



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 05 322 T2 2005.09.15

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 368 041 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 05 322.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IN01/00040

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 923 963.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 02/069983

(86) PCT-Anmeldetag: 16.03.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.09.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 10.12.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 01.09.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 15.09.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 31/715

A61K 47/14, A61K 9/127

(30) Unionspriorität:

MU02001217 01.03.2001 IN

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Bharat Serums & Vaccines Ltd., Thane, IN

(72) Erfinder:

PAI, Srikanth, Wagle Estate, Thane 400 604, IN;  
RIVANKAR, Sangeeta, Wagle Estate, Thane 400  
604, IN

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München

(54) Bezeichnung: WÄSSERIGE ZUSAMMENSETZUNG ENTHALTEND AMPHOTERICIN B

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

**[0001]** Gegenstand der Erfindung ist eine wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B von geringer Toxizität. Gegenstand dieser Erfindung ist insbesondere die wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B von geringer Toxizität, die zur parenteralen Verabreichung geeignete Phospholipide enthält.

### Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Amphotericin B ist ein antifungales Polyen-Antibiotikum, das bei der Behandlung invasiver Pilzinfektionen nützlich ist. Es besitzt jedoch eine hohe Nephrotoxizität.

**[0003]** Die Toxizität des Amphotericins B wird durch verschiedene Verfahren reduziert; von diesen werden (a) Einschluss des Arzneimittels in Liposomen und (b) Umwandlung des Arzneimittels in einen HDLC-Komplex („high drug:lipid complex“; Komplex mit hohem Arzneimittelanteil:Lipid) häufig verwendet.

### Herstellung von liposomalem Amphotericin B

**[0004]** In US-Patent 4973465 (1990) wurde die Herstellung von HDLC beschrieben, worin Sterole wie Cholesterin entweder allein oder in Kombination mit natürlichen Phospholipiden, Phosphatidylcholin, verwendet werden.

**[0005]** In US-Patent 5616334 (1997) wurde ein Verfahren zur Herstellung von liposomalem Amphotericin B beschrieben, das initial die Herstellung roher multilamellarer Vesikel (MLV) und dann Mischen der MLV mit beschallter Amphotericin B-Suspension in Wasser beinhaltet. Dieses Verfahren beinhaltet nicht die Verwendung irgendwelcher Lösungsmittel. Anhand dieses Verfahrens wird jedoch spezifisch liposomales Amphotericin B, das toxischer als Amphotericin B-HDLC ist, hergestellt. Das Verfahren beinhaltet die Extrusion roher Liposomen zur Größentrennung, zehnmal, immer wieder, durch gestapelte Polycarbonatfilter. Es beinhaltet auch die Entfernung von nicht inkorporiertem Amphotericin B durch Zentrifugation nach dem Arzneimittel-Loading.

**[0006]** Dieses US-Patent beschreibt auch ein Verfahren zur Herstellung von HDLC in „Arzneimittel-Lipid-Systemen von geringer Toxizität“. In diesem Patent wurde ein Verfahren zur Herstellung eines Amphotericin B-Lipid-Komplexes beschrieben. Dieses Verfahren läuft im Allgemeinen wie folgt ab:

### Herstellung von HDLC

**[0007]** Zuerst wird das Arzneimittel Amphotericin B in einem Lösungsmittel, wie zum Beispiel Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Methanol, löslich gemacht. Die Lipide, bevorzugt Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) in einem Molverhältnis von 7 : 3 werden in Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Methanol, Ethanol, chlorierten Kohlenwasserstoffen, löslich gemacht. Die Arzneimittellösung und die Lipidlösung werden gemischt. Die Lösungsmittel werden unter reduziertem Druck verdampft, was in einem dünnen Lipid-Arzneimittel-Film resultiert. Der Film wird mit einer wässrigen Lösung, wie zum Beispiel Wasser, Kochsalzlösung, phosphatgepufferter Kochsalzlösung oder Glycinpuffer, zur Bildung von HDLC hydratisiert.

**[0008]** In einer Variation des vorstehenden Verfahrens wird der resultierende Trockenlipid-Arzneimittel-Film in einem Lösungsmittel, wie zum Beispiel Methylenchlorid, resuspendiert und vor dem Hydratisieren des Films unter reduziertem Druck wieder verdampft.

**[0009]** In einer anderen Variation des vorstehenden Verfahrens wird der Trockenlipid-Arzneimittel-Film zur Bildung von Flocken dehydratisiert; die Flocken werden dann mit wässriger Lösung hydratisiert.

**[0010]** In einem anderen Verfahren wird die wässrige Lösung, wie zum Beispiel Kochsalzlösung, Puffer oder Wasser, der das Arzneimittel und das Lipid enthaltenden Lösung zugefügt, und dann wird das Lösungsmittel zum Erhalt von HDLC abgedampft. In diesem Verfahren ist die Bildung eines dünnen Films aus den Phospholipiden nicht erforderlich.

**[0011]** In einem alternativen Verfahren zur Bildung der in diesem US-Patent beschriebenen HDLC werden Lipidpartikel (oder Liposomen), enthaltend bioaktive Mittel, wie zum Beispiel Amphotericin B, durch zuerst Herstellung multilamellarer Vesikel (MLV), enthaltend von 6–50 Mol-% des bioaktiven Mittels, gebildet. Dann wer-

den die MLV einem Erhitzungszyklus von ca. 25°C bis ca. 60°C, am bevorzugtesten ca. 60°C ausgesetzt. Ein derartiger Zyklus bildet einen höher geordneten und weniger toxischen Amphotericin B-Lipid-Komplex.

**[0012]** In diesem US-Patent wurde auch ein anderes alternatives Verfahren zur Herstellung des Amphotericin B-Lipid-Komplexes beschrieben. In diesem Verfahren werden Lipide mit Natriumchloridlösung (0,9%) beige-mischt und unter Verwendung eines Homogenisators homogenisiert. Amphotericin B wird in DMSO aufgelöst und der Lipidlösung während des Homogenisierens zugefügt und ca. 30 Minuten weiter homogenisiert, bis die Partikelgröße auf ungefähr weniger als 10 Mikron, bevorzugt ca. 10 Mikron, reduziert ist. Die resultierenden Lipidpartikel werden nach der Tangentialflussfiltration nach Größe ausgewählt. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass das verwendete Lösungsmittel, DMSO, einen hohen Siedepunkt aufweist und folglich schwer aus dem Produkt zu entfernen ist. Im Endprodukt bleiben weiter Spurenmengen von DMSO zurück. Es ist nicht erwünscht, dass ein derartiges Lösungsmittel in Spurenmengen in der Zusammensetzung zur intravenösen Verabreichung vorliegt, da über dieses Lösungsmittel berichtet wurde, dass es hepatotoxisch ist (The Journal of Infectious Diseases 1991; 164, S. 418 bis 421).

**[0013]** HDLC sind nützliche Präparationen zur Reduktion der Toxizität von Amphotericin B, aber die in US-Patent 5616334 (1997) beschriebenen Verfahren erfordern die Verwendung großer Mengen organischer Lösungsmittel, da Amphotericin B in den meisten allgemein verwendeten und parenteral verträglichen organischen Lösungsmitteln eine geringe Löslichkeit besitzt. Das Verfahren beinhaltet folglich die Entfernung großer Mengen organischer Lösungsmittel mittels Verdampfung. Alternativ werden aprotische Lösungsmittel, wie zum Beispiel Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, auch zur Auflösung von Amphotericin B verwendet. Diese aprotischen Lösungsmittel besitzen einen hohen Siedepunkt, und Spuren dieser Lösungsmittel bleiben unweigerlich in der Endzusammensetzung zurück. Da über diese aprotischen Lösungsmittel berichtet wird, dass sie hepatotoxisch sind, ist die Verwendung dieser Lösungsmittel im Herstellungsverfahren nicht erwünscht.

**[0014]** Es besteht deshalb ein Bedarf an einer Verbesserung des Verfahrens zur Herstellung solcher Amphotericin B-Zusammensetzungen in großem Maßstab durch Reduktion der Mengen von verwendetem Lösungsmittel. Dadurch werden auch die Herstellungskosten herabgesetzt.

**[0015]** Die erfindungsgemäße Hauptaufgabe besteht in der Entwicklung einer parenteralen wässrigen Zusammensetzung von geringer Toxizität, enthaltend Amphotericin B und Phospholipide im Hinblick auf eine einfache Herstellung und die Reduktion der Herstellungskosten. Eine weitere Erweiterung der erfindungsgemäßen Hauptaufgabe besteht in der Entwicklung einer parenteralen wässrigen Zusammensetzung von geringer Toxizität, die Amphotericin B und Phospholipide enthält und die keine Spuren von DMSO und/oder chlorierten Kohlenwasserstoffen enthält.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0016]** Demgemäß ist der Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine parentrale Dimethylsulfoxid-freie wässrige Zusammensetzung von geringer Toxizität, die Amphotericin B, Natriumchlorid und Phospholipide enthält.

**[0017]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiter ein Verfahren zur Herstellung einer parenteralen, Dimethylsulfoxid-freien wässrigen Zusammensetzung von geringer Toxizität, die Amphotericin B, Natriumchlorid und Phospholipide enthält, umfassend die Schritte von:

- (i) Auflösen von einem oder mehr Phospholipid(en) in einem oder mehr parenteral verträglichen organischen Lösungsmittel(n), wie zum Beispiel Methanol, Ethanol, Isopropylalkohol, Chloroform, Kohlenstofftetrachlorid und Methylenechlorid, und dann Entfernen der Lösungsmittel durch Verdampfung unter reduziertem Druck zur Bildung eines Trockenfilms aus den einzelnen oder gemischten Phospholipiden;
- (ii) Suspendieren von Amphotericin B in einer parenteral verträglichen wässrigen Phase, die kein Natriumchlorid enthält, oder Suspendieren von mikronisiertem Amphotericin B in einer parenteral verträglichen wässrigen Phase, die Natriumchlorid enthalten kann;
- (iii) Zufügen der wässrigen Phase, enthaltend am Ende von Schritt (ii) gebildetes suspendiertes Amphotericin B zu genanntem Film aus Phospholipiden, der am Ende von Schritt (i) erhalten wurde und Mischen der beiden zum Erhalt einer Suspension von genanntem Amphotericin B zusammen mit genannten Phospholipiden in genannter wässriger Phase;
- (iv) Einstellen des pH der am Ende von Schritt (iii) erhaltenen genannten Suspension auf 6,0–8,0 und dann ihr Homogenisieren, bis sie durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar ist;
- (v) Zufügen von ausreichender Natriumchloridlösung in Wasser am Ende von Schritt (iv), damit der Natriumchloridgehalt des Endproduktes mindestens 0,1% (w/v) beträgt.

(vi) Filtrieren der am Ende von Schritt (v) erhaltenen genannten homogenisierten Suspension durch ein Glasfaserfilter von 2 µ und Füllen des Filtrats in Glasfläschchen unter einer Stickstoffdecke, festes Verschließen der Fläschchen und Sterilisieren der fest verschlossenen Fläschchen mittels Autoklavieren zum Erhalt des Endproduktes, das zur parenteralen Verabreichung geeignet ist.

**[0018]** Gegenstand der Erfindung ist auch eine parenterale wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B von geringer Toxizität, die mindestens 0,1% (w/v) Natriumchlorid und Phospholipide wie hierin beschrieben und durch das erfindungsgemäße Verfahren, wie hierin vorstehend beschrieben, hergestellt enthält.

Ausführliche Beschreibung der erfindungsgemäßen Ausführungsformen

**[0019]** Der Gehalt von Amphotericin B in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung variiert von 0,1% (w/v) bis 1,0% (w/v) der Zusammensetzung, wobei der Gehalt von Amphotericin B bevorzugt bei 0,5% (w/v) der Zusammensetzung liegt.

**[0020]** Der Gesamtgehalt von Phospholipiden variiert von 0,1% (w/v) bis 1,0% (w/v) der Zusammensetzung. Der bevorzugte Gehalt beträgt von ca. 0,4% bis ca. 0,6% (w/v).

**[0021]** Das Gewichtsverhältnis von Amphotericin B zu Phospholipiden beträgt von ca. 1 : 0,5 bis ca. 1 : 1,5. Das bevorzugte Gewichtsverhältnis beträgt von ca. 1 : 0,8 bis ca. 1 : 1,2.

**[0022]** In diesem Verfahren werden die Phospholipide aus Eiphosphatidylcholin oder einem Gemisch aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und dem Natriumsalz von Dimyristoylphosphatidylglycerin (DMPG) gewählt. Wenn ein Gemisch aus zwei Phospholipiden, DMPC und DMPG, verwendet wird, dann liegt das Gewichtsverhältnis von Phospholipiden, DMPC : DMPG, zwischen 7 : 1 und 7 : 15, bevorzugt 7 : 3.

**[0023]** Die zum Auflösen der Phospholipide verwendeten Lösungsmittel werden aus alkoholischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Ethanol, Methanol, Isopropylalkohol mit oder ohne Zusatz von chlorierten Kohlenwasserstoffen, wie zum Beispiel Chloroform, Methylenchlorid und Kohlenstofftetrachlorid, ausgewählt. Alkoholische Lösungsmittel allein oder chlorierte Kohlenwasserstoffe allein können zum Auflösen der Phospholipide verwendet werden. Alternative alkoholische Lösungsmittel und chlorierte Kohlenwasserstoffe können in Kombination zur Auflösung der Phospholipide auch verwendet werden. Wenn keine chlorierten Kohlenwasserstoffe ausgewählt werden, ist die Zusammensetzung frei von chlorierten Kohlenwasserstoffen. Ein zum Auflösen der Phospholipide bevorzugtes Lösungsmittel ist Ethanol.

**[0024]** Mikronisiertes Amphotericin B, wann immer es erfindungsgemäß verwendet wird, wird unter Verwendung einer Luftstrommühle zu einer Partikelgröße von weniger als 10 Mikron mikronisiert.

**[0025]** Der pH der zum Dispergieren von Amphotericin B verwendeten wässrigen Phase wird unter Verwendung von verdünnter Natriumhydroxid-Lösung auf 6,0–8,0 eingestellt, wann immer keine Pufferlösung in der Zusammensetzung verwendet wird.

**[0026]** Die zum Suspendieren von Amphotericin B verwendete wässrige Phase ist ein parenteral verträgliches Vehikel, wie zum Beispiel Wasser oder Phosphatpuffer. Wenn mikronisiertes Amphotericin B verwendet wird, kann es sich bei der zur Suspension von Amphotericin B verwendeten wässrigen Phase um Kochsalzlösung, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Wasser oder Phosphatpuffer handeln.

**[0027]** Natriumchlorid wird nach der Homogenisierung und vor der Filtration als Lösung in Wasser zugefügt. Natriumchlorid kann jedoch auf jeder Stufe (ii) bis (v) der unter „Zusammenfassung der Erfindung“ spezifizierten Herstellung zugefügt werden, wenn mikronisiertes Amphotericin B verwendet wird.

**[0028]** Die Konzentration von Natriumchlorid beträgt von ca. 0,1% bis 0,9% (w/v) der Zusammensetzung, bevorzugt 0,4% bis 0,9% (w/v) der Zusammensetzung.

**[0029]** Die Homogenisierung wird mithilfe eines Hochdruckhomogenisators bei nicht weniger als 5000 psi durchgeführt, bis das Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 Mikron filtrierbar ist.

**[0030]** In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Lipidsuspension von Amphotericin B vor dem Homogenisieren in einem Bad-Beschallungsgerät beschallt, um nach Einstellung des pH auf ca. 6,0–8,0 eine gleichförmige Suspension zu erhalten. Zum Einstellen des pH wird verdünnte Natriumhydro-

xid-Lösung verwendet, wann immer in der Zusammensetzung keine Pufferlösung verwendet wird.

**[0031]** Die homogenisierte Amphotericin B-Lipidsuspension wird nach dem üblichen Filtrationsverfahren unter Druck, entweder unter Verwendung von filtriertem Stickstoff oder filtrierter Kompressionsluft, durch Glasfaserfilter von 2 µ filtriert.

**[0032]** Nach der Filtration wird die homogenisierte Suspension unter einer Stickstoffdecke in Fläschchen gefüllt und anhand von konventionellem Autoklavieren bei 110°C bis 121°C, bevorzugt 20 Minuten bei 121°C oder 40 Minuten bei 110°C sterilisiert. Die Sterilisation kann auch durch ein Spezialautoklavierverfahren durchgeführt werden, bei dem die Zeit des Erhitzungs- und Abkühlungszyklus durch Schnellerhitzungs- und Schnellabköhlungssysteme reduziert ist.

**[0033]** Im früheren Verfahren zur Herstellung von HDLC, wie in US-Patenten 4973465 (1990) und 5616334 (1997) beschrieben, wird Amphotericin B in sehr großen Mengen organischer Lösungsmittel aufgelöst. In einem der Beispiele in US-Patent 5616334 (1997) wird zur Herstellung von 1 Fläschchen mit 20 ml Amphotericin B-Lipid-Komplex, der 100 mg Amphotericin B entspricht, ein Liter Methanol verwendet. In einem anderen Beispiel wurden zum Vermindern des Lösungsmittelvolumens 5 ml DMSO für 100 mg Amphotericin B verwendet, DMSO wird jedoch nicht als Lösungsmittel zur intravenösen Injektion empfohlen, weil DMSO Berichten zufolge hepatotoxisch ist.

**[0034]** Während das konventionelle Verfahren DMSO zum Auflösen von Amphotericin B verwendet, wird Amphotericin B im erfindungsgemäßen Verfahren in keinerlei Lösungsmitteln aufgelöst.

**[0035]** Wenn im erfindungsgemäßen Verfahren das in einer wässrigen Phase suspendierte Amphotericin B, enthaltend Natriumchlorid, dem Lipidfilm zugefügt und homogenisiert wurde, wurde beobachtet, dass es Aggregate bildete, und das homogenisierte Produkt war anhand des üblichen Filtrationsverfahrens nicht durch ein Glasfaserfilter von 2 Mikron filtrierbar.

**[0036]** Nach umfangreicher Experimentierung fanden wir, wenn die wässrige Phase zum Suspendieren von Amphotericin B ohne Zufügen von jeglichem Natriumchlorid darin hergestellt wurde, dass die Homogenisierung ohne jegliche Aggregation der Suspension glatt ablief und der homogenisierte Großteil filtrierbar war.

**[0037]** Während des erfindungsgemäßen Verlaufs fanden wir jedoch, dass Natriumchlorid zur Reduktion der Toxizität in der Zusammensetzung wesentlich ist. Wässrige Zusammensetzungen von Amphotericin B, die verschiedene Natriumchlorid-Konzentrationen in einer Dosis von 80 mg/kg Körpergewicht enthalten, wurden einer aus 8 Mäusen bestehenden Gruppe injiziert. Die wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B ohne jedwedes Natriumchlorid, wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben, wurde hergestellt und getrennt injiziert. Vor jeder Injektion wurde ein Volumen, das einer Dosis von 80 mg/kg Körpergewicht entspricht, mit 5 ml 5%iger Dextrose zur Injektion auf 0,5 verdünnt, um sie isotonisch zu machen. Die am Ende von 72 Stunden beobachtete Mortalität (%) ist in Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1

Natriumchlorid-Konzentration in der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B	Herstellung nach Beispiel:	Mortalität (%) in Mäusen bei einer Dosis von 80 mg/kg
0,9 % (w/v)	III	0
0,7 % (w/v)	IV	0
0,4 % (w/v)	V	0
0,1 % (w/v)	VI	50 %
0	XIII	87,5 %

**[0038]** Aus Tabelle 1 geht deutlich hervor, dass zur Reduktion der Toxizität eine Mindestkonzentration von 0,1% Natriumchlorid wesentlich ist. Deshalb wurde während der Hydratation des Phospholipidfilms die wässrige Phase ohne jegliches Natriumchlorid verwendet, um die Homogenisierung glatt und die Filtration durch ein

Glasfaserfilter von 2 µ leicht zu machen. Natriumchlorid wurde nach dem Homogenisierungsverfahren als eine Lösung zugefügt. Das Zufügen von Natriumchlorid zur erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist zur Reduktion der Toxizität von Amphotericin B wesentlich. Trotzdem ist mit dem Zufügen von 0,1% (w/v) Natriumchlorid (die LD<sub>50</sub> betrug 80 mg/kg) diese LD<sub>50</sub> sehr viel höher als die der konventionellen Amphotericin B-Präparationen, die Natriumdesoxycholat enthalten, von dem berichtet wird, dass es bei ca. 4 mg/kg vorliegt.

**[0039]** Nach vielen weiteren Experimenten fanden wir, dass die Reduktion der durchschnittlichen Partikelgröße von Amphotericin B auf weniger als 10 Mikron durch Mikronisieren bei der Begegnung des Aggregationsproblems während der Homogenisierung half. Die Partikelgrößenanalyse von Amphotericin B vor und nach der Mikronisierung wurde mit dem Sympatic HELOS Particle Size Analyser durchgeführt.

**[0040]** Die Mikronisierung von Amphotericin B half auch bei der Begegnung des Filtrationsproblems, das mit dem Vorliegen von Natriumchlorid in der homogenisierten wässrigen Suspension, enthaltend nicht mikronisiertes Amphotericin B und Phospholipid, einhergeht.

**[0041]** Filtration des unter Verwendung von mikronisiertem Amphotericin B hergestellten homogenisierten Großteils ist leicht, und üblicherweise verwendete Filter können verwendet werden; im Verfahren im Stand der Technik, wie zum Beispiel in US-Patent 5616334 (1997), wird das Filtrieren von HDLC über einen umständlichen Weg oder direkt durch ein Membranfilter, wie zum Beispiel ein Polycarbonatfilter, durchgeführt.

**[0042]** In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform konnten wir folglich dem Problem mit der Aggregation und Filtration unter Verwendung von nicht mikronisiertem Amphotericin B durch Vermeidung des Zufügens von Natriumchlorid zur wässrigen Phase begegnen. Wir fanden jedoch, dass das Zufügen von Natriumchlorid in mindestens einer Mindestkonzentration von 0,1% (w/v) zur Reduktion der Toxizität der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B wesentlich ist. Wir lösten das Aggregations- und Filtrationsproblem mit dem darin vorliegenden Natriumchlorid dadurch, dass wir das Zufügen von Natriumchlorid bis zum Homogenisierungsschritt verschoben.

**[0043]** Demgemäß ist in der ersten erfindungsgemäßen Ausführungsform im Verfahren zur Herstellung einer sterilen wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B von geringer Toxizität, enthaltend mindestens 0,1% (w/v) Natriumchlorid, die zum Dispergieren von nicht mikronisiertem Amphotericin B verwendete wässrige Phase Wasser oder Phosphatpuffer, das/der kein Natriumchlorid enthält. Natriumchlorid wird kurz nach der Homogenisierung der wässrigen Suspension, enthaltend nicht mikronisiertes Amphotericin B und die Phospholipide, zugefügt.

**[0044]** In der zweiten erfindungsgemäßen Ausführungsform wurde das Aggregations- und Filtrationsproblem der Suspension des Phospholipids und der wässrigen Phase, enthaltend Amphotericin B, unter Verwendung von mikronisiertem Amphotericin B gelöst.

**[0045]** In Kombination der beiden Ausführungsformen, wenn das verwendete Amphotericin B mikronisiert und in einer wässrigen Phase, die kein Natriumchlorid enthält, suspendiert ist, wird Natriumchlorid der wässrigen Phase vor, während oder nach dem Homogenisierungsschritt zugefügt.

#### Beispiele

**[0046]** Die Erfindung wird nun durch Beispiele erläutert. Die Beispiele sind lediglich Erläuterungen und schränken in keiner Weise den erfindungsgemäßen Umfang ein. Wie nachstehend in Tabelle 2 beschrieben wird, gibt es 4 Gruppen von Beispielen.

Tabelle 2

Gruppe	Beispiel Nr.	Amphotericin B	Zum Dispergieren von Amphotericin B verwendete wässrige Phase	Zugabe von Salz	Erfindungsgemäße Ausführungsform
A	I - II	Nicht mikronisiert	Enthält kein Salz	Nach dem Homogenierungsschritt	Erste
B	III - VI ) VIII - IX)	Mikronisiert	Enthält Salz	-----	Zweite
	VII*	Mikronisiert	Enthält Salz	-----	Zweite
C	X - XII	Mikronisiert	Enthält kein Salz	Während/nach dem Homogenierungsschritt	Erste und zweite
D	XIII XIV	Mikronisiert Nicht mikronisiert	Enthält kein Salz	-----	Nicht erfundungsgemäß

\* Das zum Auflösen der Phospholipide verwendete Lösungsmittel ist nur Ethanol.

[0047] Alle in diesen Beispielen verwendeten Rohmaterialien waren von parenteralem Gütegrad. Bei den verwendeten Geräten handelte es sich um die üblichen. Die gesamte Verarbeitung wurde in einem Bereich mit zur Herstellung steriler Produkte erforderlicher kontrollierter Umgebung durchgeführt.

[0048] In diesen Beispielen verwendetes Amphotericin B war von parenteralem Gütegrad und wurde von Alpharma in Compliance mit den USP-Spezifikationen bezogen. Wann immer in diesen Beispielen verwendet, wurde mikronisiertes Amphotericin B durch Mikronisierung von Amphotericin B unter Verwendung einer Luftstrommühle auf eine Partikelgröße von weniger als 10 Mikron hergestellt.

[0049] Die in den Beispielen verwendeten Phospholipide, DMPC und DMPG, waren von parenteralem Gütegrad und wurden von Avanti Polar Lipids bezogen.

[0050] Das in den Beispielen verwendete Phospholipid, Eiphosphatidylcholin, war von parenteralem Gütegrad und wurde von Lipoids bezogen.

[0051] In den Beispielen verwendete organische Lösungsmittel waren p. a. (pro analysi). d. h. von analysenreinem Gütegrad.

[0052] In den Beispielen verwendetes Phosphatpuffer wurde nach der Indischen Pharmakopöe hergestellt.

[0053] Die im Beispiel verwendete phosphatgepufferte Kochsalzlösung von pH 7,4 wurde durch Auflösen von 1,19 g Dinatriumhydrogenorthophosphat, 0,095 g Kaliumdihydrogenorthophosphat und 4 g Natriumchlorid in 400 ml Wasser hergestellt. Zum Auffüllen des Volumens auf 500 ml wurde Wasser zugefügt.

#### GRUPPE A: Beispiele I und II

[0054] Die in diesen Beispielen verwendeten Bestandteile sind in Tabelle 3 ersichtlich:

Tabelle 3

		<b>Beispiel I</b>	<b>Beispiel II</b>
a)	Amphotericin B	1,00 g	1,00 g
b)	DMPC	0,68 g	0,68 g
c)	DMPG	0,30 g	0,30 g
d)	Ethanol*	200 ml	200 ml
e)	Chloroform*	10 ml	10 ml
f)	pH - bei der Dispersion vor der Homogenisierung	6,95** 6,80**	7,2 7,2
g)	Natriumchlorid	1,80 g	1,80 g
h)	Wasser q.s. auf	200 ml	--
i)	Phosphatpuffer pH 7,2 q.s. auf	--	200 ml

\*Bleibt nicht im Endprodukt zurück

\*\*Einstellung mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung

## Verfahren

**[0055]** In Beispiel I wurde Amphotericin B in 150 ml Wasser unter Rühren und Durchperlen mit Stickstoff suspendiert. Der pH wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung auf ca. 6,95 eingestellt.

**[0056]** In Beispiel II wurde Amphotericin B in 150 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) unter Rühren und Durchperlen mit Stickstoff suspendiert.

**[0057]** Die Phospholipide, DMPC und DMPG, wurden in Chloroform in einem Rotationskolben aufgelöst. Nach der vollständigen Auflösung der Phospholipide wurde Ethanol zugefügt und unter Rotation des Kolbens bei mäßiger Geschwindigkeit unter Flushing mit Stickstoff mischen lassen. Diese alkoholische Lösung wurde unter reduziertem Druck bis zur vollkommenen Trockenheit rotationsverdampft. Nach vollständiger Entfernung der Lösungsmittel wurde 30 Minuten lang Stickstoff durchgespült.

**[0058]** Der Trockenlipidfilm wurde im Rotationskolben mit der wässrigen Suspension von Amphotericin B, die wie vorstehend hergestellt wurde, wobei der Kolben unter kontinuierlicher Rotation unter kontinuierlichem Flushing mit Stickstoff gehalten wurde, hydratisiert. Der pH der in Beispiel I erhaltenen Amphotericin B-Lipidsuspension wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung auf ca. 6,80 eingestellt. Der Inhalt des Kolbens wurde 1 h in einem Bad-Beschallungsgerät beschallt. Das Volumen wurde mit Wasser in Beispiel I und mit Phosphatpuffer (pH 7,2) in Beispiel II auf 180 ml aufgefüllt.

**[0059]** Die Amphotericin B-Lipidsuspension wurde dann unter Verwendung eines APV-Hochdruckhomogenisators homogenisiert, bis das homogenisierte Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar war.

**[0060]** Natriumchlorid wurde in Wasser aufgelöst und in Beispiel I mit Wasser auf 20 ml verdünnt. Natriumchlorid wurde in Beispiel II aufgelöst in und mit Phosphatpuffer (pH 7,2) auf 20 ml verdünnt. Diese Natriumchlorid-Lösung wurde der homogenisierten Amphotericin B-Lipidsuspension unter Röhren bei niedriger Geschwindigkeit und Flushing mit Stickstoff zugefügt. Dieses Produkt wurde an den Homogenisator zurück transferiert und 5 Minuten ohne Druckbeaufschlagung rezirkuliert. Dann wurde es durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtriert und unter Stickstoff in Glasbehältnisse gefüllt, fest verschlossen und 40 min bei 110°C autoklaviert. In Beispiel II wird das Autoklavieren 40 min bei 110°C mit einem Schnellerhitzungs- und Schnellabkühlungszyklus durchgeführt.

## GRUPPE B

## 1) Beispiele III bis VI

**[0061]** Die in diesen Beispielen verwendeten Bestandteile sind in Tabelle 4 ersichtlich, wobei bei dem nachstehenden Verfahren die zugefügte Natriumchloridmenge von 1,8 g auf 0,2 g geändert wurde.

Tabelle 4

	Beispiele				
	III	IV	V	VI	
a)	Amphotericin B (mikronisiert)	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)	Natriumchlorid	1,80 g	1,40 g	0,80 g	0,20 g
e)	Ethanol*	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
f)	Chloroform*	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
g)	pH - bei Dispersion vor der Homogenisierung	7,20 ** 7,00**	7,15** 7,10**	7,05** 7,15**	7,20** 7,00**
h)	Wasser q.s. auf	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml

\*Bleibt nicht im Endprodukt zurück.

\*\*Einstellung mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung

## Verfahren

**[0062]** Die Phospholipide, DMPC und DMPG, wurden in Chloroform in einem Rotationskolben aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung der Phospholipide wurde Ethanol zugefügt und unter Rotation des Kolbens bei mäßiger Geschwindigkeit unter Flushing mit Stickstoff mischen lassen. Diese alkoholische Lösung wurde unter reduziertem Druck bis zur vollkommenen Trockenheit rotationsverdampft. Nach vollständiger Entfernung der Lösungsmittel wurde 30 min lang Stickstoff durchgespült.

**[0063]** Natriumchlorid wurde in 175 ml Wasser aufgelöst. Stickstoff wurde 15 min in diese Lösung gepert. Mikronisiertes Amphotericin B wurde dann in der Natriumchlorid-Lösung unter Rühren und unter Durchperlen von Stickstoff suspendiert. Der pH wurde durch Zufügen von 0,1 n Natriumhydroxid auf die wie in Tabelle 4 für jedes Beispiel gezeigten Werte eingestellt.

**[0064]** Der Trockenlipidfilm wurde im Rotationskolben mit wie vorstehend hergestellter wässriger Suspension von Amphotericin B hydratisiert, wobei der Kolben unter kontinuierlicher Rotation mit kontinuierlichem Flushing mit Stickstoff gehalten wurde.

**[0065]** Der pH dieses erhaltenen Amphotericin B-Lipid-Komplexes wurde wie in Tabelle 4 ersichtlich eingestellt. Der Kolbeninhalt wurde 1 h in einem Bad-Beschallungsgerät beschallt.

**[0066]** Das Volumen wurde mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

**[0067]** Die Amphotericin B-Lipidsuspension wurde dann unter Verwendung eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, bis das Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar war.

**[0068]** Die homogenisierte Amphotericin B-Lipidsuspension wurde durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtriert und unter Stickstoff in Glasbehältnisse gefüllt, fest verschlossen und 40 min bei 110°C mit einem Schnellerhitze- und Schnellkühlungszyklus autoklaviert.

**[0069]** Toxizitätsstudien an Mäusen mit dem Produkt von Beispielen III, IV und V bei einer Dosis von 80 mg/kg

Körpergewicht ließ keine Mortalität erkennen, während die von Beispiel VI eine 50%ige Mortalität zeigte.

Gruppe B (Fortsetzung)

2) Beispiele VII bis IX

**[0070]** Die in diesen Beispielen verwendeten Bestandteile sind in Tabelle 5 mit dem nachstehend angegebenen Verfahren ersichtlich.

Tabelle 5

	<b>Beispiele</b>		
	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>
a) Amphotericin B (mikronisiert)	1 g	1 g	1 g
b) DMPC	0,68 g	--	0,68 g
c) DMPG	0,30 g	--	0,30 g
d) Eiphosphatidylcholin	--	0,90 g	--
e) Natriumchlorid	1,80 g	1,80 g	***
f) Ethanol*	300 ml	200 ml	200 ml
g) Chloroform*	--	15 ml	10 ml
h) pH - bei Dispersion vor der Homogenisierung	7,15** 7,05**	7,15** 6,95**	7,40 7,40
i) Wasser q.s. auf	200 ml	200 ml	--
j) Phosphatgepufferte Kochsalzlösung q.s. auf	-	--	200 ml

\*Bleibt nicht im Endprodukt zurück.

\*\*Einstellung mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung

\*\*\*ca. 2 g werden von PBS beigetragen.

Verfahren

**[0071]** In Beispiel VII wurden die Phospholipide, DMPC und DMPG, in Ethanol in einem Rotationskolben durch Rotation des Kolbens bei mäßiger Geschwindigkeit unter Flushing mit Stickstoff aufgelöst.

**[0072]** In Beispiel VIII wurde Phospholipid, Eiphosphatidylcholin, in Chloroform in einem Rotationskolben aufgelöst, und in Beispiel IX wurden die Phospholipide, DMPC und DMPG, in Chloroform in einem Rotationskolben aufgelöst. Nach der vollständigen Auflösung der Phospholipide in Chloroform wurde Ethanol zugefügt und durch Rotation des Kolbens bei mäßiger Geschwindigkeit unter Flushing mit Stickstoff mischen lassen.

**[0073]** In diesen Beispielen wurden die so erhaltenen Phospholipid-Lösungen unter reduziertem Druck bis zur vollständigen Trockenheit rotationsverdampft. Nach der vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurde 30 min lang Stickstoff durchgespült.

**[0074]** In den Beispielen VII und VIII wurde Natriumchlorid in 175 ml Wasser aufgelöst. Diese Lösung wurde 15 min mit Stickstoff durchperlt. Dann wurde mikronisiertes Amphotericin B in der Natriumchlorid-Lösung unter Rühren und unter Durchperlen von Stickstoff mikronisiert, der pH wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung auf ca. 7,15 eingestellt.

**[0075]** In Beispiel IX wurde mikronisiertes Amphotericin B in 175 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4; PBS) unter Röhren suspendiert. Stickstoff wurde für die Dauer von 15 Minuten durchgeperlt. PBS trägt zu ca. 2 g Natriumchlorid bei.

**[0076]** Der Trockenlipidfilm wurde im Rotationskolben mit wässriger Suspension von wie vorstehend hergestelltem mikronisiertem Amphotericin B hydratisiert, wobei der Kolben unter kontinuierlicher Rotation mit kon-

tinuierlichem Flushing mit Stickstoff gehalten wurde. Der pH dieser erhaltenen Amphotericin B-Lipidsuspension wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung in Beispiel VII auf 7,05 und in Beispiel VIII auf 6,95 eingestellt.

**[0077]** Das Volumen wurde in Beispiel VII und VIII mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

**[0078]** Das Volumen wurde in Beispiel IX mit phosphatgepufferter Kochsalz-Lösung (pH 7,4) auf 200 ml aufgefüllt.

**[0079]** Die Amphotericin B-Lipidsuspension wurde dann unter Verwendung eines APV-Hochdruckhomogenisators homogenisiert, bis das homogenisierte Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar war.

**[0080]** Die homogenisierte Amphotericin B-Lipidsuspension wurde durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtriert und unter Stickstoff in Glasbehältnisse gefüllt, fest verschlossen und 20 min bei 121°C in Beispiel IX und 40 min bei 110°C in Beispielen VII und VIII autoklaviert.

**[0081]** Die in Beispiel VII erhaltene sterile wässrige Zusammensetzung aus Amphotericin B wurde Toxizitätstudien an Mäusen und Stabilitätsstudien unterzogen. Die Ergebnisse der Toxizitätsstudie sind in Tabelle 6 und die von der Stabilitätsstudie in Tabelle 7 ersichtlich.

#### Analyse der Partikelgröße

**[0082]** Die in Beispiel VII erhaltene Partikelgröße der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B wurde am Modell 770 AccuSizer von Particle Sizing Systems, Inc., USA, bewertet. Es wurde ermittelt, dass die Größe von 95% der Partikel unter 1,63 µ und die Größe von 90% der Partikel unter 1,28 µ lag.

#### Toxizitätsstudie an Mäusen

**[0083]** Die Toxizitätsstudie mit der in Beispiel VII erhaltenen wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B wurde an Mäusen zusammen mit einem konventionellen Amphotericin B-Produkt, enthaltend Natriumdesoxycholat untersucht. Die angestellten Beobachtungen gehen aus Folgendem hervor:

Tabelle 6  
Akute Toxizitätsstudie an Mäusen

---

LD <sub>50</sub> (intravenös)	
Amphotericin B, konventionelles Produkt	- 3,5 mg/kg Körpergewicht
Amphotericin B, wässrige Zusammensetzung von Beispiel VII	- > 80 mg/kg Körpergewicht

---

**[0084]** Die LD<sub>50</sub> der in diesem Labor hergestellten wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B nach einer Einzelinjektion betrug bei Mäusen > 80 mg/kg. Dies war mehr als 20mal höher als die LD<sub>50</sub> nach einer Einzelinjektion des konventionellen Amphotericin B-Produkts, enthaltend Natriumdesoxycholat.

Tabelle 7

Stabilitätsdaten für die wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B von Beispiel VII bei der empfohlenen Lagertemperatur von 2°C–8°C

PERIODE	AUSSEHEN	AMPHOTERICIN B-GEHALT
Initial	Gelbfarbige Suspension, die sich bei Stehenlassen absetzt und sich bei leichtem Schütteln gleichmäßig dispergiert	100,6 %
6 Monate	Gelbfarbige Suspension, die sich bei Stehenlassen absetzt und sich bei leichtem Schütteln gleichmäßig dispergiert	100,3 %
1 Jahr	Gelbfarbige Suspension, die sich bei Stehenlassen absetzt und sich bei leichtem Schütteln gleichmäßig dispergiert	99,8 %
18 Monate	Gelbfarbige Suspension, die sich bei Stehenlassen absetzt und sich bei leichtem Schütteln gleichmäßig dispergiert	98,3 %
2 Jahre	Gelbfarbige Suspension, die sich bei Stehenlassen absetzt und sich bei leichtem Schütteln gleichmäßig dispergiert	96,5 %

**[0085]** Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass die parenterale wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B, die – wenn sie durch das erfindungsgemäße verbesserte Verfahren hergestellt wird – selbst keine Spur von DMSO oder chloriertem Kohlenwasserstoff aufweist, dort wo diese Lösungsmittel überhaupt nicht verwendet werden, den allgemeinen Anforderungen an ein vermarktbare injizierbares Suspensionsprodukt entspricht. Die anhand des Verfahrens von Beispiel VII hergestellte neue wässrige Zusammensetzung ist vollkommen frei von schädlichen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel DMSO und chlorierten Kohlenwasserstoffen.

#### GRUPPE C: Beispiele X bis XII

**[0086]** Die in diesen Beispielen verwendeten Bestandteile sind in Tabelle 8 mit dem nachstehend gegebenen Verfahren ersichtlich

Tabelle 8

	<b>Beispiele</b>		
	<b>X</b>	<b>XI</b>	<b>XII</b>
a) Amphotericin B (mikronisiert)	1 g	1 g	1 g
b) DMPC	0,68 g	0,68 g	0,68 g
c) DMPG	0,30 g	0,30 g	0,30 g
d) Natriumchlorid	1,80 g	1,80 g	1,80 g
e) Ethanol*	200 ml	200 ml	200 ml
f) Chloroform*	10 ml	10 ml	10 ml
g) pH - bei Dispersion vor Homogenisierung	7,15** 6,90**	7,30** 7,00**	7,2 7,2
h) Wasser q.s. auf	200 ml	200 ml	--
i) Phosphatpuffer pH 7,2 q.s. auf	--	--	200 ml

\*Bleibt nicht im Endprodukt zurück.

\*\*Einstellung mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung.

#### Verfahren

**[0087]** Die Phospholipide, DMPC und DMPG, wurden in Chloroform in einem Rotationskolben aufgelöst. Nach der vollständigen Auflösung der Phospholipide wurde Ethanol zugefügt und unter Rotieren des Kolbens bei mäßiger Geschwindigkeit unter Flushing mit Stickstoff mischen lassen. Diese alkoholische Lösung wurde unter reduziertem Druck bis zur vollkommenen Trockenheit rotationsverdampfen lassen. Nach der vollständigen Entfernung von Lösungsmitteln wurde 30 min lang Stickstoff durchgespült. Mikronisiertes Amphotericin B wurde in Beispielen X und XI in 150 ml Wasser und in Beispiel XII in 150 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) unter Rühren und unter Durchperlen mit Stickstoff suspendiert. Der pH wurde durch Zufügen von 0,1 n Natriumhydroxid auf die Werte wie in Tabelle 8 für die Beispiele X und XI ersetzt eingestellt.

**[0088]** Der Trockenlipidfilm wurde im Rotationskolben mit wie vorstehend hergestellter mikronisierter Amphotericin B-Suspension unter Verwendung des Rotationsverdampfers mit kontinuierlichem Flushing mit Stickstoff hydratisiert. Der pH der erhaltenen Amphotericin B-Lipidsuspension wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung wie in Tabelle 8 gezeigt eingestellt. In Beispielen X und XI wurde das Volumen mit Wasser auf 180 ml aufgefüllt, während das Volumen in Beispiel XII mit Phosphatpuffer (pH 7,2) auf 180 ml aufgefüllt wurde. In Beispiel XI wurde der Inhalt des Kolbens 1 Stunde in einem Bad-Beschallungsgerät beschallt.

**[0089]** In Beispielen X und XII wurde die Amphotericin B-Lipidsuspension dann unter Verwendung eines APV-Hochdruckhomogenisators homogenisiert, bis das homogenisierte Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar war.

**[0090]** Natriumchlorid wurde in Wasser aufgelöst und auf 20 ml mit Wasser in Beispiel X verdünnt. Natriumchlorid wurde in Phosphatpuffer mit einem pH von 7,2 aufgelöst und in Beispiel XII mit Phosphatpuffer mit einem pH von 7,2 auf 20 ml verdünnt. Diese Natriumchlorid-Lösung wurde der homogenisierten Lipidsuspension unter Rühren bei niedriger Geschwindigkeit und Flushing mit Stickstoff zugefügt. Dieses Produkt wurde zurück an den Homogenisator transferiert und ohne Druckbeaufschlagung 5 Minuten rezirkuliert.

**[0091]** In Beispiel XI wurde die Amphotericin B-Lipidsuspension nach der Beschallung dreimal unter Druck unter Verwendung eines APV-Hochdruckhomogenisators durch einen Homogenisator gegeben. Natriumchlorid wurde in Wasser aufgelöst und mit Wasser auf 20 ml verdünnt. Diese Natriumchlorid-Lösung wurde bei geringer Mischgeschwindigkeit der am Ende von 3 Durchläufen erhaltenen Amphotericin B-Lipidsuspension zugefügt. Dieses Produkt wurde zurück an den Homogenisator transferiert und ohne Druckbeaufschlagung 5 Minuten rezirkuliert. Dies wurde wieder unter Druck homogenisiert, bis das Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar war.

**[0092]** Das Produkt wurde dann durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtriert. Das filtrierte Produkt wurde unter Stickstoff in Glasbehältnisse gefüllt, dicht verschlossen und 40 Minuten bei 110°C mit einem Schnellerhitzungs- und Schnellkühlungszyklus autoklaviert.

#### GRUPPE D: Beispiele XIII und XIV

**[0093]** Die in diesen Beispielen verwendeten Bestandteile sind in Tabelle 9 mit dem nachstehend angegebenen Verfahren ersichtlich.

Tabelle 9

	<b>Beispiel XIII</b>	<b>Beispiel XIV</b>
a) Amphotericin B (mikronisiert)	1 g	--
b) Amphotericin B (nicht mikronisiert)	--	1 g
c) DMPC	0,68 g	0,68 g
d) DMPG	0,30 g	0,30 g
e) Ethanol*	200 ml	200 ml
f) Chloroform*	10 ml	10 ml
g) Wasser q.s. auf	200 ml	200 ml
h) pH - bei Dispersion vor Homogenisierung	7,25** 7,15**	7,20** 7,10**

\*Bleibt nicht im Endprodukt zurück

\*\*Einstellung mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung

#### Verfahren

**[0094]** Die Phospholipide, DMPC und DMPG, wurden in Chloroform in einem Rotationskolben aufgelöst. Nach der vollständigen Auflösung der Phospholipide wurde Ethanol zugefügt und unter Rotation des Kolbens bei mäßiger Geschwindigkeit unter Flushing mit Stickstoff mischen lassen. Diese alkoholische Lösung wurde unter reduziertem Druck bis zur vollständigen Trockenheit rotationsverdampfen lassen. Nach der vollständigen Entfernung von Lösungsmitteln wurde 30 min lang Stickstoff durchgespült.

**[0095]** In Beispiel XIII wurde mikronisiertes Amphotericin B in Wasser unter Röhren und unter Durchperlen von Stickstoff suspendiert. In Beispiel XIV wurde nicht mikronisiertes Amphotericin B unter Röhren und unter Durchperlen mit Stickstoff in Wasser suspendiert. Der pH wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung wie in Tabelle 9 ersichtlich eingestellt.

**[0096]** Der Trockenlipidfilm wurde im Rotationskolben mit wie vorstehend hergestellter Amphotericin B-Suspension unter Verwendung des Rotationsverdampfers mit kontinuierlichem Flushing mit Stickstoff hydratisiert. Der pH wurde mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung wie in Tabelle 9 ersichtlich eingestellt. In Beispiel XIV wurde der Inhalt des Kolbens 1 h beschallt. Das Volumen wurde mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

**[0097]** Die Amphotericin B-Lipidsuspension wurde dann unter Verwendung eines APV-Hochdruckhomogenisators homogenisiert, bis das homogenisierte Produkt durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtrierbar war.

**[0098]** Die homogenisierte Amphotericin B-Lipidsuspension wurde durch ein Glasfaserfilter von 2 µ filtriert. Das filtrierte Produkt wurde unter Stickstoff in Glasbehältnisse gefüllt, fest verschlossen und autoklaviert. Das Autoklavieren wurde 20 Minuten bei 121°C durchgeführt.

#### Toxizitätsstudie an Mäusen

**[0099]** Die Toxizität der in Beispielen XIII und XIV erhaltenen wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B (ohne Natriumchlorid) wurde an Mäusen zusammen mit der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B, enthaltend Natriumchlorid wie nach Beispiel III, untersucht. Im Folgenden sind die angestellten Beobachtungen ersichtlich:

Tabelle 10  
Akute Toxizitätsstudie an Mäusen

**LD<sub>50</sub> (intravenös)**

Amphotericin B, wässrige Zusammensetzung (mit Natriumchlorid) wie nach Beispiel III	- > 80 mg/kg Körpergewicht
Amphotericin B, wässrige Zusammensetzung (ohne Natriumchlorid) nach Beispielen XIII und XIV	- 40 mg/kg Körpergewicht

**[0100]** Die LD<sub>50</sub> der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B, die nach den Beispielen XIII und XIV ohne Natriumchlorid hergestellt wurde, betrug nach einer Einzelinjektion bei Mäusen 40 mg/kg Körpergewicht im Vergleich zu > 80 mg/kg mit der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B, die mit Natriumchlorid nach Beispiel III hergestellt wurde. Damit konnte belegt werden, dass Natriumchlorid zur Bildung der wässrigen Zusammensetzung von Amphotericin B von geringer Toxizität erforderlich ist.

**ERFINDUNGSGEMÄSSE VORTEILE**

**[0101]** Die erfindungsgemäßen Vorteile sind nachstehend angegeben:

- i) Die wässrige Zusammensetzung von Amphotericin B wurde erfindungsgemäß ohne die Verwendung von DMSO hergestellt, von dem berichtet wurde, dass es hepatotoxisch ist.
- ii) Aufgrund der geringen Löslichkeit von Amphotericin B in parenteral verträglichen organischen Lösungsmitteln (0,1 mg/ml in Methanol) ist ein großes Volumen an organischem Lösungsmittel erforderlich, wodurch das Verfahren langwieriger, zeitaufwendiger und kommerziell nicht durchführbar wird. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist das Auflösen von Amphotericin B in irgendeinem organischen Lösungsmittel nicht erforderlich.
- iii) Das Verfahren im Stand der Technik erfordert ein Spezialverfahren zur Filtration wie die Tangentialflussfiltration oder Extrusion. Im erfindungsgemäßen Verfahren wird die konventionelle Filtration verwendet.
- iv) Das anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellte Produkt ist bei Sterilisation mittels Autoklavieren stabil, wodurch es folglich zum intravenösen Gebrauch geeignet ist.

**[0102]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfach und kostenwirksam und stellt gegenüber dem Verfahren im Stand der Technik eine Verbesserung dar. Das wichtigste Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das erhaltene Produkt von großer Reinheit ohne das Risiko des Zurückbleibens irgendwelcher Spuren schädlicher Lösungsmittel, weil in diesem Verfahren keinerlei dieser Lösungsmittel verwendet werden.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung einer parenteralen, Dimethylsulfoxid-freien wässrigen Zusammensetzung von geringer Toxizität, die Amphotericin B, Natriumchlorid und Phospholipide enthält, umfassend die Schritte von:
  - (i) Auflösen von einem oder mehr Phospholipid(en) in einem oder mehr parenteral verträglichen organischen Lösungsmittel(n) und dann Entfernen der Lösungsmittel durch Verdampfung unter reduziertem Druck zur Bildung eines Trockenfilms aus den einzelnen oder gemischten Phospholipiden;
  - (ii) Suspendieren von Amphotericin B in einer parenteral verträglichen wässrigen Phase, die kein Natriumchlorid enthält, oder Suspendieren von mikronisiertem Amphotericin B in einer parenteral verträglichen wässrigen Phase, die Natriumchlorid enthalten kann;
  - (iii) Zufügen der wässrigen Phase, enthaltend am Ende von Schritt (ii) gebildetes suspendiertes Amphotericin B zu genanntem Film aus Phospholipiden, der am Ende von Schritt (i) erhalten wurde und Mischen der beiden zum Erhalt einer Suspension von genanntem Amphotericin B zusammen mit genannten Phospholipiden in genannter wässriger Phase;
  - (iv) Einstellen des pH der am Ende von Schritt (iii) erhaltenen genannten Suspension auf 6,0–8,0 und dann ihr Homogenisieren, bis sie durch einen Glasfaserfilter von 2 µ flitrierbar ist; und
  - (v) Zufügen von ausreichender Natriumchloridlösung in Wasser am Ende von Schritt (iv), damit der Natriumchloridgehalt des Endproduktes mindestens 0,1% (w/v) beträgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend:

- (vi) Filtrieren der am Ende von Schritt (v) erhaltenen genannten homogenisierten Suspension durch einen Glasfaserfilter von 2 µ und Füllen des Filtrats in Glasfläschchen unter einer Stickstoffdecke, festes Verschließen der Fläschchen und Sterilisieren der fest verschlossenen Fläschchen mittels Autoklavieren zum Erhalt des End-

produktes, das zur parenteralen Verabreichung geeignet ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin die Phospholipide aus Eiphosphatidylcholin (EPC) oder einem Gemisch aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und dem Natriumsalz des Dimyristoylphosphatidylglycerols (DMPG) ausgewählt sind.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das genannte organische Lösungsmittel aus alkoholischen Lösungsmitteln, chlorierten Kohlenwasserstoffen und Gemischen davon ausgewählt ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, worin genanntes organisches Lösungsmittel aus Methanol, Ethanol, Isopropylalkohol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und Methylenechlorid ausgewählt ist.
6. Verfahren nach Anspruch 4, worin genanntes organisches Lösungsmittel Ethanol ist.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Amphotericin B-Gehalt von ca. 0,1% bis 1% (w/v) der Zusammensetzung beträgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Amphotericin B-Gehalt 0,5% (w/v) der Zusammensetzung beträgt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Natriumchlorid-Gehalt zwischen 0,1% bis 0,9% (w/v) der Zusammensetzung beträgt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Natriumchloridgehalt zwischen 0,4% bis 0,9% (w/v) bezogen auf die Zusammensetzung beträgt.
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Gehalt an Phospholipiden von ca. 0,1% bis 1% (w/v) der Zusammensetzung beträgt.
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Gehalt an Phospholipiden 0,4% bis 0,6% (w/v) der Zusammensetzung beträgt.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Gewichtsverhältnis von Amphotericin B zu Phospholipiden von ca. 1 : 0,8 bis ca. 1 : 1,2 beträgt.
14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin Phospholipide Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) in einem Gewichtsverhältnis von DMPC : DMPG von ca. 7 : 1 bis ca. 7 : 15 darstellen.
15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Gewichtsverhältnis von DMPC : DMPG 7 : 3 beträgt.
16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin nicht mikronisiertes Amphotericin B verwendet wird und die in Schritt (ii) nach Anspruch 1 verwendete parenteral verträgliche wässrige Phase Wasser oder Phosphatpuffer darstellt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, worin mikronisiertes Amphotericin B verwendet wird und die in Schritt (ii) nach Anspruch 1 verwendete parenteral verträgliche wässrige Phase Wasser, Phosphatpuffer, Kochsalzlösung oder phosphatgepufferte Kochsalzlösung darstellt.
18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der pH der zur Suspension von Amphotericin B in Schritt (ii) verwendeten genannten wässrigen Phase auf 6,0–8,0 eingestellt ist.
19. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin Sterilisation der homogenisierten filtrierten Suspension mittels konventionellen Autoklavierens durchgeführt wird.
20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Sterilisationstemperatur 110°C beträgt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18 und 20, worin die Sterilisation mittels eines Spezialautoklavierverfahrens durchgeführt wird, worin die Erhitzungs- und Abkühlungszeit mittels eines Schnellerhit-

zungs- und Schnellabkühlungszyklus reduziert wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und 17 bis 21, worin das Amphotericin B mikronisiert wird und Natriumchlorid in einem der Schritte (ii) bis (iv) zugefügt wird, damit der Natriumchlorid-Gehalt des Endproduktes mindestens 0,1% (w/v) beträgt.

23. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Produkt der wässrigen Zusammensetzung vollkommen frei von jeglichem chlorierten Kohlenwasserstoff ist.

24. Parenterale, Dimethylsulfoxid-freie wässrige Zusammensetzung von geringer Toxizität, enthaltend Amphotericin B, Natriumchlorid und Phospholipide, die mittels eines Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche erhältlich ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen