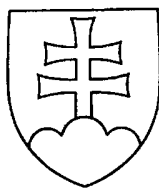


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **6. 12. 2012**
 (31) Číslo prioritnej prihlášky:
 (32) Dátum podania prioritnej prihlášky:
 (33) Krajina alebo regionálna organizácia priority:
 (40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 7. 2014**
 Vestník ÚPV SR č.: **07/2014**
 (62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
 (67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
 (86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
 (87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
 (96) Číslo európskej patentovej prihlášky:

(11), (21) Číslo dokumentu:

96-2012(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. (2014.01):

A61K 47/00(71) Prihlasovateľ: **EUROFINS BEL/NOVAMANN s.r.o., Nové Zámky, SK**

(72) Pôvodca: **Veverka Miroslav, Ing., CSc., Bratislava, SK;**
Veverková Eva, Ing., CSc., Bratislava, SK;
Vodný Štefan, Ing. CSc., Lozorno, SK;
Gallovič Ján, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov **Komplexy β -glukánu a spôsob ich prípravy a ich použitie**

(57) Anotácia:

Vynález sa týka komplexov β -glukánu s minimálne jednou komplex formujúcou látkou vybranou z: kvercetín, taxifolín, naringín, silibín, silibinin, kyselina gálová, kyselina chlorogenová, kyselina salicylová, kyselina acetylsalicylová, taurín, nikotínamid, kyselina izonikotínová, pyridoxín, diosmín, hesperidín, escín, troxuretín, kyselina askorbová, kyselina izoaskorbová, kyselina citrónová, kyselina hydroxycitrónová, kyselina vínna, boswellové kyseliny, kyselina rozmarínová, kyselina glykolová, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosahehexaenová, kyselina asparágová, kyselina trieslová, kyselina chinová, L-lyzín, kyselina p-aminobenzoová, kyselina listová, kyselina pantoténová, cholin chlorid, kyselina glutarová, kofeín, kyselina L-glutámová, kyselina N-acetyl-L-glutámová, L-kamitín, kyselina mliečna, kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina 3,3'-tiidipropiónová, koenzým Q10, kyselina algínová, arginín, asparagín, cysteín, metionín, tiamín, L-kamitín, skopoletín, kurkumín, polykosanol, teanín, teobromín, leucín, lykopén, resveratrol, pterostilben, glutatión, melatonin, chondroitín, glukozamín, donepezil, hydroxymočovina, 4-acetamidofenol, kyselina 4-aminosalicylová, hydrochlorotiazid, telmisartan, agomelatin, tenofovir, emtricitabin, tam-solusin, desloratadín, metoprolol, carbamazepin, giklazid, amiloride, quinacrine, karsalam, duloxetine, ibuprofen, naproxen, diklofenak, piroxikam, furosemid, allopurinol, silodosin, rivoroxaban, acetazolamid, diltiazem, prasugrel, cloroxin, prednison, methotrexat, merkaptopurin, almorexant, laropiprant, sitagliptín, rivoroxaban, vildagliptín, solifenacín, silodosin, galantamín, trimetazín, amlodipín, nifedipín, risperidon, alprazolam, entakapon, leukovorín, dakarbazín, 5-fluorouracil, oxaliplatina, paclitaxel, docetaxel, imatinib, sunitinib, ibandronát, zolendronát, glipizid, metformin, kyselina valpróová. Vynález sa tiež týka spôsobu prípravy týchto komplexov a aj ich použitia na liečebné účely a prípravu liečivých prípravkov.

SK 96-2012 A3

Komplexy β -glukánu a spôsob ich prípravy a ich použitie

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka komplexov β -glukánu s komplex formujúcimi látkami a spôsobu ich prípravy a ich použitia. Komplexy sú v kompozíciách vhodné pre farmaceutické použitie alebo ako výživové doplnky.

Oblasť pôsobenia vynálezu

Glukány sú polysacharidy s dlhým reťazcom, ktorých jediným komponentom je glukóza, v reťazci viazaná väzbami v pozíciách 1 a 3. Menšie postranné reťazce sa vetvia z hlavného reťazca polysacharidu v pozíciách 1 a 6. Z tohto dôvodu sa v niektorých literárnych zdrojoch uvádza β -1,3-glukán aj ako β -1,3/1,6 glukán. V 2011 roku boli glukány *Saccharomyces cerevisiae* povolené v Európskej únii ako nová zložka potravy. Popis β -glukánov, ich biologické aktivity a rozdiely medzi cereálnymi a fungálnymi β -glukánmi uvádza Novák M. in: *Chemické listy* 101, 872-880, 2007; Šturdík E. in: *Nova Biotechnologica* V-I (2005), 105-121 a Vetvička V. in: *Chemické listy*, 2004, roč. 98, č. 11, s. 963. Termín „nutraceutikum“ bol prvýkrát použitý v roku 1989 a vzťahuje sa na produkty, ktoré sa využívajú na prevenciu či stabilizáciu degeneratívnych ochorení stavby či funkcie organizmu. Skupina zahŕňa stopové prvky, fenolické kyseliny, vitamíny, rôzne alkaloidy, oligo a polysacharidy včítane vlákniny, aminokyseliny a látky bielkovinnej povahy, bioflavonoidy, antokyaníny, mastné kyseliny či štruktúrované tuky (tuky s rôznymi mastnými kyselinami na jednotlivých reťazcoch glycerolu) a pod. až po živé baktérie. Je opísaný rad nutraceutických prípravkov obsahujúcich glukán, a na trhu je niekoľko desiatok potravinových a výživových doplnkov s β -glukánom. Doplnky stravy sa vyrábajú v rôznych formách, ako napríklad kapsle, tobolky, tablety, sirup, tinktúra, kvapky. Pre účely vynálezu sú ako komplex formujúce látky (komplexačný partner) vybraté látky označované ako farmaceuticky účinné látky. Zoznam takýchto látok obsahuje napr. databáza EAFUS/FDA a GRAS/FDA. Všeobecne nutraceutiká a farmaceuticky účinné substancie (API) môžu byť aplikované v rôznych formách napr. ako soli, deriváty (pro-drugs) alebo v rôznych fyzikálnych formách ako amorfne, kryštalické polymorfy alebo ako kokryštály (molekulové komplexy alebo adukty v prípade vysokomolekulových látok). Názvoslovie je však nejednotné a pojem kokryštál nahrádza najmä

v patentových spisoch širšie označenie (molekulárny) komplex. Kryštály organickej látky organizované nekovalentnými neväzbovými interakciami sú považované za supramolekulárne útvary. Pri tvorbe molekulárneho komplexu dochádza k vzájomnému rozpoznaniu a následnému usporiadaniu super štruktúry na základe medzimolekulových interakcií. Konformačná flexibilita špirály glukánu s odhalením komplementárnych funkčných skupín zohráva zásadnú možnosť v následnej medzimolekulovej interakcii. V re-denaturačnom kroku dochádza aspoň k čiastočnému obnoveniu natívnej architektúry molekuly.

Spôsob prípravy molekulových komplexov β -glukánu a farmaceuticky účinných látok (nutraceutík a API) podľa vynálezu predstavuje príspevok k jednoduchej a dizajnovanej príprave kombinovaných liečiv a liečiv s riadením uvoľňovaním. Modifikáciou β glukánu s nutraceutikom a alebo API sa získajú látky s priaznivejšími vlastnosťami najmä z hľadiska tvorby formulácii pre orálnu aplikáciu, zníženie toxicity v mieste akumulácie liečiva, transportu účinnej látky na cieľové miesto, stabilitu, rozpustnosť a aj na technologické operácie (mletie, sušenie).

Doterajší stav techniky

Molekulárne komplexy liečiv opisuje rad článkov ako napr. :

Crystal Engineering Approach to Forming Cocrystals of Amine Hydrochlorides with Organic Acids. *Molecular Complexes* of Fluoxetine Hydrochloride with Benzoic, Succinic, and Fumaric Acids. JACS, 2004, 126: 13335-13342 a patentové spisy US 2008/45481, 2008/51453, WO 2010/17343.

Komplexácia β -glukánu a congo red v závislosti od pH a teploty študoval Ogawa in: Biosci Biotechnol Biochem. 1994 Oct;58(10):1870-2.

Spôsob prípravy rozpustných konjugátov oligonukleotidov s β -glukánom opisujú spisy JP 2003/127783, 2004/331758. Ako rozpúšťadlo je použitý DMSO a voda.

Americký patentový spis US 5,741,495 chráni beta glukánové mikročastice inkorporované difúziou cytochromom C a albumínom z kravského séra.

Vo vode rozpustné β glukánové komplexy farmaceuticky účinných látok ako doxorubicín, paclitaxel, valsartan, tioguanín, sunitinib, olanzapin chráni spis WO 2011/063776. Príprava pozostáva s prídavku roztoku API vo vode do 2% roztoku glukánu vo vode a následného 0.1-5% prídavku organického rozpúšťadla.

Japonský patentový spis JP 2011/132223 chráni postup prípravy rozpustnejších foriem paclitaxelu, Q10, škoricových kyselín ako β -glukánových komplexov.

Kokryštály najmä imatinib mezlátu s funkcionalizovanými polysacharidmi uvádza spis WO 2010/081443. Kryštalické alebo amorfné komplexy sú pripravené z vodorozpustných inhibítorov tyrozín kináz a polymérnych tektónov. Príklady 15-17 uvádzajú vykryštalizovanie komplexu z vody po zmiešaní cca 1% roztokov glukánu a imatinib mezlátu.

Metódu prípravy hydrofóbného komplexu karboránu a glukánu rozpustného alebo dispergovateľného vo vode uvádzajú spisy WO2011/065481, JP 2008/222585.

Prípravu a charakterizáciu komplexu ovseného β -glukánu a čajových polyfenolov opisuje Wu (J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 10737-10746). Príprava komplexu spočíva v rozpustení β -glukánu a polyfenolov vo fosfátovom pufri, následnej purifikácii od fosfátových iónov dialýzou a lyofilizácii.

Komplexácia β -D-glukánu s zearalenonom je študovaná v Biomacromolecules, 2004 Nov-Dec;5(6):2176-85, a Biomacromolecules. 2006 Apr;7(4):1147-55.

Inklúzne komplexy β -glukánu a paclitaxelu, naproxenu, a luteolinu sú uvedené v Cyclic β -Glucans from Microorganisms, Production, Properties and Applications, Geetha, 2013, XI, ed. Venkatachalam, Gummadi, Sathyanarayana, Doble, Mukesh.

Nízka rozpustnosť a nevyhovujúce fyzikálnochemické vlastnosti napr. stabilita môžu byť zlepšené u niektorých nutraceutík a liečiv o.i. použitím alternatívnej komplexnej formy. Kvantifikované rozdiely niektorých fyzikálnochemických parametrov (rozpustnosť, rýchlosť rozpúšťania, hydroskopicita...) voči pôvodným formám umožňujú odhadnúť ich účinnosť, dostupnosť a stabilitu. Cieľom je teda získať formy

vykazujúce nízku hygroskopicitu, vysokú stabilitu a dobrú spracovateľnosť pre farmaceutické operácie a stabilizáciu formulácie liečiva.

Doterajšie postupy používali vodorozpustný glukán v koncentrácii ako cca 1-2 % vodný alebo vodno-organický roztok. V takomto prevedení sa pracuje s malou objemovou výťažnosťou a zriedené roztoky sa museli zahusťovať. Známe procesy sa obmedzovali na vo vode rozpustné účinné látky. Zistili sme, že použitím špecifickej hodnoty pH pri príprave komplexov v roztokoch a dokonca aj suspenzii je možné uvedené nevýhody odstrániť a pripraviť komplexy postupom podľa vynálezu vo vysokej čistote a výťažku. Výhodou je, že pre úpravu pH sa cielene využívajú samotné komplex formujúce látky. Ďalej bolo zistené, že postupom podľa vynálezu je možné výhodne pre prípravu komplexov využiť aj mletie alebo miešanie komponent v suspenzii. Predložený vynález rieši problémy prípravy technologicky ľahšie manipulovateľnejších, a stabilnejších foriem molekulových komplexov β -glukánu a komplex formujúcich látok. Spôsob prípravy molekulových komplexov β -glukánu a komplex formujúcich látok vybraných zo skupiny nutraceutík a alebo API podľa vynálezu predstavuje jednoduchý a dizajnovaný postup prípravy liečiv s riadením uvoľňovaním. Modifikáciou β -glukánu s nutraceutikom a alebo API sa takýmto spôsobom získajú látky s priaznivejšími vlastnosťami najmä z hľadiska tvorby formulácii pre orálnu a rektálnu aplikáciu, transportu účinnej látky na cieľové miesto, stabilitu liekovej formy a technologických operácii (mletie, sušenie).

Podstata vynálezu

Vynález rieši vyššie uvedené problémy prípravou komplexov β -glukánu s komplex formujúcimi látkami.

Prvým predmetom vynálezu sú komplexy β -glukánu a minimálne jednej komplex formujúcej látky pričom komplexy sú tvorené supramolekulárnymi väzbami glukánu a komplementárnymi skupinami komplex formujúcich látok.

Ďalším predmetom vynálezu sú komplexy kde sú ako komplex formujúce látky zvolené nutraceutiká a alebo farmaceuticky aktívne látky: kvercetín, taxifolín, naringín, silibín, silibinin, kyselina gálová, kyselina chlorogenová, kyselina salicylová, kyselina acetylsalicylová, taurín, nikotínamid, kyselina izonikotínová, pyridoxín, diosmín,

hesperidín, escín, troxuretín, kyselina askorbová, kyselina izoaskorbová, kyselina citrónová, kyselina hydroxycitrónová, kyselina vínna, boswellové kyseliny, kyselina rozmarínová, kyselina glykolová, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosahexaenová, kyselina asparágová, kyselina trieslová, kyselina chinová, L-lyzín, kyselina p-aminobenzoová, kyselina listová, kyselina pantoténová, cholín chlorid, kyselina glutarová, kofeín, kyselina L-glutámová, kyselina *N*-acetyl-L-glutámová, L-karnitín, kyselina mliečna, kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina 3,3'-tiodipropiónová, koenzým Q10, kyselina algínová, arginín, asparagín, cysteín, metionín, tiamín, L-karnitín, skopoletín, kurkumín, polykosanol, teanín, teobromín, leucín, lykopén, resveratrol, pterostilben, glutatión, melatonín, chondroitín, glukozamín, donepezil, hydroxymočovina, 4-acetamidofenol, kyselina 4-aminosalicylová, hydrochlorotiazid, telmisartan, agomelatín, tenofovir, emtricitabin, tamsolusín, desloratadín, metoprolol, carbamazepín, giklazid, amiloride, quinacrine, karsalam, duloxetin, ibuprofen, naproxen, diklofenak, piroxikam, furosemid, allopurinol, silodosin, rivoroxaban, acetazolamid, diltiazem, prasugrel, cloroxin, prednison, methotrexat, merkaptopurín, almorexant, laropiprant, sitagliptín, rivaroxaban, vildagliptín, solifenacín, silodosin, galantamín, trimetazín, amlodipín, nifedipín, risperidon, alprazolam, entakapon, leukovorín, dakarbazín, 5-fluorouracil, oxaliplatina, paclitaxel, docetaxel, imatinib, sunitinib, ibandronát, zolendronát, glipizid, metformín, kyselina valpróová a ich soli ak je to možné.

Ďalším predmetom vynálezu je postup prípravy komplexov, charakterizovaný tým, že minimálne jedna komplex formujúca látka zo skupiny nutraceutík alebo farmaceuticky aktívnych látok sa vo vode alebo vo vode miešateľnom organickom rozpúšťadle nechá reagovať s β -glukánom vo vode alebo vo vode miešateľnom rozpúšťadle pri definovanej hodnote pH.

Ďalším predmetom vynálezu, je poskytnúť komplexy β -glukánu a komplex formujúcich látok, pre kompozície vhodné pre farmaceutické použitie, alebo ako výživové doplnky.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť komplexy β -glukánu a komplex formujúcich látok vhodné pre stabilizáciu komplex formujúcich látok.

Vzhľadom k štruktúre β -glukánu je zrejmé, že popri komplexácii aktívnych látok tieto môžu byť aj koprecipitované. Podiel jednotlivých interakcií je kontrolovaný chemickou štruktúrou a molekulovou hmotnosťou aktívnej látky a spôsobom prípravy komplexu ako je koncentrácia, pH, teplota, rozpúšťadlo. Objavenie nových molekulových komplexov β -glukánu komplex formujúcich látok zo skupiny nutraceutík a farmaceuticky aktívnych látok ako farmaceuticky využiteľných foriem poskytuje príležitosti na zlepšenie vlastností a účinkov farmaceutických výrobkov. To rozširuje škálu foriem, ktorých formulácie sú k dispozícii pre navrhovanie prípravkov. Vynález sa rovnako týka aj solvátov komplexov a ich polymorfných modifikácií.

Podrobný popis vynálezu

Predložený vynález sa týka komplexov β -glukánu s komplex formujúcimi látkami a spôsobu ich prípravy a ich použitia. Komplexy sú v kompozíciách vhodné pre farmaceutické použitie alebo ako výživové doplnky. Je známe, že jednotlivé β -glukány sa líšia v konfigurácii, vetvení, molekulovej hmotnosti, rozpustnosti a trojrozmernej štruktúre a tieto rozdiely sa odrážajú aj v možných modifikáciách prípravy látok podľa vynálezu. Komplexy β -glukánu s minimálne jednou komplex formujúcou látkou pozostávajú z glukánu a látok vybraných zo skupiny nutraceutík a alebo farmaceuticky aktívnych látok. Komplexy môžu tiež zahrňovať jednu alebo viac molekúl solventu alebo vody na jednotku komplexu. Bolo zistené, že keď β -glukán a vybrané nutraceutikum a alebo API ako partner tvoria komplexy, tento má nové neočakávané vlastnosti. Je známe, že účinok nutraceutík sa zvyšuje, ak sa používajú spoločne. Vybrané nutraceutiká sa prejavujú pri prevencii a liečbe diabetického šedého zákalu, zlepšení mozgového metabolizmu, neuropatie a retinopatie. Kombináciou nutraceutík, napr. s vitamínom C, sa vytvára synergický komplex, pričom vitamín C regeneruje vitamín E. Ovplyvňuje sa tvorba červených krviniek, obnova a rast svalovej hmoty a ďalších tkanív, nezriedka majú močopudné účinky, čím sa znižuje krvný tlak. Nakoľko β -glukán sám má priaznivé vlastnosti je výhodné pripraviť spoločnú formu glukánu a nutraceutík a liečiva. Zvlášť výhodné je pre niektoré kombinácie riadené uvoľňovanie komplexovaného liečiva. Tieto nové formy majú zmenenú rozpustnosť a zvýšenú stabilitu v porovnaní so pôvodnou formou API alebo nutraceutika, bez ohľadu na to, či toto bolo vo forme soli, hydrátu alebo solvátu. Zmeny sa ďalej prejavujú v novej morfológii a viskozite, čo umožňuje lepšiu spracovateľnosť ako napr. mletie alebo

plnenie. Zvlášť výhodný je stabilizačný efekt partnera pre prípravu liekovej formy, nakoľko takýto je zároveň spojený s nastavením vhodnej hodnoty pH prípravku a stabilizáciou účinnej látky. Pripravené komplexy tak umožňujú cielený transport aktívnej látky a jej ochranu biodegradovateľným nosičom pred hydrolytickými reakciami. Vykazujú vysokú stabilitu, nízku hygroskopicitu tuhých foriem, dobrú spracovateľnosť pri technologických operáciách a stabilitu tekutých prípravkov ako sirupy, krémy, injekcie.

Predmetom tohto vynálezu sú polysacharidové komplexy farmaceuticky aktívnych látok vybraných zo skupiny nutraceutík a alebo aktívnych farmaceutických substancií. Pre účely vynálezu sú ako komplex formujúce látky použité kvercetin, taxifolín, naringín, silibín, silibinin, kyselina gálová, kyselina chlorogenová, kyselina salicylová, kyselina acetylsalicylová, taurín, nikotínamid, kyselina izonikotínová, pyridoxín, diosmín, hesperidín, escín, troxuretín, kyselina askorbová, kyselina izoaskorbová, kyselina citrónová, kyselina hydroxycitrónová, kyselina vínna, boswellové kyseliny, kyselina rozmarínová, kyselina glykolová, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosahexaenová, kyselina asparágová, kyselina trieslová, kyselina chinová, L-lyzín, kyselina p-aminobenzoová, kyselina listová, kyselina pantoténová, cholin chlorid, kyselina glutarová, kofeín, kyselina L-glutámová, kyselina N-acetyl-L-glutámová, L-karnitín, kyselina mliečna, kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina 3,3'-tiodipropiónová, koenzým Q10, kyselina algínová, arginín, asparagín, cysteín, metionín, tiamín, L-karnitín, skopoletín, kurkumín, polykosanol, teanín, teobromín, leucín, lykopén, resveratrol, pterostilben, glutatión, melatonín, chondroitín, glukozamín, donepezil, hydroxymočovina, 4-acetamidofenol, kyselina 4-aminosalicylová, hydrochlorotiazid, telmisartan, agomelatín, tenofovir, emtricitabin, tamsolusín, desloratadín, metoprolol, carbamazepín, giklazid, amiloride, quinacrine, karsalam, duloxetin, ibuprofen, naproxen, diklofenak, piroxikam, furosemid, allopurinol, silodosin, rivoroxaban, acetazolamid, diltiazem, prasugrel, cloroxin, prednison, methotrexat, merkaptopurín, almorexant, laropiprant, sitagliptín, rivaroxaban, vildagliptín, solifenacín, silodosin, galantamín, trimetazín, amlolidín, nifedipín, risperidon, alprazolam, entakapon, leukovorín, dakarbazín, 5-fluorouracil, oxaliplatina, paclitaxel, docetaxel, imatinib, sunitinib, ibandronát, zolendronát, glipizid, metformín, kyselina valproová a ich soli ak je to možné. Odborníkovi v oblasti je známe, že je možné použiť aj extrakty obsahujúce uvedené látky. Napr. pre silibín (silybin) extrakt

zo semena *Sylibum marianum* alebo *Linum usitatissimum*, pre kyselinu rozmarínovú napr. *Mellisa officinalis*, pre resveratrol extrakt polyfenolov napr. z červeného hrozna, pre Daidzein, Formononetin, Genistein & Biochanin A (Isoflavonoids) z *Trifolium pratense* L., pre β -boswellové kyseliny *Boswellia serrata* (Salai guggal), pre epigallokatechín gallát extrakt čajových polyfenolov, pre escín extrakt z *Aesculum hypocastanum* L., pre kurkumín kurkuminoidy označované ako komplex z *Curcuma longa*, pre kvercetín bioflavonoidový komplex a pod.

Postup prípravy podľa vynálezu je charakterizovaný tým, že sa:

- a) rozpustí alebo suspenduje β -glukán vo vode alebo v organickom rozpúšťadle s vodou miešateľnom, alebo ich zmesiach a príležitostne sa upraví hodnota pH a
- b) pridá sa komplex formujúca látka a upraví sa hodnota pH a alternatívne sa
- c) pridá ďalšia komplex formujúca látka a
- d) pridá sa anti-rozpúšťadlo, a komplex sa izoluje alebo sa alternatívne rozpúšťadlo oddestiluje a
- e) komplex sa izoluje

Podľa predloženého vynálezu sa v kroku (a) na prípravu roztokov alebo suspenzií používajú rozpúšťadlá vybrané zo skupiny dimetylacetamid, dimetylformamid, alkoholy C₁ až C₃, dimetylsulfoxid, propylénkarbonát, kyselina octová, pyridín, morfolín, dietylénglykol, metoxyetanol, etoxyetanol, acetón a voda alebo ich kombinácie. Pripravuje sa najčastejšie zmiešaním vodných alebo vodno-organických roztokov. Ak sa priamo použije roztok komplexu pre tvorbu formulácie je podmienkou pre výber rozpúšťadla jeho farmaceutická akceptovateľnosť a dispergovateľnosť vo vodnom prostredí. V prípade uskutočnenia v suspenzii sa využije efekt napučievania, v alkalickom prostredí pri pH 7,5 až 12,5 s výhodou 7,9-9,5. V niektorých prípadoch je možné použiť aj soli alkalických kovov napríklad glutatión sodná soľ a vypufrovať prídavkom ďalšieho nutraceutika alebo hydroxidov kovov ako napr. hydroxid sodný, hydroxid draselný alebo hydroxid amónny. V kroku (a) sa používa teplota 10 až 80 °C, s výhodou teplota 20-45°C. Je zrejmé, že je možné jednotlivé zložky pridávať v závislosti na ich rozpustnosti v rozdielnych rozpúšťadlách. V prípade použitia kombinácie rozpúšťadiel, veľké množstvo ďalšieho rozpúšťadla môže viesť k vyzrážaniu látok z reakčného média. Je preto výhodné pridávať ďalšie rozpúšťadlo za stáleho miešania a postupne. Naopak, v niektorých prípadoch môže viesť veľké množstvo rozpúšťadla k zriedenému roztoku, z ktorého sa vyzráža produkt až po dlhom

čase resp. až po čiastočnom zakoncentrovaní. Postupom podľa vynálezu sa tvorba komplexu cielene dosiahne zmenou hodnoty pH počas pôsobenia nutraceutika a alebo API. Požadovaná hodnota pH je 2.1 až 7.0 s výhodou 3.2 až 6.5. Uvedené sa postupom podľa vynálezu uskutočňuje v kroku (b) napríklad priamo pridaním organickej kyseliny ako napr. kyselina vínna, alebo kyselina askorbová. Všeobecne sa pre úpravu pH používajú silnejšie kyseliny napr. kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná. Ale zvlášť výhodné je pre úpravu pH a prípravu komplexov podľa vynálezu kombinovať glukán a nutraceutikum vo forme organickej kyseliny napr. kyselina vínna, alebo askorbová alebo alternatívne jej soľ. V prípade použitia farmaceuticky aktívnej látky vo forme jej odpovedajúcej soli napríklad sulfátu, fosfátu, hydrochloridu je možné vybalancovať žiadanú hodnotu aj vhodne zvoleným množstvom takejto soli ku glukánu. Hodnotu pH možno nastaviť aj použitím vhodného akceptovaného rozpúšťadla ako kyselina octová a jej roztoky. Následne je možné pridať ďalšie nutraceutikum alebo API. Reakčná zmes sa mieša alebo melie do vytvorenia komplexu. Výraz komplex sa týka chemicky a fyzikálne stabilizovaného komplexu vznikajúceho kombináciou β -glukánu a nutraceutika a alebo farmaceuticky účinnej látky pri podmienkach pri ktorých vzniká stabilný komplex. Odborníkovi je zrejmé, že v závislosti na podmienkach prípravy časť aktívnych látok nemusí byť zabudovaná do komplexu s β -glukánom ale prítomná aj vo forme koprecipitátu. Takéto koprecipitáty aktívnej látky obsahujú homogénne distribuovanú aktívnu látku na povrchu glukánu. Podiel jednotlivých nekovalentných interakcií je okrem iného kontrolovaný chemickou štruktúrou, efektívnou veľkosťou a molekulovou hmotnosťou aktívnej látky, stupňom „rozvoľnenia“ reťazca a zdrojom glukánu a spôsobom prípravy komplexu. Komplexy a koprecipitáty je možné kvantifikovať napr. adsorpčnou izotermou, gélovou filtráciou. Prítomnosť koprecipitátu v získanej substancii komplexu je v niektorých prípadoch výhodná vzhľadom k potlačeniu agregácie častíc. V niektorých prípadoch je obsah koprecipitátu menší než 0.5 hmotnostných %, alebo menší než 0.1 hmotnostných %. Je preferované aby koprecipitát v komplexe bol menší než 1 hmotnostné %, avšak môže dosiahnuť až 25 hmotnostných %. Komplex má najčastejšie formu zrazeniny po prídavku anti-rozpúšťadla v kroku (d) ale alternatívne môže byť vo forme pasty, v kryštalickej forme alebo amorfnej forme. Izolácia v kroku (e) sa uskutoční po oddestilovaní rozpúšťadiel napr. lyofilizáciou alebo filtráciou, s výhodou za zníženého tlaku, alebo odstredením. Filtračný koláč je možné premývať rozpúšťadlom inertným za podmienok izolácie, ako sú alkoholy C_1 až C_4 , acetón a ich vodné roztoky. Je zrejmé,

že na tvorbu komplexu môže byť použitá kombinácia viacerých kompatibilných nutraceutík napr. kyselina askorbová-resveratrol, kyselina askorbová-kvercetín, kyselina vínná-nikotínamid, kyselina askorbová-nikotínamid. Komplexy môže byť ďalej inkorporované farmaceuticky akceptovateľnou látkou napr. antokyanidínmi, resp. ich glykozidmi, tokoferolpolyetylénglykoljantáranom, tokoferolpolyetylénglykolpalmitátom, alebo látkou tvoriacou fosfolipidické komplexy. Pomery tuhých zložiek ku glukánu sa môžu líšiť od 0.1 do 55% hmot. pre nutraceutikum alebo API, podľa požadovaných terapeutických účinkov. Je však výhodné nastaviť pomer podľa sily požadovanej formulácie v prípravku. Pre účely vynálezu sú vybrané látky všeobecne označené ako farmaceuticky účinné látky t.j látky spadajúce do definície: AAPS PharmSci 2003; 5 (3) Article 25 (<http://www.pharmsci.org>) a nutraceutiká uvedené v zozname GRAS alebo EAFUS ako aj excipienty akceptované vo farmácii. Pre účely vynálezu sú to kvercetín, taxifolín, naringín, silibín, silibinin, kyselina gálová, kyselina chlorogenová, kyselina salicylová, kyselina acetylsalicylová, taurín, nikotínamid, kyselina izonikotínová, pyridoxín, diosmín, hesperidín, escín, troxuretín, kyselina askorbová, kyselina izoaskorbová, kyselina citrónová, kyselina hydroxycitrónová, kyselina vínná, boswellové kyseliny, kyselina rozmarínová, kyselina glykolová, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosaheptaenová, kyselina asparágová, kyselina trieslová, kyselina chinová, L-lyzín, kyselina p-aminobenzoová, kyselina listová, kyselina pantoténová, cholín chlorid, kyselina glutarová, kofeín, kyselina L-glutámová, kyselina N-acetyl-L-glutámová, L-karnitín, kyselina mliečna, kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina 3,3'-tiodipropiónová, koenzým Q10, kyselina algínová, arginín, asparagín, cysteín, metionín, tiamín, L-karnitín, skopoletín, kurkumín, polykosanol, teanín, teobromín, leucín, lykopén, resveratrol, pterostilben, glutatión, melatonín, chondroitín, glukozamín, donepezil, hydroxymočovina, 4-acetamidofenol, kyselina 4-aminosalicylová, hydrochlorotiazid, telmisartan, agomelatín, tenofovir, emtricitabin, tamsolusín, desloratadín, metoprolol, carbamazepín, giklazid, amiloride, quinacrine, karsalam, duloxetin, ibuprofen, naproxen, diklofenak, piroxikam, furosemid, allopurinol, silodosin, rivoroxaban, acetazolamid, diltiazem, prasugrel, cloroxin, prednison, methotrexat, merkaptopurín, almorexant, laropiprant, sitagliptín, rivaroxaban, vildagliptín, solifenacín, silodosin, galantamín, trimetazín, amlolidín, nifedipín, risperidon, alprazolam, entakapon, leukovorín, dakarbazín, 5-fluorouracil, oxaliplatina, paclitaxel, docetaxel, imatinib, sunitinib, ibandronát, zolendronát, glipizid, metformín, kyselina valproová. Je zrejmé, že uvedené látky môžu byť aj vo forme

farmaceuticky akceptovateľných solí ako napr. hydrochloridu, hydrobromidy alebo sodné soli alebo draselné. Pripravené komplexy a alebo koprecipitáty sa charakterizujú štandardnými technikami napr. meraním vodivosti, FT-IR, NMR, XRPD, UV a DSC. Nakoľko je praktické pre tvorbu makromolekulových komplexov vychádzať z váhových pomerov reaktantov resp. extraktov je v niektorých prípadoch výhodná elementárna analýza alebo HPLC. Všeobecne je optimálna náplň liečivého prípravku závislá od periódy uvoľňovania a sily aktívnej látky. Homogénna zmes glukánu a nutraceutika a alebo API sa tiež môže dispergovať vo vodných alebo vodno-organických roztokoch a následne po tvorbe komplexu sa vzniknutý produkt izoluje napr. odparením rozpúšťadiel, filtráciou, odstredením alebo lyofilizáciou. Výsledná látka sa melie alebo mikronizuje. Výhodné veľkosti častíc produktu sú od 1 μm do 500 μm s výhodou pod 25 μm .

Postupom podľa vynálezu získané komplexy môžu byť použité pre prevenciu alebo liečbu rôznych chorôb. Napríklad pri aplikácii ako antioxidant ich primárna aktivita spočíva v schopnosti zhasť voľné radikály a platí, že ich antioxidačná aktivita všeobecne rastie s počtom hydroxylových skupín a je potenciovaná aj ich prítomnosťou v molekule nutraceutika ako partnera pre tvorbu komplexu. Ich použitie zahŕňa, ale nie je limitované, na prípravu nutraceutík a liečiv na prevenciu a liečenie chronickej žilovej nedostatočnosti, detoxikáciu organizmu, alergií, artritíd, ateroskleróz, kolorrektálneho karcinómu, diabetes, zlepšení mozgového metabolizmu, neuropatie a retinopatie, vysokého cholesterolu, vysokého krvného tlaku, zápalov, mŕtvice, vredového ochorenia tráviaceho systému, mykóz, dermatitíd, neurodegeneratívne ochorenia ako Alzheimerova choroba, regeneráciu po ischemickej cievnej mozgovej príhode alebo infekčné choroby spôsobené baktériami. Samotné komplexy β -glukánu a nutraceutík pripravené postupom podľa vynálezu môžu napomôcť pri detoxikácii hrubého čreva.

Vynález sa rovnako týka aj solvátov komplexov a ich polymorfných modifikácii. Objavenie nových komplexov β -glukánu a nutraceutík a alebo API ako farmaceuticky využiteľných zlúčenín poskytuje nové príležitosti na zlepšenie vlastností a účinkov farmaceutických výrobkov. Molekulárny komplex môže byť vytvorený aj viacerými komplementárnymi nutraceutikami. To ďalej rozširuje repertoár foriem, ktorých formulácie mám k dispozícii pre navrhovanie prípravkov. Je zrejmé, že je možné ďalej látky pripravené postupom podľa vynálezu vo formulácii doplniť prídavkom napr. piperínu alebo vo forme fosfolipidických komplexov. Autori vynálezu zistili, že vyššie

uvedené komplexy glukánu môžu prekvapivo tvoriť vhodnú maticu pre stabilizáciu komplex formujúcich látok bez straty biologickej aktivity. Uvedené je pozoruhodné nakoľko je známe, že množstvo týchto látok je citlivých na podmienky technologického procesu alebo skladovanie. Stabilita nových komplexov bola sledovaná pri vystavení definovanej vlhkosti. Tieto boli ponechané v stabilitej komore do bodu, kedy sa dosiahla rovnováha. Obsah vody bol stanovený pre každú formu gravimetricky (% obsahu vody bolo stanovené v prepočte na vstupnú látku). Pozorovalo sa, že komplex tvorený β -glukánom a nutraceutikom ako kyselina vínna, kyselina askorbová, kyselina izoaskorbová a kyselina mliečna a galantamín hydrobromidom je podstatne menej hygroskopický než samotný galantamín hydrobromid pri 95 % r.h. a teplote 25°C. Zistilo sa, že v záťažovej komore (Aquadyne DVS-2, podmienky: %RV-5%, dm/dt 0.008% mg/min 10min., opakované cykly) po expozícii vlhkosťou 95% r.v., pri 25°C vzorka komplexu β -glukán (*S. cerevisiae*)-kyselina askorbová-galantamín hydrobromid sorbovala 0.12 % vody pričom samotný galantamín hydrobromid sorboval 3.6% vody. Analogicky v prípade komplexu β -glukán (*S. cerevisiae*)-kyselina izoaskorbová-galantamín hydrobromid sa dosiahla hodnota 0.4 % a pričom kyselina izoaskorbová sorbovala 5% vody. Nižšia hygroskopicita komplexov pripravených podľa vynálezu je výhodou pre spracovanie a skladovanie v kryštalickej forme. Z toho vyplývajúcou ďalšou výhodou kokryštálov podľa tohto vynálezu je jednotnosť produktu a stabilita, v dôsledku čoho sa u týchto látok zlepšujú ich mechanické vlastnosti pre spracovanie (filtrácia, sušenie, mletie a pod.). Ak sú využité ako farmaceutické látky, komplexy podľa vynálezu sa podávajú vo forme farmaceutických kompozícií. Kompozície môžu byť pripravené pre ľubovoľný spôsob aplikácie a príprava vhodnej farmaceutickej kompozície pre konkrétny spôsob podávania je dobre známa odborníkom vo farmácii. Predložený vynález sa teda týka aj farmaceutických kompozícií, ktoré obsahujú terapeuticky významné množstvo komplexov glukánu s komplex formujúcimi látkami spolu s farmaceuticky prijateľným riedidlom alebo nosičom. Významný je stabilizujúci efekt glukánu pri príprave sirupov ako liekovej formy alebo mletí suroviny. Podľa ďalšieho aspektu vynálezu sa formulácie môžu pripraviť vo forme roztokov alebo suspenzií molekulárnych kryštálov vo farmaceuticky prijateľnom rozpúšťadle. Tvorbou komplexu s glukánom sa zabráni reakcii reaktívnej skupiny nutraceutika a alebo API s vodou, kyslíkom alebo inými látkami vo formulácii. Takto je stabilita nutraceutika a API v kompozícii podľa vynálezu zlepšená tvorbou komplexu podľa vynálezu. Je zrejmé, že výber konkrétneho typu, a množstva glukánu v kompozícii na dosiahnutie

požadovaných vlastností môže byť jednoducho vykonané odborníkom v odbore. Vo výhodnej forme sú farmaceutické kompozície podľa vynálezu pripravené pre krémy alebo injekcie, napr. pre intravenóznú aplikáciu. Typická kompozícia pre injekčnú aplikáciu zahŕňa sterilný izotonický vodný roztok a korozpúšťadlo napr. etanol, polyetylén glykol. Takýto prípravok môže zahŕňať chelatačné činidlo, lecitín a antioxidant, ale výhodou podľa vynálezu je použitie komplexu, ktorého partner/i kombinuje uvedené vlastnosti. Spôsob ich prípravy podľa tohto vynálezu závisí od zručnosti osôb majúcich príslušnú kvalifikáciu v danej oblasti. Komplexy glukánu, nutraceutika a alebo API podľa uvedeného vynálezu sa môžu výhodne spracovať do farmaceutických prostriedkov. V tomto prípade sa hlavná aktívna zložka použije v kombinácii s niektorými prvkami, ako sú spojivá, plnivá, lubrikanty, riedidlá, stabilizátory, chelatačné činidlá, dezintegranty, mazivá podľa požadovaného podania. Výhodné je kombinovať v prípravkoch kde nové komplexy tvoria nutraceutiká ďalšie známe nutraceutikum alebo ingrediencie ako vitamíny, flavonoidy.

Pevné perorálne liekové formy sú napríklad tvrdé želatínové kapsuly a tablety. V prípravkoch podľa tohto vynálezu sa množstvo komplexu pohybuje v rozpätí od 5% do 85%, najvýhodnejšie 5% až 50% hmotnosti. Riedidlá, ktoré môžu byť začlenené podľa uvedeného vynálezu, sú prednostne vybrané zo skupiny prírodných alebo umelých uhl'ohydrátov, ako je napríklad laktóza, sacharóza, glukóza, škroby, sorbitol a mikrokryštalická celulóza. Zo spojív sú prednostne vybrané škroby, cukry, celulóza a jej deriváty, želatína a polyvinylpyrolidón. Škrob a mikrokryštalická celulóza majú prednosť v použití ako dobré disintegranty. Preferuje sa najmä Avicel (TM), typ komerčnej mikrokryštalickej celulózy. Mazivá použité pre pevné liekové formy sú vybrané zo skupiny pozostávajúcej z mastenca, oxidu kremičitého, magnézium stearátu, glidantu, aerosólu, kyseliny stearovej a stearínu. Aplikácie sú injekcie obsahujúce 1 až 2 mg/ml komplexu glukánu, nutraceutika a alebo API na celkový objem injekcie. Ako riedidlo je použitá voda a farmaceuticky akceptovateľné rozpúšťadlá v objeme 10 až 70% na objem injekcie. Ako farmaceuticky akceptovateľné rozpúšťadlá sa použijú etanol, propylén glykol, polyetylén glykol a pod. Všeobecne sa pre úpravu pH používajú napr. kyselina chlorovodíková, kyselina citrónová, kyselina vínna, kyselina askorbová, kyselina etyléndiamíntetraoctová. Avšak postupom podľa vynálezu ak sú tieto látky už zabudované do komplexu nie je nutné ich pridávať osobitne. Injekcie ďalej môžu obsahovať farmaceuticky akceptovateľný stabilizátor. Aj v tomto prípade je vhodné využiť ako farmaceuticky akceptovateľný stabilizátor nutraceutického partnera napr. L-

cysteín, kyselinu 3,3'-tiodipropiónovú, kyselinu askorbovú, kyselinu gálovú, kyselinu etyléndiamíntetraoctovú a ich soli.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Látky ktoré sú predmetom vynálezu boli charakterizované FT-IR spektrom, Ramanovým spektrom, UV-VIS spektrom, teplotou topenia, DSC/TGA a XRPD.

Obrázok č. 1a-g predstavuje Fourierove transformačné infračervené spektrá FTIR vybraných komplexov meraných na prístroji Spektrometer Nicolet, Impact 410. Na meranie bola použitá ATR meracia technika, program Omnic verzia 5.2.

Obrázok č. 1a: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kyselina listová-kurkumín, kurkumín, kyselina listová (horná línia)

Obrázok č. 1b: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kyselina askorbová-nikotínamid, kyselina askorbová-nikotínamid (horná línia)

Obrázok č. 1c: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kurkumín, kurkumín (horná línia)

Obrázok č. 1d: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kyselina listová, kyselina listová (horná línia)

Obrázok č. 1e: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-koenzým Q10, koenzým Q10 (horná línia)

Obrázok č. 1f: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-allopurinol, allopurinol (horná línia)

Obrázok č. 1g: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-ibuprofen, ibuprofen (horná línia)

Obrázok č. 2a-d uvádza fotografie z polarizačného mikroskopu (Nikon Eclipse LV 100POL) β -glukánu a vybraných komplexov

Obrázok č. 2a: β -glukán, komplex β -glukán-kvercetín (vpravo)

Obrázok č. 2b: komplex β -glukán-kurkumín, kurkumín (vpravo)

Obrázok č. 2c: komplex β -glukán-koenzým Q10, koenzým Q10 (vpravo)

Obrázok č. 2d: komplex β -glukán-kyselina listová, kyselina listová (vpravo)

Obrázok č. 3a-c predstavuje vybrané difraktogramy (XRPD-röntgenová prášková difrakcia). Meranie sa robilo na práškovom difraktometri: Bragg-Brentano diffractometer Philips PW 1730/1050, s kobaltovou lampou: β -filtered $\text{CoK}\alpha$ radiation, napätie 40 kV/35 mA, rozsah $3^\circ - 51^\circ 2\Theta$, krok 0.02° . Kľúčové medzirovinné vzdialenosti a relatívne intenzity k obrázkom sú uvedené v sprievodnej tabuľke.

Obrázok č. 3a: kyselina askorbová (spodná línia), komplex β -glukán-kyselina askorbová (stredná línia), β -glukán (horná línia).

Obrázok č. 3b: kyselina askorbová (spodná línia), nikotínamid, komplex β -glukán-kyselina askorbová-nikotínamid (stredná línia), glukán (horná línia)

Obrázok č. 3c: β -glukán (spodná línia), komplex β -glukán-koenzým Q10 (horná línia)

Obrázky č.4 a-b uvádzajú záznamy získané diferenčnou kompenzačnou kalorimetriou (DSC). DSC merania sa uskutočnili za použitia prístroja Perkin-Elmer DSC-7 (Perkin-Elmer, USA) so softwarom Pyris. Teplotná škála bola kalibrovaná za použitia In, Sn a Zn. Entalpická škála bola kalibrovaná na entalpiu topenia In. Vzorky o hmotnosti 3-4 mg sa umiestnili v štandardnej zalisovanej hliníkovej miske, ako očistný plyn sa použil dusík. Na záznamoch sú endotermické píky orientované nahor. Záznamy sú korigované na základnú líniu. Rýchlosť ohrevu bola 10°C/ min, v teplotnom rozsahu 100-250°C.

Obrázok č.4a, DSC záznam: fyzikálna zmes glukán kurkumín 9:1 (dolná línia), komplex glukán kurkumín 9:1, glukán, kurkumín (horná línia)

Obrázok č.4b, DSC záznam: komplex glukán-kyselina askorbová 1:1 (dolná línia), komplex glukán-kyselina askorbová-nikotínamid 1:1:1, glukán, fyzikálna zmes glukán-kyselina askorbová 1:1 (horná línia)

Obrázky č.5 a-e uvádzajú UV-VIS spektrá získané UV-VIS spektrofotometrom Spekord M 40, UV-VIS Zeiss Jena s kremennými kyvetami 1,0 cm, ktorý má v oblasti 200-400 nm rozlišovaciu schopnosť 0,06-0,12 nm. Vzorky sa pripravili ako roztoky v 50% metanole (UV).

Obrázok č.5a, UV spektrum: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kvercetín, kvercetín (horná línia)

Obrázok č.5b, UV spektrum: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kyselina askorbová-nikotínamid, kyselina askorbová-nikotínamid (horná línia)

Obrázok č.5c, UV spektrum: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kurkumín, kurkumín (horná línia)

Obrázok č.5d, UV spektrum: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-koenzým Q10, koenzým Q10 (horná línia)

Obrázok č.5e, UV spektrum: β -glukán (dolná línia), komplex β -glukán-kyselina listová, kyselina listová (horná línia)

Obrázok č.6a HPLC záznam komplexu β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*)-kyseliny boswelové (BSWA): 11-keto-BSWA, 3-Acetyl-11-keto-BSWA, beta-BSWA, 3-acetyl-beta-BSWA

Obrázok č.6b HPLC záznam komplexu β -glukán (*Schizophyllum commune*)-kyseliny boswelové (BSWA): 11-keto-BSWA, 3-Acetyl-11-keto-BSWA, beta-BSWA, 3-acetyl-beta-BSWA

Obrázok č.7a Distribúcia a veľkosť častíc komplexu β -glukán, mikronizovaný

Obrázok č.7b Distribúcia a veľkosť častíc komplexu β -glukán

Graf č.1: Vplyv prídavku glukánu ako zmena vodivosti (plné krúžky) a hodnoty pH (plné štvorce) vodného roztoku kyseliny askorbovej.

Graf č.2: Vplyv prídavku etanolu ako zmena vodivosti (plné krúžky) a hodnoty pH (plné štvorce) vodného roztoku komplexu β -glukán-kyselina askorbová.

V nasledovných príkladoch je opísaný spôsob prípravy komplexov podľa predloženého vynálezu. Príklady slúžia na ďalšie objasnenie predkladaného vynálezu bez toho, aby v zmysle vynálezu ohraničovali jeho uskutočnenie na opísané príklady.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Príprava komplexu β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*)-kyselina citrónová-kyselina salicylová

K 60 mg suchého β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*) sa pridali 2 ml 10% kyseliny octovej a zmes sa miešala pri teplote 37°C pričom sa postupne pridávala kyselina citrónová do hodnoty pH 2.17. Následne sa pridalo 13mg kyseliny salicylovej v jednej dávke a zmes sa miešala počas 30minút pričom sa ochladila na 20°C a nechalo stáť pri teplote 20°C počas 12 hodín. Následne sa pridali postupne 3.5m etanolu a nechalo stáť pri teplote 5°C počas 12 hodín, hodnota pH 2.83. Vylúčená látka sa odstredila, premyla vodou a 3x 3ml 50% etanolom a vysušila pri teplote 40°C do konštantnej váhy.

Následne sa produkt podrobil mletiu vo vibračnom guľovom mlyne počas 10 minút. Získalo sa 65 mg komplexu β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*)- kyselina citrónová-kyselina salicylová. Látka bola charakterizovaná XRPD, IR, DSC a RTG štruktúrnou analýzou. Obsah kyseliny salicylovej (HPLC) 18.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Strata sušením bola stanovená termogravimetricky (TG) <0.21%.

Príklad 2

Príprava komplexu β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*)-kyselina askorbová-hydroxymočovina.

K 100 mg β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*) sa pridalo 2.1 ml vody a zmes sa miešala s postupným prídavkom 12.5 mg kyseliny askorbovej počas 12 hodín pri teplote 45°C, a upravila sa hodnota pH zmesi na 3.85. Následne sa pridalo 10mg hydroxymočoviny a miešalo cez noc. K reakčnej zmesi sa pridalo 5.0ml etanolu a nechalo stať počas 1 hodiny. Tuhá látka sa odstredila, premyla vodou a 2x 3ml etanolom a vysušila pri teplote 40°C do konštantnej váhy. Získalo sa 80 mg β -glukán (*Saccharomyces cerevisiae*)-kyselina askorbová-hydroxymočovina. Strata sušením stanovená termogravimetricky (TG) <1.9%.

Príklad 3

Príprava komplexu β -glukán-allopurinol

K 350mg glukánu sa pridalo 8ml vody a prídavkom 10% NaOH sa upravila hodnota pH na 12.35. Zmes sa podrobila sonifikácii 2x15 min v ultrazvukovom kúpeli. Následne sa pridalo 40mg allopurinolu a prídavkom 10% HCl sa upravila hodnota pH na 6.07. Zmes sa podrobila sonifikácii 2x 20minút. Zmes sa nechala stať cez noc v chladničke. Následne sa pridalo 9ml etanolu a zmes sa nechala stát' 6 hodín v chladničke. Produkt sa odstredil, premyl 2x 3ml 60% etanolom a vysušil pri teplote 45°C za vákua. Tuhá látka sa odstredila, premyla vodou a 2x 3ml 96% etanolom a vysuší pri teplote 40°C do konštantnej váhy. Získalo sa 80 mg komplexu β -glukán-allopurinol, obsah (UV) 6.8 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Strata sušením stanovená termogravimetricky (TG) <2.8%.

Príklad 4-16

Analogicky podľa príkladu 2 sa pripraví séria komplexov s tým, že sa použili uvedené účinné látky (API) resp. ich soli, partner a rozpúšťadlo.

Príklad	API	rozpúšťadlo	Partner
Príklad 4	duloxetin	metanol/voda	extrakt <i>Hypericum perforatum</i> (70%)
Príklad 5	piroxikam	metanol/voda	kyselina askorbová
Príklad 6	sitagliptin	DMF	kyselina glutámová,
Príklad 7	methotrexat	acetón/voda	EDTA Na
Príklad 8	docetaxel	DMF/voda	5-fluorouracil
Príklad 9	silodosín	etanol/voda	nikotinamid
Príklad 10	vildagliptin	metanol	kyselina izoaskorbová
Príklad 11	quetiapin	etanol/voda	trehalóza/ kyselina fumarová

Príklad 12	ibuprofen	DMSO	lyzín
Príklad 13	solifenacin	metanol	kyselina jantárová
Príklad 14	kofeín	voda	taurín
Príklad 15	5-fluororacil	pyridín	kvercetí
Príklad 16	4-acetamidofenol	acetón/voda	kofeín

Príklad 17

Príprava komplexu β -glukán (*Schizophyllum commune*)-imatinib mezlát-kurkumín

K 350 mg β -glukán (*Schizophyllum commune*) v 4ml dimetylsulfoxidu sa pridalo 35 mg imatinib mezlátu a 12.5mg kurkumínu. Zmes sa miešala cez noc pri teplote 22°C. K reakčnej zmesi s hodnotou pH 5.85 sa za intenzívneho miešania postupne pridalo 8ml vody a nechalo stať počas 12 hodiny. Pridalo sa 4.5ml acetónu, miešalo 12 hodín a reakčná zmes sa odstredila, premyla vodou 2x2.5ml a 2x 3ml acetónom a vysušilo pri teplote 40°C. Získalo sa 180 mg komplexu β -glukán-imatinib mezlát-kurkumín. Strata sušením stanovená termogravimetricky (TG) <2.8%.

Príklad 18

Príprava komplexu β -glukán-kyselina listová

K 350mg ražného glukánu sa pridalo 8ml dimetylsulfoxidu a prídavkom 10% NaOH sa upravila hodnota pH na 11.00. Zmes sa podrobila sonifikácii 2x15 min v ultrazvukovom kúpeli. Následne sa pridalo 35mg kyseliny listovej a hodnota pH sa upravila na 10.54. Zmes sa podrobila sonifikácii 2x 20minút, následne sa pridalo 18ml vody a prídavkom 10% HCl sa upravila hodnota pH na 4.59. Zmes sa nechala stať cez noc v chladničke. Pridali sa 3ml etanolu a zmes sa opäť nechala stať 6 hodín v chladničke. Produkt sa odstredil, premyl 2x 3ml 60% etanolom, 3x3ml 96% etanolom a vysušil pri teplote 45°C za vákua. Získalo sa 325 mg komplexu β -glukán-kyselina listová. Strata sušením stanovená termogravimetricky (TG) <0.15%.

Príklad 19

Príprava komplexu β -glukán-tamsolusín-kyselina citrónová

K 100 mg β -glukán (*Pleurotus ostreatus*) sa pridalo 3.5 ml vody a 20mg tamsolusin hydrochloridu a niekoľko kvapiek kyseliny octovej a zmes sa miešala cez noc pri teplote 35°C. K reakčnej zmesi s hodnotou pH 5.8 sa pridalo 8.5mg citronanu sodného. Hodnota pH sa upravila na 3.85 kyselinou chlorovodíkovou a miešalo počas 12 hodín.

Tuhá látka sa odstredila, premyla vodou a 2x 3ml 96% etanolom a vysuší pri teplote 40°C do konštantnej váhy. Získalo sa 80 mg komplexu β -glukán-tamsolusín-kyselina citrónová. Strata sušením stanovená termogravimetricky (TG) <2.8%.

Príklad 20

Príprava komplexu β -glukán (*Pleurotus ostreatus*)-kyselina askorbová-nikotínamid

K 60mg glukánu v mlecej nádobe, objemu 10 ml (nerezová oceľ) sa pridalo 30 mg kyseliny L-askorbovej a 10mg nikotínamidu a premiešalo špachtľou. Následne sa pridalo 0.5 ml 80% 2-propanolu a mlecie guľa 2 mm, (nerezová oceľ). Suspenzia sa mlela 2 x po 0.5 hodine po premiešaní (uvoľnení látok zo stien) v mlyne MM200 frekvencia 12/s a ponechala stáť cez noc. Produkt sa vybral a sušil pri teplote 45°C. Získalo sa 50mg komplexu β -glukán (*Pleurotus ostreatus*)-kyselina askorbová-nikotínamid. Strata sušením stanovená termogravimetricky (TG) <0.22%.

Príklad 21

Príprava komplexu β -glukán-kyselina askorbová-resveratrol

K 350mg glukánu sa pridalo 3.5ml vody a prídavkom 10% NaOH sa upravila hodnota pH na 12.1. Zmes sa podrobila sonifikácii 2x15 min v ultrazvukovom kúpeli. Následne sa pridalo 150 mg extraktu polyfenolov z červeného hrozna (s obsahom 10% resveratrolu), zmes sa podrobila sonifikácii 2x 20minút a následne sa pridalo 127mg kyseliny askorbovej a prídavkom 10% HCl upravila hodnota pH na 3.55. Zmes stála cez noc v chladničke. Pridalo sa 8ml 2-propanolu za miešania a zmes sa opäť nechala stáť 12 hodín v chladničke. Produkt sa odstredil, premyl 2x 3ml 60% 2-propanolu a vysušil pri teplote 45°C za vákua. Následne sa pomlel a zmiešal s 400 mg tokoferolpolyetylénglykoljantarunu (TPGS, Eastman-Kodak) pri 65 až 70°C. Po ochladení na 5-10°C v chladničke sa pastovitý produkt rozotrel. Získalo sa 690 mg disperzie komplexu β -glukán-kyselina askorbová-resveratrol v TPGS.

Príklad 22

Príprava komplexu β -glukán-kyselina askorbová-koenzým Q

Postupom analogickým ako v príklade 17 s tým, že sa použije koenzým Q a získaný komplex sa následne miešal s 400mg tokoferolpolyetylénglykoljantarunu (TPGS, Eastman-Kodak) pri 65 až 70°C. Získalo sa 485 mg disperzie komplexu β -glukán-kyselina askorbová-koenzým Q v TPGS.

Príklad 23

Príprava komplexu β -glukán-kurkumín

K 350mg glukánu sa pridalo 8ml dimetylsulfoxidu a 35mg kurkumínu. Zmes za podrobila sonifikácii 2x15 min v ultrazvukovom kúpeli. Postupne sa pridalo 16ml vody a následne sa prídavkom 10% HCl upravila hodnota pH na 3.85. Zmes sa nechala stať cez noc v chladničke. Reakčná zmes sa odstredila, premyla 3x 10ml 60% etanolom a vysušil pri teplote 45°C za vákua. Získaný komplex β -glukán-kurkumín sa následne miešal s 100mg fosfatidilcholínu a sójového lecitínu (1:1) pri 55 až 60°C. Získalo sa 325 mg disperzie komplexu β -glukán-kurkumín.

Príklad 24

Prípravok komplexu β -glukán (*Pleurotus ostreatus*)-kyselina askorbová-kurkumín

Zloženie jednej tablety hmotnosti 500mg:

komplex β -glukán (*Pleurotus ostreatus*)-kyselina askorbová-kurkumín 225mg (32.7 μ g mg⁻¹, 4.2 μ g mg⁻¹)

silymarin (ako 80% extrakt) 25.0mg

koenzým Q10 10 mg

hydrofosforečnan vápenatý 200.0mg

oxid kremičitý 5.0mg

stearát horečnatý 10.0mg

poťahovacie látky (zmes hydroxypropylcelulóza, mastenec, glycerín, mikrokryštalická celulóza, oxid titaničitý, chlorofylín) 25 mg.

Príklad 25

Prípravok komplexu β -glukán-kurkumín

Zloženie jednej kapsle hmotnosti 500mg:

komplex β -glukán –kurkuminoidy 350mg (ako kurkumín, demetoxykurkumín a bisdemetoxykurkumín)

Mikrokryštalická celulóza – objemové činidlo

Stearan horečnatý – protihrudkujúca látka

Želatína – obal kapsule

Príklad 25

Sirup komplexu β -glukán (*Pleurotus ostreatus*)-koenzým Q 10-kyselina askorbová (5 ml) obsahuje

komplex β -glukán (*Pleurotus ostreatus*)-koenzým Q10-kyselina askorbová 120mg (28.1 μ g mg⁻¹, 42.12 μ g mg⁻¹))

niacín 1,35 mg,

kyselinu pantoténovú 0,45 mg

vitamín B6 0,15 mg

vitamín B1 0,10 mg
 kyselinu listovú 10,00 µg
 biotín 1,25 µg
 vitamín B12 0,10 µg
 lecitín 45.0mg

Príklad 26

Príprava komplexu β-glukán (*Pleurotus ostreatus*)-aventyl hydrochlorid

K 20ml 2% roztoku β-glukán (*Pleurotus ostreatus*) sa pridalo 5mg aventyl hydrochloridu a zmes sa miešala počas 24 hodín pri 20°C a prefiltrovala cez filter Nylon filter (0.22µm). Reakčná zmes sa lyofilizovala. Získalo sa 6mg komplexu β-glukán (*Pleurotus ostreatus*)-aventyl hydrochlorid.

Príklad 27 až 32

Analogicky podľa príkladu 26 sa pripravila séria komplexov s tým, že sa použili uvedené farmaceuticky aktívne látky resp. ich soli a rozpúšťadlá.

Príklad	Farmaceuticky aktívne látky	Rozpúšťadlo
Príklad 27	chondroitín sulfát	voda
Príklad 28	kofeín sulfát	voda/etanol
Príklad 29	klopidogrel bisulfát/kyselina salicylová	voda
Príklad 30	ezatiostat HCl	voda/aceton
Príklad 31	chondroitín sulfát/glukozamín	voda
Príklad 32	kyselina askorbová/ hesperidín	voda/DMSO
Príklad 33	kyselina listová/kurkumín	pyridín
Príklad 34	kyselina listová/5-fluorouracil	dimetylacetamid

Príklad 33

Príprava komplexu β-glukán-kyselina askorbová

350mg β-glukánu sa ponechá napučiavať v 3.5ml 10mmol roztoku askorbátu sodného počas 6 hodín pri pH 9.8. Pridalo sa 7ml kyseliny octovej a upravilo sa pH na 4.35 a zmes sa nechala stáť v chladničke cez noc. Reakčná zmes sa odstredila, premyla 3x 10ml 90% acetónom a vysušil pri teplote 45°C za vákua. Získalo sa 250mg komplexu β-glukán-kyselina askorbová. Časť vzorky bola dialyzovaná voči deionizovanej vode a lyofilizovaná.

Príklad 34

Príprava komplexu β -glukán-kyseliny boswelové

350mg glukánu mikronizovaného a 100 mg extraktu *Boswellia serrata* sa pridalo do 8ml vody. Hodnota pH sa upravila na 12.3 prídavkom hydroxidu sodného a ponechalo v ultrazvukovom kúpeli 2x15 minút a miešalo počas 6 hodín. Následne sa upravilo pH na 3.34 a zmes sa sonifikovala v ultrazvukovom kúpeli 2x15 minút a nechala stáť v chladničke cez noc. K reakčnej zmesi sa pridalo 8ml etanolu, zmes sa odstredila, premyla 3x 10ml 60% etanolom, 1x 10ml etanolu 96% a vysušil pri teplote 45°C za vákua. Získalo sa 426mg komplexu β -glukán-kyseliny boswelové. Obsah kyselín boswelových (BSWA) metódou HPLC: 6.78 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (11-keto-BSWA), 2.99 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (3-acetyl-11-keto-BSWA), 27.58 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (beta-BSWA), 9.20 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (3-acetyl-beta-BSWA).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Komplexy β -glukánu s minimálne jednou komplex formujúcou látkou kde komplex formujúca látka je farmaceuticky účinná látka.

2. Spôsob prípravy komplexov podľa nároku 1 **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplex formujúce látky sú farmaceuticky účinné látky vybrané zo skupiny kvercetín, taxifolín, naringín, silibín, silibinin, kyselina gálová, kyselina chlorogenová, kyselina salicylová, kyselina acetylsalicylová, taurín, nikotínamid, kyselina izonikotínová, pyridoxín, diosmín, hesperidín, escín, troxuretín, kyselina askorbová, kyselina izoaskorbová, kyselina citrónová, kyselina hydroxycitrónová, kyselina vínna, boswellové kyseliny, kyselina rozmarínová, kyselina glykolová, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosaheptaenová, kyselina asparágová, kyselina trieslová, kyselina chinová, L-lyzín, kyselina p-aminobenzoová, kyselina listová, kyselina pantoténová, cholin chlorid, kyselina glutarová, kofeín, kyselina L-glutámová, kyselina N-acetyl-L-glutámová, L-karnitín, kyselina mliečna, kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina 3,3'-tiodipropiónová, koenzým Q10, kyselina algínová, arginín, asparagín, cysteín, metionín, tiamín, L-karnitín, skopoletín, kurkumín, polykosanol, teanín, teobromín, leucín, lykopén, resveratrol, pterostilben, glutatión, melatonín, chondroitín, glukozamín, donepezil, hydroxymočovina, 4-acetamidofenol, kyselina 4-aminosalicylová, hydrochlorotiazid, telmisartan, agomelatín, tenofovir, emtricitabin, tamsolusín, desloratadín, metoprolol, carbamazepín, giklazid, amiloride, quinacrine, karsalam, duloxetin, ibuprofen, naproxen, diklofenak, piroxikam, furosemid, allopurinol, silodosin, rivoroxaban, acetazolamid, diltiazem, prasugrel, cloroxin, prednison, methotrexat, merkaptopurín, almorexant, laropiprant, sitagliptín, rivaroxaban, vildagliptín, solifenacín, silodosin, galantamín, trimetazín, amlodipín, nifedipín, risperidon, alprazolam, entakapon, leukovorín, dakarbazín, 5-fluorouracil, oxaliplatina, paclitaxel, docetaxel, imatinib, sunitinib, ibandronát, zolendronát, glipizid, metformín, kyselina valproová a ich soli ak je to možné.

3. Spôsob prípravy komplexov podľa nároku 1 a 2 **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa:

- a) rozpustí alebo suspenduje β -glukán vo vode alebo v organickom rozpúšťadle s vodou miešateľnom alebo ich zmesiach a príležitostne sa upraví hodnota pH a

- b) pridá sa komplex formujúca látka a upraví sa hodnota pH alebo sa alternatívne
- c) pridá ďalšia komplex formujúca látka a
- d) pridá sa anti-rozpúšťadlo, alebo sa alternatívne rozpúšťadlo oddestiluje a
- e) komplex sa izoluje

4. Spôsob prípravy komplexov podľa nároku 1 až 3 **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že glukán a minimálne jedna komplex formujúca látka sa nechajú vzájomne pôsobiť v rozpúšťadle s jeho následným odparením.

5. Prípravok obsahujúci aspoň jeden komplex podľa nároku 1 a 2 pripravený odparením rozpúšťadiel z komplexu alebo izolovaný z jeho suspenzie.

6. Prípravok podľa nároku 1 až 5 **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje dve komplex formujúce látky.

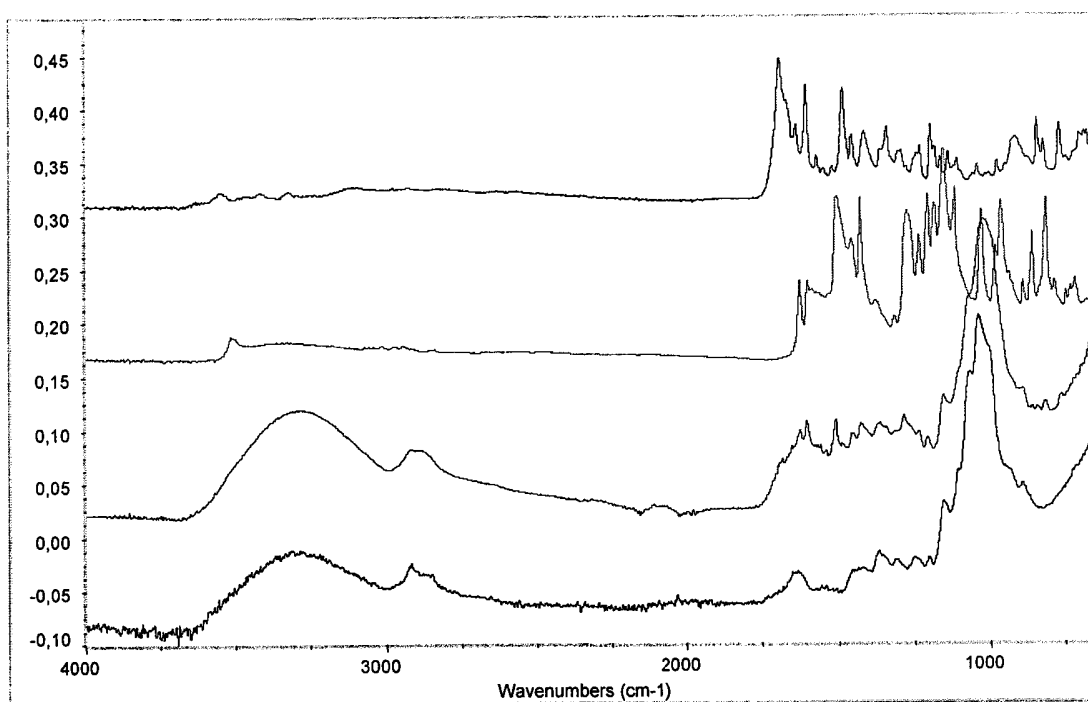
7. Použitie komplexov podľa niektorého nároku 1 až 6 **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že sa použijú na prípravu výživových doplnkov a liečiv na prevenciu a liečenie chronickej žilovej nedostatočnosti, detoxikáciu organizmu, alergií, artritíd, ateroskleróz, kolorrektálneho karcinómu, diabetes, zlepšení mozgového metabolizmu, neuropatie a retinopatie, vysokého cholesterolu, vysokého krvného tlaku, zápalov, mŕtvice, vredového ochorenia tráviaceho systému, mykóz, dermatitíd.

8. Spôsob stabilizácie komplex formujúcich látok podľa nároku 1,2 a 3 **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa tvorí komplex s glukánom.

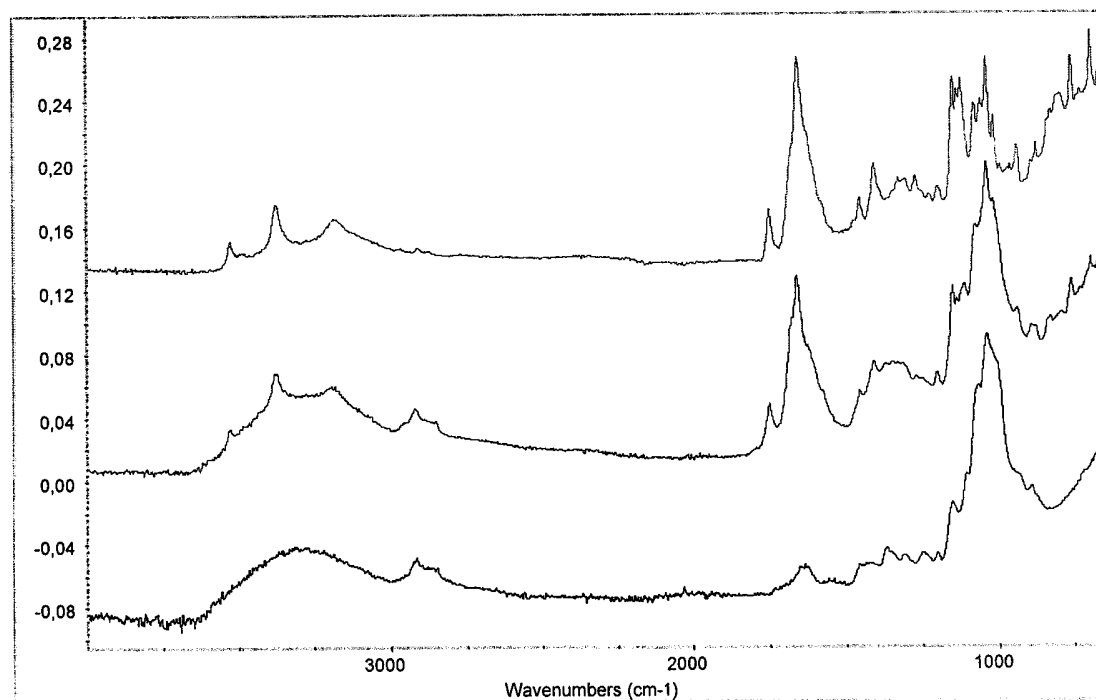
9. Komplexy podľa niektorého nároku 1 až 8 **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že hmotnostný podiel komplex formujúcich látok je od 0.01 do 50% hmotnostných.

10. Spôsob stabilizácie komplex formujúcich látok podľa nároku 2,8 a 9 **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplex s glukánom stabilizuje nanočasticu komplex formujúcej látky.

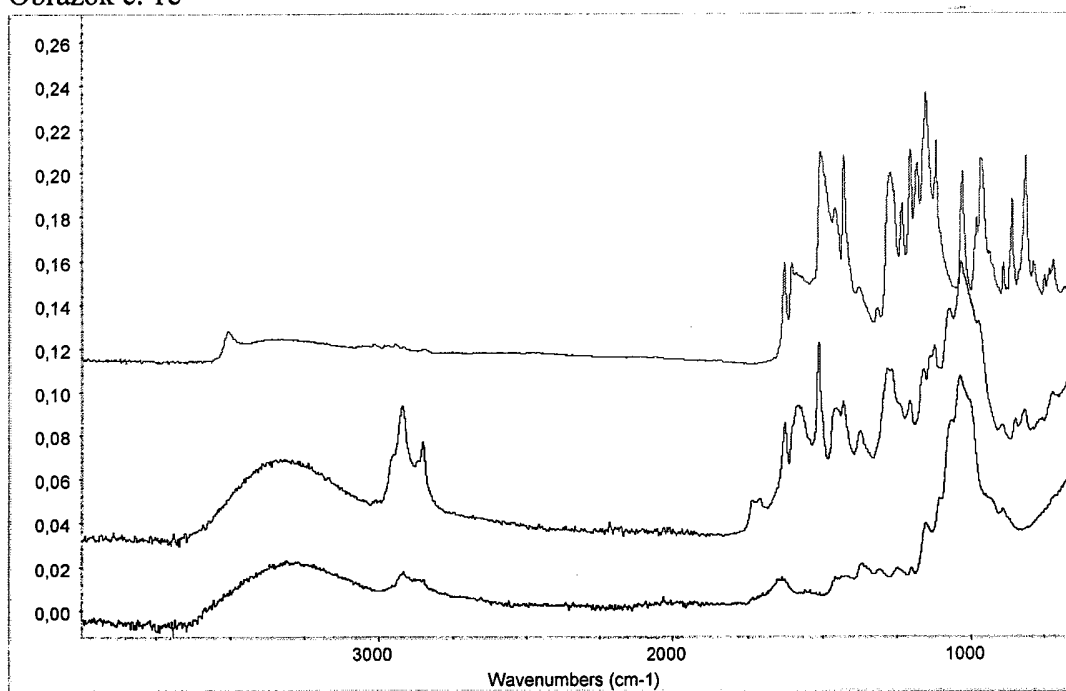
Obrázok č. 1a



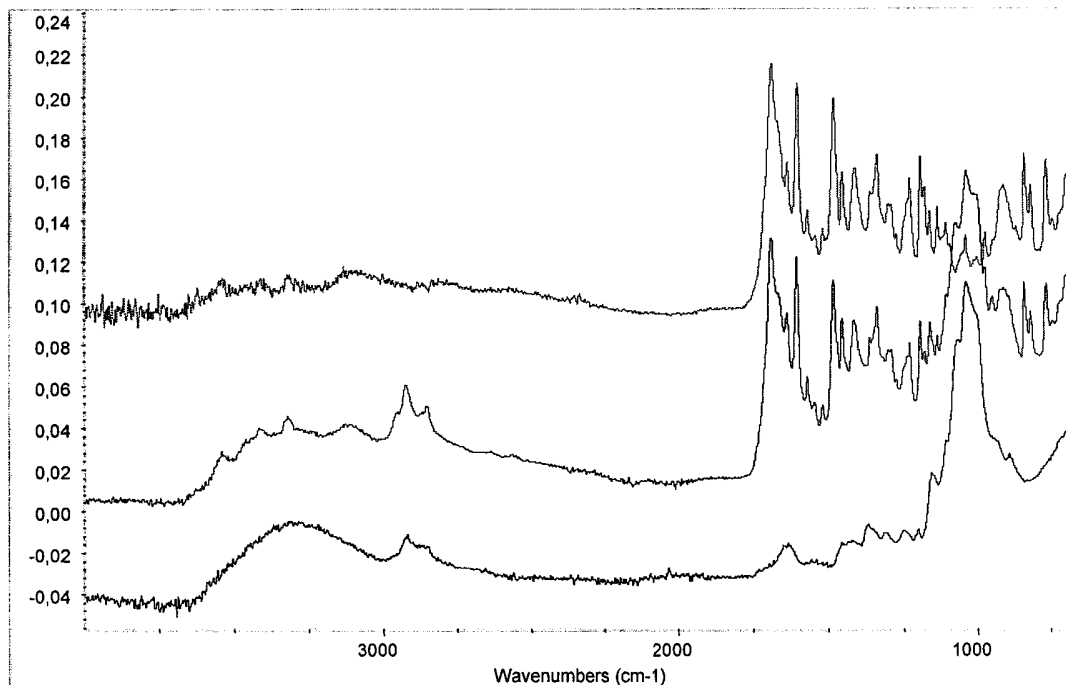
Obrázok č. 1b



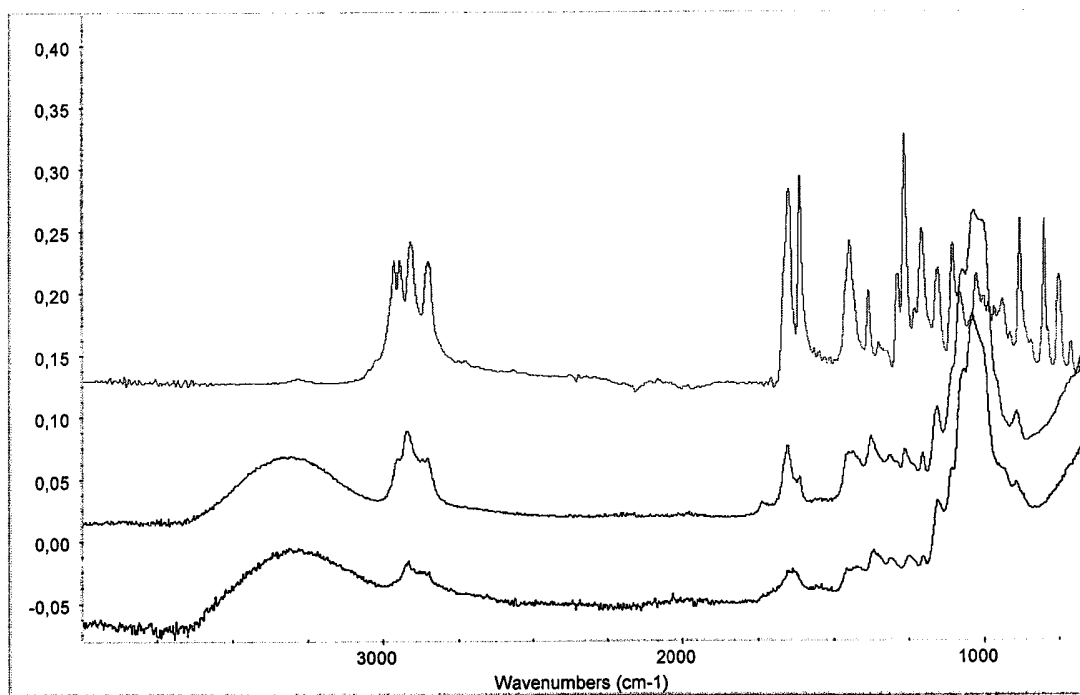
Obrázok č. 1c



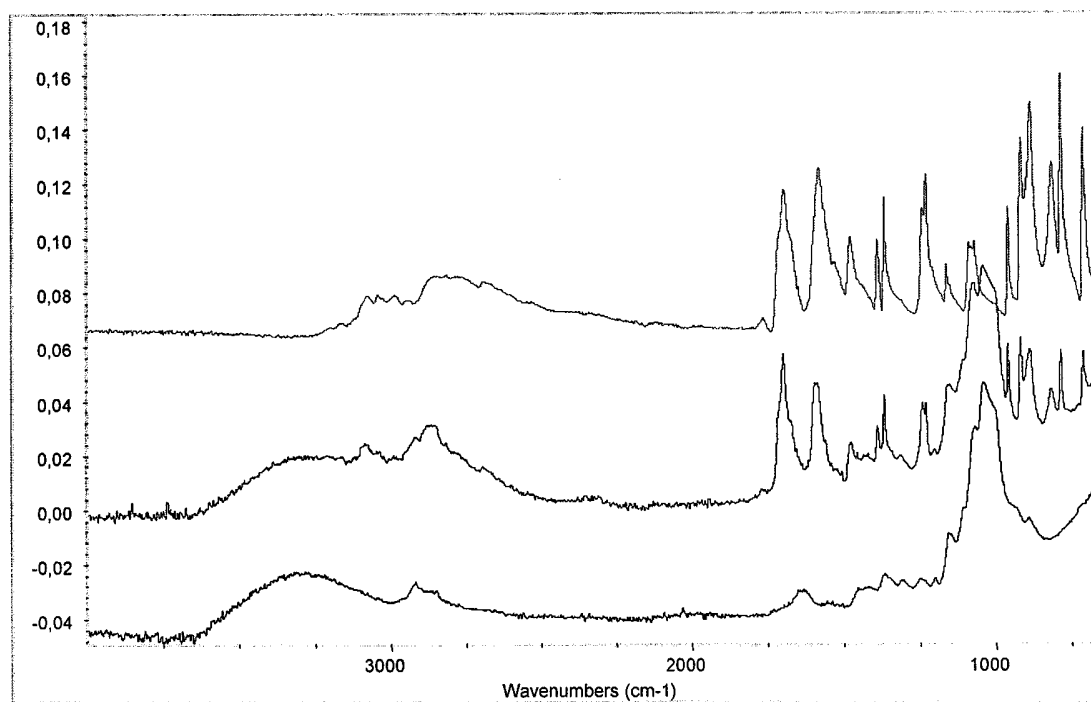
Obrázok č. 1d



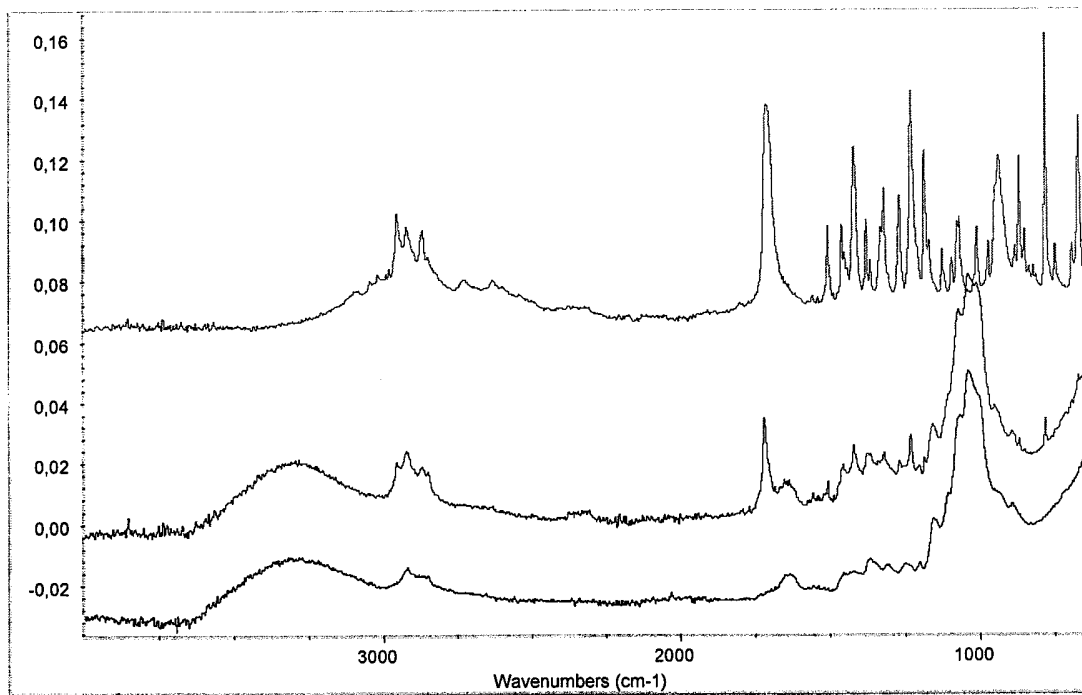
Obrázok č. 1e



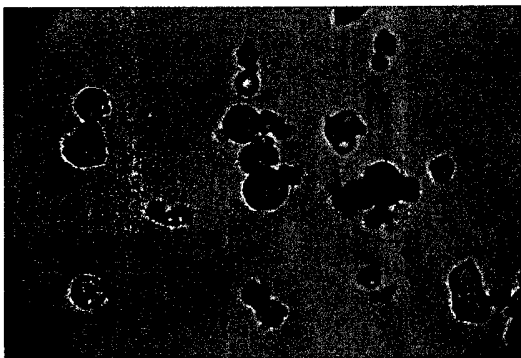
Obrázok č. 1f



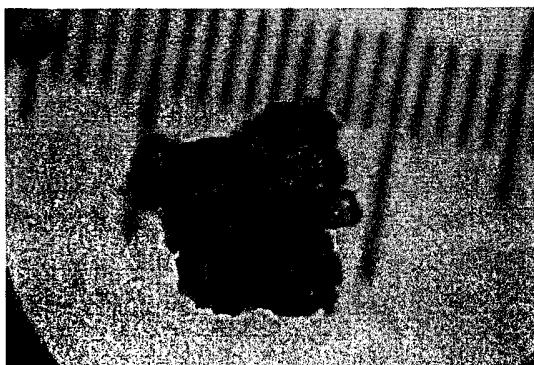
Obrázok č. 1g



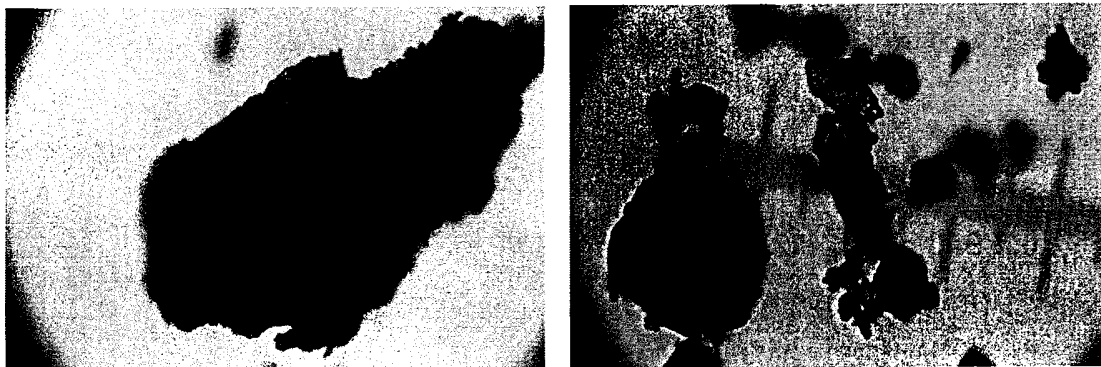
Obrázok č. 2a



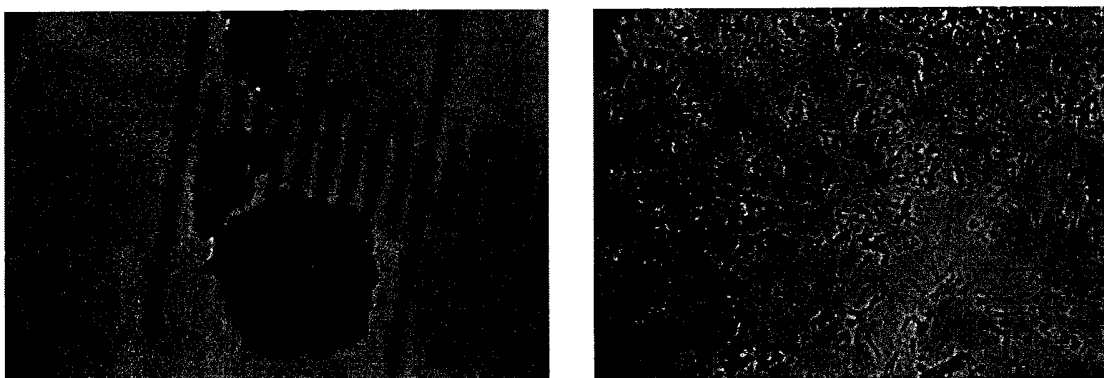
Obrázok č. 2b



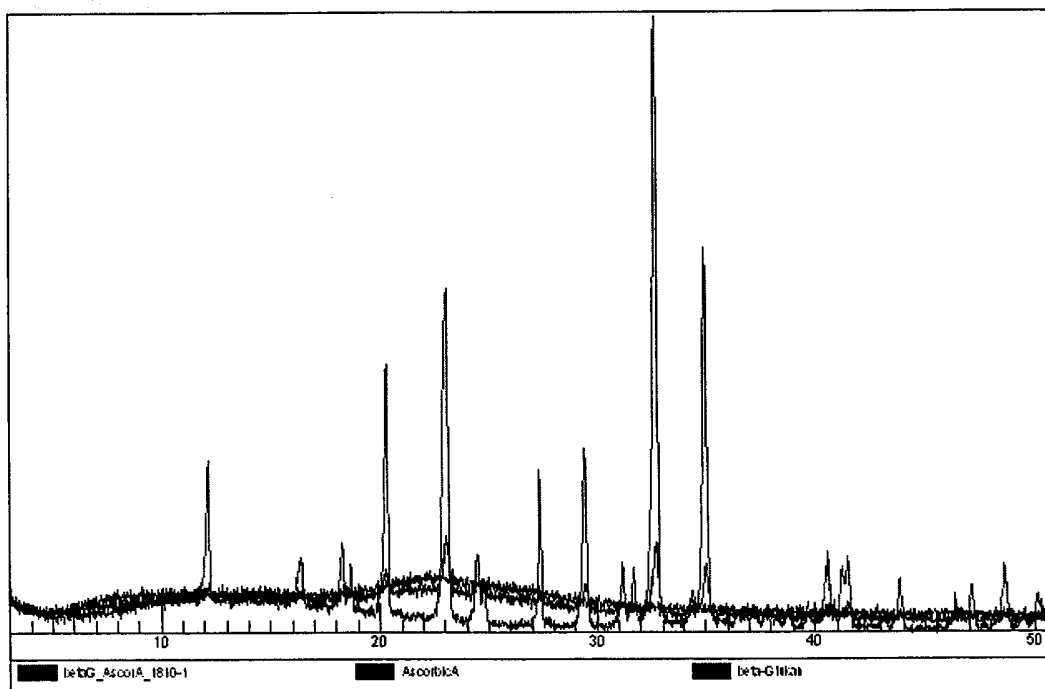
Obrázok č. 2c



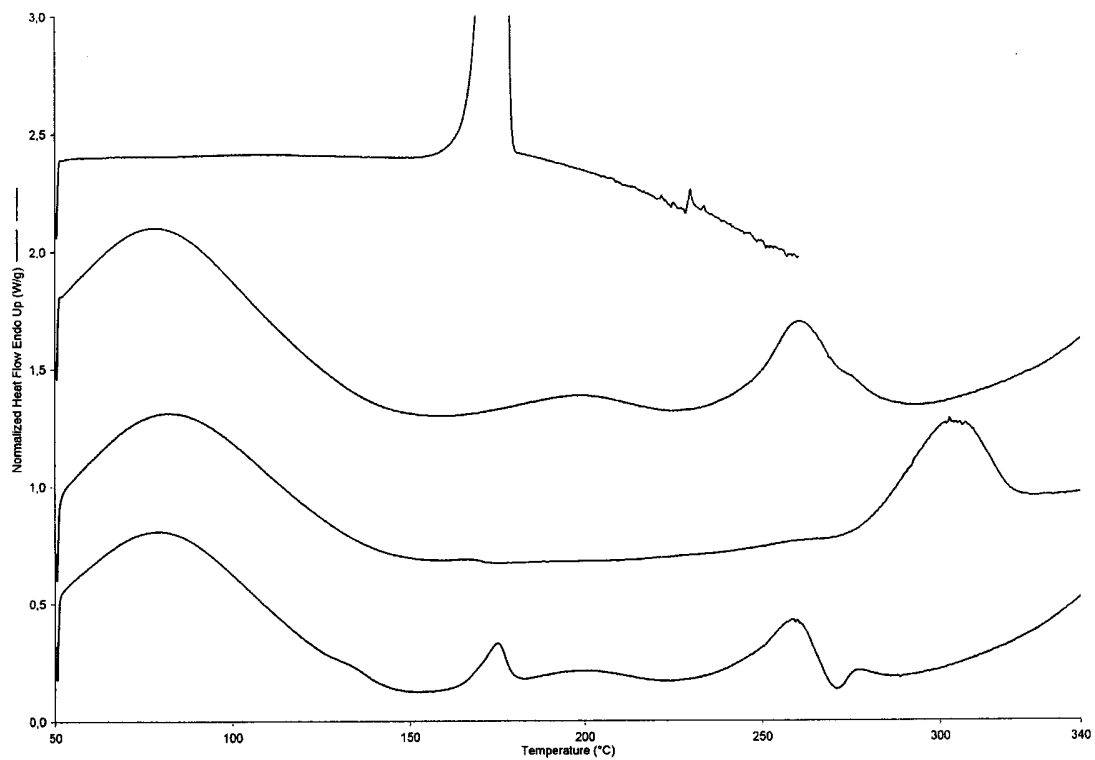
Obrázok č. 2d



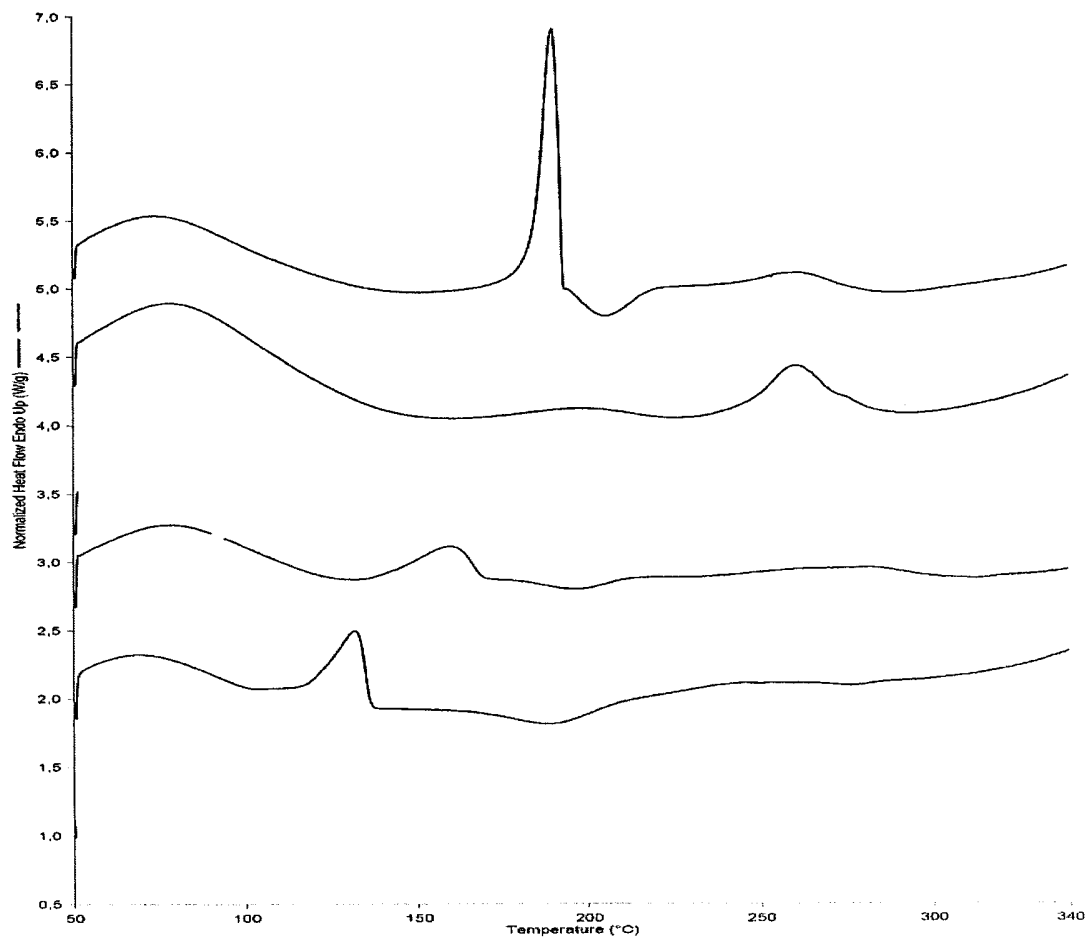
Obrázok č. 3a



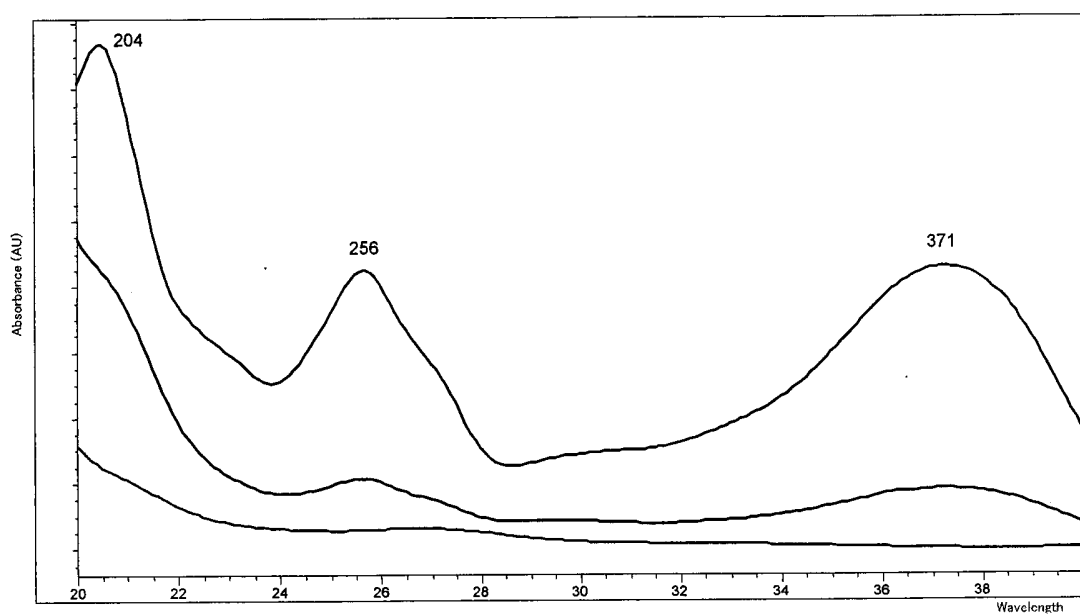
Obrázok č. 4a



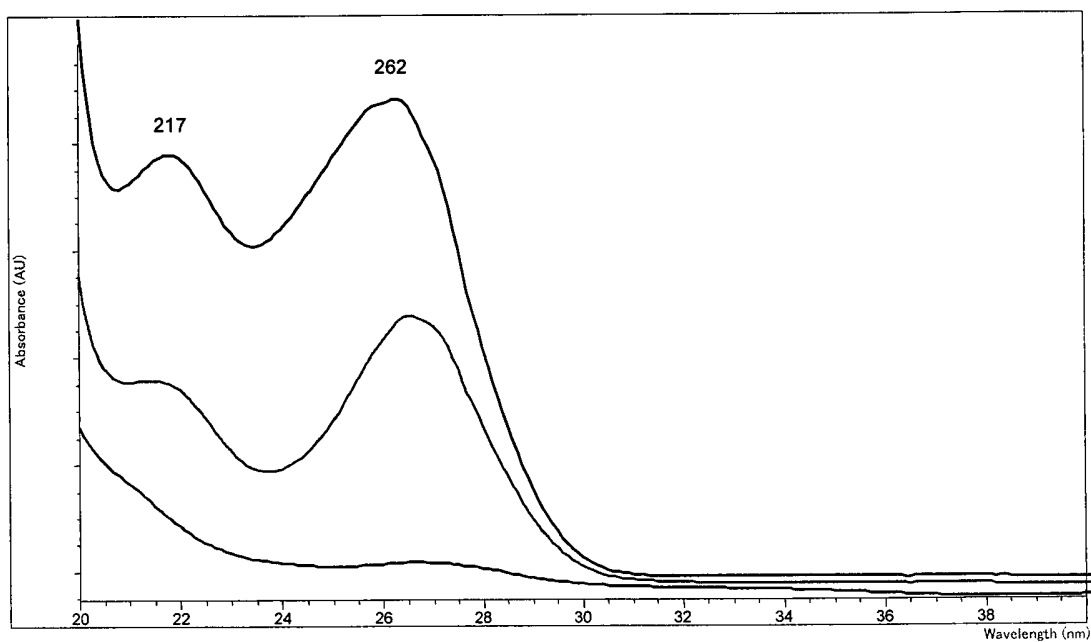
Obrázok č. 4b



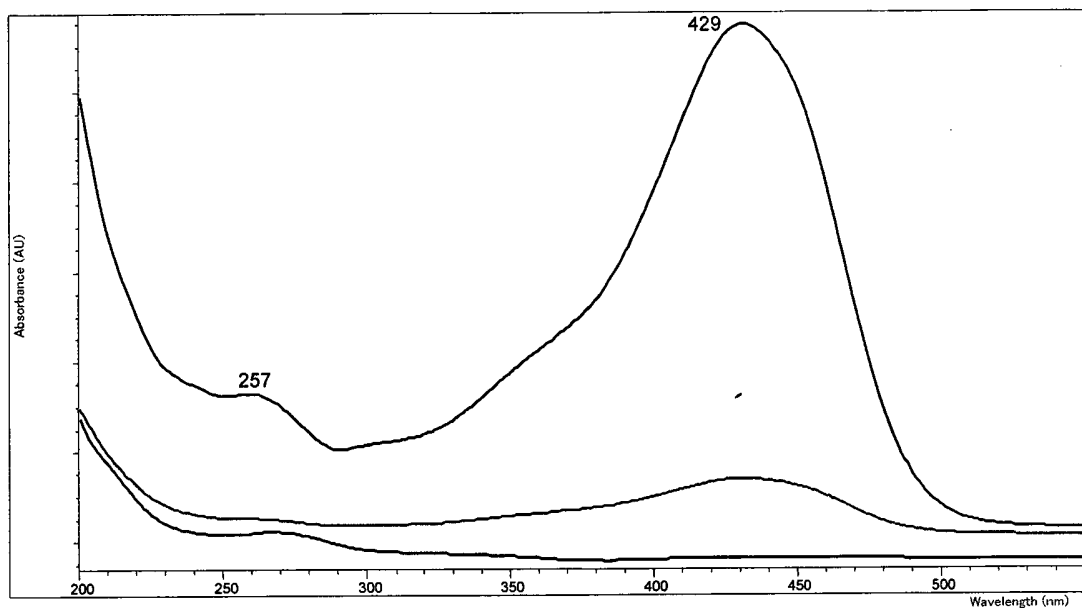
Obrázok č. 5a



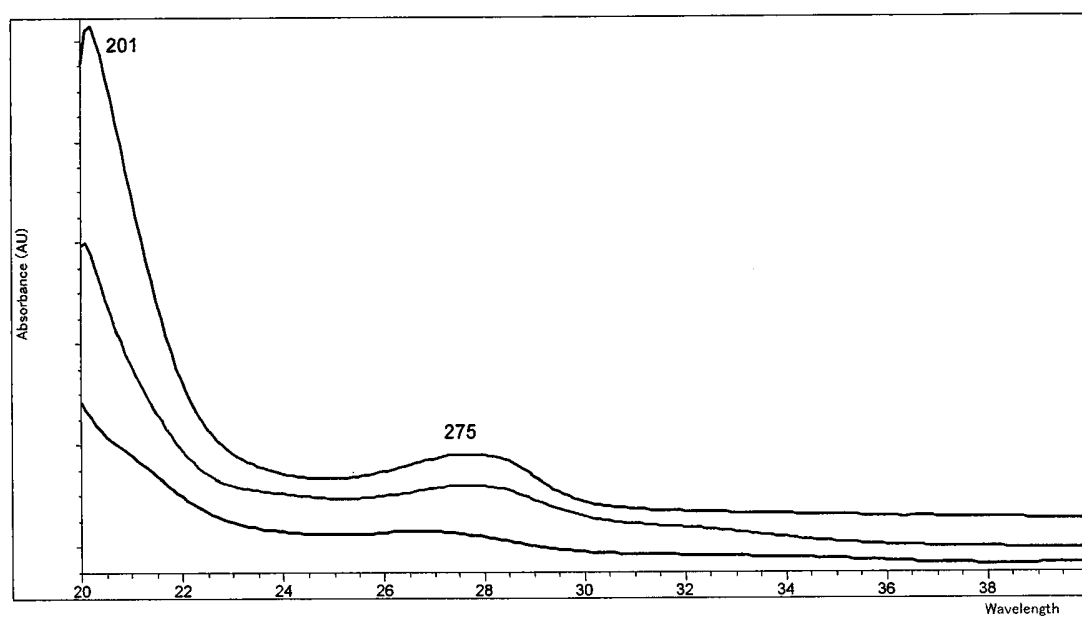
Obrázok č. 5b



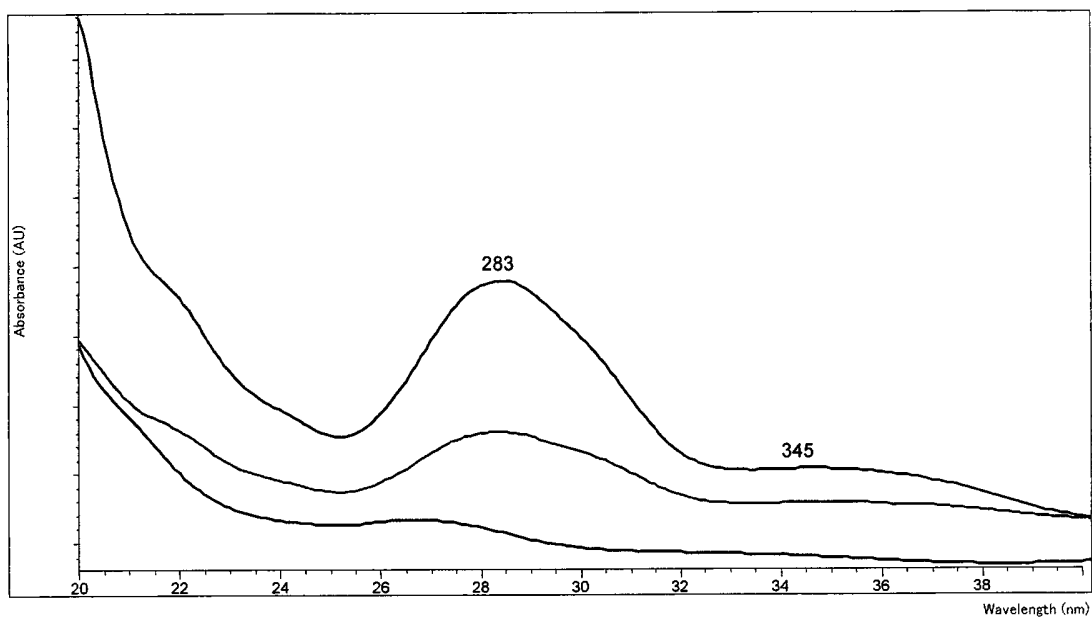
Obrázok č. 5c



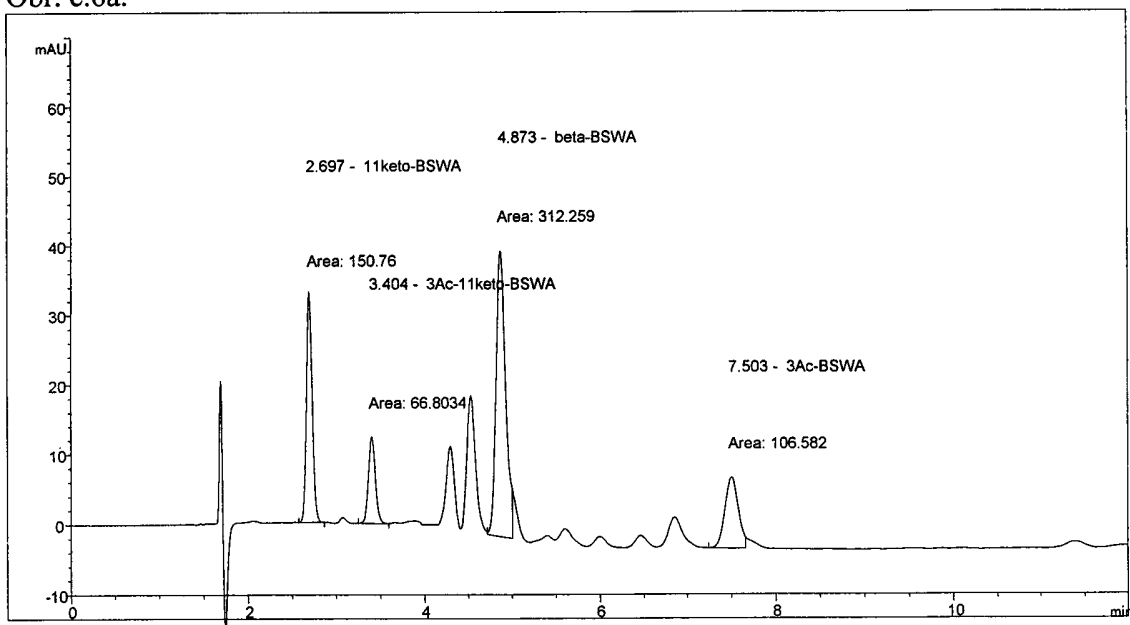
Obrázok č. 5d



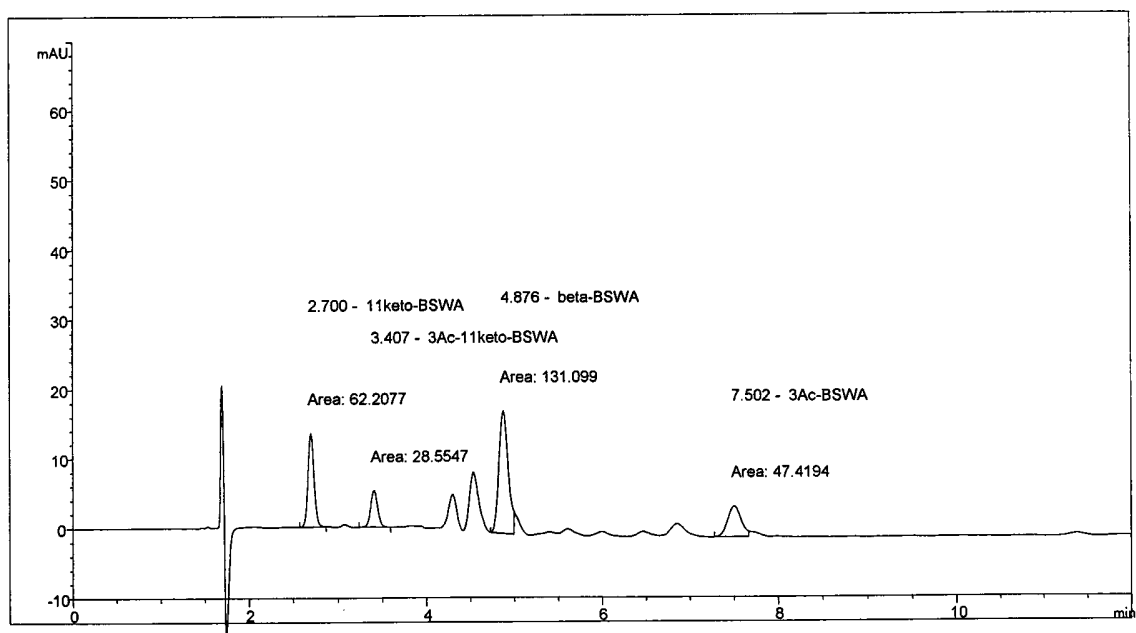
Obrázok č. 5e



Obr. č.6a.

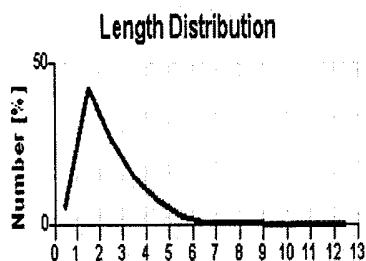


Obr. č.6b.



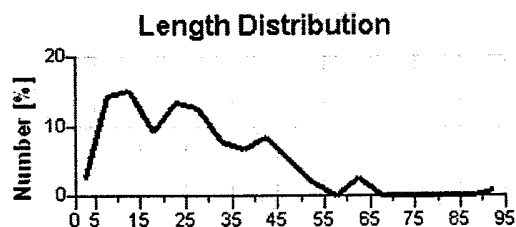
Obr. č.7a.

Feature	Mean	STDev	Minimum	Maximum
Length	2,45	1,36	0,64	12,78



Obr. č.7b.

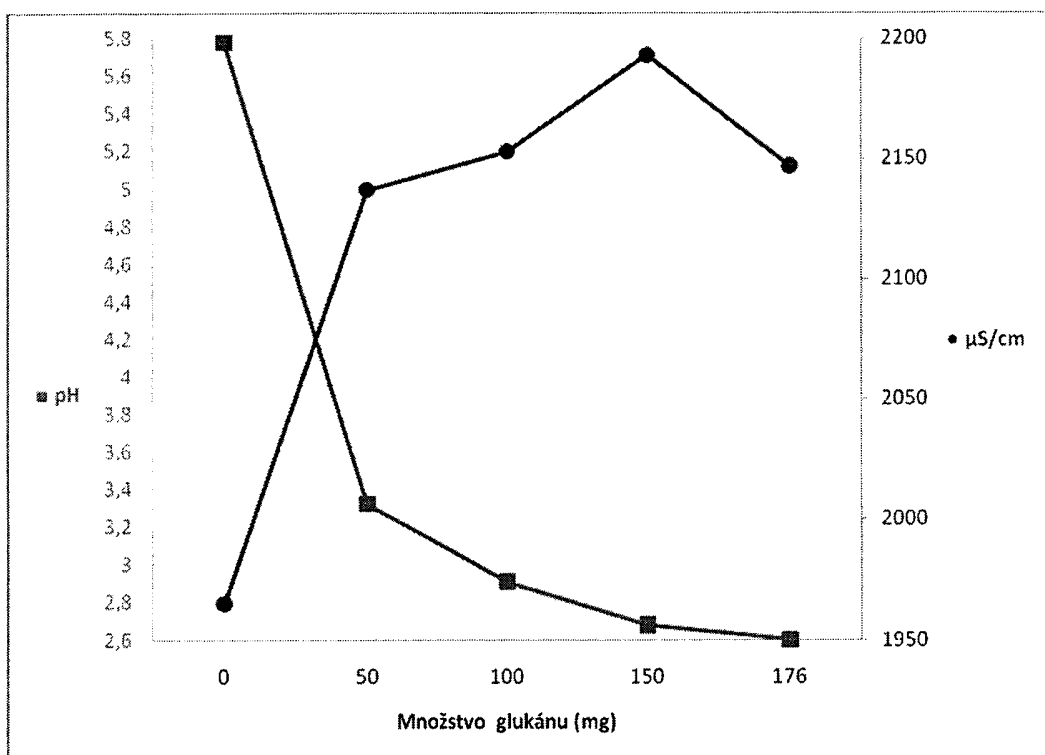
Feature	Mean	STDev	Minimum	Maximum
Length	25,28	15,44	3,58	94,85



Class	Number	% Number	Cumulative	% Cumulative
0-1	22	4,74	22	4,74
1-2	199	42,89	221	47,63
2-3	120	25,86	341	73,49
3-4	67	14,44	408	87,93
4-5	34	7,33	442	95,26
5-6	12	2,59	454	97,84
6-7	3	0,65	457	98,49
7-8	4	0,86	461	99,35
8-9	2	0,43	463	99,78
9-10	0	0	463	99,78
10-11	0	0	463	99,78
11-12	0	0	463	99,78
12-13	1	0,22	464	100

Class	Number	% Number	Cumulative	% Cumulative
0-5	3	2,52	3	2,52
5-10	17	14,29	20	16,81
10-15	18	15,13	38	31,93
15-20	11	9,24	49	41,18
20-25	16	13,45	65	54,62
25-30	15	12,61	80	67,23
30-35	9	7,56	89	74,79
35-40	8	6,72	97	81,51
40-45	10	8,4	107	89,92
45-50	6	5,04	113	94,96
50-55	2	1,68	115	96,64
55-60	0	0	115	96,64
60-65	3	2,52	118	99,16
65-70	0	0	118	99,16
70-75	0	0	118	99,16
75-80	0	0	118	99,16
80-85	0	0	118	99,16
85-90	0	0	118	99,16
90-95	1	0,84	119	100

Graf č.1



Graf č.2

