



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102716085 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 21

(21) 申请号 201210222195. 5

CN 101015526 A, 2007. 08. 15, 全文.

(22) 申请日 2012. 06. 29

US 2009192184 A1, 2009. 07. 30, 全文.

(73) 专利权人 海南灵康制药有限公司

审查员 孙迎琪

地址 570216 海南省海口市保税区 8 号厂房

(72) 发明人 陶灵刚

(74) 专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理

事务所 (普通合伙) 11369

代理人 刘冬梅

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006. 01)

A61K 31/4745(2006. 01)

A61K 47/36(2006. 01)

A61K 47/28(2006. 01)

A61K 47/24(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005002546 A1, 2005. 01. 13, 全文.

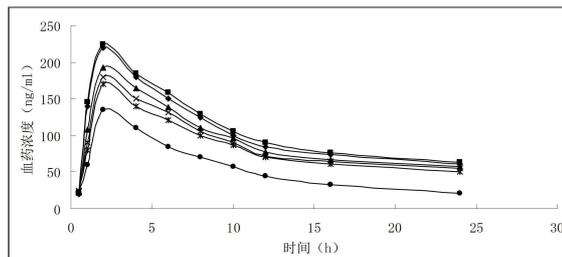
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

一种盐酸托泊替康脂质体注射剂

(57) 摘要

本发明公开一种盐酸托泊替康脂质体注射剂及其制法。该脂质体注射剂由特定重量配比的盐酸托泊替康、胆固醇琥珀酸酯、二月桂酰磷脂酰胆碱、PEG600、吐温 60、海藻糖和甘露醇制成。本发明的脂质体注射剂具有良好的制剂稳定性,冷冻过程中脂质体不会因融合、冰晶等发生破裂,长期储存后,脂质体同样保持良好的包封率;本发明提高了盐酸托泊替康的溶解度,提高了制剂产品的质量,减少了毒副作用,增加了药物在体循环中的保留时间,提高了药物的生物利用度,疗效明显提高;并且制备方法简单,适合于工业化大生产。



1. 一种盐酸托泊替康脂质体注射剂,其特征在于由以下重量配比的成分制成:

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	10-100 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	20-300 份
PEG600	10-50 份
吐温 60	10-60 份
海藻糖	10-150 份
甘露醇	10-150 份,

其中所述的胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1 : 1-1:3,且其制备方法包括如下步骤:

(1) 将胆固醇琥珀酸酯、二月桂酰磷脂酰胆碱、吐温 60 溶解于有机溶剂中,搅拌使其溶解;将上述溶液置于茄形瓶中,45℃水浴减压除去有机溶剂,在瓶壁上形成均匀透明薄膜;

(2) 在氮气保护下,向瓶中加入含有盐酸托泊替康和 PEG600 的水溶液,搅拌,使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合,水化完全后在 200bar 到 800bar 做梯度均质 4 ~ 6 遍,0.22 μm 微孔滤膜过滤,制得盐酸托泊替康脂质体;

(3) 无菌条件下,将处方量的海藻糖和甘露醇溶于注射用水中,然后加入到盐酸托泊替康脂质体中,加注射用水定容,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,灌装,然后进行冻干,即得盐酸托泊替康脂质体注射剂。

2. 根据权利要求 1 所述的盐酸托泊替康脂质体注射剂,其特征在于由以下重量配比的成分制成:

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	40-80 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	60-160 份
PEG600	20-50 份
吐温 60	10-20 份
海藻糖	20-50 份
甘露醇	30-60 份,

其中所述的胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:2。

3. 一种制备权利要求 1 或 2 所述的盐酸托泊替康脂质体注射剂的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将胆固醇琥珀酸酯、二月桂酰磷脂酰胆碱、吐温 60 溶解于有机溶剂中,搅拌使其溶解;将上述溶液置于茄形瓶中,45℃水浴减压除去有机溶剂,在瓶壁上形成均匀透明薄膜;

(2) 在氮气保护下,向瓶中加入含有盐酸托泊替康和 PEG600 的水溶液,搅拌,使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合,水化完全后在 200bar 到 800bar 做梯度均质 4 ~ 6 遍,0.22  $\mu$  m 微孔滤膜过滤,制得盐酸托泊替康脂质体;

(3) 无菌条件下,将处方量的海藻糖和甘露醇溶于注射用水中,然后加入到盐酸托泊替康脂质体中,加注射用水定容,经 0.22  $\mu$  m 微孔滤膜过滤,灌装,然后进行冻干,即得盐酸托泊替康脂质体注射剂。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,其中步骤(1)中所述的有机溶剂是体积比为 1 :3 的甲醇和叔丁醇的混合溶剂。

5. 根据权利要求 3 所述的盐酸托泊替康脂质体注射剂的制备方法,其特征在于步骤(3)中所述的冻干的过程为:在  $-20 \sim -50^{\circ}\text{C}$  预冻 2 ~ 4 小时,接着在  $-40^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$  冷冻 6 ~ 8 小时,再经 12 ~ 24 小时升华至  $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ,最后在  $30^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$  干燥 6 ~ 12 小时。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的盐酸托泊替康脂质体注射剂在制备抗肿瘤药中的应用。

## 一种盐酸托泊替康脂质体注射剂

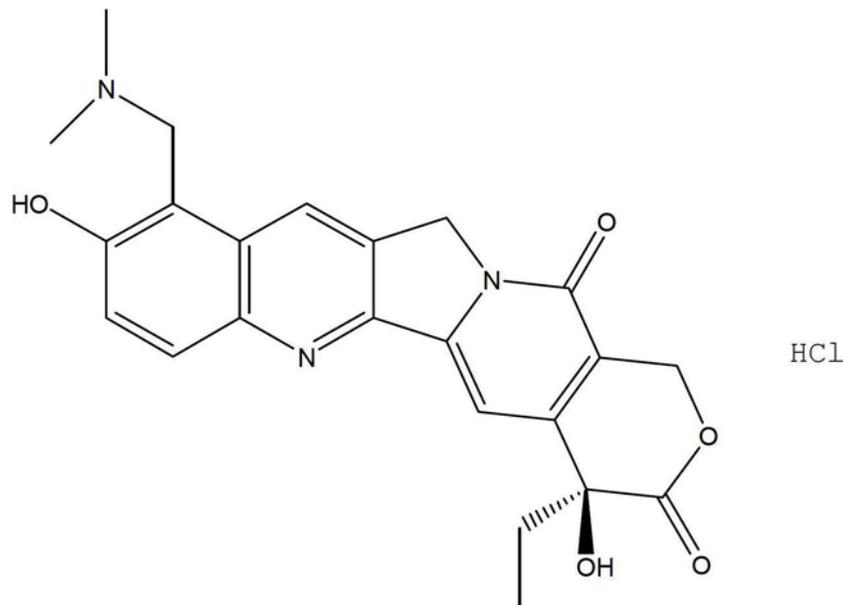
### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种脂质体注射剂及其制法,具体涉及一种盐酸托泊替康脂质体注射剂及其制法,属于医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 盐酸托泊替康,化学名称为(S)-10[(二甲氨基)甲基]-4-乙基-4,9-二羟基-1H-吡喃[3',4':6,7]中氮茛[1,2-b]喹啉-3,14-(4H,12H)-二酮单盐酸盐。结构式如下:

[0003]



[0004] 托泊替康(Topotecan, 英文商品名为 Hycamtin, 中文商品名为和美新)是 SmithklineBeecham 制药公司于 1996 年在美国上市的半合成抗肿瘤新药,也是世界上第一个作用于拓扑异构酶 I 的抗肿瘤药物。托泊替康是半合成的喜树碱类化合物,化学名为 9-二甲氨基喜树碱,分子式为  $C_{23}H_{23}N_3O_5 \cdot HCl$ , 分子量为 457.9。它是在羟基喜树碱化学结构 A 环的第 9 个位置上引进了一个稳定的碱基侧链,并在手性碳 20 的位置上保留了 S 构象,引入的碱基侧链增加了该化合物的水溶性,减少了 E 环上具有生物活性的内酯水解,与其它喜树碱类药物相比,具有更强的抗肿瘤活性,而毒副反应较少。托泊替康是一种新型的抗肿瘤药物,作用机制类似其它喜树碱,是一种特异性的拓扑异构酶 I 抑制剂。在 DNA 复制前期,托泊替康特异性地与 DNA 单链断端上的拓扑异构酶 I 结合,形成稳定的复合物,阻止拓扑异构酶 I 对单链断端的修复,致使 DNA 双链结构破坏,最终导致肿瘤细胞死亡。基础研究表明,托泊替康对多种移植性的鼠、人肿瘤有效,包括 P388 白血病、Lewis 肺癌和 B16 黑色素瘤等,特别是对耐药的 HT-29 人结肠癌细胞株,托泊替康可以诱导肿瘤消退及延缓其生长。另外,在对托泊替康敏感的肿瘤中,给药时间的长短与抗肿瘤的活性成正比,其持续性治疗的抗癌活性明显优于冲击性治疗。对移植至探鼠体内的卵巢癌细胞进行观察发现,

局部注射托泊替康,肿瘤抑制率可达 75%。美国和欧洲对托泊替康进行大量的 I 期临床研究,结果表明,它对卵巢癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、直肠癌、急性白血病等多种肿瘤具有作用。II 期临床研究证明,托泊替康对卵巢上皮性癌具有良好的治疗效果,尤其是对经过含铂类药物一线治疗后病情恶化的晚期卵巢上皮癌患者有效。II 期临床研究还发现托泊替康对小细胞肺癌包括一线化疗失败后的敏感型小细胞肺癌也有较好的疗效,总的缓解率在 19%~39.8% 之间。另外,托泊替康对头颈部肿瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、软组织肉瘤、神经胶质瘤等疾病治疗有效。目前上市的盐酸托泊替康剂型为注射剂,标准编号:WS1-(X-362)-2004Z。

[0005] US2009192184(A) 公开了两种盐酸托泊替康的新的结晶形式和制备方法。CN101951891A 公开了一种包括盐酸托泊替康的固态单位剂型的药物组合物,其制备方法选择制备固体分散体,但这种制备方法十分复杂,时间较长,难于适用于工业大生产。

[0006] 在药物载体输送系统中,微乳、微球、纳米粒、脂质体、药质体等亚微粒的研究已经成为药物新剂型研究中非常活跃的领域。将药物包封于这些亚微粒中可以改变药物在体内的分布,增加药物在靶器官的分布量,从而提高疗效,减轻毒副作用。

[0007] 在靶向给药系统中,脂质体的研究较为广泛,脂质体在体内具有良好的靶向性和生物相容性。作为一种新型药物制剂,脂质体制剂具有以下优点:(1)具有缓释作用:活性成分缓慢释放,延缓肾排泄和代谢,从而延长作用时间,提高质量效果;(2)降低药物毒性;(3)增加药物的溶解性,提高制剂质量;(4)具有靶向性:脂质体所载的药物在肝、脾网状内皮系统脏器局部维持高浓度,从而起到药物器官靶向性作用;(5)具有对活性药物成分的保护作用。

[0008] CN101015526A 公开了一种拓扑替康脂质体及其制备方法,拓扑替康与磷脂的重量配比为 1 : 0.5 ~ 100。所述的生物可接受的磷脂选自天然磷脂、氢化大豆磷脂和合成磷脂中的一种。还可以含有胆固醇和支持剂。所述的支持剂选自葡萄糖、甘露醇、蔗糖、山梨醇、右旋糖苷、乳糖和海藻糖中的一种,磷脂与支持剂重量配比为 1 : 0.01 ~ 500。其制备方法包括:薄膜分散法、注入法、超声波分散法、冷冻干燥法、冻融法、高压挤出法、均质机制备法和高压微射流制备法。W00202077A3 公开了鞘磷脂和胆固醇的比例(摩尔比例)约为 30 : 70 至约 60 : 40 托泊替康脂质体。W02005002546A1 公开了冻干的拓扑替康脂质体,以避免托泊替康降解。W02010057317A1 公开了包括或基本上由二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)和胆固醇(CHOL)组成的脂质体制剂,在一个实施例中,脂质体组合物包括摩尔比为 7 : 2 : 1 的 DSPC : DSPG : CHOL 和拓扑替康。

[0009] 专利 CN101744764 公开了一个空囊脂质体和盐酸拓扑替康囊脂质体及其制备方法;其中脂质成分包括两亲性脂质和中性脂肪,所述的两亲性脂质为选自卵磷脂、大豆磷脂、氢化大豆磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、硬脂胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、脑磷脂、鞘磷脂、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸和二棕榈酰磷脂酰甘油中的一种或几种。

[0010] CN101744767A 公开了包含喜树碱类抗肿瘤药物的热敏脂质体制剂。其中包含喜树碱类抗肿瘤药物、普通类脂、相变调节剂和任选的长循环材料,其中相变调节剂占脂质重量的 6-100%,长循环材料占脂质重量的 0-40%,喜树碱类药物与脂质的重量比为 1 : 0.5 ~ 1 : 100。该脂质体制剂的特征是该类脂质体具有热敏性,但这种方法制备过程过于复杂,

脂质体的包封率和粒径都得不到保证。

[0011] 托泊替康虽然在上述脂质体中其稳定性得到了改善,且有利于降低托泊替康的副作用,提高其疗效。然而上述脂质体制剂在技术和效果上依然存在各种不同的缺陷,或者其稳定性不理想而不利于长期存放,或者不能有效控制脂质体制剂的质量例如粒子大小不均匀合适和形状不完整,或者药品释放度和生物利用度不适合,因而上述脂质体制剂依然不能满足临床需求。目前,对于优良的盐酸托泊替康脂质体注射剂依然存在需求且不断成为研发热点,需要提供适当释放度的盐酸托泊替康脂质体制剂,以降低托泊替康的副作用,并提高其疗效。

[0012] 一般而言,对于大多数的脂质体药物制剂而言,被包裹的药物的药学性质是由脂类等材料组成和药物剂量控制的。为了形成品质优良的盐酸托泊替康脂质体注射剂,重要的是寻找能与盐酸托泊替康良好相容从而将其良好包封且不渗漏的成膜材料,以及寻找能使脂质体形成稳定注射剂的赋形剂成分。

### 发明内容

[0013] 本发明人在对现有技术不断摸索和改良的基础上,经过锐意研究发现,通过选用特定重量配比的盐酸托泊替康、胆固醇琥珀酸酯、二月桂酰磷脂酰胆碱、PEG600、吐温 60、海藻糖和甘露醇进行组合,可以形成品质优异的盐酸托泊替康脂质体注射剂,从而完成本发明。

[0014] 为了实现上述目的,本发明人进行的大量研究和实现,发现特定重量配比的盐酸托泊替康、胆固醇琥珀酸酯、二月桂酰磷脂酰胆碱、PEG600、吐温 60,海藻糖和甘露醇能制成盐酸托泊替康脂质体注射剂,其中,与现有技术中的盐酸托泊替康注射剂或者上述文献涉及的盐酸托泊替康脂质体相比,作为药物活性成分的盐酸托泊替康的包封率更高,脂质体粒径小且分布均匀,本发明制剂的药物活性成分在体循环中的保留时间延长适当,药物的生物相容性和生物利用度明显提高,从而明显提高其疗效。

[0015] 一方面,本发明提供一种盐酸托泊替康脂质体注射剂,其脂质体主要由以下重量配比的成分制成:

[0016]

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	10-100 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	20-300 份
PEG600	10-50 份
吐温 60	10-60 份。

[0017] 一般而言,作为用于形成脂质体的磷脂,可以使用天然磷脂和合成磷脂。所述磷脂包括磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱、蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、蛋黄磷脂酰甘油、蛋黄磷脂酰丝氨酸、蛋黄磷脂酰肌醇、大豆卵磷脂、氢化大豆卵磷脂、氢化卵磷脂、卵磷脂酰甘油、卵磷脂酰丝氨酸、卵磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酸磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二豆蔻酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰

胆碱 (DLPC)、二油酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二月桂酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE) 和聚乙二醇衍生化磷脂例如二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 - 聚乙二醇 2000 ;二软酯酰胆磷脂 - 聚乙二醇 2000 ;氢化大豆磷脂酰胆碱 - 聚乙二醇 2000 ;二油酰磷脂酰胆碱 - 聚乙二醇 2000 等。附加剂一般选用胆固醇、维生素 E、十八胺、磷酸二鲸蜡酯。在本发明中,作为药物活性成分的盐酸托泊替康,其水溶性良好,脂溶性差。针对盐酸托泊替康的特点,本发明人通过研究发现二月桂酰磷脂酰胆碱特别适于作为盐酸托泊替康的基础磷脂成膜材料。

[0018] 二月桂酰磷脂酰胆碱容易获得,价格低廉,二月桂酰磷脂酰胆碱的相变温度合适,易于形成稳定的脂质体膜。为了改善药物脂质体的稳定性等性质,所用二月桂酰磷脂酰胆碱的纯度为 98% 以上,优选 99% 以上。本发明人在大量的筛选实验时发现,当使用二月桂酰磷脂酰胆碱之外的其他常规磷脂时,不利于形成品质优良的盐酸托泊替康脂质体,所得脂质体在高温 40°C、相对湿度 75%±5% 的加速试验下,包封率、稳定性、和渗漏率等性质较差。

[0019] 在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中,相对于 2 重量份的盐酸托泊替康而言,二月桂酰磷脂酰胆碱的用量为 20-300 重量份。如果二月桂酰磷脂酰胆碱的用量低于 20 重量份,则无法形成稳定的脂质体;反之,如果二月桂酰磷脂酰胆碱的用量的用量高于 300 重量份,则作为药物活性成分的盐酸托泊替康的包封率下降,注射剂的品质以及疗效降低,优选在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中,相对于 2 重量份的盐酸托泊替康而言,二月桂酰磷脂酰胆碱的用量为 60-160 重量份。

[0020] 在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中,胆固醇琥珀酸酯和 PEG600 以及吐温 -60 用于调节脂质体的膜稳定性和通透性,以获得稳定的盐酸托泊替康脂质体注射剂和适当的盐酸托泊替康释放。

[0021] 一方面,本发明提供一种盐酸托泊替康脂质体注射剂,其脂质体主要由以下重量配比的成分制成:

[0022]

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	10-100 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	20-300 份
PEG600	10-50 份

[0023]

吐温 60	10-60 份。
-------	----------

[0024] 优选地,本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂,其脂质体主要由以下重量配比的成分制成:

[0025]

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	10-100 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	20-300 份
PEG600	10-50 份
吐温 60	10-60 份。

[0026] 优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:1-1:3,更优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:2。

[0027] 进一步优选地,本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂,其脂质体主要由以下重量配比的成分制成:

[0028]

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	40-80 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	60-160 份
PEG600	20-50 份
吐温 60	10-20 份。

[0029] 优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:1-1:3,更优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:2。

[0030] 在本发明的脂质体中,胆固醇琥珀酸酯和吐温 60 用于调节脂质体的膜稳定性和通透性。胆固醇琥珀酸酯 (cholesterol hemisuccinate, CHS) 是胆固醇的琥珀酯衍生物,又名胆固醇半琥珀酸酯,胆固醇半丁二酸酯,是一种抗动脉硬化的原料药。胆固醇琥珀酸酯除了荷负电荷外,还具有较好的脂质体膜稳定作用。这种胆固醇的琥珀酸衍生物,体内可生物降解,不存在安全性风险,可以安全的作为负电性材料使用。

[0031] 胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱相结合,阻止其凝聚成晶体结构。胆固醇琥珀酸酯掺入二月桂酰磷脂酰胆碱双层,类似于“缓冲剂”一样起到调节膜结构“流动性”的作用。当低于相变温度时,胆固醇琥珀酸酯可以使膜减少有序排列,增加流动性;当高于相变温度时,胆固醇琥珀酸酯可以增加膜的有序排列,从而降低膜的流动性。胆固醇琥珀酸酯能使脂质体双分子层膜固化,从而减少自由基的生成,降低氧化水平,使脂质体稳定性显著增强。

[0032] 优选在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中,相对于 2 重量份的盐酸托泊替康而言,胆固醇琥珀酸酯的用量优选为 40-80 重量份。优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:1-1:3,更优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:2。在对比实验中,本发明盐酸托泊替康脂质中的胆固醇琥珀酸酯显著优于胆固醇。

[0033] 本发明人经过研究发现,当胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:1-1:3 时,能形成稳定的盐酸托泊替康脂质体。当胆固醇琥珀酸酯的重量与二月桂酰磷脂酰胆碱重量比低于 1:1 时,膜稳定性降低,盐酸托泊替康易于渗漏;当胆固醇琥珀酸酯

的重量与二月桂酰磷脂酰胆碱重量比高于 1:3 时, 盐酸托泊替康脂质体膜流动性过高, 被包裹在脂质体内的盐酸托泊替康易于释放。此外, 研究发现, 当胆固醇琥珀酸酯的重量与二月桂酰磷脂酰胆碱重量比为 1:1-1:3 时, 所形成的脂质体毒性低。

[0034] 本发明所用的 PEG600 也用于调节二月桂酰磷脂酰胆碱膜的稳定性和通透性, 不受理论限制, 本发明人令人惊奇地发现, 加入 PEG600 可以改变盐酸托泊替康脂质体的药性, 聚乙二醇 600 有一定粘度和表面活性作用, 可降低脂质体与胃肠道黏液之间的表面张力, 促进药物进入胃肠黏膜, 从而提高生物利用度和治疗效果。经研究, 发明人发现 PEG600 优于 PEG400、PEG800 或 PEG1000 等其他聚乙二醇。

[0035] 研究表明, 脂质体的稳定性与生物利用度有密切的对应关系。稳定性越高, 生物利用度越高。因此, 本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂的稳定性高, 是导致药物生物利用度高的因素之一。

[0036] 另一方面, 本发明人研究发现, 在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中, 相对于 2 重量份的盐酸托泊替康而言, 二月桂酰磷脂酰胆碱的用量为 20-300 重量份, 胆固醇琥珀酸酯为 10-100 重量份, PEG600 为 10-50 重量份, 且胆固醇琥珀酸酯的重量与二月桂酰磷脂酰胆碱重量比为 1:1-1:3 优选 1:2 时, 所形成的盐酸托泊替康脂质体注射剂的包封率高, 重量最优。

[0037] 在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中, 优选, 使用吐温 60 来进一步改进脂质体膜的稳定性。吐温 60 是一种非离子表面活性剂, 当用于二月桂酰磷脂酰胆碱双层膜中时, 能提高该双层膜之间的化学能, 从而提高脂质体在水性液体中的化学稳定性, 进而提高盐酸托泊替康脂质体注射剂的稳定性。

[0038] 在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中, 相对于 2 重量份的盐酸托泊替康而言, 吐温 60 的用量为 10-60 重量份。如果吐温 60 的用量低于 10 重量份, 则由于其用量过低导致对盐酸托泊替康脂质体注射剂的稳定性改进不够, 反之, 如果吐温 60 的用量高于 60 重量份, 则用于其用量过高而导致脂质体膜易于泄露。在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中, 相对于 2 重量份的盐酸托泊替康而言, 吐温 60 的用量优选为 10-20 重量份。

[0039] 研究发现, 当使用上述特定量的盐酸托泊替康、二月桂酰磷脂酰胆碱、胆固醇琥珀酸酯、PEG600 和吐温 60 时, 可以得到品质优良的盐酸托泊替康脂质体, 其包封率和稳定性都很高, 毒性低, 生物利用度高。

[0040] 在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中, 进一步优选使用海藻糖和甘露醇作为赋形剂, 用于形成稳定的注射剂。海藻糖是由两个葡萄糖分子以  $\alpha, \alpha, 1, 1$ -糖苷键构成的非还原性糖, 自身性质非常稳定, 它最明显的性质是在无水的条件下有保护生物膜的能力, 使脂质体即使在脱水的情况下也保持形态完整。在本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂中, 海藻糖能有效保护脂质体颗粒的形态和稳定性, 进一步提高脂质体注射剂的稳定性。甘露醇在医药上是良好的利尿剂, 降低颅内压、眼内压及治疗肾药、脱水剂、食糖代用品、也用作药片的赋形剂及固体、液体的稀释剂, 尤其能为冻干粉针剂提供良好的成型支撑。本发明发现, 使用海藻糖和甘露醇作为冻干赋形剂, 有利于维持盐酸托泊替康脂质体的稳定, 从而能形成稳定注射剂, 而应用其它的冻干赋形剂或组合包括海藻糖或甘露醇单独作为冻干赋形剂均不如海藻糖和甘露醇作为冻干赋形剂, 其原因不清, 可能是海藻糖和甘露醇的不同性质发挥了协同效果。

[0041] 本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂,其盐酸托泊替康(以托泊替康计)的规格可以为 2mg 或 4mg。

[0042] 一方面,本发明提供一种盐酸托泊替康脂质体注射剂,其主要由以下重量配比的成分制成:

[0043]

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	10-100 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	20-300 份
PEG600	10-50 份
吐温 60	10-60 份
海藻糖	10-150 份
甘露醇	10-150 份

[0044] 优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1 : 1-1:3,更优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:2。

[0045] 进一步优选地,本发明的盐酸托泊替康脂质体注射剂,主要由以下重量配比的成分制成:

[0046]

盐酸托泊替康	2 份
胆固醇琥珀酸酯	40-80 份
二月桂酰磷脂酰胆碱	60-160 份
PEG600	20-50 份
吐温 60	10-20 份
海藻糖	20-50 份
甘露醇	30-60 份

[0047] 优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1 : 1-1:3,更优选地,胆固醇琥珀酸酯与二月桂酰磷脂酰胆碱之间的重量比为 1:2。

[0048] 另一方面,本发明还提供一种盐酸托泊替康脂质体注射剂的制备方法,具体包括如下制备步骤:

[0049] (1) 将胆固醇琥珀酸酯、二月桂酰磷脂酰胆碱、吐温 60 溶解于有机溶剂中,搅拌使其溶解;将上述溶液置于茄形瓶中,45℃水浴减压除去有机溶剂,在瓶壁上形成均匀透明薄膜;

[0050] (2) 在氮气保护下,向瓶中加入含有盐酸托泊替康和 PEG600 的水溶液,搅拌,使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合,水化完全后在 200bar 到 800bar 做梯度均质 4 ~ 6 遍优选 5 遍,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,制得盐酸托泊替康脂质体;

[0051] (3) 无菌条件下,将处方量的海藻糖和甘露醇溶于注射用水中,然后加入到盐酸托泊替康脂质体中,加注射用水定容,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,灌装,然后进行冻干,即得盐酸托泊替康脂质体注射剂。

[0052] 上述所述的制备方法,其中步骤(1)中所述的有机溶剂选自乙醇、氯仿、二氯甲烷、甲醇、正丁醇、异丙醇、丙酮、苯甲醇、叔丁醇、乙腈、正己烷中的一种或几种,优选体积比为 1:3 的甲醇和叔丁醇的混合溶剂。

[0053] 上述所述的制备方法,其中步骤(2)中在 200bar 到 800bar 做梯度均质 5 遍。

[0054] 上述所述的制备方法,其中步骤(3)中所述的冻干的过程为:在 -20~-50℃ 预冻 2~4 小时,接着在 -40℃~-50℃ 冷冻 6~8 小时,再经 12~24 小时升华至 20℃~25℃,最后在 30℃~35℃ 干燥 6~12 小时。

[0055] 有益效果

[0056] 本发明的脂质体注射剂减少了毒副作用,提高了制剂产品质量,具有良好的制剂稳定性,冷冻过程中脂质体不会因脱水、融合、冰晶等发生破裂,长期储存后,脂质体同样保持良好的包封率。

[0057] 通过本发明方法制得的盐酸托泊替康脂质体注射剂,提高了盐酸托泊替康的溶解度,提高了制剂产品的质量,减少了毒副作用,增加了药物在体循环中的保留时间,提高了药物的生物利用度,疗效明显提高;并且制备方法简单,适合于工业化大生产。

#### 附图说明

[0058] 图 1 是实施例 1、3 及对比例 1、2、4 中制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂以及市售盐酸托泊替康注射剂的血药浓度-时间曲线。

[0059] 其中:

[0060]

—◆— 实施例1 —■— 实施例3 —▲— 对比例1 —✕— 对比例3 —✱— 对比例4 —●— 上市剂

#### 具体实施方式

[0061] 以下通过具体优选的实施例对本发明进行进一步说明。这些实施例仅是说明性的,并不应理解为对本发明的限制。

[0062] 实施例 1 盐酸托泊替康脂质体注射剂的制备

[0063] 所用成分及其重量如下:

[0064]

盐酸托泊替康	2g
胆固醇琥珀酸酯	40g
二月桂酰磷脂酰胆碱	80g
PEG600	30g
吐温 60	10g
海藻糖	40g
甘露醇	60g

[0065] 采用如下工艺制备盐酸托泊替康脂质体注射剂：

[0066] (1)将 40g 胆固醇琥珀酸酯、80g 二月桂酰磷脂酰胆碱、和 10g 吐温 60 溶于体积比为 1 :3 的甲醇和叔丁醇的混合溶剂 2000ml 中，搅拌使其溶解；将上述溶液置于茄形瓶中，45℃水浴减压除去有机溶剂，在瓶壁上形成均匀透明薄膜；

[0067] (2) 在氮气保护下，向瓶中加入含有 2g 盐酸托泊替康和 30g PEG600 的水溶液 3000ml，搅拌，使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合，水化完全后在 200bar 到 800bar 做梯度均质 5 遍，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，制得盐酸托泊替康脂质体；

[0068] (3) 无菌条件下，将 40g 海藻糖和 60g 甘露醇溶于注射用水 500ml 中，然后加入到盐酸托泊替康脂质体中，加注射用水定容，经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤，灌装，然后在 -45℃预冻 2 小时，接着在 -50℃冷冻 6 小时，再经 20 小时升华至 25℃，最后在 30℃干燥 10 小时，即得 1000 支盐酸托泊替康脂质体注射剂。

[0069] 实施例 2 盐酸托泊替康脂质体注射剂的制备

[0070] 所用成分及其重量如下：

[0071]

盐酸托泊替康	2g
胆固醇琥珀酸酯	80g
二月桂酰磷脂酰胆碱	160g
PEG600	50g
吐温 60	20g
海藻糖	40g
甘露醇	60g

[0072] 采用如下工艺制备盐酸托泊替康脂质体注射剂：

[0073] (1)将 80g 胆固醇琥珀酸酯、160g 二月桂酰磷脂酰胆碱、和 20g 吐温 60 溶于体积比为 1 :3 的甲醇和叔丁醇的混合溶剂 3500ml 中，搅拌使其溶解；将上述溶液置于茄形瓶中，45℃水浴减压除去有机溶剂，在瓶壁上形成均匀透明薄膜；

[0074] (2) 在氮气保护下，向瓶中加入含有 2g 盐酸托泊替康和 50g PEG600 的水溶液 5000ml，搅拌，使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合，水化完全后在 200bar 到 800bar 做梯度均质

5 遍, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 制得盐酸托泊替康脂质体;

[0075] (3) 无菌条件下, 将 40g 海藻糖和 60g 甘露醇溶于注射用水 500ml 中, 然后加入到盐酸托泊替康脂质体中, 加注射用水定容, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 灌装, 然后在  $-40^{\circ}\text{C}$  预冻 3 小时, 接着在  $-45^{\circ}\text{C}$  冷冻 7 小时, 再经 18 小时升华至  $20^{\circ}\text{C}$ , 最后在  $33^{\circ}\text{C}$  干燥 8 小时, 即得 1000 支盐酸托泊替康脂质体注射剂。

[0076] 实施例 3 盐酸托泊替康脂质体注射剂的制备

[0077] 所用成分及其重量如下:

[0078]

盐酸托泊替康	4g
胆固醇琥珀酸酯	120g
二月桂酰磷脂酰胆碱	240g
PEG600	80g
吐温 60	30g
海藻糖	80g
甘露醇	100g

[0079] 采用如下工艺制备盐酸托泊替康脂质体注射剂:

[0080] (1) 将 120g 胆固醇琥珀酸酯、240g 二月桂酰磷脂酰胆碱、和 30g 吐温 60 溶于体积比为 1:3 的甲醇和叔丁醇的混合溶剂 6000ml 中, 搅拌使其溶解; 将上述溶液置于茄形瓶中,  $45^{\circ}\text{C}$  水浴减压除去有机溶剂, 在瓶壁上形成均匀透明薄膜;

[0081] (2) 在氮气保护下, 向瓶中加入含有 4g 盐酸托泊替康和 80g PEG600 的水溶液 8000ml, 搅拌, 使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合, 水化完全后在 200bar 到 800bar 做梯度均质 5 遍, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 制得盐酸托泊替康脂质体;

[0082] (3) 无菌条件下, 将 80g 海藻糖和 100g 甘露醇溶于注射用水 900ml 中, 然后加入到盐酸托泊替康脂质体中, 加注射用水定容, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 灌装, 然后在  $-35^{\circ}\text{C}$  预冻 4 小时, 接着在  $-40^{\circ}\text{C}$  冷冻 8 小时, 再经 20 小时升华至  $25^{\circ}\text{C}$ , 最后在  $35^{\circ}\text{C}$  干燥 8 小时, 即得 1000 支盐酸托泊替康脂质体注射剂。

[0083] 对比例 1-4 盐酸托泊替康脂质体注射剂的制备

[0084] 采用与分别与实施例 1-3 中相同的生产工艺, 将如下表 1 中所示的对比例 1-4 中的成分分别制成盐酸托泊替康脂质体注射剂:

[0085] 表 1 对比例 1-4 中所用成分

[0086]

成份	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
盐酸托泊替康	2g	2g	4g	2g
胆固醇琥珀酸酯	40g	/	120g	100g
胆固醇	/	80g	/	/
二月桂酰磷脂酰胆碱	/	/	/	100g
二硬脂酰磷脂酰胆碱	80g	/	/	/
二棕榈酰磷脂酰胆碱	/	160g	/	/
卵磷脂	/	/	240g	100g
PEG600	30g	/	80g	/
PEG800	/	50	/	/
吐温 60	/	20g	/	30g
吐温 80	10g	/	30g	/
海藻糖	40g	40g	80g	8g
甘露醇	60g	60g	100g	160g

[0087] 其中，“/”表示未使用。

[0088] 试验例 1 脂质体粒径的测定

[0089] 室温条件下，取实施例 1-3 和对比例 1-4 中的盐酸托泊替康脂质体注射剂，置于 Submicron Particle Sizer Model 370 粒径检测仪的样品管中，测定粒径大小分布及平均粒径；用投射电子显微镜观察粒子形态，结果示于下表 2 中。

[0090] 表 2 脂质体粒径检测结果

	编号	平均粒径	外观
[0091]	实施例 1	125.9nm	球状，均匀
	对比例 1	286.8nm	不均匀，杂乱
	实施例 2	131.2nm	球状，均匀
	对比例 2	324.4nm	不均匀，杂乱
	实施例 3	127.6nm	球状，均匀
	对比例 3	357.6nm	不均匀，杂乱
	对比例 4	246.5nm	不均匀，杂乱

[0092] 从表 2 可知，实施例 1-3 制得的脂质体粒径均匀，显球形，大小均一；对比例 1-4 制得的脂质体粒径不均匀，形状不定，大小不一。

[0093] 具体而言，即使在采用同样的生产工艺时，实施例 1-3 中所得盐酸托泊替康脂质体的颗粒外观及其平均粒径明显优于对比例 1-4 中所得的盐酸托泊替康脂质体。说明当使用本发明所用成分以外的成分时，或者当成分用量在本发明限定的成分用量范围外时，所得盐酸托泊替康脂质体的外观劣于本发明，平均粒径明显大出很多。

[0094] 试验例 2 包封率的测定

[0095] 将实施例 1-3 和对比例 1-4 中制备的盐酸托泊替康脂质体以 5000r/min 的转速高速离心，离心 20 分钟，取上清液，用甲醇溶解，HPLC 法测盐酸托泊替康含量，计算包封率，结果示于下表 3 中。

[0096] 表 3 包封率测定结果

[0097]

编号	实施例 1	对比例 1	实施例 2	对比例 2	实施例 3	对比例 3	对比例 4
包封率	96.4%	79.2%	97.7%	78.9%	96.8%	73.2%	76.3%

[0098] 由表 3 可知,实施例 1-3 制备的脂质体制剂的包封率显著的高于对比例 1-4 的脂质体制剂的包封率。说明当使用本发明所用成分以外的成分时,或者当成分用量在本发明限定的成分用量范围外时,所得脂质体的脂质体包封率低于本发明。本发明实施例 1-3 所制备的脂质体制剂的包封率也显著高于上述文献所述的托泊替康脂质体制剂的包封率。

#### [0099] 试验例 3 稳定性考察

[0100] 将本发明实施例 1-3 和对比例 1-4 中制备的样品和上市注射用盐酸托泊替康冻干粉针(批号:20100526,江苏奥赛康药业股份有限公司)分别置于高温 40℃、相对湿度 75% 的条件下 6 个月,进行加速试验考察,实验结果示于下表 4 中。

[0101] 表 4 加速试验结果

[0102]

时间	样品	性状	有关物质 (%)	含量 (%)
0 月	实施例 1	白色冻干粉末	0.89	99.9
	实施例 2	白色冻干粉末	0.90	99.8
	实施例 3	白色冻干粉末	0.92	99.8
	对比例 1	白色冻干粉末	1.14	99.5
	对比例 2	白色冻干粉末	1.16	99.5
	对比例 3	白色冻干粉末	1.18	99.4
	对比例 4	白色冻干粉末	1.14	99.5

[0103]

	上市制剂	白色冻干粉末	1.25	99.2
1 月	实施例 1	白色冻干粉末	0.90	99.9
	实施例 2	白色冻干粉末	0.91	99.8
	实施例 3	白色冻干粉末	0.91	99.7
	对比例 1	白色冻干粉末	1.22	99.2
	对比例 2	白色冻干粉末	1.20	99.1
	对比例 3	白色冻干粉末	1.23	99.0
	对比例 4	白色冻干粉末	1.21	99.1
	上市制剂	白色冻干粉末	1.49	98.1
2 月	实施例 1	白色冻干粉末	0.91	99.8
	实施例 2	白色冻干粉末	0.93	99.7
	实施例 3	白色冻干粉末	0.92	99.6
	对比例 1	白色冻干粉末	1.42	98.7
	对比例 2	白色冻干粉末	1.43	98.4
	对比例 3	白色冻干粉末	1.45	98.5
	对比例 4	白色冻干粉末	1.44	98.6
	上市制剂	白色冻干粉末	1.57	97.4
3 月	实施例 1	白色冻干粉末	0.92	99.8
	实施例 2	白色冻干粉末	0.94	99.6
	实施例 3	白色冻干粉末	0.92	99.6
	对比例 1	白色冻干粉末	1.90	97.6
	对比例 2	白色冻干粉末	1.91	97.5
	对比例 3	白色冻干粉末	1.92	97.4
	对比例 4	白色冻干粉末	1.91	97.5
	上市制剂	白色冻干粉末	2.08	96.3
6 月	实施例 1	白色冻干粉末	0.92	99.7
	实施例 2	白色冻干粉末	0.94	99.5
	实施例 3	白色冻干粉末	0.96	99.4
	对比例 1	白色冻干粉末	2.09	95.8
	对比例 2	白色冻干粉末	2.10	95.7
	对比例 3	白色冻干粉末	2.11	95.8
	对比例 4	白色冻干粉末	2.10	95.8
	上市制剂	白色冻干粉末	2.24	94.9

[0104] 由表 4 可知,加速 6 月时,上市制剂和对比例 1-4 的含量降低,有关物质升高;而本发明的样品性状、含量和有关物质变化均不明显,说明本发明的产品稳定性好。

#### [0105] 试验例 4 渗漏率试验

[0106] 取试验例 1-3 和对比例 1-4 制备的样品,在室温条件下,分别于 0 天、30 天、60 天、90 天和 180 天,定期检查,测定包封率,与 0 天包封的药量比较,计算渗漏率,结果示于下表 5 中。

#### [0107] 表 5 渗漏率试验结果

时间	渗漏率 (%)						
	实施例 1	实施例 2	实施例 3	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
0 天	0.31	0.34	0.32	0.90	0.87	0.93	0.90
30 天	0.34	0.36	0.39	1.39	1.56	1.81	1.52
60 天	0.45	0.50	0.49	3.65	3.34	4.34	3.41
90 天	0.50	0.58	0.57	6.41	4.57	7.62	5.65
180 天	0.59	0.66	0.68	7.88	8.39	11.77	7.65

[0110] 由表 5 可知,长期储存时,本发明实施例 1-3 中制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂

渗漏率变化不大,而对比例 1-4 中制备的注射剂渗漏率逐渐增大,脂质体渗漏严重,这说明本发明制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂具有更高的稳定性,也显著高于上述文献所述的托泊替康脂质体制剂的稳定性。

[0111] 试验例 5 血药浓度的测定

[0112] 将 48 只大鼠随机分成 6 组,每组分别注射给药实施例 1、3 及对比例 1、2、4 中制备的注射剂,以及市售盐酸托泊替康注射剂(批号:20100526,江苏奥赛康药业股份有限公司),注射量为 2mg 盐酸托泊替康(以托泊替康计)。给药后分别于 0.5h、1h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、16h 和 24h,采血,血样经处理后,以 HPLC-MS 法测定血药浓度。绘制实施例 1、3 中制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂、对比例 1-3 中制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂和市售盐酸托泊替康注射剂的血药浓度与时间的关系曲线,示于附图 1 中。

[0113] 由图 1 可知,与对比例 1、2、4 中制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂和市售盐酸托泊替康脂质体注射剂相比,本发明实施例制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂具有以下优点:在体内的消除速度减缓,在体循环中分布时间延长,达到了部分缓释效果,生物利用度增加。本发明实施例制备的盐酸托泊替康脂质体注射剂适合一天一次给药,相对于上述文献所述的托泊替康脂质体制剂,其释放要快的多。

[0114] 工业实用性

[0115] 由上述实施例以及实验例的结果可知,本发明的盐酸托泊替康脂质体具有良好的外观,颗粒小,粒径均匀,包封率高,稳定性高,渗漏率低,在体内的停留时间长,生物利用度高,具有良好的工业应用价值。

[0116] 以上通过具体实施方式和实施例对本发明进行了详细说明,不过应理解,这些说明并不对本发明的范围构成任何限制,在不偏离本发明的精神和保护范围的情况下,可以对本发明的技术方案及其实施方式进行多种修饰、改进和替换,这些均因落入本发明的保护范围内。

[0117] 本申请中提及或引用的各个参考文献,在此全文引入作为参考。

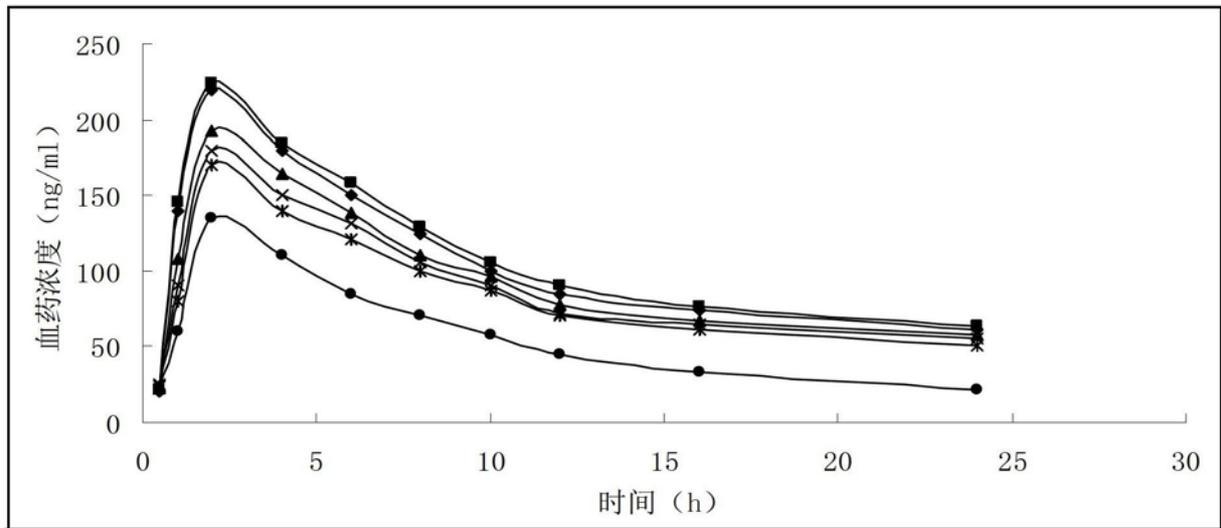


图 1