

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 -3741

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/36

A 61 K 9/20

A 61 K 9/22

A 61 K 31/70

A 61 K 31/52

A 61 K 31/40

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19816070**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/02386**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/52558**

(71) Přihlašovatel:

AXIVA GMBH, Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Bengs Holger, Frankfurt am Main, DE;
Schuth Silke, Ruppach-Goldhausen, DE;
Grande Jürgen, Bad Soden, DE;
Böhm Gitta, Frankfurt am Main, DE;
Schneller Arnold, Messel, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Retardované tablety vyrobené z lineárních
polysacharidů nerozpustných ve vodě a jejich
použití**

(57) Anotace:

Řešením je retardovaná tableta, která jako retardační materiál obsahuje zcela nebo částečně ve vodě nerozpustný lineární polysacharid a sice s výhodou polysacharid poly-(1,4-alfa-D-glukan) ve formě mikročástic a je uzpůsobena k řízenému uvolňování účinné látky.

UDLZ MILOŠ VŠETEČKA
advokát
120 00 PRAHA 2, Hájkova 2

Retardované tablety vyrobené z lineárních polysacharidů nerozpustných ve vodě a jejich použití

Oblast techniky

Předložený vynález se týká retardovaných tablet z lineárních polysacharidů nerozpustných ve vodě, způsobu jejich výroby a jejich použití, obzvláště k řízenému uvolňování účinných látek.

Dosavadní stav techniky

V moderních farmaceutických technologiích mají význam formulace nosičů účinných látek (excipient), jejichž aplikační forma cíleně ovlivňuje biologické rozdělení, biologickou dostupnost, biologickou snášenlivost a resorpci. Navíc musí mít nosiče účinných látek dobré mechanické vlastnosti, jako dostatečnou tvrdost a odolnost proti tahu a napětí.

Ačkoliv některé sloučeniny se mohou již samy nechat slisovat na kompaktní stabilní hmoty (příkladně sacharoza nebo laktoza), jsou potřebné další ingredience - také pomocné látky k výrobě tablet - jako pojiva, plnicí prostředky, kluzné prostředky a přísady. Typickými suchými pojivy ke zvýšení stability, které se zde používají, jsou fosforečnany vápenaté, mikrokrytalická celuloza, (příkladně Avicel^R, PH 102^R, obzvláště Celsphere), polyvinylpyrrolidony (příkladně Kollidon^R, Luviskol VA 64^R, Plasdone^R), kukuřičný, pšeničný nebo bramborový škrob, derivatizované polysacharidy, tak zvané gumy (příkladně xantanová guma), deriváty celulozy

(příkladně hydroxypropylmethylceluloza : Klucel^R) nebo ethylceluloza (Aqualon^R).

Navíc se musí nosič účinné látky v kontaktu s tělesnými tekutinami optimálním a řízeným způsobem v organismu rozpadat. Proto se k řízení rozkladu často přidávají tak zvané desintegrancia. Typickými sloučeninami pro tento účel jsou kukuřičné škroby, želatinizované škroby a modifikace škrobů. Použitelné jsou rovněž substance, které v důsledku příjmu vody a započatého botnání vyvíjejí trhací sílu. K nim patří zesíťované polyvinylpyrrolidony (Kollidon CL^R), karboxymethylcelulozy a jejich vápenaté soli nebo galaktomannany.

U mnoha sloučenin (příkladně Avicel^R a PH 102^R) se podařilo dosáhnout jak potřebné mechanické stability tak i řízeného rozpadu tablet.

Speciální škroby, včetně amylozy, se popisují jako výhodné nosiče účinných látek k formulaci tablet (Journal of Pharmaceutical Sciences 55 (1966), 340. Použitá amyloza Neopol se však ukazuje jako nevýhodná (E.A. Stanley Manufacturing Co, USA), protože se účinná látka uvolňuje neúplně a nosič účinné látky má vysoký obsah vody (10 - 12 %), takže nelze sestavovat formulace hydrolyticky labilních účinných látek. Obzvláště zesíťovaná amyloza (stupeň zesíťování 15 %) se popisuje jako výhodné pojivo (S.T.P. Pharma Sciences 4 (1994), 329-335 a Journal of Controlled Release 15 (1991) 39 - 46, protože na základě její kapacity k přijímání vody působí jako urychovač rozpadu. Ve WO 94/21236 se jako pojivo a desintegrační prostředek používá zesíťovaná amyloza (stupeň zesíťování 25 %). Vysoký stupeň zesíťování se však ukazuje nevýhodný z hlediska biologické snášenlivosti. Jako zesíťova-

cí prostředek se používá až do 30 % hmotnostních nesnášený epichlorhydrin. Již nepatrná míra zesíťení v rozsahu několika málo procent vede k rychlému poklesu reaktivnosti, takže se musí počítat se zbývajícími zbytky nezreagovaného zesíťujícího činidla.

Všechny na trhu dostupné nosiče účinných látek obsahující škroby a amylozu využívají zdroje rostlinného původu.

Zde je nevýhodou, že tyto biopolymery jako všechny přirozeně se vyskytující látky vykazují značné kolísání ve stavbě a struktuře a proto není zaručena požadovaná reprodukovatelnost a tím rovnoměrná kvalita produktu, i se zřetelem na řízené uvolňování účinné látky. V případě přirozených škrobů značně kolísá podle původu obsah amylozy a amylopektinu. Příkladně škrob z brambor obsahuje asi 20 % hmotnostních amylozy a asi 80 % hmotnostních amylopektinu, zatímco škrob z kukuřice obsahuje asi 50 % hmotnostních amylozy a asi 50 % hmotnostních amylopektinu. Tato kolísání v rámci jednoho rostlinného společenství vznikají bonitou půdy, příjmem hnojiv, sezonními klimatickými rozdíly atd. Navíc mohou amylozy obsahovat 1,4 spojený polyglukan s molekulovou hmotností asi 50 000 až 150 000 Dalton a amylopektin, vysoce rozvětvený a 1,4 a 1,6 spojený polyglukan s molekulovou hmotností asi 300 000 až 2 000 000 Dalton a širokým rozdělením molekulové hmotnosti.

Přechody od vysoce rozvětvených k lineárním jsou plynulé a kolísají v materiálu rostlinného původu, takže ostré oddělení je prakticky nemožné. Obzvláště ty nosiče účinných látek, které ještě obsahují amylopektin způsobují na základě rozvětvení nerovnoměrné botnání, čímž je negativně ovlivněna stabilita nosiče. Amylopektin se proto většinou nákladně

odstraňuje enzymatickým odstraněním rozvětvení (Journal of Controlled Release 45 (1997) 25 - 33 a EP 0499 648 B1 = US 5 468 286.

Vedle těchto vyslovených nevýhod, širokého rozdělení molekulových hmotností nebo směsí polymerů rozdílného prostorového uspořádání obsahují přirozené polymery další součásti jako nízkomolekulární sloučeniny, příkladně tuky a oleje, které je možné jen obtížně oddělit a které se při dalším zpracování a používání projevují nevýhodně (příkladně US 3 490 742). Obzvláště se musí provádět pracovní kroky snižující výtěžek, přičemž se nečistoty zčásti nedají úplně odstranit.

Známé jsou rovněž pokusy optimalizovat biopolymery, také škroby, tím, že se výchozí rostliny změní genovými technikami. WO 94/03049 popisuje výrobu a použití škrobů s vysokým obsahem amylázy z kukuřice změněné genovými technikami. Nadále zůstávají nevýhodu nejednotnost a nečistoty.

Reprodukovatelnost a kvalita je výrazně závislá na jednotnosti a čistotě. K zaručení produktů vysoké kvality musí být tyto výchozí látky jasně definovatelné a charakterizovatelné.

Předložený vynález má za úkol dát k dispozici retardační materiál za vyloučení výše uvedených nevýhod, který se může používat jako retardované tablerky ve farmaceutických přípravcích k řízenému uvolňování účinných látek, s výhodou pro orální aplikace.

Podstata vynálezu

Úkol se řeší tak, že se jako retardační materiál použije ve vodě nerozpustný lineární polysacharid, který představuje biokompatibilní, chemicky inertní a za tlaku stabilní výchozí produkt, který bez dalších přídavných látek umožňuje řízené uvolňování účinné látky. S výhodou se jako výchozí produkt použije lineární ve vodě nerozpustný poly-(1,4-alfa-glukan) jako takový nebo ve formě sferických mikročástic.

"Retardované tablety" ve smyslu předloženého vynálezu jsou obzvláště tablety, dražé, pilulky, pelety, lisované tvary, destičky, kotouče tvaru disku a další, jejichž receptura vyžaduje kompresi. Rovněž jsou zahrnuté kapsle, které se plní retardačním materiálem.

Za retardační materiál se v dalším považují lineární ve vodě nerozpustné polysacharidy.

Lineární ve vodě nerozpustné polysacharidy ve smyslu předloženého vynálezu jsou polysacharidy, s výhodou polyglukany, obzvláště poly(1,4-alfa-D-glukan), které sestávají z monosacharidů, disacharidů, jeho dalších oligomerů nebo derivátů.

Tyto jsou spolu spojeny vždy stejným způsobem. Každá takto definovaná základní jednotka má přesně dvě spojení, vždy jedno k jinému monomeru. Z toho jsou vyňaty obě základní jednotky, které tvoří počátek a konec polysacharidu. Tyto základní jednotky mají pouze jednu vazbu k jednomu dalšímu monomeru. Při třech nebo více spojeních (kovalentní vazby) jednoho monomeru k jedné další skupině, s výhodou

k jedné další sacharidové jednotce se hovoří o rozvětvení. Z každé sacharidové stavební jednotky v polymerním řetězci potom vycházejí nejméně tři glykosidické vazby.

Podle vynálezu se nevyskytují rozvětvení vůbec nebo jen v nevýznamné míře, aby nebyly při existujících velmi malých podílech rozvětvení obecně obvyklým analytickým metodám nadále přístupné. To je příkladně ten případ, kdy vztaženo na celkový počet existujících hydroxylových skupin v počtu jedno sto hydroxylových skupin, které nejsou potřeba k výstavbě lineárního polysacharidu, je obsazeno maximálně pět hydroxylových skupin vazbami k dalším sacharidovým stavebním jednotkám.

Přitom je stupeň rozvětvení maximální (100 %), jestliže na každé sacharidové jednotce vykazují volné hydroxylové skupiny (nebo jiné vyskytující se funkční skupiny) další glykosidické (nebo jiné) vazby k dalším sacharidům. Stupeň rozvětvení je minimální (0 %), jestliže na sacharidech kromě hydroxylových skupin, které podmiňují linearitu polymeru, nejsou žádné další hydroxylové skupiny změněny chemickou reakcí. Příklady výhodných ve vodě nerozpustných lineárních polysacharidů jsou lineární poly-D-glukany, přičemž druh spojení je nepodstatný, pokud je ve smyslu vynálezu zachována linearita. Příklady jsou poly(1,4-alfa-D-glukan) a poly(1,3-beta-D-glukan), přičemž poly(1,4-alfa-D-glukan) je obzvláště výhodný.

Pokud má základní jednotka tři nebo více spojení, hovoří se o rozvětvení. Přitom vyplývá z počtu hydroxylových skupin na 100 základních jednotek, které se nepodílejí na stavbě lineárního polymerního řetězce a tvoří rozvětvení, tak zvaný stupeň rozvětvení.

Podle vynálezu vykazují lineární ve vodě nerozpustné polysacharidy stupeň rozvětvení méně než 8 %, to znamená, že mají méně než 8 rozvětvení na 100 základních jednotek. S výhodou je stupeň rozvětvení menší než 4 % a obzvláště maximálně 1,5 %.

Pokud je lineární ve vodě nerozpustný polysacharid polyglukan, příkladně poly-(1,4-alfa-D-glukan), je stupeň rozvětvení v pozici 6 menší než 4 %, s výhodou maximálně 2 % a obzvláště maximálně 0,5 % a stupeň rozvětvení v dalších pozicích nepodílejících se na lineárním spojení, příkladně v pozici 2 případně 3 v případě výhodného poly-(1,4-alfa-D-glukanu) je s výhodou maximálně 2 % a obzvláště maximálně 1 %.

Obzvláště výhodné jsou polysacharidy, obzvláště pol-alfa-D-glukany, které nemají žádná rozvětvení, případně jejichž stupeň rozvětvení je tak minimální, že již není prokazatelný obvyklými metodami.

Podle vynálezu se vztahuje předpona "alfa", "beta" nebo "D" pouze na vazby, které tvoří páteřní polymerní řetězec a nikoliv na rozvětvení.

"Nerozpustnost ve vodě" ve smyslu předloženého vynálezu znamená, že neexistuje žádná rozpoznatelná rozpustnost sloučeniny za normálních podmínek (teplota místnosti 25 °C a tlak vzduchu 101325 Pa nebo hodnoty odchylující se maximálně o 20 %).

V případě polysacharidů používaných podle vynálezu, obzvláště polyglukanů jako poly(1,4-alfa-D-glukanu) to znamená, že nejméně 98 % použitého množství, s výhodou množství

většího než 99,5 % je ve vodě nerozpustné. Přitom může být pojem nerozpustnost vysvětlen také s pomocí následujícího pozorování. Pokud se zahřeje 1 g zkoušeného lineárního polysacharidu v 1 l deionizované vody na teplotu 130 °C za tlaku 0,1 MPa, potom zůstane vzniklý roztok stabilní jen krátkodobě, po dobu několika minut. Po ochlazení za normálních podmínek látka opět vypadává. Po dalším ochlazení a oddělení na odstředivce se započítáním ztrát při pokusu je možné tímto způsobem získat zpět nejméně 66 % použitého množství.

V rámci tohoto vynálezu se s výhodou používají lineární, ve vodě nerozpustné polysacharidy, které se mohou získat s pomocí biotechnologických metod nebo metod s genovými manipulacemi obecné definice. Jednou obzvláště výhodnou formou provedení zde popsaného vynálezu je výroba biotechnologickým způsobem, obzvláště biokatalytickým způsobem.

Lineární polysacharidy vyrobené biokatalyzou (též biotransformace) v rámci tohoto vynálezu znamená, že se katalytickou reakcí monomerních základních stavebních jednotek jako oligomerních sacharidů, příkladně mono- a/nebo disacharidů vyrobí lineární polysacharid, přičemž se použije tak zvaný biokatalyzátor, obvykle enzym, za vhodných podmínek. Obvykle se vyrobí obzvláště poly-(1,4-alfa-D-glukan) pomocí polysacharidových syntáz a/nebo škrobových syntáz a/nebo glykosyltransferáz a/nebo alfa-1,4-glukantransferáz a/nebo glykogensyntáz a/nebo amylocukráz a/nebo fosforyláz.

V úvahu připadají rovněž lineární polysacharidy z fermentace. To jsou v rámci tohoto vynálezu lineární polysacharidy, které se mohou získat fermentačními procesy za použití organismů vyskytujících se v přírodě, jako houby,

řasy nebo mikroorganismy nebo za použití organismů nevyskytujících se v přírodě, které se získají modifikací přirozených organismů, jako houby, řasy nebo mikroorganismy pomocí genových manipulací obecné definice.

Dále se mohou lineární polysacharidy k výrobě retardovaných tablet popsaných v předloženém vynálezu získat z nelineárních polysacharidů, které obsahují rozvětvení tak, že se zpracují s enzymem a po odštěpení (příkladně pomocí enzymů, jako je amyláza, isoamyláza, glukonohydroláza, pullulánázy a další) a oddělení rozvětvení se z nich získají lineární polymery.

Molekulové hmotnosti M_w lineárních polysacharidů používaných podle vynálezu mohou kolísat v širokém rozmezí 10^3 g/mol až 10^7 g/mol, s výhodou leží molekulové hmotnosti M_w v rozmezí 2×10^3 g/mol až 5×10^4 g/mol, obzvláště 3×10^3 g/mol až 2×10^4 g/mol. Pro výhodně použitý lineární polysacharid poly-(1,4-alfa-D-glukan) se použije odpovídající rozmezí.

Rozdělení molekulové hmotnosti případně polydisperzita M_w/M_n může kolísat v širokých mezích podle způsobu výroby polysacharidu. S výhodou se použije polydisperzita 1,01 až 50, obzvláště výhodně 1,5 až 15. Přitom polydisperzita stoupá s bimodálním rozdělením molekulové hmotnosti, přičemž tato skutečnost neovlivňuje negativně formulaci tablet.

Nejsou vyloučeny směsi lineárních polysacharidů podle vynálezu ani ve formě mikročástic s nelineárními polysacharidy. Jako "řízené uvolňování účinné látky" se rozumí, že se účinná látka se zohledněním statistické odchylky odpovídající okolnostem po určité době a/nebo intervalu

uvolní v dávku výhodnou pro biologický organismus.

Tato definice obsahuje také extrémy. Jednak spontání uvolnění všech účinných látek ve formulaci v průběhu časového intervalu pokleslého na nulu, jednak minimální požadované množství/dávka k dosažení terapeutického efektu po dlouhou, dokonce nekonečnou dobu, nejméně určitou dobu, která je potřebná k uvolnění všech účinných látek přítomných ve formulaci.

Proto se hovoří pro zde uváděnou retardovanou formulaci jako o synonymu pro depotní formulaci nebo formulaci se zpožděným uvolňováním. Za "účinnou látku" se považuje každá biologicky aktivní substance a kombinace substancí v nejširším slova smyslu (s důrazem na humánní a veterinární oblast), obzvláště k lékařské indikaci. Obzvláště se jedná o : analgetika, anginální přípravky, antialergika, antihistaminika, antiinflammatoria, bronchodilatátory, bronchospasmolytika, diuretika, anticholinergetika, antiadhesní molekuly, modulátory cytokinu, biologicky aktivní endonukleázy, rekombinantní humánní DNasy, neurotransmittery, inhibitory leukotrinu, vasoaktivní intestinální peptidy, antagonisty endothelinu, analeptika, analgetika, lokální anestetika, narkotizační prostředky, antiepileptika, antikonvulsiva, antiparkinsonika, antiemetika, sloučeniny regulující nebo stimulující hormonální systém, sloučeniny regulující nebo stimulující srdeční oběhový systém, sloučeniny regulující nebo stimulující respirační systém, vitaminy, stopové prvky, antioxidanta, cytostatika, antimetabolity, antiinfektiva, imunomodulátory, imunosupresiva, antibiotika, proteiny, peptidy, hormony, růstové hormony, růstové faktory, xanthiny, vakciny, steroidy, beta₂-mimetika.

"Terapeutický efekt" ve smyslu tohoto vynálezu znamená, že terapeuticky efektivní množství účinné látky dospěje na požadované cílové místo, tam vyvine svůj účinek a způsobí fyziologickou reakci. Paliativní a/nebo kurativní efekt je zahrnut.

"Biokompatibilní" ve smyslu tohoto vynálezu znamená, že použité polysacharidy podléhají úplnému biologickému odbourání a nedochází k jejich obohacení v organismu. Jako biologické odbourání se přitom vždy rozumí proces probíhající in vivo, který vede k odbourání nebo k degradaci polymeru. Do této oblasti spadají rovněž hydrolytické nebo enzymatické procesy. Pro biokompatibilitu polysacharidů i produktů jejich odbourání (metabolitů) je v neposlední řadě významný i přírodní charakter použitých polysacharidů. Proto jsou polysacharidy použité podle vynálezu obzvláště vhodné pro terapeutické, diagnostické nebo profylaktické použití. Pojem "farmaceuticky akceptovatelný" ve smyslu tohoto vynálezu znamená, že nosič účinné látky, pomocná látka nebo tak zvaný excipient může být živoucí bytostí přijat, aniž by v organismu vznikaly významné vedlejší účinky.

Výroba tablet se provádí smícháním výchozích složek, přičemž lineární polysacharid se s účinnou látkou známými metodami a homogenizuje se, příkladně s pomocí kulových mlýnů. Účinná látka může mít koncentraci až do 50 %, přičemž výhodná je koncentrace mezi 1 a 20 %, obzvláště výhodně mezi 5 a 15 %. Mohou se použít další obvyklé pomocné látky a přísady. Součet účinné látky a polysacharidu podle vynálezu v celkovém složení (včetně případných pomocných látek a přísad) má činit nejméně 50 %, s výhodou však 70 až 100 %, obzvláště výhodně 85 až 98 %. Složení pomocných látek může kolísat v širokém rozmezí, přičemž jejich poměr ve

složení závisí na vzájemných účincích s účinnou látkou a lineárním polysacharidem nerozpustným ve vodě.

Jako pomocný prostředek se při výrobě tablet stejně jako při předcházejícím míchání mohou použít rozpouštědla, přičemž jsou výhodná snadno těkavá rozpouštědla.

Základním tělesem polysacharidů podle vynálezu k výrobě tablet může být amorfni nebo krystalická podoba nebo zrna, tak jak vznikají přímo při syntéze, nebo také mikročástice, jaké se popisují v patentové přihlášce (DPA, Az : 197 37 481.6). K výrobě surové hmoty nebo surové směsi se s výhodou používá jednoduchá způsob mísení. Způsob výroby tablet může ovlivnit vlastnosti tablety. Příkladně je možné účinnou látku spojit s základním tělesem polysacharidu technikou nastříkání, příkladně způsobem ve vzhledu nebo vytvářením povlaku suspenze na polysacharidech použitých podle vynálezu. Přitom jsou použitelné procesy nasávání, při kterých se využije porézní podoba mikročástic, aby se tak nasála účinná látka v roztoku (charakter houby), nebo techniky rozstřikovacího sušení. Přitom se roztok, suspenze nebo emulze lineárního polysacharidu a účinné látky vysušuje známými technikami rozstřikovacího sušení. V případě roztoků se použijí odpovídající organická rozpouštědla. Přitom mohou pomoci vyšší teploty nebo tlaky a rovněž nadkritické způsoby, aby se dosáhlo potřebné rozpustnosti v krátkém čase.

Tlaky použité v průběhu výroby tablet mohou kolísat v širokých mezích. Změny tlaků se mohou cíleně využít v případě polysacharidů popaných podle vynálezu k dosažení dodatečně pozitivně působícího retardačního efektu. Tlaky mohou kolísat v širokých mezích od 1 MPa do 10^3 MPa (10^5 Pa

= 1 bar). Výhodné jsou tlaky v rozmezí od 10 MPa do 300 MPa, obzvláště výhodně tlaky od 100 MPa do 250 MPa.

Následující příklady a obrázky slouží k bližšímu vysvětlení vynálezu, aniž by v příkladech uvedené produkty a způsoby provedení jakkoliv omezovaly jeho rozsah.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady se týkají obzvláště výroby mikročástic, jak je popsána v patentové přihlášce (DPA, AZ : 197 37 481.6), na kterou se tímto upozorňuje. Dále se popisuje obzvláště výhodná metoda výroby poly-(1,4-alfa-D- glukanu) ve WO 95/31553.

P ř í k l a d 1

Výroba in-vitro poly-(1,4-alfa-D-glukanu) biokatalytickým procesem s pomocí enzymu amylocukrázy

Do sterilizované 15 l nádoby (sterilace parou) se předloží 10 l 20 %-ního roztoku sacharozy. Enzymový extrakt obsahující amylocukrázu, získaný pomocí fermentace se najednou přidá k roztoku sacharozy. Aktivita enzymu činí 16 jednotek (1 jednotka odpovídá reakci 1 μ mol sacharozy za minutu na mg enzymu). Aparatura se opatří rovněž sterilizovaným míchadlem KPG. Nádoba se uzavře a udržuje při teplotě 40 °C a míchá se. Po nějaké době se vytvoří bílá sraženina. Reakce se ukončí po době 180 hodin. Sraženina se odfiltruje a k odstranění nízkomolekulárních cukrů se opakovaně promyje. Zbytek zůstávající na filtru se vysuší při teplotě mezi 30 a 40 °C v sušárně za použití vakua

membránové pumpy (Firma Vacuubrand GmbH & Co, CVC 2).
Hmotnost činí 685 g (výtěžek 69 %).

P ř í k l a d 2

Charakterizace poly-(1,4-alfa-D-glukanu) syntetizovaného amylocukrázou z příkladu 1 pomocí gelové permeační chromatografie

2 mg poly-(1,4-alfa-D-glukanu) z příkladu 1 se za teploty místnosti rozpustí v dimethylsulfoxidu (DMSO, p.a. firmy Riedel-de-Haen) a zfiltruje se (filtr 2 mm). Část roztoku se injikuje na sloupec gelové permeační chromatografie. Jako eluční prostředek se použije DMSO. Intenzita signálu se měří pomocí RI-detektoru a vyhodnocuje se proti standardu pullulanu (firma Polymer Standard Systems). Průtok činí 1,0 ml za minutu.

Z měření vyplývá číselný střed molekulové hmotnosti (M_n) 2 700 g/mol a vážený střed molekulové hmotnosti (M_w) 11 700 g/mol. To odpovídá disperzitě 4,3.

P ř í k l a d 3

Výroba mikročástic poly-(1,4-alfa-D-glukanu)

400 g poly-(1,4-alfa-D-glukanu) se během jedné hodiny rozpustí ve 2 l dimethylsulfoxidu (DMSO, p.a. firmy Riedel-de-Haen) při teplotě 60 °C. Potom se míchá jednu hodinu při teplotě místnosti. Roztok se v průběhu 2 hodin přikape za míchání kapací nálevkou do 20 l dvakrát destilované vody. Násada se uloží po dobu 40 hodin při teplotě

6 °C. Vytvoří se jemná suspenze. Částice se oddělí tak, že se nejprve dekantuje zbytek. Úsada se odebere a v malých částech se centrifuguje (ultracentrifuga RC5C : vždy 5 minut při 5000 otáčkách za minutu). Pevný zbytek se promyje celkem třikrát dvakrát destilovanou vodou a znovu se centrifuguje. Pevná látka se spojí a suspenze asi 1000 ml se vysuší vymražením (Christ Delta 1-24 KD). Izoluje se 283 g bílé pevné látky (příklad 3a : výtěžek 71 %). Spojené zbytky se při teplotě 18 °C uloží přes noc. Zpracování se porovádí jako je popsáno. Isoluje se dalších 55 g bílé pevné látky (příklad 3b : výtěžek 14 %). Celkový výtěžek činí 85 %.

P ř í k l a d 4

Odsíření mikročástic z příkladu 3

K oddělení dimethylsulfoxidu zůstalého v částicích se postupuje jak je uvedeno dále. 100 g částic amylozy z příkladu 9 se uvede do 1000 ml deionizované vody. Násada se ponechá za lehkého pohybování 24 hodin. Oddělení částic se provádí jako se popisuje v příkladu 9 (ultracentrifuga RC5C : vždy 15 minut, 3000 ot/min). Po vysušení vymražením se získá 98,3 g (výtěžek 98 %). Stanovení síry elementární analýzou poskytuje následující hodnoty (zkušební metoda spálení a detekce IR) :

Obsah síry částic z příkladu 2 : 6 % $\pm$ 0,1 %

Obsah síry částic z příkladu 3 : < 0,01 %

P ř í k l a d 5

Vyšetření mikročástic z příkladu 3 pomocí elektronové

mikroskopie

K charakterizaci částic se provedou snímky elektronovým rastrovacím mikroskopem (REM) (Camsan S-4). Obrázky 1 a 2 ukazují snímky částic, které dokládají, že se jedná o sférické, velmi jednotné částice z hlediska tvaru, velikosti a drsnosti povrchu.

P ř í k l a d 6

Vyšetření rozdělení velikosti částic z příkladu 3

K charakterizaci rozdělení velikosti částic z příkladů 1 a 9 se provede zkoušení pomocí přístroje Mastersizer (firma Malvern Instruments). Zkoušení se provádí v modu Fraunhofer (vyhodnocení : multimodální, počet) s hustotou $1,080 \text{ g/cm}^3$ a objemovou koncentrací v rozmezí 0,012 % až 0,014 %.

Tabulka 1

Charakterizace průměru mikročástic z příkladu 3

Př.	P r ů m ě r			Rozdělení částic		
	$D_n^1 (\text{mm})$	$D_w^2 (\text{mm})$	d_w/d_n^3	$d(10\%)^4 (\text{mm})$	$d(50\%)^5 (\text{mm})$	$d(90\%)^6 (\text{mm})$
3a	1,664	4,184	2,541	0,873	1,504	2,624
3b	0,945	2,345	2,481	0,587	0.871	1,399

¹ d_n číselný průměr průměrů

² d_w vážený průměr průměrů

- ³ dw/dn disperzita průměru částic
⁴ $d(10\%)$ 10 % všech částic má menší průměr než uvedená hodnota
⁵ $d(50\%)$ 50 % všech částic má menší průměr než uvedená hodnota
⁶ $d(90\%)$ 90 % všech částic má menší průměr než uvedená hodnota

P ř í k l a d 7

Obecný způsob výroby tablet z mikročástic obsahujících poly-(1,4-alfa-D-glukan)

V kulovém mlýnu (firma Retsch MM2000) se po dobu 10 minut při amplitudě 100 (údaj výrobce) mele 270 mg pomocné látky k výrobě tablet (poly-(1,4-alfa-D-glukan)) a 30 mg účinné látky. Z homogenizované dávky se odebere 250 mg a převede se do lisovacího nástroje (Perkin Elmer; průměr razidla 13 mm). Lisovací nástroj se umístí pod lis (firma Perkin Elmer, hydraulický lis). Následně se hmota vylisuje tlakem 2 t po dobu 10 minut. Po odtlačování aparátu se hotové tablety opatrně vyjmou a uchovávají se pro další charakterizaci, příkladně měření stability nebo zkoušky uvolňování.

Dále budou pro účely srovnání připraveny tablety ze známých materiálů pro přípravu tablet (srovnávací příklady) jako mikrokrytalická celuloza (AvicelTM), bramborový škrob (ToffenaTM-Südtärke) a rovněž polyakryláty (EudragiteTM-Rhöm).

P ř í k l a d 8

Stanovení uvolňování účinné látky v závislosti na čase

Rozvolňování tablet vyrobených podle příkladu 7 se stanovuje jak je uvedeno dále. Jedna tableta se vloží do 25 ml vody (deionizovaná voda) v 50 ml Erlenmayerově baňce. Hrdlo se zakryje parafilmem. Baňka se upevní na třepačku (firma IKA Labortechnik; KS 125 basic). Třepačka se provozuje při nastavení asi 150/minuta. Po určité době se ze zbytku vzniklého roztoku odebírají vzorky asi 1,5 ml. Z tohoto objemu se převede dostatečné množství do kyvety pro jedno použití (firma Sarstedt No. 67.741) a měří se na spektrometru (firma Kontrom Instruments, Uvikon 860). Pro jednotlivé účinné látky nebo modelové substance platí uvedená absorpční maxima.

P ř í k l a d 9

Absorpční maxima dalších účinných látek

Absorpční maxima dalších účinných látek se stanovují jako v příkladu 10. Všechny uvedené účinné látky vedou ke srovnatelným výsledkům při pozorování retardačního efektu, z čehož lze zpětně vyvozovat závěry z hlediska mnohostrannosti možného použití.

Tabulka 2

Absorpční maxima rozdílných vyšetřovaných účinných látek

Účinná látka	Absorpční maximum
Vitamin B 12	549 nm ²
Theophyllin	271 nm ³
Ramorelix TM	276 nm ³
Kofein	272 nm ³
Iloperidon	274 nm ³
Buserelin ¹	278 nm ³
Minoclinhydrochlorid	278 nm ³
Tetracyklinhydrát	269 nm ³
Phenylephrin	272 nm ³

¹Struktura: 5-oxo-L-prolyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-torosyl-P-terc.butyl-D-seryl-L-leucil-L-arginyl-N-ethyl-L-prolinamid

²Kyveta pro jedno použití (firma Sarstedt No. 67.741)

³Křemenná kyveta (firma Hellma, Suprasil^R)

P ř í k l a d 10

Sejmutí cejchovací křivky pro účinnou látku na příkladu modelové sloučeniny vitamin B 12

1 % základní roztok se připraví navážením 100 mg vitaminu B 12 do 10 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou až po značku cejchu. Z něj se připraví zředovací řada o koncentracích 0,005 %, 0,01 % a 0,02 % a měří se ve spekt-

rometru (firma Kontrom Instruments, Uvikon 860). Extinkce se odečítají při absorpčním maximu $\lambda = 549$ nm. Další měřicí body jsou potřebné tehdy, jestliže jsou patrné odchylky od přímky. Tyto cejchovací přímky slouží jako výchozí bod pro stanovení koncentrace ve zbytku z pokusu na uvolňování účinné látky. Při snímání cejchovacích křivek dalších účinných látek a modelových substancí se postupuje při získávání dat analogickým způsobem. Grafické znázornění cejchování pro vitamin B 12 (extinkce ve vodě v závislosti na koncentraci) ukazuje obrázek 3.

P ř í k l a d 11

Pokusy uvolňování vitaminu B 12 z tablet vyrobených s poly-(1,4-alfa-D-glukanem) a z mikročástic z něj

Stejně jako se popisuje v příkladu 10 se měří po určité době extinkce zbytku z pokusu uvolňování in vitro. Aby se z extinkce změřené podle cejchovací křivky dospělo k odpovídajícím koncentracím, může být nutné zředit zbytky v poměru 1 : 10. Tento faktor se potom odpovídajícím způsobem zohlední.

Hodnoty jsou přehledně uvedeny v Tabulce 3. Na odpovídajícím obrázku 4 jsou hodnoty znázorněny graficky. Maximální možná koncentrace - podle příkladu 8 je to 0,1 % - se k přehlednějšímu znázornění porovnává s hodnotou 100 %, takže je tak možné ohodnocení, jakého stupně uvolnění se po jaké době dosáhne.

Tabulka 3

Hodnoty koncentrací vodného zbytku v závislosti na čase pro pomocné materiály pro výrobu tablet popsané podle vynálezu poly-(1,4-alfa-D-glukan) a mikročástice z něj vyrobené.

Je ukázáno uvolňování vitamínu B₁₂ z tablet vyrobených s různými pomocnými látkami :

a) poly-(1,4-alfa-D-glukan)

b) mikročástice z poly-(1,4-alfa-D-glukanu)

	Pomocný prostředek k výrobě tablety					
Hodiny ¹	A ²	A ²	A ²	B ³	B ³	B ³
0	0	0	0	0	0	0
0.5	5.44	2.33	4.91	3.97	3.52	3.14
1	6.74	4.87	5.94	4.03	3.74	3.89
2	11.45	7.57	8.18	6.52	5.72	5.63
3.5	24.45	15.32	19.57	14.22	9.43	11.19
6	35.26	26.11	30.36	20.37	17.23	18.92
8	41.14	27.20	36.38	23.71	17.77	22.94
10	43.28	34.78	36.38	26.12	21.90	22.94
24	60.90	55.02	67.08	33.23	31.07	39.92
32	63.83	61.21	74.96	35.70	28.13	46.83
48	75.27	64.30	87.17	38.18	33.38	53.17

¹Doba uvolňování v hodinách

²Poly-(1,4-alfa-D-glukan)

³Mikročástice z poly-(1,4-alfa-D-glukanu)

P ř í k l a d 12

Pokusy uvolňování vitamínu B 12 z tablet vyrobených z mikrokrytalické celulozy (AvicelTM) a bramborového škrobu ToffenaTM) (srovnávací příklady)

Výsledky uvedené v tabulce 4 byly změřeny a vypočteny stejně jako se popisuje v příkladu 11. Obrázek 8 znázorňuje ve srovnání výsledky s pomocnou látkou pro výrobu tablet popsanou podle vynálezu poly-(1,4-alfa-D-glukan) vůči srovnávací substanci mikrokrytalické celuloze (AvicelTM) a bramborovému škrobu ToffenaTM). Retardační efekt je zde zřetelně rozpoznatelný.

Tabulka 4

Hodnoty koncentrací vodného zbytku v závislosti na čase pro srovnávací substance mikrokrytalickou celulozu (AvicelTM) a bramborový škrob (ToffenaTM)

	Pomocný prostředek k výrobě tablety					
Hodiny ¹	Avicel ²	Avicel ²	Avicel ²	Škrob ³	Škrob ³	Škrob ³
0	0	0	0	0	0	0
0.5	6.99	6.51	4.81	7.99	12.18	93.97
1	13.38	14.84	17.68	74.65	33.54	74.34
2	34.31	22.30	26.12	77.28	39.57	77.28
3.5	52.40	31.53	37.51	76.51	65.07	91.14
6	65.53	43.89	50.54	78.98	69.86	84.70
8	75.12	52.40	57.50	78.98	77.43	80.53
10	77.13	67.23	57.50	78.98	84.08	80.53
24	78.36	84.70	95.05	83.15	87.48	87.79
32	72.80	81.92	100	80.53	85.32	87.48
48	79.75	84.39	100	84.08	82.07	87.48

¹Doba uvolňování v hodinách

²mikrokrytalická celuloza AvicelTM

³bramborový škrob ToffenaTM

Na obrázku 5 je znázorněno uvolňování vitamínu B₁₂ z tablet s různými pomocnými látkami :

a) poly-(1,4-alfa-D-glukan)

b) mikročástice z poly-(1,4-alfa-D-glukanu)

c) mikrokrytalická celuloza AvicelTM (srovnávací příklad) a

d) bramborový škrob Toffena TM (srovnávací příklad)
(K přehlednému znázornění byly střední hodnoty uvedené v tabulkách 3 a 4 vypočteny).

P ř í k l a d 13

Pokusy uvolňování theofylinu z tablet vyrobených
z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a z mikročástic z něj

Pokusy uvolňování theofylinu z tablet sestávajících z různých pomocných látek k výrobě tablet se provádí stejně jako se popisuje v příkladu 12. Jako pomocná látka se používá poly-(1,4-alfa-D-glukan), který se získá přímo z procesu biokatalyzy odpovídajícím zpracováním (srovnej příklad 1), a rovněž mikročástice z poly-(1,4-alfa-D-glukanu). Výsledky jsou znázorněny na obrázku 6. Provádí se vždy dvojí stanovení, které prokazuje vysokou reprodukovatelnost výsledků.

P ř í k l a d 14

Pokusy uvolňování theofylinu z tablet vyrobených z

- c) mikrokrytalické celulozy (Avicel TM),
- d) Eudragit RS TM a
- e) Eudragit RLTM (srovnávací příklady)

Pokusy uvolňování theofylinu z tablet sestávajících ze srovnávacích pomocných látek pro výrobu tablet se provádí stejně jako se popisuje v příkladu 14. Jako pomocné látky pro výrobu tablet se použijí mikrokrytalická celuloza (Avicel TM), Eudragit RS TM a Eudragit RLTM. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 6. Bylo prováděno dvojí stanovení.

Na obrázku 6 jsou ve srovnání znázorněny profily uvolňování z příkladu 13.

Obrázek 6 ukazuje uvolňování theofylinu z tablet s rozdílnými pomocnými látkami :

- a) poly-(1,4-alfa-D-glukan) ,
- b) mikročástice z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) ,
- c) mikrokryсталická celuloza (AvicelTM) ,
- d) Eudragit RSTM a
- e) Eudragit RLTM.

P ř í k l a d 15

Pokusy uvolňování z theofylinových tablet sestávajících z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a rovněž mikročástic z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a mikrokryсталické celulozy (AvicelTM) (srovnávací příklad) v umělé žaludeční šťávě

Pokus uvolňování theofylinu z tablet s pomocnou látkou k výrobě tablet poly-(1,4-alfa-D-glukan) (vč. mikročástic z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a mikrokryсталické celulozy (AvicelTM) v umělé žaludeční šťávě se provádí stejně jako se popisuje v příkladu 8 (umělá žaludeční šťáva : 2 g chloridu sodného, 3,2 g pepsinu, 7 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl_{aq}), doplněné na jeden litr celkového objemu deionizovanou vodou). Také při použití media, které odpovídá přirozeným podmínkám je možné pozorovat reprodukovatelný způsob retardačního efektu při uvolňování.

Obrázek 7 zobrazuje uvolňování theofylinu z tablet různých pomocných látek :

- a) poly-(1,4-alfa-D-glukanu) ,

- b) mikročástic z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a
 - c) mikrokryсталické celulozy (AvicelTM)
- (srovnávací příklad).

P ř í k l a d 16

Pokusy uvolňování z theofylinových tablet sestávajících z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a mikročástic z něj vyrobených

Pokusy uvolňování RamorelixTM se provádějí stejným způsobem jako v dosud uvedených příkladech. V případě RamorelixTM se jedná o antagonistu LHRH s následující sekvencí aminokyselin (struktura) :

1-N-(acetyl-3-(2-naftyl)-D-alanyl-p-chloro-D-fenylalanyl-D-tryptofyl-L-seryl-L-tyrosyl-O-(6-deoxy-alfa-L-mannopyranosyl)-D-seryl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl)semikarbazidacetát. Jako uvolňovací medium však byla místo deionizované vody (E-voda) použita umělá žaludeční šťáva. Receptura umělé žaludeční šťávy je : 2 g chloridu sodného, 3,2 g pepsinu, 7 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl_{aq}), doplněné na jeden litr celkového objemu deionizovanou vodou. pH roztoku činí 1,2.

P ř í k l a d 17

Pokus uvolňování z tablet RamorelixTM sestávajících z mikrokryсталické celulozy (AvicelTM) (srovnávací příklad)

Pokusy uvolňování se provádějí stejně, jako se popisuje v příkladu 8. Jako uvolňovací medium slouží umělá žaludeční šťáva.

Obrázek 8 ukazuje uvolňování RamorelixTM z tablet s rozdílnými pomocnými látkami :

- a) poly-(1,4-alfa-D-glukan),
- b) mikročástice z poly-(1,4-alfa-D-glukanu) a
- c) mikrokryсталická celuloza (AvicelTM) (srovnávací příklad).

P ř í k l a d 18

Stanovení rozpustnosti polysacharidů

100 mg poly-(1,4-alfa-D-glukanu) se vloží do 5 ml dvojnásobně destilované vody. Reakční nádoba se za míchání (magnetické míchadlo) pomalu zahřeje. Postupně se v programu s dvacetistupňovými kroky zahřívá a vizuálně pozoruje. Při teplotách 40 °C, 60 °C, 80 °C a 100 °C se nepozorují žádné změny. Podle těchto pozorování je možné sloučeninu zařadit jako "ve vodě nerozpustnou".

P ř í k l a d 19

Stanovení rozpustnosti polysacharidů a klasifikace podle německého lékopisu (DAB)

564 mg poly-(1,4-alfa-D-glukanu) se zahřívá v asi 0,5 l dvakrát destilované vody při tlaku 0,13 MPa a teplotě 130 °C po dobu 1,5 hodiny v autoklávu (aparát Certoclav). Předem se zjistí hmotnost reakční nádoby. Potom se aparatura odtlakuje a při teplotě místnosti se ochladí. Obsah se zváží. Odpovídá 501,74 g. Po dalších 24 hodinách se odstředí a dekantuje. Pevný zbytek se vysuší a zváží : 468 mg. Z toho se vypočte rozpuštěný podíl 96 mg. Vztaženo na použité rozpouštědlo se z toho vypočítá, že na 1 mg poly-(1,4-alfa-D-glukanu) je zapotřebí 5 226 mg vody. Podle klasifikace německého lékopisu z toho vyplývá zařazení jako

"velmi špatně rozpustný", protože je potřeba mezi 1 000 a 10 000 díly rozpouštědla k rozpuštění 1 dílu substance. To je ze 7 tříd ke klasifikaci rozpustnosti (od "velmi snadno rozpustný" (třída 1) až po "prakticky nerozpustný" (třída 7) třída číslo 6.

P ř í k l a d 20

Stanovení rozpustnosti polysacharidů a klasifikace podle německého lékopisu (DAB)

Pokus se provádí stejně jako se popisuje v příkladu 19. Jediný rozdíl tvoří proces chlazení, který se zařazuje po zpracování v autoklávu a ochlazení na teplotu místnosti. Směs látek se uchovává po dobu 3 hodiny při teplotě 5 °C.

K asi 480 ml dvakrát destilované vody se naváží 526 mg poly-(1,4-alfa-D-glukanu). Po tepelném zpracování činí vývažek 468,09 g. Vysušený sediment má hmotnost 488 mg. Podle toho do roztoku přešlo 38 mg poly-(1,4-alfa-D-glukanu). To odpovídá poměru 1 mg substance ku 12 318 dílů rozpouštědla. Podle toho se substance řadí při tomto způsobu zpracování do třídy 7 německého lékopisu a podle něj se klasifikuje jako prakticky nerozpustná, protože se na 1 díl substance potřebuje více jak 10 000 dílů rozpouštědla.

KLUB VŠETČKA
servis
220 00 PRAHA 2, MÁKOVÁ 2

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Retardované tablety, obsahující zcela nebo částečně nejméně jeden ve vodě nerozpustný lineární polysacharid jako retardační materiál.
2. Retardované tablety podle nároku 1, obsahující zcela nebo částečně nejméně jeden ve vodě nerozpustný lineární polysacharid, který se vyrobí biotechnologickým způsobem.
3. Retardované tablety podle nároku 1, obsahující zcela nebo částečně nejméně jeden ve vodě nerozpustný lineární polysacharid, který se vyrobí biokatalytickým procesem.
4. Retardované tablety podle nároku 1, obsahující zcela nebo částečně nejméně jeden ve vodě nerozpustný lineární polysacharid, který se vyrobí fermentačním procesem.
5. Retardované tablety, získatelné z lineárního ve vodě nerozpustného polysacharidu.
6. Retardované tablety podle některého z nároků 1 až 5, obsahující zcela nebo částečně nejméně jeden ve vodě nerozpustný lineární poly-(1,4-alfa-D-glukan).
7. Retardované tablety podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že ve vodě nerozpustné lineární polysacharidy jsou zcela nebo částečně ve formě mikročástic.
8. Retardované tablety podle jednoho nebo několika z ná-

roků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jsou biokompatibilní a/nebo farmaceuticky akceptovatelné.

9. Použití retardovaných tablet podle jednoho nebo několika nároků 1 až 8 k řízenému uvolňování účinných látek.

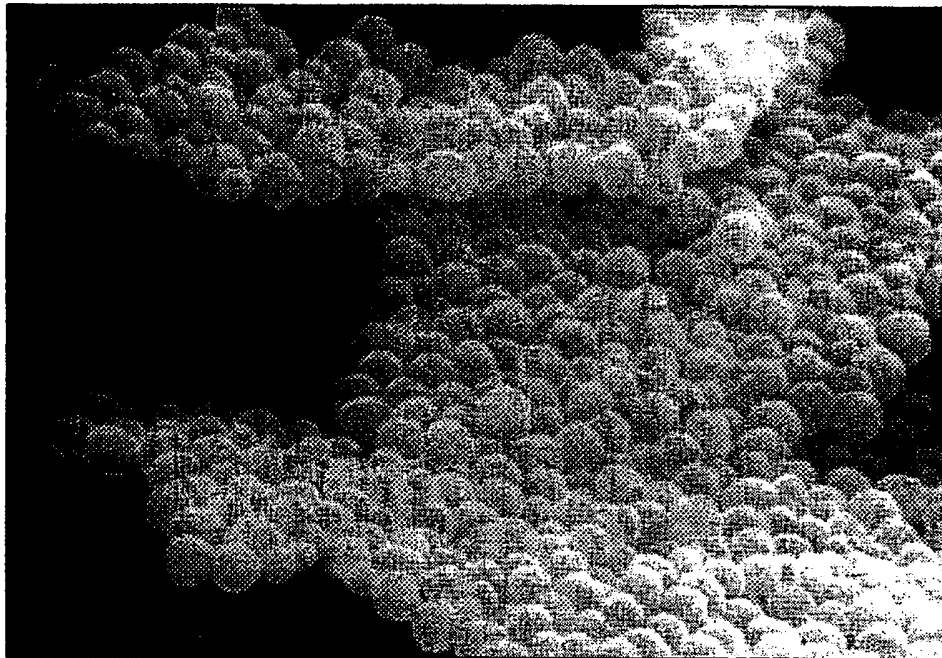
10. Retardované tablety podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9, obsahující jednu nebo několik účinných látek a případně další přísady a pomocné látky.

11. Retardované tablety podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vyvolávají jako farmaceutické přípravky terapeutický efekt.

12. Použití retardovaných tablet podle některého z nároků 1 až 11 jako formulací, s výhodou jako orálních aplikačních forem.

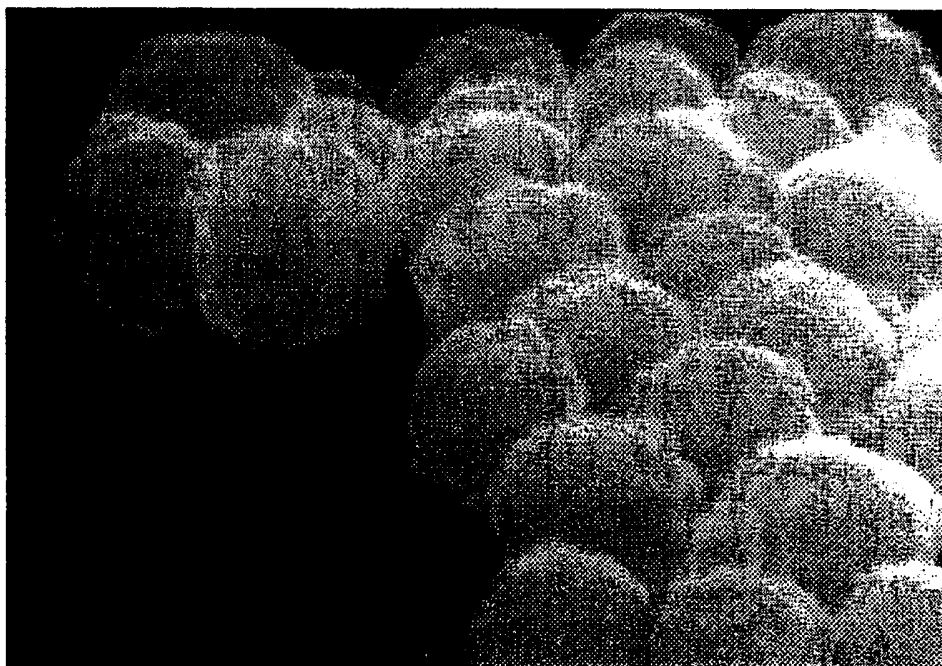
1/5

obr. 1



3 μm

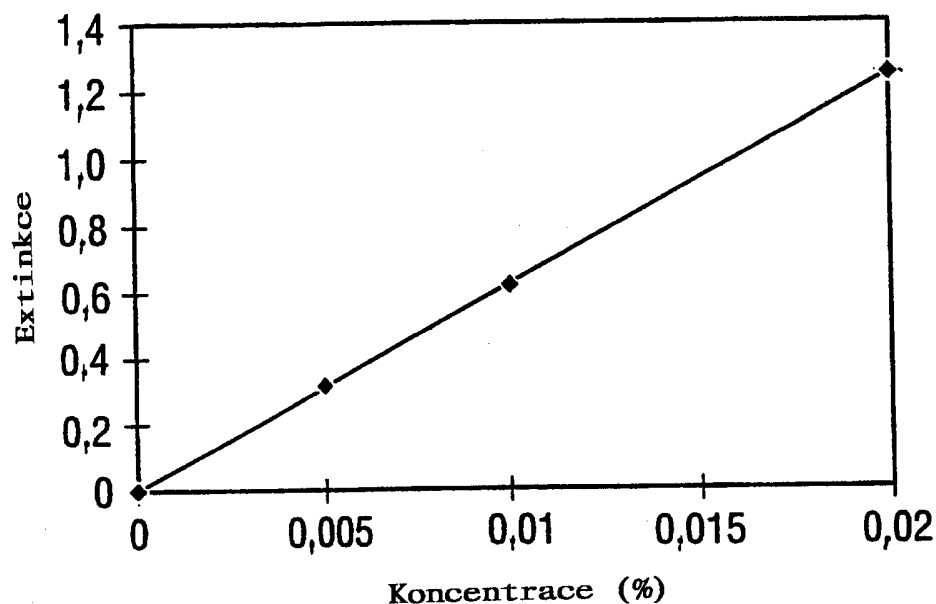
obr. 2



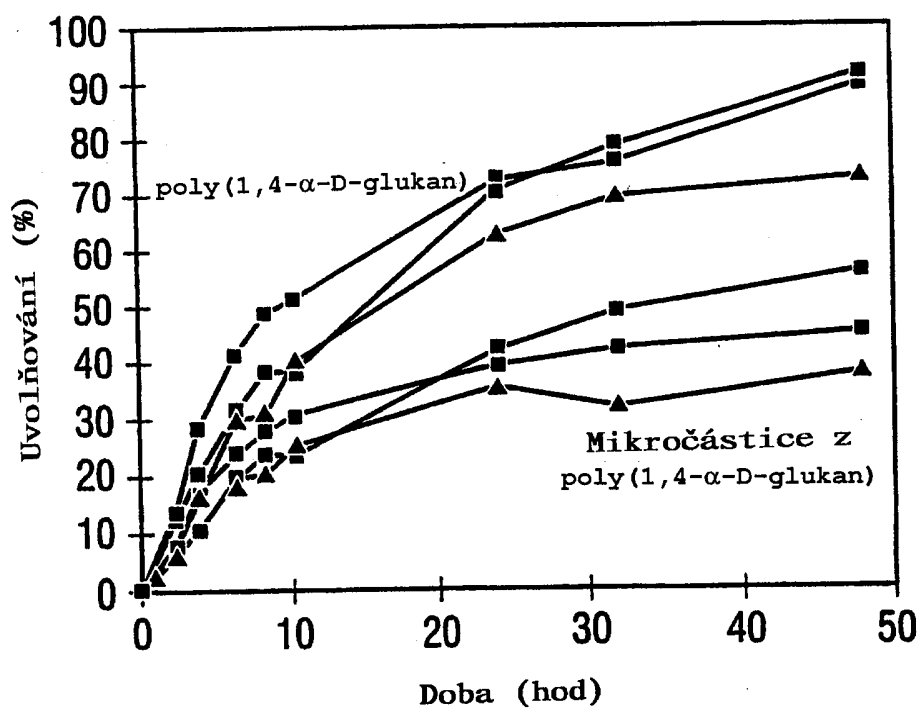
1 μm

2/5

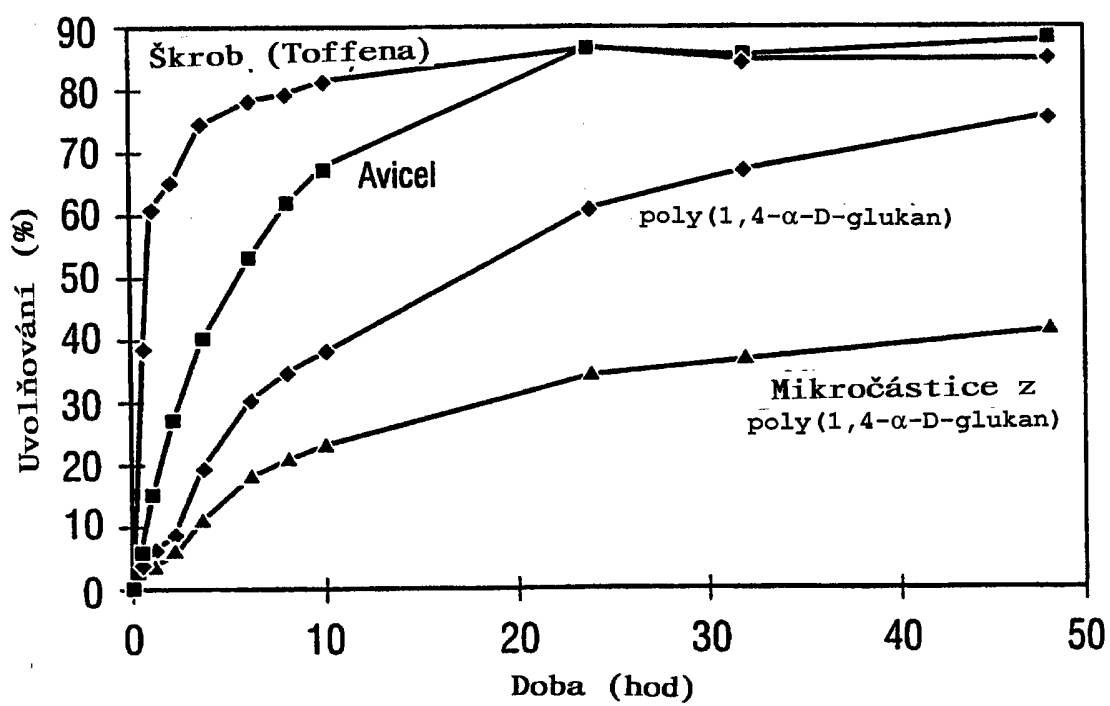
obr. 3



obr. 4

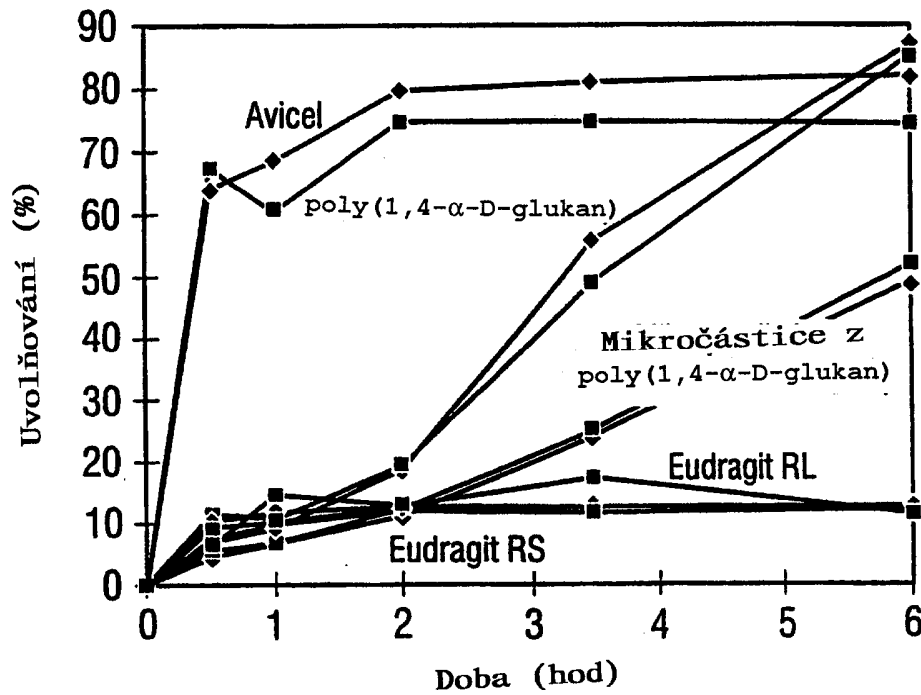


obr. 5

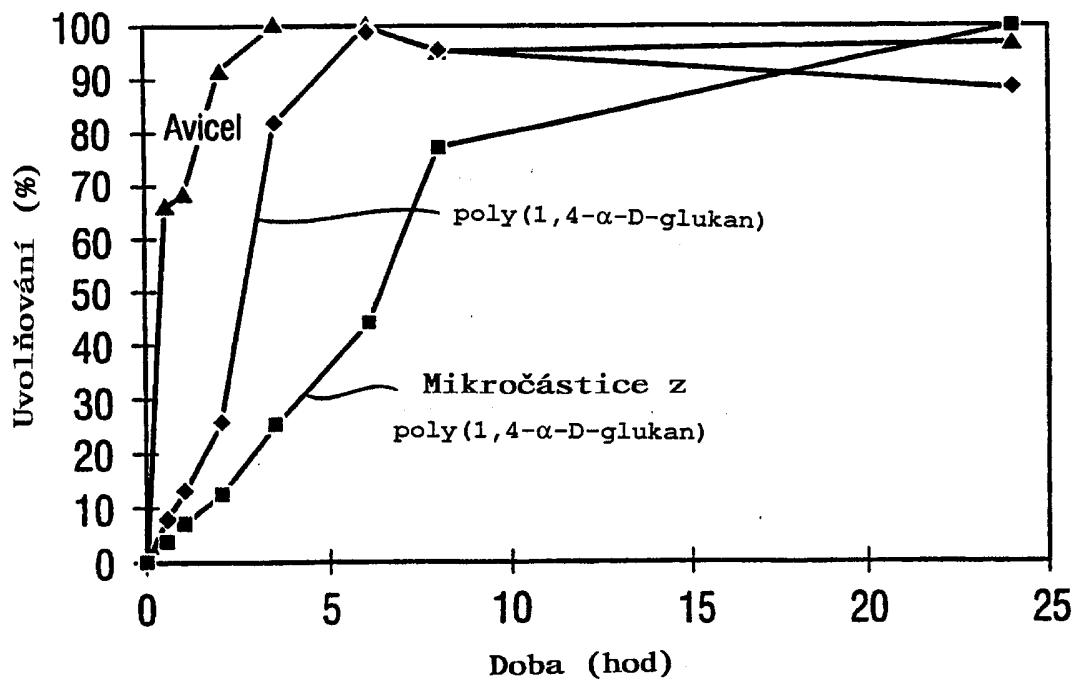


4 / 5

obr. 6



obr. 7



obr. 8

