

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-523566  
(P2004-523566A)

(43) 公表日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード(参考)

**A61K 31/7048**

A 61 K 31/7048

4 C 076

**A61K 9/127**

A 61 K 9/127

4 C 086

**A61K 47/02**

A 61 K 47/02

**A61K 47/24**

A 61 K 47/24

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2002-569158 (P2002-569158)	(71) 出願人	502451199 ブハラット セルムズ アンド ヴァクシ ンズ リミテッド インド セイン 400604 ワグル エステイト ロード ナンバー 27 プ ロット エイ-371/エイ-372
(86) (22) 出願日	平成13年3月16日 (2001.3.16)	(74) 代理人	100059959 弁理士 中村 稔
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月1日 (2003.9.1)	(74) 代理人	100067013 弁理士 大塚 文昭
(86) 國際出願番号	PCT/IN2001/000040	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 穎男
(87) 國際公開番号	WO2002/069983	(74) 代理人	100065189 弁理士 宍戸 嘉一
(87) 國際公開日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		
(31) 優先権主張番号	217/MUM/2001		
(32) 優先日	平成13年3月1日 (2001.3.1)		
(33) 優先権主張国	インド (IN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アンホテリシンB水性組成物

## (57) 【要約】

アンホテリシンBを含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性で非経口投与用水性組成物を開示する。組成物は、アンホテリシンB以外にリン脂質及び塩化ナトリウムを必須成分とする。また組成物はオートクレーブにより滅菌される。更にアンホテリシンBを溶解する溶媒を用いない組成物の製造方法が開示されている。組成物は湿潤性真菌感染の治療に適用される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 2】**

使用するリン脂質が、卵ホスファチジルコリン(EPC)、またはジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)及びジミリストイルホスファチジルグリセロールナトリウム塩(DMPG)の混合物から選択される、請求項1記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 3】**

アンホテリシンBの含有量が、組成物の約0.1w/v%～1w/v%である、請求項1または2記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 4】**

アンホテリシンBの含有量が、組成物の0.5w/v%である、請求項1～3のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 5】**

塩化ナトリウムの含有量が、組成物の少なくとも0.1w/v%である、請求項1～4のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 6】**

塩化ナトリウムの含有量が、組成物の0.1w/v%～0.9w/v%である、請求項1～5のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 7】**

リン脂質の含有量が、組成物の0.1w/v%～1w/v%である、請求項1～6のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 8】**

リン脂質の含有量が、組成物の0.4w/v%～0.6w/v%である、請求項1～7のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 9】**

アンホテリシンBとリン脂質の重量比が約1:0.8～約1:1.2である、請求項1～8のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 10】**

リン脂質のジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)とジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)の重量比が約7:1～約7:15である、請求項1～9のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 11】**

使用されるリン脂質のジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)とジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)の重量比が7:3である、請求項1～10のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 12】**

組成物が完全に塩素化炭化水素を含まない、請求項1～11のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない

10

20

30

40

50

、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 1 3】**

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物を製造する方法であって、

(i) 一つ以上のリン脂質を、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、クロロホルム、四塩化炭素及びメチレンクロロリドのような非経口的に許容される溶媒群から選択される一つ以上の有機溶媒中に溶解し、次に溶媒を減圧下蒸発させて、単独または混合されたリン脂質の乾燥フィルムを形成する工程、

(ii) 塩化ナトリウムを含まない非経口的に許容される水相中にアンホテリシンBを懸濁するか、または塩化ナトリウムを含んでいてもよい非経口的に許容される水相中に微粉碎したアンホテリシンBを懸濁する工程、

(iii) 工程(ii)の終りに形成された懸濁されたアンホテリシンBを含む水相を、工程(i)の終りに得られたリン脂質のフィルムに添加し、両者を混合して、アンホテリシンBとリン脂質を前記水相中に含む懸濁液を得る工程、

(iv) 工程(iii)の終りにおいて得られた前記懸濁液のpHを 6.0 ~ 8.0 に調整し、次にこれを、2 μ のグラスファイバーフィルターでろ過できるようになるまで均質化する工程、

(v) 工程(iv)の終りにおいて、最終生成物の塩化ナトリウム含有量が少なくとも 0.1w/v% となるよう十分な塩化ナトリウム水溶液を添加する工程、

(vi) 工程(v)の終わりにおいて得られた均質化された懸濁液を、2 μ グラスファイバーフィルターを通してろ過し、前記濾液を窒素カバー下にバイアル中に注入し、バイアルを密封し、密封したバイアルをオートクレーブをかけて滅菌し、非経口投与に適する最終生成物を得る工程、

を含む上記方法。

**【請求項 1 4】**

リン脂質が卵ホスファチジルコリン(EPC)またはジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)及びジミリストイルホスファチジルグリセロールナトリウム塩(DMPG)の混合物から選択される、請求項 1 3 記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 1 5】**

アンホテリシンBの含有量が、組成物の約 0.1w/v% ~ 1w/v% である、請求項 1 3 または 1 4 記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 1 6】**

アンホテリシンBの含有量が、組成物の 0.5w/v% である、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 1 7】**

リン脂質の含有量が、組成物の 0.1w/v% ~ 1w/v% である、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 1 8】**

リン脂質の含有量が、組成物の 0.4w/v% ~ 0.6w/v% である、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 1 9】**

アンホテリシンBとリン脂質の重量比が約 1:0.8 ~ 約 1:1.2 である、請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 2 0】**

10

20

30

40

50

リン脂質ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)とジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)の重量比が約7:1~7:15である、請求項13~19のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項21】

使用されるリン脂質のジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)とジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)の重量比が7:3である、請求項13~20のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項22】

リン脂質を溶解するために用いられる溶媒がエタノールである、請求項13~21のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項23】

非経口的に許容される水相が水またはリン酸緩衝液であり、微粉碎されたアンホテリシンBが使用される場合には水、リン酸緩衝液、食塩水またはリン酸緩衝食塩水である、請求項13~22のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項24】

工程(ii)におけるアンホテリシンBの懸濁に用いられる水相のpHを6.0~8.0に調整する、請求項13~23のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項25】

均質化され濾過された懸濁液の滅菌を、通常のオートクレーブにより行う、請求項13~24のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項26】

滅菌温度が110である、請求項13~25のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項27】

滅菌をオートクレーブによる特別処理により行い、加熱及び冷却時間を迅速な加熱及び迅速な冷却サイクルにより減少させることを特徴とする、請求項13~26のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項28】

使用されるアンホテリシンBが微粉碎される場合には、工程(ii)における水相が水、食塩水、リン酸緩衝液またはリン酸緩衝食塩水である、請求項13~27のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項29】

使用されるアンホテリシンBが微粉碎される場合には、工程(ii)~(iv)のいずれかにおいて塩化ナトリウムの最終生成物における濃度が少なくとも0.1w/v%となるように添加される、請求項13~28のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

【請求項30】

請求項13~29のいずれか一項に記載の方法で製造される、請求項1~12のいずれか一項に記載の、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 1】**

明細書及び実施例I~XIIに実質的に記載された、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 3 2】**

明細書及び実施例I~XIIに実質的に記載された、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 3 3】**

明細書及び実施例I~XIIに実質的に記載された方法により製造された、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物。10

**【請求項 3 4】**

明細書及び実施例VIIに実質的に記載された、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシド及び塩素化炭化水素を含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【請求項 3 5】**

明細書及び実施例VIIに実質的に記載された、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシド及び塩素化炭化水素を含まない、低毒性な非経口水性組成物の製造方法。

**【請求項 3 6】**

明細書及び実施例VIIに実質的に記載された製造方法により製造された、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシド及び塩素化炭化水素を含まない、低毒性な非経口水性組成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の分野**

本発明は低毒性アンホテリシンB水性組成物に関する。本発明は特に、低毒性な、非経口投与に適するリン脂質含有アンホテリシンB水性組成物に関する。

**【0002】****発明の背景**

アンホテリシンBは、湿潤性真菌感染の処置に有用なポリエン抗真菌抗生物質である。しかし、高い腎毒性を有する。

アンホテリシンBの毒性は、様々なプロセスにより軽減されるが、これらのうち (a) リポソーム中への薬剤の取り込み、及び (b) 薬剤を高薬剤リピド複合体 (High drug lipid complex) (HDLC) が通常使用される。

**【0003】****リポソームアンホテリシンBの調製**

米国特許第4973465号 (1990) 明細書には、HDLC類の製造が記載されており、その中にコレステロールのようなステロール類は単独または天然のリン脂質であるホスファチジルコリンと組み合わせて使用されている。

**【0004】**

米国特許第5616334号 (1997) 明細書には、リポソームアンホテリシンBの調製方法が記載されており、初めにブランクマルチアメラーベル (blank multilamellar vesicles) (MLVs) を製造し、次にMLVを超音波処理されたアンホテリシンBの水中懸濁液と混合することが記載されている。このプロセスはいずれの溶媒も使用しない。しかし、この方法は特に、アンホテリシンB HDLCより高い毒性を示すリポソームアンホテリシンBを生成する。この方法は、サイズ処理のため、重ねたポリカーボネットフィルターを通じたブランクリポソームの押し出しを反復して10回も行うことを含む。また、薬剤を積載した後、取り込まれなかつたアンホテリシンBを遠心により除去することを含む。

**【0005】**

10

20

30

40

50

この米国特許はまた、“低毒性薬剤脂質システム”におけるHDLC作成プロセスについて記載している。この特許において、アンホテリシンB脂質複合体の製造が記載されている。この技術は一般的に以下のようなものである。

【0006】

HDLC類の製造：第一に、薬剤アンホテリシンBをジメチルスルホキシド(DMSO)またはメタノールのような溶媒に溶解する。脂質、好ましくはジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)及びジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)(モル比7:3)、をメタノール、エタノール、塩素化炭化水素類のような溶媒中に溶解させる。その薬剤溶液及び脂質溶液を混合する。溶媒を減圧下蒸発させて、脂質-薬剤の薄いフィルムを得る。フィルムを水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、またはグリシン緩衝液のような水溶液により水和化して、HDLCを形成する。

【0007】

上記方法の一つの変法では、得られた乾燥脂質-薬剤フィルムを、メチレンクロリド等の溶媒中に再懸濁し、フィルムを水和化する前に減圧下、再度蒸発させる。

【0008】

上記方法の他の変法としては、乾燥脂質-薬剤フィルムを脱水させて、フレークを形成し、そのフレークを次に水溶液で水和化する。

【0009】

他の方法では、食塩水、緩衝液または水のような水溶液を、薬剤及び脂質を含む溶液に添加し、次に溶媒を蒸発させ、HDLCを得る。この方法では、リン脂質の薄いフィルムを形成する必要が無い。

【0010】

前記米国特許に記載のHDLCを形成する他の方法では、アンホテリシンBのような生物活性薬剤を含む脂質粒子(またはリポソーム)を、初めに、生物活性薬剤の6~50モル%を含むマルチアメラー小泡(MLV)を作成することにより、形成される。次に、MLVを約25~約60、最も好ましくは約60、の加熱サイクルに入れる。そのようなサイクルは、より高度に整列し、より毒性が低い、アンホテリシンB脂質複合体を形成する。

【0011】

アンホテリシンB脂質複合体を作成する他の代わりの方法もまた、この米国特許に記載されている。この方法では、脂質は、塩化ナトリウム溶液(0.9%)と混合され、ホモジナイザーを用いて均質化される。アンホテリシンBは、DMSO中に溶解され、均質化の間に脂質溶液に添加され、さらに30分間、粒子サイズが約10ミクロンより小さくなるまで、好ましくは約10ミクロンになるまで、均質化される。得られた脂質粒子は、正接流動濾過(tangential flow filtration)の後、選択される。このプロセスの不利点は、使用される溶媒のDMSOが高い沸点を有し、そのため生成物から除去するのが困難な点である。さらに、微量のDMSOが最終生成物に残存する。この溶媒は、肝毒性があることが報告されている(The journal of Infectious diseases 1991 : '164 Pg 418 to 421)ため、静脈注射用の組成物に微量なこれらの溶媒が存在することは望ましくない。

【0012】

HDLCは、アンホテリシンBの毒性を軽減する有用な製剤であるが、米国特許第5616334号(1997)明細書に記載の技術は、アンホテリシンBが通常使用される非経口的に許容される有機溶媒のほとんどに対し低溶解性であるため、大量の有機溶媒の使用を必要とする。従って、このプロセスは大量の有機溶媒の蒸発を伴うものである。または、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドのような非プロトン性溶媒をまた使用してアンホテリシンBを溶解する。これらの非プロトン性溶媒は、高い沸点を有し、微量のこれらの溶媒が結合して最終組成物に残存する。これらの非プロトン性溶媒は、肝毒性であることが報告されているため、これらの溶媒を製造工程において使用することは望ましくない。

【0013】

従って、使用する溶媒量を低減することによる、アンホテリシンB組成物の大量製造方法の改良が必要とされる。このような改良はまた製造コストを低減させる。

10

20

30

40

50

## 【0014】

本発明の主たる目的は、製造を簡単にし、かつ製造コストを低減することを目的として、アンホテリシンB及びリン脂質を含む低毒性な非経口水性組成物を開発することである。本発明の目的は更に、アンホテリシンB及びリン脂質を含み、微量のDMSOおよび/または塩素化された炭化水素を含まない、低毒性な非経口水性組成物を開発することである。

## 【0015】

## 本発明の要約

従って、本発明は、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含む、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物に関する。

## 【0016】

本発明はさらに、アンホテリシンB、塩化ナトリウム及びリン脂質を含み、ジメチルスルホキシドを含まない、低毒性な非経口水性組成物を製造する方法であって、

(i) 一つ以上のリン脂質を、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、クロロホルム、四塩化炭素及びメチレンクロリドのような非経口的に許容される溶媒群から選択される一つ以上の有機溶媒中に溶解し、次に溶媒を減圧下蒸発させることにより除去して、単独または混合されたリン脂質の乾燥フィルムを形成する工程、

(ii) 塩化ナトリウムを含まない非経口的に許容される水相中にアンホテリシンBを懸濁するか、または塩化ナトリウムを含んでいてもよい非経口的に許容される水相中に微粉碎したアンホテリシンBを懸濁する工程、

(iii) 工程(ii)の終りに形成された懸濁されたアンホテリシンBを含む水相を、工程(i)の終りに得られたリン脂質のフィルムに添加し、両者を混合して、アンホテリシンBとリン脂質を前記水相中に含む懸濁液を得る工程、

(iv) 工程(iii)の終りにおいて得られた前記懸濁液のpHを6.0~8.0に調整し、次にこれを、2μのグラスファイバーフィルターでろ過できるようになるまで均質化する工程、

(v) 工程(iv)の終りにおいて、最終生成物の塩化ナトリウム含有量が少なくとも0.1w/v%となるよう十分な塩化ナトリウム水溶液を添加する工程、

(vi) 工程(v)の終わりにおいて得られた均質化された懸濁液を、2μグラスファイバーフィルターを通してろ過し、前記濾液を窒素ガバード下にバイアル中に注入し、バイアルを密封し、密封したバイアルをオートクレーブをかけて滅菌し、非経口投与に適する最終生成物を得る工程、

を含む上記方法、に関する。

## 【0017】

本発明はまた、本願明細書に記載され、かつ上述したような本発明の方法により作成される、少なくとも0.1w/v%の塩化ナトリウム及びリン脂質を含む、低毒性な非経口アンホテリシンB水性組成物に関する。

## 【0018】

## 発明の実施態様の詳細な説明

本発明の組成物中のアンホテリシンBの含有量は、組成物の0.1w/v%~1.0w/v%の範囲で変化し、好ましくはアンホテリシンBの含有量は組成物の0.5w/v%である。

## 【0019】

リン脂質の全含有量は、組成物の0.1w/v%~1.0w/v%の範囲で変化し、好ましい含有量は約0.4w/v%~約0.6w/v%である。

## 【0020】

リン脂質に対するアンホテリシンBの重量比は、約1:0.5~約1:1.5である。好ましい重量比は、約1:0.8~約1:1.2である。

本方法において、リン脂質は、卵ホスファチジルコリン(EPC)、またはジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)及びジミリストイルホスファチジルグリセロールナトリウム塩(DMPG)の混合物から選択される。二種のリン脂質DMPC及びDMPGの混合物を使用する場合には、リン脂質の重量比、DMPC:DMPGは、7:1~7:15の間であり、好ましくは7:3である。

10

20

30

40

50

## 【0021】

リン脂質を溶解するの使用される溶媒は、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコールのようなアルコール溶媒から選択され、クロロホルム、メチレンクロリド、四塩化炭素のような塩素化炭化水素の添加を伴うか若しくは伴わない。アルコール溶媒単独または塩素化溶媒単独を、リン脂質の溶解に使用することができる。またはアルコール溶媒及び塩素化炭化水素を組み合わせてリン脂質を溶解するのに用いることができる。塩素化炭化水素を選択しない場合には、組成物は塩素化炭化水素を含まない。リン脂質を溶解するのに用いる好ましい溶媒はエタノールである。

## 【0022】

本発明において用いる微粉碎したアンホテリシンBは、どんな場合にも、10ミクロンより 10  
小さい粒子サイズに空気ジェットミルを用いて微粉碎したものである。

## 【0023】

アンホテリシンBを分散させるのに用いる水相のpHは、緩衝液を組成物中に用いない場合には、希釈した水酸化ナトリウム溶液を用いて6.0～8.0に調整される。

アンホテリシンBを懸濁するのに使用される水相は、水またはリン酸緩衝液のような非経口的に許容されるビヒクルである。微粉碎されたアンホテリシンBを使用する場合には、アンホテリシンBを懸濁するのに使用される水相は、食塩水、リン酸緩衝食塩水、水またはリン酸緩衝液であり得る。

## 【0024】

塩化ナトリウムを、均質化後濾過前に水溶液として添加する。しかし、微粉碎したアンホ 20  
テリシンBを使用する場合には、塩化ナトリウムは“発明の要約”において特定した製造工程(iii)～(iv)のいずれの工程でも添加することができる。

塩化ナトリウムの濃度は、組成物の約0.1w/v%～0.9w/v%であり、好ましくは約0.4w/v%～0.9w/v%である。

## 【0025】

均質化は高速ホモジナイザーを用いて5000psi以上で、生成物が2ミクロンガラスファイバーフィルターを通じて濾過可能となるまで行う。

## 【0026】

本発明の他の態様であ、アンホテリシンB脂質懸濁液は、均質化の前に超音波処理浴中で超音波処理し、pHを約6.0～8.0に調整した後、均一な懸濁液を得る。緩衝溶液を組成物において用いない場合にはいつでも、希釈した水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを調整する。 30

## 【0027】

均質化したアンホテリシンB脂質懸濁液を、2μのグラスファイバーフィルターを通じて濾過し、次にフィルターをかけた窒素またはフィルターをかけた圧縮空気のいずれかを用いて、圧力下、通常の濾過工程を行う。

## 【0028】

濾過後、均質化した懸濁液を、窒素カバー下にバイアルへ充填し、通常の(conventional)オートクレーブで110～121、好ましくは121で20分間、110で40分間滅菌した。滅菌はまた、オートクレーブの特別な方法で行うことができ、その方法では加熱及び冷却サイクル時間は迅速な加熱及び冷却システムにより短縮される。 40

## 【0029】

米国特許第4973465号(1990)及び米国特許第5616334号(1997)に記載されるように、HDLCを製造する初期の方法では、アンホテリシンBをかなり大量の有機溶媒中に溶解する。米国特許第5616334号(1997)の一つの実施例では、100mgのアンホテリシンBに等価の1バイアル20mLのアンホテリシンB脂質複合体を製造するために、1リットルのメタノールが使用される。溶媒容積を減少させる他の実施例では、5mLのDMSOが100mgのアンホテリシンBのために使用されたが、DMSOは腎毒性があることが報告されているため、腹腔内投与には望ましい溶媒ではない。

## 【0030】

本発明の方法において、アンホテリシンBは全くいずれの溶媒にも溶解されない。一方、従来の方法では、アンホテリシンBを溶解するためにDMSOを使用する。

【0031】

本発明の方法において、塩化ナトリウムを含む水相中に懸濁したアンホテリシンBを脂質フィルムに添加し、均質化した場合、凝集物を形成し、通常の濾過手順では均質化された生成物は $2\mu$ グラスファイバーフィルターを濾過できないことが観察された。

【0032】

さらに広範な実験をした後、発明者らは、アンホテリシンBを懸濁するために使用した水相に塩化ナトリウムを添加せずに調製すると、懸濁液の凝集が起こらず均質化が円滑に進行し、均質化したバルクを濾過し得ることを見出した。

10

【0033】

しかし、本発明の経過において、発明者は塩化ナトリウムが毒性を軽減するのに組成物に必須であることを見出した。異なる濃度の塩化ナトリウムを含むアンホテリシンB水性組成物を、80mg/kgの投与量において、8匹の群のマウスに注入した。下記実施例に記載の、塩化ナトリウムを含まないアンホテリシンB水性組成物を調製し、それぞれ注入した。各注入の前に、80mg/kg体重に等しい容量を、5%デキストロース注入により0.5mlに希釈し、等張にした。72時間後に観察された死亡率を表1に示す。

【0034】

表1

アンホテリシンB水性組成物中の塩化ナトリウム濃度	調製に使用した実施例	80mg/kg投与量におけるマウスの死亡率
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%

20

【0035】

表1から、0.1%塩化ナトリウムの最小濃度が毒性を低減するのに必須であることが明らかである。リン脂質フィルムの水和化の間に、塩化ナトリウムを含まない水相を用いて均質化を平滑に行い、 $2\mu$ グラスファイバーフィルターを通じた濾過を容易に行った。塩化ナトリウムを均質化プロセスの後に溶液として添加した。本発明の組成物中の塩化ナトリウムの添加は、アンホテリシンBの毒性を軽減するのに必須である。0.1w/v%塩化ナトリウムの添加によっても、 $LD_{50}$ は80mg/kgであり、この $LD_{50}$ はデスオキシコリン酸ナトリウム(sodium desoxycholate)を含む従来のアンホテリシンB製剤(これは4mg/kgであること報告されている)より非常に高い。

30

【0036】

更なる多数の実験の後、微粉碎してアンホテリシンBの平均粒子サイズを10ミクロンよりも小さくすることにより、均質化の間の凝集という問題を解決するのに役立つことを見出した。微粉碎前後のアンホテリシンBの粒子サイズ分析を、シンパティックベロス粒子サイズ分析機(Sympatic BELOS Particle Size Analyser)により行なった。アンホテリシンBの微粉碎はまた、非微粉碎化アンホテリシンB及びリン脂質を含む均質化した水性懸濁液中の塩化ナトリウムの存在に伴う濾過の問題を解決するのに役立った。

40

【0037】

微粉碎化アンホテリシンBを用いて調製した均質化されたバルクの濾過は容易であり、通常使用されるフィルター、すなわち、米国特許第5616334号(1997)のような従来技術プロセスにおける、を使用することができ、ポリカーボネットフィルターのような膜フィルター中を直線または曲がりくねった(tortuous)経路を通してHDLCの濾過を行なう。

【0038】

50

以上のように、本発明の一つの実施態様において、非微粉碎したアンホテリシンBを用いて、水相に塩化ナトリウムを添加することを回避することにより、凝集の問題を解決することができた。しかし、発明者らは、アンホテリシンB水性組成物の毒性を軽減させるのに、少なくとも0.1w/v%の最小濃度の塩化ナトリウムの添加が必要であることを見出した。塩化ナトリウムを含ませるが、均質化工程まで塩化ナトリウムの添加を延期することにより、凝集及び濾過の問題を発明者らは解決した。

#### 【0039】

従って、本発明の第一の実施態様では、少なくとも0.1w/v%の塩化ナトリウムを含む低毒性の滅菌アンホテリシンB水性組成物の製造方法において、非微粉碎したアンホテリシンBを分散するために使用する水相は、塩化ナトリウムを含まない水またはリン酸緩衝液である。塩化ナトリウムは、非微粉碎化アンホテリシンB及びリン脂質を含む水性懸濁液の均質化のすぐ後に添加される。

10

#### 【0040】

本発明の第二の態様において、リン脂質及びアンホテリシンBを含む水相を含む懸濁液の凝集及び濾過の問題は、微粉碎したアンホテリシンBを用いることにより解決された。

#### 【0041】

二つの実施態様を組み合わせて、使用されるアンホテリシンBを微粉碎し、塩化ナトリウムを含まない水相中に懸濁し、塩化ナトリウムを、均質化工程の前、中または後に水相に添加する。

#### 【0042】

20

#### 実施例

本発明を実施例により説明する。実施例は説明のためのみのものであって、本発明の観点を制限するものではない。

表2に記載されるように4グループの実施例が示される。

#### 【0043】

表2

グループ	実施例No.	アンホテリシンB	アンホテリシンBを分散するために使用する水相	塩の添加	発明の実施態様
A	I-II	非微粉碎化	塩非含有	均質化工程後	第一
B	III-VI } VIII-IX }	微粉碎化	塩含有	—	第二
	VII*	微粉碎化	塩含有	—	第二
C	X-XII	微粉碎化	塩非含有	均質化工程前 ／中	第一及び第二
D	XIII XIV	微粉碎化 非微粉碎化	塩非含有	—	本発明ではない

30

\*リン脂質を溶解するための溶媒はエタノールのみ

#### 【0044】

実施例において使用された全ての原料物質は、非経口グレード(parenteral grade)であった。使用した設備は通常のものであった。全てのプロセスは、滅菌製品を製造するに必要とされるコントロールされた環境下の領域で行なわれた。

#### 【0045】

これらの実施例において使用されるアンホテリシンBは、アルファーマ(Alpharma)から得られた非経口グレードのものであり、USP仕様に従うものである。微粉碎したアンホテリシンBは、本実施例において使用したものは全て、空気ジェットミルを用いて10ミクロンより小さい粒子サイズに微粉化することにより調製された。

50

## 【0046】

実施例において使用されたリン脂質DMPC及びDMPGは、非経口グレードのものであり、アバンティポラーリピッド(Avanti Polar Lipids)から調達した。

## 【0047】

実施例で使用したリン脂質である卵ホスファチジルコリンは、非経口グレードであり、リポイド(Lipooids)から調達した。

実施例で使用した有機溶媒は、AR(分析試薬)品質であった。

実施例で使用したリン酸緩衝液は、インド薬局方(Indian Pharmacopoeia)に従い調製された。

## 【0048】

実施例において使用されたリン酸緩衝食塩水pH7.4は、1.19gのオルトリニ酸水素二ナトリウム、0.095gのオルトホスフェート二水素カリウム及び4gの塩化ナトリウムを400mlの水に溶解することにより調製した。水を添加して500mlの体積にした。

## 【0049】

グループA: 実施例I及びII

これらの実施例で使用した成分を表3に示す。

## 【0050】

表3

	実施例I	実施例II
a) アンホテリシンB	1.00g	1.00g
b) DMPC	0.68g	0.68g
c) DMPG	0.30g	0.30g
d) エタノール*	200ml	200ml
e) クロロホルム*	10 ml	10 ml
f) pH — 分散時 均質化前	6.95** 6.80**	7.2 7.2
g) 塩化ナトリウム	1.80g	1.80g
h) 水 q.s.to	200ml	—
i) リン酸緩衝液pH 7.2 q.s.to	—	200ml

10

20

30

\*最終生成物に残存しない

\*\*0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて調整した

## 【0051】

手順:

実施例Iにおいて、アンホテリシンBを、窒素を通気し、攪拌した150mlの水に添加した。pHを、0.1N水酸化ナトリウム溶液により、約6.95に調整した。

実施例IIにおいて、アンホテリシンBを、窒素を通気した、攪拌下の150mlリン酸緩衝液pH7.2に懸濁した。

## 【0052】

リン脂質DMPC及びDMPGをロータリーフラスコ中のクロロホルムに溶解した。リン脂質が完全に溶解した後エタノールを添加し、窒素を流しながらフラスコを適度な速度で回して混合させた。このアルコール性溶液を、減圧下濃縮して、完全に乾燥させた。溶媒を完全に除去した後窒素を30分間流した。

## 【0053】

乾燥脂質フィルムを、ロータリーフラスコ内で、フラスコを連続して回転させ、連続して窒素を流しながら、上述したように調製したアンホテリシンBの水性懸濁液により水和化した。実施例において得られたアンホテリシンB脂質懸濁液のpHを0.1N水酸化ナトリウム溶液により約6.80に調整した。フラスコ内容物を超音波処理浴内で1時間超音波処理した。容積は、実施例Iでは水で、実施例IIではリン酸緩衝液pH7.2で、180mlとした。

40

50

## 【0054】

アンホテリシンB脂質懸濁液を次に、APV高圧ホモジナイザーにより、均質化生成物が $2\mu$ グラスファイバーフィルターにより濾過できるまで、均質化した。

## 【0055】

実施例Iにおいて塩化ナトリウムを水に溶解し、20mlの水で希釈した。実施例IIでは、塩化ナトリウムをリン酸緩衝液pH7に溶解し、20mlのリン酸緩衝液pH7.2により希釈した。この塩化ナトリウム溶液を、均質化したアンホテリシンB脂質懸濁液を低い速度で攪拌し、窒素を流しながら、これに添加した。この生成物をホモジナイザーに戻し、圧力をかけずに5分間再循環した。次にこれを $2\mu$ グラスファイバーフィルターを通して濾過し、窒素雰囲気下、ガラス容器に充填し、重さを計り(scaled)、110℃で40分間オートクレープをかけた。実施例IIでは、オートクレープを、110℃で40分間、迅速な加熱及び迅速な冷却サイクルで行なった。

## 【0056】

グループB:

## 1) 実施例III~VI

これらの実施例において使用した成分を表4に示し、手順を下に示した。添加する塩化ナトリウムの量を1.8gから0.2gに変更した。

## 【0057】

表4

	実施例			
	III	IV	V	VI
a) アンホテリシンB (微粉碎化)	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) 塩化ナトリウム	1.80g	1.40g	0.80g	0.20g
e) エタノール*	200ml	200ml	200ml	200ml
f) クロロホルム*	10ml	10ml	10ml	10ml
g) pH - 分散時 均質化前	7.20** 7.00**	7.15** 7.10**	7.05** 7.15**	7.20** 7.00**
h) 水 q. s. to	200ml	200ml	200ml	200ml

10

20

30

40

40

\* 最終生成物中に残存しない

\*\* 0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて調整した

## 【0058】

手順

リン脂質DMPC及びDMPGをロータリーフラスコ中のクロロホルムに溶解した。リン脂質が完全に溶解した後エタノールを添加し、窒素を流しながらフラスコを適度な速度で回して混合させた。このアルコール性溶液を、減圧下濃縮して、完全に乾燥させた。溶媒を完全に除去した後窒素を30分間流した。

## 【0059】

塩化ナトリウムを175mlの水に溶解した。窒素をこの溶液に15分間通気した。微粉碎したアンホテリシンBを次にその塩化ナトリウム溶液に、攪拌し、窒素を通気しながら、添加した。0.1N水酸化ナトリウムを添加することにより、pHを各実施例について表4に記載の値に調整した。

## 【0060】

乾燥脂質フィルムを、ロータリーフラスコ内で、フラスコを連続して回転させ、連続して窒素を流しながら、上述したように調製したアンホテリシンBの水性懸濁液により水和化した。得られたアンホテリシンB脂質複合体のpHを表4に示すように調整した。フラスコ内

50

容物を超音波処理浴内で1時間超音波処理をした。

【0061】

容積を、水で200mlに調整した。

アンホテリシンB脂質懸濁液を次に、高圧ホモジナイザーを用いて、生成物が2μグラスファイバーフィルターにより濾過できるまで均質化した。

【0062】

均質化したアンホテリシンB脂質懸濁液を、2μグラスファイバーフィルターを用いて濾過し、窒素雰囲気下、ガラス容器に充填し、重さを計り(scaled)、オートクレーブを110度40分間、迅速な加熱及び迅速な冷却サイクルで行なった。

【0063】

実施例III、IV及びVの生成物を用いた、80mg/kg体重の投与量におけるマウスにおける毒性試験は、いずれの死亡率も示さなかつたが、実施例VIは50%死亡率を示した。

【0064】

グループB( 続き )

2) 実施例VII~IX

これらの実施例で使用された成分を表5に下記手順と共に示した。

【0065】

表5

	実施例		
	VII	VIII	IX
a) アンホテリシンB (微粉碎化)	1g	1g	1g
b) DMPC	0.68g	—	0.68g
c) DMPG	0.30g	—	0.30g
d) 卵ホスファチジルコリン	—	0.90g	—
e) 塩化ナトリウム	1.80g	1.80g	***
f) エタノール*	300ml	200ml	200ml
g) クロロホルム*	—	15ml	10ml
h) pH - 分散時 均質化前	7.15** 7.05**	7.15** 6.95**	7.40 7.40
i) 水 q.s.to	200ml	200ml	—
j) リン酸緩衝食塩水 q.s.to	—	—	200ml

10

20

30

\* 最終生成物中に残存しない

\*\* 0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて調整した

\*\*\* PBSによる寄与 ~ 2gm

【0066】

手順

実施例VIIにおいて、リン脂質DMPC及びDMPGをロータリーフラスコ中のエタノールに、フラスコを適度な速度で回し、窒素を流しながら溶解した。

実施例VIIIにおいて、リン脂質である卵ホスファチジルコリンをロータリーフラスコ中のクロロホルムに溶解し、実施例IXにおいてリン脂質DMPC及びDMPGをロータリーフラスコ中のクロロホルムに溶解した。リン脂質がクロロホルムに完全に溶解した後、エタノールを添加し、窒素を流しながらフラスコを適度な速度で回して混合させた。

【0067】

これらの実施例において、以上のように得られたリン脂質溶液を、減圧下蒸発させて完全に乾燥させた。溶媒を完全に除去した後、窒素を30分間流した。

【0068】

実施例VII及びVIIIにおいて、塩化ナトリウムを175mlの水に溶解した。窒素をこの溶液に

40

50

15分間通気した。微粉碎したアンホテリシンBを、次にこの塩化ナトリウム溶液に、攪拌下及び窒素通気下に懸濁し、0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7.15に調整した。

#### 【0069】

実施例IXにおいて、微粉碎したアンホテリシンBを、175mlのリン酸緩衝食塩水pH7.4(PBS)に攪拌下懸濁した。窒素を15分間通気した。PBSは、約2gの塩化ナトリウムを与える。

#### 【0070】

乾燥脂質フィルムを、フラスコを連続して回転させ及び連続して窒素を流し入れながら、ロータリーフラスコ中で上述したように製造した微粉碎化アンホテリシンBの水性懸濁液により水和化した。0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて、得られたアンホテリシンB脂質懸濁液のpHを、実施例VIIでは7.05に、そして実施例VIIIでは6.95に調整した。

10

#### 【0071】

実施例VII及びVIIIにおいて、容積を水により200mlに調整した。

実施例IXでは、容積をリン酸緩衝食塩水pH7.4により200mlに調整した。

アンホテリシンB脂質懸濁液を次に、APV高圧ホモジナイザーを用いて、生成物が2μグラスファイバーフィルターにより濾過できるまで均質化した。

#### 【0072】

均質化したアンホテリシンB脂質懸濁液を、窒素雰囲気下、2μグラスファイバーフィルターを通じて濾過し、ガラス容器に充填し、密閉して、実施例IXについては110°で20分間、実施例VII及びVIIIについては110°で40分間、オートクレープを行なった。

実施例VIIで得られた、滅菌したアンホテリシンB水性組成物についてマウスの毒性試験及び安定性試験を行なった。毒性試験の結果を表6に示し、安定性試験の結果を表7に示す。

20

#### 【0073】

##### 粒子サイズ分析

実施例VIIにおいて得られたアンホテリシンB水性組成物の粒子サイズを、モデル770 AccuSizer of Particle Sizing Systems, Inc., USAで評価した。95%の粒子が1.63μより小さいサイズを示し、90%の粒子が1.28μより小さいサイズを示した。

#### 【0074】

##### マウスにおける毒性試験

実施例VIIにおいて得られたアンホテリシンB水性組成物の毒性試験は、デスオキシコリン酸ナトリウムを含む従来のアンホテリシンB生成物についてマウスで行なわれた。以下が結果である。

30

#### 【0075】

##### 表6

##### マウスにおける急性毒性

	LD <sub>50</sub> (腹腔内)
アンホテリシンB(従来の生成物)	3.5mg/kg体重
実施例VIIのアンホテリシンB水性組成物	>80mg/kg体重

研究室で製造したアンホテリシンB水性組成物の単回投与によるLD<sub>50</sub>は>80mg/kg体重であった。これは、デスオキシコリン酸ナトリウムを含む従来のアンホテリシンB生成物の単回投与によるLD<sub>50</sub>の20倍以上高い。

40

#### 【0076】

##### 表7

推奨保管温度2~8°Cにおける、実施例VIIのアンホテリシンB水性組成物の安定性データ

期間	外見	アンホテリシンB 含有率
初期	安定して維持され、穩やかに攪拌すると均一に分散する黄色に着色した懸濁液。	100.6%
6ヶ月	安定して維持され、穩やかに攪拌すると均一に分散する黄色に着色した懸濁液。	100.3%
1年	安定して維持され、穩やかに攪拌すると均一に分散する黄色に着色した懸濁液。	99.8%
18ヶ月	安定して維持され、穩やかに攪拌すると均一に分散する黄色に着色した懸濁液。	98.3%
2年	安定して維持され、穩やかに攪拌すると均一に分散する黄色に着色した懸濁液。	96.5%

10

20

30

## 【0077】

微量でさえもDMSOまたは塩素化炭化水素を含まない非経口アンホテリシンB水性組成物は、これらの溶媒を全く使用しない本発明の改良された方法により製造したとき、市場向きの注入可能な懸濁液製品の一般的な要求を満たすことを、本実施例は明瞭に示している。実施例VIIの方法で製造された新規な水性組成物は、DMSO及び塩素化炭化水素のような危険な溶媒を完全に含まない。

## 【0078】

## グループC：実施例X～XII

これらの実施例において使用される成分を表8に示し、手順を以下に示す。

表8

	実施例		
	X	XI	XII
a) アンホテリシンB (微粉碎化)	1g	1g	1g
b) DMPC	0.68g	0.68g	0.68g
c) DMPG	0.30g	0.30g	0.30g
d) 塩化ナトリウム	1.80g	1.80g	1.80g
e) エタノール*	300ml	200ml	200ml
f) クロロホルム*	10ml	10ml	10ml
g) pH - 分散時 均質化前	7.15** 6.90**	7.30** 7.00**	7.2 7.2
h) 水 q.s.to	200ml	200ml	—
i) リン酸緩衝液pH7.2 q.s.to	—	—	200ml

40

\* 最終生成物中に残存しない

\*\* 0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて調整した

## 【0079】

## 手順

リン脂質DMPC及びDMPGをロータリーフラスコ中のクロロホルムに溶解した。リン脂質が完全に溶解した後エタノールを添加し、窒素を流しながらフラスコを適度な速度で回して混合させた。このアルコール性溶液を、減圧下濃縮して、完全に乾燥させた。溶媒を完全に除去した後窒素を30分間流した。

## 【0080】

微粉碎したアンホテリシンBを、攪拌下及び窒素通気下に、実施例X及びXIでは150mlの水に、実施例XIIでは、150mlのリン酸緩衝液pH7.2に懸濁した。実施例X及びXIについては、

50

pHを0.1N水酸化ナトリウムを添加することにより、表8に示される値に調整した。

【0081】

乾燥脂質フィルムを、ロータリーフラスコ内で、フラスコを連続して回転させ、連続して窒素を流しながら、上述したように調製したアンホテリシンBの水性懸濁液により水和化した。得られたアンホテリシンB脂質複合体のpHを、0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて、表8に示すように調整した。実施例X及びXIでは、容積を水により180mlに調整したが、実施例XIIでは、容積をリン酸緩衝液pH7.2により180mlに調整した。フラスコ内容物を超音波処理浴内で1時間超音波処理をした。

【0082】

実施例X及びXIIにおいて、アンホテリシンB脂質懸濁液を次に、APV高圧ホモジナイザーを用いて、生成物が2μグラスファイバーフィルターにより濾過できるまで均質化した。 10

【0083】

実施例Xにおいて、塩化ナトリウムを水に溶解し、20mlまで水で希釈した。実施例XIIでは塩化ナトリウムをpH7.2のリン酸緩衝液に溶解し、20mlまで同溶液で希釈した。この塩化ナトリウム溶液を、均質化した脂質懸濁液へ、低速で攪拌し、窒素を流しながら、添加した。この生成物をホモジナイザーに戻し、圧力をかけずに5分間再循環した。

【0084】

実施例XIIにおいて、超音波処理後、アンホテリシンB脂質懸濁液を、APV高圧ホモジナイザーを用いて圧力下にホモジナイザーを3回通して超音波処理した。塩化ナトリウムを水に溶解し、20mlまで水で希釈した。この塩化ナトリウム溶液を、低速混合下に、3回通して最後に得られたアンホテリシンB脂質懸濁液へ添加した。この生成物をホモジナイザーに戻し、圧力をかけずに5分間再循環した。これを再び生成物が2μグラスファイバーフィルターを通して濾過可能になるまで、圧力下均質化した。 20

【0085】

生成物を次に、2μグラスファイバーフィルターを通して濾過した。濾過生成物を窒素雰囲気下、ガラス容器中に充填し、密閉して、110℃で40分間、迅速加熱及び迅速冷却サイクルによりオートクレープを行なった。

【0086】

グループD：実施例XIII及びXIV

これらの実施例で使用した成分を表9に示し、手順を下記に示した。 30

【0087】

表9

	実施例	
	XIII	XIV
a) アンホテリシンB (微粉碎化)	1g	—
b) アンホテリシンB (非微粉碎化)	—	1g
c) DMPC	0.68g	0.68g
d) DMPG	0.30g	0.30g
e) エタノール*	200ml	200ml
f) クロロホルム*	10ml	10ml
g) 水 q.s.to	200ml	200ml
h) pH - 分散時 均質化前	7.25** 7.15**	7.20** 7.10**

\*最終生成物中に残存しない

\*\*0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて調整した

【0088】

## 手順

リン脂質DMPC及びDMPGをロータリーフラスコ中のクロロホルムに溶解した。リン脂質が完全に溶解した後エタノールを添加し、窒素を流しながらフラスコを適度な速度で回して混合させた。このアルコール性溶液を、減圧下濃縮して、完全に乾燥させた。溶媒を完全に除去した後窒素を30分間流した。

### 【0089】

実施例XIIIにおいて、微粉碎したアンホテリシンBを次にその塩化ナトリウム溶液に、攪拌し、窒素を通気しながら添加した。0.1N水酸化ナトリウムを添加することにより、pHを各実施例について表4に記載の値に調整した。実施例XIVにおいて、非微粉碎したアンホテリシンBを水に、攪拌し、窒素を通気しながら添加した。pHを、0.1N水酸化ナトリウム溶液により表9に示されるように調整した。10

### 【0090】

乾燥脂質フィルムをロータリーフラスコ中で、ロータリーエバポレーターを用いて、連続して窒素を流しながら、上述したように製造したアンホテリシンB懸濁液により水和化した。pHを、0.1N水酸化ナトリウム溶液により表9に示されるように調整した。実施例XIVにおいて、フラスコ内容物を1時間超音波処理した。容積を水で200mlにした。

### 【0091】

アンホテリシンB脂質懸濁液を次にAPV高圧ホモジナイザーを用いて、生成物が2μグラスファイバーフィルターにより濾過できるまで均質化した。

### 【0092】

均質化したアンホテリシンB脂質懸濁液を、2μグラスファイバーフィルターを用いて濾過し、窒素雰囲気下、ガラス容器に充填し、重さを計り(scaled)、オートクレーブを121度20分間、迅速な加熱及び迅速な冷却サイクルで行なった。20

### 【0093】

#### マウスにおける毒性試験

実施例XIII及びXIVにおいて得られたアンホテリシンB水性組成物(塩化ナトリウム非含有)の毒性を、実施例IIIに従って塩化ナトリウム含有アンホテリシンB水性組成物と共に、マウスにおいて試験した。以下が観察されたことである。

### 【0094】

表10

#### マウスにおける急性毒性

	LD <sub>50</sub> (腹腔内)
実施例IIIに従うアンホテリシンB水性組成物 (塩化ナトリウム含有)	>80mg/kg体重
実施例XIII及びXIVのアンホテリシンB水性組成物 (塩化ナトリウム非含有)	40mg/kg体重

### 【0095】

実施例XIII及びXIVに従って製造された、塩化ナトリウムを含まないアンホテリシンB水性組成物の単独注入後のLD<sub>50</sub>は、マウスにおいて40mg/kg体重であり、一方、実施例IIIに従って製造されたアンホテリシンB水性組成物は>80mg/kgであった。これは、塩化ナトリウムが、低毒性なアンホテリシンB水性組成物を形成する上で必要であることを示している。40

### 【0096】

#### 発明の利点

本発明の利点を以下に記載する。

i) 本発明において、アンホテリシンB水性組成物は、腎毒性を有することが報告されているDMSOを用いずに製造された。

ii) 非経口的に許容される有機溶媒中へのアンホテリシンBの低溶解性(0.1mg/ml)メタ50

ノール)のため、大量の有機溶媒が必要であり、そのため、プロセスがより長く、時間のかかるものとなり、商業的に不適切となる。本発明の方法は、アンホテリシンBをいずれの有機溶媒に溶解することも必要としない。

iii) 従来技術の方法では、濾過に関して、接線方向の流れの濾過または押し出しのような特別な技術を必要とする。本発明の方法では、通常の濾過を使用する。

iv) 本発明の方法により製造された生成物は、オートクレーブによる滅菌に安定であり、従って腹腔内使用に適するものとなっている。

#### 【 0 0 9 7 】

本発明の方法は、シンプルであり、費用効果も良く、及び従来技術の方法に対し改良されている。本発明の方法の最も重要な特性は、得られた生成物の非常に高い純度であり、工程において危険な溶媒は全く使用されていないので、微量でもそのような溶媒が残存するというリスクが無いことである。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/069983 A1(51) International Patent Classification<sup>1</sup>: A61K 31/715. (74) Agent: KASBEKAR, Madhav; 48/3, Mudhavi Sah-Nivas, 277, Mogul Lane, Mahim, Mumbai 400 016 (IN).  
47/14, 9/127

(21) International Application Number: PCT/IN01/00040

(22) International Filing Date: 16 March 2001 (16.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
217/MUM/2001 1 March 2001 (01.03.2001) IN

(71) Applicant (for all designated States except US): BHARAT SERUMS &amp; VACCINES LTD. (IN/IN); Daftary Gantam, Road No. 27, Wagle Estate, Thane 400 604 (IN).

(81) Designated States (national): AI, AL, AM, AT, AU, BB,

BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,

EE, ES, FI, GB, GH, GM, IIR, IIU, ID, IL, JP, KE, KP, KR,

KZ, LK, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ,

PL, PT, RO, RU, SD, SL, SG, SI, SK, IJ, TR, TT, TZ, UA,

UG, US, UZ, VN, YU, JA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BJ, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PAL, Srikanth (IN/IN); Bharat Serums &amp; Vaccines Ltd., Road No. 27, Wagle Estate, Thane 400 604 (IN). RIVANKAR, Songeeta (IN/IN); Bharat Serums &amp; Vaccines Ltd., Road No. 27, Wagle Estate, Thane 400 604 (IN).

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/069983 A1

(54) Title: AMPHOTERICIN B AQUEOUS COMPOSITION

(57) Abstract: A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous compositions containing Amphotericin B are described. The compositions essentially consist of in addition to Amphotericin B, phospholipids and sodium chloride. The compositions are sterilised by autoclaving. The process of making these compositions without the use of solvents for dissolving Amphotericin B have been described. The compositions are indicated for the treatment of invasive fungal infections.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

**AMPHOTERICIN B AQUEOUS COMPOSITION****Field of Invention**

This invention relates to low toxicity Amphotericin B aqueous composition. This invention is particularly related to the low toxicity Amphotericin B aqueous composition containing phospholipids suitable for parenteral administration.

**Background of the Invention**

Amphotericin B is a polyene antifungal, antibiotic drug useful in treatment of invasive fungal infections. However, it has high nephrotoxicity.

10

The toxicity of the Amphotericin B is reduced by various processes; of these (a) entrapping the drug in liposomes and (b) converting the drug into High drug lipid complex (HDLC) are commonly used.

15 **Preparation of liposomal Amphotericin B:**

In US patent 4973465 (1990) preparation of HDLCs have been described in which sterols like cholesterol are used either alone or in combination with natural phospholipids, phosphatidylcholine.

20

In US patent 5616334 (1997) a method of preparing liposomal Amphotericin B which involves initially producing blank multilamellar vesicles (MLVs) and then mixing the MLVs with sonicated Amphotericin B suspension in water has been described. This process does not involve the use of any solvents. However, this procedure specifically produces liposomal Amphotericin B which is more toxic than Amphotericin B HDLC. The 25 procedure involves extrusion of blank liposomes for sizing through stacked polycarbonate filters again and again ten times. It also involves removal of unincorporated Amphotericin B by centrifugation after drug loading.

30

This US patent also describes a process for making HDLC in "Low toxicity drug-lipid systems". In this patent a process for the preparation of Amphotericin B lipid complex has been described. This technique in general is as follows:

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

**Preparation of HDLCs:** First the drug Amphotericin B is solubilised in a solvent such as Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methanol. The lipids, preferably dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) in a molar ratio of 7 : 3 are solubilised in solvents such as methanol, ethanol, chlorinated hydrocarbons. The drug solution and the lipid solution are mixed. The solvents are evaporated under reduced pressure, resulting in a thin lipid-drug film. The film is hydrated with an aqueous solution such as water, saline, phosphate buffer saline or glycine buffer, to form HDLCs.

10 In one variation of the above process, the resulting dry lipid - drug film is resuspended in a solvent, such as methylene chloride and again evaporated under reduced pressure prior to hydrating the film.

15 In another variation of the above process, the dry lipid-drug film is dehydrated to form flakes; the flakes are then hydrated with aqueous solution.

In another process, the aqueous solution such as saline, buffer or water is added to the solution containing the drug and the lipid, and then the solvent is evaporated off to obtain HDLCs. In this process, formation of thin film of the phospholipids is not required.

20 In an alternative method for forming the HDLCs described in this US patent, lipid particles (or liposomes) containing bioactive agents, such as Amphotericin B, are formed by first making multilamellar vesicles (MLVs) containing from 6 - 50 mole percent of the bioactive agent. Then subjecting the MLVs to a heating cycle, from about 25°C to about 25 60°C, most preferably about 60°C. Such a cycle forms a more highly ordered and less toxic Amphotericin B lipid complex.

Another alternate process of making Amphotericin B lipid complex has also been described in this US patent. In that process lipids are admixed with sodium chloride 30 solution (0.9%) and homogenised using a homogeniser. Amphotericin B is dissolved in DMSO and added to the lipid solution while homogenising and homogenised further for about thirty minutes, until the particle size is reduced to about less than 10 microns,

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

preferably to about 10 micron. The resulting lipid particles are size selected following tangential flow filtration. The disadvantage with this process is that the solvent used DMSO has high boiling point and hence difficult to remove from the product. Further trace quantity of DMSO remains in the final product. It is not desirable to have such a solvent in  
5 trace quantities in the composition for intravenous administration, as this solvent has been reported to be hepatotoxic (The journal of Infectious diseases 1991 : 164 Pg 418 to 421).

HDLCS are useful preparations to reduce toxicity of Amphotericin B, but the techniques described in US patent 5616334 (1997) require use of large amount of organic  
10 solvents, as Amphotericin B has a low solubility in most of the commonly used parenterally acceptable organic solvents. Hence the process involves removal of large quantities of organic solvents by evaporation. Alternatively aprotic solvents such as dimethyl sulfoxide, dimethyl formamide are also used to dissolve Amphotericin B. These aprotic solvents have high boiling point and traces of these solvents is bound to remain in the final composition.  
15 As these aprotic solvents are reported to be hepatotoxic, it is not desirable to use these solvents in the process of manufacturing.

There is, therefore, a need to improve the process for large scale manufacture of such Amphotericin B compositions by reducing the quantity of solvents used. That will  
20 also bring down the production cost.

The main object of the present invention is to develop a low toxicity parenteral aqueous composition containing Amphotericin B and phospholipids with a view to make it simple and to reduce the cost of manufacture. Further extension of the main object of the  
25 present invention is to develop a low toxicity parenteral aqueous composition containing Amphotericin B and phospholipids and not containing traces of DMSO and / or chlorinated hydrocarbons.

***Summary of the Invention :***

30 Accordingly, the present invention relates to a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

The present invention further relates to a process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids comprising steps of

- (i) dissolving one or more phospholipids in one or more of organic solvents selected from a group of parenterally acceptable solvents such as methanol, ethanol, isopropyl alcohol, chloroform, carbon tetrachloride and methylene chloride and then removing the solvents by evaporation under reduced pressure to form a dry film of the single or mixed phospholipids;
- (ii) suspending Amphotericin B in a parenterally acceptable aqueous phase, not containing sodium chloride or suspending micronised Amphotericin B in a parenterally acceptable aqueous phase, which may contain sodium chloride;
- (iii) adding aqueous phase containing suspended Amphotericin B formed at the end of step (ii) to said film of phospholipids obtained at the end of step (i) and mixing the two to obtain a suspension of said Amphotericin B together with said phospholipids in said aqueous phase;
- (iv) adjusting the pH of said suspension obtained at the end of step (iii) to 6.0 - 8.0 and then homogenising it till it becomes filterable through a  $2\mu$  glass fibre filter;
- (v) adding sufficient sodium chloride solution in water at the end of step (iv) so that the sodium chloride content of the final product is at least 0.1% w/v;
- (vi) filtering said homogenised suspension obtained at the end of step (v) through a  $2\mu$  glass fibre filter and filling the filtrate in vials under nitrogen cover, sealing the vials and sterilising the sealed vials by autoclaving to obtain the final product suitable for parenteral administration.

The present invention also relates to a low toxicity parenteral Amphotericin B aqueous composition, containing atleast 0.1% w/v sodium chloride and phospholipids as described herein and made by the process of the present invention as described above.

**Detailed description of embodiments of the invention**

The content of Amphotericin B in the composition of present invention varies from 0.1% w/v to 1.0% w/v of the composition, preferably the content of Amphotericin B is 0.5%w/v of the composition.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

The total content of phospholipids varies from 0.1% w/v to 1.0%w/v of the composition. The preferred content is from about 0.4% to about 0.6%w/v.

5 The weight ratio of Amphotericin B to phospholipids is from about 1:0.5 to about 1:1.5. The preferred weight ratio is from about 1:0.8 to about 1:1.2.

In this process, phospholipids are chosen from egg phosphatidylcholine, or a mixture of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol sodium salt (DMPG). When a mixture of two phospholipids DMPC and DMPG are used, 10 then the weight ratio of phospholipids DMPC : DMPG is between 7:1 and 7:15, preferably 7:3.

The solvents used for dissolving the phospholipids are chosen from alcoholic solvents such as ethanol, methanol, Isopropyl alcohol with or without addition of 15 chlorinated hydrocarbons such as chloroform, methylene chloride, carbon tetrachloride. Alcoholic solvents alone or chlorinated hydrocarbons alone can be used for dissolving the phospholipids. Alternatively alcoholic solvents and chlorinated hydrocarbons can also be used in combination to dissolve the phospholipids. When chlorinated hydrocarbons are not selected, the composition is free from chlorinated hydrocarbons. Preferred solvent used for 20 dissolving phospholipids is ethanol.

Micronised Amphotericin B wherever used in this invention is micronised using air jet mill to particle size less than 10 microns.

25 The pH of aqueous phase used for dispersing Amphotericin B is adjusted to 6.0 - 8.0 using dilute sodium hydroxide solution whenever buffer solution is not used in the composition.

30 The aqueous phase used for suspending Amphotericin B is parenterally acceptable vehicle such as water or phosphate buffer. When micronised Amphotericin B is used, the aqueous phase used for suspending Amphotericin B can be saline, phosphate buffer saline, water or phosphate buffer.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

Sodium chloride is added as a solution in water after homogenisation and before filtration. However sodium chloride can be added at any step (ii) to (iv) of manufacturing specified under "Summary of the invention" when micronised Amphotericin B is used.

5 The concentration of Sodium chloride is from about 0.1% to 0.9% w/v of the composition preferably 0.4% to 0.9% w/v of the composition.

Homogenisation is carried out using high pressure homogeniser at not less than 5000 psi till the product is filterable through 2 micron glass fibre filter.

10 In another embodiment of the invention, the Amphotericin B lipid suspension is sonicated in a bath sonicator before homogenisation to get the uniform suspension after adjusting the pH to about 6.0 - 8.0. Dilute sodium hydroxide solution is used to adjust the pH whenever buffer solution is not used in the composition.

15 The homogenised Amphotericin B lipid suspension is filtered through 2 $\mu$  glass fibre filters following the usual filtration procedure under pressure either using filtered Nitrogen or filtered compressed air.

20 After filtration, the homogenised suspension is filled into vials under nitrogen cover and sterilised by conventional autoclaving at 110°C to 121°C, preferably at 121°C for 20 minutes or 110°C for 40 minutes. The sterilisation can also be carried out by specialised process of autoclaving in which the heating and cooling cycle time is reduced by rapid heating and rapid cooling system.

25 In the earlier process of preparing HDLCs as described in US patents 4973465 (1990) and 5616334 (1997), Amphotericin B is dissolved in very large amount of organic solvents. In one of the examples in US patent 5616334 (1997), for preparing 1 vial of 20 ml of Amphotericin B lipid complex equivalent to 100mg of Amphotericin B, one litre of 30 methanol is used. In another example to decrease the solvent volume, 5 ml of DMSO for 100mg of Amphotericin B has been used, but DMSO is not a recommended solvent for intravenous injection as DMSO has been reported to be hepatotoxic.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

In the process of the present invention, Amphotericin B is not at all dissolved in any solvents while the conventional process use DMSO for dissolving Amphotericin B.

5 In the process of present invention, when Amphotericin B, suspended in an aqueous phase containing sodium chloride, was added to the lipid film and homogenised, it was observed to form aggregates and the homogenised product was not filterable through 2 micron glass fibre filter by the usual filtration procedure.

10 After extensive experimentation, we found that when aqueous phase used for suspending Amphotericin B was prepared without addition of any sodium chloride in it, homogenisation proceeded smoothly without any aggregation of the suspension and the homogenised bulk was filterable.

15 However, during the course of this invention, we found that sodium chloride is essential in the composition to reduce toxicity. Amphotericin B aqueous compositions containing different concentrations of sodium chloride at a dose of 80 mg/kg body weight, were injected in mice, in a group of eight. Amphotericin B aqueous composition without any sodium chloride as described in the Examples below were prepared and injected separately. Before each injection, volume equivalent to a dose of 80 mg/kg body weight 20 was diluted to 0.5 ml with 5% dextrose injection to render it isotonic. The percentage mortality observed at the end of 72 hours are as shown in Table 1.

Table 1

	<b>Concentration of Sodium chloride in Amphotericin B aqueous composition</b>	<b>Prepared as per Example</b>	<b>Percentage mortality in mice at 80mg/kg dose</b>
25	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%

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

From the Table 1, it is clear that a minimum concentration of 0.1% sodium chloride is essential to reduce toxicity. Hence during the hydration of phospholipid film, aqueous phase without any sodium chloride was used to make homogenisation smooth and filtration through 2 $\mu$  glass fibre filter easy. Sodium chloride was added as a solution after the process of homogenisation. Addition of Sodium chloride in the composition of the present invention is essential to reduce toxicity of Amphotericin B. Eventhough with the addition of 0.1% w/v sodium chloride, the LD<sub>50</sub> was 80mg/kg, this LD<sub>50</sub> is very much higher than the conventional Amphotericin B preparations containing sodium desoxycholate which is reported to be around 4mg/kg.

10

After a lot of further experiments, we found that reducing the average particle size of Amphotericin B to less than 10 microns by micronising, helped in overcoming the problem of aggregation during homogenisation. The particle size analysis of Amphotericin B before and after micronisation was carried out with Sympatic HELOS Particle Size Analyser. 15 Micronisation of Amphotericin B also helped in overcoming the problem of filtration associated with the presence of sodium chloride in the homogenised aqueous suspension containing non-micronised Amphotericin B and phospholipid.

Filtration of homogenised bulk prepared using micronised Amphotericin B is easy 20 and commonly used filters can be used; in the prior art process such as in US patent 5616334 (1997), filtering of HDLC is performed through a torturous path or straight through a membrane filter such as a polycarbonate filter.

Thus in one embodiment of the invention, we could overcome the problem of 25 aggregation and filtration using non-micronised Amphotericin B by avoiding addition of sodium chloride to the aqueous phase. However, we found that addition of sodium chloride in atleast a minimum concentration of 0.1% w/v is essential to reduce the toxicity of Amphotericin B aqueous composition. Having sodium chloride in it, we solved the problem of aggregation and filtration by deferring the addition of Sodium chloride until the 30 step of homogenisation.

Accordingly, in the first embodiment of the invention, in the process for manufacture of a low toxicity sterile Amphotericin B aqueous composition containing

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

atleast 0.1% w/v sodium chloride, the aqueous phase used for dispersing non-micronised Amphotericin B is water or phosphate buffer not containing sodium chloride. Sodium chloride is added just after homogenisation of the aqueous suspension containing non-micronised Amphotericin B and the phospholipids.

5

In the second embodiment of the invention, the problem of aggregation and filtration of the suspension of the phospholipid and the aqueous phase containing Amphotericin B, was solved by using micronised Amphotericin B.

10

In combination of the two embodiments, when the Amphotericin B used is micronised and is suspended in an aqueous phase not containing sodium chloride, sodium chloride is added into the aqueous phase before, during or after homogenisation step.

*Examples :*

15

The invention will now be illustrated by way of Examples. The Examples are by way of illustration only and in no way restrict the scope of the invention.

There are 4 groups of Examples as described below in the Table 2.

Table 2

20 Group Nos.	Example	Amphotericin B	Aqueous phase used for dispersing Amphotericin B	Addition of salt	Embodiment of the invention
25 A	I - II	Non-micronised	Not containing salt	After homogenisation step	First
B	III - VI } VIII - IX }	Micronised	Containing salt	-----	Second
30 VII*	Micronised	Containing salt	-----	Second	
C	X - XII	Micronised	Not containing salt	During / after Homogenisation step	First & second
35 D	XIII	Micronised	Not containing salt	-----	Not of invention
XIV	Non-micronised				

40 \* Solvent used for dissolving phospholipids is only ethanol.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

All the raw materials used in these Examples were of parenteral grade. Equipments used were of conventional nature. Entire processing was done in an area with a controlled environment required for manufacturing sterile products.

5

Amphotericin B used in these Examples was of parenteral grade obtained from Alpharma complying with USP specifications. Micronised Amphotericin B wherever used in these Examples was prepared by micronising Amphotericin B using air jet mill to the particle size of less than 10 microns.

10

Phospholipids DMPG and DMPG used in the Examples were of parenteral grade and were procured from Avanti Polar Lipids.

15

Phospholipid Egg phosphatidylcholine used in the Examples was of parenteral grade and was procured from Lipoids.

Organic solvents used in the Examples were of AR (Analytical reagent) quality.

20

Phosphate buffer used in the Examples were prepared as per Indian Pharmacopoeia.

Phosphate buffer saline pH 7.4 used in the Example was prepared by dissolving 1.19gm of Disodium hydrogen orthophosphate, 0.095gms of Potassium dihydrogen orthophosphate and 4gms of Sodium chloride in 400ml of water. Water was added to make up the volume to 500ml.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

**GROUP A : Example I & II**

The ingredients used in these Examples are shown in Table 3 :

5

**Table 3**

		<b>Example I</b>	<b>Example II</b>
10	a) Amphotericin B	1.00g	1.00g
b) DMPC	0.68g	0.68g	
c) DMPG	0.30g	0.30g	
d) Ethanol*	200ml	200ml	
e) Chloroform*	10 ml	10ml	
f) pH - at dispersion	6.95**	7.2	
15	before homogenisation	6.80**	7.2
g) Sodium chloride	1.80g	1.80g	
h) Water q.s.to	200ml	--	
i) Phosphate buffer pH 7.2 q.s.to	--	200ml	

20 \* Does not remain in the final product.

\*\* Adjusted using 0.1N Sodium hydroxide solution

**Procedure :**

In Example I, Amphotericin B was suspended in 150ml of water under stirring and  
 25 under nitrogen bubbling. The pH was adjusted to about 6.95 with 0.1 N Sodium hydroxide solution.

In Example II, Amphotericin B was suspended in 150ml of Phosphate buffer pH 7.2  
 under stirring and under nitrogen bubbling.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

Phospholipids DMPC and DMPG were dissolved in Chloroform in a rotary flask. Ethanol was added after complete dissolution of phospholipids and allowed to mix by rotating the flask at moderate speed under nitrogen flushing. This alcoholic solution was rotary evaporated under reduced pressure to complete dryness. Nitrogen was flushed for 30 min. after complete removal of solvents.

The dry lipid film was hydrated in the rotary flask with aqueous suspension of Amphotericin B prepared as above keeping the flask under continuous rotation with continuous flushing of nitrogen. pH of Amphotericin B lipid suspension obtained in Example I was adjusted to about 6.80 with 0.1N Sodium hydroxide solution. The content of the flask was sonicated in a bath sonicator for 1 hr. The volume was made upto 180 ml with water in Example I and with phosphate buffer pH 7.2 in Example II.

The Amphotericin B Lipid suspension was then homogenised using APV high pressure homogeniser till the homogenised product was filterable through 2 $\mu$  glass fibre filter.

Sodium Chloride was dissolved in water and diluted to 20ml with water in Example I. In Example II, sodium chloride was dissolved in and diluted to 20ml with phosphate buffer pH 7.2. This sodium chloride solution was added to the homogenised Amphotericin B Lipid suspension under low speed stirring and nitrogen flushing. This product was transferred back to the homogeniser and recirculated for 5 minutes without applying pressure. Then it was filtered through a 2 $\mu$  glass fibre filter and filled into glass containers under nitrogen, sealed and autoclaved at 110°C for 40 mins. In Example II autoclaving is done at 110°C for 40 minutes with rapid heat and rapid cooling cycle.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

**GROUP B :**1) **Example III to VI**

5 The ingredients used in these Examples are shown in Table 4 with the procedure given below, quantity of sodium chloride added has been changed from 1.8g to 0.2g

Table 4

		Examples			
		III	IV	V	VI
	a) Amphotericin B (micronised)	1g	1g	1g	1g
15	b) DMPC	0.68g	0.68g	0.68g	0.68g
	c) DMPG	0.30g	0.30g	0.30g	0.30g
	d) Sodium Chloride	1.80g	1.40g	0.80g	0.20g
	e) Ethanol*	200ml	200ml	200ml	200ml
	f) Chloroform*	10ml	10ml	10ml	10ml
20	g) pH - at dispersion before homogenisation	7.20** 7.00**	7.15** 7.10**	7.05** 7.15**	7.20** 7.00**
	h) Water q.s.to	200ml	200ml	200ml	200ml

\* Does not remain in the final product.

25 \*\* Adjusted using 0.1N Sodium hydroxide solution

**Procedure :**

Phospholipids DMPC and DMPG were dissolved in Chloroform in a rotary flask. Ethanol was added after complete dissolution of phospholipids and allowed to mix by 30 rotating the flask at moderate speed under nitrogen flushing. This alcoholic solution was rotary evaporated under reduced pressure to complete dryness. Nitrogen was flushed for 30 min. after complete removal of solvents.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

Sodium chloride was dissolved in 175ml of water. Nitrogen was bubbled in this solution for 15 min. Micronised Amphotericin B was then suspended in the sodium chloride solution under stirring and under nitrogen bubbling. The pH was adjusted by addition of 0.1N sodium hydroxide to the values as shown in Table 4 for each Example.

5

The dry lipid film was hydrated in the rotary flask with aqueous suspension of Amphotericin B prepared as above, keeping the flask under continuous rotation with continuous flushing of nitrogen. pH of this Amphotericin B lipid complex obtained was adjusted as shown Table 4. The content of the flask was sonicated in a bath sonicator for 1 10 hr.

The volume was made upto 200 ml with water.

The Amphotericin B Lipid suspension was then homogenised using high pressure 15 homogeniser till the product was filterable through 2 $\mu$  glass fibre filter.

The homogenised Amphotericin B Lipid suspension was filtered through a 2 $\mu$  glass fibre filter and filled into glass containers under nitrogen, sealed and autoclaved at 110°C for 40 mins with rapid heat and rapid cooling cycle.

20

Toxicity studies in mice with the product of Examples III, IV and V at a dose of 80mg/kg body weight did not show any mortality while that of Example VI showed 50% mortality.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

**Group B continued.....**2) **Example VII to IX**

5 The ingredients used in these Examples are shown in Table 5 with the procedure given below

**Table 5**

		Examples		
		VII	VIII	IX
10	a) Amphotericin B (micronised)	1g	1g	1g
	b) DMPC	0.68g	--	0.68g
	c) DMPG	0.30g	--	0.30g
15	d) Egg phosphatidylcholine	--	0.90g	--
	e) Sodium Chloride	1.80g	1.80g	***
	f) Ethanol*	300ml	200ml	200ml
	g) Chloroform*	--	15ml	10ml
	h) pH - at dispersion	7.15**	7.15**	7.40
20	before homogenisation	7.05**	6.95**	7.40
	i) Water q.s.to	200ml	200ml	--
	j) Phosphate buffer saline q.s.to	--	--	200ml

\* Does not remain in the final product.

25 \*\* Adjusted using 0.1N sodium hydroxide solution.

\*\*\* ~ 2gm contributed from PBS.

**Procedure :**

In the Example VII, phospholipids DMPC and DMPG were dissolved in ethanol in  
30 a rotary flask by rotating the flask at moderate speed under nitrogen flushing.

In the Example VIII, phospholipid Egg phosphatidylcholine was dissolved in  
Chloroform in a rotary flask and in the Example IX phospholipids DMPC & DMPG were

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

dissolved in chloroform in a rotary flask. Ethanol was added after complete dissolution of phospholipids in chloroform and allowed to mix by rotating the flask at moderate speed under nitrogen flushing.

5 In these Examples the phospholipid solutions thus obtained were rotary evaporated under reduced pressure to complete dryness. Nitrogen was flushed for 30 min. after complete removal of the solvent.

In Example VII & VIII, sodium chloride was dissolved in 175ml of water. Nitrogen  
10 was bubbled in this solution for 15 min. Micronised Amphotericin B was then suspended in the sodium chloride solution under stirring and under nitrogen bubbling, the pH was adjusted to about 7.15 with 0.1 N Sodium hydroxide solution.

In Example IX, micronised Amphotericin B was suspended in 175ml of phosphate  
15 buffer saline pH 7.4 (PBS) under stirring. Nitrogen was bubbled for 15 minutes. PBS contributes about 2gms of sodium chloride.

The dry lipid film was hydrated in the rotary flask with aqueous suspension of micronised Amphotericin B prepared as above keeping the flask under continuous rotation  
20 with continuous flushing of nitrogen. pH of this Amphotericin B lipid suspension obtained was adjusted to 7.05 in Example VII and to 6.95 in Example VIII with 0.1N Sodium hydroxide solution.

The volume was made upto 200 ml with water in Example VII & VIII.  
25 The volume was made upto 200 ml with phosphate buffer saline pH 7.4 in Example IX.

The Amphotericin B Lipid suspension was then homogenised using APV high  
30 pressure homogeniser till the homogenised product was filterable through 2 $\mu$  glass fibre filter.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

The homogenised Amphotericin B Lipid suspension was filtered through a 2 $\mu$  glass fibre filter and filled into glass containers under nitrogen, sealed and autoclaved at 121°C for 20 minutes in Example IX and at 110°C for 40 minutes in Example VII & VIII.

5 The Sterile Amphotericin B aqueous composition obtained in Example VII was subjected to toxicity studies in mice and stability studies. The results of the toxicity study are given in Table 6 and stability study are given in Table 7.

*Particle size analysis :*

10 Particle size of the Amphotericin B aqueous composition obtained in Example VII was evaluated on Model 770 AccuSizer of Particle Sizing Systems, Inc., USA. 95% of the particles were found to be below 1.63 $\mu$  in size and 90% of the particles were found to be below 1.28 $\mu$  in size.

15 *Toxicity study in mice :*

The toxicity study of the Amphotericin B aqueous composition obtained in Example VII was studied in mice along with a conventional Amphotericin B product containing sodium desoxycholate. The followings are the observations:

20 **Table 6**  
**Acute toxicity study in mice**

LD <sub>50</sub> (Intravenous)	-	
Amphotericin B conventional product	-	3.5mg/kg body weight
25 Amphotericin B aqueous composition of Example VII	-	>80mg/kg body weight

30 The LD<sub>50</sub> of Amphotericin B aqueous composition prepared in this laboratory after single injection was >80 mg/kg in mice. This was more than 20 times higher than LD<sub>50</sub> after a single injection of conventional Amphotericin B product containing sodium desoxycholate.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

Table 7

**Stability data for Amphotericin B aqueous composition  
of Example VII at recommended storage temperature of 2°C - 8°C**

5

PERIOD	APPEARANCE	AMPHOTERICIN B CONTENT
10		
Initial	Yellow coloured suspension which settles on keeping and disperses uniformly on mild shaking	100.6%
15		
6 Months	Yellow coloured suspension which settles on keeping and disperses uniformly on mild shaking	100.3%
1 Year	Yellow coloured suspension which settles on keeping and disperses uniformly on mild shaking	99.8%
20		
18 Months	Yellow coloured suspension which settles on keeping and disperses uniformly on mild shaking	98.3%
25		
2 Years	Yellow coloured suspension which settles on keeping and disperses uniformly on mild shaking	96.5%

This example clearly shows that parenteral Amphotericin B aqueous composition having not even a trace of DMSO or chlorinated hydrocarbon when prepared by the improved process of the present invention where these solvents are not at all used, complies 30 with general requirements of a marketable injectable suspension product. The novel aqueous composition prepared by the process of Example VII is totally free from harmful solvents such as DMSO and chlorinated hydrocarbons.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

**GROUP C : Example X to XII**

The ingredients used in these Examples are shown in Table 8 with the procedure given below

5

**Table 8**

		<b>Examples</b>		
		<b>X</b>	<b>XI</b>	<b>XII</b>
10	a) Amphotericin B (micronised)	1g	1g	1g
	b) DMPC	0.68g	0.68g	0.68g
	c) DMPG	0.30g	0.30g	0.30g
15	d) Sodium Chloride	1.80g	1.80g	1.80g
	e) Ethanol*	200ml	200ml	200ml
	f) Chloroform*	10ml	10ml	10ml
	g) pH - at dispersion before homogenisation	7.15** 6.90**	7.30** 7.00**	7.2
20	h) Water q.s.to	200ml	200ml	--
	i) Phosphate buffer pH 7.2 q.s. to	--	--	200ml

\* Does not remain in the final product

\*\* Adjusted using 0.1N Sodium hydroxide solution.

25

**Procedure :**

Phospholipids DMPC and DMPG were dissolved in Chloroform in a rotary flask. Ethanol was added after complete dissolution of phospholipids and allowed to mix by rotating the flask at moderate speed under nitrogen flushing. This alcoholic solution was rotary evaporated under reduced pressure to complete dryness. Nitrogen was flushed for 30 min. after complete removal of solvents.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

Micronised Amphotericin B was suspended in 150ml of water in Example X and XI and in 150ml of phosphate buffer pH 7.2 in Example XII under stirring and under nitrogen bubbling. The pH was adjusted by addition of 0.1N sodium hydroxide to the values as shown in Table 8 for examples X & XI.

5

The dry lipid film was hydrated in the rotary flask with micronised Amphotericin B suspension prepared as above using the rotary evaporator with continuous flushing of nitrogen. pH of Amphotericin B lipid suspension obtained was adjusted with 0.1N Sodium hydroxide solution as shown in Table 8. In Examples X and XI, the volume was made upto 10 180ml with water while in Example XII, the volume was made upto 180ml with Phosphate buffer pH 7.2. In Example XI, the content of the flask was sonicated in a bath sonicator for 1 hour.

In Example X & XII, the Amphotericin B Lipid suspension was then homogenised 15 using APV high pressure homogeniser till the homogenised product was filterable through 2 $\mu$  glass fibre filter.

Sodium chloride was dissolved in water and diluted to 20ml with water in Example X. Sodium chloride was dissolved in phosphate buffer of pH 7.2 and diluted to 20ml with 20 phosphate buffer of pH 7.2 in Example XII. This sodium chloride solution was added to the homogenised Lipid suspension under low speed stirring and nitrogen flushing. This product was transferred back to the homogeniser and recirculated for 5 minutes without applying pressure.

25 In Example XI, the Amphotericin B lipid suspension after sonication was passed through homogeniser 3 times under pressure using APV high pressure homogeniser. Sodium chloride was dissolved in water and diluted to 20ml with water. This sodium chloride solution was added under low speed mixing to the Amphotericin B lipid suspension obtained at the end of 3 passes. This product was transferred back to the 30 homogeniser and recirculated for 5 minutes without applying pressure. This was again homogenised under pressure till the product was filterable through 2 $\mu$  glass fibre filter.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

The product was then filtered through a 2 $\mu$  glass fibre filter. The filtered product was filled into glass containers under nitrogen, sealed and autoclaved at 110°C for 40 minutes with rapid heat and rapid cooling cycle.

5 **GROUP D : Example XIII and XIV**

The ingredients used in these Examples are shown in Table 9 with the procedure given below

10

**Table 9**

		<b>Example XIII</b>	<b>Example XIV</b>
15	a) Amphotericin B (micronised)	1g	--
b) Amphotericin B (non-micronised)	--	1g	
c) DMPC	0.68g	0.68g	
d) DMPG	0.30g	0.30g	
e) Ethanol*	200ml	200ml	
f) Chloroform*	10 ml	10ml	
20 g) Water q.s.to	200ml	200ml	
h) pH - at dispersion before homogenisation	7.25** 7.15**	7.20** 7.10**	

\* Does not remain in the final product

25 \*\* Adjusted using 0.1N Sodium hydroxide solution

**Procedure :**

Phospholipids DMPC and DMPG were dissolved in Chloroform in a rotary flask. Ethanol was added after complete dissolution of phospholipids and allowed to mix by 30 rotating the flask at moderate speed under nitrogen flushing. This alcoholic solution was rotary evaporated under reduced pressure to complete dryness. Nitrogen was flushed for 30 min. after complete removal of solvents.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

In Example XIII, micronised Amphotericin B was suspended in water under stirring and under nitrogen bubbling. In Example XIV, non-micronised Amphotericin B was suspended in water under stirring and under nitrogen bubbling. The pH was adjusted with 0.1 N Sodium hydroxide solution as shown in Table 9.

5

The dry lipid film was hydrated in the rotary flask with Amphotericin B suspension prepared as above using the rotary evaporator with continuous flushing of nitrogen. pH was adjusted with 0.1N Sodium hydroxide solution as shown Table 9. In Example XIV, the content of the flask was sonicated for 1 hr. The volume was made upto 200 ml with water.

10

The Amphotericin B Lipid suspension was then homogenised using APV high pressure homogeniser till the homogenised product was filterable through 2 $\mu$  glass fibre filter.

15

The homogenised Amphotericin B Lipid suspension was filtered through a 2 $\mu$  glass fibre filter. The filtered product was filled into glass containers under nitrogen, sealed and autoclaved. Autoclaving was done at 121°C for 20 minutes.

*Toxicity study in mice :*

20

The toxicity of Amphotericin B aqueous composition (without sodium chloride) obtained in Example XIII and XIV was studied in mice along with Amphotericin B aqueous composition containing sodium chloride as per Example III. The followings are the observations:

25

**Table 10**  
**Acute toxicity study in mice**

LD <sub>50</sub> (Intravenous)	-	> 80mg/kg body weight
Amphotericin B aqueous composition (with sodium chloride) as per Example III	-	
Amphotericin B aqueous composition (without sodium chloride) as per Example XIII & XIV	-	40mg/kg body weight

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

The LD<sub>50</sub> of Amphotericin B aqueous composition prepared without sodium chloride as per Example XIII and XIV after single injection was 40 mg/kg body weight in mice as compared to >80 mg/kg with Amphotericin B aqueous composition prepared with sodium chloride as per Example III. This proves that sodium chloride is required to form 5 Amphotericin B aqueous composition of low toxicity.

**ADVANTAGES OF THE INVENTION :**

The advantages of the present invention are given below :

- 10 i) In present invention, Amphotericin B aqueous composition has been prepared without the use of DMSO which has been reported to be hepatotoxic.
- 15 ii) Due to low solubility of Amphotericin B in parenterally acceptable organic solvents, (0.1 mg/ml in methanol) a large volume of organic solvent is required which makes the process more tedious, time consuming and commercially not feasible. The process of the present invention does not require, dissolving Amphotericin B in any organic solvent
- 20 iii) The process of the prior art requires a specialised technique for filtration like tangential flow filtration or extrusion. In the process of present invention, conventional filtration is used.
- 25 iv) The product prepared by the process of present invention, is stable to sterilisation by autoclaving thus making it suitable for intravenous use.

Process of present invention is simple and cost effective, and an improvement over the process of prior art. The most important feature of the process of this invention is the greatest purity of the obtained product without the risk of retaining any traces of harmful 30 solvents because such solvents are not at all used in the process.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

CLAIMS

1. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids.  
5
2. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in claim (1) wherein the phospholipids used are chosen from egg phosphatidylcholine (EPC) or a mixture of dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol sodium salt (DMPG).  
10
3. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (2) wherein the content of Amphotericin B is from about 0.1% to 1% w/v of the composition.  
15
4. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (3) wherein the content of Amphotericin B is 0.5% w/v of the composition.  
20
5. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (4) wherein the content of Sodium chloride is atleast 0.1% w/v of the composition.
- 25 6. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (5) wherein the content of Sodium chloride is between 0.1% to 0.9% w/v of the composition.
- 30 7. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (6) wherein the content of phospholipids is from about 0.1% to 1% w/v of the composition.

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

8. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (7) wherein the content of phospholipids is between 0.4% to 0.6% w/v of the composition.
- 5
9. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (8) wherein the weight ratio of Amphotericin B to phospholipids is from about 1 : 0.8 to about 1 : 1.2.
- 10
10. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (9) wherein the weight ratio of phospholipids dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) : dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) is from about 7:1 to about 15
- 15
11. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (10) wherein the weight ratio of phospholipids dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) : dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) used is 7:3.
- 20
12. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (11) wherein the composition is totally free from any chlorinated hydrocarbon.
- 25
13. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (12), comprising steps of
- 30
- (i) dissolving one or more phospholipids in one or more of organic solvents selected from a group of parenterally acceptable solvents such as methanol, ethanol, isopropyl alcohol, chloroform, carbon tetrachloride and

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

- methylene chloride and then removing the solvents by evaporation under reduced pressure to form a dry film of the single or mixed phospholipids;
- (ii) suspending Amphotericin B in a parenterally acceptable aqueous phase, not containing sodium chloride or suspending micronised Amphotericin B in a parenterally acceptable aqueous phase, which may contain sodium chloride;
- 5 (iii) adding aqueous phase containing suspended Amphotericin B formed at the end of step (ii) to said film of phospholipids obtained at the end of step (i) and mixing the two to obtain a suspension of said Amphotericin B together with said phospholipids in said aqueous phase;
- 10 (iv) adjusting the pH of said suspension obtained at the end of step (iii) to 6.0 - 8.0 and then homogenising it till it becomes filterable through a 2 $\mu$  glass fibre filter;
- (v) adding sufficient sodium chloride solution in water at the end of step (iv) so that the sodium chloride content of the final product is at least 0.1% w/v;
- 15 (vi) filtering said homogenised suspension obtained at the end of step (v) through a 2 $\mu$  glass fibre filter and filling the filtrate in vials under nitrogen cover, sealing the vials and sterilising the sealed vials by autoclaving to obtain the final product suitable for parenteral administration.
- 20 14. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in claim (13) wherein the phospholipids are chosen from egg phosphatidylcholine (EPC) or a mixture of dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol sodium salt (DMPG).
- 25 15. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) & (14) wherein the content of Amphotericin B is from about 0.1% to 1% w/v of the composition
- 30 16. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

- phospholipids as claimed in any of claims (13) - (15) wherein the content of Amphotericin B is 0.5% w/v of the composition.
17. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (16) wherein the content of phospholipids is from about 0.1% to 1% w/v of the composition.
18. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (17) wherein the content of phospholipids is between 0.4% to 0.6% w/v of the composition.
19. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (18) wherein the weight ratio of Amphotericin B to phospholipids is from about 1 : 0.8 to about 1 : 1.2.
20. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (19) wherein the weight ratio of phospholipids dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) is from about 7:1 to about 7:15.
- 25 21. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (20) wherein the weight ratio of phospholipids dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) used is 7:3.
- 30 22. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

phospholipids as claimed in any of claims (13) - (21) wherein the solvent used for dissolving phospholipids is ethanol.

23. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (22) wherein parenterally acceptable aqueous phase is water or phosphate buffer; in case micronised Amphotericin B is used, it is water, phosphate buffer, saline or phosphate buffer saline.
- 10
24. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (23) wherein the pH of said aqueous phase used for suspension of Amphotericin B at step (ii) is adjusted to 6.0 -
- 15
- 8.0.
25. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (24) wherein sterilisation of the homogenised filtered suspension is carried out by conventional autoclaving.
- 20
26. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (25) wherein the sterilisation temperature is 110°C.
- 25
27. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (26) wherein sterilisation is carried out by specialised process of autoclaving in which the heating and cooling time is reduced by rapid heat and rapid cool cycle.
- 30

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

28. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (27) wherein when Amphotericin B used is micronised, said aqueous phase used in step (ii) is water, saline, phosphate buffer or phosphate buffer saline.
- 5
29. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (13) - (28) wherein when Amphotericin B used is micronised, sodium chloride is added at any step (ii) to (iv) so that the sodium chloride content of the final product is atleast 0.1% w/v.
- 10
30. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids as claimed in any of claims (1) - (12) prepared by the process as claimed in any of claims (13) - (29).
- 15
31. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids substantially as herein described in the Text and in the Examples I - XII of the invention.
- 20
32. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids substantially as herein described in the Text and in the Examples I - XII of the invention.
- 25
33. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids prepared by the process substantially as herein described in the Text and in the Examples I - XII of the invention.
- 30
34. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free and chlorinated hydrocarbon free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and

WO 02/069983

PCT/IN01/00040

phospholipids substantially as herein described in the Text and in the Example VII of the invention.

35. A process for manufacture of a low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free and chlorinated hydrocarbon free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids substantially as herein described in the Text and in the Example VII of the invention.
- 5
36. A low toxicity parenteral dimethyl sulfoxide free and chlorinated hydrocarbon free aqueous composition containing Amphotericin B, sodium chloride and phospholipids prepared by the process substantially as herein described in the Text and in the Example VII of the invention.
- 10

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		
International Application No <b>PCT/IN 01/00040</b>		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K31/715 A61K47/24 A61K9/127		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>IPC 7 A61K</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) <b>WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 418 153 A (MEDGENIX GROUP) 20 March 1991 (1991-03-20) claims 1-16 page 2, line 12 - line 14 page 3, line 6 - line 13 page 6, line 26 - line 35 example 1 -----	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
8 February 2002	19/02/2002	
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer	
European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: 31 651 600 nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ventura Amat, A	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/IN 01/00040

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 418153	A 20-03-1991	FR 2651680 A1	15-03-1991
		AT 93385 T	15-09-1993
		CA 2025298 A1	15-03-1991
		DE 69002905 D1	30-09-1993
		DE 69002905 T2	23-12-1993
		DK 418153 T4	12-08-1996
		EP 0418153 A1	20-03-1991
		ES 2060107 T3	16-11-1994
		GR 3020068 T3	31-08-1996
		JP 2831455 B2	02-12-1998
		JP 3169808 A	23-07-1991
		MX 9203803 A1	01-08-1992
		US 5100591 A	31-03-1992

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GH,GM,HR,HU,ID,IL,JP,KE,KP,KR,KZ,LK,LU,MA,MD,MG,MK,MN,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,TJ,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 バイ スリカンス

インド セイン 400 604 ワグル エステイト ロード ナンバー27 ブハラット セルムズ アンド ヴァクシンズ リミテッド

(72)発明者 リヴァンカー サンゲータ

インド セイン 400 604 ワグル エステイト ロード ナンバー27 ブハラット セルムズ アンド ヴァクシンズ リミテッド

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB11 CC47 DD63 FF16 FF67

4C086 AA01 AA02 EA15 MA03 MA05 MA24 MA55 NA05 NA06 ZB32