

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 357

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-212**
(22) Přihlášeno: **04.04.2019**
(40) Zveřejněno: **17.06.2020**
(Věstník č. 25/2020)
(47) Uděleno: **07.05.2020**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **17.06.2020**
(Věstník č. 25/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
P. Šalamúnová et al.: 95ab: "Glucane Particles As Potential Carriers of Natural Flavonoids for Treatment of Idiopathic Inflammation Diseases" 8th World Congress on Particle Technology, Orlando 2018, <https://aiche.confex.com/aiche/wcpt18/meetingapp.cgi/Paper/508510>; P. Šalamúnová et al.: 97a: "Preparation of Glucan Microparticles with Curcumin for Treatment of Idiopathic Inflammation Diseases" 8th World Congress on Particle Technology, Orlando 2018, <https://aiche.confex.com/aiche/wcpt18/meetingapp.cgi/Paper/509046>; I. Saloň et al.: "Suspension stability and diffusion properties of yeast glucan microparticles" Food and Bioprocess Processing 99, 128-235 (2016).

(73) Majitel patentu:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, Dejvice, CZ

(72) Původce:
Ruphuy Chan Gabriela, Praha 8, Libeň, CZ
prof. Ing. František Štěpánek, Ph.D., Praha 4,
Lhotka, CZ
Mgr. Jaroslav Hanuš, Ph.D., Praha 10, Strašnice,
CZ
Mgr. Petra Šalamúnová, Banská Bystrica-Šalková,
974 01, SK
Mgr. Ivan Saloň, Jarabina, 065 31, SK

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
**Způsob výroby kompozitu beta-
glukanových částic s inkorporovaným, ve
vodě špatně rozpustným, léčivem,
farmaceutický přípravek a jejich použití**

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká kompozitu a způsobu výroby kompozitu, jedná se o kompozit beta-glukanové částice s inkorporovaným, ve vodě špatně rozpustným, léčivem, které má rozpustnost ve vodě 30 mg/ml nebo méně, měřeno při teplotě 37 °C a pH 1 až 8, přičemž hmotnostní poměr ve vodě špatně rozpustného léčiva k beta-glukanové částici je v rozmezí od $0,1 \cdot 10^{-3}$ do 3. Ve vodě špatně rozpustné léčivo se rozpustí v organickém rozpouštědle, vybraném ze skupiny zahrnující ethanol, methanol, aceton, dichlormethan, trichloromethan, chloroform, isopropanol, hexan, heptan, cyklohexan, toluen nebo jejich směsi včetně směsi s vodou, a beta-glukanové částice se přidají do roztoku léčiva za vzniku suspenze, která se následně usuší rozprašováním v plynné atmosféře za vzniku kompozitu beta-glukanové částice s příslušným léčivem.

CZ 308357 B6

Způsob výroby kompozitu beta-glukanových částic s inkorporovaným, ve vodě špatně rozpustným, léčivem, farmaceutický přípravek a jejich použití

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká formulace kompozitů obsahujících beta-glukanové částice (glucan particles, GP), s výhodou kvasinkového původu, a ve vodě nerozpustná nebo špatně rozpustná léčiva. Kompozity mohou vykazovat různé stupně krystalinity v závislosti na formulaci a v důsledku toho lze řídit kinetiku rozpouštění. Beta-glukanové částice kvasinkového původu se používají jako nosiče pro zapouzdření a amorfizaci ve vodě nerozpustných nebo špatně rozpustných léčiv, přičemž amorfní přípravky vykazují vyšší rychlosti rozpouštění a tudíž i lepší biologickou dostupnost léčiva. Předkládaný vynález se dále týká způsobu přípravy kompozitů technikou rozprašovacího sušení a jejich použití.

15

Dosavadní stav techniky

Špatná rozpustnost léčiv, a s tím související nízká rychlost rozpouštění ve vodných gastrointestinálních tekutinách, je jednou z nejčastějších příčin nízké biologické dostupnosti, hlavně v případě lékových forem pro orální aplikaci, což je nejčastější a nejpohodlnější způsob podávání. Vzhledem k tomu, že 90 % léčiv nacházejících se ve fázi objevu a více než 40 % léčiv schválených pro trh je ve vodě nerozpustných nebo špatně rozpustných, soustředí se farmaceutický průmysl na vývoj strategií pro zlepšení rozpustnosti léčiv ve vodě.

25

Jedna z nejslibnějších metodik zlepšování rozpustnosti léčiva spočívá ve vývoji léčiva jako amorfni pevné látky. Ve srovnání se svým krystalickým protějškem vykazuje amorfni forma vyšší vnitřní energii a v důsledku toho i lepší termodynamické vlastnosti, včetně lepší rozpustnosti, než krystalická forma. Amorfni forma léčiva je však často nestabilní a má tendenci konvertovat na krystalický stav, který má nižší vnitřní energii. Nevýhodami současného stavu techniky jsou tedy nízká rozpustnost většiny léčiv, nízká stabilita jejich amorfni formy a sklon ke konverzi na ještě méně rozpustnou krystalickou formu. Jedním ze způsobů, jak překonat výše uvedené nevýhody, je vpravení léčiva do amorfni nosičů, obvykle polymerů. Výsledné kompozity jsou známy jako amorfni pevné disperze - *disperze* léčiva v amorfni polymerní matici.

35

Glukanové částice (glucan particles, GP) jsou duté a porézní mikrokuličky získané z buněčné stěny pekařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, převážně složené z polysacharidů (> 85 % β -glukanů). Protože jsou získány z mikroorganismů, mohou je receptory rozpoznávající molekulární motivy imunitních buněk hostitele rozpoznat a spustit imunitní reakce (Samuelsen, A.B.C., J. Schrezenmeir, and S.H. Knutsen, *Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review*. Molecular Nutrition & Food Research, 2014. **58**(1): s. 183-193). Z tohoto důvodu jsou glukanové částice obzvláště zajímavé jako biotempláty pro zapouzdření a transport léčiv cílený na makrofágy.

45

Široká škála vodorozpustných látek, včetně peptidů, siRNA a DNA, byla úspěšně zapouzdřena do glukanových částic pro cílený transport. Navíc byly ve vodě rozpustné bioaktivní molekuly se zvyšujícími se molekulovými hmotnostmi zapouzdřeny do beta-glukanových částic za účelem studia stability suspenze a difúzních vlastností.

50

Rozprašovací sušení je dobře zavedená technika, která byla úspěšně použita pro výrobu amorfni pevných disperzí. Obvykle se léčivo a polymerní nosič rozpustí ve vhodném společném rozpouštědle. Tento roztok se potom nastříkne do sušicí komory, ve které se rozpouštědlo odpaří za vzniku amorfni kompozitních částic, které se dále oddělí a odeberou. Zapouzdření ve vodě rozpustných aromatických látek ve zbytkových buňkách kvasinek

55

- technikou rozprašovacího sušení popsali Sultana, A., et al., *Microencapsulation of flavors by spray drying using Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Engineering, 2017. **199** (Supplement C): s. 36-41. Dostupné publikace jsou zaměřeny na použití techniky rozprašovacího sušení jako posledního kroku při přípravě beta-glukanových částic kvasinkového původu.
- 5 Srovnávací studie prokázaly, že oproti jiným technikám sušení vede rozprašovací sušení ke zlepšeným výsledným vlastnostem glukanových částic. Glukanové částice sušené rozprašováním lze naplnit účinnými látkami; Upadhyay, T.K., et al., *Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages*. EXCLI journal, 2017. **16**: s. 210-228., zabudovali rifabutinové nanoprecipitáty
- 10 inkubací glukanových částic sušených rozprašováním v rifabutinovém kyselém vodném roztoku s následným vysrážením léčiva po přidání Tris pufru.

Podstata vynálezu

- 15 Formulace předkládaného vynálezu a způsob jejich přípravy pomocí rozprašovacího sušení představují nové kompozity na bázi GP s řízenou kinetikou rozpouštění ve vodě nerozpustných nebo špatně rozpustných léčiv. Tyto nové kompozity překonávají nevýhody dosavadního stavu techniky a představují částice se zlepšenými tokovými vlastnostmi prášku a zlepšenou
- 20 dispersibilitou ve vodě, které umožňují zlepšit biologickou dostupnost ve vodě nerozpustných a/nebo špatně rozpustných léčiv.

- Vynález se tedy týká nových kompozitů beta-glukanových částic kvasinkového původu a farmakologicky účinných látek, které jsou nerozpustné nebo špatně rozpustné ve vodě nebo ve
- 25 vodných roztocích. Špatnou rozpustnost ve vodě pro účely předkládaného vynálezu lze definovat jako 30 mg/ml nebo méně, měřeno při 37 °C, ve vodě/vodných roztocích s pH v rozpětí hodnot 1 až 8, což odpovídá rozpětí pH, které se nachází v gastrointestinálním traktu. Vynález také poskytuje způsob výroby těchto kompozitů technikou rozprašovacího sušení, farmaceutickou kompozicí obsahující tyto kompozity a jejich použití.

- 30 Předmětem předkládaného vynálezu je tedy způsob výroby kompozitu beta-glukanové částice, s výhodou kvasinkového původu, s inkorporovaným jedním nebo více ve vodě špatně rozpustným léčivem, přičemž toto ve vodě špatně rozpustné léčivo má rozpustnost ve vodě 30 mg/ml nebo méně, měřeno při teplotě 37 °C (pH 1 až 8), a hmotnostní poměr ve vodě špatně rozpustného
- 35 léčiva k beta-glukanové částici kvasinkového původu je v rozmezí od $0,1 \cdot 10^{-3}$ do 3, výhodně od 0,1 do 2, výhodněji od 0,2 do 1 a nejvýhodněji od 0,25 do 0,5, přičemž:

- i) ve vodě špatně rozpustné léčivo nebo jejich směs se rozpustí v organickém rozpouštědle, vybraném ze skupiny zahrnující ethanol, methanol, aceton, dichlormethan, trichloromethan,
- 40 chloroform, isopropanol, hexan, heptan, cyklohexan, toluen nebo jejich směsi, včetně případné směsi s vodou, s výhodou v koncentraci do 150 mg/ml, výhodněji od 0,5 do 20 mg/ml;

- ii) beta-glukanové částice se přidají do roztoku z kroku i) za vzniku suspenze, výhodně s výslednou koncentrací 200 mg až 4 g beta-glukanových částic na 100 ml roztoku z kroku i),
- 45 výhodněji s koncentrací od 500 mg do 3 g beta-glukanových částic na 100 ml roztoku z kroku i), nejvýhodněji s koncentrací od 1 g do 2 g beta-glukanových částic na 100 ml roztoku z kroku i);

- iii) suspenze získaná v kroku ii) se usuší rozprašováním v plynné atmosféře za vzniku kompozitu beta-glukanové částice kvasinkového původu s ve vodě špatně rozpustným léčivem.

- 50 Výsledný kompozit beta-glukanové částice kvasinkového původu se zabudovaným ve vodě špatně rozpustným léčivem obsahuje léčiva ve vodě nerozpustná nebo špatně rozpustná uvnitř a/nebo rovnoměrně dispergované s glukanovými částicemi.

Překvapujícím účinkem vynálezu je tvorba amorfních pevných disperzí na bázi beta-glukanových částic. Inkorporace ve vodě nerozpustných nebo špatně rozpustných léčiv do glukanových částic podporuje amorfizaci léčiv, což má za následek kompozity s vyššími rychlostmi rozpouštění, zlepšenými tokovými vlastnostmi a dispergovatelností ve vodě, a tedy zlepšenou biologickou

5

dostupností léčiva. Jemným doladěním parametrů rozprašovacího sušení a kompozic kompozitů je možné vyrábět přípravky, ve kterých je léčivo obsaženo uvnitř glukanových částic nebo kompozity, ve kterých je léčivo částečně uvnitř a částečně mimo částice, a tak formulovat přípravky s různými rychlostmi rozpouštění a/nebo biologickými odezvami, v závislosti na

10

V jednom provedení předkládaného vynálezu je vstupní teplota rozprašovacího sušení v kroku iii) v rozmezí od 30 do 250 °C, s výhodou je vstupní teplota od 50 do 150 °C, rychlost nástřiku je mezi 1 a 20 mililitry za minutu a průtok sušícího plynu je v rozmezí od 100 do 600 l/hod. Jako sušící plyn lze použít dusík, argon, helium, vzduch nebo jejich směsi.

15

S výhodou jsou beta-glukanové částice připraveny ze *Saccharomyces cerevisiae*. Výhodněji jsou beta-glukanové částice připraveny ze *Saccharomyces cerevisiae* metodou popsanou v Saloň, I., et al., *Suspension stability and diffusion properties of yeast glucan microparticles*. Food and Bioproducts Processing, 2016. 99: s. 128-135. Příprava je založena na sérii alkalických a kyselých proplachování za použití vodného hydroxidu a vodné anorganické kyseliny při teplotě vyšší než 50 °C, následovaných kroky promývání vodou a organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou. Konečný produkt se s výhodou lyofilizuje.

20

V jednom provedení se kvasinka nejprve třikrát podrobí alkalickému proplachování tak, že se 600 ml 1M roztoku NaOH přidá ke 150 g sušeného droždí. Suspenze se zahřeje na 90 °C a míchá se magnetickou tyčinkou po dobu jedné hodiny, pak se suspenze odstředí a supernatant se odstraní. Hodnota pH řídké suspenze získané po alkalickém promývání se upraví na hodnotu mezi 4 a 5 přidáním roztoku HCl (35%). Kyselá suspenze se míchá 2 hodiny při 75 °C, následně se odstředí, aby se odstranil supernatant. Nakonec se suspenze promyje deionizovanou vodou (třikrát), isopropanolem (čtyřikrát) a acetonem (dvakrát), lyofilizuje se po dobu dvou dnů a skladuje v chladničce pro další použití.

25

30

V jednom výhodném provedení předkládaného vynálezu je ve vodě špatně rozpustné léčivo vybrané ze skupiny zahrnující ibuprofen, kurkumin, atorvastatin, diplakon, artemisinin, morusin, epigalokatechin galát, resveratrol, kyselinu acetylsalicylovou a kyselinu ellagovou.

35

Předmětem předkládaného vynálezu je dále kompozit beta-glukanové částice, s výhodou kvasinkového původu, s inkorporovaným, ve vodě špatně rozpustným, léčivem, připravitelný způsobem podle předkládaného vynálezu, přičemž ve vodě špatně rozpustné léčivo má rozpustnost ve vodě 30 mg/ml nebo méně, měřeno při teplotě 37 °C s pH 1 až 8, a hmotnostní poměr ve vodě špatně rozpustného léčiva ku beta-glukanové částici kvasinkového původu je v rozmezí od $0,1 \cdot 10^{-3}$ do 3, výhodně od 0,1 do 2, výhodněji od 0,2 do 1, nejvýhodněji od 0,25 do 0,5.

40

45

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž farmaceutická kompozice, která obsahuje kompozit podle předkládaného vynálezu a dále alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič, vybraný ze skupiny zahrnující plniva, jako jsou cukry, například laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulózoové přípravky a/nebo fosforečnany vápenaté, například trifosforečnan vápenatý, nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, a dále pojiva, jako jsou škroby, například kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulose a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo, pokud je to žádoucí, rozvolňovadla, jako jsou například výše uvedené škroby a dále karboxymethylškrob, zesítěný polyvinylpyrrolidon, kyselina alginová nebo její sůl, jako je například alginát sodný, stabilizátory, excipienty, zejména regulátory tokovosti a kluzné látky,

50

55

například kyselina salicylová, mastek, kyselina stearová nebo její soli, jako je stearat hořečnatý nebo stearat vápenatý, a/nebo polyethylenglykol nebo jeho deriváty.

5 V jednom provedení farmaceutická kompozice dále obsahuje ve vodě špatně rozpustné léčivo v krystalické formě, které není zapouzdřené v glukonových částicích. Ve vodě špatně rozpustné léčivo v krystalické formě je vybráno ze skupiny zahrnující ibuprofen, kurkumin, atorvastatin, diplakon, artemisinin, morusin, epigalokatechin galát, resveratrol, kyselinu ellagovou a amlodipin. Přítomnost amorfního léčiva v glukonové částici a krystalického léčiva mimo
10 glukonovou částici ve farmaceutické kompozici umožňuje nastavit a kontrolovat kinetiku rozpouštění a biologickou dostupnost použitého ve vodě špatně rozpustného léčiva. Výhodněji je léčivo v krystalické formě stejné jako léčivo v amorfním stavu v glukonové částici.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití kompozitu a/nebo farmaceutické kompozice podle předkládaného vynálezu jako léčiva.

15 Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití kompozitu a/nebo farmaceutické kompozice podle předkládaného vynálezu jako léčiva s řízeným uvolňováním.

20 Objasnění výkresů

Obr. 1: Morfologie mikročástic vyrobených v Příkladu 2, vyhodnoceno rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Jeol JCM-5700.

25 Obr. 2: Výtěžnost procesu přípravy kompozitů z Příkladu 2.

Obr. 3: Rentgenová difrakce, hodnocení krystalinity vzorků z Příkladu 2 zaznamenáním difrakčních intenzit vyrobených mikročástic v rozmezí 5° až 50° úhlu 2θ pomocí přístroje PANalytical X'Pert PRO s difraktometrem High Score Plus.

30 Obr. 4: Morfologie mikročástic vyrobených v Příkladu 3, vyhodnoceno rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Jeol JCM-5700. Šipky ukazují kurkumin nalezený mimo glukonové částice.

35 Obr. 5: Kompozity z Příkladu 3 pozorované pomocí optického fluorescenčního mikroskopu při excitaci světlem v modré oblasti (excitace 470 až 490 nm, emise nad 515 nm).

Obr. 6: Kompozity z Příkladu 3 pozorované pomocí konfokálního skenovací laserového mikroskopu při excitaci 488 nm laserem.

40 Obr. 7: Výtěžnost procesu přípravy kompozitů z Příkladu 3.

Obr. 8: Rentgenová difrakce, hodnocení krystalinity vzorků vyrobených v Příkladu 3 zaznamenáním difrakčních intenzit vyrobených mikročástic v rozmezí 5° až 50° úhlu 2θ přístrojem PANalytical X'Pert PRO s difraktometrem High Score Plus.

Obr. 9: Morfologie mikročástic vyrobených v Příkladu 4, vyhodnoceno rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Jeol JCM-5700. Před analýzou SEM byly vzorky potaženy 5 nm vrstvou zlata v rozprašovacím potahovacím zařízení Emitech K550X. Kruhy a
50 šipky ukazují krystaly nalezené ve vzorcích.

Obr. 10: Rentgenové difraktogramy ibuprofenu a glukonových částic připravených rozprašovacím sušením (SD-GP, IBU-GP-0.1, IBU-GP-0.2, IBU-GP-0.5, IBU-GP-1.0, IBU-GP-2.0), hodnocení krystalinity vzorků vyrobených v Příkladu 4 zaznamenáním difrakčních intenzit

připravených mikročástic v rozmezí 5° až 50° úhlu 2θ přístrojem PANalytical X'Pert PRO s difraktometrem High Score Plus.

5 Obr. 11: Kinetika rozpouštění surového mikronizovaného ibuprofenu, kompozitů (IBU+ASA)/GP a surové kyseliny acetylsalicylové, vyrobených podle Příkladu 5.

Obr. 12: Kinetika rozpouštění surového amlodipinu a kompozitů AML/GP vyrobených podle Příkladu 6.

10 Obr. 13: Porovnání smáčitelnosti a disperze kompozitů IBU/GP (levá lahvička) vyrobených podle Příkladu 7 a surového ibuprofenu (pravá lahvička), ihned po kontaktu s vodou (a) a s mírným protřepáním po 5 minutách (b).

15 Obr. 14: Kinetika rozpouštění surového mikronizovaného ibuprofenu, kompozitů IBU/GP a jejich směsi, vyrobených podle Příkladu 7.

Obr. 15: Výsledky práškové reologie pro surový atorvastatin, kompozity ATO/GP vyrobené rozprašovací sušením a rotačním odpařením podle příkladu 8: (a) Surový atorvastatin; (b) ATO/GP-RE; (c) ATO/GP-SD.

20

Příklady uskutečnění vynálezu

25 Vynález je dále ilustrován následujícími příklady, ale není omezen pouze na ně.

Příklad 1: *Obecný způsob přípravy kompozitů beta-glukanových částic kvasinkového původu a ve vodě špatně rozpustného léčiva*

30 Kompozity beta-glukanových částic a ve vodě špatně rozpustných léčiv podle předkládaného vynálezu byly vyrobeny rozprašovací sušením v rozprašovací sušičce Mini Spray Dryer B-290 firmy Büchi, pracující v inertní smyčce pod atmosférou N₂ a opatřené 2kapalinovou tryskou (0,7 mm v průměru) nebo ultrazvukovou soupravou (ultrazvuková tryska a regulátor). Je připraven roztok ve vodě špatně rozpustného léčiva v organickém rozpouštědle (jako je ethanol, methanol, aceton, isopropanol nebo jejich směsi) s požadovanou koncentrací (obvykle v rozmezí
35 od 0,5 do 20 mg/ml) a k roztoku léčiva se přidávají glukanové částice za vzniku suspenze obsahující 2 až 40 mg glukanových částic na 1 ml suspenze. Výsledná suspenze se suší rozprašováním v inertní, obvykle dusíkové, atmosféře, a za předem definovaných parametrů. Proces rozprašovacího sušení podporuje rychlé odpaření organického rozpouštědla a následné deponování léčiva uvnitř nebo uvnitř a mimo glukanové částice. Parametry rozprašovacího sušení
40 mohou být změněny za vzniku různých formulací kompozitů. Vstupní teplota je zvolena na základě teploty bodu varu organického rozpouštědla a/nebo tepelných degradačních vlastností výchozích materiálů. Rychlost nástřiku roztoku a průtok plynu ovlivňují hlavně velikost kapiček. Rychlost nástřiku se v experimentech pohybovala mezi 1 a 20 mililitry za minutu a průtok plynu od 100 do 600 l/hod.

45

Beta-glukanové částice pro experiment byly připraveny ze *Saccharomyces cerevisiae* metodikou, kterou popsali Saloň, I., et al., *Suspension stability and diffusion properties of yeast glucan microparticles*. Food and Bioproducts Processing, 2016. 99: p. 128-135. Nejprve byla kvasinka
50 třikrát podrobena alkalickému promytí, kdy bylo 600 ml 1M roztoku NaOH přidáno ke 150 g kvasinek. Suspenze byla zahřata na 90 °C a míchána magnetickou tyčinkou po dobu jedné hodiny; pak byla odstředěna a supernatant byl odstraněn. Hodnota pH řídké suspenze získané po alkalických promytích byla upravena na hodnotu mezi 4 a 5 přidáním roztoku HCl (35%). Kyselá suspenze byla míchána 2 hodiny při 75 °C a odstředěna, aby se odstranil supernatant. Nakonec byla suspenze promyta deionizovanou vodou (třikrát), isopropanolem (čtyřikrát) a acetonem
55 (dvakrát), lyofilizována po dobu dvou dnů a uložena do chladničky pro další použití.

Formulace beta-glukanových a ve vodě nerozpustných nebo špatně rozpustných léčiv:

- 5 Přípraveny byly různé formulace beta-glukanových částic kvasinkového původu a ve vodě nerozpustných nebo špatně rozpustných léčiv pomocí různých léčiv a/nebo jejich kombinací, různých roztoků a/nebo jejich kombinací a různých hmotnostních poměrů léčivo/GP. Rozpouštědlem může být například ethanol, methanol, aceton, isopropanol nebo jiná organická rozpouštědla a/nebo jejich směsi. Rozsah experimentu se může pohybovat v řádu miligramů až stovek gramů glukanových částic, což pokrývá průmyslovou výrobu. Hmotnost ve vodě špatně rozpustného léčiva je pak dána požadovanou frakcí léčiva v kompozitu, která se může pohybovat v rozmezí od 0,1 do více než 3,0. Poměr mezi hmotnostmi glukanových částic a objemem rozpouštědla se může pohybovat v řádu desítek miligramů až desítek gramů částic na litr rozpouštědla podle požadovaných vlastností kompozitů. Příklady přípravků použitých pro testování jsou uvedeny v následující Tabulce 1.

15

Tabulka 1:

Modelové léčivo	Použité rozpouštědlo	Koncentrace léčiva (mg/mL)	Koncentrace GP (mg/mL)	Hmotnostní poměr léčiva ku GP	Podmínky sušení rozprašováním*
ibuprofen	ethanol	1,0	10,0	0,1	2FN, S a L
ibuprofen	ethanol	2,0	20,0	0,1	2FN, S a L
ibuprofen	ethanol	2,0	10,0	0,2	2FN, S a L
ibuprofen	ethanol	5,0	10,0	0,5	2FN, S a L
ibuprofen	ethanol	10,0	10,0	1,0	2FN, S a L
ibuprofen	ethanol	20,0	10,0	2,0	2FN, S a L
ibuprofen	ethanol	5,0	20,0	0,25	USN
kurkumin	ethanol	0,01	20,0	$0,5 \times 10^{-3}$	USN
kurkumin	ethanol	0,02	20,0	$1,0 \times 10^{-3}$	USN
kurkumin	ethanol	0,10	20,0	$5,0 \times 10^{-3}$	USN
kurkumin	ethanol	1,0	20,0	0,050	2FN (S a L), USN
kurkumin	ethanol	3,6	20,0	0,180	2FN, L
diplakon	ethanol	$2,5 \times 10^{-3}$	20,0	$0,13 \times 10^{-3}$	USN
diplakon	ethanol	0,013	20,0	$0,63 \times 10^{-3}$	USN
diplakon	ethanol	0,127	20,0	$6,3 \times 10^{-3}$	USN
artemisinin	ethanol	$8,4 \times 10^{-3}$	20,0	$0,42 \times 10^{-3}$	USN
epigallokat echin galát	ethanol	0,014	20,0	$0,68 \times 10^{-3}$	USN
resvesratrol	ethanol	$6,8 \times 10^{-3}$	20,0	$0,34 \times 10^{-3}$	USN
kyselina ellagová	ethanol	$9,0 \times 10^{-3}$	20,0	$0,45 \times 10^{-3}$	USN
morusin	ethanol	0,013	20,0	$0,63 \times 10^{-3}$	USN
atorvastatin	ethanol	0,017	20,0	$0,85 \times 10^{-3}$	USN
atorvastatin	ethanol	0,033	20,0	$1,65 \times 10^{-3}$	USN
atorvastatin	ethanol	0,167	20,0	$8,4 \times 10^{-3}$	USN
atorvastatin	ethanol	1,0	20,0	0,05	USN
atorvastatin	ethanol	2,0	20,0	0,10	USN
atorvastatin	ethanol	3,0	20,0	0,15	USN
atorvastatin	methanol	1,0	20,0	0,05	USN
amlodipin	ethanol	5,0	20,0	0,25	USN

amlodipin	DCM	5,0	20,0	0,25	USN
amlodipin	DCM/ ethanol	5,0	20,0	0,25	USN
Ibuprofen/ kyselina acetylsalicyl ová	ethanol	5,0	20,0	0,25	USN

*2FN: 2kapalinová tryska; S: konfigurace pro *malé* kapičky; L: konfigurace pro *velké* kapky; USN: ultrazvuková tryska (se kterou lze vyrábět *mimořádně velké* kapky).

Příklad 2: Příprava kompozitů při různých podmínkách zpracování

5

Kompozity beta-glukanových částic kvasinkového původu s inkorporovaným, ve vodě špatně rozpustným, léčivem byly připraveny postupem podle Příkladu 1, pomocí ibuprofenu (IBU) jako ve vodě špatně rozpustného modelového léčiva, s pevným hmotnostním poměrem IBU/GP ve výši 0,1. Různé vzorky byly vyrobeny změnou podmínek zpracování, jmenovitě výchozího obsahu pevných látek a parametrů rozprašovacího sušení (rychlost přivádění a průtok). Výchozí obsahy pevných látek byly 10 a 20 mg/ml, tj. 1 nebo 2 gramy glukanových částic byly přidány do 100 ml roztoku ibuprofenu s koncentrací 1 nebo 2 mg/ml. Jako organické rozpouštědlo byl použit ethanol.

Připravené 100ml suspenze byly sušeny rozprašováním pomocí 2kapalinové trysky. Za účelem vyhodnocení vlivu velikosti kapiček ve finálních kompozitech byly testovány dvě různé sady provozních podmínek. První z nich (malé kapičky) zahrnovala rychlost nástřiku 3,5 ml/min a průtok N₂ 600 l/hod (50 %); druhá skupina (velké kapky) zahrnovala rychlost nástřiku 7,0 ml/min a průtok N₂ 473 l/hod (40 %). V obou případech byla výstupní teplota udržována na konstantní hodnotě (75 ± 2) °C, pro kterou se vstupní teplota měnila mezi 120 až 130 °C.

Vzorky byly označeny takto:

- S10: kompozity připravené s výchozím obsahem pevných látek 10 mg/ml a sadou parametrů malých kapiček.
- S20: kompozity připravené s výchozím obsahem pevných látek 20 mg/ml a sadou parametrů malých kapiček.
- L10: kompozity připravené s výchozím obsahem pevných látek 10 mg/ml a sadou parametrů velkých kapek.
- L20: kompozity připravené s výchozím obsahem pevných látek 20 mg/ml a sadou parametrů velkých kapek.

35

Morfologie kompozitů

Morfologie vyrobených mikročástic (Obr. 1) byla vyhodnocena rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Jeol JCM-5700. Před analýzou SEM byly vzorky potaženy 5nm vrstvou zlata v naprašovacím zařízení Emitech K550X.

Glukanové částice mají typickou elipsoidní morfologii s velikostí částic 2 až 4 µm, vykazující vrásčitý povrch, který lze připsat hydrolýze vnější buněčné stěny kvasinek a mezibuněčných složek, což je produktem alkalického a kyselého ošetření. Nebyly pozorovány žádné známky ibuprofenu mimo glukanové částice.

Výtěžnost procesu přípravy kompozitů

- Za účelem stanovení obsahu léčiva (Obr. 2) byl ibuprofen extrahován z vyrobených kompozitů IBU/GP přidáním 10,0 mg mikročástic do 10,0 ml roztoku fosfátového pufru (pH 7,4). Disperze byly umístěny do ultrazvukové lázně na dobu 10 minut, aby byla zaručena úplná extrakce ibuprofenu z glukonových částic. Poté byly glukonové částice odděleny odstředěním (5 minut při rychlosti 7000 ot/min) a bylo odebráno 500 μ l supernatantu. Koncentrace byla vyhodnocena vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí (firma Agilent), ve spojení s kolonou C18 (100 mm x 4,6 mm, 5 μ m) a mobilní fází tvořenou 0,01 M pufrem fosforečnanu amonného (pH 2,0) a acetonitrilem (60 %).
- Výtěžnost procesu přípravy kompozitu IBU/GP byla vypočtena jako experimentálně stanovené množství ibuprofenu v kompozitech (C_E), měřeno pomocí HPLC, děleno teoretickým obsahem (C_T) ibuprofenu v kompozitech, pokud by byl ibuprofen deponován do kompozitů všechny.
- Významně vyšší výtěžnosti přípravy kompozitů (C_E/C_T) byly získány u vzorků vyrobených při nastavení na velké kapky (L10 a L20) ve srovnání se vzorky vyrobenými při nastavení na malé kapičky. Kromě toho byly vyšší výtěžnosti přípravy kompozitů získány u vzorků vyrobených z disperzi s vyšším obsahem pevných látek.

Rentgenová difrakce

- Krystalinita vzorků (Obr. 3) byla vyhodnocena zaznamenáním difrakčních intenzit vyrobených mikročástic v rozmezí 5° až 50° úhlu 2 θ přístrojem PANalytical X'Pert PRO s difraktometrem High Score Plus. Na rozdíl od mikronizovaného surového ibuprofenu jsou všechny vyráběné kompozity IBU/GP zcela amorfni.

Příklad 3: Příprava kompozitů pomocí různých trysek pro sušení rozprašováním

- Kompozity z beta-glukanových částic kvasinkového původu se zabudovaným ve vodě špatně rozpustným léčivem byly připraveny postupem podle Příkladu 1 s kurkuminem (CC) jako ve vodě špatně rozpustným modelovým léčivem, s pevným hmotnostním poměrem CC/GP ve výši 0,05. K tomu byly připraveny 50ml suspenze (20 mg/ml) přidáním 1 gramu glukonových částic v 50 mililitrech roztoku kurkuminu s koncentrací 1 mg/ml ethanolu. Poté byly suspenze sušeny rozprašením pomocí různých trysek pro sušení rozprašováním, a to 2kapalinovou tryskou (s průměrem 0,7 mm) a ultrazvukovou tryskou. Různé trysky mohou hlavně ovlivňovat velikost kapiček a morfologii vzorků.

- Pro vzorky sušené rozprašováním pomocí 2kapalinové trysky (označené 2FN) se použily provozní podmínky zahrnující rychlost přivádění 3,5 ml/min a průtok N₂ 473 l/hod (40 %). Pro vzorky sušené rozprašováním pomocí ultrazvukové trysky (označené USN) se použily provozní podmínky zahrnující rychlost přivádění 3,5 ml/min, průtok N₂ 246 l/hod (20 %) a 1,8 wattů (výkon ultrazvukové trysky). V obou případech byla vstupní teplota 120 °C, pro kterou byla výstupní teplota (75 $\pm$ 2) °C.

Morfologie kompozitů

- Morfologie vyrobených mikročástic (Obr. 4) byla vyhodnocena rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Jeol JCM-5700. Před analýzou SEM byly vzorky potaženy 5nm vrstvou zlata v naprašovacím zařízení Emitech K550X.
- Vedle typické elipsoidní vrásčité morfologie glukonových částic byl pozorován další typ částic s kulovitou morfologií a přisouzen kurkuminu vysráženému mimo glukonové částice. Kurkumin mimo glukonové částice je mnohem více patrný u vzorku 2FN než u vzorku USN.

Fluorescenční a konfokální mikroskopie

Vzorky byly analyzovány fluorescenční (Obr. 5) a konfokální mikroskopií (Obr. 6) s využitím konfokálního systému Olympus Fluoview FV1000 (excitační vlnová délka 488 nm). Ze snímků fluorescenční mikroskopie lze pozorovat, že obsah kurkuminu v glukanových částicích byl u obou vzorků podobný (2FN a USN). Na snímcích konfokálního mikroskopu je u vzorku 2FN pozorováno velké množství kurkuminových částic mimo glukanové částice (malé tečky), zatímco u vzorků USN tyto částice pozorovány nejsou, což dokazuje, že veškerý kurkumin byl zapouzdřen uvnitř glukanových částic.

Výtěžnost procesu přípravy kompozitů

Výtěžnost procesu přípravy kompozitů CC/GP byla vypočtena jako experimentálně stanovené množství kurkuminu v kompozitech (C_E), měřeno UV-Vis spektrofotometrií, děleno teoretickým obsahem (C_T) kurkuminu v kompozitech, pokud by byl kurkumin deponován do kompozitů všechen.

Pro stanovení experimentální koncentrace byl z vyrobených CC/GP kompozitů extrahován kurkumin přidáním 5,0 mg mikročástic do 10,0 ml methanolu. Disperze byly vloženy do ultrazvukové lázně na dobu 10 minut, aby byla zaručena úplná extrakce kurkuminu z glukanových částic. Poté byly glukanové částice odděleny odstředěním (10 minut při 5000 ot/min) a 3,0 ml supernatantu byly zfiltrány a umístěny do kyvety spektrofotometru. V případě potřeby bylo provedeno zředění. Absorbance ($\lambda = 425$ nm) byla měřena UV-Vis spektrofotometrií spektrofotometrem Specord 205 BU UV-Vis a vztažena ke koncentraci kurkuminu pomocí dříve vynesené kalibrační křivky.

Výtěžnost procesu přípravy byla přibližně 100 % u vzorku USN a 61,5 % u vzorku 2FN. Čtyřicetiprocentní rozdíl se připisuje ztrátám kurkuminu, který se vysrážel mimo glukanové částice v případě vzorku 2FN. Tyto kurkuminové částice jsou velmi malé; proto existuje vysoká pravděpodobnost, že nebyly shromážděny v cyklónu rozprašovací sušičky, což způsobilo ztrátu v rozprašovací sušičce.

Rentgenová difrakce

Krystalinita vzorků (Obr. 8) byla vyhodnocena zaznamenáním difrakčních intenzit vyrobených mikročástic v rozmezí 5° až 50° úhlu 2θ přístrojem PANalytical X'Pert PRO s difraktometrem High Score Plus. Na rozdíl od čistého kurkuminu, jsou všechny vyrobené kompozity CC/GP plně amorfni.

Příklad 4: Příprava kompozitů se zvyšujícím se podílem léčiva

Kompozity glukanových částic a ibuprofenu (IBU), jako ve vodě špatně rozpustného modelového léčiva, byly připraveny postupem podle Příkladu 1, při zohlednění zvyšujících se hmotnostních poměrů IBU/GP (0,1, 0,2, 0,5, 1,0 a 2,0) tak, že byly připraveny 100ml roztoky ibuprofenu s koncentracemi 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 a 2,0 % (hmot./obj.), za použití ethanolu jako organického rozpouštědla. Poté byl ke každému roztoku přidán 1,0 g glukanových částic a dispergován v homogenizátoru IKA® T10 Ultra-Turrax basic po dobu 5 minut před sušením rozprašováním. Disperze byly před rozprašováním inkubovány při laboratorní teplotě přes noc. Vzorky jsou označeny jako IBU-GP-0.1, IBU-GP-0.2, IBU-GP-0.5, IBU-GP-1.0 a IBU-GP-2.0. Připraven a sušen rozprašováním byl také analogický vzorek bez léčiva, označený jako „SD-GP“.

100ml vzorky byly sušeny rozprašováním v rozprašovací sušičce Mini Spray Dryer B-290 vybavené 2kapalinovou tryskou (průměr 0,7 mm) a pracující v inertní smyčce pod atmosférou N_2 . Byly použity dvě různé sady provozních podmínek. První z nich (malé kapičky) zahrnovala vstupní teplotu $120^\circ C$, rychlost nástřiku 3,5 ml/min a průtok N_2 600 l/hod (50 %). Druhá sada provozních podmínek (velké kapky) byla: vstupní teplota $130^\circ C$, rychlost nástřiku 7,0 ml/min a průtok N_2 473 l/hod (40 %). V obou případech se výstupní teplota pohybovala od 66 do $72^\circ C$.

Morfologická charakterizace

Morfologie vyrobených mikročástic (Obr. 9) byla vyhodnocena rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Jeol JCM-5700. Před analýzou SEM byly vzorky potaženy 5nm vrstvou zlata v naprašovací zařízení Emitech K550X. Přítomnost krystalů ibuprofenu mimo glukonové částice byla pozorována ve vzorcích s vyšším obsahem IBU (hmotnostní poměr IBU/GP $\geq 0,5$). Krystaly se jevily větší a četnější ve vzorcích vyrobených technikou sušení rozprašováním v nastavení na velké kapky.

Rentgenová difrakce

Krystalinita vzorků (Obr. 10) byla vyhodnocena zaznamenáním difrakčních intenzit vyrobených mikročástic v rozmezí 5° až 50° úhlu 2θ přístrojem PANalytical X'Pert PRO s difraktometrem High Score Plus. V souladu s pozorováními SEM byla pozorována tendence krystalinity zvyšovat se s obsahem IBU a velikostí kapiček.

Příklad 5: Příprava kompozitů s kombinací více než jednoho ve vodě špatně rozpustného léčiva

Kompozity glukonových částic a dvou různých ve vodě špatně rozpustných modelových léčiv, a to ibuprofenu (IBU) a kyseliny acetylsalicylové (ASA), byly připraveny postupem podle Příkladu 1. Kompozity byly připraveny s hmotnostním poměrem léčivo/GP 0,25 (IBU/GP = 0,125 hmot. a ASA/GP = 0,125 hmot.) a za použití ethanolu jako organického rozpouštědla. K tomu byl připraven 50ml roztok léčiva rozpuštěním 125 mg IBU a 125 mg ASA za použití ethanolu jako běžného organického rozpouštědla. Poté byl k roztoku léčiva přidán 1,0 g glukonových částic a dispergován v homogenizátoru IKA® T10 Ultra-Turrax basic po dobu 5 minut před sušením rozprašováním. Vzorek byl sušen rozprašováním v rozprašovací sušičce Mini Spray Dryer B-290 vybavené ultrazvukovou tryskou a pracující v inertní smyčce pod atmosférou N_2 . Použité provozní podmínky zahrnovaly vstupní teplotu $120^\circ C$, rychlost nástřiku 5,0 ml/min, průtok N_2 246 l/hod (20 %) a výkonový výstup na trysce 2,0 W. Výstupní teplota byla $76^\circ C$.

Kinetika rozpouštění

Byly provedeny zkoušky rozpouštění (Obr. 11) pro surový mikronizovaný ibuprofen, surovou kyselinu acetylsalicylovou a pro vyrobené částice kompozitu (IBU+ASA)/GP, v práškové formě a za použití 10 mM HCl (pH 2,0) jako rozpouštěcího média. K tomu bylo 20,0 mg surového léčiva (IBU nebo ASA) nebo 100,0 mg kompozitu (IBU+ASA)/GP přidáno do 200 ml kontinuálně míchaného rozpouštěcího média (pro maximální koncentraci 0,1 mg léčiva na ml média). Směsi byly kontinuálně míchány rychlostí 250 ot/min při laboratorní teplotě v kádince o objemu 250 ml. V předem určených časových bodech (v rozmezí od 0 do 60 minut) bylo odebráno 500 μ l vzorku, odstředěno a přefiltrováno (filtrační membrána s velikostí pórů 200 nm) a koncentrace byly vyhodnoceny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí (firma Agilent), ve spojení s kolonou C18 (100 mm x 4,6 mm, 5 μ m) a mobilní fází tvořenou 0,01 M pufrem fosforečnanu amonného (pH 2,0) a acetonitrilem (60%), s gradientem podle Tabulky 2:

Tabulka 2:

Čas (min)	% A	% B	Průtok (ml/min)
0,0	80	20	1
3,0	80	20	1
3,5	40	60	1
6,5	40	60	1
7,0	80	20	1

9,0	80	20	1
-----	----	----	---

Po 2 minutách byly IBU a ASA zapouzdřené v glukonových částicích kompletně rozpuštěny, zatímco surový IBU a surová ASA vykazují pomalejší rychlosti rozpouštění.

5 *Příklad 6: Příprava kompozitů s různými čistými organickými rozpouštědly a jejich kombinacemi*

Byly připraveny kompozity glukonových částic a amlodipinu (AML) jako ve vodě špatně rozpustného modelového léčiva postupem podle Příkladu 1, s hmotnostním poměrem AML/GP 0,25 a za použití různých organických rozpouštědel a jejich kombinací. K tomu byly připraveny 10 50ml roztoky amlodipinu s koncentrací 5 mg/ml, za použití ethanolu, dichloromethanu (DCM) a směsi ethanol/DCM (50/50) jako organických rozpouštědel. Poté byl ke každému roztoku přidán 1,0 g glukonových částic a dispergován v homogenizátoru IKA® T10 Ultra-Turrax basic po dobu 5 minut před sušením rozprašováním.

15 Vzorky byly označeny takto:

- AML/GP-EtOH: kompozity připravené se 100 % ethanolu jako rozpouštědla.
- AML/GP-DCM-EtOH: kompozity připravené s 50 % DCM a 50 % ethanolu jako 20 rozpouštědel.
- AML/GP-DCM: kompozity připravené se 100 % DCM jako rozpouštědla.

Tři vzorky byly sušeny rozprašováním v rozprašovací sušičce Mini Spray Dryer B-290 vybavené ultrazvukovou tryskou a pracující v inertní smyčce pod atmosférou N₂. Použité provozní podmínky zahrnovaly vstupní teploty 120, 90 a 80 °C pro vzorky AML/GP-EtOH, AML/GP-DCM-EtOH resp. AML/GP-DCM. Ve všech případech byla nastavena rychlost přivádění 5,0 ml/min, průtok N₂ 246 l/hod (20 %) a výkonový výstup na trysce 2,4 W. Výstupní teplota 25 byla 76, 56 resp. 54 °C.

30

Kinetika rozpouštění

Byly provedeny zkoušky rozpouštění (Obr. 12) pro surový amlodipin a pro vyrobené kompozitní částice AML/GP ve formě prášku a za použití destilované vody jako rozpouštěcího média. 35 K tomu bylo 20,0 mg surového amlodipinu nebo 100,0 mg kompozitů přidáno do 200 ml rozpouštěcího média (pro maximální koncentraci 0,1 mg amlodipinu na ml média). Směsi byly kontinuálně míchány rychlostí 250 ot/min při teplotě laboratoře v kádince o objemu 250 ml. V předem určených časových bodech (v rozmezí od 0 do 60 minut) bylo před měřením odebráno 500 µl vzorku, odstředěno a přefiltrováno (filtrační membrána s velikostí pórů 200 nm). 40 Koncentrace byla vyhodnocena UV-Vis spektrofotometrií ($\lambda = 366$ nm) spektrometrem Tecan Infinite M200.

Rychlejší rozpouštění bylo získáno pro vzorky AML/GP-DCM-EtOH a AML/GP-DCM. Navíc bylo v případě kompozitů AML/GP po 30 minutách rozpuštěno 100 % amlodipinu, nezávisle na 45 použitém rozpouštědle, zatímco v případě surového amlodipinu bylo po 60 minutách rozpuštěno pouze 80 % amlodipinu.

Příklad 7: Příprava kompozitů se zlepšenými dispersními vlastnostmi a řízeným uvolňováním léčiva

50

Kompozity glukonových částic a ibuprofenu (IBU), jako ve vodě špatně rozpustného modelového léčiva, byly připraveny postupem podle Příkladu 1, s hmotnostním poměrem IBU/GP 0,25. K tomu byl připraven 50ml roztok ibuprofenu s koncentrací 5 mg/ml, za použití ethanolu jako organického rozpouštědla. Poté byl přidán 1,0 g glukonových částic a dispergován v

homogenizátoru IKA® T10 Ultra-Turrax basic po dobu 5 minut před rozprašováním sušením. Vzorek byl sušen rozprašováním v rozprašovací sušičce Mini Spray Dryer B-290 vybavené ultrazvukovou tryskou a pracující v inertní smyčce pod atmosférou N₂. Použité provozní podmínky zahrnovaly vstupní teplotu 120 °C, rychlost nástřiku 5,0 ml/min, průtok N₂ 246 l/hod (20 %) a výkonový výstup na trysce 2,4 W. Výstupní teplota byla 76 °C.

Dispergační vlastnosti

Byly analyzovány dispergační vlastnosti kompozitů IBU/GP oproti mikronizovanému surovému ibuprofenu (Obr. 13) pozorováním chování vzorků v suspenzi. K tomu bylo naváženo 20,0 mg vzorku a přidáno do 10,0 ml 10 mM HCl (pH 2,0). Kompozity IBU/GP vykazují zlepšené dispergační vlastnosti i bez použití povrchově aktivního činidla. Vzhledem k jejich dobré smáčivosti bylo rozptýlení kompozitů rychlé a spontánní.

Kinetika rozpouštění

Protože ibuprofen je špatně rozpustný za kyselých podmínek, lze očekávat, že krystalické a amorfni formy ibuprofenu budou vykazovat významně odlišné rychlosti rozpouštění v kyselém prostředí. Proto byly provedeny zkoušky rozpouštění (Obr. 14) pro surový mikronizovaný ibuprofen (krystalický) a pro vyrobené částice kompozitu IBU/GP (amorfni), jakož i pro fyzické směsi surového IBU a kompozitních částic v práškové formě a za použití 10 mM HCl (pH 2,0) jako rozpouštěcího média. K tomu bylo přidáno 20,0 mg ibuprofenu (surový, kompozit nebo fyzikální směs – viz Tabulka 3) do 200 ml kontinuálně míchaného rozpouštěcího média (250 ot/min při laboratorní teplotě) v kádince o objemu 250 ml. V předem určených časových bodech (v rozmezí od 0 do 60 minut) bylo odebráno 500 µl vzorku, odstředěno a přefiltrováno (filtrační membrána s velikostí pórů 200 nm) a koncentrace byly vyhodnoceny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí (firma Agilent), ve spojení s kolonou C18 (100 mm x 4,6 mm, 5 µm) a mobilní fází tvořenou 0,01 M puforem fosforečnanu amonného (pH 2,0) a acetonitrilem (60 %).

Tabulka 3:

poměr krystalického ku amorfniému ibuprofenu	hmotnost surového ibuprofenu (mg)	hmotnost enkapsulovaného ibuprofenu* (mg)	hmotnost kompozitu IBU/GP (mg)
100 / 0	20,0	0,0	0,0
75 / 25	15,0	5,0	25,0
50 / 50	10,0	10,0	50,0
25 / 75	5,0	15,0	75,0
0 / 100	0,0	20,0	100,0

*Enkapsulovaný (zapouzdřený) ibuprofen je ibuprofen obsažený v kompozitech.

Postupně rychlejší profily rozpouštění byly získány se zvyšujícím se hmotnostním podílem zapouzdřeného ibuprofenu, až do dosažení limitu rozpustnosti. U vzorků s nejvyšším hmotnostním podílem zapouzdřeného ibuprofenu (poměr krystalický/amorfni ibuprofen = 25/75 a 0/100) vede rychlé uvolnění k přesycení.

Příklad 8: Příprava kompozitů se zlepšenými tokovými vlastnostmi

Byly připraveny kompozity glukanových částic a atorvastatinu (ATO) jako ve vodě špatně rozpustného modelového léčiva postupem podle Příkladu 1, s hmotnostním poměrem ATO/GP 0,25. K tomu bylo připraveno 50 ml roztoku atorvastatinu s koncentrací 5 mg/ml za použití ethanolu jako organického rozpouštědla. Poté byl do roztoku přidán 1,0 g glukanových částic a dispergován v homogenizátoru IKA® T10 Ultra-Turrax basic po dobu 5 minut před

rozprašovacím sušením. Vzorek byl sušen rozprašováním v rozprašovací sušičce Mini Spray Dryer B-290 vybavené ultrazvukovou tryskou a pracující v inertní smyčce pod atmosférou N₂. Použité provozní podmínky zahrnovaly vstupní teplotu 120 °C, rychlost nástřiku 5,0 ml/min, průtok N₂ 246 l/hod (20 %) a výkonový výstup na trysce 2,0 W. Výstupní teplota byla 76 °C.

5

Kompozity glukonových částic a atorvastatinu (ATO) s hmotnostním poměru ATO/GP ve výši 0,25 byly připraveny také alternativním způsobem v rotační odparce. K tomu bylo 200 ml roztoku atorvastatinu (1,25 mg/ml v ethanolu) přidáno k 1,0 g glukonových částic v baňce s kulatým dnem. Získaná suspenze byla homogenizována v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut a rozpouštědlo bylo odstraněno odpařením v rotační odparce IKA® HB10 basic. Použité provozní podmínky zahrnovaly teplotu vodní lázně 60 °C a rychlost otáčení 175 ot/min. Tlak byl pomalu snižován z atmosférického tlaku na 330 mbar. Po odstranění většiny ethanolu byl tlak snížen na 80 až 90 mbar a vzorek byl sušen při nízkém tlaku po dobu 20 minut. Získaný prášek byl z baňky s kulatým dnem odebrán a lyofilizován po dobu 48 hodin.

15

Vzorky byly označeny takto:

- ATO/GP-SD: kompozity připravené technikou rozprašovacího sušení
- ATO/GP-RE: kompozity připravené v rotační odparce.

20

Oba vzorky kompozitů (ATO/GP-SD a ATO/GP-RE) a surový atorvastatin byly podrobeny charakterizaci.

25 *Prášková reologie*

Vlhkost (obsah vody) u vzorků byla nejprve změřena pomocí sušící váhy pro analýzu vlhkosti (jednoduchý test, 100 °C, počáteční hmotnost 5 mg, infračervené sušení). Vzorky ATO/GP-SD, ATO/GP-RE a surového ATO obsahovaly 5, 3, resp. 2,5 % hmot. vlhkosti. Poté byly vzorky vystaveny laboratorní vlhkosti (21 °C a 28 % relativní vlhkosti) po dobu 24 hodin a obsah vlhkosti byl změřen znovu (9 hmot. % pro ATO/GP-SD, 9 % pro ATO/GP-RE a 5 % pro ATO). Vzorky se pak sušily 24 hodin v peci s velmi pomalu se pohybujícím ventilátorem při 30 °C. Na konec byla na vzorcích provedena zkouška smykem (Obr. 15) na práškovém reometru Powder Rheometer FT4 (předběžný smyk při konsolidaci 3 kPa a počáteční hmotnosti 0,6 – 0,7 g).

35

Surový atorvastatin vykazuje nejvyšší soudržnost a vnitřní tření, zatímco oba kompozity (ATO/GP-SD a ATO/GP-RE) ukazují zlepšenou tekutost (Tabulka 4). U obou vzorků kompozitů je soudržnost stejná, ale rozdíl je pokud jde o vnitřní tření. Vzorky kompozitů ATO/GP-SD a ATO/GP-RE budou téci podobně ve specifických procesech s vysokým smykem a tlakem, zatímco vzorek sušený rozprašováním (ATO/GP-SD) bude mít lepší tekutost než ATO/GP-RE v procesech s nízkým smykovým napětím.

40

Tabulka 4:

45

Vzorek	Soudržnost (kPa)	UYS* (kPa)	AIF* (°)
surový ATO	0,879	4,27	45,3
ATO/GP-RE	0,534	2,12	36,6
ATO/GP-SD	0,529	1,74	27,3

*UYS: Unconfined Yield Strength (pevnost v tlaku); AIF: Angle of Internal Friction (úhel vnitřního tření).

50

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby kompozitu beta-glukanové částice s inkorporovaným alespoň jedním, ve
 5 vodě špatně rozpustným, léčivem, které má rozpustnost ve vodě 30 mg/ml nebo méně, měřeno za
 podmínek gastrointestinálního traktu při teplotě 37 °C a pH 1 až 8, přičemž hmotnostní poměr ve
 vodě špatně rozpustného léčiva k beta-glukanové částici je v rozmezí od $0,1 \cdot 10^{-3}$ do 3,
vyznačený tím, že:
 - i) ve vodě špatně rozpustné léčivo se rozpustí v organickém rozpouštědle, vybraném ze skupiny
 zahrnující ethanol, methanol, aceton, dichlormethan, trichloromethan, chloroform, isopropanol,
 hexan, heptan, cyklohexan, toluen nebo jejich směsi nebo jejich směsi s vodou;
 - ii) beta-glukanové částice se přidají do roztoku z kroku i) za vzniku suspenze;
 - 15 iii) suspenze získaná v kroku ii) se vysuší rozprašováním v plynné atmosféře při teplotě v
 rozmezí od 30 do 250 °C, rychlosti nástřiku mezi 1 a 20 mililitry za minutu a průtoku sušícího
 plynu v rozmezí od 100 do 600 l/hod, za vzniku kompozitu beta-glukanové částice s ve vodě
 špatně rozpustným léčivem, které je v beta-glukanové částici v amorfnní formě.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že koncentrace roztoku špatně rozpustného léčiva v
 organickém rozpouštědle v kroku i) je do 150 mg/ml.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že suspenze v kroku ii) má koncentraci od
 25 200 mg do 4 g beta-glukanových částic na 100 ml roztoku z kroku i).
4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačený tím**, že beta-glukanové částice jsou
 připraveny ze *Saccharomyces cerevisiae* způsobem, který zahrnuje následující kroky:
 - 30 i) přírodní nebo sušené droždí se suspenduje ve vodném roztoku hydroxidu sodného, s výhodou
 v 1M roztoku hydroxidu sodného;
 - ii) suspenze se zhomogenizuje a zahřeje na alespoň 50 °C, s výhodou na 95 °C, po dobu alespoň
 jedné hodiny;
 - 35 iii) následně se suspenze z kroku ii) centrifuguje a supernatant se odstraní;
 - iv) pH suspenze se upraví na hodnotu přibližně 4,5, s výhodou vodným roztokem HCl, a
 připravená suspenze se zahřeje na alespoň 50 °C, s výhodou na 75 °C, po dobu alespoň dvou
 40 hodin;
 - v) následně se suspenze z kroku iv) centrifuguje a supernatant se odstraní;
 - vi) nerozpustný zbytek se promyje, s výhodou se promyje deionizovanou vodou, isopropanolem,
 45 acetonem a konečný produkt se lyofilizuje.
5. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačený tím**, že ve vodě špatně
 rozpustné léčivo je vybrané ze skupiny zahrnující ibuprofen, kurkumin, atorvastatin, diplakon,
 artemisinin, morusin, epigalokatechin galát, resveratrol, kyselinu acetylsalicylovou a kyselinu
 50 ellagovou.
6. Kompozit beta-glukanové částice s inkorporovaným, ve vodě špatně rozpustným, léčivem,
 připravitelný způsobem, kdy se:
 - 55 i) ve vodě špatně rozpustné léčivo se rozpustí v organickém rozpouštědle, vybraném ze skupiny

zahmující ethanol, methanol, aceton, dichlormethan, trichloromethan, chloroform, isopropanol, hexan, heptan, cyklohexan, toluen nebo jejich směsi nebo jejich směsi s vodou;

ii) beta-glukanové částice se přidají do roztoku z kroku i) za vzniku suspenze;

5

iii) suspenze získaná v kroku ii) se vysuší rozprašováním v plynné atmosféře při teplotě v rozmezí od 30 do 250 °C, rychlosti nástřiku mezi 1 a 20 mililitry za minutu a průtoku sušícího plynu v rozmezí od 100 do 600 l/hod, za vzniku kompozitu beta-glukanové částice s ve vodě špatně rozpustným léčivem, které je v beta-glukanové částici v amorfní formě, přičemž ve vodě špatně rozpustné léčivo má rozpustnost ve vodě 30 mg/ml nebo méně, měřeno za podmínek gastrointestinálního traktu při teplotě 37 °C a pH 1 až 8, a hmotnostní poměr ve vodě špatně rozpustného léčiva ku beta-glukanové částici je v rozmezí od $0,1 \cdot 10^{-3}$ do 3.

10

7. Kompozit podle nároku 6, **vyznačený tím, že** ve vodě špatně rozpustné léčivo je vybrané ze skupiny zahmující ibuprofen, kurkumin, atorvastatin, diplakon, artemisinin, morusin, epigalokatechin galát, resveratrol, kyselinu acetylsalicylovou a kyselinu ellagovou.

15

8. Farmaceutická kompozice, **vyznačená tím, že** obsahuje kompozit podle nároku 6 nebo 7 a dále alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič, vybraný ze skupiny zahmující plniva, pojiva, rozvolňovadla, stabilizátory, kluzné látky, excipienty.

20

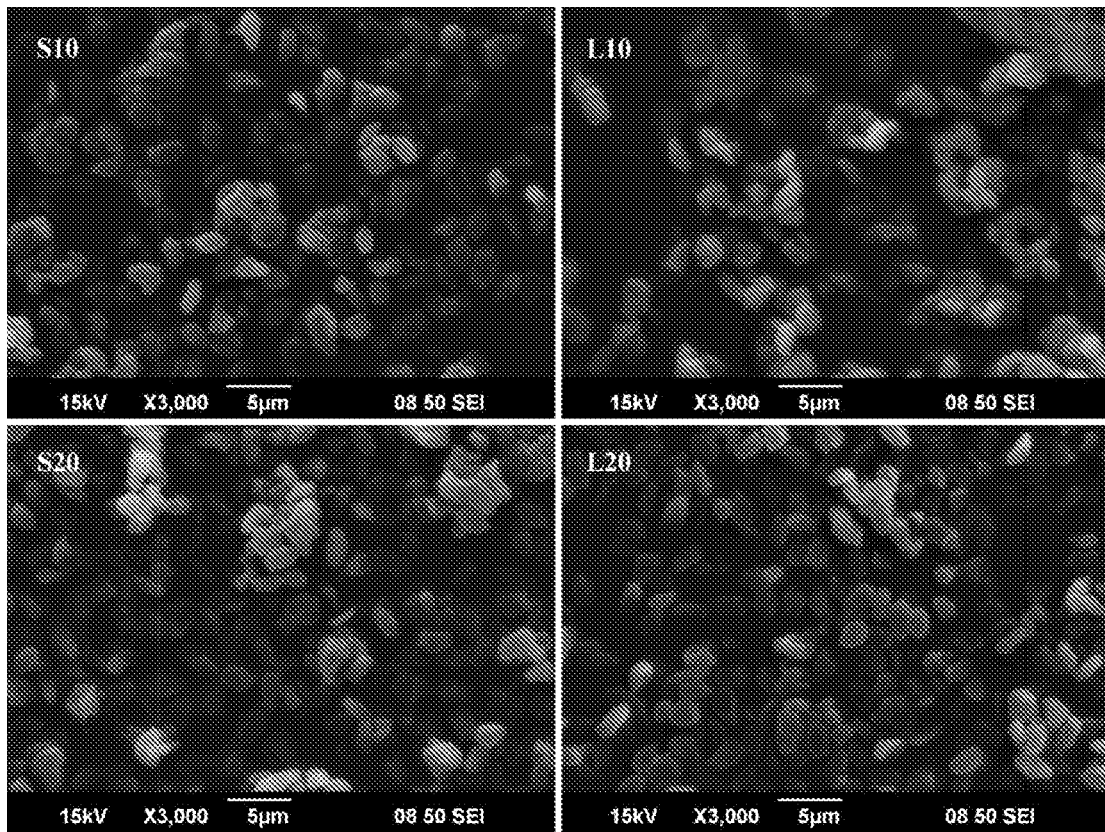
9. Farmaceutická kompozice podle nároku 8, **vyznačená tím, že** dále obsahuje ve vodě špatně rozpustné léčivo v krystalické formě, které není inkorporované v glukanových částicích, přičemž vodorozpustnost tohoto ve vodě špatně rozpustného léčiva je 30 mg/ml nebo méně, měřeno za podmínek gastrointestinálního traktu při teplotě 37 °C a pH 1 až 8, přičemž toto léčivo v krystalické formě je stejné jako léčivo v amorfním stavu obsažené v glukanové částici kompozitu podle nároku 6 nebo 7.

25

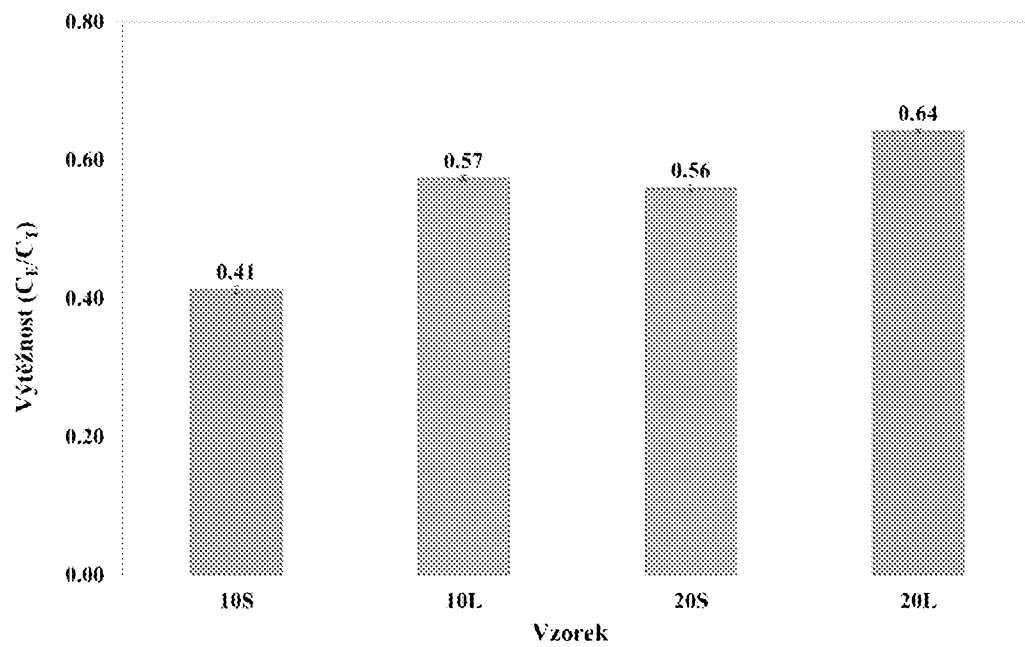
10. Farmaceutická kompozice podle nároku 9 pro použití jako léčivo s řízeným uvolňováním.

30

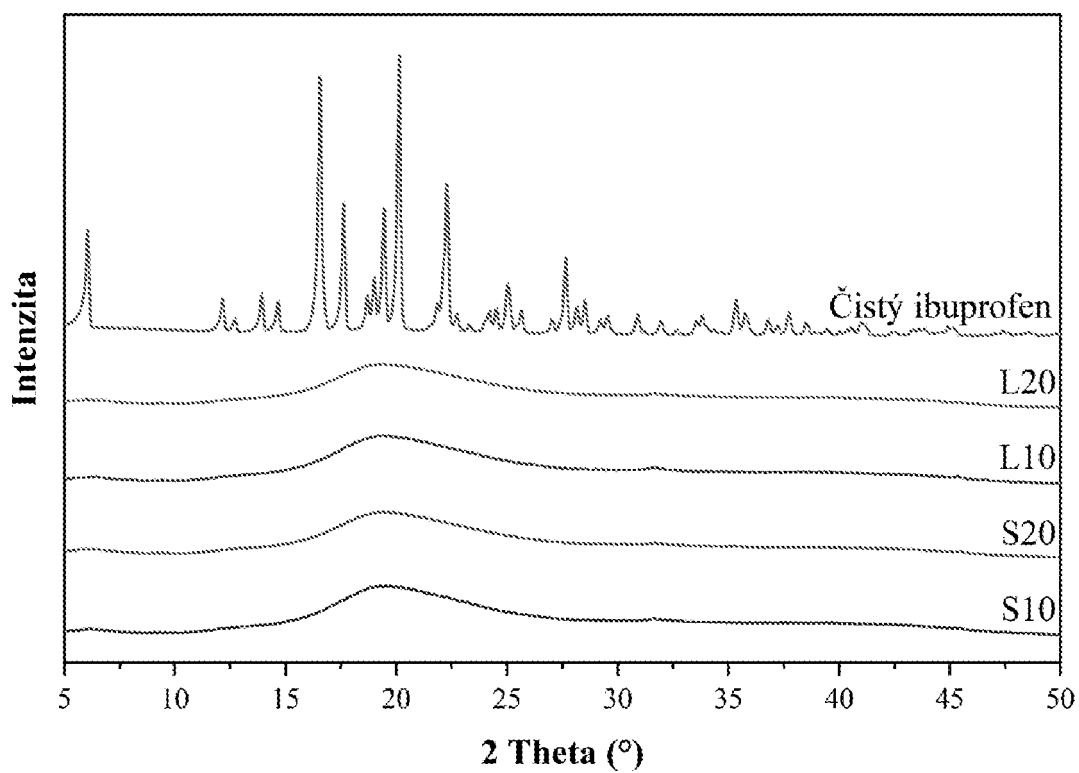
10 výkresů



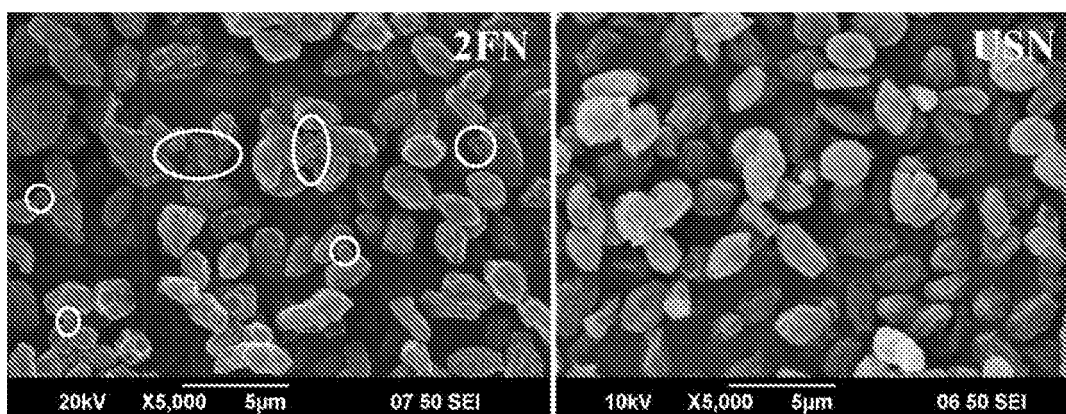
Obr. 1



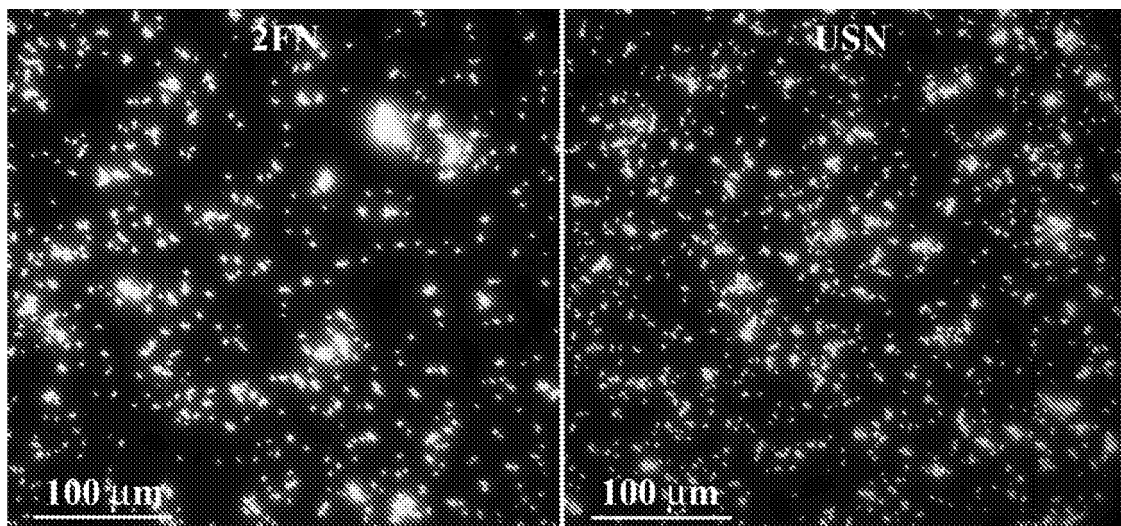
Obr. 2



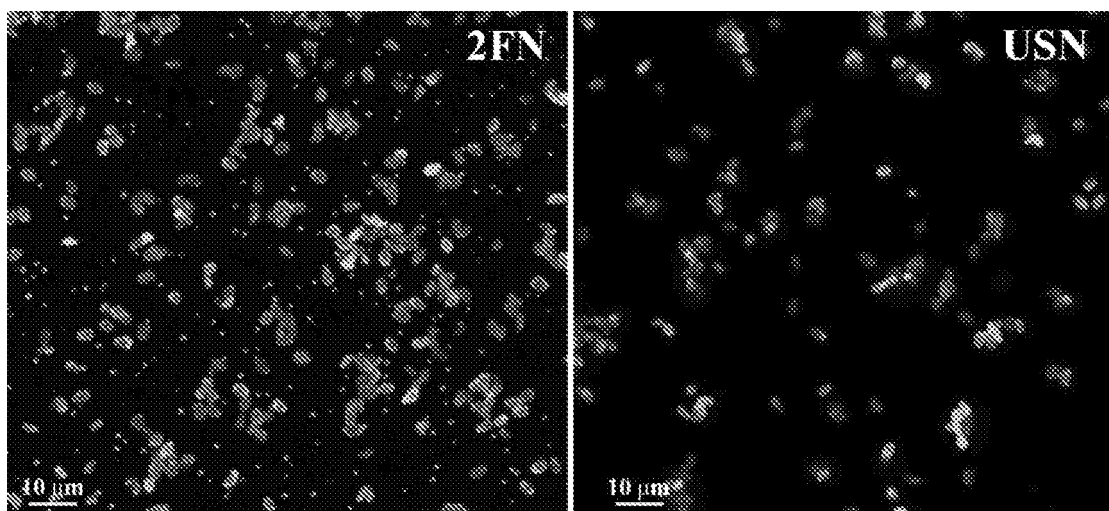
Obr. 3



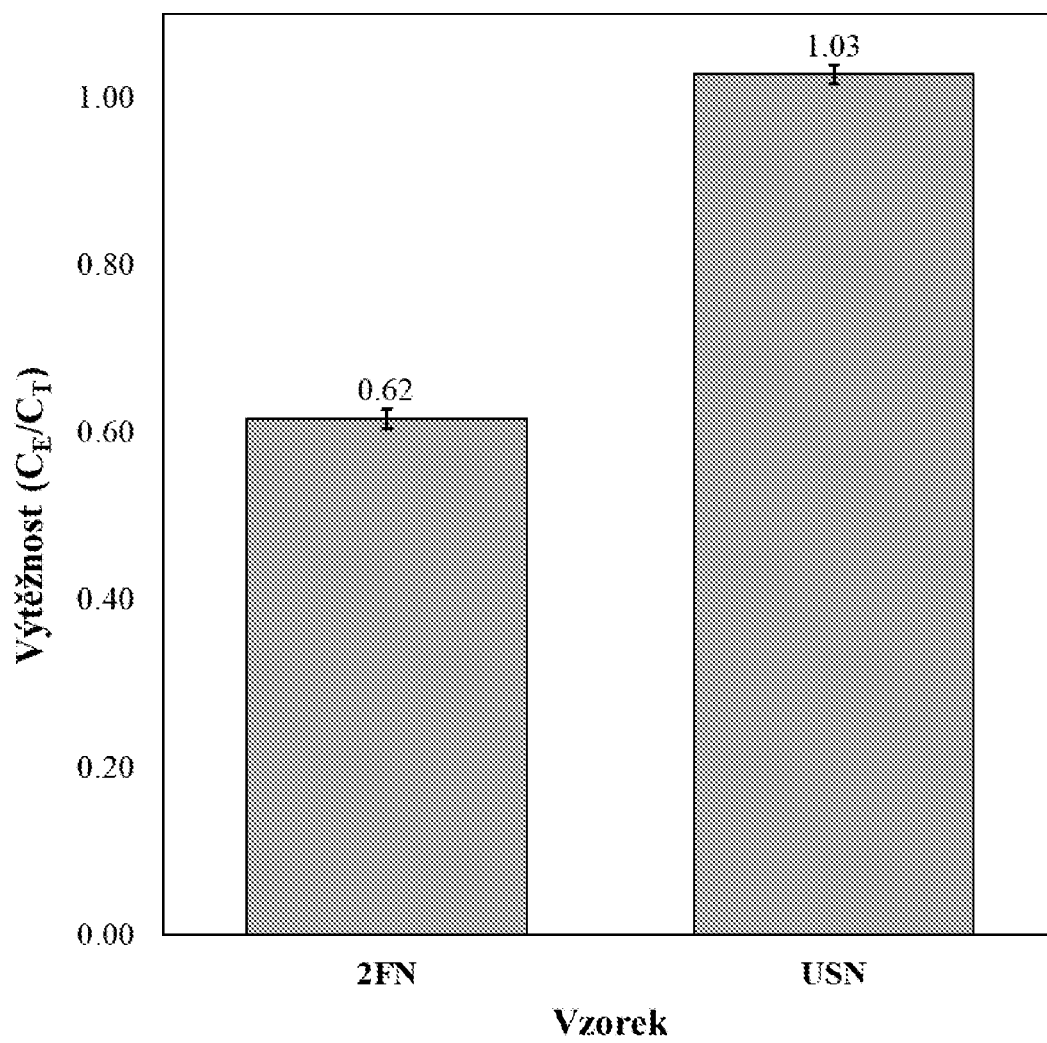
Obr. 4



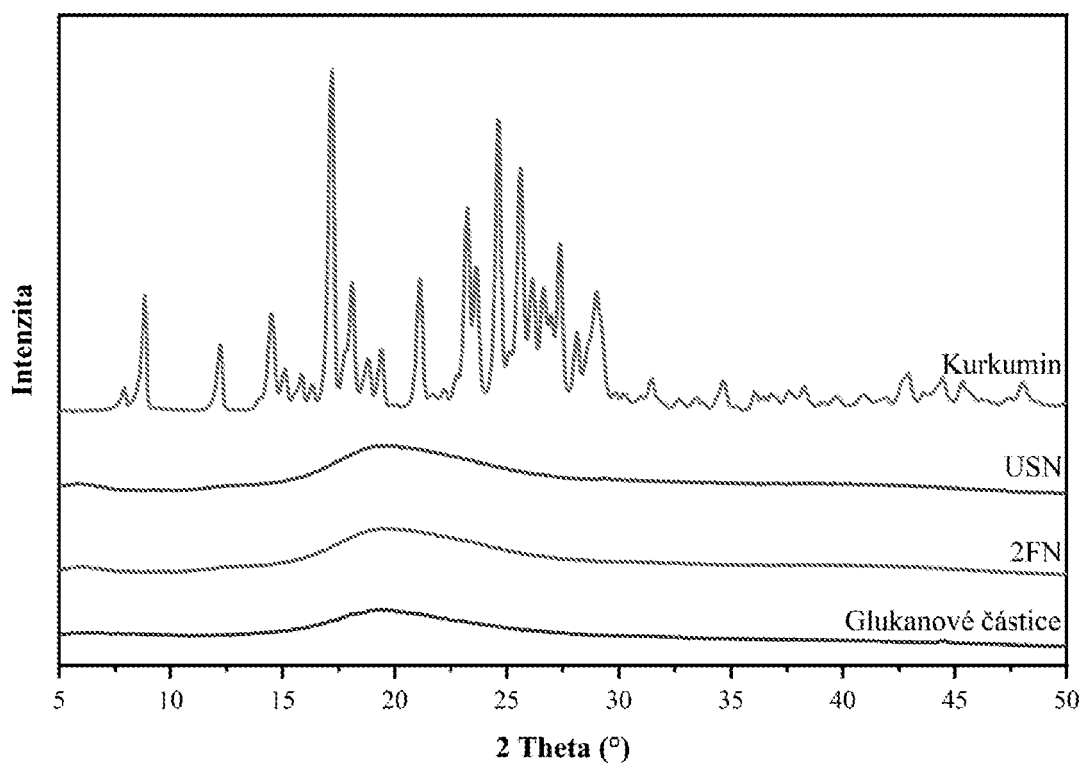
Obr. 5



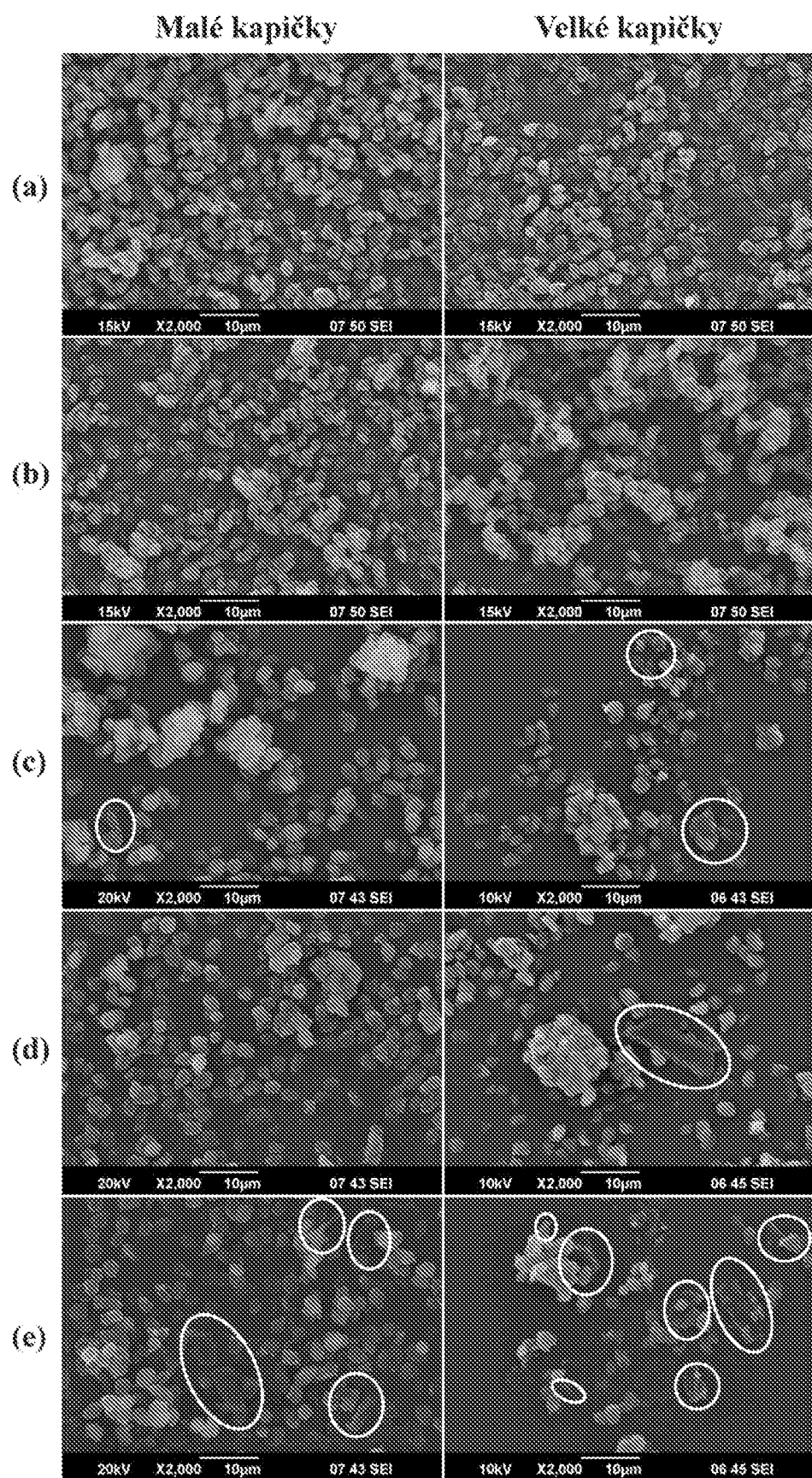
Obr. 6



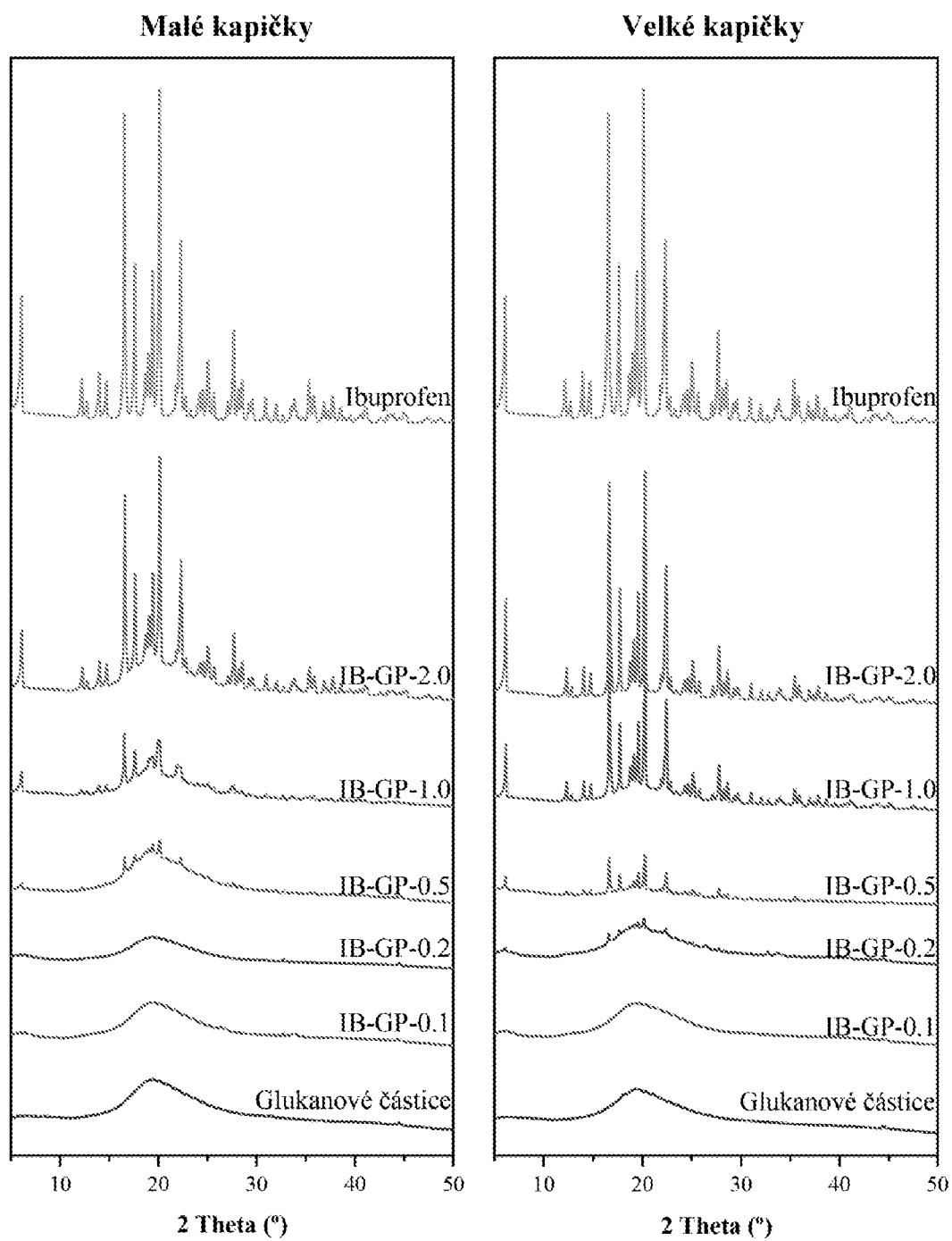
Obr. 7



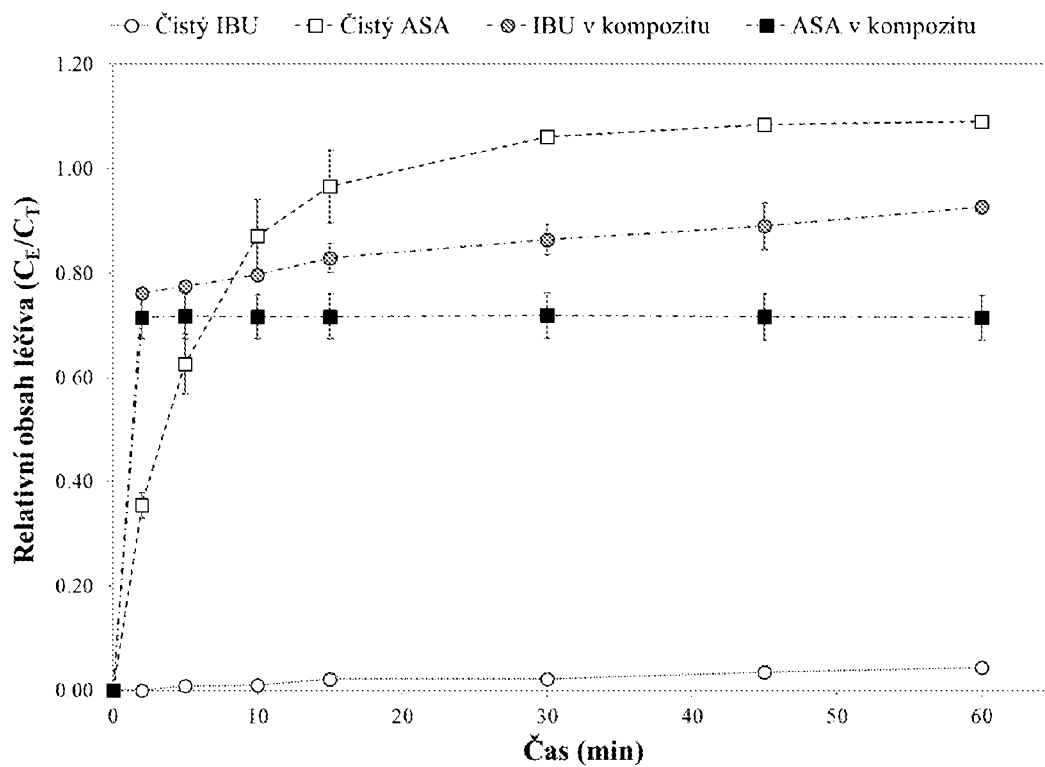
Obr. 8



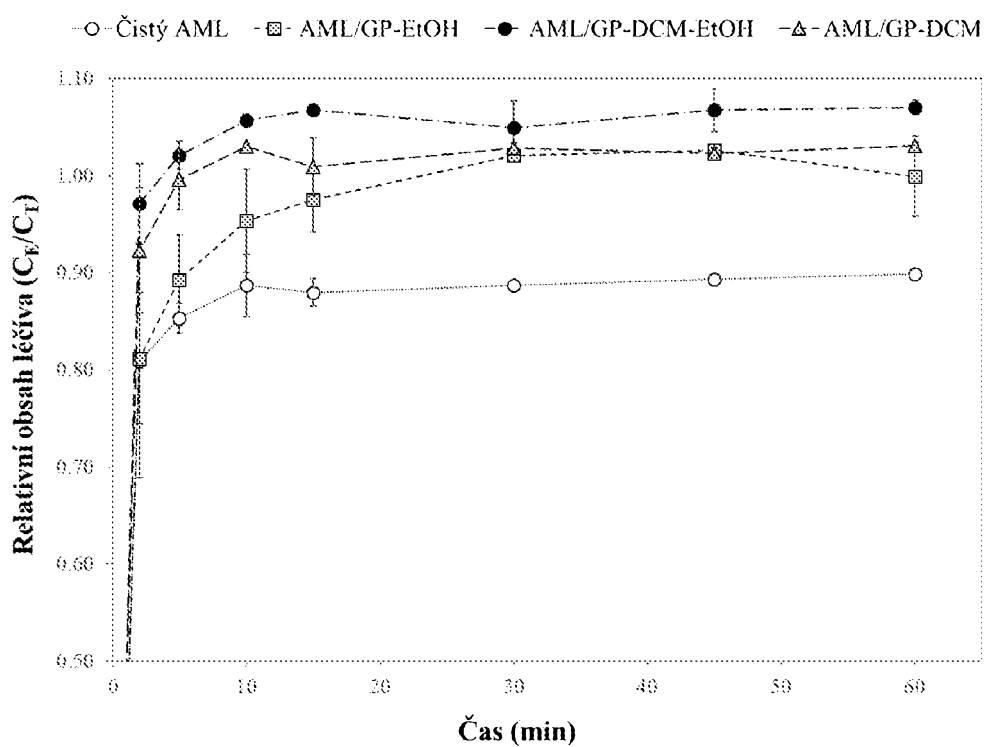
Obr. 9



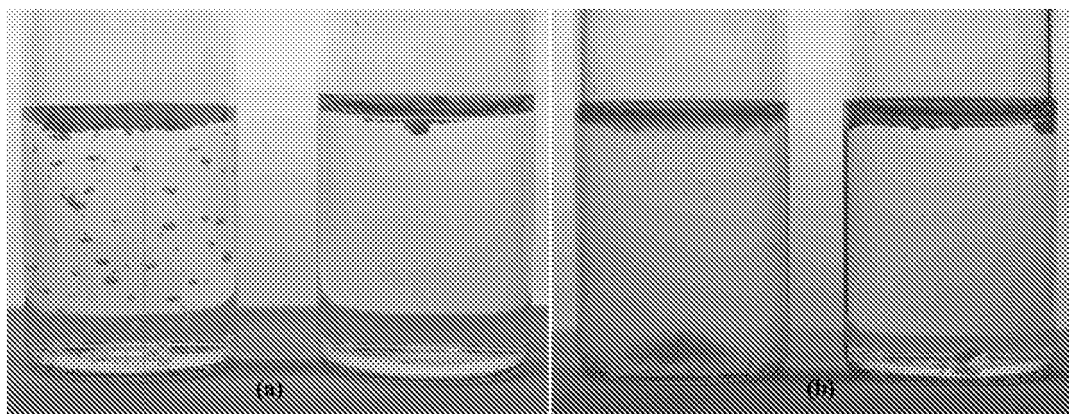
Obr. 10



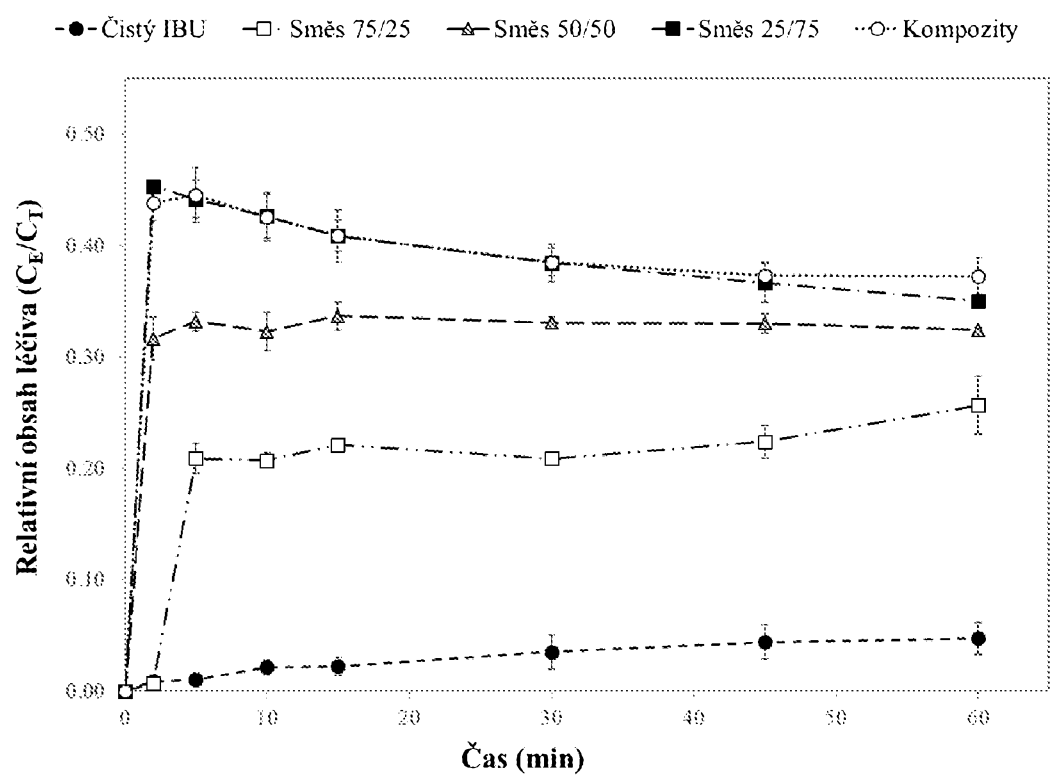
Obr. 11



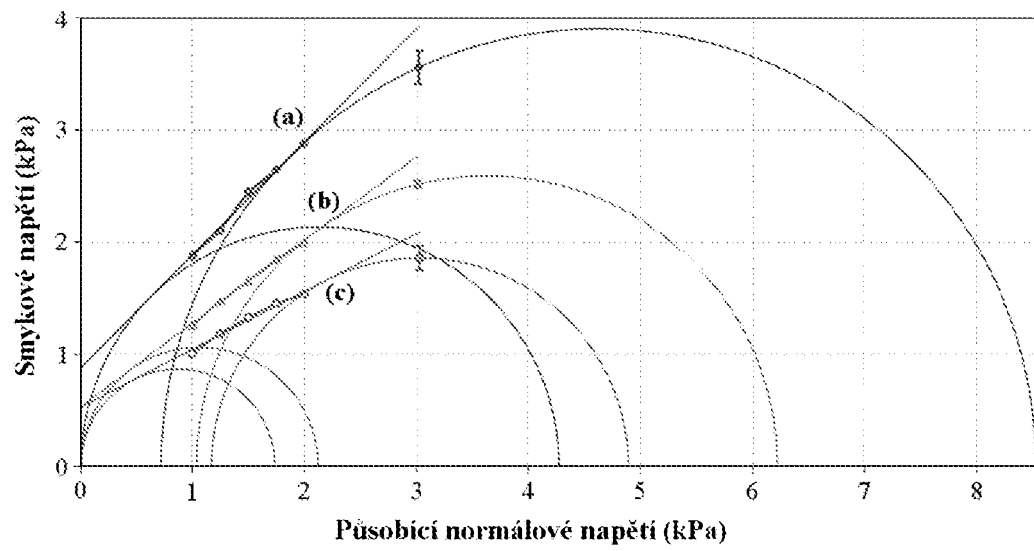
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15