



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월05일  
 (11) 등록번호 10-0810067  
 (24) 등록일자 2008년02월27일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2003-7011489  
 (22) 출원일자 2003년09월01일  
 심사청구일자 2006년03월09일  
 번역문제출일자 2003년09월01일  
 (65) 공개번호 10-2004-0018337  
 (43) 공개일자 2004년03월03일  
 (86) 국제출원번호 PCT/IN2001/000040  
 국제출원일자 2001년03월16일  
 (87) 국제공개번호 WO 2002/69983  
 국제공개일자 2002년09월12일  
 (30) 우선권주장  
 217/MUM/2001 2001년03월01일 인도(IN)

(56) 선행기술조사문헌

US05100591  
 전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 여경숙

**(54) 암포테리신 B 수성 조성물****(57) 요약**

암포테리신 B를 포함하는 저독성 비경구용 디메틸 셀록시드-부재 수성 조성물. 수성 조성물{Amphotericin B Aqueous Composition}이 기재되어 있다. 조성물은 필수적으로 암포테리신 B외에도 인지질 및 염화나트륨으로 구성된다. 조성물은 압열멸균된다. 암포테리신 B를 용해하기 위해 용매를 사용하지 않는 본 조성물의 제조방법이 기재되어 있다. 상기 조성물은 침습성 진균감염의 치료에 바람직하다.

**특허청구의 범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

### 청구항 33

삭제

### 청구항 34

삭제

### 청구항 35

삭제

### 청구항 36

삭제

### 청구항 37

다음의 단계를 포함하는 암포테리신 B, 염화나트륨 및 인지질을 포함하는 저독성 비경구용 디메틸 셀록시드-부재 수성 조성물의 제조방법:

- (i) 하나 이상의 인지질을 비경구용으로 허용되는 하나 이상의 유기용매에 용해하고 감압 하에서 용매를 증발에 의해 제거하여 단일 또는 혼합된 인지질의 건조된 필름을 형성하는 단계;
- (ii) 염화나트륨을 포함하지 않는 비경구용으로 허용되는 수상 (aqueous phase)에서 암포테리신 B을 혼탁하는 단계 또는 염화나트륨을 포함할 수 있는 비경구용으로 허용되는 수상에서 미분화된 (micronized) 암포테리신 B을 혼탁하는 단계;
- (iii) 단계(ii)에서 형성된 혼탁된 암포테리신 B를 포함하는 수상을 단계(i)에서 얻어진 상기 인지질 필름에 첨가하고, 이들을 혼합하여 상기 수상 내에서 상기 인지질과 함께 상기 암포테리신 B의 혼탁액을 얻는 단계;
- (iv) 단계(iii)에서 얻어진 상기 혼탁액의 pH를 6.0 내지 8.0으로 조정하고 2 μ유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 균질화하는 단계; 및
- (v) 단계(iv)에 물에 용해한 염화나트륨을 충분히 첨가하여 최종 결과물의 염화나트륨 함량이 0.1% 내지 0.9% w/v가 되도록 하는 단계.

### 청구항 38

제 37 항에 있어서, 상기 방법은 (vi) 상기 단계(v)에서 얻어진 균질화된 혼탁액을 2 μ유리섬유필터에 여과하고, 여과물을 질소 하에서 바이알에 담고 바이알을 밀봉한 후 밀봉된 바이알을 압열멸균하여 비경구투여에 적합한 최종 산물을 얻는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

### 청구항 39

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 인지질은 에그 포스파티딜콜린 (EPC) 또는 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC)과 디미리스토일포스파티딜글리세롤 나트륨염(DMPG)의 혼합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

### 청구항 40

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 유기용매는 알코올성 용매, 염소화된 탄화수소 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

### 청구항 41

제 40 항에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알코올, 클로로포름, 카본 테트라클로리드 및 염화메틸렌으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 42**

제 40 항에 있어서, 상기 유기용매는 에탄올인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 43**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 암포테리신 B의 함량은 상기 조성물의 0.1% 내지 1% w/v인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 44**

제 43 항에 있어서, 상기 암포테리신 B의 함량은 상기 조성물의 0.5% w/v인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

제 37 항에 있어서, 상기 염화나트륨의 함량은 상기 조성물의 0.4% 내지 0.9% w/v인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 47**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 인지질의 함량은 상기 조성물의 0.1% 내지 1% w/v인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 48**

제 47 항에 있어서, 상기 인지질의 함량은 상기 조성물의 0.4% 내지 0.6% w/v인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 49**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 암포테리신 B 대 인지질의 중량비는 1:0.8 내지 1:1.2인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 50**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 인지질은 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC)과 디미리스토일포스파티딜글리세롤 나트륨염(DMPG)의 혼합물이며, DMPC:DMPG 중량비는 7:1 내지 7:15인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 51**

제 50 항에 있어서, 상기 DMPC:DMPG 중량비는 7:3인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 52**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 방법은 비-미분화된 암포테리신 B를 사용하고, 상기 단계(ii)에서 사용되는 비경구용으로 허용되는 수상은 물 또는 인산염 완충액인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 53**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 방법은 미분화된 암포테리신 B를 사용하고 상기 단계(ii)에서 사용되는 비경구용으로 허용되는 수상은 물, 인산염 완충액, 염수 또는 인산염 염수 완충액인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

**청구항 54**

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 단계(ii)에서 암포테리신 B를 혼탁하기 위하여 사용하는 상기 수상의 pH는 6.0 내지 8.0으로 조정되는 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

#### 청구항 55

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 균질화되고 여과된 혼탁액의 멸균은 통상적인 압열 멸균에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

#### 청구항 56

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 멸균온도는 110°C 내지 121°C인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

#### 청구항 57

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 멸균은 121°C에서 20분간 또는 110°C에서 40분간 수행함을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

#### 청구항 58

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 암포테리신 B는 미분화되고, 상기 단계(ii) 내지 (iv) 중 어느 단계에서나 염화나트륨을 첨가하여 상기 최종 산물의 상기 염화나트륨의 함량은 0.1% 내지 0.9% w/v인 것을 특징으로 하는 수성 조성물의 제조방법.

#### 청구항 59

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서, 상기 수성 조성물에는 염소화된 탄화수소는 전혀 존재하지 않는 것을 특징으로 수성 조성물의 제조방법.

#### 청구항 60

제 37 항의 제조방법에 의해 얻어진 암포테리신 B, 염화나트륨 및 인지질을 포함하는 저독성 비경구용 디메틸 셀프시드-부재 수성 조성물.

#### 청구항 61

삭제

#### 청구항 62

삭제

### 명세서

#### 기술 분야

<1> 본 발명은 저독성 암포테리신 B 수성 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 인지질(phospholipid)을 포함하는 비경구투여에 적합한 저독성 암포테리신 B 수성 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

<2> 암포테리신 B는 폴리엔계의 항진균제, 항생제로서 침습성 진균감염의 치료에 유용하다. 그러나, 암포테리신 B는 높은 신독성 (nephrotoxicity)을 갖는다.

<3> 암포테리신 B의 독성은 다양한 공정에 의해 감소될 수 있다; 이 중에서 (a) 리포솜 (liposome)에 상기 약물을 담는 방법, 그리고 (b) 고약물지질 복합체 (high drug lipid complex, HDLC)로 약물을 전환시키는 방법이 통상적으로 사용된다.

<4> 리포소말 (liposomal) 암포테리신 B의 제조:

<5> 미합중국 특허 제 4973465 호 (1990)에는 HDLC의 제조방법에 관하여 기재되어 있으며, 상기 특허에서, 콜레스테롤과 같은 스테롤이 단독으로 또는 천연 인지질, 포스티틸콜린과 조합으로 사용된다.

<6> 미합중국 특허 제 5616334 호 (1997)에는 리포소말 암포테리신 B를 제조하는 방법이 기재되어 있으며, 상기 방법은 초기에 빈 다중충소포 (multilamellar vesicles, MLVs)를 제조한 후 상기 MLVs를 초음파분쇄된 암포테리신 B 혼탁액과 물에서 혼합하는 단계를 포함한다. 이 방법은 어떤 용매도 사용하지 않는다. 그러나, 이 공정은 특히, 암포테리신 B HDLC 보다 높은 독성이 있는 리포소말 암포테리신 B를 생산한다. 상기 공정은 빈 리포솜을 겹으로 쌓여진 폴리카아보네이트 필터에 반복적으로 10 회 압출시켜 크기를 조절하는 단계를 포함한다. 또한, 상기 공정은 약물 로딩 후 함입되지 않은 암포테리신 B를 원심분리하여 제거하는 단계를 포함한다.

<7> 또한, 상기 미합중국 특허에는 "저독성 약물-지질 시스템"에서 HDLC를 제조하는 방법이 기재되어 있다. 상기 특허에는, 암포테리신 B 지질 복합체의 제조 방법이 기재되어 있다. 이 기술은 일반적으로 다음과 같다:

<8> **HDLCs의 제조:** 우선, 약물로서 암포테리신 B를 디메틸 셀록시드 (DMSO) 또는 메탄올과 같은 용매에 용해시킨다. 지질로서 바람직하게는 7:3 몰비의 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC) 및 디미리스토일포스파티딜글리세롤 (DMPG)을 메탄올, 에탄올 및 염소화된 탄화수소와 같은 용매에 용해시킨다. 약물 용액 및 지질 용액을 혼합한다. 감압 하에서 용매를 증발시켜, 얇은 지질-약물 필름을 얻는다. 상기 필름을 수성 용매, 예컨대, 물, 살린 (saline), 인산염 염수 완충액 (phosphate buffer saline) 또는 글리신 완충액으로 수화하여 HDLC를 형성한다.

<9> 상기 방법의 일 변형에 따르면, 상기 결과물인 건조 지질-약물 필름을 염화메틸렌과 같은 용매에 재현탁하고 필름을 수화하기 전에 감압 하에서 용매를 다시 기화한다.

<10> 상기 방법의 다른 변형에 따르면, 상기 건조 지질-약물 필름을 탈수하여 박편 (flake)을 형성시킨다; 그 다음, 상기 박편을 수성 용액으로 수화한다.

<11> 다른 방법에 따르면, 수성 용액, 예컨대, 살린, 완충액 또는 물을 약물 및 지질을 포함하는 용액에 첨가한 후, 용매를 증발시켜 HDLC를 얻는다. 이 방법에서, 인지질의 얇은 필름 형성을 필요로 하지 않는다.

<12> 상기 미합중국 특허에 기재된 HDLC를 형성하는 다른 방법에 따르면, 암포테리신 B와 같은 생활성 작용제를 포함하는 지질 입자 (또는 리포솜)가 형성되는데, 우선 생활성 작용제 6-50 몰%를 포함하는 다중충소포 (MLVs)를 만들고 이 MLVs를 약 25°C 내지 약 60°C, 바람직하게는 약 60°C의 가열 사이클을 거치게 한다. 이런 사이클은 보다 더 정열되고, 독성이 낮은 암포테리신 B 지질 복합체를 형성한다.

<13> 상기 미합중국 특허에는 암포테리신 B 지질 복합체를 만드는 또 다른 방법이 기재되어 있다. 그 방법에 따르면, 지질을 염화나트륨 용액 (0.9%)과 혼합하고 균질기 (homogenizer)로 균질화한다. 암포테리신 B를 DMSO에 용해하고 상기 지질 용액에 균질화하면서 첨가하며, 약 30 분간 더 균질화하여 입자 크기가 약 10  $\mu$  (10 micron)이하, 바람직하게는 약 10  $\mu$  이 되도록 한다. 결과적으로 얻는 지질 입자는 접선유동여과 (tangential flow filtration)를 거쳐 크기에 따라 선택된다. 이 방법의 단점은 용매로 사용되는 DMSO가 높은 끓는점을 가지므로 결과물로부터 제거하기 어렵다. 더욱이, 미량의 DMSO가 최종 결과물에 남게 된다. 정맥투여에 사용되는 조성물에 미량이라도 이런 용매들이 있는 것은 바람직하지 않으며, 이런 용매들은 간독성이 있는 것으로

알려져 있기 때문이다 (The journal of Infectious disease 1991 : 164 Pg 418 to 421).

<14> HDLC는 암포테리신 B의 독성을 감소시키는 조제로 유용하나, 미합중국 특허 제 5616334 호 (1997)에 기재된 기술은 다량의 유기용매의 사용이 필요하며, 이는 암포테리신 B가 일반적으로 사용되는 비경구용으로 허용되는 대부분의 유기용매에서 낮은 용해도를 갖기 때문이다. 상기 방법은 증발에 의해 다량의 유기용매를 제거하는 공정을 포함하게 된다. 또한, 선택적으로 비양성자성 용매, 예컨대, 디메틸 셀록시드, 디메틸 포르마이드가 암포테리신 B를 용해하기 위해 사용된다. 비양성자성 용매는 높은 끓는점을 가지므로 미량의 용매가 최종 조성물에 남아있게 될 수 있다. 비양성자성 용매는 간독성이 있는 것으로 보고되어 있으므로, 제조 공정에서 이를 용매를 사용하는 것은 바람직하지 않다.

<15> 따라서, 사용되는 용매의 양을 적게 하면서, 암포테리신 B 조성물을 대량 생산할 수 있는 방법이 필요하다. 또한, 이것은 생산비용을 줄이게 될 것이다.

<16> 본 발명의 목적은 간단히 제조될 수 있고, 생산비용도 줄일 수 있는 암포테리신 B 및 인지질을 포함하는 저독성 비경구용 수성 조성물을 개발하는 것이다. 본 발명의 추가적인 목적은 암포테리신 B 및 인지질을 포함하는 저독성 비경구용 수성 조성물로서 미량의 DMSO 및/또는 염소화 탄화수소를 포함하지 않는 조성물을 개발하는 것이다.

<17> 따라서, 본 발명은 암포테리신 B, 염화나트륨 및 인지질을 포함하는 저독성 비경구용 디메틸 셀록시드-부재 수성 조성물에 관한 것이다.

<18> 본 발명은 추가적으로 다음의 단계를 포함하는 암포테리신 B, 염화나트륨 및 인지질을 포함하는 저독성 비경구용 디메틸 셀록시드-부재 수성 조성물의 제조방법에 관한 것이다:

<19> (i) 하나 이상의 인지질을 비경구용으로 허용되는 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알코올, 클로로포름, 카본 테라클로리드 및 염화메틸렌에서 선택되는 하나 이상의 유기용매에 용해하고 단일 또는 혼합된 인지질의 건조된 필름을 형성하기 위하여 감압 하에서 용매를 증발시켜 제거하는 단계;

<20> (ii) 염화나트륨을 포함하지 않는 비경구용으로 허용되는 수상 (aqueous phase)에서 암포테리신 B을 혼탁하는 단계 또는 염화나트륨을 포함할 수 있는 비경구용으로 허용되는 수상에서 미분화된 암포테리신 B을 혼탁하는 단계;

<21> (iii) (ii)에서 형성된 혼탁된 암포테리신 B를 포함하는 수상을 (i)에서 얻어진 상기 인지질 필름에 첨가하고 물을 혼합하여 상기 수상 내에서 상기 인지질과 함께 상기 암포테리신 B의 혼탁액을 얻는 단계;

<22> (iv) (iii)에서 얻어진 상기 혼탁액의 pH를 6.0 내지 8.0으로 조정하고 2  $\mu$  유리섬유필터를 통과 할 수 있을 때 까지 균질화하는 단계;

<23> (v) (iv)에 물에 용해한 염화나트륨을 충분히 첨가하여 최종 결과물의 염화나트륨 함량이 최소 0.1% w/v가 되도록 하는 단계; 및

<24> (vi) (v)에서 얻은 상기 균질화된 혼탁액을 2  $\mu$  유리섬유필터에 여과하고 여과물을 질소 하에서 바이알에 담고 바이알을 밀봉한 후 밀봉된 바이알을 압열멸균하여 비경구투여에 적합한 최종 산물을 얻는 단계.

<25> 또한, 본 발명은 본 명세서에 기재된 적어도 0.1% w/v의 염화나트륨 및 인지질을 포함하고 상술된 본 발명의 방법에 의해 제조된 저독성 비경구용 암포테리신 B 수성 조성물에 관한 것이다.

### 발명의 상세한 설명

<26> 본 발명의 조성물에서 암포테리신 B의 함량은 상기 조성물의 0.1% w/v 내지 1.0% w/v로 다양하며, 바람직하게는, 암포테리신 B의 함량은 상기 조성물의 0.5% w/v이다.

- <27> 인지질의 총 함량은 상기 조성물의 0.1% w/v 내지 1.0% w/v로 다양하다. 바람직한 함량은 약 0.4% 내지 약 0.6% w/v이다.
- <28> 암포테리신 B 대 인지질의 중량비는 약 1:0.5 내지 약 1:1.5이다. 바람직한 중량비는 약 1:0.8 내지 약 1:1.2이다.
- <29> 본 방법에서, 인지질은 에그 포스파티딜콜린 또는 디미리스토일 포스파티딜콜린 (DMPC) 및 디미리스토일포스파티딜글리세롤 나트륨염 (DMPG)의 혼합물로부터 선택된다. 두 인지질 DMPC 및 DMPG의 혼합물이 사용되는 경우, 인지질 DMPC:DMPG의 중량비는 7:1 내지 7:15, 바람직하게는 7:3이다.
- <30> 인지질을 용해하기 위하여 사용되는 용매는 알코올성 용매 예컨대, 에탄올, 메탄올 및 이소프로필 알코올로부터 선택되며, 염소화된 탄화수소 예컨대, 클로로포름, 염화메틸렌 및 카본 테트라클로리드를 첨가하거나 또는 첨가하지 않을 수 있다. 알코올성 용매 단독으로 또는 염소화된 용매 단독으로 인지질을 용해하는데 사용될 수 있다. 선택적으로 알코올성 용매 및 염소화된 탄화수소는 조합하여 인지질을 용해하는데 사용할 수 있다. 염소화된 탄화수소가 선택되지 않으면, 상기 조성물에는 염소화된 탄화수소가 존재하지 않는다. 인지질을 용해하는데 사용되는 바람직한 용매는 에탄올이다.
- <31> 본 발명의 어느 곳에서든 사용되는 미분화된 암포테리신 B는 공기 분출 분쇄기 (air jet mill)를 이용하여 10 마이크로 이하의 입자 크기로 미분화된다.
- <32> 암포테리신 B를 분산하기 위하여 사용되는 수상의 pH는 조성물에서 완충액이 사용되지 않는 경우는 언제나 묽은 수산화나트륨을 사용하여 6.0 내지 8.0으로 조정한다.
- <33> 암포테리신 B를 혼탁하기 위하여 사용되는 수상은 비정구용으로 허용된 매질 예컨대, 물 또는 인산염 완충액이다. 미분화된 암포테리신 B를 사용하는 경우, 암포테리신 B를 혼탁하기 위하여 사용하는 수상은 염수, 인산염 염수 완충액, 물 또는 인산염 완충액일 수 있다.
- <34> 균질화 후 그리고 여과 전에 물에 용해한 염화나트륨을 첨가한다. 그러나, 미분화된 암포테리신 B를 사용하는 경우에는 상기된 제조단계 (ii) 내지 (iv)의 어느 단계에서든 염화나트륨을 첨가할 수 있다.
- <35> 염화나트륨의 농도는 조성물의 약 0.1% 내지 0.9% w/v이며, 바람직하게는 조성물의 0.4% 내지 0.9% w/v이다.
- <36> 균질화는 5000 psi 이상에서 고압균질기를 사용하여 실시되며 결과물이 2  $\mu$  유리섬유필터를 통과할 수 있을 때 까지 실시한다.
- <37> 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 암포테리신 B 지질 혼탁액은 균질화 전에 균일한 혼탁액을 얻기 위하여 pH를 약 6.0~8.0으로 조정한 후 배스 (bath) 초음파분쇄기에서 분쇄된다. 조성물에서 완충액이 사용되지 않는 경우에는 언제나 묽은 수산화나트륨 용액으로 pH를 조정한다.
- <38> 균질화된 암포테리신 B 지질 혼탁액을 여과된 질소 또는 여과된 압축공기를 사용하여 압력 하에서 통상의 여과 공정을 따라 2  $\mu$  유리섬유필터로 여과한다.

<39> 여과 후에, 균질화된 혼탁액을 질소 하에서 바이알에 담고 110°C 내지 121°C에서 통상적인 압열멸균에 의해 멸균하며, 바람직하게는, 121°C에서 20 분 또는 110°C에서 40 분간 실시한다. 또한 멸균은 빠른 가열 및 빠른 감온 시스템에 의해 가열 및 감온 사이클 시간이 감소된 압열멸균 방법에 의해 실시될 수 있다.

<40> 미합중국 특허 제 4973465 호 (1990) 및 제 5616334 호 (1997)에 기재된 HDLC를 제조하는 선행 방법에서, 암포테리신 B를 다량의 유기용매에 용해한다. 미합중국 특허 제 5616334 호 (1997)의 실시예 중 하나에서, 100 mg의 암포테리신 B에 해당하는 20 mL의 암포테리신 B 지질 복합체 1 바이알을 제조하는데, 1 L의 메탄올을 사용한다. 다른 실시예에서는 용매 부피를 줄이기 위하여, 100 mg의 암포테리신 B에 대해 5 mL의 DMSO가 사용되나, DMSO는 정맥 주사에 권장되는 용매는 아니며, 이는 DMSO가 간독성이 있는 것으로 알려져 있기 때문이다.

<41> 본 발명의 방법에서, 암포테리신 B 어떤 용매에도 용해하지 않는 반면, 통상적인 방법은 암포테리신 B를 용해하기 위하여 DMSO를 사용한다.

<42> 본 발명의 방법에서, 염화나트륨을 포함하는 수상에 용해되어 있는 암포테리신 B를 지질 필름에 첨가하고 균질화하면, 덩어리가 형성되고 균질화된 결과물은 통상적인 여과 과정에 의해서는 2 μ유리섬유필터로 여과할 수 없는 것이 관찰되었다.

<43> 다양한 실험을 통하여, 본 발명자들은 암포테리신 B를 혼탁하기 위하여 사용하는 수상을 제조할 때 염화나트륨을 첨가하지 않으면, 균질화 과정에서 혼탁액에서 덩어리가 형성되지 않고 균질화된 벌크 (bulk)도 여과할 수 있다는 것을 발견하였다.

<44> 그러나, 본 발명의 과정에서, 본 발명자들은 염화나트륨이 조성물의 독성을 감소시키는 핵심적인 성분임을 확인하였다. 다른 농도의 염화나트륨을 포함하는 암포테리신 B 수성 조성물을 80 mg/kg 생체 중량의 분량으로 8개 군의 쥐에 투여하였다. 하기 실시예에 기재된 것처럼 염화나트륨이 없는 암포테리신 B 수성 조성물을 제조하고 별도로 투여하였다. 주사 전에, 80 mg/kg 생체 중량의 분량에 해당하는 부피는 등장액으로 만들기 위하여 5% 텍스트로스를 사용하여 0.5 mL로 희석하였다. 72 시간 후에 관찰된 치사율은 표 1에 나타나 있다.

**표 1**

암포테리신 B 수성 조성물에서 염화나트륨의 농도	실시예에 따라 제조	80 mg/kg 도스에서 쥐의 치사율
0.9% w/v	III	Nil
0.7% w/v	IV	Nil
0.4% w/v	V	Nil
0.1% w/v	VI	50%
Nil	XIII	87.5%

<46> 표 1로부터, 최소 농도로 0.1%의 염화나트륨이 독성을 감소시키기 위하여 핵심적이라는 것이 명확하다. 따라서, 인지질 필름의 수화 동안에, 염화나트륨이 없는 수상을 사용하여 균질화가 부드럽게 되고 2 μ유리섬유필터로 여과할 수 있도록 하였다. 상기 균질화 과정 이후에 염화나트륨 용액을 첨가하였다. 본 발명의 조성물에서 염화나트륨의 첨가는 암포테리신 B의 독성을 감소시키는데 핵심적인이다. 0.1% w/v 염화나트륨을 첨가해도, LD<sub>50</sub>이 80 mg/kg이지만, 이 LD<sub>50</sub>은 4 mg/kg 범위의 값은 갖는 것으로 보고된 소듐 데속시콜레이트를 포함하는 통상적인 암포테리신 B 제조물에 비해 월등히 높은 것이다.

<47> 추가적인 실험을 통하여, 본 발명자들은 미분화에 의해 암포테리신 B의 평균 입자 크기를 10  $\mu$  이하로 줄이면 균질화 동안에 덩어리가 형성되는 문제를 해결하는데 도움이 된다는 것을 확인하였다. 미분화 전 및 후의 암포테리신 B의 입자 크기 분석을 Sympatic HELOS Particle Size Analyser로 실시하였다. 또한, 암포테리신 B 미분화는 비-미분화된 암포테리신 B 및 인지질을 포함하는 균질화된 수성 혼탁액에서 염화나트륨의 존재와 연관된 여과시의 문제점을 극복하는데 도움을 준다.

<48> 미분화된 암포테리신 B를 사용하여 제조된 균질화된 벌크의 여과는 손쉬우며, 일반적으로 사용되는 필터을 사용할 수 있다; 미합중국 특허 제 5616334 호 (1997)와 같은 선행기술에서는, HDLC의 여과는 폴리카아보네이트 필터같은 막 필터를 통하여 휘거나 또는 곧은 경로로 실시되었다.

<49> 따라서, 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명자들은 비-미분화된 암포테리신 B 사용시의 덩어리화 및 여과의 문제점을 수상에 염화나트륨을 첨가하지 않는 것에 의해 극복할 수 있었다. 그러나, 본 발명자들은 최소한 최소농도인 0.1 w/v의 염화나트륨의 첨가가 암포테리신 B 수성 조성물의 독성을 줄이는데 핵심적이라 것을 발견하였다. 염화나트륨 첨가에 있어서, 본 발명자들은 덩어리화 및 여과의 문제점을 균질화 단계까지 염화나트륨을 첨가하는 것을 연기함으로써 해결하였다.

<50> 따라서, 본 발명의 첫 번째 구현예에서, 최소 0.1% w/v 염화나트륨을 포함하는 저독성 멸균 암포테리신 B 수성 조성물의 제조방법에 있어서, 비-미분화된 암포테리신 B를 분산하기 위해 사용되는 수상은 물 또는 염화나트륨을 포함하지 않는 인산염 완충액이다. 염화나트륨은 비-미분화된 암포테리신 B 및 인지질을 포함하는 수성 혼탁액의 균질화 후에 바로 첨가된다.

<51> 본 발명의 두 번째 구현예에서, 인지질 및 암포테리신 B를 포함하는 수상의 혼탁액의 덩어리화 및 여과의 문제점은 미분화된 암포테리신 B를 사용하여 해결되었다.

<52> 상기 두 구현예의 조합으로, 사용되는 암포테리신 B를 미분화하고 염화나트륨을 포함하지 않는 수상에 혼탁하는 경우, 염화나트륨을 균질화 단계 전, 동안 또는 후에 수상에 첨가한다.

### 실시 예

<53> 본 발명은 실시예에 의해 예시된다. 다음의 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<54> 하기 표 2에 기재된 것처럼 4 군의 실시예가 있다.

### 표 2

<55>	군	실시예 번호	암포테리신 B	암포테리신 B를 분산시키기 위해 사용된 수상	염의 첨가	발명의 구현물
	A	I - II	비-미분화	염 비포함	균질화 이후	첫번째
	B	III-VI } VIII-IX }	미분화	염 포함	-	두 번째
		VII*	미분화	염 포함	-	두번째
	C	X-XII	미분화	염 비포함	균질화 도중/이후	첫번째 및 두번째

D	XIII	미분화	염 비포함	-	본 발명이 아님
	XIV	비-미분화			

<56> \* 인지질을 용해하기 위하여 사용한 용매는 에탄올이다.

<57> 본 실시예에서 사용된 모든 원료는 비경구용 등급이었다. 사용된 기기는 통상적으로 사용되는 것이다. 모든 공정은 멸균 생성물을 제조하는데 요구되는 통제되는 환경을 갖춘 지역에서 실시되었다.

<58> 본 실시예에서 사용되는 암포테리신 B는 미국약전 (USP) 규격에 따르는 비경구용 등급의 것을 Alpharma로부터 구입하였다. 본 실시예에서 사용되는 미분화된 암포테리신 B는 공기 분출 분쇄기(air jet mill)를 사용하여 입자 크기가 10  $\mu$  이하가 되도록 암포테리신 B를 미분화하여 제조되었다.

<59> 본 실시예에서 사용된 인지질 DMPC 및 DMPG는 비경구용 등급이며, Avanti Polar Lipids로부터 구입하였다.

<60> 본 실시예에서 사용된 인지질 에그 포스파티딜콜린은 비경구용 등급이며, Lipids로부터 구입하였다.

<61> 본 실시예에서 사용된 유기용매는 AR (분석 시약, analytical reagent) 급이었다.

<62> 본 실시예에서 사용된 인삼엽 완충액은 인도약전(Indian Pharmacopoeia)대로 제조되었다.

<63> 본 실시예에서 사용된 인산염 염수 완충액 (pH 7.4)은 1.19 gm의 디소듐 히드로젠 오르소포스페이트, 0.095 gm의 포타슘 디히드로젠 오르소포스페이트, 및 4 gm의 염화나트륨을 400 ml의 물에 용해하여 제조되었다. 전체 부피가 500 ml되도록 물을 첨가하였다.

<64> A 군: 실시예 I & II

<65> 본 실시예에서 사용되는 성분은 표 3에 나타나 있다:

표 3

	실시예 I	실시예 II
a) 암포테리신 B	1.00 g	1.00 g
b) DMPC	0.68 g	0.68 g
c) DMPG	0.30 g	0.30 g
d) 에탄올*	200 ml	200 ml
e) 클로로포름*	10 ml	10 ml
f) pH - 분산에서 균질화 전	6.95** 6.80**	7.2 7.2
g) 염화나트륨	1.80 g	1.80 g
h) 물 q.s.to	200 ml	-
I) 인산염 완충액 pH 7.2 q.s.to	-	200 ml

<67> \* 최종 산물에 남지 않음

<68> \*\* 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 조정

&lt;69&gt;

공정:

&lt;70&gt;

실시예 I에서, 암포테리신 B를 교반 및 질소 기포 하에서 150 ml의 물에 혼탁하였다. 0.1N 수산화나트륨 용액으로 pH를 약 6.95로 조정하였다.

&lt;71&gt;

실시예 II에서, 암포테리신 B를 교반 및 질소 기포 하에서 150 ml의 인산염 완충액 (pH 7.2)에 혼탁하였다.

&lt;72&gt;

인지질 DMPC 및 DMPG를 회전용 플라스크에서 클로로포름에 용해시켰다. 인지질이 완전히 용해된 후 에탄올을 첨가하고 질소 플러싱 (flushing) 하에서 적당한 속력으로 플라스크를 회전시켜 혼합하였다. 이 알코올성 용액을 감압 하에서 회전 증발시켜 완전히 건조시켰다. 용매가 완전히 제거된 후 질소로 30 분간 플러시하였다.

&lt;73&gt;

건조된 지질 펠름을 회전용 플라스크에서 계속적인 질소의 플러싱과 함께 플라스크를 계속적으로 회전시켜 상기에서처럼 제조된 암포테리신 B의 수성 혼탁액으로 수화하였다. 실시예 I에서 수득된 암포테리신 B 지질 혼탁액의 pH를 0.1N 수산화나트륨 용액으로 약 6.80으로 조정하였다. 플라스크의 내용물을 1 시간 동안 배스 (bath) 초음파분쇄기에서 분쇄하였다. 실시예 I의 경우에는 물을 이용하여, 실시예 II의 경우에는 인산염 완충액 (pH 7.2)를 이용하여 부피를 180 ml로 만들었다.

&lt;74&gt;

암포테리신 B 지질 혼탁액을 APV 고압 균질기를 이용하여 균질화였으며, 상기 균질화는 균질화된 결과물이 2 μ 유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 실시되었다.

&lt;75&gt;

실시예 I에서 염화나트륨을 물에 용해하고 물로 20 ml이 되도록 희석하였다. 실시예 II에서 염화나트륨을 인산염 완충액 (pH 7.2)에 용해하고 인산염 염수 완충액 (pH 7.2)로 20 ml이 되도록 희석하였다. 이 염화나트륨 용액을 저속 교반 및 질소 플러싱 하에서 균질화된 암포테리신 B 지질 혼탁액에 첨가하였다. 상기 결과물을 다시 균질기에 담고 압력을 가하지 않고 5 분 동안 재순환시켰다. 그 다음, 2 μ 유리섬유필터로 여과하고 질소 하에서 유리 용기 담아 밀봉한 후 110°C에서 40 분간 압열멸균 (autoclave)하였다. 실시예 II에서 압열멸균은 빠른 가열 및 빠른 감온 사이클로 110°C에서 40 분간 실시되었다.

&lt;76&gt;

B. 군:

&lt;77&gt;

1) 실시예 III 내지 VI

&lt;78&gt;

본 실시예에서 사용되는 성분은 표 4에 나타나 있으며 하기의 공정으로 실시되었고, 첨가되는 염화나트륨의 양은 1.8 g 내지 0.2 g 내에서 선택되었다.

**표 4**

&lt;79&gt;

	실시예			
	III	IV	V	VI
a) 암포테리신 B (미분화)	1 g	1 g	1 g	1 g
b) DMPC	0.68 g	0.68 g	0.68 g	0.68 g
c) DMPG	0.30 g	0.30 g	0.30 g	0.30 g
d) 염화나트륨	1.80 g	1.40 g	0.80 g	0.20 g
e) 에탄올*	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
f) 클로로포름*	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
g) pH - 분산에서 균질화 전	7.20** 7.00**	7.15** 7.10**	7.05** 7.15**	7.20** 7.00**
h) 물 q.s.to	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml

&lt;80&gt;

\* 최종 산물에 남지 않음

<81> \*\* 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 조정

<82> 공정:

<83> 인지질 DMPC 및 DMPG를 회전용 플라스크에서 클로로포름에 용해시켰다. 인지질이 완전히 용해된 후 에탄올을 첨가하고 질소 플러싱 (flushing) 하에서 적당한 속력으로 플라스크를 회전시켜 혼합하였다. 이 알코올성 용액을 감압 하에서 회전 증발시켜 완전히 건조시켰다. 용매가 완전히 제거된 후 질소로 30 분간 풀러시하였다.

<84> 염화나트륨을 175 ml의 물에 용해하였다. 질소로 이 용액에 15 분간 기포를 일으켰다. 미분화된 암포테리신 B를 염화나트륨 용액에 고반 및 질소 기포 하에서 혼탁하였다. 0.1 N 수산화나트륨 용액을 첨가하여 표 4에 표시된 pH 값으로 각 실시예의 pH를 조정하였다.

<85> 건조된 지질 필름을 회전용 플라스크에서 상기에서 제조된 암포테리신 B 혼탁액으로 계속적인 질소의 풀러싱과 함께 플라스크를 계속적으로 회전시켜가며 수화하였다. 수득한 암포테리신 B 지질 복합체의 pH를 표 4에 표시된 대로 조정하였다. 플라스크의 내용물을 1 시간 동안 배스 (bath) 초음파분쇄기에서 분쇄하였다.

<86> 물을 첨가하여 부피를 200 ml로 만들었다.

<87> 암포테리신 B 지질 혼탁액을 고압 균질기를 이용하여 균질화하였으며, 상기 균질화는 균질화된 결과물이 2 μ 유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 실시되었다

<88> 상기 균질화된 암포테리신 B 지질 혼탁액을 2 μ 유리섬유필터로 여과하고 질소 하에서 유리 용기 담아 밀봉한 후 110°C에서 40 분간 빠른 가열 및 빠른 감온 사이클로 압열멸균하였다.

<89> 실시예 III, IV 및 V의 산물의 독성 실험을 80 mg/kg 생체 중량 분량으로 쥐에서 실시한 결과 치사율이 0 %인 반면, 실시예 VI는 50 %의 치사율을 나타내었다.

<90> B 군 계속

<91> 2) 실시예 VII 내지 IX

<92> 본 실시예에서 사용되는 성분은 표 5에 나타나 있으며 하기의 공정으로 실시되었다.

### 표 5

<93>

	실시예		
	VII	VIII	IX
a) 암포테리신 B (미분화)	1 g	1 g	1 g
b) DMPC	0.68 g	-	0.68 g
c) DMPG	0.30 g	-	0.30 g
d) 에그 포스파티딜코린	-	0.90 g	-
e) 염화나트륨	1.80 g	1.80 g	***
f) 에탄올*	300 ml	200 ml	200 ml
g) 클로로포름*	-	15 ml	10 ml
h) pH - 분산에서 균질화 전	7.15** 7.05**	7.15** 6.95**	7.40 7.40
i) 물 q.s.to	200 ml	200 ml	-
j) 인산염 염수 완충액 q.s.to	-	-	200 ml

<94> \* 최종 산물에 남지 않음

<95> \*\* 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 조정

<96> \*\*\* 약 2 gm정도가 PBS로부터 제공됨

<97> 공정:

<98> 실시예 VII에서, 인지질 DMPC 및 DMPG를 회전용 플라스크에서 질소 풀러싱 하에서 적당한 속력으로 플라스크를 회전시키며 에탄올에 용해하였다.

<99> 실시예 VIII에서, 인지질 에그 포스파티딜콜린을 회전용 플라스크에서 클로로포름에 용해하였으며, 실시예 IX에서, 인지질 DMPC 및 DMPG를 회전용 플라스크에서 클로로포름에 용해하였다. 클로로포름에 인지질이 완전히 용해된 후 에탄올을 첨가하고 질소 풀러싱 하에서 적당한 속력으로 플라스크를 회전시켜 혼합하였다.

<100> 본 실시예들에서 수득한 상기 인지질 용액을 감압 하에서 회전 증발시켜 완전히 건조시켰다. 용매가 완전히 제거된 후 질소로 30 분간 풀러시하였다.

<101> 실시예 VII 및 VIII에서, 염화나트륨을 175 ml의 물에 용해하였다. 질소로 이 용액에 15 분간 기포를 일으켰다. 그 다음, 미분화된 암포테리신 B를 염화나트륨 용액에 교반 및 질소 기포 하에서 혼탁하였다. 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH를 약 7.15로 조정하였다.

<102> 실시예 IX에서, 미분화된 암포테리신 B를 175 ml의 인산염 염수 완충액 pH 7.4 (PBS)에 교반하에서 혼탁하였다. 질소로 이 용액에 15 분간 기포를 일으켰다. PBS가 약 2 gm의 염화나트륨을 제공한다.

<103> 건조된 지질 필름을 상기에서 제조된 미분화된 암포테리신 B 혼탁액으로 회전용 플라스크에서 계속적인 질소의 풀러싱과 함께 플라스크를 계속적으로 회전시켜가며 수화하였다. 얻어진 암포테리신 B 지질 혼탁액의 pH를 실시예 VII의 경우에는 7.05로 조정하고 실시예 VIII의 경우에는 6.95로 조정하였다.

<104> 실시예 VII 및 VIII에서는 물을 첨가하여 부피를 200 ml로 만들었다.

<105> 실시예 IX에서는 인산염 염수 완충액 (pH 7.4)을 첨가하여 부피를 200 ml로 만들었다.

<106> 그 다음, 암포테리신 B 지질 혼탁액을 APV 고압 균질기를 이용하여 균질화하였으며, 상기 균질화는 균질화된 결과물이 2  $\mu$  유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 실시되었다.

<107> 상기 균질화된 암포테리신 B 지질 혼탁액을 2  $\mu$  유리섬유필터로 여과하고 질소 하에서 유리용기에 담아 밀봉한 후 압열멸균하였으며, 실시예 IX의 경우에는 121°C에서 20 분간, 실시예 VII 및 VIII의 경우에는 110°C에서 40 분간 실시하였다.

<108> 실시예 VII에서 얻어진 멸균된 암포테리신 B 수성 조성물의 취에 대한 독성 및 안정성 시험을 실시하였다. 독성 시험 결과는 표 6에 나타나 있으며, 안정성 시험 결과는 표 7에 나타나 있다.

<109> 입자 크기 분석:

<110> 실시예 VII에서 얻어진 암포테리신 B 수성 조성물의 입자 크기를 모델 770 AccuSizer (Particle Sizing Systems, Inc, 미합중국)로 측정하였다. 입자의 95%가 1.63  $\mu$  이하였으며, 90%가 1.28  $\mu$  이하였다.

<111> 쥐에 대한 독성 시험:

<112> 실시예 VII에서 얻어진 암포테리신 B 수성 조성물의 독성 시험을 소듐 데속시콜레이트를 함유하는 통상적인 암포테리신 B와 함께 쥐에서 실시하였다. 관찰 결과는 다음과 같다:

### 표 6

#### 쥐에서 급성독성 시험

LD <sub>50</sub> (정맥)		
통상적인 암포테리신 B	-	3.5 mg/kg 생체 중량
실시예 VII의 암포테리신 B 수성 조성물	-	>80 mg/kg 생체 중량

<114> 본 발명자에 의해 제조된 암포테리신 B 수성 조성물의 LD<sub>50</sub>은 일회 주사 후 쥐에서 >80 mg/kg이었다. 이것은 소듐 데속시콜레이트를 포함하는 통상적인 암포테리신 B의 일회 주사 후의 LD<sub>50</sub>에 비하여 20 배가 높은 수치였다..

### 표 7

#### 권장되는 보관 온도인 2°C-8°C에서 실시예 VII의 암포테리신 B 수성 조성물에 대한 안정성 자료

기간	외관	암포테리신 B 함량
초기	노란색 혼탁액으로 보관시 침전되며 가볍게 흔들어 주면 고루 분산됨	100.6%
6 월	노란색 혼탁액으로 보관시 침전되며 가볍게 흔들어 주면 고루 분산됨	100.3%
1 년	노란색 혼탁액으로 보관시 침전되며 가볍게 흔들어 주면 고루 분산됨	99.8%
18 월	노란색 혼탁액으로 보관시 침전되며 가볍게 흔들어 주면 고루 분산됨	98.3%
2 년	노란색 혼탁액으로 보관시 침전되며 가볍게 흔들어 주면 고루 분산됨	96.5%

<116> 본 실시예는 DMSO 또는 염소화된 탄화수소 용매를 전혀 사용하지 않는 본 발명의 개선된 방법에 의해 제조되는, 미량의 DMSO 또는 염소화된 탄화수소조차 함유되지 않은, 비경구용 암포테리신 B 수성 조성물은 시판될 수 있는 주사 혼탁액이 가져야 할 일반적인 요건을 만족한다는 것을 명백하게 보여준다. 실시예 VII의 방법에 의해 제조된 신규한 수성 조성물은 유해한 용매 예컨대, DMSO 및 염소화된 탄화수소가 전혀 존재하지 않는다.

#### C 표: 실시예 X 내지 XII

<118> 본 실시예에서 사용되는 성분은 표 8에 나타나 있으며 하기의 공정으로 실시되었다.

표 8

&lt;119&gt;

	실시예		
	X	XI	XII
a) 암포테리신 B (미분화)	1 g	1 g	1 g
b) DMPC	0.68 g	0.68	0.68 g
c) DMPG	0.30 g	0.30	0.30 g
d) 염화나트륨	1.80 g	1.80 g	1.80 g
e) 에탄올*	200 mL	200 mL	200 mL
f) 클로로포름*	10 mL	10 mL	10 mL
g) pH - 분산에서 균질화 전	7.15** 6.90**	7.30** 7.00**	7.2 7.2
h) 물 q.s.to	200 mL	200 mL	-
i) 인산염 완충액 pH 7.2 q.s.to	-	-	200 mL

&lt;120&gt;

\* 최종 산물에 남지 않음

&lt;121&gt;

\*\* 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 조정

&lt;122&gt;

공정:

&lt;123&gt;

인지질 DMPC 및 DMPG를 회전용 플라스크에서 클로로포름에 용해시켰다. 인지질이 완전히 용해된 후 에탄올을 첨가하고 질소 풀러싱 하에서 적당한 속력으로 플라스크를 회전시켜 혼합하였다. 이 알코올성 용액을 감압 하에서 회전 증발시켜 완전히 건조시켰다. 용매가 완전히 제거된 후 질소로 30 분간 풀러시하였다.

&lt;124&gt;

교반 및 질소 기포 하에서, 실시예 X 및 XI에서는 미분화된 암포테리신 B를 150 mL의 물에 용해하였고, 실시예 XII에서는 150 mL의 인산염 완충액 (pH 7.2)에 용해하였다. 0.1 N 수산화나트륨 용액을 첨가하여 표 8에 표시된 pH 값으로 실시예 X 및 XI의 pH를 조정하였다.

&lt;125&gt;

건조된 지질 필름을 상기에서 제조된 미분화된 암포테리신 B 혼탁액으로 회전용 플라스크에서 계속적인 질소로 풀러싱하며 회전 증발기로 사용하여 수화하였다. 얻어진 암포테리신 B 지질 혼탁액의 pH를 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 표 8에 나타나 있는 것처럼 조정하였다. 실시예 X 및 XI에서는 물을 첨가하여 부피를 180 mL로 만들었고, 실시예 XII에서는 인산염 염수 완충액 (pH 7.2)을 첨가하여 부피를 180 mL로 만들었다. 실시예 XI에서는 플라스크의 내용물을 1 시간 동안 배스 (bath) 초음파분쇄기에서 분쇄하였다.

&lt;126&gt;

그 다음, 실시예 X 및 XII에서는 암포테리신 B 지질 혼탁액을 APV 고압 균질기를 이용하여 균질화였으며, 상기 균질화는 균질화된 결과물이 2 μ 유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 실시되었다.

&lt;127&gt;

실시예 X에서 염화나트륨을 물에 용해하고 물로 20 mL가 되도록 회석하였다. 실시예 XII에서 염화나트륨을 인산염 완충액 (pH 7.2)에 용해하고 인산염 완충액 (pH 7.2)로 20 mL가 되도록 회석하였다. 이 염화나트륨 용액을 저속 교반 및 질소 풀러싱 하에서 균질화된 암포테리신 B 지질 혼탁액에 첨가하였다. 상기 결과물을 다시 균질기에 담고 압력을 가하지 않고 5 분 동안 재순환시켰다.

&lt;128&gt;

실시예 XI에서, 초음파분쇄 후에 APV 고압 균질기를 이용하여 암포테리신 B 지질 혼탁액을 압력 하에서 3회 균질기를 통과시켰다. 염화나트륨을 물에 용해하고 물로 20 mL가 되도록 회석하였다. 이 염화나트륨 용액를 상기에서 3회 통과시키고 얻어진 암포테리신 B 지질 혼탁액에 저속으로 혼합하면서 첨가하였다. 상기 결과물을 다시 균질기에 담고 압력을 가하지 않고 5 분 동안 재순환시켰다. 이것을 압력 하에서 다시 균질화하며, 상기 균질화는 균질화된 결과물이 2 μ 유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 실시되었다.

<129> 그 다음, 결과물을 2  $\mu$  유리섬유필터로 여과하였다. 여과된 결과물을 질소 하에서 유리 용기 담아 밀봉한 후 빠른 가열 및 빠른 감온 사이클로 110°C에서 40 분간 압열멸균하였다.

<130> D 군:

1) 실시예 XIII 내지 XIV

<132> 본 실시예에서 사용되는 성분은 표 9에 나타나 있으며 하기의 공정으로 실시되었다.

**표 9**

	실시예 XIII	실시예 XIV
a) 암포테리신 B (미분화)	1 g	-
b) 암포테리신 B (비-미분화)	-	1 g
c) DMPC	0.68 g	0.68 g
d) DMPG	0.30 g	0.30 g
e) 에탄올*	200 mL	200 mL
f) 클로로포름*	10 mL	10 mL
g) 물 q.s.to	200 mL	200 mL
h) pH - 분산에서 균질화 전	7.25** 7.15**	7.20** 7.10**

<134> \* 최종 산물에 남지 않음

<135> \*\* 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 조정

<136> 공정:

<137> 인지질 DMPC 및 DMPG를 회전용 플라스크에서 클로로포름에 용해시켰다. 인지질이 완전히 용해된 후 에탄올을 첨가하고 질소 플러싱 (flushing) 하에서 적당한 속력으로 플라스크를 회전시켜 혼합하였다. 이 알코올성 용액을 감압 하에서 회전 증발시켜 완전히 건조시켰다. 용매가 완전히 제거된 후 질소로 30 분간 플러시하였다.

<138> 실시예 XIII에서, 미분화된 암포테리신 B를 교반 및 질소 기포 하에서 물에 혼탁하였다. 실시예 XIV에서, 미분화되지 않은 암포테리신 B를 교반 및 질소 기포 하에서 물에 혼탁하였다. 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 표 9에 나타나 있는 것처럼 pH를 조정하였다.

<139> 건조된 지질 필름을 상기에서처럼 제조된 암포테리신 B 혼탁액으로 회전용 플라스크에서 계속적인 질소로 플러싱하며 회전 증발기로 사용하여 수화하였다. 0.1 N 수산화나트륨 용액을 사용하여 표 9에 나타나 있는 것처럼 pH를 조정하였다. 실시예 XIV에서는 플라스크의 내용물을 1 시간 동안 배스 (bath) 초음파분쇄하였다. 물을 첨가하여 부피를 200 mL로 만들었다.

<140> 암포테리신 B 지질 혼탁액을 APV 고압 균질기를 이용하여 균질화하였으며, 상기 균질화는 균질화된 결과물이 2  $\mu$  유리섬유필터를 통과할 수 있을 때까지 실시되었다.

<141> 상기 균질화된 암포테리신 B 지질 혼탁액을 2  $\mu$  유리섬유필터로 여과하였다. 여과된 결과물을 질소 하에서 유리 용기에 담아 밀봉한 후 압열멸균하였다. 압열멸균은 121°C에서 20 분간 실시되었다.

<142> 취에 대한 독성 시험

<143> 실시예 XIII 및 XIV에서 얻어진 암포테리신 B 수성 조성물 (염화나트륨 부존재)의 독성 시험을 실시 예 III대로의

염화나트륨을 함유하는 암포테리신 B와 함께 쥐에서 실시하였다. 관찰 결과는 다음과 같다:

### 표 10

#### 쥐에서 급성독성 시험

LD <sub>50</sub> (정맥)	
실시예 III대로의 암포테리신 B 수성 조성물 (염화나트륨 존재)	- >80 mg/kg 생체 중량
실시예 XIII 및 XIV대로의 암포테리신 B 수성 조성물 (염화나트륨 부존재)	- 40 mg/kg 생체 중량

<145> 실시예 XIII 및 XIV대로 제조된 염화나트륨이 없는 암포테리신 B 수성 조성물의 LD<sub>50</sub>은 일회 주사시 쥐에서 40 mg/kg 생체 중량이었으며, 실시예 III대로 제조된 염화나트륨이 존재하는 암포테리신 B 수성 조성물의 LD<sub>50</sub>은 >80 mg/kg 생체 중량이었다. 이것은 저독성의 암포테리신 B 수성 조성물을 형성하기 위해서는 염화나트륨이 필요하다는 것을 증명한다.

#### 본 발명의 이점:

<147> 본 발명의 이점은 다음과 같다:

<148> i) 본 발명에서, 암포테리신 B 수성 조성물은 간독성이 보고된 DMSO를 사용하지 않고 제조되었다.

<149> ii) 비경구용으로 적용할 수 있는 유기 용매에서의 암포테리신 B의 낮은 용해도로 인하여 (메탄올에서 0.1 mg/ml), 다량의 유기 용매가 요구되며, 이것은 공정을 장황하고 시간이 소비되도록 하며, 상업적으로 실행하기에 적합하지 못하게 한다. 본 발명의 방법은 암포테리신 B를 어떤 유기 용매에서든 용해시킬 필요가 없다.

<150> iii) 선행방법은 여과의 경우 특별한 기술, 예컨대, 접선유동여과 (tangential flow filter) 또는 압출 등을 필요로 한다. 본 발명에서는 통상적인 여과방법이 사용된다.

<151> iv) 본 발명에 의해 제조된 생성물은 압열멸균에 의한 멸균과정에서 안정하며, 따라서 정맥용으로 사용하는데 적합하다.

<152> 본 발명의 방법은 간단하고 효율적이며, 선행기술에 비해 향상된 점이 있다. 본 발명의 방법의 가장 중요한 특징은 얻어지는 결과물의 탁월한 순도로서, 유해한 용매를 미량도 함유할 위험이 없으며, 이는 본 발명에서는 그런 용매가 전혀 사용되지 않기 때문이다.