

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01823163.2

[45] 授权公告日 2006 年 5 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1255114C

[22] 申请日 2001.3.16 [21] 申请号 01823163.2

[30] 优先权

[32] 2001.3.1 [33] IN [31] 217/MUM/2001

[86] 国际申请 PCT/IN2001/000040 2001.3.16

[87] 国际公布 WO2002/069983 英 2002.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2003.10.20

[71] 专利权人 印度血清及疫苗有限公司

地址 印度塔纳

[72] 发明人 S·派 S·里范卡

审查员 田丽丽

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 张广育

权利要求书 3 页 说明书 18 页

[54] 发明名称

两性霉素 B 的水性组合物

[57] 摘要

本文描述了一种含有两性霉素 B 的且不含二甲亚砜的低毒性的非肠道水性组合物。组合物还主要由两性霉素 B、磷脂和氯化钠组成。组合物通过高压灭菌法灭菌。本发明还描述了不需要使用溶剂溶解两性霉素 B 的组合物制备方法。本发明还显示组合物可用于治疗侵入性的真菌感染。

1. 一种制备含有两性霉素 B、氯化钠和磷脂且不含二甲亚砆的低毒性的非肠道水性组合物的方法，包括以下步骤，

5 (i) 将一种或多种磷脂溶解在一种或多种可非肠道使用的有机溶剂之中，然后，在减压条件下通过蒸发除去溶剂形成一种单一磷脂或混合磷脂的干燥薄膜；

(ii) 将两性霉素 B 混悬于不含氯化钠的可非肠道使用的水相，或者将微粉化两性霉素 B 混悬于可含氯化钠的可非肠道使用的水相；

10 (iii) 将步骤(ii)末形成的含有混悬两性霉素 B 的水相加入到所述步骤(i)末形成的磷脂薄膜中，将两者混合以得到所述两性霉素 B 与所述水相中的磷脂共存的混悬液；

(iv) 将步骤(iii)末得到的所述混悬液的 pH 值调节至 6.0-8.0，然后将其均化直至其能滤过 2 微米的玻璃纤维滤器；然后

15 (v) 在步骤(iv)末加入足量的氯化钠水溶液，以使最终产物中的氯化钠含量至少为 0.1% w/v。

2. 权利要求 1 的方法，还包括以下步骤

(vi) 在步骤(v)末得到的均化混悬液用一 2 微米 玻璃纤维滤器过滤，将滤液在氮封条件下装入小瓶中并通过高压灭菌法灭菌已封缄的小瓶，以得到适于非肠道给药的最终产物。

20 3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中的磷脂选自卵磷脂酰胆碱或者二豆蔻酰磷脂酰胆碱和二豆蔻酰磷脂酰甘油钠盐 的混合物。

4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述有机溶剂选自醇溶剂、氯代烃以及它们的混合物。

25 5. 权利要求 4 的方法，其中所述有机溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、氯仿、四氯化碳和二氯甲烷。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述有机溶剂是乙醇。

7. 权利要求 1 或 2 的方法，其中两性霉素 B 的含量约为组合物的 0.1%-1% w/v。

30 8. 权利要求 7 的方法，其中两性霉素 B 的含量是组合物的 0.5% w/v。

9. 权利要求 1 或 2 的方法，其中氯化钠的含量是组合物的 0.1%-0.9% w/v。

10. 权利要求 9 的方法,其中氯化钠的含量是组合物的 0.4%-0.9% w/v。
11. 权利要求 1 或 2 的方法,其中的磷脂含量约为组合物的 0.1%-1% w/v。
- 5 12. 权利要求 1 或 2 的方法,其中的磷脂含量是组合物的 0.4%-0.6% w/v。
13. 权利要求 1 或 2 的方法,其中两性霉素 B 对磷脂的重量比约为 1:0.8-1:1.2。
14. 权利要求 1 或 2 的方法,其中磷脂为二豆蔻酰磷脂酰胆碱 与
10 二豆蔻酰磷脂酰甘油,而二豆蔻酰磷脂酰胆碱 与二豆蔻酰磷脂酰甘油的重量比约为 7:1-7:15。
15. 权利要求 14 的方法,其中二豆蔻酰磷脂酰胆碱 与二豆蔻酰磷脂酰甘油的重量比是 7:3。
16. 权利要求 1 或 2 的方法,当使用未微粉化的两性霉素 B 时,
15 权利要求 1 的步骤(ii)中使用的可非肠道使用的水相是水或磷酸盐缓冲液。
17. 权利要求 1 或 2 的方法,当使用微粉化的两性霉素 B 时,权利要求 1 的步骤(ii)中使用的可非肠道使用的水相是水、磷酸盐缓冲液、盐水或磷酸盐缓冲盐水。
- 20 18. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在步骤(ii)中用于混悬两性霉素 B 的所述水相的 pH 值调节至 6.0-8.0。
19. 权利要求 1 或 2 的方法,其中均化后的混悬液的滤液的灭菌通过传统的高压灭菌法灭菌。
20. 权利要求 1 或 2 的方法,其中的灭菌温度是 110℃。
- 25 21. 权利要求 1 或 2 的方法,其中的灭菌通过其中加热和冷却的时间通过快速的热循环和冷循环而减少,这样的高压灭菌操作进行。
22. 权利要求 1 或 2 的方法,其中,当使用的两性霉素是微粉化的时候,需要在步骤(ii)-(iv)中任一步骤中加入氯化钠,以使最终产物中的氯化钠含量至少为 0.1% w/v。
- 30 23. 权利要求 1 或 2 的方法,其中的水性组合物产品完全不含任何氯代烃。
24. 一种由权利要求 1-23 中任一项的方法所制备的含有两性霉

素 B、氯化钠和磷脂且不含二甲亚砷的低毒性的非肠道水性组合物。

两性霉素 B 的水性组合物

发明领域

- 5 本发明涉及低毒性的两性霉素 B 的水性组合物。本发明特别涉及含有适于非肠道给药的磷脂的低毒性两性霉素 B 的水性组合物。

发明背景

- 10 两性霉素 B 是一种用于治疗侵入性真菌感染的多烯类抗真菌、抗生素药物。然而，它具有很高的肾毒性。

两性霉素 B 的毒性可以通过多种方法来降低；其中通常使用 (a) 将药物嵌入到脂质体中的方法和 (b) 将药物转变为高药物脂质复合体 (HDL) 的方法。

- 15 脂质体两性霉素 B 的制备：

在美国专利 4973465 (1990) 中记载了 HDL 的制备方法，其中甾醇如胆甾醇可单独使用或与天然磷脂、卵磷脂相结合使用。

- 20 在美国专利 5616334 (1997) 中记载了一种制备脂质体两性霉素 B 的方法，其中涉及到的是，首先制备空白的多室脂质体 (MLVs)，然后将 MLVs 与超声处理的两性霉素 B 水混悬液相混合。该操作不涉及使用任何溶剂。然而，该操作特别制备的脂质体两性霉素 B 的毒性要远大于两性霉素 B HDL。该操作涉及到将空白脂质体一遍又一遍的挤过叠栅聚碳酸酯滤器以过筛十次。该操作还涉及到在载入药物后将未包封的两性霉素 B 通过离心法除去。

- 25 该美国专利还记载了在“低毒性的药物脂质系统”中制备 HDL 的方法。在该专利中，还记载了制备两性霉素 B 脂质复合体的方法。该技术通常为如下方法：

- 30 HDLs 的制备：首先将药物两性霉素 B 溶于一种溶剂，诸如二甲亚砜 (DMSO) 或甲醇中。脂质，优选将二豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 和二豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG) 以摩尔比 7:3 的比例溶于诸如甲醇、乙醇、氯代烃溶剂之中。将药物溶液和脂质溶液混合。在减压条件下蒸发溶剂，得到一薄层脂质-药物薄膜。然后将薄膜用水性溶液诸如

水、盐水、磷酸盐缓冲盐水或甘氨酸缓冲液水合，形成 HDLCs。

在上述操作的一项变化操作中，所得干燥脂质-药物薄膜在一种溶剂诸如二氯甲烷中进行再混悬，然后在水合薄膜之前在减压条件下蒸发溶剂。

- 5 在上述操作的另一项修正性操作中，将干燥的脂质-药物薄膜脱水以形成薄片；该薄片随后用水性溶液水合。

在另一项操作中，向含有药物和脂质的溶液中加入水性溶液诸如盐水、缓冲液或水，然后除去溶剂得到 HDLCs。在该方法中，不需要形成磷脂薄膜。

- 10 在记载于该美国专利中的另一项可用于形成 HDLCs 的方法中，含有生物活性剂诸如两性霉素 B 的脂质颗粒(或脂质体)按照如下制得。首先制备含 6-50 摩尔百分比的生物活性剂的多室脂质体 (MLVs)。然后将 MLVs 经过热循环，使温度从约 25℃ 升至约 60℃，最优选为约 60℃。这样的循环可形成高度规则的且毒性较低的两性霉素 B 脂质复合体。

- 15 在该美国专利中还记载了另一项可用于制备两性霉素 B 脂质复合体的操作。在该方法中，脂质与氯化钠溶液(0.9%)相混合，然后使用均化器使之均化。两性霉素 B 溶于 DMSO 并在均化的同时加入到脂质溶液中，再次均化约 30 分钟，直至颗粒粒度降低到低于约 10 微米，优选降低到约 10 微米。所得脂质颗粒的大小经切向流过滤进行选择。此操作的缺点是所使用的溶剂 DMSO 具有很高的沸点，因此很难从产品中除去。进而在最终产物中尚存留有痕量的 DMSO。对于静脉给药来说，是不希望留有痕量的这种溶剂的，因为这种溶剂据报道具有肝毒性(传染病杂志<The journal of Infectious diseases>1991 年：164，418 页-421 页)。

- 25 HDLCs 对于降低两性霉素 B 毒性来说是非常有用的制剂，但是在美国专利 5616334 (1997)描述的工艺中需要使用大量的有机溶剂，这是因为两性霉素 B 在大多数常用的可非肠道使用的有机溶剂中的溶解度都很低。因此在该操作还需要通过蒸发除去大量的有机溶剂。其它可选用的非质子传递溶剂诸如二甲亚砷、二甲基甲酰胺也可用于溶解两性霉素 B。这些非质子传递溶剂具有很高的沸点，必定将在最终组合物中残留下痕量的溶剂。由于这些非质子传递溶剂都
- 30

报道具有肝毒性，因此在制备过程中是不希望使用这些溶剂的。

因此，人们需要对大规模的制备两性霉素 B 组合物的操作过程进行改进——通过减少溶剂的使用量来实现此目的。这样同时也能降低生产成本。

- 5 本发明的主要目的是开发一种含有两性霉素 B 和磷脂的低毒性非肠道水性组合物，以简化制造方法从而降低制造成本。本发明制药目的的进一步拓展是开发一种含有两性霉素 B 和磷脂且不含有痕量 DMSO 和/或氯代烃的低毒性非肠道水性组合物。

10 发明概述：

相应的，本发明涉及一种含有两性霉素 B、氯化钠和磷脂，但是不含二甲亚砜的低毒性非肠道水性组合物。

本发明进一步的涉及制备含有两性霉素 B、氯化钠和磷脂而不含二甲亚砜的低毒性非肠道水性组合物的方法，该方法包括以下步骤

- 15 (i) 将一种或多种磷脂溶于一种或多种选自如下可非肠道使用的溶剂，诸如甲醇、乙醇、异丙醇、氯仿、四氯化碳和二氯甲烷之中，然后通过减压条件下蒸发除去溶剂，以形成单一磷脂或混合磷脂的干燥薄膜；

- 20 (ii) 将两性霉素 B 混悬于可非肠道使用的不含氯化钠的水相中，或者将粉碎后的两性霉素 B 混悬于可非肠道使用的可含有氯化钠的水相中；

(iii) 将在步骤(ii)末形成的含有混悬两性霉素 B 的水相加入到所述步骤(i)末得到的磷脂薄膜中，并混合两者以形成所述两性霉素 B 和所述磷脂共混于所述水相中的混悬液；

- 25 (iv) 调节步骤(iii)末得到的所述混悬液的 pH 至 6.0-8.0，然后均化该混悬液直至其能滤过 2 μ 的玻璃纤维滤器；

(v) 在步骤(iv)末加入足量的氯化钠水溶液，以使最终产物中氯化钠含量至少为 0.1% w/v；

- 30 (vi) 所述步骤(v)末得到的均化后的混悬液用 2 μ 玻璃纤维滤器过滤，滤入氮气覆盖的滤器小瓶中，封缄小瓶并通过高压灭菌法灭菌已封缄的小瓶，以得到适宜非肠道给药的最终产物。

本发明还涉及了一种上文所述的按照本发明方法制备的低毒性

非肠道的两性霉素 B 的水性组合物,其中含有如此文所述的至少 0.1% w/v 的氯化钠以及磷脂。

本发明具体实施方式的详细说明

- 5 本发明组合物中两性霉素 B 的含量可为组合物的 0.1% w/v 至 1.0% w/v, 优选两性霉素 B 的含量是组合物的 0.5% w/v。

磷脂的总含量为组合物的 0.1% w/v 至 1.0% w/v。优选的含量为约 0.4%至约 0.6% w/v。

- 10 两性霉素 B 对磷脂的重量比为约 1:0.5 至约 1:1.5。优选的重量比是约 1:0.8 至约 1:1.2。

在该操作中,磷脂选自蛋卵磷脂、或者二豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和二豆蔻酰磷脂酰甘油钠盐(DMPG)的混合物。当使用两种磷脂 DMPC 和 DMPG 的混合物时, 磷脂 DMPC:DMPG 的重量比在 7:1 和 7:15 之间, 优选 7:3。

- 15 用于溶解磷脂的溶剂选自醇溶剂, 诸如乙醇、甲醇、异丙醇, 可加入或不加入氯代烃, 诸如氯仿、二氯甲烷、四氯化碳。单独使用醇溶剂或单独使用氯代烃都可用以溶解磷脂。另外, 醇溶剂和氯代烃也可以结合的形式溶解磷脂。当不选用氯代烃时, 该组合物不含氯代烃。优选的用于溶解磷脂的溶剂是乙醇。

- 20 本发明中所使用的微粉化两性霉素 B 使用喷气磨微粉化至粒径小于 10 微米。

当组合物中不使用缓冲液时, 用于分散两性霉素 B 的水相需使用稀释的氢氧化钠溶液将 pH 值调节至 6.0-8.0。

- 25 用于两性霉素 B 的水相是可非肠道使用的载体, 诸如水或磷酸盐缓冲液。当使用微粉化的两性霉素 B 时, 用于混悬两性霉素 B 的水相可以是盐水、磷酸盐缓冲液盐水、水或磷酸盐缓冲液。

氯化钠以水溶液的形式在均化之后、过滤之前加入。然而, 当使用微粉化的两性霉素 B 时, 氯化钠可以在“发明概述”中所述的制备步骤(ii)至(iv)中任一的步骤中加入。

- 30 氯化钠的浓度约为组合物的 0.1%至 0.9% w/v, 优选组合物的 0.4%至 0.9% w/v。

使用高压均化器, 在不低于 5000psi 下进行均化, 直至产品能滤

过 2 微米的玻璃纤维滤器。

在本发明的另一个具体实施方式中,两性霉素 B 脂质混悬液在均化前在水浴超声仪中超声处理,以便在将 pH 值调节至约 6.0-8.0 后得到均匀的混悬液。当组合物中不使用缓冲液时,使用稀释的氢氧化钠溶液调节 pH。

根据常规的过滤操作,将均化后的两性霉素 B 脂质混悬液在过滤的氮气或过滤的压缩空气的压力下,滤过 2 μ 玻璃纤维滤器。

过滤之后,将均匀混悬液填充到氮气覆盖下的小瓶中,并用常规高压灭菌法在 110℃ 至 121℃ 下灭菌,优选在 121℃ 下灭菌 20 分钟,或者在 110℃ 下灭菌 40 分钟。灭菌过程也可以由特定的高压灭菌操作进行,其中可由快速加热和快速冷却系统来减少热循环和冷循环所需的时间。

在美国专利 4973465 (1990) 和 5616334 (1997) 中描述的早期的制备 HDLCs 的方法中,两性霉素 B 溶于非常大量的有机溶剂中。在美国专利 5616334 (1997) 的一个实施例中,为了制备 1 瓶 20 ml 的两性霉素 B 脂质复合体,相当于 100mg 两性霉素 B,需要使用 1 升甲醇。在另一个实施例中,为了降低了溶剂的使用体积,100mg 的两性霉素 B 使用了 5 ml 的 DMSO,但是因为 DMSO 据报道是具有肝毒性的,因此 DMSO 是不受推荐的静脉注射溶剂。

在本发明的操作中,两性霉素 B 完全不必溶于任一溶剂中,而传统的操作方法需使用 DMSO 以溶解两性霉素 B。

在本发明的操作中,当将混悬于含氯化钠的水相中的两性霉素 B 加入到脂质薄膜中并均化时,可观察到形成聚集体,并且均匀产物不能用常规过滤方法滤过 2 微米的玻璃纤维滤器。

经过多方面的试验,我们发现,用于混悬两性霉素 B 的水相,在制备时不加入任何氯化钠,并且轻柔的均化而不产生任何混悬液聚集体,所得的均化原材料是可滤过的。

然而,在本发明的实施期间,我们发现氯化钠可降低毒性,在组合物中是必需的。含不同浓度氯化钠的两性霉素 B 水性组合物,以 80 mg/kg 体重的剂量,注射到 8 个为 1 组的小鼠中。制备以下实施例中所述的不含氯化钠的两性霉素 B 水性组合物,并单独的给药。在每次注射之前,等价于 80 mg/kg 体重剂量的体积用 5% 的葡萄糖

注射液稀释至 0.5 ml，以调整成等渗液体。在 72 小时末观察到的死亡百分率如表 1 所示。

表 1

两性霉素 B 水性组合 物中氯化钠的浓度	按照每一 实施例制备	80mg/kg 剂量给药 小鼠的死亡百分率
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%

5

从表 1 中可清楚的看出，最低浓度为 0.1% 的氯化钠对于降低毒性是必须的。由此，在水化磷脂薄膜期间，不含任何氯化钠的水相可用于平稳均化并用于使之易于滤过 2 μ 玻璃纤维滤器。在均化操作后，氯化钠以溶液的形式加入。在本发明组合物中加入氯化钠对于降低两性霉素 B 的毒性来说是必须的。即使加入 0.1% w/v 氯化钠，LD₅₀ 仍有 80mg/kg，该 LD₅₀ 值相比传统含有脱氧络胆酸钠的两性霉素 B 制剂要高得多，后者据报道 LD₅₀ 为 4mg/kg。

在众多进一步的试验后，我们发现，通过粉碎将两性霉素 B 的平均粒径降低至小于 10 微米可有助于克服在均化过程中发生聚集的难题。使用 Sympatic HELOS 粒径分析仪对微粉化前后的两性霉素 B 的粒径进行分析。两性霉素 B 的微粉化也有助于克服与含未-微粉化两性霉素 B 和磷脂的均化后的水性混悬液中氯化钠的存在有关的过滤问题。

使用微粉化两性霉素 B 而制备的均均化原材料的过滤是很容易的，并且可使用常规滤器进行；在现有技术，诸如美国专利 5616334 (1997) 的操作中，HDLc 的过滤可以通过 tortorous 水浴或直接通过滤膜，诸如聚碳酸酯滤膜进行。

由此，在本发明的一个具体实施方式中，我们可以通过使用未-微粉化两性霉素 B，避免向水相中加入氯化钠来克服聚集和过滤的问题。然而，我们又发现加入最低浓度至少为 0.1% w/v 的氯化钠对

于降低两性霉素 B 水性组合物的毒性是必须的。在其中加入氯化钠的时候，我们可通过延迟至均化步骤再加入氯化钠来解决聚集和滤过的问题。

相应地，在本发明的第一个具体实施方式中，在制备含至少 0.1%w/v 氯化钠的低毒性无菌两性霉素 B 水性组合物的操作过程中，用于分散未-微粉化的两性霉素 B 的水相是不含氯化钠的水或磷酸盐缓冲液。在含未-微粉化两性霉素 B 和磷脂的水性混悬液经均化之后立即加入氯化钠。

在本发明的第二个具体实施方式中，可以通过使用微粉化两性霉素 B 来解决磷脂与含两性霉素 B 的水相的混悬液的聚集问题以及过滤问题。

在将两个实施方式相结合的情况中，如果所使用的两性霉素 B 是微粉化的，并混悬于不含氯化钠的水相中，那么氯化钠在均化之前、之中或之后加入。

实施例：

本发明现在将用实施例来进行说明。这些实施例只是用于说明而不能以任何方式来限制本发明的范围。

在以下所述的表 2 中有四组实施例。

表 2					
组	实施例 序号	两性霉素 B	用于分散 两性霉素 B 的水相	加入盐	发明的具 体实施 方式序号
A	I-II	未-微粉化	不含盐	均化操作后	1
B	III-VI} VII-IX} VII*	微粉化	含盐	-----	2
C	X - XII	微粉化	不含盐	均化操作 期间/之后	1&2
D	XIII XIV	微粉化 未-微粉化	不含盐	-----	不包括在 本发明中

*用于溶解磷脂的溶剂仅为乙醇。

所有这些实施例中所使用的原料都是非肠道使用级别的。所使用的都是常规设备。整个操作过程在一个制备无菌产品所需的受控环境的区域中进行。

- 5 在这些实施例中使用的两性霉素 B 都是非肠道使用级别的,是从依循 USP 规格的 Alpharma 处购得的。这些实施例中任何地方所使用的微粉化两性霉素 B 都是通过使用喷气磨将两性霉素 B 研磨微粉化至粒径小于 10 微米后制备得到的。

- 10 实施例中所使用的磷脂 DMPC 和 DMPG 都是非肠道使用级别的,购自于 Avanti Polar Lipids。

实施例中所使用的卵蛋磷脂磷脂酰胆碱是非肠道使用级别的,购自于 Lipoids。

实施例中所使用的有机溶剂是 AR(分析纯)级别的。

实施例中所使用的磷酸盐缓冲液是按照印度药典制备。

- 15 实施例中所使用的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水是通过将 1.19g 磷酸氢二钠、0.095g 的磷酸二氢钾和 4g 的氯化钠溶于 400ml 水中而得到的。然后加水至体积为 500ml。

组 A: 实施例 I & II

- 20 实施例中所使用的组分列于表 3 中:

表 3

	实施例 I	实施例 II
a) 两性霉素 B	1.00g	1.00g
b) DMPC	0.68g	0.68g
c) DMPG	0.30g	0.30g
d) 乙醇*	200ml	200ml
e) 氯仿*	10ml	10ml
f) pH - 分散操作时	6.95**	7.2
均化之前	6.80**	7.2
g) 氯化钠	1.80g	1.80g
h) 水, 适量加至	200ml	--
i) pH7.2 的磷酸盐缓冲液, 适量加至	--	200mL

* 不留在最终产物中。

** 使用 0.1N 氢氧化钠溶液调节。

操作过程:

- 5 在实施例 I 中, 在搅拌的条件下, 将两性霉素 B 分散于通有氮气的 150ml 水中。用 0.1N 氢氧化钠将 pH 调节至约 6.95。

在实施例 II 中, 在搅拌和通入氮气的情况下, 将两性霉素 B 混悬于 150ml pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中。

- 10 磷脂 DMPC 和 DMPG 在旋转烧瓶中溶于氯仿。待磷脂完全溶解后, 加入乙醇, 并在氮气的冲刷下, 以适宜的速度旋转混合。该醇溶液在减压下旋转蒸发以干燥完全。在除去溶剂后后用氮气冲刷 30 分钟。

- 干燥的脂质薄膜在旋转烧瓶中, 在伴有连续的氮冲刷的连续旋转的条件下, 使用上文所述的保存在烧瓶中的两性霉素 B 的水性混悬液水合化。实施例 I 中所得的两性霉素 B 脂质混悬液的 pH 用 0.1N 氢氧化钠溶液调节至约 6.80。烧瓶中的物质在水浴超声仪中超声 1 小时。在实施例 I 中用水加至体积为 180ml, 而在实施例 II 中, 用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液加至体积为 180ml。

- 20 然后将两性霉素 B 脂质混悬液用 APV 高压均化器均化至所得均化产物可滤过 2 μ 的玻璃纤维滤器。

- 在实施例 I 中, 将氯化钠溶于水中, 并用水稀释至 20ml。在实施例 II 中, 氯化钠用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液溶解并稀释至 20ml。将此氯化钠溶液在搅拌和氮气冲刷的条件下加入到均化后的两性霉素 B 脂质混悬液中。所得产物重新转移回均化器中, 在不加压力的情况下再循环 5 分钟。然后, 将产物用 2 μ 的玻璃纤维滤器过滤, 在氮气下滤入并填充到玻璃容器中, 封缄后在 110℃ 下高压灭菌 40 分钟。在实施例 II 中, 高压灭菌在快速热循环和快速冷循环下在 110℃ 下操作 40 分钟。

30 组 B:

1) 实施例 III 至 VI

这些实施例中所使用的成分列于表 4 中, 在下表中还给出了操作

步骤，其中氯化钠的加入量改变为 1.8g 至 0.2g。

表 4

	实施例			
	III	IV	V	VI
a) 两性霉素 B(微粉化)	1g	1g	1g	1g
b) DMPC	0.68g	0.68g	0.68g	0.68g
c) DMPG	0.30g	0.30g	0.30g	0.30g
d) 氯化钠	1.80g	1.40g	0.80g	0.20g
e) 乙醇*	200ml	200ml	200ml	200ml
f) 氯仿*	10ml	10ml	10ml	10ml
g) pH-分散时	7.20**	7.15**	7.05**	7.20**
-均化前	7.00**	7.10**	7.15**	7.00**
h) 水，适量加至	200ml	200ml	200ml	200ml

*不留在最终产物中

** 使用 0.1N 的氢氧化钠溶液调节

5

操作过程:

磷脂 DMPC 和 DMPG 在旋转烧瓶中溶于氯仿。

待磷脂完全溶解后，加入乙醇并在氮气冲刷的条件下，以适当的速度旋转该烧瓶而混合。此醇溶液在减压条件下旋转蒸发至干燥完全。在溶剂完全除去后，用氮气冲刷 30 分钟。

氯化钠溶于 175ml 水中。在溶液中通入氮气 15 分钟。然后将微粉化两性霉素 B 在搅拌和氮气的条件下混悬于氯化钠溶液中。通过加入 0.1N 氢氧化钠将每一实施例的 pH 值调节至表 4 中所示的值。

干燥的脂质薄膜在旋转烧瓶内用上文制备的两性霉素 B 的水性混悬液水合化，将烧瓶在氮气冲刷的条件下连续旋转。如表 4 所示，对所得两性霉素 B 脂质复合体的 pH 进行调节。将烧瓶中的物质置于水浴超声仪中超声 1 小时。

用水将体积调节至 200 ml。

然后，使用高压均化器均化两性霉素 B 脂质混悬液，直至所得产物可滤过 2 μ 的玻璃纤维滤器。

均化后的两性霉素 B 脂质混悬液用 2 μ 的玻璃纤维滤器过滤，并

在氮气条件下填充到玻璃容器中后，封缄，并通过快速热循环和快速冷循环在 110℃ 下高压灭菌 40 分钟。

实施例 III、IV 和 V 的产物在 80mg/kg 体重剂量时的小鼠毒性研究中没有出现任何死亡数目，而实施例 VI 则有 50% 的死亡率。

5 组 B 待续

2) 实施例 VII 至 IX

这些实施例中所使用的组分伴随操作步骤列于以下表 5 中。

表 5

	实施例		
	VII	VIII	IX
a) 两性霉素 B (微粉化)	1g	1g	1g
b) DMPC	0.68g	--	0.68g
c) DMPG	0.30g	--	0.30g
d) 蛋卵磷脂酰胆碱	--	0.90g	--
e) 氯化钠	1.80g	1.80g	***
f) 乙醇*	300ml	200ml	200ml
g) 氯仿*	--	15ml	10ml
h) pH-分散时	7.15**	7.15**	7.40
均化前	7.05**	6.95**	7.40
i) 水，适量加至	200ml	200ml	--
j) 磷酸盐缓冲盐水，适量加至	--	--	200ml

10 *不留在最终产物中。

** 使用 0.1N 氢氧化钠溶液调节。

*** ≈ 2 gm，从 PBS 中得到。

操作：

15 在实施例 VII 中，在氮气冲刷的条件下，通过在适宜速度下旋转该烧瓶，将磷脂 DMPC 和 DMPG 在旋转烧瓶中溶于乙醇。

在实施例 VIII 中，卵蛋磷脂磷脂酰胆碱在旋转烧瓶中溶于氯仿，在实施例 IX 中，磷脂 DMPC 和 DMPG 在旋转烧瓶中溶于氯仿。待磷脂在氯仿中溶解完全后，加入乙醇并在氮气冲刷下以适宜的速度

旋转该烧瓶进行混合。

在这些实施例中,由此得到的磷脂溶液在减压条件下旋转蒸发至干燥完全。除去溶剂之后用氮气冲刷 30 分钟。

在实施例 VII 和 VIII 中,将氯化钠溶于 175ml 的水中。在此溶
5 液中通入氮气 15 分钟。然后,在搅拌和氮气的条件下,将微粉化两性霉素 B 混悬于氯化钠溶液中,使用 0.1N 的氢氧化钠溶液调节 pH 至约 7.15。

在实施例 IX 中,在搅拌条件下,将微粉化两性霉素 B 混悬于
10 175ml pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。通入氮气 15 分钟。PBS 中带有约 2g 的氯化钠。

干燥的脂质薄膜在旋转烧瓶中,用上文所制备的微粉化两性霉素 B 的水性混悬液水合,并使烧瓶在连续用氮气冲刷的条件下连续的旋转。将实施例 VII 中所得的两性霉素 B 脂质混悬液的 pH 值用 0.1N 氢氧化钠溶液调节到 7.05,实施例 VIII 的混悬液调节到 6.95。

15 在实施例 VII 和 VIII 中,将体积用水调节至 200 ml。

在实施例 IX 中,将体积用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水调节至 200ml。

然后,使用 APV 高压均化器均化两性霉素 B 脂质混悬液直至均化后的产物能滤过 2 μ 的玻璃纤维滤器。

20 均化后的两性霉素 B 脂质混悬液用 2 μ 玻璃纤维滤器过滤,并在氮气条件下填充到玻璃容器中,封缄后,在实施例 IX 中,在 121 $^{\circ}$ C 下高压灭菌 20 分钟,在实施例 VII 和 VIII 中,在 110 $^{\circ}$ C 下高压灭菌 40 分钟。

25 实施例 VII 中得到的无菌两性霉素 B 水性组合物在小鼠上进行毒性研究,并同时进行稳定性的研究。毒性研究的结果示于表 6 中,稳定性研究的结果示于表 7 中。

粒径分析:

30 实施例 VII 中所得的两性霉素 B 水性组合物的粒径,在美国粒径系统公司<Particle Sizing Systems, Inc.>的 Model 770 AccuSizer 上进行评价,95%的粒子粒径尺寸低于 1.63 μ ,90%的粒子粒径尺寸低于 1.28 μ 。

小鼠毒性研究:

实施例 VII 中所得的两性霉素 B 水性组合物在小鼠身上的毒性研究，与传统的含有脱氧络胆酸钠的两性霉素 B 产品相平行的进行。以下是观察结果：

表 6

小鼠急性毒性研究

LD ₅₀ (静脉)	
两性霉素 B 传统产品	- 3.5mg/kg 体重
实施例 VII 的两性霉素 B 水性组合物	- > 80mg/kg 体重

在本实验室中制备的两性霉素 B 水性组合物在小鼠身上单次注射后的 LD₅₀>80 mg/kg。此项值高于传统含脱氧络胆酸钠的两性霉素 B 产品在单次注射后的 LD₅₀。

表 7

实施例 VII 的两性霉素 B 水性组合物
在推荐储存温度 2℃-8℃ 下的稳定性数据

时间	外观	两性霉素 B 的含量
最初	黄色混悬液，静置时保持不变，轻微摇晃时均匀分散	100.6%
6 个月	黄色混悬液，静置时保持不变，轻微摇晃时均匀分散	100.3%
1 年	黄色混悬液，静置时保持不变，轻微摇晃时均匀分散	99.8%
18 个月	黄色混悬液，静置时保持不变，轻微摇晃时均匀分散	98.3%
2 年	黄色混悬液，静置时保持不变，轻微摇晃时均匀分散	96.5%

该实施例清楚的显示，使用本发明改良后的完全不需使用 DMSO 或氯代烃的方法制备得到的非肠道两性霉素 B 水性组合物中不含任何的痕量 DMSO 或氯代烃，并且符合畅销注射混悬液产品的常规要

求。使用实施例 VII 的方法制备得到的新的水性组合物完全不含任何有害溶剂，诸如 DMSO 和氯代烃。

组 C: 实施例 X 至 XII

- 5 这些实施例中所使用的组分与操作方法列于以下表 8 中
表 8

		实施例		
		X	XI	XII
a)	两性霉素 B (微粉化)	1g	1g	1g
b)	DMPC	0.68g	0.68g	0.68g
c)	DMPG	0.30g	0.30g	0.30g
d)	氯化钠	1.80g	1.80g	1.80g
e)	乙醇*	200ml	200ml	200ml
f)	氯仿*	10ml	10ml	10ml
g)	pH-分散时	7.15**	7.30**	7.2
	均化前	6.90**	7.00**	7.2
h)	水, 适量至	200ml	200ml	--
i)	pH 7.2 的磷酸盐缓冲液, 适量至	--	--	200ml

* 不留在最终产物中

** 使用 0.1N 的氢氧化钠溶液调节。

10 操作:

磷脂 DMPC 和 DMPG 在旋转烧瓶中溶于氯仿。待磷脂完全溶解后加入乙醇，并且在氮气的冲刷下通过适宜速度旋转该烧瓶。在减压条件下旋转蒸发该醇溶液至干燥完全。在完全除去溶剂后用氮气冲刷 30 分钟。

- 15 在搅拌和通氮冒泡的条件下，在实施例 X 和 XI 中，将微粉化两性霉素 B 混悬在 150ml 的水中，而在实施例 XII 中，混悬于 150ml 的 pH7.2 的磷酸盐缓冲液中。对于实施例 X 和 XI，通过加入 0.1N 氢氧化钠调节 pH 至表 8 中所示的值。

- 20 使用旋转蒸发器，在连续冲入氮气的条件下，在旋转烧瓶中用上文制备的微粉化两性霉素 B 混悬液水合干燥脂质薄膜。如表 8 中所

示, 所得两性霉素 B 脂质混悬液的 pH 用 0.1N 氢氧化钠溶液调节。在实施例 X 和 XI 中, 用水将体积调节至 180ml, 而在实施例 XII 中, 用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液调节至 180ml。在实施例 XI 中, 烧瓶中的物质在水浴超声仪中超声处理 1 小时。

- 5 在实施例 X 和 XII 中, 随后使用 APV 高压均化器均化两性霉素 B 脂质混悬液直至均化产物可滤过 2 μ 玻璃纤维滤器。

10 在实施例 X 中, 氯化钠用水溶解并稀释至 20ml。在实施例 XII 中, 氯化钠用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液溶解并稀释至 20ml。在低速搅拌及氮气冲刷的条件下, 将此氯化钠溶液加入到均化后的脂质混悬液中。随后将所得产物转移回均化器中, 并在不施加压力的条件下再循环 5 分钟。

在实施例 XI 中, 超声处理后的两性霉素 B 脂质混悬液使用 APV 高压均化器, 在均化器中循环 3 次。

15 氯化钠用水溶解并稀释至 20ml。在低速混合下, 将此氯化钠溶液加入到 3 次循环末得到的两性霉素 B 脂质混悬液中。此产品转移回均化器中在不加压的情况下再循环 5 分钟。此产物再次在压力下均化, 直至产物可滤过 2 μ 玻璃纤维滤器。

20 然后将产物用 2 μ 玻璃纤维滤器过滤。在氮气下, 将过滤产物填充到玻璃容器中, 封缄后, 在 110℃ 下采用快速热循环和快速冷循环高压灭菌 40 小时。

组 D: 实施例 XIII 和 XIV

这些实施例中所使用的组分与操作过程一起示于以下表 9 中

表 9

	实施例 XIII	实施例 XIV
a) 两性霉素 B (微粉化)	1g	-
b) 两性霉素 B (未-微粉化)	--	1g
c) DMPC	0.68g	0.68g
d) DMPG	0.30g	0.30g
e) 乙醇*	200ml	200ml
f) 氯仿*	10 ml	10ml
g) 水, 适量加至	200ml	200ml
h) pH -分散时	7.25**	7.20**
均化前	7.15**	7.10**

*不留在最终产物中

** 用 0.1N 氢氧化钠溶液调节

5 操作:

在旋转烧瓶中, 磷脂 DMPC 和 DMPG 溶于氯仿中。在磷脂完全溶解后加入乙醇, 并通过在氮气冲刷条件下以适当速度旋转该烧瓶混合。此醇溶液在加压条件下旋转蒸发至干燥完全。在完全除去溶剂后, 用氮气冲刷 30 分钟。

- 10 在实施例 XIII 中, 在搅拌和通入氮气泡的条件下, 将微粉化两性霉素 B 混悬于水中。在实施例 XIV 中, 在搅拌和氮气泡的条件下, 将未-微粉化两性霉素 B 混悬于水中。如表 9 中所示, 用 0.1 N 氢氧化钠溶液调节 pH 值。

- 15 使用旋转蒸发仪, 在氮气连续冲刷的条件下, 将干燥脂质薄膜在旋转烧瓶中用上文制备的两性霉素 B 混悬液水合。如表 9 中所示, 用 0.1N 氢氧化钠溶液调节 pH 值。在实施例 XIV 中, 将烧瓶中的物质超声处理 1 小时。用水将体积调整至 200 ml。

然后, 使用 APV 高压均化器均化两性霉素 B 脂质混悬液, 直至所得均化产物可滤过 2 μ 的玻璃纤维滤器。

- 20 均化后的两性霉素 B 脂质混悬液用 2 μ 玻璃纤维滤器过滤。过滤产物在氮气条件下填充到玻璃容器中, 封缄并高压灭菌。高压灭菌需在 121 $^{\circ}$ C 下进行 20 分钟。

小鼠毒性研究:

- 与前述实施例 III 中得到的含有氯化钠的两性霉素 B 水性组合物一起, 研究实施例 XIII 和 XIV 中得到的两性霉素 B 水性组合物 (不含氯化钠) 在小鼠身上的毒性。以下是观察结果:

表 10

小鼠急性毒性研究

LD₅₀ (静脉)

两性霉素 B 水性组合物 (含有氯化钠) 如实施例 III	- > 80mg/kg 体重
两性霉素 B 水性组合物 (不含氯化钠) 如实施例 XIII & XIV	- 40mg/kg 体重

- 如实施例 XIII 和 XIV 中制备的不含氯化钠的两性霉素 B 水性组合物在以单次注射后的小鼠 LD₅₀ 是 40mg/kg 体重, 与之相比, 按照实施例 III 制备的含有氯化钠的两性霉素 B 水性组合物的小鼠 LD₅₀ > 80 mg/kg。这表明在制备低毒性的两性霉素 B 水性组合物中需要加入氯化钠。

15 本发明优点:

以下是本发明的优点:

- i) 在本发明中, 两性霉素 B 水性组合物的制备不需要使用据报道有肝毒性的 DMSO。
- ii) 由于两性霉素 B 在非肠道可接受的有机溶剂中溶解度很低 (甲醇中为 0.1 mg/ml), 因此需要使用大量的有机溶剂, 这将导致操作过程很漫长、很费时, 商业上亦不可行。而本发明的操作过程不需要将两性霉素 B 溶于任一有机溶剂中。
- iii) 现有技术中的操作过程需要特定的过滤技术, 诸如切向流过滤或挤压过滤。在本发明的操作过程中, 只需要使用常用的过滤方法。
- iv) 通过本发明操作方法制备的产品, 能稳定的进行高压灭菌的灭菌处理方法, 这样, 可使其适用于静脉给药使用。

本发明的方法简单经济，是对整个现有技术的改进。本发明方法的最重要的特点是：由于在操作过程中完全不使用有害溶剂，因此所得产物纯度非常高，不可能含有任何痕量的有害溶剂。