



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

86958

C (15) Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen 10 11 1985

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 31/35, 31/715, C 08B 37/16, A 61K 47/40,
C 07D 311/36, C 08L 5/16

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	863652
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	10.09.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	10.09.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	11.03.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.07.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	

10.09.85 HU 3415/85 P

(71) Hakija - Sökande

1. **Chinoin Gyogyszer es Vegyeszeti Termekek Gyara RT.,** To u. 1-5, 1045 Budapest,
Hungary, (HU)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Stadler nee Szöke, Agnes,** Nepstadion u. 18., 1143 Budapest, Hungary, (HU)
2. **Szejtli, Jozsef,** Endrödi S. u. 38-40., 1026 Budapest, Hungary, (HU)
3. **Weiszfeiler, Viktor,** Nemetvölgyi u. 72/b., 1124 Budapest, Hungary, (HU)
4. **Vargay, Zoltan,** Vezer u. 59/b., 1144 Budapest, Hungary, (HU)
5. **Kaloy, Katalin,** Ibrahim u. 15., 1113 Budapest, Hungary, (HU)
6. **Gergely, Vera,** Tinodi u. 15., 1095 Budapest, Hungary, (HU)
7. **Szűts, Tamas,** Csalogany u. 53., 1027 Budapest, Hungary, (HU)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä 7-isopropoksi-isoflavonin ja syklodekstriinin inkluusiokompleksin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett inklusionskomplex av 7-isopropoxi-isoflavon och cyklodextrin

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB A 2133405 (C 07D 311/80), GB A 2174991 (C 07D 311/80),
Uekama, K., Inclusion complexes of Cyclodextrins with Organic Drug Molecules,
The Japanese Journal of Antibiotics, joulukuu 1979, vol. XXXII, Suppl., p. 103-111

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu 7-isopropoksi-isoflavonin inkluusiokomplekseihin, jotka on muodostettu syklodekstriinin tai syklodekstriinijohdannais-
ten kanssa sekä farmaseuttisiin koostumuksiin, jotka sisältävät näi-
tä inkluusiokomplekseja aktiivisena aineosana. Keksintö kohdistuu lii-
säksi uusien inkluusiokompleksien valmistukseen.

Keksinnön mukainen inkluusiokompleksi osoittaa parempia liukenemis-
ja resorptio-ominaisuuksia verrattuna aktiiviseen aineosaan annostel-
tuna sellaisenaan.

Uppfinningen avser inklusionskomplex av 7-isopropoxi-isoflavon, vil-
ka bildats med cyklodextrin eller cyklodextrinderivat, samt farma-
ceutiska kompositioner, vilka innehåller dessa inklusionskomplex som
aktiv ingrediens. Uppfinningen avser vidare framställningen av dessa
nya inklusionskomplex.

Det nya inklusionskomplexet enligt uppfinningen uppvisar bättre lös-
nings- och återabsorptionsegenskaper i jämförelse med den som sådan
administrerade aktiva ingrediensen.

Menetelmä 7-isopropoksi-isoflavonin ja syklodekstriinin inkluusiokompleksin valmistamiseksi

5 Keksintö koskee menetelmää 7-isopropoksi-isoflavonin ja syklodekstriinin inkluusiokompleksin valmistamiseksi.

10 Suun kautta annosteltavasta farmaseuttisesta koostumuksesta, joka sisältää keksinnön mukaisesti valmistettua inkluusiokompleksia, ipriflavoni (7-isopropoksi-isoflavoni) resorboituu farmakologisesti aktiivisessa pitoisuudessa ollen metaboloimattomassa muodossa ja se voidaan havaita veressä.

15 Ipriflavonin valmistus on kuvattu GB-patenttijulkaisussa 1 360 461 ja yhdisteen ominaispiirteet ovat seuraavat: molekyylipaino 280,3; sulamispiste 112-118°C; liukoisuus veteen 25°C:ssa 1-2 µg/ml. Se on heikosti liukoinen asetoniin mutta liukenee hyvin kloroformiin ja dimetyyliformamidiin.

20 Tunnettua tablettia Yambolap, joka sisältää 200 mg ipriflavonia aktiivisena aineosana, on käytetty osteoproosin ja osteomalacian hoitoon. Kuitenkin, johtuen sen huonosta liukoisuudesta ja resorptiosta sen terapeuttinen teho ei ole riittävä.

25 Annosteltaessa radioaktiivisesti merkittyä ipriflavonia beagle-koiriin ja todettaessa poistuneen radioaktiivisen materiaalin määrä, on havaittu, että vain 12 % annostellusta radioaktiivisesta materiaalista on poistunut virtsan mukana. Veren HPLC-analyysi osoitti, että sen aineenvaihduntatuotteita (7-hydroksi-isoflavonin pääaineenvaihduntatuotteena) ilmenee veressä.

30 Erilaisia yrityksiä on suoritettu ipriflavonin ja sen pääaineenvaihduntatuotteen (7-hydroksi-isoflavoni) resorption kasvattamiseksi. EP-patenttijulkaisussa 0 129 893 on esitetty, että huonon liukoisuuden omaavien farmaseuttisten koostumusten resorptio ja liukoisuus kas-

35

vaa, jos ne on jauhettu inertin kantaja-aineen kanssa yhdessä. Esimerkiksi 2 g ipriflavonia jauhettiin 10-60 minuutin ajan yhdessä 2 g:n kanssa aerosiliä tai 2 g:n kanssa aktiivihiihtä tai 2 g:n kanssa aktivoitua savea tai 2 g:n kanssa aktivoitua alumiinia vibraatiomyllyssä käyttäen teräspalloja. Saadun tuotteen liukoisuus esim. aerosilillä oli 20,4 µg/ml 50 %:ssa vesi-metanolissa 30 minuutin jälkeen 37°C:ssa, kun taas jauhamattoman seoksen liukoisuus oli vain 15,0 µg/ml, minkä mukaisesti saavutettiin 1,36-kertainen kasvu in vitro liuotuksessa. Analysoitaessa veren tasoja koirilla suun kautta annostelun jälkeen, ipriflavonia ei voida havaita veressä. Aerosilin kanssa jauhaminen kasvattaa pääaineenvaihduntatuotteen resorptiota 0,152 µg/ml:sta 0,485 µg/ml:aan, mikä vastaa 3,19-kertaista kasvua.

On hyvin tunnettua, että erilaisten farmaseuttisten koostumusten ja pestisidien erilaiset epästabiilit ja haihtuvat aktiiviset aineosat tulevat stabiileiksi ja kiteisiksi, kun muodostetaan "molekyylikapseleita" syklodekstriinin kanssa. Farmaseuttiselta näkökannalta tärkein vaikutus on siinä, että veteen huonosti liukenevien erilaisten aktiivisten aineosien inkluusiokompleksit tulevat kostutettaviksi vedellä, että ne voidaan helposti dispergoida ja niin ne liukenevat veteen helposti. Niiden liukoisuus ja resorptio on tavallisesti 1,3-3 kertaa suurempi kuin vapaiden, ei-kompleksoitujen aktiivisten aineosien liukoisuus ja resorptio (W.F. Smolen ja L.A. Ball: Controlled drug bioavailability, Vol. 3., sivu 365, John Wiley, New York, 1985).

Nyt on yllättäen havaittu, että annosteltaessa keksinnön mukaisesti valmistettua inkluusiokompleksia ipriflavonin in vitro liukoisuus on 10 kertaa ja pääaineenvaihduntatuotteen veritaso 15-20 kertaa suurempi verrattuna ipriflavonin annosteluun per se. Ipriflavonin resorptio muuttumattomassa muodossa ja farmaseuttisesti tehokkaassa pitoisuudessa voidaan todeta samoin.

Keksintö koksee menetelmää 7-isopropoksi-isoflavonin ja syklodekstriinin inkluusiokompleksin valmistamiseksi. Menetelmälle on tunnusomaista, että 7-isopropoksi-isoflavoni saatetaan reagoimaan α, β , δ -syklodekstriinin, heptakis-2,6-O-dimetyyli- tai 2-heptakis-2,3,6-tri-O-metyyli- β -syklodekstriinin kanssa tai syklodekstriinipolymerin kanssa, jonka molekyylipaino on noin 4000, vesipitoisessa tai vesi-orgaanisessa väliaineessa, jolloin 7-isopropoksi-isoflavonin ja syklodekstriinikomponentin välinen moolisuhde on 1:2 - 3,5, minkä jälkeen muodostunut tuote eristetään ja kuivataan.

Syklodekstriinit valmistetaan tärkkelyksistä käyttäen syklodekstriini-glukosiili-transferaasi-entsyymiä. On olemassa kolme erilaista syklodekstriiniä, ts. α -, β - ja δ -syklodekstriini, jotka koostuvat α -1,4 glukosididoksilla yhdistetyistä 6, 7 tai 8 glukopyranoosiyksiköistä. Mainitut kolme syklodekstriiniä eroavat toisistaan molekyylipainoltaan, vesiliukoisuudeltaan ja ontelohalkaisijaltaan, minkä mukaisesti ne kykenevät muodostamaan inkluusiokomplekseja mitä erilaisimpien yhdisteiden kanssa, mutta saman yhdisteen erilaisten syklodekstriinien kanssa muodostetulla inkluusiokompleksilla on hyvin erilaiset ominaisuudet. On mahdollista suorittaa lisämuunnelmia syklodekstriinimolekyylissä sopivilla substituoitioilla. Esimerkiksi dimetyyli- β -syklodekstriinin (DIMEB) tapauksessa jokaisen glukosiyksikön kaksi hydroksyyli-ryhmää on metyloitu, kun taas trimetyyli-syklodekstriinin (TRIMEB) tapauksessa kaikki hydroksyyli-ryhmät on substituoitu metoksilla. Näiden yhdisteiden liukoisuus on jopa parempi ja niin niiden kompleksinmuodostuskyky eroaa substituoimattomasta syklodekstriinistä.

Syklodekstriinille on tavallisesti luonteenomaista, että molekyylin ulompi pinta on hydrofiilinen mutta sisempi pinta on apolaarinen ja johtuen ulompien tilojen koosta se pystyy sisältämään - ottamaan sisään - sopivan "vierasmolekyylin". Niin kutsuttua "molekyylistä kapse-

lointia" voidaan kuvata tällä tavoin.

Yksi todisteista inkluusiokompleksin muodostumisesta iproflavonin ja syklodekstriinin välillä on se, että syklodekstriini kasvattaa ipriflavonin liukoisuutta vesiliuoksissa. Tämän ominaisuuden määrittämiseksi 10 mg ipriflavonia, eri määriä syklodekstriiniä ja 5 ml tislattua vettä laitettiin 10 ml koeputkiin. Putkien sulkemisen jälkeen niitä sekoitettiin 4 päivän ajan 25°C:ssa 325 rpm:n nopeudella, minkä jälkeen näytteet suodatettiin G4 lasisuodattimella ja suodokset analysoitiin fotometrisesti 50 % vesi-etanoliliuoksessa. Tulokset on esitetty taulukossa I.

Taulukko I

Ipriflavonin liukoisuus $\mu\text{g/ml}$:na määritettynä 25°C:ssa eri syklodekstriiniliuoksissa, joilla on eri pitoisuudet

Syklo-	α -	β -	γ -	DIMEB	TRIMEB
dekstriini	SD	SD	SD		
1		2,52			
3		7,03		22,0	
5		11,44		40,6	
7		15,93		59,1	
9		19,51		77,5	
11	4,12	15,22	2,02	96,2	8,23
13	4,68	15,48	2,05	114,8	9,88
15	5,08	15,75	2,16	191,3	11,32
20	6,10	13,46	2,38	284,4	14,71
30	8,19	7,59	2,74	416,8	26,82
40	9,63	6,20	3,26	588,2	43,91
50	10,61	5,44	3,04	761,0	61,3
70	14,77	6,08	3,64	1118	96,2
90	18,24	6,93	4,51	1142	127,5
100	21,63	6,64	4,76	1654	179,0
110	19,02	5,98	5,12	1824	218,8
120	23,65	5,66	5,48	2012	269,3
150				2024	435,6

Ipriflavonin liukoisuus tislatussa vedessä on 1-2 $\mu\text{g/ml}$ 25°C:ssa. Kuten on ilmeistä taulukon I tiedoista, voi ipriflavonin liukoisuus kasvaa β -syklodekstriiniliuoksessa - riippuen β -syklodekstriinin pitoisuudesta.

desta - aina 15-kertaiseksi tislatussa vedessä mitattuun liukoisuuteen nähden. Kasvatettaessa β -syklodekstriinin pitoisuutta 1 %:iin kasvaa ipriflavonin liukoisuus noin 16-20 $\mu\text{g/ml}$:aan, mutta kasvatettaessa edelleen syklodekstriinin pitoisuutta pysyy liukoisuusarvo ensin vakiona, sitten se alkaa vähentyä, kun syklodekstriinin pitoisuus ylittää arvon 1,8 %. Liukoisuus saavuttaa vakioarvon 6 $\mu\text{g/ml}$, kun syklodekstriinin pitoisuus ylittää 4 % suspensiossa. Tämän arvon voidaan katsoa olevan liukoisuusrajan kiinteälle inkluusiokompleksille, joka on muodostettu ylimäärän ipriflavonia läsnäollessa.

γ -syklodekstriiniliuoksessa liukoisuus ei kasva merkittävästi, vain 3-kertainen nousu voidaan saavuttaa.

α -syklodekstriinin tapauksessa ipriflavonin liukoisuus kasvaa arvoon 20-22 $\mu\text{g/ml}$ 12 % liuoksessa ja ylättäen ipriflavonin UV-spektri muuttuu myöskin sellaisessa liuoksessa.

Käytettäessä TRIMEB:iä tai DIMEB:iä voidaan havaita vielä suurempi liukoisuuden kasvu. Kasvatettaessa syklodekstriinijohdannaisten pitoisuutta on ipriflavonin liukoisuuden kasvu lähes lineaarinen. TRIMEB:n 15 % liuoksessa 440 $\mu\text{g/ml}$ liukoisuus ja DIMEB:n 15 % liuoksessa 1700-2000 $\mu\text{g/ml}$ liukoisuus voidaan saavuttaa, mikä vastaa 300- ja 1770-kertaisia kasvuja liukoisuudessa, vastaavasti.

Yhteenvetona edellä mainituista tuloksista, keksinnön mukaisesti valmistetun ipriflavonin inkluusiokompleksin liukoisuus on 4 kertaa suurempi aktiiviaineosan suhteen - kuin ipriflavonin liukoisuus per se, ja sen resorptio rotille suun kautta annostelun jälkeen on vähintään 10 kertaa parempi verrattuna veritasoon, joka on mitattu saman suuruisen annoksen vapaata aktiivista aineosaa annostelun jälkeen. Muuttumaton 7-isopropoksi-isoflavoni-taso on ainakin 25 % resorptiokykyisen materiaalin kokonaismäärästä.

Inkluusiokompleksi voidaan valmistaa saattamalla 7-isopropoksi-isoflavoni reagoimaan syklodekstriinijohdannaisen kanssa vesi-orgaaninen liuotin-väliaineessa. Orgaanisena liuottimena voidaan käyttää alkoholia tai ketonia. Edullisesti, komponenttien vesi-etanoliliuosten annetaan reagoida - edullisesti 50 % etanolipitoisuudessa - sitten saatu kiteinen tuote eristetään jäädyttämällä.

Vaihtoehtoisesti mainittuja kahta komponenttia voidaan sekoittaa vesi-asetoni-väliaineessa haihduttaen samanaikaisesti liuotinta. Käytettäessä DIMEB:iä tai TRIMEB:iä tai liukoista syklodekstriinipolymeeriä, kiinteä, puuterimainen tuote voidaan eristää reaktioseoksesta haihduttamalla, spray-kuivaamalla, pakaste-kuivaamalla tai DIMEB:n tapauksessa kuumentamalla liuosta.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä.

Esimerkki 1

Ipriflavoni- β -syklodekstriini-inkluusiokompleksin, jolla on moolisuhde 1:2, valmistus

11,0 g (39,2 mmoolia) ipriflavonia ja 114,3 g (88,3 mmoolia) β -syklodekstriiniä, jossa kosteuspitoisuus on 12,36 % liuotettiin 2,25 litraan 50 tilavuus-% vesipitoiseen, etanoliliuokseen 80°C:ssa voimakkaasti sekoitetaan ja jätettiin jäähtymään huoneen lämpötilaan. Saostunut kiteinen tuote suodatettiin ja kuivattiin 24 tuntia 60°C:ssa, jolloin saatiin 96,4 g irtonaisen valkoisen pulverin muodossa olevaa tuotetta. Partikkelikoko on pienempi kuin 90 μ m. Ipriflavoni-sisältö: 10,8 paino-%; ipriflavoni: - β -syklodekstriinisuhde = 1:2; saanto suhteessa aktiiviseen aineosaan 94,7 %.

Sen osoittamiseksi, että yllä oleva tuote on todella inkluusiokompleksi, suoritettiin erilaisia termanalyttisiä, röntgensädediffraktio- ja liuotusanalyysyjä.

- Mekaanisen seoksen ja vapaiden komponenttien termoanalyttiset käyttäytymiset ovat miltei samat, mutta kuumennuksesta johtuvat muutokset kompleksissa voidaan havaita vain samanaikaisesti syklodekstriinin hajoamisen kanssa. Testatessa mekaanista seosta differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrillä (DSC) 115°C:ssa ilmenee endoterminen piikki vastaten ipriflavonin sulamispistettä, mutta mitään piikkiä ei voida havaita kompleksin ollessa kyseessä. Mekaaninen seos osoittaa jatkuvaa massahäviötä - ipriflavoni-sisältönsä mukaan - 130°C ja 250°C:n välillä, mutta kompleksien tapauksessa ei voida havaita massahäviötä tai orgaanisen aineen vapautumista samalla lämpötila-välillä (Thermal Evolution Analysis, TEA).
- Mekaanisen seoksen röntgensädediffraktiojauhediatrammi käsittää additiivisen summan komponenttien jauhediatrammeista. Kuitenkin, kompleksin jauhediatrammi sisältää vähemmän piikkejä ja uusia piikkejä ($2\theta = 6,7; 7,8; 20,9$) ollen luonteenomaisia kompleksille ja eroten β -syklodekstriinin luonteenomaisista piikeistä ($2\theta = 4,5; 10,6; 12,3$) osoittaen uuden kiteisen rakenteen ja siten todistaen epäsuorasti inkluusiokompleksin muodostumisen.
- Liukoisuuskokeiden suorittamiseksi laitettiin 250 ml tislattua vettä 500 ml pulloon ja kuumennettiin 37°C:seen. Sen jälkeen lisättiin tuotetta määrä, joka vastaa 50 mg aktiivista aineosaa, sitten siten saatua suspensiota sekoitettiin 1000 rpm:n nopeudella käyttäen magneettisekoittajaa. Kiintein aikaväleisin otettiin 2-6 ml näytteet ja suodatettiin lasisuodattimella ja laimennuksen jälkeen suodokset mitattiin fotometrisesti 1:1 vesi-etanoliseoksessa.

Saadut tulokset ovat yhteenvedona taulukossa II.

Taulukossa II

Ipriflavonin, esimerkin I mukaisesti valmistetun ipriflavon- β -syklodekstriini-inkluusiokompleksin ja ipriflavonin ja β -syklodekstriinin seoksen liukoisuus 250 ml:ssa tislattua vettä 37°C:ssa

Liuenneen ipriflavonin pitoisuus $\mu\text{g/ml}$				
Aika (min)	Ipriflavoni 51,5 mg	Ipriflavon- β -syklodekstriini-inkluusiokompleksi 471,5 mg	Ipriflavoni (50,5 mg) + syklodekstriini (444,7 mg)	
10	1	0,435	13,21	0,442
	2	0,327	9,26	0,462
	3	0,401	8,03	0,726
	5	0,507	7,36	1,20
15	10	0,882	7,62	2,28
	15	1,123	7,43	3,21
	20	1,197	7,89	4,69
	30	1,423	6,89	5,86
	40	1,508	7,11	6,07
20	60	1,621	6,81	6,27
	90	1,525	6,89	6,34
	120	1,482	6,94	6,37

Vapaan aktiivisen aineosan liukeneminen on suhteellisen hidasta, se saavuttaa ipriflavonin kyllästysarvon (noin 1,5 $\mu\text{g/ml}$) 40-50 minuutin jälkeen. Ipriflavoni- β -syklodekstriinikompleksia sisältävien näytteiden ollessa kyseessä liuenneen ipriflavonin maksimipitoisuus havaitaan jo 1 minuutin jälkeen, ts aktiivinen aineosa liukenee heti - tapahtuu siis salamaliukeneminen -, sitäpaitsi alussa aktiivisen aineosan pitoisuus voi olla yhtä suuri kuin kyllästysarvo kaksinkertaisena. Ipriflavonin ja β -syklodekstriinin seoksen liukeneminen on hitaampaa, liuenneen aktiivisen aineosan pitoisuus lähenee arvoa, joka on määritetty inkluusiokompleksin liuettua, vasta 30-40 minuutin jälkeen.

Aktiivisen aineosan liukeneminen on määritetty myös erilaisilla pH-arvoilla. Saadut liukoisuuskäyrät pH:ssa 1,3 (se vastaa mahan happamuutta; HCl) ja pH:ssa 7,6 (se vastaa suoliston pH-arvoa; fosfaattipuskuri) eivät eroa merkittävästi tislatussa vedessä saaduista liukoisuusarvoista, minkä mukaisesti aktiivisen aineosan liukoisuus on riippumaton pH:sta testatulla pH-alueella.

Esimerkki 2

Ipriflavoni- γ -syklodekstriini-inkluusiokompleksin, jossa moolisuhde 1:2, valmistus

0,5 g (1,78 mmoolia) ipriflavonia liuotettiin 50 ml:aan 96 %:sta etanolia ja siten saadut liuokset lisättiin tipoittain liuokseen, jossa oli 8,0 g (5,35 mmoolia) γ -syklodekstriiniä, jossa kosteussisältö oli 13,3 %

50 ml:ssa tislattua vettä, kahden tunnin aikana, sitten seos jätettiin jäähtymään huoneen lämpötilaan. Lisä-16-tunnin intensiivisen sekoittamisen jälkeen saatu tuote suodatettiin ja kuivattiin 24 tuntia 60°C:ssa, jolloin saatiin 5,5 g tuotetta. Ipriflavoni-sisältö: 7,9 paino-%, moolisuhde ipriflavoni: γ -syklodekstriini = 1:2,29.

Saanto suhteutettuna aktiiviseen aineosaan: 87 %. Tuote sisältää siis vapaata syklodekstriiniä.

Esimerkki 3

Ipriflavoni- α -syklodekstriini-inkluusiokompleksin, jossa moolisuhde 1:2, valmistus

0,5 g (1,78 mmoolia) ipriflavonia liuotettiin 10 ml:aan asetonia huumareessa ja 4,0 g (3,70 mmoolia) α -syklodekstriiniä, jonka kosteussisältö oli 10 paino-% ja 2 ml tislattua vettä lisättiin. Siten saatu kevyt suspensio homogenisoitiin mekaanisesti kunnes liuotin oli haihtunut. Sen jälkeen siten saatu tuote kuivattiin 24 tunnin ajan 60°C:ssa. Se sisältää 11,1 % aktiivista aineosaa ja myös vapaata α -syklodekstriiniä. Ipriflavonin moolisuhde α -syklodekstriiniin = 1:2,1.

Formulointiesimerkkejä ipriflavoni-syklodekstriini-

inkluusio-komplekseja aktiivisina aineosina sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia varten ja biologisia kokeita niistä.

Esimerkki 4

5 200 mg ipriflavonia sisältävän tunnetun tabletin Yambolap (A), 40 mg ipriflavonia esimerkin 1 mukaisesti valmistetun β -syklodekstriini-inkluusiokompleksin muodossa sisältävän tabletin (B) ja 200 mg ipriflavonia ja 330 mg β -syklodekstriinia sisältävää seosta sisältävän
10 tabletin liuotusominaisuuksia verrattiin 37°C:ssa 500 ml:ssä mahanestettä käyttäen Erweka ZT-4-laitteistoa. Yksi pala tablettia asetettiin laitteeseen ja liuenneen materiaalin määrä määritettiin spektrofotometrisesti 247 nm:ssä.

15 Testattujen tablettien koostumukset olivat seuraavat:

Tabletti A (tunnettu tabletti Yambolap, K-020484):

	Ipriflavoni	200 mg
	Amylum maxdis	36 mg
20	Laktoosi	60 mg
	PVP	13 mg
	Esma Spreng	30 mg
	Talkki	7 mg
	Magnesiumstearaatti	4 mg
25		350 mg

Tabletti B:

Keksinnön mukainen inkluusiokompleksi sisältäen 40 mg

	ipriflavonia	370 mg
	PVP	15 mg
30		385 mg

Tabletti C:

	Ipriflavoni	200 mg
	β -syklodekstriini	330 mg
	PVP	20 mg
35		550 mg

Liukoisuuskokeiden tulokset ovat yhteenvedona taulukossa III.

Taulukko III

Erilaisista tableteista liuenneiden aktiivisten aineosien määrät

Aika (min)	Liuenneen aktiivisen aineosan määrät (mg)		
	A	B	C
2	-	0,80	-
5	0,21	1,05	0,27
10	0,45	1,10	0,50
15	0,58	1,15	0,60
30	0,56	1,15	0,65
60	0,61	1,30	0,75
120	0,60	1,30	1,00
180	0,62	1,40	1,15

Tulokset osoittavat, että vain 0,62 mg ipriflavonia liukenee tavallisesta tabletista, mutta tapauksessa, että tabletti sisältää yhden viidenneksen aktiivisesta aineosasta β -syklodekstriini-inkluusiokompleksin muodossa verrattuna tavanomaisessa tabletissa olevan aktiivisen aineosan määrään, liuenneen aktiivisen aineosan määrä kaksinkertaistuu ja liuenneen materiaalin määrä ylittää 2 minuutin jälkeen 30 %:lla maksimiarvon, joka on saatu tavanomaisilla tableteilla. Tabletin sisältäessä ipriflavonia ja β -syklodekstriiniä mekaanisen seoksen muodossa, liukeneminen oli jonkin verran hitaampaa, mutta sittenkin liuenneen aktiivisen aineosan määrä oli suurempi kuin verrattuna tavanomaiseen tablettiin.

Resorptiokokeisiin käytettiin CFY koirasrottia, jotka painoivat 170-200 g. 16 tunnin paaston jälkeen annosteltiin ipriflavonia annoksena 25 mg/kg (ryhmä A), esimerkin mukaisesti valmistettua ipriflavoni- β -syklodekstriini-inkluusiokompleksia (ryhmä B) ja ipriflavoni-

β -syklodekstriiniseosta (ryhmä C) - kummankin sisältäessä β -syklodekstriiniä ekvimolaarisessa suhteessa aktiiviseen aineosaan nähden, sen jälkeen annettiin eläimille rotanruokaa ja vettä "ad libitum" (halun mukaan).

5 Testattavia materiaaleja sekoitettiin 5 minuuttia 2 ml:ssa 1 % metyyliiselluloosaliuosta ja annosteltiin vatsaputken avulla. Plasmanäytteitä kerättiin 10, 30 minuuttia ja 1, 2 ja 4 tuntia käsittelyn jälkeen käyttäen kuolettavaa verenvuotoa eetterillä nukutettujen eläimien
10 reisilaskimon transektioinnin jälkeen. Verinäytteet laitettiin hepariinilla sisältäviin putkiin, sentrifugoitiin, nutsch-suodatettiin ja varastoitiin syväjäädetyinä pienissä lääkepulloissa, jatkokäyttöä varten.

 Virtsanäytteiden keräämiseksi käsittelyn jälkeen
15 eläimet laitettiin yksittäisiin aineenvaihdunta-astioihin ja virtsa ja ulosteet kerättiin erikseen 24 tunnin ajan. Virtsanäytteet varastoitiin syväjäädetyinä jatkokäyttöön. Muuttumattoman ipriflavonin ja sen pääainenvaihduntatuotteen (7-hydroksi-isoflavoni) pitoisuutta virtsassa ja plasmassa seurattiin HPLC:llä.
20

 HPLC suorittamiseksi käytettiin nestekromatografia tyyppiä RP-18 ja LiChrosorb käänteisfaasikolonnia (plasmanäytteen tapauksessa raekoko: 10 μ m ja virtsanäytteiden tapauksissa: 5 μ m). Eluentin virtausnopeus:
25 1,5 ml/min, UV-detektorin aallonpituus: 254 nm, paperin nopeus: 0,2 cm/min.

 Plasmanäytteiden tapauksessa käytettiin eluenttina seosta 0,05 M asetaattipuskuri (pH = 3): asetonitriili = 60:40 ja virtsanäytteiden tapauksessa seosta
30 asetaatipuskuri: asetonitriili = 55:45. Sisäinen standardi oli 2-metyyli-7-metoksi-4'-nitroisoflavonin (100 μ g/ml) etanoliliuos ja kalibrointiin käytettiin liuosia käsittäen 100 μ g/ml ja 10 μ g/ml 7-hydroksi-isoflavonia metanolissa.

35 Plasmanäytteiden analysoimiseksi lisättiin 1 ml:

aan plasmaa 1 ml asetaattipuskuria ($\text{pH} = 5$) ja β -glukuronidaasi-(aryylisulfonaati)-entsyymiä (100FU) laimennettuna 10-kertaisesti 10 μ l:lla tislattua vettä ja inkuboitiin 37°C:ssa 24 tuntia. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 50 μ l 2 N NaOH ja seos uutettiin bentseenillä ja sentrifugoitiin. Orgaaninen faasi erotettiin, vesifaasi tehtiin happamaksi 400 ml:lla 1N HCl, ja 50 μ l sisäisen standardiliuoksen lisäyksen jälkeen seos uutettiin uudelleen 8 ml:lla bentseeniä. Orgaaninen faasi sentrifugoitiin, haihdutettiin, jäännös liuotettiin 100 μ l:aan eluenttia ja 50 μ l tätä liuosta injektointiin ja mitattiin.

Kalibrointikäyrän yhtälö: $y = 8,2x - 0,08$; korrelaatiokerroin: 0,9999.

Virtsanäytteen analysoimiseksi 0,5 ml:aan virtsaa lisättiin 0,5 ml asetaattipuskuria ($\text{pH} = 5$) ja 10 μ l β -glukuronidaasi-(aryylisulfataasi)-entsyymiä (1000FU) ja seos uutettiin 8 ml:lla bentseeniä ja sentrifugoitiin. Orgaaninen faasi erotettiin, vesifaasi tehtiin happamaksi 400 ml:lla 1N HCl, ja 50 μ l sisäisen standardiliuoksen lisäyksen jälkeen liuos uutettiin uudelleen 8 ml:lla bentseeniä. Orgaaninen faasi sentrifugoitiin, haihdutettiin, jäännös liuotettiin 100 μ l:aan eluenttia, ja 10 μ l tätä liuosta injektointiin nestekromatografiin.

Kalibrointikäyrän yhtälö: $y = 0,911x - 0,09$, korrelaatiokerroin: 0,9995.

Taulukossa IV on esitetty muuttumattoman ipriflavonin pitoisuusarvot ja taulukossa V on esitetty pääaineenvaihduntatuotteen pitoisuusarvot määritettynä eläinten verestä. Ryhmään A oli annosteltu ipriflavonia per se, ryhmään B keksinnön mukaista inklusiokompleksia ja ryhmään C ipriflavonin ja β -syklodekstriinin seosta.

Taulukko IV

Muuttumattoman ipriflavonin plasmatasoarvot $\mu\text{g/ml}$
ajan funktiona ekvivalenttisten annosten po annos-
telun jälkeen

Aika (h)	A Ipriflavononi	B Esimerkin 1 muk. valmistettu ink- luusiokompleksi	C Ipriflavonin ja β -syklodekstrii- nin seos
0,17	0	0,065	0,479
	0	0,055	0
	0	0,073	0
0,5	0	0,468	0
	0	0,149	0
	0	0,194	0
1	0	0,271	0
	0	0,354	0
	0	0,293	0
2	0,078	0,514	0,081
	0	0,402	0
	0,095	0,214	0
4	0,041	0,148	0
	0	0,363	0
	0	0,054	0
24	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

Taulukko V

Pääaineenvaihduntatuotteen (7-hydroksi-isoflavon) plasmatasoarvot $\mu\text{g/ml}$:na ajan funktiona ekvivalenttisten annosten po annostelun jälkeen

Aika (h)	A Ipriflavoni	B Esimerkin 1 muk. valmistettu ink- luusiokompleksi	C Ipriflavonin ja β - syklodekstriinin seos
0,17	0,156	-	2,080
	0,265	2,450	0,457
	0,195	3,650	0,767
0,5	0,860	12,270	0,304
	0,591	4,840	0,374
	0,365	-	0,358
1	0,239	12,190	0,306
	0,790	4,330	-
	0,340	3,870	0,274
2	1,218	22,040	0,270
	0,715	-	0,358
	1,093	3,780	0,826
4	0,220	1,740	-
	0,237	-	0,130
	0,235	2,520	0,330
24	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

Joka jaksossa muuttumaton ipriflavoni voidaan havaita vain ryhmän B tapauksessa ja sen määrä on 50-500 ng/ml. Ryhmän A sekä samaten ryhmän C tapauksessa muuttumatonta ipriflavonia voidaan havaita vain harvoissa jaksoissa (2 ja 4 tunnissa). Mitä tulee pääaineenvaihduntatuotteeseen, niin joka jaksossa plasmatasot olivat 10-20 kertaa korkeampia ryhmässä B verrattuna tasoihin ryhmissä A ja C määritettynä samassa jaksossa, ts ryhmän

B arvot ovat välillä 3-20 $\mu\text{g/ml}$ kun ne ryhmien A ja C tapauksissa ovat välillä 0,2-1,0 $\mu\text{g/ml}$. Kaikissa tapauksissa ilmenee toinen piikki plasmakäyrässä 2-tunnin jaksossa, mikä saattaa olla tulosta tehokkaasta enterohepa-
5 tiittisesta kierrosta ja vielä paremmasta resorptiosta ohutsuolesta.

Taulukossa VI on esitetty tulokset virtsanäytteiden HPLC-analyysituloksista, 0-24 tunnin virtsanäytteistä ei voida havaita muuttumatonta ipriflavonia. Kuitenkin
10 pääaineenvaihduntatuotetta (kaikissa tapauksissa) voidaan seurata. 7-hydroksi-isoflavonin keskimääräinen arvo oli 952 μg vastaten 3-kertaista kasvua verrattuna muihin ryhmiin. Kokemuksemme mukaan pääaineenvaihduntatuotteen määrä on 50-55 % aineenvaihduntatuotteen kokonaismäärästä
15 ja siten virtsan mukana poistunut kokonaismäärä on 2 kertaa suurempi kuin *us de facto* määritetty määrä. Tämä huomioonottaen ryhmän B tapauksessa 40 %, kun taas ryhmien A ja C tapauksessa vain 10-14 % annostellusta annoksesta on poistunut virtsan mukana.

20 Edellä mainittujen tosiasioiden mukaan voidaan osoittaa, että ipriflavoni- β -syklodekstriini-inkluusio-kompleksin rotille annostelun jälkeen voidaan saavuttaa 10-15-kertainen kasvu plasmatasossa ja noin 3-kertaa suurempi poistuneen aineen määrä kuin verrattuna kont-
25 rolliin.

Taulukko VI

Virtsan mukana poistuneen pääaineenvaihdunta-
tuotteen (7-hydroksi-isoflavoni) määrät, mitat-
tuna ekvivalenttisten annosten po annostelun
jälkeen

Eläinten lukumäärä	Poistuneen materiaalin kokonaismäärät /ug	Poistuneen materiaalin määrät, %:na annoksista D %	D %
A			
Ipriflavoni	1	236,1	9,44
	2	344,4	13,77
	3	270,4	10,81
B			
Esim. 1 muk.	4	925,4	37,01
inkluusio-	5	978,9	39,16
kompleksi			38,09
C			
Ipriflavonin	6	341,6	13,66
ja β -syklo-	7	494,3	19,77
dekstriinin			13,33
seos	8	163,9	6,56

Patenttivaatimus

Menetelmä 7-isopropoksi-isoflavonin ja syklo-
dekstriinin inkluusiokompleksin valmistamiseksi, t u n -
5 n e t t u siitä, että 7-isopropoksi-isoflavoni saatetaan
reagoimaan α, β, γ -syklodekstriinin, heptakis-2,6-O-dime-
tyyli- tai 2-heptakis-2,3,6-tri-O-metyyli- β -syklodeks-
triinin kanssa tai syklodekstriinipolymeerin kanssa, jon-
ka molekyylipaino on noin 4000, vesipitoisessa tai vesi-
10 orgaanisessa väliaineessa, jolloin 7-isopropoksi-isofla-
vonin ja syklodekstriinikomponentin välinen moolisuhde on
1:2 - 3,5, minkä jälkeen muodostunut tuote eristetään ja
kuivataan.

15

Patentkrav

Förfarande för framställning av ett inklusions-
komplex av 7-isopropoxi-isoflavon och cyklodextrin,
k ä n n e t e c k n a t därav, att 7-isopropoxi-isofla-
20 von omsätts med α, β, γ -cyklodextrin, heptakis-2,6-O-dime-
tyl- eller 2-heptakis-2,3,6-tri-O-metyl- β -cyklodextrin
eller med en cyklodextrinpolymer med en molekylvikt av ca
4000 i ett vattenhaltigt eller vatten-organiskt medium,
varvid molförhållandet mellan 7-isopropoxi-isoflavonen
30 och cyklodextrinkomponenten är 1:2 - 3,5, varefter den
bildade produkten isoleras och torkas.