

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046550**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.26**

**(21)** Номер заявки  
**201892065**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.03.15**

**(51)** Int. Cl. *A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 47/02* (2006.01)  
*A61K 9/06* (2006.01)  
*A61K 47/42* (2017.01)  
*A61K 33/26* (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ ЖЕЛЕЗА В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

---

**(31)** 16160539.9

**(32)** 2016.03.15

**(33)** EP

**(43)** 2019.04.30

**(86)** PCT/EP2017/056134

**(87)** WO 2017/158030 2017.09.21

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СОЛВОТРИН ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД**  
**(IE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Гилмер Джон, Габор Радикс, Велехан**  
**Майкл, Ван Дзун, О'Флинн Пат,**  
**Ледвидж Марк (IE)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2013044246  
WO-A2-2007035757  
US-A-4216144  
WO-A1-0112163  
US-A-4167564

---

**(57)** Получены композиции, содержащие железо, буферное средство и денатурированный белок, которые способны увеличивать содержание железа в сыворотке у субъекта. Например, получены высушенные распылением микрогранулы, содержащие железо, заключенное в белковой матрице, и несвязанное железо в буферной композиции, которая обеспечивает гастропротекторный эффект, сохраняет железо в более доступной форме Fe<sup>2+</sup> и повышает биодоступность железа у человека, в сравнении с известными ранее носителями для доставки железа в организм субъекта.

**B1**

**046550**

**046550**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к композициям, подходящим для доставки железа в организм млекопитающего.

#### Предпосылки создания изобретения

Перорально введенное железо часто плохо поглощается и переносится млекопитающими, и согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от дефицита железа страдают более двух миллиардов человек в развитых и развивающихся странах. Данное состояние может неблагоприятно влиять на когнитивную функцию, перенос кислорода в тканях, метаболизм и иммунную функцию.

Железо преимущественно поступает в организм пероральным путем в виде двухвалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) железа, которое в зависимости от потребности организма активно поглощается с помощью переносчика двухвалентных металлов 1 (DMT-1), однако имеет плохую пероральную биодоступность и переносимость. Трехвалентное ( $\text{Fe}^{3+}$ ) железо обычно лучше переносится с точки зрения влияния на желудочно-кишечный тракт, однако, как правило, имеет более низкую биодоступность, чем двухвалентное железо. Двухвалентное железо продолжает оставаться международным золотым стандартом с точки зрения поглощения перорально введенного железа, и единственной солью, упомянутой в перечне основных лекарственных средств ВОЗ, является соль двухвалентного железа. Сульфат железа является наиболее поглощаемой формой перорально введенного железа. Однако он также плохо поглощается. Фармацевтическим подходом в случае слабой поглощаемости перорально вводимого железа является увеличение дозы. Однако это приводит к серьезным нарушениям функции желудочно-кишечного тракта. На рынке имеются препараты с замедленным высвобождением и/или гастропротекторные препараты (например, с энтеросолюбильным покрытием), содержащие и не содержащие железо, однако, как известно специалистам в данной области, они характеризуются меньшей биодоступностью и, соответственно, не рекомендуются к применению. Смотри, например, Walker S., et al., "Bioavailability of iron in oral ferrous sulfate preparations in healthy volunteers", Canadian Medical Association Journal 1989; (141): 543-547. Современные пероральные препараты железа, используемые в качестве биологических добавок, имеют значительные ограничения, что объясняет высокую частоту случаев дефицита железа, единственного дефицита питательных веществ, распространенного в развитых и развивающихся странах. Авторы изобретения обнаружили, что могут быть получены гастропротекторные, приятные на вкус препараты, например, микроинкапсулированные препараты, железа, заключенного в денатурированном белке, например, денатурированном белке молочной сыворотки, обладающие более высокой биодоступностью в сравнении с сульфатом железа. Они особенно подходят для создания продуктов, принимаемых перорально, например, пищевых продуктов или пищевых добавок, в которых присутствующее железо создает проблемы с вкусовой привлекательностью и стабильностью. Однако подходящие препараты, как правило, должны иметь высокие показатели соотношения белок/железо, обычно бывают объемными, требуют относительно высоких производственных затрат, и их довольно сложно формулировать в виде пищевых добавок с единичной дозированной формой для перорального приема, например, в виде капсул или таблеток.

Таким образом, одной из проблем, требующих решения, является создание препарата для пероральной доставки, например, таблетки или капсулы, обеспечивающего хорошее поглощение железа, в виде недорогого и небольшого по объему продукта. Производство такого препарата должно быть подходящим для масштабирования. Такой препарат должен обеспечивать эффективную доставку железа с целью эффективного увеличения содержания доступного железа в организме. Предпочтительно, такой препарат является эффективным даже при введении более низкой суммарной дозы. Предпочтительно, такой препарат имеет хорошую переносимость в желудочно-кишечном тракте. Предпочтительно, такой препарат способствует меньшему прохождению железа в нижние отделы ЖКТ. Предпочтительно, такой препарат вызывает меньше неблагоприятных эффектов в сравнении с другими препаратами железа.

#### Сущность изобретения

Изобретение относится к композиции, содержащей железо, буферное средство и носитель, содержащий денатурированный белок, которая высвобождает по меньшей мере 71%, например, по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 80%, общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 30 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6, которая при внесении ее в искусственный желудочный сок при pH 1,6 доводит pH до значения по меньшей мере 2 (через 30 мин) и которая при внесении ее в искусственный кишечный сок при pH 6,6 доводит pH раствора до значения не более pH 5,5, например, pH 5,0 (через 30 мин), и которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 120% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа с немедленным высвобождением.

Композиции по изобретению подходят для введения млекопитающим, включая людей.

Композиция по изобретению высвобождает по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 71%, например, по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 80% ее буферного средства в течение 30 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6.

Предпочтительно, если в композиции по изобретению высвобождение железа и высвобождение буферного средства происходит в молярном соотношении. Например, в соотношении 1:1. Таким образом,

например, если молярное соотношение составляет 1:1, то количество по массе высвобождаемого буферного средства может практически соответствовать количеству по массе высвобождаемого железа.

Изобретение относится к композиции, содержащей ядро из железа и денатурированного белка, соль железа и pH-модифицирующее средство, которая в условиях, характерных для желудочного сока, высвобождает по меньшей мере 71%, например, по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 80%, общего содержащегося в ней железа и по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 71%, например, по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 80%, ее модификатора pH в течение 1 часа, и которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 120% в сравнении с эквивалентной дозой введенного перорально раствора (с немедленным высвобождением) сульфата железа в подкисленной воде.

Композиция по изобретению преимущественно обладает характеристиками препарата с немедленным высвобождением. Удивительно, но даже обладая характеристиками немедленного высвобождения, препарат хорошо переносится и не вызывает неблагоприятных побочных эффекты, которые можно было бы ожидать при использовании композиций, высвобождающих большие количества железа. Считается, что другие препараты, с более медленным высвобождением, переносятся лучше, поскольку доза высвобождается медленно с течением времени, что способствует лучшей переносимости. Недостатком таких препаратов является то, что они плохо поглощаются. Композиция по изобретению обладает гастропротекторными свойствами.

Композиция по изобретению может высвобождать по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 71%, например, по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 80%, ее буферного средства в течение 30 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6.

Композиция может иметь соотношение железо:белок, по массе, составляющее от 1:50 до 5:1, например, от 1:40 до 1:3.

Композиция по изобретению может иметь общее содержание железа, составляющее от 2,5 до 50% по массе, например, 5-10%.

Композиция может иметь соотношение буферное средство/модификатор pH (например, ацетат/уксусная кислота): белок, по массе, составляющее от 1:50 до 5:1, например, от 1:40 до 1:3.

Композиция может иметь соотношение буферное средство/модификатор pH (например, ацетат/кислота, такая как уксусная кислота): железо, по массе, составляющее от 1:10 до 10:1, например, от 1:3 до 3:1, например, от 1:1,25 до 2:1.

Композиция может являться (по существу) аморфной. Этот факт был подтвержден методом РД.

Денатурированный белок может являться по меньшей мере на 50, 80 или 90% денатурированным.

Денатурированный белок может содержать по меньшей мере 50, 80 или 90% денатурированного бета-лактоглобулина.

Денатурированный белок может быть подвергнут процессу удаления ионов двухвалентного металла.

Содержание воды в композиции может составлять менее 30%, менее 20%, например, менее 15%, или менее примерно 10% по массе.

Композиция по изобретению может иметь ядро, которое содержит матрицу из денатурированного агрегированного белка.

Носитель может иметь ядро и оболочку, при этом оболочка содержит денатурированный агрегированный белок. Необязательно, оболочка может дополнительно содержать гелеобразующее средство.

Ядро может содержать матрицу из денатурированного агрегированного белка. Необязательно, денатурированный белок содержит, исключая железо, менее 500 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 300 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, 100 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка.

Композиция при пероральном введении человеку может иметь соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 150% или 175% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа с немедленным высвобождением.

Композиции вводят голодающим субъектам, и содержание железа в сыворотке измеряют у голодающих субъектов. Термин "голодающий" означает, что субъект не принимал пищу в течение 8 ч.

Композиция при пероральном введении человеку может иметь соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 160%, по меньшей мере 175% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа с немедленным высвобождением.

Композиция может высвобождать более 70 мас.%, например, более 71 мас.%, общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6; композиция может высвобождать более 75 мас.% общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6; композиция может высвобождать более 80 мас.%

общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6; композиция может высвобождать более 85 мас.% общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6; композиция может высвобождать более 90 мас.% общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6; композиция может высвобождать более 10, 20, 30, 40, 50 или 60 мас.% общего содержащегося в ней железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном кишечном соке при pH 6,6; и/или композиция может высвобождать более 80 мас.% общего содержащегося в ней железа в течение 15 мин или 30 мин, или 45 мин, или 60 мин в искусственном кишечном соке при pH 6,6.

Композиция может дополнительно содержать стабилизатор, такой как аскорбиновая кислота, аскорбаты, например, он может быть выбран из L-аскорбиновой кислоты, L-аскорбата натрия, L-аскорбата кальция, аскорбилпальмитата (пальмитоил-L-аскорбиновой кислоты), эриторбиновой кислоты (D-изоаскорбиновой кислоты) и эриторбата натрия (D-изоаскорбата натрия), или их сочетания.

Соотношение железо: белок может составлять от 1:20 до 1:3, например, от 1:40 до 1:3, например, от 1:15 до примерно 1:4, например, от примерно 1:6 до примерно 1:12.

Композиция может состоять из частиц, имеющих средний размер частиц 2000 мкм или менее, 1000 мкм или менее, 600 мкм или менее, 500 мкм или менее, или 300 мкм или менее, или 100 мкм или менее, или 80 мкм или менее, или 60 мкм или менее, или 40 мкм или менее, или 20 мкм или менее.

В одном варианте осуществления железо в композиции содержит по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 90, 95, 98 или 99% двухвалентного железа.

Композиция, предпочтительно, является стабильной в отношении содержания двухвалентного железа и микробного загрязнения в течение по меньшей мере 6 месяцев при хранении в герметичном контейнере в условиях ускоренного старения препаратов (40°C и относительная влажность 75%).

В одном варианте осуществления композиция является стабильной в отношении содержания двухвалентного железа при хранении в герметичном контейнере в условиях окружающей среды в течение по меньшей мере 24 месяцев.

В одном варианте осуществления денатурированный белок содержит денатурированный белок молочной сыворотки, денатурированный изолят белка молочной сыворотки, денатурированный бета-лактоглобулин или их сочетания.

В одном варианте осуществления изобретения композиция содержит соль. Например, соль короткоцепочечной жирной кислоты, например, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> жирной кислоты. Соль, включенная в композицию по изобретению, может иметь буферный эффект, например, в растворе. Соль, включенная в композицию по изобретению, может являться модификатором pH, например, когда композиция по изобретению находится в растворе.

Композиция по изобретению предпочтительно содержит буферное средство, такое как соль, которая имеет pH-буферный эффект. Например, если композицию по изобретению предоставляют в форме твердых частиц, полученных из жидкой композиции, предпочтительно, если буферное средство, например, соль, действует в качестве буфера в жидкой композиции, из которой были получены частицы.

Подходящие буферные средства включают: подходящие соли, такие как ацетаты, пропионаты, бутираты, фосфаты и цитраты.

Подходящие соли включают соли ионов одновалентного металла, например, соли натрия. Подходящие соли включают ацетат натрия, пропионат натрия, бутират натрия, цитрат натрия. Одной из подходящих солей является ацетат натрия. Понятно, что такие материалы могут действовать в качестве буферных средств в присутствии источника ионов водорода (протонов).

В композиции по изобретению буферное средство/модификатор pH может присутствовать в количестве (по массе), превышающем примерно 3%, например, превышающем примерно 4%, например, превышающем примерно 5%, например, превышающем примерно 6%, например, превышающем примерно 7%. Количество может составлять более примерно 8%, например, может составлять более примерно 10%, например, может составлять более примерно 12%, например, может составлять более примерно 15%, например, примерно 17%.

Композиция по изобретению может быть получена из денатурированного белка, буферного средства, такого как соль, и железа. В такой композиции денатурированный белок предпочтительно присутствует в количестве от 5 до 80%; например, от 20 до 60%, например, от 30 до 50%, по массе от общей массы композиции. Такая композиция может находиться в соответствующем жидком носителе.

В такой композиции буферное средство предпочтительно присутствует в количестве от 5 до 50%; например, от 6 до 20%, например, от 6 до 15%, по массе от общей массы композиции. Такая композиция может находиться в соответствующем жидком носителе.

В такой композиции железо предпочтительно присутствует в количестве от 5 до 50%; например, от 5 до 20%, например, от 5 до 10%, по массе от общей массы композиции.

Предпочтительно, денатурированный белок представляет собой белок, выбранный из белка молочной сыворотки, денатурированного изолята белка молочной сыворотки, денатурированного бета-

лактоглобулина, композиции белка молочной сыворотки, содержащей бета-лактоглобулин, или белка, содержащего бета-лактоглобулин, или белка гороха, или их сочетаний. Одним из подходящих белков является денатурированный белок молочной сыворотки.

Предпочтительно, железо присутствует в форме двухвалентного железа, например, материала двухвалентного железа, описанного в настоящем документе.

Предпочтительно, денатурированный белок содержит менее 500 мг кальция на 100 г общего белка, 300 мг кальция на 100 г общего белка, например, менее 200 мг кальция на 100 г общего белка, например, менее 100 мг кальция на 100 г общего белка.

Одной из подходящих форм композиции по изобретению является сухая форма. Предпочтительно, сухую форму получают из жидкой композиции, описанной выше.

Сухая форма композиции по изобретению будет содержать денатурированный белок, буферное средство, такое как соль, и железо.

Предпочтительно, сухую форму композиции получают из жидкой композиции без отделения какого-либо материала от жидкости. Предпочтительно, если жидкость и материалы, находящиеся в ней, сушат совместно. Таким образом, отсутствует разделение, такое как фильтрование, центрифугирование и так далее. Таким образом, например, перед высушиванием не удаляют буферное средство. Таким образом, имеется маточная жидкость, в которой находится композиция, и перед высушиванием не выполняют отделение от маточной жидкости, например, не выполняют отделение геля и/или буферного средства.

Неожиданно было обнаружено, что сохранение количества буферного средства, присутствующего в жидкой форме, в сухом материале, полученном из жидкой формы, приводит к тому, что сухой материал является эффективным и лучше переносится, чем другие формы, такие как сульфат железа. Поскольку количество буферного средства не уменьшается (или практически не уменьшается), считается, что оно не только оказывает буферный эффект в жидкой форме, но также может играть определенную роль в стабильности и биодоступности железа, присутствующего в сухом материале. Например, оно может защищать двухвалентную форму железа от окисления. Как правило, тогда сухой материал будет иметь более высокую концентрацию буферного средства, например, соли, например, ацетата натрия.

Предпочтительно, если (ни) сухой материал (ни гель) не подвергают промыванию. Соответственно, полезно использовать способ, не требующий этапа промывания. Считается, что промывание сухого материала может приводить к удалению буферного средства, например, соли, такой как ацетат натрия. Это, в свою очередь, может влиять на профиль высвобождения железа из композиции. Такой же эффект может оказывать отделение геля от маточной жидкости для последующего высушивания.

Изобретение относится к композиции, содержащей:

железо; и

носитель, содержащий денатурированный белок молочной сыворотки;

в которой соотношение железо:белок, по массе, составляет от 1:50 до 5:1;

в которой денатурированный белок содержит, исключая железо, менее 500 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 300 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 100 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка;

в которой содержание влаги составляет менее 30, 15 или 10% по массе;

в которой носитель содержит ядро с матрицей из денатурированного агрегированного белка;

в которой по меньшей мере 50, 60 или 70 мас.% железа представляет собой двухвалентное железо;

которая содержит модификатор pH, такой как ацетат натрия;

которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 150% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа с немедленным высвобождением.

Композиция по изобретению может содержать ядро из дегидратированного гидрогеля на основе железа и белка.

Изобретение относится к способу увеличения сывороточного содержания железа у млекопитающего, которое нуждается в этом, включающему введение композиции, содержащей:

железо; и

носитель, содержащий денатурированный белок;

в которой соотношение железо:белок, по массе, составляет от 1:50 до 1:3;

которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 150% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа (с немедленным высвобождением), и, необязательно;

в которой денатурированный белок содержит, исключая железо, менее 500 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 300 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 100 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка.

Считается, что введение композиции млекопитающему, такому как человек, приводит к повышению pH в желудке и снижению pH в кишечнике (в двенадцатиперстной кишке).

Изобретение относится к композиции, содержащей железо и буферное средство, которая высвобо-

ждает по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 71%, общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение 30 мин в искусственном желудочном соке при pH 1,6; которая при внесении ее в искусственный желудочный сок при pH 1,6 доводит pH до значения по меньшей мере 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0 и которая при внесении ее в искусственный кишечный сок при pH 6,6 доводит pH раствора до значения не более pH 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, и которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 120% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа с немедленным высвобождением.

Такая композиция может, необязательно, содержать белок, такой как денатурированный белок, описанный выше. Все из аспектов изобретения, обсуждаемых в настоящем документе, также применимы к такой композиции.

Изобретение относится к композиции, содержащей железо, буферное средство и носитель, в которой буферное средство присутствует в количестве по массе, превышающем примерно 3%, например, превышающем примерно 4%, например, превышающем примерно 5%, например, превышающем примерно 6%, например, превышающем примерно 7%, например, превышающем примерно 8%, например, превышающем примерно 10%, например, превышающем примерно 12%, например, превышающем примерно 15%, например, примерно 17% по массе от массы композиции.

Такая композиция может, необязательно, содержать носитель, такой как белок, например, денатурированный белок, описанный выше. Все из аспектов изобретения, обсуждаемых в настоящем документе, применимы к такой композиции.

Изобретение относится к способу получения сухого материала для доставки железа, включающему: формирование геля из жидкости, содержащей денатурированный белок и железо, и, необязательно, буферное средство;

фрагментацию геля, с получением частиц геля в жидкости; и

высушивание жидкости, содержащей частицы геля, с получением сухого материала, такого как сухие частицы.

Хотя это не является необходимым, композиция по изобретению может содержать гелеобразующее средство для формирования, или облегчения формирования, соответствующего геля.

При сушке жидкости, содержащей частицы геля, например, при сушке распылением, и жидкость и частицы геля сушат совместно. Это отличается от способов, в которых жидкость (например, маточную жидкость) сначала удаляют, а затем оставшийся материал обрабатывают, например, превращают в частицы.

Использование способа по изобретению означает, что материал, который был бы удален при удалении жидкости, может оставаться в сухом материале. Это приводит к благоприятному изменению состава сухого материала.

Например, более высокое содержание буферного средства, например, соли, например, ацетата натрия, в сухом материале может приводить к повышению pH в желудке, обеспечивая гастропротекцию. Это может способствовать сохранению железа в 2+ состоянии (смотри выше). Это также может приводить к снижению pH в двенадцатиперстной кишке, что может способствовать поглощению железа.

Если способ по изобретению используют для получения сухих частиц, сухие частицы могут иметь средний диаметр частиц 5-15 или 15-30, или 30-50, или 50-75 мкм.

Предпочтительно, высушивание жидкости, содержащей частицы геля, включает сушку распылением, с получением сухих частиц. Можно использовать другие методы сушки, например, метод сушки в лотках, вакуумной сушки, сушки в барабанной сушилке, УФ-сушки, с контролем температуры до максимум 80 или 85, или 90, или 95, или 100°C.

Предпочтительно, буферное средство присутствует в композиции и поддерживает pH на уровне 2,5-6,5 или 3,0-6,0, или 3,3-4,0. Уровень pH поддерживается, когда композиция находится в жидкой форме.

Подходящее буферное средство представляет собой буферную систему соль/кислота, такую как буферная система ацетат натрия/кислота.

Сухие частицы содержат среднее количество железа, составляющее от 3 до 30%; например, от 4 до 10% по массе от общей массы композиции.

Сухие частицы содержат среднее количество денатурированного белка от 20 до 96% по массе.

Денатурированный белок может представлять собой белок молочной сыворотки или другие белки с высоким содержанием бета-лактоглобулина, например, белок гороха.

Денатурированный белок может, необязательно, представлять собой белок, подвергнутый процессу удаления двухвалентных ионов металла.

Железо может присутствовать в жидкости преимущественно в форме двухвалентного железа.

Предпочтительно, фрагментацию выполняют в течение относительно небольшого периода времени. Например, жидкий препарат можно подвергать фрагментации в течение периода времени вплоть до 1 или 3, или 5, или 7 мин.

Предпочтительно, если частицам геля, образовавшимся при фрагментации, дают возможность ста-

новиться более вязкими и становиться более плотными перед высушиванием. Например, жидкую композицию, содержащую частицы геля, можно оставлять для отстаивания в течение минимального периода времени, например, 10-120 мин, например, 20-40 мин, например, примерно 30 мин. После отстаивания жидкую композицию, содержащую частицы геля, высушивают. Опять-таки, это приводит к получению сухого материала, имеющего более высокую биодоступность, чем сульфат железа.

Следует понимать, что фрагментацию выполняют в фазе жидкости и перед высушиванием, а не после того, как получен сухой материал.

Процесс сушки предпочтительно выполнять в течение короткого периода времени, например, <300 мин или <120 мин, или <60 мин, или <30 мин, или <5 мин, или <1 мин. Процесс сушки предпочтительно выполнять таким образом, чтобы высушиваемый материал был подвергнут повышенной температуре от 40 до 100°C, например, от 50 до 90°C, например, от 60 до 80°C.

Предпочтительно, при использовании способа по изобретению получают частицы со средним диаметром в диапазоне 10-75 мкм.

Гель может представлять собой гидрогель.

Отсутствие этапа промывания, что является характерной особенностью способа, но также повышает буферную способность композиции, также повышает масштабируемость, выход, снижает стоимость продукта и приводит к получению композиции, которую можно быстро высушивать, например, высушивать распылением.

Композиция по изобретению обеспечивает по меньшей мере такую же биодоступность, как препарат, содержащий более, чем трехкратный, уровень дозы железа.

Достижение хорошей биодоступности с меньшей дозой способствует лучшей переносимости, даже в случае препарата с немедленным высвобождением.

Например, как показано на фиг. 10, композиция по изобретению с дозой железа, составляющей 25 мг, превосходит по характеристикам препарат, продаваемый под названием тардиферон™, содержащий дозу 80 мг сульфата железа.

В настоящем изобретении особенно предпочтительным является ацетат натрия. Принято считать, что ацетат натрия образует буферное средство под воздействием протонов из уксусной кислоты, другой органической кислоты (например, масляной кислоты, аскорбиновой кислоты) или протонов, присутствующих в желудочном или кишечном соке. Это является следствием установления равновесия между ацетатом натрия и уксусной кислотой. Считается, что он может образовывать буфер в среде желудка с диапазоном pH от 3,7 до 5,6. Считается, что этот буферный эффект может способствовать биодоступности железа. Кроме того, принято считать, что даже если уксусная кислота может присутствовать в жидкой композиции, из которой получают сухой материал, большая часть ее может испаряться во время сушки. Когда материал подвергается воздействию протонов в среде желудка с низким значением pH, pH возрастает, обеспечивая гастропротекцию. Это локальное pH-буферное действие может продолжаться в кишечнике, где pH кишечного сока поддерживается на более низком уровне, чем при использовании только сульфата железа, сохраняя железо II для поглощения DMT-1.

Кроме того, ацетат натрия (и, разумеется, уксусная кислота) является ингредиентом, пригодным для использования в пищевой промышленности.

Получены композиции, содержащие железо, буферное средство и денатурированный белок, способные увеличивать сывороточное содержание железа у субъекта. Например, получены высушенные распылением микрогранулы, содержащие железо, заключенное в белковой матрице, и несвязанное железо в буферной композиции, которая обеспечивает гастропротекторный эффект, сохраняет железо в наиболее доступной форме Fe<sup>2+</sup> и повышает биодоступность железа в организме человека в сравнении с ранее известными носителями для доставки железа в организм субъекта. Это достигается при использовании частиц малого размера, например, менее 80 мкм.

#### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 показано распределение по размерам частиц для микрогранул геля по изобретению, полученных путем формирования геля и уменьшения размеров частиц за счет фрагментации. Отверждающий раствор (500 мМ сульфат железа, 500 мМ-5М ацетат натрия) помещали в IKA LR-1000 и нагревали до 40°C. Примерно 500 мл раствора денатурированного белка молочной сыворотки (10,5%) добавляли в течение 30 с. После добавления раствора белка молочной сыворотки и формирования геля отверждающий раствор перемешивали при помощи ротационной мешалки Turgax со скоростью 15000 об/мин в течение 2 мин, и раствор оставляли для отверждения на 60 мин при низкой скорости вращения (мешалка 100 об/мин), получая более вязкую суспензию геля. Вновь образовавшиеся влажные частицы были очень мелкими (показаны результаты измерения размера частиц на анализаторе Malvern) и демонстрировали двухвершинную картину распределения с D50 33 мкм и D90 121 мкм. Для высушивания в этом случае образец нагревали до 80°C и данный раствор фильтровали в вакууме для удаления маточной жидкости. Остальной образец сушили в лотках в течение ночи в сушильном шкафу при 80°C.

На фиг. 2 показано оборудование, используемое в соответствии с аспектами варианта осуществления изобретения. Сначала получают раствор белка, как описано ниже, и смешивают с отверждающим раствором, как описано ниже, получая гель. Гель фрагментируют на частицы меньшего размера с ис-

пользованием срезающей силы (например, при помощи роторно-статорной или лопастной мешалки), получая частицы геля с нужным размером частиц. Суспензию геля затем осторожно перемешивают в течение по меньшей мере 30 мин перед перекачиванием ее в двухжидкостное сопло в распылительной сушилке. В [1] суспензию нагревают до температуры от 140°C до 160°C. [2] Затем образуются капли с помощью двухжидкостного сопла в установке Vuchi B-290. [3] Между сушильным газом и каплями образца происходит кондуктивный теплообмен. Это приводит к удалению избытка жидкости из маточной жидкости, а также жидкости внутри гранул геля. [4] Частицы собирают с использованием циклонной технологии. [5] В фильтре выходного отверстия происходит сбор самых мелких частиц. [6] Сушильный газ доставляется при помощи аспиратора.

На фиг. 3 представлено полученное методом СЭМ при слабом увеличении изображение микрогранул композиции, полученных методом сушки распылением. Изображения методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) получали на приборе Zeiss Ultra Plus Field Emission СЭМ с колонкой Gemini® (Zeiss). Сухие гранулы образца помещали на проводящую угольную пленку без какой-либо дополнительной обработки или покрытия образца. Использовали ускоряющее напряжение 2-3 кВ для преодоления экстенсивного эффекта разряда.

На фиг. 4 представлен сравнительный пример профиля железа II при растворении при pH 1,6 в присутствии пепсина (раствор с pH 1,6), демонстрирующий преимущественно немедленное высвобождение из микрогранул ST1501 композиции, полученной методом формирования геля, уменьшения размера частиц за счет срезающей силы и сушки распылением (пример 1). Подробная методика описана ниже. Данный профиль показывает, что композиция высвобождает большое количество (>71%) железа II в экспериментальных условиях, имитирующих среду в желудке (низкое значение pH, пищеварительные ферменты).

На фиг. 5 представлен пример профиля pH при растворении из микрогранул композиции при pH 1,6 и pH 6,6 через 30 мин в присутствии пепсина (раствор с pH 1,6) и панкреатина (раствор с pH 6,6). Показано сравнение с эквивалентными дозами железа в сульфате железа. Подробная методика описана ниже. Данный профиль показывает, что композиция по изобретению доводит pH желудочного сока до более высокого значения pH, чем сульфат железа или композиции без буфера, в экспериментальных условиях, имитирующих среду в желудке (низкое значение pH, пищеварительные ферменты). Это может обеспечить гастропротекцию в отличие от других буферов, которые могут связывать железо и/или блокировать его поглощение. Данный профиль также показывает, что композиция по изобретению доводит значение pH в кишечнике до более низкого значения pH, чем сульфат железа, в экспериментальных условиях, имитирующих среду в кишечнике (более высокое значение pH, пищеварительные ферменты и соли желчных кислот). Более низкое значение pH может замедлять окисление железа II и способствовать поглощению железа при помощи DMT-1.

На фиг. 6 представлен сравнительный пример соотношения остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч при использовании микрогранул ST1501 по изобретению и сульфата железа с эквивалентной дозой железа у голодающего субъекта (n=3).

На фиг. 7А представлен полученный методом Фурье-ИКС график, показывающий характерное присутствие характерных пиков ацетата натрия в композиции в области 1560-1410 см<sup>-1</sup> в сравнении с денатурированным белком молочной сыворотки. Измерения в инфракрасной области выполняли на Фурье-ИКС спектрофотометре PerkinElmer Spectrum 100 в области 4000-650 см<sup>-1</sup> и с использованием зонда нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). На фиг. 7В представлен полученный методом Фурье-ИКС график, показывающий уменьшение пиков ацетата натрия в композиции в области 1560-1410 см<sup>-1</sup>, отражающее уменьшение (<3% по массе) содержания ацетата натрия, уменьшение соотношения ацетат: железо и уменьшение соотношения ацетат: белок.

На фиг. 8 представлены результаты термогравиметрического анализа (ТГА) потерь при высушивании микрогранул по изобретению после использования только сушки распылением (А) и после сушки распылением с последующей сушкой при 80°C. Взвешенные порошкообразные образцы (10-15 мг) анализировали в открытых керамических чашках. Для ТГА измерений использовали термогравиметрический анализатор TGA-Q50 от компании TA Instruments со следующей температурной программой: образец был нагрет до 120°C (10°C/мин) и в течение 45 мин оставался изотермическим при 120°C.

На фиг. 9А показаны результаты порошковой РД, демонстрирующие преимущественно аморфную природу композиций по изобретению. Отсутствуют типичные пики ПРД, характерные для кристаллического сульфата железа (II). Измерения ПРД выполняли на образцах, помещенных в кремниевую ювету для образцов с низким уровнем фона, с использованием настольного рентгеновского дифрактометра Rigaku Miniflex II (Rigaku, Tokyo, Japan). Картины ПРД получали в области от 5° до 80° по шкале 2θ с шагом 0,05°/с. На рентгеновскую трубку с медным анодом (λCuKα 01,54 Å) подавали напряжение 30 кВ и ток 15 мА. Широкие пики базовой линии отражают низкий уровень упорядоченности в структуре белка. На фиг. 9В представлен профиль рентгеновской дифракции денатурированного белка молочной сыворотки, физически смешанного с гептагидратом сульфата железа, демонстрирующий признаки кристаллического состояния.



На фиг. 10 показаны сывороточные концентрации железа у голодающих субъектов (n=3), принимавших ферроград С с дозой элементарного железа 105 мг и впоследствии перешедших на ST1501.

#### **Подробное описание изобретения**

Используемые в настоящем документе термин "лишенный кальция" или "декальцифицированный", или "подвергнутый по меньшей мере частичному удалению ионов двухвалентного металла" относятся к белковому исходному материалу, который был подвергнут процессу удаления ионов двухвалентного металла, включая, но без ограничения, процессу удаления кальция. Предпочтительно, декальцифицированный белок содержит менее 500 мг кальция на 100 г белка, менее 200 мг кальция на 100 г белка, менее 100 мг кальция на 100 г белка, менее 50 мг кальция на 100 г белка, или лишь следовые количества кальция. Альтернативно, декальцифицированный белок может содержать (исключая железо) менее 1% ионов двухвалентного металла (по массе), менее 0,5% ионов двухвалентного металла (по массе), менее 0,1% ионов двухвалентного металла (по массе) или лишь следовые количества ионов двухвалентного металла. Существуют стандартные методы декальцификации белка, известные специалистам в данной области, включая (а) закисление с диализом и/или ультрафильтрацией, и/или диафильтрацией, и/или (b) использование хелатирующего/секвестрирующего кальций средства(средств), и/или (c) использование методов катионного обмена.

Используемый в настоящей спецификации термин "белковый носитель" означает вещество, по меньшей мере частично полученное из белкового источника, которое объединено с формой железа в композицию. Носитель может быть использован для того, чтобы сделать композицию подходящей для предназначенной цели. Целью может являться эффективная доставка железа в организм субъекта-млекопитающего. Белковый носитель может придавать определенные преимущества композиции. Примеры таких преимуществ включают, но без ограничения, обеспечение для композиции благоприятного модифицированного профиля высвобождения железа, придание композиции дополнительных антиоксидантных свойств, снижение уровня желудочно-кишечного дискомфорта, возникающего вследствие введения композиции, а также повышение уровня поглощения железа.

Используемый в настоящем документе термин "денатурированный белок" означает белок, который по меньшей мере частично денатурирован, то есть, по меньшей мере на 5% денатурирован.

Используемый в настоящем документе термин "инкапсуляция" или "заклучение в" означает процесс, включающий полное обертывание (заклучение) предварительно выбранного материала(ов) в матрице (как правило, называемой гранулой или сферой или микрогранулой) или капсуле, состоящей из ядра и оболочки (как правило, называемой капсулой), с образованием частиц, имеющих размер от нескольких сотен нанометров до нескольких сантиметров.

Используемый в настоящем документе термин "связанное железо" означает железо, которое не может с легкостью вымываться, и "несвязанное железо" может с легкостью вымываться. Данные термин не подразумевают ковалентное или ионное связывание.

Используемый в настоящем документе термин "преимущественно аморфный" означает отсутствие признаков ближнего порядка структуры на картине РД, связанных с кристалличностью. Иными словами, низкую кристалличность. Смотрите, например, фиг. 9.

Используемый в настоящем документе термин "аморфное" вещество включает преимущественно аморфное вещество.

Капсула состоит из определенного и четко различаемого ядра (состоящего из инкапсулированного материала) и оболочечной части, которые отделены друг от друга. В предпочтительных вариантах осуществления микрогранула представляет собой сферическую структуру, имеющую (инкапсулированный) материал, распределенный по всей структуре (то есть, матрице). Микрогранула может иметь поверхностный слой ("оболочку"), имеющий тот же состав, что и внутренняя часть, но с отличающимися от внутренней части структурными и химическими свойствами. Толщина и структура оболочки может влиять на свойства и особенности функционирования микрогранул - например, набухание, эластичность и диффузию полезной нагрузки.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения обеспечивают уменьшение неблагоприятных эффектов в желудке за счет модулирования pH желудочного сока, в отличие от сульфата железа (фиг. 5). Это позволяет поддерживать поглощение железа без ощущения неблагоприятных эффектов медицинских препаратов. Это позволяет более эффективно поддерживать поглощение железа с использованием пищевой добавки, без других неблагоприятных эффектов, таких как неприятный вкус, связанных с поглощением железа.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к препарату микрогранул, содержащему дискретные микрогранулы, в котором микрогранулы содержат железо и денатурированный белок. В одном варианте осуществления железо заключено в ядре с матрицей из денатурированного белка. Необязательно, гранулы также могут содержать гелеобразующее средство, такое как сложный углевод, например, альгинат, или белок, например, желатин.

Необязательно, гранулы могут содержать глидант для облегчения обработки. Подходящие глиданты включают лейцин, стеарат магния, коллоидный диоксид кремния, крахмал и тальк, а также их сочетания.

Дополнительной нагрузки железа можно добиваться за счет придания отрицательного заряда поверхности микрокапли до отверждения в растворе железа или путем изменения температуры отверждения или уровня денатурации белка, или путем включения веществ, таких как витамин С (аскорбиновая кислота), которые, как известно, образуют комплекс с железом.

В одном варианте осуществления белок в белковой матрице был подвергнут процессу удаления ионов двухвалентного металла, приводящему к лишению кальция.

Предпочтительно, белок в белковой матрице содержит белок молочной сыворотки, другую композицию молочных белков, содержащую бета-лактоглобулин, или белок гороха.

Предпочтительно, белок представляет собой денатурированный белок молочной сыворотки или лишенный кальция денатурированный белок молочной сыворотки.

В одном варианте осуществления микрогранулы содержат 2,5-50% железа. В другом варианте осуществления композиция имеет содержание железа вплоть до 20% по массе, более 5% по массе или от 5 до 10% по массе в расчете на сухую массу.

Процентное содержание железа можно оценивать инструментальными или колориметрическими методами анализа после расщепления микрогранул. Общее остаточное содержание неорганических веществ, которое отражает содержание железа в лишенных кальция микрогранулах, можно оценивать методом высокотемпературного термогравиметрического анализа. Альтернативно, микрогранулы предпочтительно имеют соотношение железо:белок в диапазоне от примерно 1:50 до примерно 1:1, от примерно 1:40 до примерно 1:1, от примерно 1:30 до примерно 1:2, от примерно 1:20 до примерно 1:3 или 1:5, от примерно 1:10 до примерно 1:3, или от примерно 1,2:100 до примерно 1:2, или в других диапазонах этих значений.

Как правило, железо в микрогранулах содержит двухвалентное (II) железо, которое может быть получено, например, из сульфата железа, фумарата железа, глюконата железа, бисглицината железа, таурата железа, цитрата железа, аскорбата железа, хлорида железа, нитрата железа, лактата железа, ацетата железа, карбоната железа/сидерита, оксидов железа, либо хелатов или комплексов железа с аминокислотой или железа с углеводом. Композиция по изобретению также может содержать трехвалентное (III) железо или смесь железа II и железа III. Железо в композиции предпочтительно содержит по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 90, 95, 98 или 99 мас.% двухвалентного железа.

Предпочтительно, микрогранулы содержат противоионы ацетата, цитрата, фосфата или аскорбата. В предпочтительных вариантах осуществления эти ионы повышают стабильность за счет уменьшения окисления двухвалентного железа и/или улучшают характеристики высвобождения.

Изобретение также относится к способам повышения биодоступности железа в организме млекопитающего, например, для лечения или предотвращения дефицита железа, включающим этапы введения композиции по изобретению (предпочтительно микрогранул) млекопитающему.

Композицию по изобретению можно вводить с помощью любого носителя для доставки, известного в данной области. Предпочтительным вариантом осуществления является съедобный препарат, такой как порошок (например, детская молочная смесь), препарат пренатальных витаминов, препарат мультивитаминов, пищевая добавка, жевательная пищевая добавка, жевательная резинка, продукт питания (например, шоколад или жир/масло), напиток, корм для животных, таблетка, капсула или суспензия. Варианты осуществления с менее приятными вкусовыми качествами предпочтительно находятся в форме капсул или таблеток с покрытием.

Композиции по изобретению предпочтительно вводят в дозе, достаточной для доставки эффективного количества. Специалист в данной области может определять потребности конкретного субъекта и учитывать биодоступность композиции по изобретению для определения соответствующего режима дозирования.

В одном варианте осуществления гранулы готовят путем получения носителя, содержащего денатурированный белок и железо; преобразования носителя в микрокапли; отверждения микрокапель в гранулы и высушивания гранул до состояния, когда содержание влаги в гранулах составляет менее 10%, менее 7%, менее 5% или менее 3% по массе.

В другом варианте осуществления гранулы готовят путем получения носителя, содержащего денатурированный белок и, необязательно, железо; преобразования носителя в микрокапли; отверждения микрокапель в гранулы в отверждающем растворе, содержащем железо, и высушивания гранул до состояния, когда содержание влаги в гранулах составляет менее 10%, менее 7%, менее 5% или менее 3% по массе.

Предпочтительно, гранулы имеют оболочку из денатурированного агрегированного белка.

Если микрокапли отверждают путем закапывания их в отверждающий раствор, содержащий железо, то помимо железа, отверждающий раствор может содержать одновалентные ионы, например, натрий, в диапазоне 100-1000 мМ. Подходящие соли натрия включают ацетат натрия, хлорид натрия и сульфат натрия. Отверждающий раствор также может содержать сурфактанты, например, твин. рН отверждающего раствора можно изменять путем внесения HCl или уксусной кислоты, или аскорбиновой кислоты для стимуляции агрегации белка (отверждения микрогранул). Дополнительное заключение железа в микрогранулы и улучшение их формы можно осуществлять путем придания отрицательного заряда по-

верхности микрокапель перед отверждением, например, с использованием устройства, придающего электростатический заряд.

Предпочтительно, отверждающий раствор содержит органическую кислоту, такую как уксусная кислота, которая влияет на агрегацию и отверждение (агрегацию белка) за счет модификации pH, а также за счет переноса протонированных на боковые цепи белка. Присутствие ацетата или сопоставимых протонированных может быть обнаружено в полученных микрогранулах такими методами, как ИК-спектроскопия.

Хотя отвержденные гранулы можно промывать для удаления несвязанного или слабо связанного железа перед высушиванием, предпочтительно, если их не промывают. В случае промывания, его можно выполнять с использованием деионизированной воды или с использованием водных растворов ацетатного буфера, цитрата или аскорбата натрия, например. Большее количество промываний, как правило, будет уменьшать количество железа и/или буфера в композиции.

Высушивание можно производить в сушильном шкафу при температуре 40-100°C, предпочтительно при температуре примерно 80°C. Альтернативно, высушивание можно производить при более низких температурах, таких как комнатная температура, в вакууме. Предпочтительно, высушивание производят в атмосфере азота или аргона.

В другом варианте осуществления высушивание производят при температуре от 15 до 90°C, от 25 до 60°C, или при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления этап высушивания можно проводить при атмосферном давлении. В других аспектах некоторых вариантов осуществления этап высушивания можно проводить в, по меньшей мере, частичном, вакууме.

В аспектах некоторых вариантов осуществления этап высушивания приводит к потере от 40% до 90% общей массы композиции, или 70-80% общей массы композиции.

Высушивание можно производить в ротационной барабанной сушилке в вакууме для уменьшения воздействия атмосферного кислорода, в то же время поддерживая частицы в постоянном движении для предотвращения слипания высыхающих частиц. Другие методы, используемые для высушивания, включают использование вибрационной сушилки с псевдооживленным слоем или ротационного испарителя, которые позволяют производить высушивание в контролируемых атмосферных условиях, в то же время поддерживая частицы в движении, или использование распылительной сушилки для быстрого высушивания частиц. Высушивание также можно производить, создавая постоянный поток воздуха или поток азота над микрогранулами.

В одном варианте осуществления изобретение относится к препарату микрогранул, в котором микрогранулы содержат полимеризованную матрицу, сформированную из денатурированного лишнего кальция белка, при этом железо микроинкапсулировано и/или заключено в матрице.

Как правило, микрогранулы имеют, в целом, сферическую форму. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр составляет 2000 мкм или менее, 1000 мкм или менее, 600 мкм или менее, 500 мкм или менее, или 300 мкм, или менее 80 мкм. В некоторых вариантах осуществления диапазон распределения частиц по размерам является узким.

В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний диаметр от 0,2 до 4000 мкм. Частицы могут иметь форму гранул с размером частиц от 0,2 до 4000 мкм, от 50 до 2000 мкм, от 150 до 1000 мкм или от 300 до 600 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний диаметр от 0,2 до 75 мкм, от 1 до 60 мкм, от 5 до 50 мкм или от 10 до 50 мкм. В некоторых вариантах осуществления гранулы больше определенного размера могут быть предпочтительными, поскольку они могут демонстрировать лучшие характеристики текучести, что уменьшает вероятность агрегации при обращении с ними и необходимость в использовании средства, предотвращающего слеживание, или тому подобного. Альтернативно, частицы могут представлять собой наночастицы с размером менее 0,2 мкм.

Композиция может содержать частицы, как таковые, или композиция может содержать конечный продукт таких частиц, которые были подвергнуты одному или более дополнительным этапам обработки. Это может быть предпочтительным, поскольку при использовании белок может образовывать защитное покрытие снаружи гранулы. Это может приводить к профилю поэтапного высвобождения.

Микрогранулы по изобретению предпочтительно высушивают быстро, при повышенной температуре, в вакууме, или в атмосфере азота. Полученные микрогранулы (после высушивания) предпочтительно имеют содержание влаги <10% по данным термогравиметрического анализа (смотри, например, фиг. 8).

В другом варианте осуществления готовят содержащий двухвалентное железо раствор и отдельно готовят суспензию лишнего кальция денатурированного белка молочной сыворотки.

Одним вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая железо, буфер и носитель, содержащий денатурированный белок. Железо в композиции предпочтительно содержит по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 90, 95, 98 или 99% двухвалентного железа. Денатурированный белок предпочтительно содержит белок молочной сыворотки, изолят белка молочной сыворотки, бета-лактоглобулин или их сочетание. Предпочтительно, денатурированный белок является по меньшей мере на 5% денатурированным. В одном варианте осуществления денатурированный белок содержит по меньшей мере 5% денатурированного бета-лактоглобулина. Соотношение железо: белок, по массе, пред-

почтительно составляет от примерно 1:50 до примерно 1:3.

Предпочтительно, композиция при пероральном введении человеку имеет биодоступность по меньшей мере на 20, 30, 40 или 50% больше, чем биодоступность равной дозы перорально введенного раствора сульфата железа в закисленной воде, или биодоступность, составляющую по меньшей мере 120, 130, 140 или 150% в сравнении с биодоступностью эквивалентной дозы перорально введенного раствора сульфата железа в закисленной воде. Биодоступность определяют методом тестирования, описанным в настоящем документе, измеряя АУС железа в сыворотке.

Предпочтительно, содержание влаги в композиции составляет менее 10% по массе, менее 7% по массе, примерно 3-10%, примерно 3-7% или примерно 5-7%.

В одном варианте осуществления композиция содержит стабилизатор, такой как аскорбиновая кислота или аскорбат (аскорбат натрия, аскорбат кальция, сложные эфиры жирных кислот аскорбиновой кислоты), токоферолы (альфа-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол), пропилгаллат, октилгаллат, додецилгаллат, эриторбиновая кислота, эриторбат натрия, трет-бутилгидрохинон, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), или их сочетания.

В предпочтительном варианте осуществления композиция обладает более приятными вкусовыми качествами, чем имеющиеся в продаже препараты железа, такие как сульфат железа в закисленной воде.

В предпочтительном варианте осуществления композиция стабильна в том отношении, что ее профиль растворения при pH 1,6 и pH 6,6 изменяется на менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, или практически не изменяется с точки зрения высвобождения железа II в течение по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно по меньшей мере 2 лет, при хранении в герметичном контейнере в условиях окружающей среды. В предпочтительном варианте осуществления композиция стабильна в отношении микробного загрязнения в течение по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно по меньшей мере 2 лет, при хранении в герметичном контейнере в условиях окружающей среды. Стабильность в отношении микробного загрязнения означает, что композиция "свободна от нежелательных микроорганизмов" в соответствии с интерпретацией этого выражения в регулирующем документе FDA 21 CFR 211.165. Предпочтительно, это включает общее количество жизнеспособных микроорганизмов с максимально допустимым количеством  $10^3$  КОЕ/1000 мг, общее максимально допустимое количество дрожжей и плесневых грибов  $10^2$  КОЕ/1000 мг и отсутствие *E. coli*.

В предпочтительных вариантах осуществления композиция имеет форму микрогранул для перорального введения. Предпочтительно, после перорального введения частота запоров, при оценке с использованием Бристольской шкалы формы кала (описанной в настоящем документе), уменьшается по меньшей мере на 50% и/или частота случаев тошноты, при оценке с использованием модифицированной шкалы оценки желудочно-кишечных симптомов (описанной в настоящем документе), уменьшается по меньшей мере на 50%.

Термин "лишенная кальция" применительно к композиции означает, что композиция содержит менее 500 мг ионов двухвалентного металла (такого как кальций) на 100 г белка, например, менее 300 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 100 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит менее 0,1% или лишь следовые количества ионов двухвалентного металла/кальция при измерении стандартными методами.

В конкретных вариантах осуществления микрогранулы по изобретению содержат (в % сухой массы): 75-95% или 85-95% денатурированного, необязательно лишнего кальция, белка молочной сыворотки или изолята белка молочной сыворотки и 2,5-10,0% железа.

Денатурированный белок молочной сыворотки может, например, представлять собой денатурированный концентрат белка молочной сыворотки или денатурированный изолят белка молочной сыворотки. Способы денатурации белка молочной сыворотки известны специалистам в данной области и включают тепловую денатурацию и вызываемую давлением денатурацию. В одном варианте осуществления изобретения белок молочной сыворотки денатурирован нагреванием при температуре от 70 до 140°C, предпочтительно примерно 80°C. Белок молочной сыворотки нагревают при температуре более 70°C в течение более 15 мин. Как правило, белок молочной сыворотки перемешивают в процессе денатурации. Известно несколько методов контроля разворачивания/денатурации и образования растворимых олигомеров. Они включают методы динамического рассеяния света и эксклюзионной хроматографии. Полезно контролировать степень экспонирования тиолов в растворах белка молочной сыворотки с использованием 5,5'-дителибис(2-нитробензойной кислоты) или DTNB, которая образует окрашенные аддукты при реакции с экспонированными тиолами. В предпочтительном варианте осуществления степень денатурации белка или бета-лактоглобулина превышает 80% или превышает 90%, что может быть измерено при помощи DTNB.

В некоторых вариантах осуществления белок, используемый в способе по изобретению, имеет содержание белка по меньшей мере 90, 94 или 98% (без учета влаги, углеводов и жиров).

Предпочтительно, концентрация раствора/суспензии по меньшей мере частично денатурированного белка составляет от 4 до 30%, предпочтительно от 7 до 30% и, в идеале, от 9 до 16% (мас./об.). Как правило, белок представляет собой белок молочной сыворотки, в идеале, суспензию пропускают через ряд фильтров, имеющих постепенно уменьшающийся размер пор.

Примеры солей железа включают сульфат железа, фумарат железа, глюконат железа, бисглицинат железа, таурат железа, цитрат железа, аскорбат железа, хлорид железа, нитрат железа, лактат железа, ацетат железа, карбонат железа/сидерит, оксиды железа. Формы этих солей с трехвалентным железом, а также динатрийфосфат трехвалентного железа, аммоний цитрат трехвалентного железа и хлорид трехвалентного железа.

В других вариантах осуществления композиция может содержать или быть изготовлена с комплексами или солями трехвалентного и/или двухвалентного иона железа в безводном или гидратированном состоянии, включающими например, сульфат, фосфат, фолат, ацетат, пропионат, малеат, бензоат, салицилат, фумарат, глутамат, аспарат, цитрат, лактат, сукцинат, тартрат, гликолят, гексаноат, октаноат, деканоат, олеат, стеарат, бисглицинат, фумарат, глюконат. Эти используемые комплексы и соли железа также могут представлять собой иные оксиды, оксид-гидроксиды или гидроксиды железа. Композицию можно получать с солями железа в смешанных состояниях окисления, а также их гидратами.

В одном варианте осуществления раствор двухвалентного железа имеет значение pH менее 5 или менее 4,5.

Гелеобразующий раствор, как правило, не содержит ионы кальция. Гелеобразующий раствор имеет концентрацию натрия 0,1-1М или, как правило, 0,2-0,5М. Предпочтительно, раствор имеет концентрацию органической кислоты 0,1-0,6М, как правило, 0,15-0,25М и, в идеале, примерно 0,2М. Как правило, раствор имеет pH 3-4,5, предпочтительно, менее 4. Как правило, раствор имеет температуру 20-65°C, как правило, примерно 45°C. Как правило, кислый гелеобразующий раствор содержит сурфактант для предотвращения или ингибирования слипания образовавшихся микрогранул. Предпочтительно, сурфактант представляет собой полисорбат, в идеале, твин 20. Гелеобразующий раствор может содержать глидант, такой как лейцин или стеарат магния. При смешивании раствора денатурированного белка и закисляющего/гелеобразующего раствора сетчатая структура гидрогеля образуется немедленно. Ее разрушают перемешиванием с высокой срезающей силой, получая частицы гидрогеля, которые затем отверждают в кислой среде.

Предпочтительно, образовавшиеся микрогранулы подвергают продолжительному периоду отверждения в гелеобразующем растворе в течение по меньшей мере 15 мин (после гелеобразования), и предпочтительно в течение по меньшей мере 20 мин. В предпочтительном варианте осуществления изобретения образовавшиеся микрогранулы отверждают в течение периода времени 20-180, 20-120 или 20-60 мин. В идеале, отверждающий раствор перемешивают в процессе отверждения.

Микрогранулы по изобретению, как правило, способны оставаться интактными при прохождении через желудок млекопитающего и способны высвобождать двухвалентное железо в желудочно-кишечном тракте вдали от желудка, например, в тонком кишечнике. Выражение "остаются интактными в желудке" означает, что микрогранулы являются устойчивыми к расщеплению желудочным пищеварительным соком в желудке млекопитающего во время прохождения через желудочно-кишечный тракт.

Предпочтительным способом получения микрокапель является дробление методом вибрации, при этом денатурированный лишенный кальция белок и соль железа готовят отдельно и не смешивают до момента непосредственно перед проведением, или в процессе, экструзии через сопло, и ламинарное разрушение экструдированной ламинарной струи индуцируют приложением синусоидальной частоты с определенной амплитудой к соплу с заданным размером отверстия. Примерами вибрационных сопловых аппаратов являются ENCAPSULATOR (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), аппараты, производимые компанией Nisco Engineering AG, или эквивалентные масштабированные для промышленного применения варианты, такие как те, которые производит компания BRACE GmbH, и тому подобные.

Как правило, сопло имеет отверстие размером от 60 до 2000 мкм, предпочтительно от 100 до 500 мкм, предпочтительно от 140 до 300 мкм, и в идеале примерно 150 мкм.

Предпочтительно, частота, при которой работает вибрирующее сопло, составляет от 100 до 20000 Гц. Необязательно, каплям добавляют электростатический потенциал, при этом электростатический потенциал между соплом и отверждающим раствором, как правило, составляет 0,15-0,3 В. Предпочтительно, амплитуда составляет от 4,7 кВ до 7 кВ. Как правило, расстояние падения (от сопла до закисляющей бани) составляет менее 50 см, предпочтительно менее 40 см, предпочтительно от 20 до 40 см, предпочтительно от 25 до 35 см, и в идеале примерно 30 см. Скорость потока суспензии (проходящей через сопло), как правило, составляет от 3,0 до 20 мл/мин; в идеале, скорость потока зависит от размера сопла, используемого в процессе.

В одном варианте осуществления способ включает этап контролирования размера исходных полученных микрогранул на пригодность.

Подходящие композиции включают съедобные продукты, такие как пищевые продукты и напитки, а также пищевые добавки в любой форме, например, стандартные дозированные продукты, порошки и тому подобное. Как правило, пищевые продукты включают полезные для здоровья напитки, йогурты и напитки на основе йогуртов, полезные для здоровья батончики и тому подобное. Композиция может представлять собой компонент препарата, который является съедобным и активным при пероральном приеме, например, такого как порошок детской молочной смеси, пренатальный витамин, мультивитамин, пищевая добавка, жевательная пищевая добавка, жевательная резинка, продукт питания, напиток, корм

для животных, таблетка, капсула или суспензия.

Препарат микрогранул по изобретению может быть предоставлен в сухой форме, например, высушенной распылением, высушенной в барабанной сушилке, дегидратированной или сублимированной форме, или он может быть предоставлен в виде суспензии в подходящем растворителе, например, воде.

Денатурированный изолят лишнего кальция белка молочной сыворотки (WPI) является предпочтительным для получения микрогранул по изобретению. Концентрат белка молочной сыворотки (WPC) также является возможным инкапсулирующим материалом.

Один аспект данной технологии включает использование денатурированного лишнего кальция изолята/концентрата белка молочной сыворотки. В некоторых вариантах осуществления уменьшение содержания двухвалентного металла в белковом исходном материале приводит к уменьшению спонтанного гелеобразования в растворе белка при обработке, усилению его железо-связывающих свойств и уменьшению высвобождения кальция после введения млекопитающим, таким образом, способствуя усилению поглощения железа. Кальций ингибирует поглощение железа за счет DMT-1.

Сухой лишнего кальция WPI предпочтительно растворяют в оптимальной композиции для микроинкапсуляции железа. Лишний кальций изолята белка молочной сыворотки (WPI) может быть исходно денатурирован в соответствующих условиях (pH, концентрация соли, твердых веществ) для получения растворимой дисперсии белковых агрегатов, подходящей для экструзии и инкапсуляции в присутствии ацетата натрия и сульфата железа. Этот способ можно использовать для стабилизации соединений двухвалентного железа в сетчатой структуре матрицы микросфер из белка молочной сыворотки. Этот процесс происходит немедленно, когда раствор гидрогеля белка молочной сыворотки попадает в оптимальные условия концентрации электролитов, pH, перемешивания и температуры. Ионы железа и сульфата в отверждающем растворе могут способствовать отверждению и делать возможным поглощение железа в гранулы путем диффузии и захвата.

Получение лишнего кальция белка молочной сыворотки (например, WPI) для создания материала для инкапсуляции железа, как правило, включает:

1. Диспергирование лишнего кальция WPI в воде при концентрациях в диапазоне 4-30% (по массе), 7-30% (по массе) или 9-16% (по массе). Это может быть достигнуто, например, за счет перемешивания с высокой срезающей силой в лопастной мешалке или Ultra-Turrax в диапазоне концентраций 0,01-0,1% (по массе), предпочтительно в диапазоне 0,04-0,09% (по массе) с pH в диапазоне 5,0-9,0, предпочтительно в диапазоне pH 6,0-7,0.

2. Фильтрация для удаления любого денатурированного материала через фильтр с размером пор <200 мкм.

3. Температурную обработку для индукции денатурации (разворачивания) белка. Денатурацию белка предпочтительно проводить при температуре 60-140°C, предпочтительно 70-121°C, при pH в диапазоне 5,0-8,5, предпочтительно в диапазоне 6,0-8,2.

Суспензию лишнего кальция денатурированного белка можно экструдировать через концентрическое сопло с раствором сульфата железа в отверждающий раствор, содержащий буферную систему уксусная кислота/ацетат натрия (0,1-5М), pH 3-4,5, с сурфактантом, и постоянно перемешивать для уменьшения слипания/агрегации при высоких скоростях потока. Следует понимать, что доведение pH раствора денатурированного белка близко к его изоэлектрической точке ("ИТ") будет способствовать агрегации за счет уменьшения кулоновских сил взаимного отталкивания.

Можно использовать ряд методов для получения микрогранул по изобретению. Для простоты, методы можно подразделять на механические, химические или физико-химические методы, включая такие методы, как: химические, полимеризация *in situ* и межповерхностная полимеризация; физико-химические, сложная коацервация, и механические методы на основе сушки распылением и экструзии.

Механические методы основаны на принципе создания капель из полимера при экструзии через сопло (отверстие) или в результате разбивания жидкой струи. В них используют механические средства (то есть срезающие или вибрационные силы) для усиления нормального процесса стекания каплями из отверстия, или для разбивания потока экструдированной жидкости, создаваемого полимером, проходящим через сопло. После формирования капли немедленно затвердевают в сферы/капсулы за счет либо физических процессов, например, охлаждения или нагревания, либо химических процессов, например, гелеобразования. Несколько разных механических методов можно использовать для инкапсуляции железа и других материалов в матрицы из белка молочной сыворотки с целью получения частиц с нужными конечными характеристиками. Простое стекание каплями является наиболее старой технологией получения частиц. Экструзия раствора белка молочной сыворотки через отверстие (сопло) при низких скоростях приводит к тому, что экструдированная жидкость прилипает к краю сопла до тех пор, пока гравитационная сила не станет достаточно высокой для преодоления поверхностного натяжения, что приводит к высвобождению капли. Небольшое увеличение скорости приводит к увеличению количества образующихся капель, в то время как дальнейшее ускорение еще более увеличивает образование капель. После формирования капли немедленно затвердевают, и размер полученных частиц в основном зависит от диаметра отверстия. Полученные гранулы, как правило, имеют размер более 2 мм.

Сушка распылением представляет собой типовой процесс, в котором жидкий полимер сначала рас-

пыляется с помощью потока сжатого воздуха и впоследствии осушается с помощью отдельного потока горячего газа в сушильной камере, что приводит к образованию частиц. Используют 2-жидкостное сопло, в котором воздух проходит через внешний канал и распыляет поток жидкости, проходящий через внутренний канал. Поток жидкости состоит из гелевой дисперсии микрочастиц лишенного кальция денатурированного белка молочной сыворотки, буфера и раствора железа, и распыляется в сопле на мелкие частицы, которые немедленно высыхают за счет мгновенного испарения в гранулы белка молочной сыворотки, заключающие в себе буфер и железо. Полученные частицы собирают с использованием циклонной технологии. Таким методом получают частицы белка молочной сыворотки с железом, имеющие размеры 10-50 мкм. Сухие частицы можно дополнительно обрабатывать в дополнительных отверждающих растворах, в случае необходимости.

Два других метода, известные специалистам в данной области, представляют собой методы с применением трехжидкостного сопла, используемого в сочетании с распылительной сушилкой и микроструйными устройствами.

Один аспект варианта осуществления изобретения относится к композиции, содержащей аморфный препарат соли железа, связанной с белковым носителем. Железо в композиции может содержать некоторое количество трехвалентного железа ( $Fe^{3+}$ ). Это может быть полезным, поскольку трехвалентное железо, поступающее в ЖК тракт, может вызывать меньший дискомфорт в пищеварительной системе, чем двухвалентное железо. Трехвалентное железо может восстанавливаться в кишечнике до двухвалентного железа, субстрата для активности DMT1. Однако аморфный препарат соли железа, связанной с белковым носителем, как правило, содержит по меньшей мере 50% двухвалентного железа ( $Fe^{2+}$ ), что способствует адекватной биодоступности за счет поглощения, опосредованного DMT1 энтероцитов кишечника. Кроме того, высвобождение двухвалентного железа из композиции по изобретению при низких значениях pH и в присутствии компонентов желудочного сока, таких как пепсин, является ограниченным для защиты желудка и уменьшения тошноты, рвоты и эпигастральных болей.

В одном аспекте варианта осуществления изобретения композиция может быть получена путем смешивания железосодержащей композиции с белковой композицией и путем высушивания полученной смеси. В другом аспекте, когда смесь содержит двухвалентное железо, этап высушивания может приводить к превращению по меньшей мере части двухвалентного железа в смеси в аморфный препарат соли железа в форме трехвалентного железа, связанной с белковым носителем. В процессе сушки можно использовать дополнительные материалы, такие как диоксид кремния, для предотвращения "слипания" композиции во время сушки.

Такая сухая композиция может иметь преимущества перед не высушенной композицией (включая гелевые препараты), которая может быть более вариабельной и/или менее стабильной при хранении, особенно с точки зрения окисления, а также недостаточно воспроизводимой в процессе производства, что в совокупности представляет проблему для формулирования препарата, масштабирования процесса и оптимизации дозы. Гранулы, не подвергнутые нагреванию/высушиванию, создают дополнительные проблемы, связанные с их объемом. Кроме того, не высушенная композиция железа вызывает технические проблемы и дополнительные расходы при создании совместимости, если планируется включать железо в мультиактивную пищевую добавку, например, мультивитамин и/или мультиминералы.

В некоторых вариантах осуществления превращение двухвалентного ( $2+$ ) железа в трехвалентное ( $3+$ ) железо в процессе получения композиции можно осуществлять во время сушки. В других вариантах осуществления превращение двухвалентного ( $2+$ ) железа в трехвалентное ( $3+$ ) железо может быть ограничено в процессе сушки из-за антиоксидантных свойств белка молочной сыворотки, из-за быстрого высушивания (например, сушки распылением), из-за сушки в инертной атмосфере (например, азота) и/или из-за включения стабилизатора с антиоксидантными свойствами. Стабилизаторы могут включать, но без ограничения, перечисленное далее, целиком или частично: бета-каротин и каротиноиды, витамин С, витамин Е, цинк, селен, медь, марганец, астаксантин, экстракт черного перца, кофермент Q10, ликопин, антиоксиданты на основе лизина, метилкобаламин, экстракт виноградных косточек, лютеин, женьшень, биофлавоноиды цитрусовых, экстракт апельсиновой цедры, экстракт зеленого чая, Ginkgo biloba, спирину, пырей, ячмень заячий, люцерну, льняное семя, экстракт банановых листьев.

Один вариант осуществления изобретения относится к способу получения композиции, включающему этапы: получения буферной содержащей железо композиции; получения белковой композиции (предпочтительно на основе денатурированного, лишенного кальция белка молочной сыворотки/бета-лактоглобулина); смешивания указанной содержащей двухвалентное железо композиции с указанной белковой композицией и превращения по меньшей мере части содержащегося в смеси железа в аморфный препарат соли железа, связанной с белковым носителем. Содержащая железо композиция может содержать двухвалентное железо. По меньшей мере часть содержащегося в смеси железа может превращаться в преимущественно аморфный препарат трехвалентного железа, связанного с белковым носителем.

В другом варианте осуществления способ может дополнительно характеризоваться тем, что: содержащая двухвалентное железо композиция представляет собой раствор; белковая композиция представляет собой суспензию белкового материала; и смешивание включает экструзию суспензии через

вибрирующее сопло таким образом, что суспензию экструдуют в форме микрокапель, микрокапли экструдуют в баню, содержащую раствор, в результате чего образуются гранулы, с получением композиции, содержащей указанные гранулы.

В некоторых вариантах осуществления превращение происходит в процессе высушивания композиции. Если процесс высушивания осуществляют на воздухе или в присутствии кислорода, считается, что этот процесс высушивания вызывает окисление по меньшей мере части содержащегося железа, которое переходит из преимущественно двухвалентного (2+) состояния в аморфный препарат соли железа, связанной с белковым носителем, в котором часть железа находится в трехвалентном (3+) состоянии.

В другом варианте осуществления ионы двухвалентного металла заменяют на железо в композиции, описанной в настоящем документе. Такие ионы металла включают цинк, марганец, медь, хром, селен, молибден, их сочетания, или их сочетания с железом. В конкретных вариантах осуществления полученные гранулы имеют улучшенные вкусовые качества (например, сульфат железа, сульфат цинка).

#### Экспериментальная часть

Получение микрогранул.

(a) Декальцификация белка молочной сыворотки.

WPI обрабатывали ионообменной смолой для замены двухвалентных катионов (например, кальция) одновалентными катионами.

(b1) Инкапсуляция двухвалентного железа - пример 1 (ST1501).

Систему инкапсуляции двухвалентного железа готовили с использованием лишнего кальция WPI, содержащего (на 100 г) более 1 г элементарного железа и до 95 г белка. Маточный раствор белка молочной сыворотки (WPS) готовили в лопастной мешалке или Ultra-Turrax в присутствии сурфактанта в диапазоне концентраций 0,01-0,1% (по массе) при pH в диапазоне 6,0-7,0. Раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 150 мкм. Изолят белка молочной сыворотки (WPI) затем денатурировали нагреванием в соответствующих условиях (pH 7,0, >78°C; содержание белка 4-11% по массе). Тепловую обработку проводили при температуре 70-140°C и pH в диапазоне 5,0-8,5. Тепловую денатурацию проводили при перемешивании (150-200 об/мин) для получения растворимой суспензии белковых агрегатов. Тепловую денатурацию проводили в течение 30-90 мин для осуществления денатурации и экспонирования гидрофобных участков.

После активации белка (то есть тепловой денатурации) раствор агрегатов быстро охлаждали до комнатной температуры. При необходимости, его можно хранить в течение ночи при 4°C с постоянным перемешиванием. 500 г раствора белка использовали для получения микрогранул композиции.

Отверждающий раствор готовили непосредственно перед процессом получения описанным далее способом, включающим приготовление двух растворов (250 г 5M буферного раствора ацетата натрия, pH 3,8, содержащего уксусную кислоту, и 250 г 1M раствора сульфата железа) перед проведением смешивания и экструзии раствора белка. После объединения двух растворов, с получением 500 г отверждающего раствора, в отверждающий раствор добавляли твин 20 и L-аскорбиновую кислоту, этот раствор затем использовали для гелеобразования и осаждения 500 г денатурированного белка молочной сыворотки, с последующим уменьшением размера частиц с использованием ротационной мешалки при 10000 об/мин в течение 1 мин. 5M буферный раствор ацетата натрия готовили путем растворения 14,3 г безводного ацетата натрия (MM 82,03 г/моль) в 178,3 г ультрачистой воды. После завершения растворения соли медленно добавляли 57 г ледяной уксусной кислоты при перемешивании. Перемешивали буферный раствор в течение по меньшей мере 10 мин и повторно перемешивали, если оставляли отстаиваться. 1M раствор FeSO<sub>4</sub> готовили путем растворения 69,5 г гептагидрата сульфата железа (II) в 180,5 г ультрачистой воды. Оба раствора смешивали (250 г каждого), получая 500 мл "отверждающего раствора". Раствор герметично закрывали для предотвращения испарения LR-1000 и нагревали до 40°C. Значение pH раствора составляло 3,4. В общей сложности 0,22 г твина 20 добавляли в отверждающий раствор и перемешивали в течение по меньшей мере 5 мин. Затем добавляли 8,80 г L-аскорбиновой кислоты и вновь перемешивали раствор в течение 5 мин.

Образования геля добивались путем перемешивания отверждающего раствора в ИКА LR-1000 и добавления денатурированного WPS (полученного, как описано выше) в отверждающий раствор, следя за поддержанием достаточного перемешивания для разбивания геля по мере его формирования. Также температуру отверждающего раствора с белком молочной сыворотки поддерживали при 40°C. WPS добавляли с использованием градуированного цилиндра, медленно в течение 1-2 мин. Если имело место значительное вспенивание отверждающего раствора с белком молочной сыворотки, уменьшали скорость перемешивания. Избыточное пенообразование очень затрудняет разбрызгивание раствора. Для уменьшения пенообразования в раствор также можно добавлять пеногаситель. После того, как весь WPS был добавлен, продолжали перемешивание (смешивание) и оставляли гель в отверждающем растворе на 30 мин. Показатель D<sub>90</sub> частиц геля должен быть ниже 80 мкм. Это облегчает перекачивание частиц через 2-жидкостное сопло и предотвращает слипание.

После 30 мин отверждения гелевую суспензию вносили в распылительную мини-сушилку BUCHI В-2 90 (лабораторную).

Показатель D<sub>90</sub> частиц геля должен быть ниже 80 мкм. Это облегчает перекачивание частиц через 2-



жидкостное сопло и предотвращает слипание. Распылительную сушилку использовали в стандартном открытом режиме с установленным осушителем для обработки поступающего сушильного воздуха. Использовали высокоэффективную циклонную установку для максимально возможного извлечения продукта. Следующие параметры использовали в начальный момент распыления раствора:

температуру выпускного отверстия поддерживали на уровне 80°C;

ротаметр (для измерения скорости потока газовой струи) был установлен на высоту 40 мм на датчике, что соответствовало скорости потока 473 л/час водопроводную воду прокачивали через теплообменник вокруг сопла для поддержания его в охлажденном состоянии в процессе распыления.

Во время процесса температуру впускного отверстия увеличивали до 191°C.

Полученные сферические частицы содержали связанное и несвязанное железо, обеспечивали профиль практически немедленного высвобождения (фиг. 4), имели показатель  $D_{90} < 15$  мкм (результаты СЭМ гранул показаны на фиг. 3), были аморфными (фиг. 9а) с начальной потерей при сушке 15% (фиг. 8а), уменьшающейся до <8% при дальнейшей сушке при 80°C (фиг. 8б). Эти частицы содержали 10,8% по массе железа. Эти частицы содержали 8% по массе ацетата. Результаты Фурье-ИКС показывают наличие характерных пиков ацетата натрия на фиг. 7а, в области 1560-1410  $\text{см}^{-1}$ .

(b2) Инкапсуляция двухвалентного железа - пример 2 (ST1502).

Как описано выше, готовили систему инкапсуляции двухвалентного железа с использованием лишнего кальция WPI, содержащего (на 100 г) более 1 г элементарного железа и до 95 г белка. Маточный раствор белка молочной сыворотки (WPS) готовили в лопастной мешалке или Ultra-Turrax в присутствии сурфактанта в диапазоне концентраций 0,01-0,1% (по массе) при pH в диапазоне 6,0-7,0. Раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 150 мкм. Изолят белка молочной сыворотки (WPI) затем денатурировали нагреванием в соответствующих условиях (pH 7,0, >78°C; содержание белка 4-11% по массе). Тепловую обработку проводили при температуре 70-140°C и pH в диапазоне 5,0-8,5. Тепловую денатурацию проводили при перемешивании (150-200 об/мин) для получения растворимой суспензии белковых агрегатов. Тепловую денатурацию проводили в течение 30-90 мин для осуществления денатурации и экспонирования гидрофобных участков.

Микрогранулы композиции получали путем помещения отверждающего раствора (500 мМ сульфат железа, 500 мМ ацетат натрия, описанного выше) в ИКА LR-1000 и нагревания до 40°C. Примерно 500 мл раствора денатурированного белка молочной сыворотки (10,5%) добавляли в течение 30 с. После добавления раствора белка молочной сыворотки и формирования геля отверждающий раствор перемешивали с использованием ротационной мешалки Turrax со скоростью 15000 об/мин в течение 2 мин, и оставляли раствор для отверждения на 60 мин при низкой скорости перемешивания (скорость мешалки 100 об/мин). Вновь образовавшиеся влажные частицы были очень мелкими (показаны результаты измерения размера частиц на анализаторе Malvern) и демонстрировали двухвершинную картину распределения с  $D50$  33 мкм перед сушкой в лотках и дополнительным уменьшением размеров при 80°C.

Характеризация микрогранул.

Рентгеновская дифрактометрия.

Анализ методом порошковой рентгеновской дифрактометрии выполняли с использованием дифрактометра Miniflex II Rigaku с Ni-фильтром, Cu K $\alpha$ -излучением ( $\lambda=1,54\text{\AA}$ ). Используемые значения напряжения на трубке и тока на трубке составляли 30 кВ и 15 мА, соответственно. Каждый образец сканировали в диапазоне 2- $\theta$ та 5-80° с величиной шага 0,05/с. Как можно видеть на фиг. 9, картина порошковой РД свидетельствует, что структура гранул преимущественно является аморфной (ось Y соответствует интенсивности и ось X соответствует углу рассеяния 2- $\theta$ та).

Термогравиметрический анализ.

Проводили термогравиметрический анализ (ТГА) потерь при высушивании микрогранул по изобретению после использования только сушки распылением (А) и после сушки распылением с последующей сушкой при 80°C. Взвешенные образцы порошка (10-15 мг) анализировали в открытых керамических чашках. Для ТГА измерений использовали термогравиметрический анализатор TGA-Q50 от компании TA Instruments со следующей температурной программой: образец был нагрет до 120°C (10°C/мин) и в течение 45 мин оставался изотермическим при 120°C (фиг. 8).

Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием.

Измерения в инфракрасной области выполняли на Фурье-ИКС спектрофотометре PerkinElmer Spectrum 100 в области 4000-650  $\text{см}^{-1}$  и с использованием зонда нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) (фиг. 7).

Сканирующая электронная микроскопия.

Изображения методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) получали на приборе Zeiss Ultra Plus Field Emission СЭМ с колонкой Gemini® (Zeiss). Сухие гранулы образца помещали на проводящую угольную пленку без какой-либо дополнительной обработки или покрытия образца. Использовали ускоряющее напряжение 2-3 кВ для преодоления экстенсивного эффекта разряда.

Растворение in vitro.

Измерение железа II.

Раствор сульфата железа (II) в воде (10 мМ) серийно разбавляли KCl буфером, pH 1,8. Аликвоты (100 мкл) разбавленных растворов добавляли в лунки 96-луночного планшета, содержащие 100 мкл 1,10-фенантролина (5 мМ). Показания с планшета снимали при длине волны 490 нм на планшетном ридере для построения калибровочной кривой. Разбавленные образцы, как правило, получали десятикратным разбавлением, при pH 1,6, в фенантролине (5 мМ), и считывание образцов проводили быстро в атмосфере N<sub>2</sub>.

Измерения железа III.

Гранулы в количестве 50 мг переносили во флакон, содержащий 10М HCl (10 мл), и оставляли на ночь при комнатной температуре. Полученный раствор встряхивали, а затем 100-мкл аликвоту переносили в 900 мкл 10М HCl. 100-мкл аликвоту разбавленного раствора добавляли в лунки 96-луночного планшета, содержащие 1М тиоцианат натрия (100 мкл). Поглощение измеряли при длине волны 450 нм на планшетном ридере. Концентрацию железа III оценивали на основании серии стандартных растворов железа III.

Метод имитации растворения в кишечнике.

Точно взвешенный образец (примерно 50 мг) микрогранул переносили в трехгорлую колбу, содержащую 15 мл буфера с pH 6,6 (содержащего 0,1М бикарбонат натрия, 10 мг/мл экстракта желчных кислот, 1,85 мг/мл панкреатина, с pH, доведенным до 6,6 1М раствором HCl) при 37°C. Как правило, во временных точках 1, 15, 30, 45, 60 и, иногда, 90, 120 мин образцы отбирали для измерения количества железа (II) и железа (III). Для измерения количества железа II 100 мкл супернатанта разбавляли в 900 мкл буфера с pH 1,8. Для измерения количества железа III 100-мкл аликвоту супернатанта разбавляли в 900 мкл 10М HCl и оставляли на ночь при комнатной температуре. После последней временной точки все буферные растворы отбирали, 10 мл 10М HCl добавляли в колбу и оставляли на ночь. Гранулы полностью растворялись в течение ночи, и 100 мкл раствора добавляли к 900 мкл 10М HCl для измерения общего уровня железа III.

Метод имитации растворения в кислоте желудка.

Точно взвешенный образец (примерно 50 мг) микрогранул переносили в 15 мл буфера с pH 1,6, содержащего NaCl (34,2 мМ), таурохолат натрия (80 мкМ), 0,1 мг/мл пепсина, и доводили pH до 1,6 1М раствором HCl при 37°C. Как правило, образцы отбирали для измерения количества железа (II) и железа (III) во временных точках 1, 15, 30, 45, 60, 90, 120 мин. Для измерения количества железа II 100 мкл раствора отбирали и разбавляли в 900 мкл буфера с pH 1,8. Для измерения количества железа III 100 мкл раствора разбавляли в 900 мкл 10М HCl и оставляли на ночь при комнатной температуре. После временной точки 2 ч все буферные растворы отбирали, 10 мл 10М HCl добавляли в колбу и оставляли на ночь. Гранулы полностью растворялись в течение ночи. 100-мкл аликвоту добавляли к 900 мкл 10М HCl для измерения общего уровня железа III и опосредованной оценки остаточного железа после 120 мин растворения.

Методы растворения для железа II и железа III были валидированы с точки зрения точности и воспроизводимости.

Измерение железа II в микрогранулах.

Образец микрогранул измельчали пестиком в ступке или размалывали на шаровой мельнице. 1 г образца переносили в стеклянный флакон, снабженный магнитным перемешивающим стержнем, в который добавляли 10 мл разведенного водного раствора HCl (0,1М), который был продут азотом для удаления кислорода. Суспензию нагревали до 50°C, а затем обрабатывали ультразвуком до растворения измельченных гранул. 0,1-мл аликвоту отбирали в атмосфере азота и быстро переносили в емкость для измерения количества железа II методом с использованием фенантролина, описанным выше.

Измерение pH.

Образцы (230 мг, содержащие примерно 25 мг железа) добавляли в 10 мл буфера с pH 1,6 (содержащего NaCl (34,2 мМ), таурохолат натрия (80 мкМ), 0,1 мг/мл пепсина). Значение pH раствора измеряли дважды в течение 30 мин.

Образцы (230 мг, содержащие примерно 25 мг железа) добавляли в 10 мл буфера с pH 6,6 (содержащего 0,1М бикарбонат натрия, 10 мг/мл экстракта желчных кислот, 1,85 мг/мл панкреатина). Значение pH раствора измеряли дважды в течение 30 мин.

Эквивалентные количества сульфата железа также оценивали в тех же растворах тем же методом, и результаты представлены на фиг. 5.

Данные эффективности *in vivo*.

Субъектами были взрослые женщины с хорошим состоянием здоровья, имеющие в сыворотке уровень ферритина >15 мкг/л. Они давали письменное информированное согласие на участие в исследовании и не были беременными. Каждый субъект был распределен в одну из двух групп перорального приема суточной дозы 25 мг элементарного железа: 25 мг элементарного железа в сульфате железа и 25 мг элементарного железа в ST1501, одной дозой, в перекрестном исследовании. В качестве части протокола клинического исследования, в отдельном анализе препарат сравнивали с тардифероном, содержащим 80 мг элементарного железа. Критерием оценки эффективности являлось соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа у голодающих (>8 ч) субъектов через 2 ч после введения исследуемого препарата.

дуемого и тестируемого препаратов.

Образец крови натощак (8 мл) собирали во время отборочного посещения и проводили общий анализ крови (ОАК), анализ содержания в сыворотке железа и ферритина. В дни проведения вмешательства кровь также собирали в исходный момент времени (8 мл), через 2 ч (4 мл) и 4 ч (4 мл). Общий анализ крови, анализ содержания в сыворотке железа и ферритина, а также определение способности к связыванию железа проводили в исходный момент времени, содержание в сыворотке железа оценивали через 2, и 4 ч, и также определяли способность к связыванию ферритина и железа. Все образцы отправляли на анализ в утвержденную контрактную лабораторию. Во время исследования в общей сложности собирали 24 мл крови.

Пример 3: определение оптимальных способов смешивания.

В одном варианте осуществления изобретения максимальная предварительная нагрузка железа для смешивания с 9% изолятом белка молочной сыворотки составляла 10-15 мМ сульфата железа. В некоторых вариантах осуществления предварительная обработка белкового материала, pH раствора и используемая форма железа оказывали влияние на продукт. Например, в некоторых вариантах осуществления была необходима адекватная гидратация белкового материала, и было установлено, что гептагидрат сульфата железа является более предпочтительным, чем сухой сульфат железа, из-за лучшей растворимости в воде и степени чистоты.

Пример 4: получение белкового раствора.

В одном варианте осуществления изобретения изолят белка молочной сыворотки (WPI) диспергировали в 250 мл стерильной воды в концентрации 10,5 мас.%/об и оставляли для гидратации на 2-16 ч при 4°C со слабым перемешиванием (180 об/мин). pH дисперсии доводили до 7 при помощи HCl. Дисперсию с доведенным pH, необязательно, фильтровали через последовательные фильтры, а затем, необязательно, проводили завершающее фильтрование через 0,45-мкм HVLP фильтр Dugaroge®. Белковую дисперсию нагревали до 80 (75-90)°C в течение 45-60 мин при перемешивании (95 об/мин). Затем дисперсию охлаждали на льду и хранили при 4°C в течение 16 ч.

Пример 5: получение отверждающего раствора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения pH содержащего соль железа отверждающего раствора (содержащего ионы одновалентного металла с буфером в диапазоне 0,1-5,0M) доводили до значения pH 3,2-6,5. В идеале, для отверждающего раствора использовали pH в диапазоне 3,5-4,0. Сульфат железа (0,1-1,0M) добавляли в отверждающий раствор, и pH дополнительно корректировали. Затем раствор нагревали до 40°C. Необязательно, добавляли сурфактант в низкой концентрации. Затем раствор поддерживали при температуре 40°C.

Пример 6: получение сухих аморфных препаратов железа, связанного с белком.

Гранулы геля сушили при 25°C в течение 16 ч или при температуре вплоть до 80°C в течение 2-16 ч, с получением сухих аморфных препаратов железа, связанного с белком, в виде гранул. Использовали термогравиметрический анализ для определения содержания воды в аморфном железе. Отбирали образец гранул (с известной массой), и содержание железа в гранулах определяли по массе в расчете на массу сухих гранул для конкретной партии методом с использованием тиоцианата натрия после растворения в 10M HCl. Сухие аморфные гранулы, содержащие железо и белок, запечатывали в воздухонепроницаемом контейнере.

Пример 7: анализ гранул.

Стандартный метод с использованием тиоцианата натрия использовали для определения общего содержания железа в белковых гранулах, которое выражали в виде % по массе в расчете на массу гранул. Общее содержание железа определяли путем обработки примерно 100 мг гранул 100 мл 10M раствора HCl при 60°C в течение двух часов для полного растворения гранул. Затем раствор разбавляли в 10 раз 10M раствором HCl. Проводили реакцию 100 мкл разбавленного раствора с 100 мкл 1M раствора тиоцианата натрия. Концентрацию ионов железа III определяли путем измерения поглощения комплекса при длине волны 495 нм и сопоставления значений с калибровочной кривой. В дополнение к световой микроскопии проводили дополнительный анализ изображений, полученных с использованием конфокального сканирующего лазерного микроскопа (CSLM) Leica TCS SP5, с целью оценки морфологии микрокапсул. Распределение частиц по размерам и D (v, 0,9) (размер, при котором кумулятивный объем достигает 90% от общего объема) оценивали, используя пятьдесят гранул на партию, которые анализировали с использованием светлопольного микроскопа при максимальном увеличении  $\times 40$ .

Профиль растворения гранул изучали путем инкубации гранул в буферах с pH 1,6, pH 6,6 и pH 8,4 при 37°C. Уровни железа II и железа III измеряли во временных точках 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 мин. Уровень железа II определяли путем добавления 100 мкл раствора, отобранного в каждой временной точке, к 900 мкл воды, ионы железа II определяли стандартным методом комплексометрического титрования с 5 мМ раствором 1,10-фенантролина путем измерения поглощения комплекса при 450 нм и сопоставления значений со стандартной кривой. Измерения железа II проводили с соответствующим подавлением искусственно вызываемого окисления до железа III за счет проведения анализа в атмосфере азота. Для измерения количества железа III 100 мкл раствора разбавляли в 900 мкл 10M раствора HCl и остав-

ляли на ночь при комнатной температуре для полного окисления. Содержание железа III определяли стандартным методом с использованием тиоцианата натрия, описанным выше.

В качестве верхнего предела использовали 9% бета-лактоглобулин - BLG - (11% денатурированного WPI эквивалентно 9% BLG) во избежание спонтанного гелеобразования BLG/WPI. Гранулы получали с использованием отверждающего раствора, содержащего 250-1000 мМ ацетат натрия в сочетании с 250-1000 мМ сульфатом железа, проводя отверждение в течение 30 мин. Полученные гранулы геля содержали от 0,5 до 2% по массе железа, и при высушивании в диапазоне условий от 15°C в течение 16 ч до 70°C в течение 2 ч, композиции содержали от 2,5% по массе железа до 10% по массе железа, соответственно.

Полученные сухие аморфные микрогранулы, содержащие железо и белок, являются прочными и стабильными. Было показано, что сухие аморфные микрогранулы, содержащие железо и белок, хранящиеся в условиях окружающей среды и условиях ускоренного старения препаратов в течение нескольких месяцев, демонстрируют твердотельные характеристики, аналогичные характеристикам исходных гранул, и также являются такими же эффективными, как свежеприготовленные образцы, в отношении высвобождения железа II при pH 6,6.

При помещении сухих аморфных гранул, содержащих железо и белок, в воду они абсорбируют воду в течение 15 мин и образуется диффузионный слой геля, окружающий сухую гранулу, который отвечает за профиль модифицированного высвобождения железа.

Измельченные лиофилизированные гранулы намного менее эффективны *in vivo*. Кроме того, растворение *in vitro* измельченных плохо сформированных сухих гранул геля быстро приводит к профилю ускоренного высвобождения.

Пример 8: растворение композиции *In vitro*.

Известные количества гранул, содержащих примерно 2-4 мг элементарного железа, растворяли в 10 мл буферного раствора для обеспечения условий достаточного разбавления в отношении сульфата железа при pH 1,6 и поддерживали при 37°C в бане с контролируемой температурой. Емкости с растворами накрывали для предотвращения испарения. В исходный момент времени и временные точки 15, 30, 45, 60, 90, 120 мин 2×100-мкл аликвоты раствора отбирали для анализа на содержание железа. Одну из аликвот немедленно разбавляли в 900 мкл воды для измерения содержания железа II в растворе стандартным методом комплексометрического титрования с 1,10-фенантролином. Другую аликвоту сохраняли для измерения железа III, для чего 100 мкл раствора разбавляли в 900 мкл 10М раствора HCl и оставляли на ночь при комнатной температуре для полного окисления. Содержание железа III определяли стандартным лабораторным методом с использованием изотиоцианата. Эксперименты проводили в тройном повторе.

Результаты.

Анализ методом порошковой рентгеновской дифрактометрии выполняли с использованием дифрактометра Miniflex II Rigaku с Ni-фильтром, Cu K $\alpha$ -излучением ( $\lambda=1,54\text{\AA}$ ). Используемые значения напряжения на трубке и тока на трубке составляли 30 кВ и 15 мА, соответственно. Каждый образец сканировали в диапазоне 2- $\theta$  от 5-80° с величиной шага 0,05/с. Как можно видеть на фиг. 9, картина порошковой РД для физического сочетания белка молочной сыворотки и FeSO $_4$ ·7H $_2$ O в пропорциях, аналогичных композиции ST1501 (сухие высвобождающие Fe $^{2+}$  гранулы), демонстрирует наличие пиков при углах рассеяния 2- $\theta$  (градусов)=12,9, 16,3, 19,9, 22,5, 26,3 и 30,1, которые отсутствуют в ST1501, подтверждая тот факт, что композиция сульфата железа находится преимущественно в аморфном физическом состоянии.

Пример 9: тестирование стабильности.

Важно отметить, что промежуточные гранулы геля нестабильны в отношении окисления, и это проявляется в сниженном высвобождении двухвалентного железа (II) в среде растворения. В связи с этим, гранулы геля, полученные ранее, чем за 24 ч, имеют переменные и неудовлетворительные клинические характеристики и не приемлемы для промышленного и коммерческого использования. Кроме того, эти промежуточные гранулы геля подвержены микробному загрязнению. Установлено, что микрогранулы ST1501 по изобретению являлись стабильными в том, что профиль растворения при pH 1,6 и pH 6,6 оставался практически неизменным в отношении высвобождения железа II в течение по меньшей мере 6 месяцев при хранении в герметичном контейнере в условиях окружающей среды. Например, в одном варианте осуществления изобретения, когда в блистер была упакована [1] гидроксипропилметилцеллюлозная (HPMC) капсула в условиях окружающей среды и [2] HPMC капсула с последующей герметизацией алюминиевой фольгой в атмосфере азота в герметичной камере при комнатной температуре, композиция после продолжительного периода времени высвобождала 98,2%±2,5% и 97,3%±2,3% от содержания железа II, высвобождаемого в исходный момент (принятого за 100%), в течение 1 ч в экспериментах по растворению при pH 6,6. Кроме того, обе композиции были свободны от нежелательных микроорганизмов, включая общее количество жизнеспособных микроорганизмов с максимальным допустимым количеством 10 $^3$  КОЕ/1000 мг, общее содержание дрожжей и плесневых грибов с максимальным допустимым количеством 10 $^2$  КОЕ/1000 мг, и с отсутствием *E. coli*.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для увеличения содержания сывороточного железа у млекопитающего, содержащая железо, буферное средство и носитель, содержащий денатурированный белок, где денатурированный белок является денатурированным сывороточным белком, которая высвобождает по меньшей мере 71% от общего содержащегося в ней железа в виде двухвалентного железа в течение одного часа в искусственном желудочном соке при рН 1,6; которая при внесении ее в искусственный желудочный сок при рН 1,6 доводит рН до значения по меньшей мере 2 через 30 мин и которая при внесении ее в искусственный кишечный сок при рН 6,6 доводит рН раствора до значения не более рН 5,5 через 30 мин; и которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 120% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально композиции сульфата железа с немедленным высвобождением;

где композиция имеет содержание железа от 2,5 до 50% по массе от общей массы композиции;

буферное средство содержит ацетат натрия и уксусную кислоту и присутствует в количестве от 5 до 20% по массе от общей массы композиции, где буферное средство поддерживает рН от 2,5 до 6,5;

денатурированный сывороточный белок присутствует в количестве от 30 до 80% по массе от общей массы композиции;

где композиция находится в форме микрогранул; и

где содержание влаги в композиции менее 10% по массе от общей массы композиции.

2. Композиция по п.1, имеющая общее содержание железа от 5 до 10% по массе от общей массы композиции.

3. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где буферное средство присутствует в количестве от 6 до 20% по массе, например от 6 до 15% по массе, от общей массы композиции.

4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, имеющая соотношение железо:белок, составляющее от 1:20 до 1:3.

5. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где денатурированный сывороточный белок представляет собой денатурированный изолят сывороточного белка, денатурированный бета-лактоглобулин или их комбинации.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой денатурированный белок был подвергнут процессу удаления ионов двухвалентного металла.

7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой денатурированный белок содержит, исключая железо, менее 500 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, менее 300 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка, например, 100 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка.

8. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая стабилизатор, например, стабилизатор, выбранный из аскорбиновой кислоты, L-аскорбиновой кислоты, L-аскорбата натрия, L-аскорбата кальция, аскорбилпальмитата (пальмитоил-L-аскорбиновой кислоты), эриторбиновой кислоты (D-изоаскорбиновой кислоты) и эриторбата натрия (D-изоаскорбата натрия), или их комбинации.

9. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая является стабильной в отношении содержания двухвалентного железа и микробного загрязнения в течение по меньшей мере 6 месяцев при хранении в герметичном контейнере при исследовании стабильности в условиях ускоренного старения препаратов при 40°C и относительной влажности 75%.

10. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая является стабильной в отношении содержания двухвалентного железа при хранении в герметичном контейнере в условиях окружающей среды в течение по меньшей мере 24 месяцев.

11. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая соль C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> жирной кислоты.

12. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из фосфорной кислоты, или соли, выбранной из пропионатов, бутиратов, фосфатов и цитратов, в том числе соль одновалентного металла, такую как соль натрия.

13. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где буферное средство содержит ацетат натрия и уксусную кислоту.

14. Способ увеличения содержания сывороточного железа у млекопитающего, включающий введение композиции, содержащей

железо;

носитель, содержащий денатурированный белок;

где денатурированный белок представляет собой денатурированный сывороточный белок; и буферное средство;

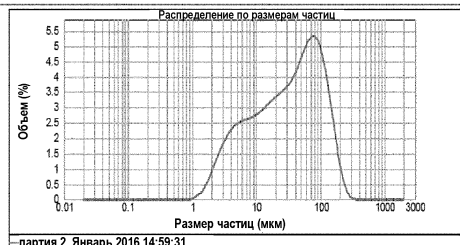
в которой соотношение железо:белок, по массе, составляет от 1:20 до 1:3;

которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 150% в сравнении с эквиво-

- лярной дозой введенной перорально композиции сульфата железа (с немедленным высвобождением);  
 где композиция имеет общее содержание железа от 5 до 20% от массы композиции;  
 где буферное средство содержит ацетат натрия и уксусную кислоту и присутствует в количестве от 5 до 20% по массе от общей массы композиции;  
 где буферное средство поддерживает pH от 2,5 до 6,5; и  
 денатурированный белок присутствует в количестве от 30 до 80% по массе от общей массы композиции;  
 где композиция находится в форме микрогранул; и  
 где содержание влаги в композиции менее 10% по массе от общей массы композиции.
15. Способ по п.14, в котором денатурированный белок содержит, исключая железо, менее 500 мг ионов двухвалентного металла на 100 г белка.
16. Способ получения микрогранул для доставки железа, включающий:  
 формирование геля из жидкости, содержащей денатурированный сывороточный белок, железо и буферное средство;  
 где буферное средство содержит буферную систему ацетат натрия/уксусная кислота и поддерживает pH от 2,5 до 6,5;  
 подвергание геля сдвиговому действию с образованием частиц геля внутри жидкости; и  
 подвергание жидкости, содержащей частицы геля, сушке распылением с образованием микрогранул, содержащих железо, денатурированный белок и буферное средство, при этом микрогранулы содержат от 2,5 до 20% по массе железа;  
 где соотношение железо:белок находится в диапазоне от 1:20 до 1:3; и при этом микрогранулы имеют содержание влаги менее 10% по массе.
17. Способ по п.16, где жидкий состав подвергают сдвиговому действию в течение до 1, 3, 5 или 7 мин.
18. Способ по любому из пп.16 или 17, где частицы геля, полученные в процессе сдвигового действия, оставляют для отстаивания на 10-120 мин, например 20-40 мин, например примерно 30 мин.
19. Способ по любому из пп.16-18, где сушку проводят в течение <300 мин, или <120 мин, или <60 мин, или <30 мин, или <5 мин, или <1 мин.
20. Способ по любому из пп.16-19, где высушиваемый материал подвергают воздействию повышенной температуры 40-100°C, например 50-90°C, например 60-80°C.
21. Способ по любому из пп.16-20, в котором получают микрогранулы со средним диаметром в диапазоне от 10 до 75 мкм.
22. Способ по любому из пп.16-20, где гель представляет собой гидрогель.
23. Способ увеличения содержания сывороточного железа у млекопитающего, включающий введение композиции по любому из пп.1-13, которая при пероральном введении человеку имеет соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 ч, составляющее по меньшей мере 150% в сравнении с эквивалентной дозой введенной перорально (немедленного высвобождения) композиции сульфата железа.

### Профиль распределения по размерам частиц микрогранул геля

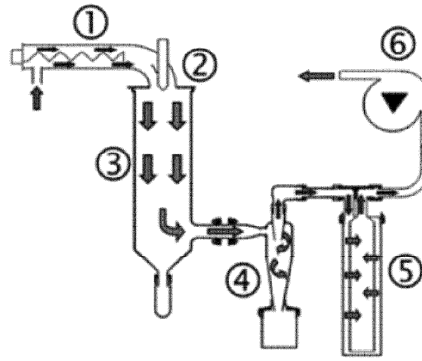
Название частиц:	Название вспомогат. ср-ва:	Модель анализа:	Чувствительность:
RI частиц:	Hydro 2000iP (A)	General purpose	Нормальная
1.435	Поглощение:	Диапазон размеров:	Затенение:
Название диспергир. ср-ва:	0.1	от 0.020 до 2000.000 мкм	13.00 %
Вода	RI диспергир. ср-ва:	Взвешенная невязка:	Эмульсия результатов:
	1.330	1.750 %	Отключено
Концентрация:	Ср-ва:	Однородность:	Единицы получ. данных:
0.0414 об. %	3.495	1.12	Объем
Удельная площадь поверхности:	Средневзвеш. значение по поверхности D[3,2]:	Средневзвеш. значение по объему D[4,3]:	
0.49 м <sup>2</sup> /г	12.245 мкм	50.161 мкм	
d(0.1): 4.267 мкм	d(0.5): 33.373 мкм	d(0.9): 120.912 мкм	



Отверждающий раствор (500 мМ сульфат железа, 500 мМ - 5 М ацетат натрия) помещали в IKA LR-1000 и нагревали до 40°C. Примерно 500 мл раствора денатурированного белка молочной сыворотки (10,5%) добавляли в течение 30 секунд. После добавления раствора белка молочной сыворотки и формирования геля отверждающий раствор перемешивали при помощи ротационной мешалки Tigtag со скоростью 15000 об/мин в течение 2 минут, и раствор оставляли для отверждения на 60 минут при низкой скорости вращения (мешалка 100 об/мин). Вновь образовавшиеся влажные частицы были очень мелкими (показаны результаты измерения размера частиц на анализаторе Malvern) и демонстрировали двухвершинную картину распределения с D50 33 микрон до сушки в лотках при 80°C

Фиг. 1

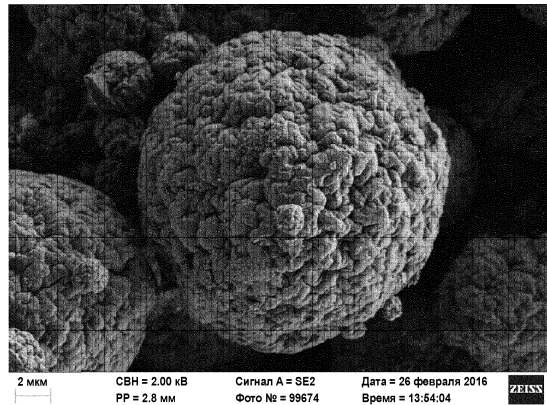
## Схема типичной установки для сушки распылением



Сначала готовят раствор белка (до 10,5%), как описано выше, и смешивают с отверждающим раствором, как описано ниже, получая гель. Гель фрагментируют на частицы меньшего размера с использованием срезающей силы (например, при помощи роторно-статорной или лопастной мешалки), получая частицы геля с нужным размером частиц. Суспензию геля затем осторожно перемешивают в течение по меньшей мере 30 минут перед перекачиванием ее в распылительную сушилку. В [1] суспензию нагревают до температуры от 140°C до 160°C. [2] Затем создают капли с помощью двухжидкостного сопла в установке Buchi B-290. [3] Между сушильным газом и каплями образца происходит кондуктивный теплообмен. Это приводит к удалению избытка жидкости из маточной жидкости, а также жидкости внутри гранул геля. [4] Частицы собирают с использованием циклонной технологии. [5] В фильтре выходного отверстия происходит сбор самых мелких частиц. [6] Сушильный газ доставляется при помощи аспиратора. Схема взята из [www.buchi.com/products/b-290](http://www.buchi.com/products/b-290)

Фиг. 2

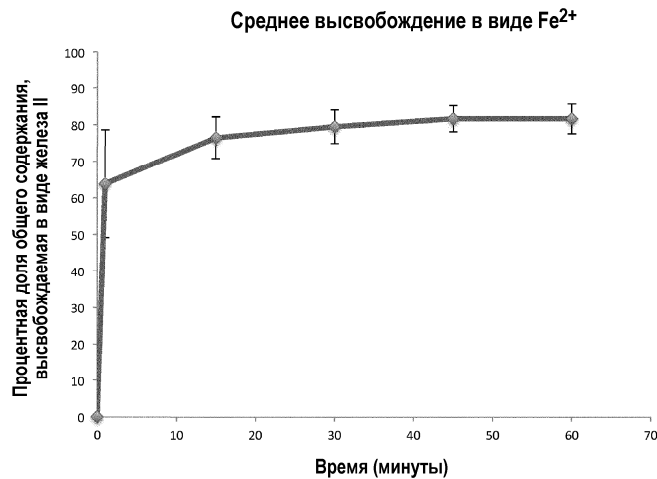
## Сканирующая электронная микроскопия микрогранул



Полученное методом СЭМ при слабом увеличении изображение микрогранул композиции, полученных методом сушки распылением. Изображения методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) получали на приборе Zeiss Ultra Plus Field Emission СЭМ с колонкой Gemini® (Zeiss). Сухие гранулы образца помещали на проводящую угольную пленку без какой-либо дополнительной обработки или покрытия образца. Использовали ускоряющее напряжение 2-3 кВ для преодоления экстенсивного эффекта разряда

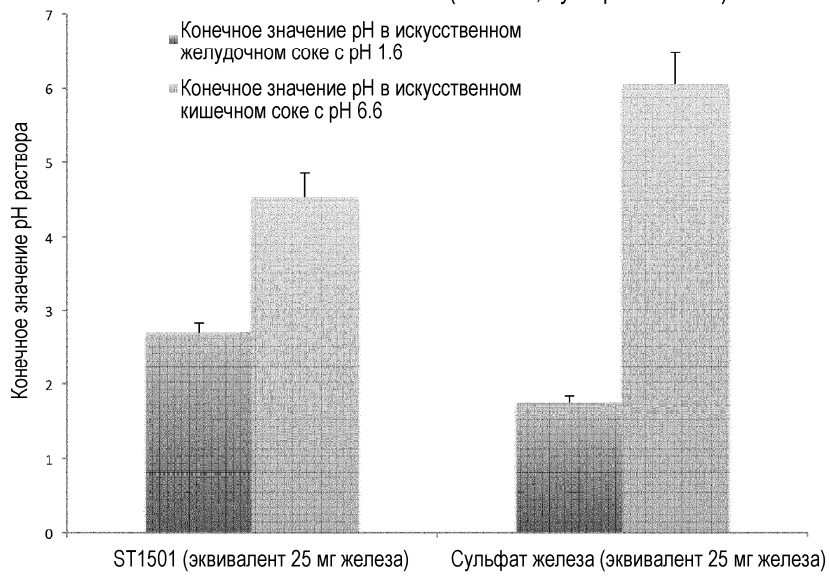
Фиг. 3

## Профиль немедленного высвобождения железа в ST1501



Фиг. 4

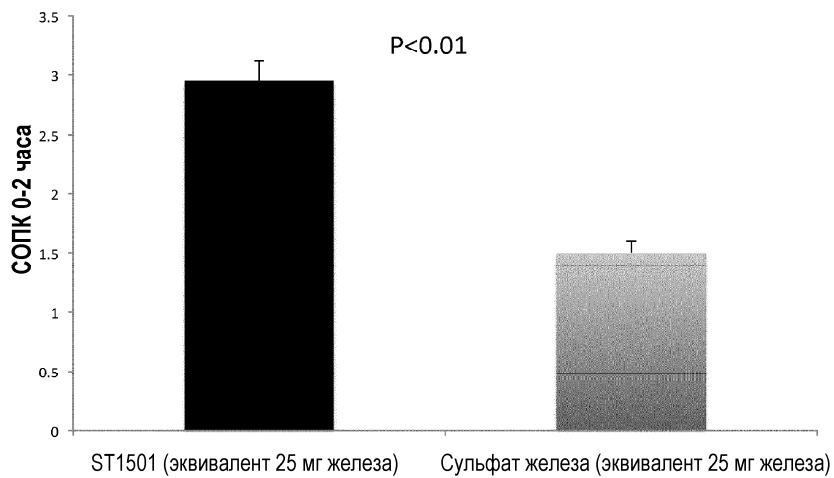
Профиль рН композиций по изобретению в искусственном желудочном и кишечном соке (ST1501, сульфат железа)



Фиг. 5

Соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 часов у голодающих субъектов

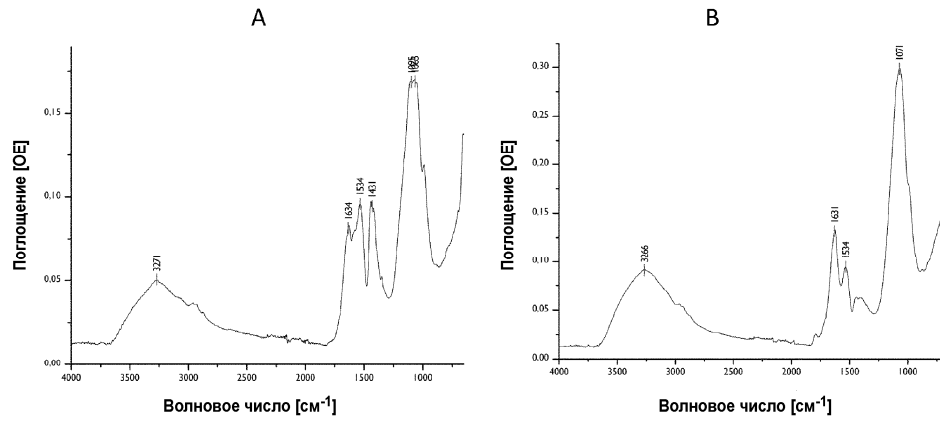
**Соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа**



Фиг. 6



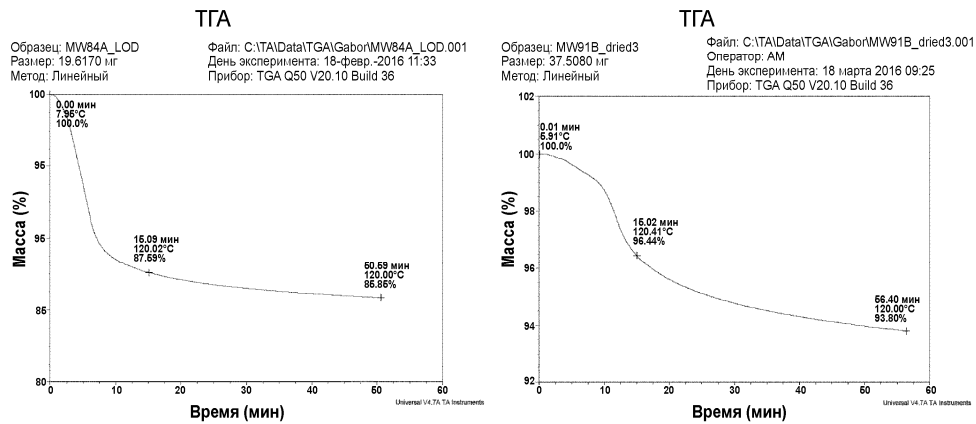
## Фурье-ИКС микрогранул композиции



Полученные методом Фурье-ИКС графики, показывающие характерное присутствие характерных пиков ацетата натрия в микрогранулах композиции в области 1560-1410 см<sup>-1</sup> в сравнении с денатурированным белком молочной сыворотки. На Фигуре 7В представлен полученный методом Фурье-ИКС график, показывающий уменьшение пиков ацетата натрия в композиции в области 1560-1410 см<sup>-1</sup>, отражающее уменьшение (<3% по массе) содержания ацетата натрия, уменьшение соотношения ацетат: железо и уменьшение соотношения ацетат: белок

Фиг. 7

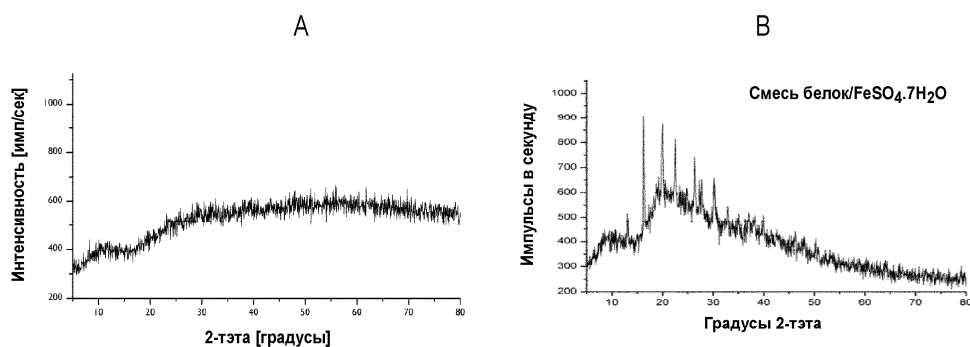
## ТГА анализ микрогранул композиции



Иллюстративный термогравиметрический анализ (ТГА) потерь при высушивании микрогранул по изобретению после использования только сушки распылением (А) и после сушки распылением с последующей сушкой при 80°C. Взвешенные порошкообразные образцы (10-15 мг) анализировали в открытых керамических чашках. Для ТГА измерений использовали термогравиметрический анализатор TGA-Q50 от компании TA Instruments со следующей температурной программой: образец был нагрет до 120°C (10°C/мин) и в течение 45 мин оставался изотермическим при 120°C

Фиг. 8

## ПРД анализ микрогранул композиции

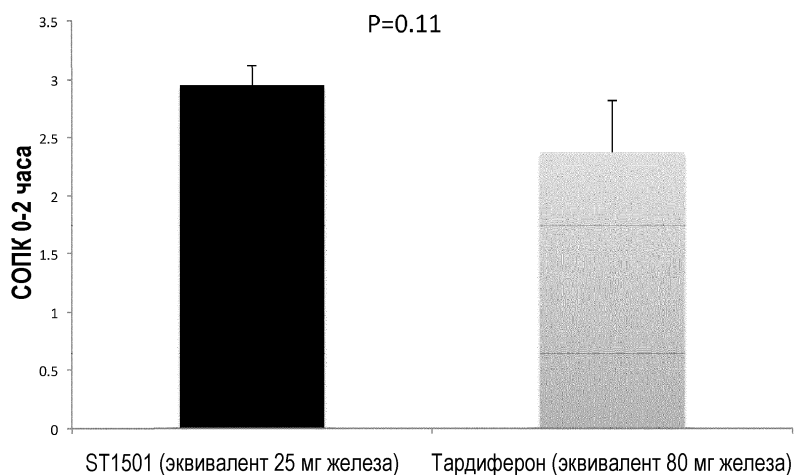


Результаты порошковой РД, демонстрирующие преимущественно аморфную природу композиций по изобретению [А]. Отсутствуют типичные пики ПРД, характерные для кристаллического сульфата железа (II). Широкие пики базовой линии отражают низкий уровень упорядоченности в структуре белка. Картина порошковой РД [В] представляет профиль денатурированного белка молочной сыворотки, физически смешанного с гептагидратом сульфата железа, демонстрирующий признаки кристаллического состояния

Фиг. 9

Соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа в течение 2 часов у голодающих субъектов

Соотношение остаточной и пиковой концентрации сывороточного железа



Фиг. 10

