



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 32 722 T2 2006.09.07

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 038 524 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 32 722.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CN98/00174

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 940 049.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/011256

(86) PCT-Anmeldetag: 28.08.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 11.03.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 27.09.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 07.12.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 07.09.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/295 (2006.01)**

*A61K 31/191 (2006.01)*

*A61K 33/26 (2006.01)*

*A61K 31/68 (2000.01)*

*A61K 31/375 (2006.01)*

*A61P 7/06 (2006.01)*

(30) Unionspriorität:

97116835 29.08.1997 CN

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:

Juneng Industry Co., Ltd., Beijing, CN

(72) Erfinder:

YU, Kai, Beijing 100031, CN; WANG, Zhiwen, Beijing 100031, CN; KOU, Fuping, Beijing 100031, CN

(74) Vertreter:

Maiwald Patentanwalts-GmbH, 20095 Hamburg

(54) Bezeichnung: EISEN-L-THREONAT-,PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN UND DEREN VERWENDUNG ZUR VERBESSERUNG UND BEHANDLUNG VON ANÄMIE BEI MENSCHEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Derivat der L-Threonsäure, das eine pharmazeutisch wirkende Verbindung darstellt. Insbesondere betrifft die Erfindung Eisen-L-Threonat, eine Methode zur Herstellung von Eisen-L-Threonat sowie eine pharmazeutische Zusammensetzung dessen. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von Eisen-L-Threonat für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Verbesserung und die Behandlung von Anämien, im Speziellen der ernährungsbedingten Eisenmangel Anämie (iron-deficiency anemia, IDA), Blutungsanämie (hämorrhagische Anämie) oder hämolytischer Anämie.

**[0002]** L-Threonsäure ist ein Metabolit des Vitamin C. Es ist bekannt, dass einige physiologische Funktionen des Vitamin C möglicherweise durch seine Metabolite, z.B. der L-Threonsäure und dergleichen, hervorgerufen werden. Auf der anderen Seite kann das Vorhandensein dieser Verbindungen gravierend die Aufnahme und die Verwertung von Vitamin C beeinflussen.

**[0003]** Calcium-L-Threonat ist ein Derivat der L-Threonsäure. Calcium-L-Threonat kann die Aufnahme von Vitamin C durch die Lymphomazellen verbessern und kann als hochwirksamer Calciumnährstoff für die Vorsorge und die Behandlung verschiedener durch einen Calciummangel verursachter Krankheiten eingesetzt werden (chinesisches Patent ZL 96 06507.9). Des weiteren wird Calcium-L-Threonat für die Linderung von Entzündungen und Erniedrigung des Blutdrucks verwendet. Es finden sich in der Literatur allerdings keine Hinweise auf andere Salze der L-Threonsäure oder auf die Verwendung anderer Salze der L-Threonsäure als Medikament zur Behandlung von Erkrankungen.

**[0004]** Die Anämie ist eine verbreitete Erkrankung, die durch verschiedene Ursachen hervorgerufen wird. Diese Ursachen umfassen hauptsächlich: (1) die Abnahme der roten Blutkörperchen (red blood corpuscle, RBC) in Volumen oder Quantität; (2) die Abnahme der Menge an Hämoprotein infolge chronischen oder akuten Blutverlusts und der Schädigung der roten Blutkörperchen (RBC) als Folge einer Chemikalienvergiftung; und (3) Reduktion der Anzahl produzierter roten Blutkörperchen (RBCs) infolge eines Knochenmarkdefekts oder eines Mangels an Nährstoffen, wie Eisen oder Vitamin B<sub>12</sub>, die für die Produktion von roten Blutkörperchen (RBCs) benötigt werden.

**[0005]** Ernährungsbedingte Eisenmangel-Anämie (iron-deficiency anemia, IDA) ist ein weit verbreiteter Fall unter den Blutmangelerkrankungen. Der Grund für diese Form der Anämie liegt darin, dass das Gleichgewicht im Körper zwischen Exkretion und Speicherung von Eisen nicht ausreichend unterstützt wird. Als Folge wird über die Zeit mehr körpereigenes Eisen ausgeschieden und immer weniger gespeichert. Dieses Phänomen ist oft während Wachstumsperioden oder Schwangerschaften sowie bei einem chronischen Blutverlust infolge unterschiedlicher Gründe zu beobachten. Beispielsweise ist die mangelnde Aufnahme an Eisen über die Nahrung ein wichtiger Faktor der zum Eisenmangel des Körpers führt.

**[0006]** Tatsächlich stellt die ernährungsbedingte IDA ein weltweites Ernährungsproblem dar. Für die Behandlung dieser Art von Erkrankungen, zeigt die einfache Aufnahme von eisenreichen Nahrungsmitteln verglichen mit der Einnahme von Medikamenten kaum ausreichende Effekte. Unter den Medikamenten zur Behandlung von Eisenmangelerkrankungen (IDA) ist Eisensulfat ein recht häufig in Eisen-Formulierungen verwendeter Wirkstoff mit einer guten Wirksamkeit, einem niedrigen Preis und einem reichlich vorhandenen Rohstoff. Trotzdem ist die umfassende Verwendung von Eisensulfat zur Behandlung der IDA aufgrund seiner Nebenwirkungen begrenzt (Chinese Child Blood, Vol. 1, p 24-26, 1996). Aus diesem Grund ist es erstrebenswert neue wirksame Verbindungen und Zusammensetzungen zur Verbesserung und effizienten Behandlung der IDA zur Verfügung zu stellen.

**[0007]** Die Blutungsanämie ist eine übliche Ursache der Anämie. Die meisten Patienten sind Frauen während der Schwangerschaft oder während der Menstruation.

**[0008]** Eine andere Form der Anämie ist die hämolytische Anämie. Die Hauptursachen der hämolytischen Anämie sind: Kontakt mit hämolytischen Chemikalien oder Substanzen, wie z.B. Naphthalin oder Sulfanilamid, Produktion von Antikörpern in den Zellen in Folge einer Medikamenteneinnahme oder die Anwesenheit von Zellen mit vererbten Zelldefekten. Eine Art der Behandlung einer hämolytischen Anämie ist die Entfernung dieser schädlichen Chemikalien aus dem Körper. Daher war es wünschenswert, eine aktive Verbindung sowie deren Zusammensetzungen für die Verbesserung und die Behandlung der hämolytischen Anämie zur Verfügung zu stellen. Insbesondere ist es wünschenswert, einen Wirkstoff sowie Zusammensetzungen umfassend diesen Wirkstoff zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, alle drei Formen von Eisenmangelerkrankungen zu

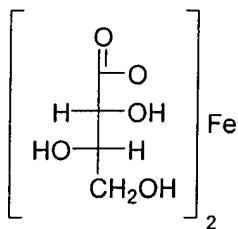
lindern oder zu heilen.

**[0009]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es damit neue Derivate der L-Threonsäure, insbesondere Eisen-L-Threonat, zur Verfügung zu stellen.

**[0010]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Zusammensetzungen umfassend Eisen-L-Threonat für die Linderung und die Behandlung von Anämien, wie hämorrhagischer Anämie, ernährungsbedingter Eisenmangelanämie (IDA) oder hämolytischer Anämie, zur Verfügung zu stellen.

**[0011]** Das erfindungsgemäße Eisen-L-Threonat weist im Vergleich zu bereits bekannten Eisenpräparaten, wie z.B. Eisensulfat, eine bessere Absorptionsrate auf. Tierversuche ergaben, dass bei gleicher Dosierung (Fe/kg Körpergewicht) sowie vergleichbarem Erkrankungsbild und Körperbau der Versuchstiere Eisen-L-Threonat besser absorbiert wurde als Eisensulfat. Eisen-L-Threonat zeigte keine Toxizität bei der Anwendung. Als Eisenpräparat, vermag Eisen-L-Threonat eine hämolytische Anämie, eine hämorrhagische sowie eine ernährungsbedingte IDA signifikant zu verbessern und zu heilen, wobei es sich gegenüber Eisengluconat und Eisenfumarat durch eine hohe Bioverfügbarkeit und eine kontrollierte Freisetzung auszeichnet. Eisen-L-Threonat kann sowohl als gutes eisenhaltiges Nahrungsergänzungsmittel als auch als Medikament für die Linderung und Behandlung von Blutarmuterkrankungen eingesetzt werden.

**[0012]** Die Erfindung betrifft sogenanntes Eisen-L-Threonat mit der unten angeführten chemischen Struktur.



**[0013]** Eisen-L-Threonat ist optisch aktiv und liegt in der L-Form vor. Eisen-L-Threonat ist stabil und wasserlöslich und liegt in Lösung überwiegend in komplexierter Form vor.

**[0014]** Verfahren zur Herstellung von Eisen-L-Threonat:

1. Neutralisierung von L-Threonsäure mit Eisenoxiden oder Eisenhydroxiden, wie z.B. Eisenoxid ( $\text{FeO}$ ) und Eisenhydroxid ( $\text{Fe(OH)}_2$ );
2. Verdrängungsreaktion von L-Threonsäure oder Calcium-L-Threonat mit anorganischen Eisensalzen, wie z.B. Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ ), Eisenchlorid ( $\text{FeCl}_2$ ) und Eisennitrat ( $\text{Fe(NO}_3)_2$ ), wobei die L-Threonsäure durch Oxidation von Vitamin C oder durch eine Verdrängungsreaktion aus Calcium-L-Threonat erhalten wird.

**[0015]** Eisenoxide, Eisenhydroxide und anorganische Eisensalze können aus den entsprechenden Eisenverbindungen, wie z.B. Eisennitrat, Eisensulfat und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , gewonnen werden. Ist L-Threonsäure kommerziell erhältlich, kann diese auch für die Herstellung von Eisen-L-Threonat gemäß einer der oben beschriebenen Methoden verwendet werden.

**[0016]** Die Reaktionsbedingungen für die Herstellung von Eisen-L-Threonat sind:

1. Vitamin C wird mittels eines Oxidationsmittels, wie z.B. Hydrogenperoxidlösung, bei einem pH-Wert von pH 6-10, vorteilhafterweise bei einem pH-Wert von pH 7-9, oxidiert, um so eine L-Threonsäurelösung zu erhalten.
2. Unter einer Schutzgasatmosphäre, wie etwa Stickstoff, wird eine Lösung von L-Threonsäure mit einer Eisenverbindung, wie z.B. Eisenoxiden, Eisenhydroxiden oder Eisensalzen, zu Eisen-L-Threonat umgesetzt.

**[0017]** Zudem betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die Eisen-L-Threonat als aktiven Wirkstoff enthalten. Diese Zusammensetzungen können zusätzlich weitere therapeutisch aktive Substanzen, pharmazeutisch akzeptable Träger und weitere medizinische Zusätze wie z. B. Geschmacksstoffe, Hilfsstoffe und Vitamine, umfassen. Vorzugsweise, enthalten die Zusammensetzungen Eisen-L-Threonat sowie Vitamin C oder Vitamin B12, wobei der Gewichtsanteil an Eisen-L-Threonat zwischen 10-90 Gew.-%, vorzugsweise in einem Bereich von 30-80 Gew.-% und besonders bevorzugt in einem Bereich von 40-60 Gew.-% liegt.

**[0018]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird der Begriff „pharmazeutisch akzeptabel“ in der Weise verstanden, dass aus pharmazeutischer Sicht die verwendeten Materialien, Substanzen und Komponenten bzw. deren Eigenschaften hinsichtlich ihrer Stabilität und Bioverfügbarkeit für Patienten und Pharmazeuten akzeptabel sind.

**[0019]** Das erfindungsgemäße Eisen-L-Threonat kann in jeder beliebigen Formulierung verarbeitet werden. Solche Formulierungen umfassen Tabletten, Kapseln, Zäpfchen, Flüssigkeiten, Suspensionen, Sirupe, Emulsionen, Gele, Salben, gefriergetrocknete Pulver, Pillen, Überzüge oder Filme, Lipoplaste, dispersible Mikropulver und Injektionslösungen, wobei feste Tablettenformen und Pulver bevorzugt sind.

**[0020]** Erfindungsgemäß kann die Tablette durch Mixen des Wirkstoffes Eisen-L-Threonat mit Hilfsstoffen wie Calciumcarbonat, Calciumphosphat oder Laktose, Sprengmitteln, wie Maisstärke, Bindemitteln, wie Stärke oder Gelatine, Schmiermitteln, wie Magnesiumstearat oder Talkum, sowie mit Hilfsstoffen, die eine verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs gewährleisten, wie Carboxypolymethylen oder Carboxymethylcellulose, hergestellt werden.

**[0021]** Tablettenkerne für die Herstellung von Zuckerbeschichteten Tabletten können mit denselben, oben genannten Methoden hergestellt werden. Ausgangssubstanzen für die Herstellung einer Zuckerbeschichtung sind Insektenleim, Gummi arabicum, Gelatine, Talkum, Titandioxid oder ähnliche Verbindungen. Die Tablettenkerne wurden im Regelfall unter Anwendung einer Mehrschicht-Technologie hergestellt, um Inkompatibilitäten zwischen den unterschiedlichen Komponenten zu vermeiden.

**[0022]** Injektionslösungen können mit Hilfe bekannter Verfahren hergestellt werden. In ähnlicher Weise können auch die anderen Eisen-L-Threonat-Zusammensetzungen unter Anwendung bekannter Verfahren und Methoden hergestellt werden.

**[0023]** Eisen-L-Threonat kann als Nahrungsergänzungsmittel zusätzlich zur Mahlzeit oder mit einem Getränk eingenommen werden, um so die Eisenaufnahme des Körpers zu verbessern und anämische Erkrankungen zu lindern oder zu behandeln.

**[0024]** Die vorliegende Erfindung stellt Eisen-L-Threonat zur Linderung und zur Behandlung von Anämien, wie z.B. von ernährungsbedingter Eisenmangelanämie, von Blutungsanämie sowie einer hemolytischen Anämie, zur Verfügung.

**[0025]** Hierzu nehmen die Patienten eine bestimmte Menge Eisen-L-Threonat ein.

**[0026]** Eisen-L-Threonat kann sowohl zur Behandlung von Tieren, wie etwa Rindern, Pferden und Schafen, als auch insbesondere zur Behandlung von Menschen inklusive Kindern, Frauen und älteren Menschen eingesetzt werden; insbesondere in der Behandlung von Kindern und Frauen.

**[0027]** Die Aktivität und Wirksamkeit von Eisen-L-Threonat wird durch die verschiedenen, möglichen Verabreichungswege, wie etwa dem oralen Weg oder der parenteralen Gabe als Injektionslösung etc. nicht beeinflusst.

**[0028]** Die Dosierungen zur Behandlung von Anämien variieren in Abhängigkeit des Krankheitszustandes des Patienten und in Abhängigkeit vom gewählten Verabreichungsweg. Um die korrekte Dosierung zu bestimmen, muss der Grad der Anämie, das Alter des Patienten sowie sein Körpergewicht usw. berücksichtigt werden. Zum Beispiel sollte die Dosierung für ein Kind niedriger gewählt werden als für einen Erwachsenen.

**[0029]** Bei der Verwendung des Arzneimittels in fester Form beträgt die Dosierung von Eisen-L-Threonat für einen Erwachsenen im Normalfall etwa 10 mg-1 g pro Tag. Bevorzugt ist eine Dosierung im Bereich zwischen 20 mg-800 mg pro Tag, insbesondere bevorzugt wird ein Bereich zwischen 30 und 500 mg pro Tag, wie z.B. 30 mg, 250 mg oder 400 mg, ganz besonders bevorzugt wird ein Bereich zwischen 50 mg-200 mg pro Tag, wie z.B. 60 mg, 100 mg oder 150 mg.

**[0030]** Für die Verwendung am Tier, insbesondere am Säugetier außer dem Menschen, hängt die Dosierung an Eisen-L-Threonat von den experimentellen Ergebnissen für die verschiedenen Tierarten und -rassen ab.

**[0031]** Eisen-L-Threonat sowie dessen Zubereitungen können zur Verbesserung und zur Behandlung ernährungsbedingter Eisenmangelanämie, Blutverlustanämie und hämolytischer Anämie eingesetzt werden.

**[0032]** Insbesondere können Eisen-L-Threonat und Eisen-L-Threonathaltige Arzneimittel in der Wachstumsphase von Kindern, bei Frauen während einer Schwangerschaft und in der Menstruation, im Fall eines chronischen oder akuten Blutverlustes und im Fall unzureichender Eisenaufnahme aus der Nahrung angewendet werden.

**[0033]** Eisen-L-Threonat und seine Zubereitungen können im Fall der hemolytischen Anämie angewendet werden, die durch eine Schädigung oder eine Abnahme der Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC) hervorgerufen wird; z. B. wenn die roten Blutkörperchen chemischen Verbindungen ausgesetzt werden.

**[0034]** Eisen-L-Threonat kann ebenfalls unter bestimmten Bedingungen als Nahrungsergänzungsmittel zur Behandlung von Körperfunktionsstörungen dienen, die z. B. durch Eisenmangel hervorgerufen werden.

**[0035]** Im Rahmen des Auswertungsprogramms für Nahrungsmittelsicherheit und Toxikologie wurde die Horn-Methode, wie sie im Standard GB 15193.4-94 veröffentlicht wurde, angewendet und so die akute Toxizität von Eisen-L-Threonat durch die LD<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Es wurden 3,16 g/kg und 3,69/kg für weibliche bzw. männliche Ratten ermittelt. Diese Tatsache illustriert, dass die Toxizität von Eisen-L-Threonat ein sehr geringes Maß aufweist.

**[0036]** Entsprechend den veröffentlichten Standards GB 15193.4-94, GB 15193.5-94, GB 15198.4-94 und GB 15193.14-94 wurden AMES-Tests, Micronucleus-Tests an Knochenmarkszellen sowie Chromosomenaberrationstests an Mäusehodenzellen durchgeführt, und alle Tests waren negativ. Bei oraler Gabe von Eisen-L-Threonat hat sich weder eine embryonale Toxizität noch eine Aberration ergeben.

**[0037]** Die Aufnahme von Eisen-L-Threonat aus dem Verdauungssystem von männlichen Wistar-Ratten wird im folgenden beschrieben (siehe: Experiment 1).

**[0038]** Des weiteren wird über die Ergebnisse von pharmacodynamischen Studien von Eisen-L-Threonat an Modellen für eine hämolytische Anämie-, eine ernährungsbedingte Eisenmangelanämie sowie für eine Blutverlust-Anämie berichtet (siehe: Experiment 2).

**[0039]** Schließlich werden klinische Untersuchungen über die Linderung und Behandlung von Eisenmangelkrankungen bei Kindern durch Eisen-L-Threonat beschrieben (siehe: Experiment 3).

#### Experiment 1

##### Metabolisierungs- und Absorptionsstudie von Eisen-L-Threonat bei männlichen Wistar-Ratten

Arzneimittel: Eisen-L-Threonat wurde vom Beijing Juneng Asia-Pacific Life Science Research Center zur Verfügung gestellt. Es ist ein gelb-grünes Pulver, in Wasser löslich und enthält das Element Eisen zu 15,47%. Seine chemische Formel lautet Fe(C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, sein Molekulargewicht beträgt 362 g/mol.

Versuchstiere: Männliche Wistar-Ratten wurden vom Experimental Animal Center, Tumor Institute of Heilongjiang Province zur Verfügung gestellt und hatten ein Körpergewicht zwischen 140 g bis 180 g. Die eisenarme Diät enthält 0,9 mg/kg Eisen.

##### Testverfahren:

**[0040]** (1) Dosierung und Aufteilung der Gruppen: 50 Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in fünf Gruppen von jeweils 10 Ratten aufgeteilt. Zur Verabreichung der Eisenmangeldiät wurde jeder Gruppe von Ratten per Sondenfütterung die unten dargestellte Dosierung verabreicht:

Hochdosisgruppe: 5mg/kg Fe entsprechend 32,32 mg/kg Eisen-L-Threonat;

Mitteldosisgruppe: 2,5 mg/kg Fe entsprechend 16,16 mg/kg Eisen-L-Threonat;

Niedrigdosisgruppe: 1,0 mg/kg Fe entsprechend 6,46 mg/kg Eisen-L-Threonat;

Positive Kontrollgruppe (Eisensulfat): 2,5 mg/kg Fe entsprechend 12,43 mg/kg Eisensulfat;

Negative Kontrollgruppe (eisenarme Diät): 0,9 mg/kg Fe (gemessener Wert).

**[0041]** Nach dem Ende einer 7-tägigen Fütterung mit einer normalen Diät, wurden die Ratten für weitere 7 Tage auf eine eisenarme Diät entsprechend der AOAC-Formel gesetzt. Die Ernährung der Gruppen 1-3 wurde mit 32,32 mg/kg (entsprechend 5 mg Fe/kg, Hochdosisgruppe), 16,16 mg/kg (entsprechend 2,5 mg Fe/kg, Mitteldosisgruppe) bzw. 6,46 mg/kg Eisen-L-Threonat (entsprechend 1,0 mg Fe/kg, Niedrigdosisgruppe) ergänzt. Der vierten, positiven Kontrollgruppe wurden 12,43 mg/kg Eisensulfat (entsprechend 2,5 mg Fe/kg) gegeben.

Der fünften, negativen Kontrollgruppe wurde ausschließlich die eisenarme Diät gegeben (0,9 mg Fe/kg) verabreicht. Jeder Gruppe wurden die Arzneimittel mit einer einzelnen Gabe pro Tag mittels Sondenfütterung verabreicht, und es wurde zur selben Zeit demineralisiertes Wasser gegeben.

**[0042]** Der Test wurde 3 Tage durchgeführt. Die Exkremeante jeder Ratte wurden gesammelt, bei einer Temperatur zwischen 80 und 90°C getrocknet, gewogen und mit Hilfe von Filtersieben (40-60 mesh) vermahlen. Proben von ungefähr 0,5-0,6 g wurden abgewogen und eine Mischung von Salpetersäure und Perchlorsäure im Verhältnis von 4:1 wurde bis zum vollständigen Aufschluss hinzugegeben. Das konstante Volumen der so erhaltenen Lösung betrug 10 ml. Durch die Zugabe der im Verhältnis 4:1 vorgemischten Salpeter- und Perchlorsäuren zu dieser Art von Rattenexkrementen wurden die für die Messung notwendigen Lösungen zur Verfügung gestellt. Der Eisengehalt in den Exkrementen wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt und die Eisenabsorptionsrate jeder Ratte kann mit der folgenden Formel bestimmt werden.

$$\text{digestive Absorption (\%)} = \frac{\text{Eisenmenge in Nahrung} - \text{Eisenmenge in Exkrementen}}{\text{Eisenmenge in der Nahrung}} \times 100$$

Ergebnisse: Die Testergebnisse wurden in Tabelle 1 aufgeführt, und sie zeigten, dass die digestive Absorption aus Eisen-L-Threonat signifikant höher ist als die aus Eisensulfat ( $P < 0,01$ ) bei Gabe derselben Eisenmenge.

Tabelle 1. Digestive Absorption verschiedener Eisensalze.

Gruppe	Größe	Dosierung (mg Fe/kg)	Aufnahme (%)
Hohe Dosierung mit Eisen-L-Threonat	10	5	42,60±1,79
Mittlere Dosierung mit Eisen-L-Threonat	10	2,5	54,90±4,08
Niedrige Dosierung mit Eisen-L-Threonat	10	1	59,10±5,01
Eisensulfat-Gruppe	10	2,5	42,00±1,02
Kontrollgruppe	10	0,9	55,50±1,85

## Experiment 2

Pharmacodynamiken von Eisen-L-Threonat in Modellen einer hämolytischen Anämie, einer ernährungsbedingten Eisenmangelanämie sowie einer Blutverlustanämie.

1. Arzneimittel: Eisen-L-Threonat, gelb-grünes Pulver mit einem Eisengehalt von 15,47% wurde von Beijing Juneng Asia-Pacific Life Science Research Center zur Verfügung gestellt. Eisengluconat, das positive Kontrollarzneimittel, gelb-grünes Pulver mit einem Eisengehalt von 11 % wurde von der Ganjian Pharmaceutical Company of Jianxi Province beschafft. Eisenfumarat mit einem Eisengehalt von 6,4% wurde von der 18<sup>th</sup> Pharmaceutical Company of Shanghai beschafft. Alle Arzneimittel wurden in destilliertem Wasser gelöst.

2. Versuchstiere und Aufteilung der Gruppen: Männliche Wistar-Ratten (Animal Center of Beijing Medical University) mit einem Körpergewicht von  $250 \pm 10$  g wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten und mit einer normalen Diät und Wasser ernährt. Das Tierfutter wurde ebenfalls von der Beijing Medical University bezogen.

**[0043]** (1) Modell für die hämolytische Anämie: Das hämolytische Anämie-Modell wurde mit Ratten erstellt, in dem ihnen Acetylphenylhydrazin ( $C_8H_{10}N_2O$ , hergestellt von der Beijing Biochemical Company) subkutan injiziert wurde. Die Verbindung Acetylphenylhydrazin wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt, um so eine Injektionslösung mit 4 Gew.-% Acetylphenylhydrazin zu erhalten. Diese Lösung wurde jeder Ratte mit einer Dosis von 57 µg/g am Anfang jedes Experiments injiziert. Die Menge des Blut-Hämochroms jeder Ratte wurde nach 2 bzw. 4 Tagen gemessen. Sobald der durchschnittliche Gehalt an Blut-Hämochrom auf etwa 6,11 ± 0,25 Gew.-% abgenommen hatte, wurden die Ratten nach dem Zufallsprinzip in 6 Gruppen von jeweils 18 Ratten aufgeteilt. Die Gruppen 1 bis 3 wurden mit Eisen-L-Threonat mit hoher, mittlerer bzw. geringer Dosis

behandelt. Die vierte Gruppe stellte die positive Kontrollgruppe dar. Die fünfte und die sechste Gruppe wurden als Modellgruppe bzw. normale Kontrollgruppe (ohne hämolytische Anämie) ausgelegt.

**[0044]** (2) Modell für die ernährungsbedingte Anämie: Männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von  $43 \pm 2,5$  g (Animal Center of Beijing Medical University) wurden nach dem Zufallsprinzip in 8 Gruppen von jeweils 10 Ratten aufgeteilt, wobei 6 Gruppen für die Untersuchung der ernährungsbedingten Anämie ausgesucht wurden und 2 Gruppen als normale Kontrollgruppen verblieben. Die Ratten der 6 Gruppen wurden auf eine eisenarme Diät gesetzt (hergestellt nach den Regeln der AOAC, mit einem Eisengehalt von 8,0 mg/kg) und mit demineralisiertem Wasser für 4 Wochen ernährt, um so ein Modell für die ernährungsbedingte Eisenmangelanämie zu generieren. Dieser Test wurde auch Hämoglobinerschöpfungstest genannt. Die zwei anderen Gruppen, die als normale Kontrollgruppen ausgelegt waren, wurden während des gesamten Experiments mit einer normalen Diät (beschafft von der Beijing Medical University) und Wasser ernährt.

**[0045]** Der Hämoglobinspiegel jeder Rattengruppe wurde alle 7 Tage gemessen. Nach dem Ende von 4 Wochen einer eisenarmen Diät, war der Hämoglobinspiegel bei den Gruppen mit ernährungsbedingter Eisenmangelanämie auf einen Wert von  $7,51 \pm 0,17$  g gesunken, und in dieser Zeit wurde der Blutindex einer Gruppe mit ernährungsbedingter Eisenmangelanämie sowie einer Kontrollgruppe als Maß für die Situation vor der Gabe des Arzneimittels gemessen. Die anderen 6 Gruppen (3 für die Behandlung mit Eisen-L-Threonat, 1 für die Behandlung mit Eisengluconat, 1 als Regelungsgruppe und eine als normale Kontrollgruppe) wurden unter kontrollierten Bedingungen in einem Tierfütterkäfig gehalten (Raumtemperatur bei  $23^{\circ}\text{C}$ , 60° relative Luftfeuchtigkeit und 10 Stunden Licht), um den Test weiter fortzusetzen.

**[0046]** (3) Modell für die Blutverlustanämie: 120 männliche Wistar-Ratten (Animal Center of Beijing Medical University) mit einem Körpergewicht von  $130 \pm 8,2$  g wurden nach dem Zufallsprinzip in 8 Gruppen von je 15 Ratten aufgeteilt. 7 Gruppen wurden als hämolytische Anämie-Gruppen und eine als normale Kontrollgruppe mit einer normalen Diät und Wasser ernährt. Das Modell der hämolytischen Anämie wurde dadurch generiert, dass an den Ratten ein Aderlass durch den inneren Canthus des rechten Auges mittels einer Glaskapillare vorgenommen wurde. Das Volumen des ersten Aderlasses betrug bei jeder Ratte 2,0 ml, und in dieser Zeit lag der Hämochrom-Wert der Ratten in einem Bereich zwischen 9,78 und 10,65 g%. Zwei Tage später wurde ein zweiter Aderlass (2 ml pro Ratte) durchgeführt, wobei ein Hämochrom-Wert von 7,40-7,88 g% ermittelt wurde. Das vollständige Aderlassvolumen bei jeder Ratte betrug somit 4 ml und betrug 32,9% des Gesamtvolumens des im Körper einer Ratte zirkulierenden Blutes.

**[0047]** Eine Gruppe des hämolytischen Anämie-Tests und eine normale Kontrollgruppe wurden als Referenzgruppen ausgewählt und mit den verbliebenen Gruppen verglichen. Diese zwei Rattengruppen wurden getötet und ihre Blutparameter bestimmt. Die anderen 6 Gruppen wurden nach dem Zufallsprinzip in drei Behandlungsgruppen mit Eisen-L-Threonat mit hoher, mittlerer bzw. niedriger Dosierung, zwei positive Kontrollgruppen mit Eisengluconat bzw. Eisenfumarat sowie eine Modellgruppe aufgeteilt. Am Ende von 12 und 18 Experimenttagen wurden 5 bzw. 10 Ratten jeder Gruppe getötet. Im Verlauf des Experiments wurde der Hämochrom-Wert in Intervallen von 6 Tagen ermittelt.

**[0048]** Dosierungen: Die drei Behandlungsgruppen mit Eisen-L-Threonat wurden in eine Hochdosisgruppe mit einer Menge an elementarem Eisen von 17,28 mg/kg, eine mittlere Dosisgruppe mit einer Menge an elementarem Eisen von 8,64 mg/kg und eine Niedrigdosisgruppe mit einer Menge an elementarem Eisen von 4,32 mg/kg aufgeteilt. Hierbei dienten die mit einer Menge an elementarem Eisen von 8,64 mg/kg (in Form von Eisengluconat bzw. Eisenfumarat) behandelten Gruppen als positive Kontrollgruppen. Die Gruppen mit Blutverlustanämie wurden während der Testperiode mit einer eisenarmen Diät und demineralisiertem Wasser gefüttert, während die normale Kontrollgruppe mit einer normalen Diät und demineralisiertem Wasser gefüttert wurde.

**[0049]** Test results: Der Grad der Anämie wurde sowohl vor der Generierung der Anämie-Modelle, als auch nach der Generierung der Anämie-Modelle (1, 2 oder 3 Wochen nach der Behandlung mit den Arzneimitteln) untersucht.

## (1) Ergebnisse der Modellstudie zur hämolytischen Anämie

Tabelle 2 Veränderung des Hämoglobinspiegels der Gruppen (g%) 2 Wochen nach der Gabe der Arzneimittel

Gruppen	vor der Anämie	nach der Anämie	1 Woche nach der Behandlung	2 Wochen nach der Behandlung
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	14,9 ±0,422	6,18 ±0,419	11,95±0,844	14,34±0,420
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	15,01 ±0,421	5,87±0,590	11,11±0,633	14,04±0,383
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	14,89±0,501	5,94±0,526	9,95±0,488	12,57±0,590
Eisengluconat-Gruppe	15,34±1,176	6,57±0,72	10,62±0,591	12,65±0,530
Modellgruppe	15,03±0,352	6,01±0,503	8,14±0,530	10,79±0,364
Normale Kontrollgruppe	14,60±0,302	14,23±0,434	14,33±0,526	14,21±0,354

Tabelle 3 Ergebnisse der Blutkörperchenzählungen (RBC,  $\times 10^{12}/L$ )

Gruppen	vor der Anämie	nach der Anämie	2 Wochen nach der Behandlung
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	7,185±0,292	2,310±0,248	5,663±0,236
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	7,238±0,181	2,163±0,422	5,376±0,273
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	8,290±0,188	3,370±0,193	4,863±0,136
Eisengluconat-Gruppe	7,215±0,212	2,188±0,201	5,011±0,337
Modellgruppe	8,180±0,277	3,323±0,384	3,647±0,293
Normale Kontrollgruppe	7,160±0,251	7,132±0,324	7,202±0,336

Tabelle 4 Ergebnisse der Blut-Granulophilozyten-Zählungen (%)

Gruppen	Berücksichtigte Zellen-Anzahl	vor der Anämie	nach der Anämie	2 Wochen nach der Behandlung
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	1000	1,193±0,093	94,80±1,183	6,11±1,375
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	1000	1,138±0,198	95,35±2,026	7,60±0,551
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	1000	1,298±0,147	95,475±1,575	9,35±1,089
Eisengluconat-Gruppe	1000	1,448±0,139	96,00±2,174	9,12±966
Modellgruppe	1000	1,135±0,256	97,85±1,790	19,21±3,063
Normale Kontrollgruppe	1000	1,602±0,154	1,734±0,253	1,932±0,387

**[0050]** Die in den Tabellen 2 bis 4 aufgezählten Ergebnisse zeigten, dass durch eine 2-wöchige Behandlung die Eigenschaften der Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC) sowie des Hämochrom-Wertes bei allen Gruppen mit Eisenergänzung in der Nahrung im Vergleich zu den Werten vor der Behandlung signifikant erhöht wurden und dass die Blut-Granulophilozyten-Anzahl im Vergleich zu der Anzahl vor der Behandlung erniedrigt war, während sie im Fall der hoch- und mittel dosierten Eisen-*L*-Threonat-Gruppen vergleichbar mit den Werten der normalen Kontrollgruppe war. Im Unterschied zu den behandelten Gruppen zeigte die Modellgruppe verständlicherweise relativ schwache Effekte hinsichtlich der Heilung der Anämie. Bei derselben Eisendosierung (8,64 mg/kg) zeigte Eisen-*L*-Threonat in der Behandlung der Anämien bedeutend bessere Effekte als Eisengluconat.

Tabelle 5: Menge des Gesamteisens im Blut sowie des Serum-Ferritins (SF)

Gruppe	Gesamteisengehalt des Blutes ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Serum-Ferritin ( $\text{mg}/\text{ml}$ )
Vor der Anämie	361,89 $\pm$ 20,841	157,36 $\pm$ 12,906
Nach der Anämie	178,81 $\pm$ 14,849	63,48 $\pm$ 10,704
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	326,95 $\pm$ 26,956	160,30 $\pm$ 11,620
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	301,89 $\pm$ 19,500	156,92 $\pm$ 16,641
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	283,53 $\pm$ 23,051	129,17 $\pm$ 10,479
Eisen-Gluconat- Gruppe	286,04 $\pm$ 26,797	134,28 $\pm$ 18,872
Modellgruppe	198,11 $\pm$ 17,122	91,33 $\pm$ 6,322
Normale Kontrollgruppe	333,11 $\pm$ 17,35	156,51 $\pm$ 12,10

**[0051]** Die in Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass im Vergleich zur Modellgruppe die Gesamtmenge des Eisens im Blut sowie des Serum-Ferritins bei allen mit Arzneimitteln behandelten Gruppen signifikant erhöht waren ( $P < 0,01$ ), während die Änderungen dieser Merkmale bei den mit Eisen-*L*-Threonat behandelten Gruppen, außer bei der niedrig dosierten Gruppe, besser waren als bei der mit Eisengluconat behandelten Gruppe.

(2) Ergebnisse der Modellstudie für eine ernährungsbedingte Eisenmangelanämie

**[0052]** Der Hämoglobinerschöpfungstest bei Ratten wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt, und die Ergebnisse wurden in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Hämoglobinerschöpfungstest bei Ratten, die mit einer Eisenmangeldiät ernährt wurden, n = 10 (g%)

Gruppen	7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
Hoch dosierte Gruppe auf Eisenmangeldiät	11,19±0,41	10,28±0,48	9,03±0,75	7,82±0,37
Mittel dosierte Gruppe auf Eisenmangeldiät	11,33±0,38	10,14±0,57	9,06±0,83	7,51±0,57
Niedrig dosierte Gruppe auf Eisenmangeldiät	11,18±0,41	10,82±0,35	8,45±0,53	7,36±0,58
Bekanntes Arzneimittel und Eisenmangeldiät	10,87±0,45	10,44±0,48	8,64±0,39	7,34±0,46
Kontrollgruppe auf Eisenmangeldiät	11,35±0,60	10,08±0,69	8,74±0,73	7,53±0,60
Kontrollgruppe auf normaler Diät	11,60±0,46	12,30±0,42	12,85±0,57	13,76±0,30

Tabelle 7: Ergebnisse der Zählungen der roten Blutkörperchen (RBC) und der Blut-Granulophilozyten (GPC) sowie der Messungen des Bluteisengehalts und des Serum-Ferritin(SF)-Gehalt im Hämoglobinerschöpfungstest:

Gruppen	RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	GPC (%)	Blut-Eisen ( $\mu g/ml$ )	SF (ng/ml)
Normale Diät	6,564±0,46	3,41±0,32	313,11±7,35	156,51±12,10
6. Gruppe (Eisenmangeldiät)	2,82±0,41	11,96±0,88	168,63±23,21	79,90±10,72

Tabelle 8: Veränderungen des Hämochrom-Gehalts bei Ratten mit ernährungsbedingter Eisenmangelanämie nach der Behandlung n = 10 g%

Gruppen	7 Tage	14 Tage	21 Tage
Normale Kontrollgruppe	13,70±0,32**	13,840,22**	13,98±0,39**
Modellgruppe	7,92±0,61	7,77±0,44	8,31±0,51
Hohe Dosierung mit Eisen-L-Threonat	10,52±0,49*	12,23±0,45**	13,67±0,41**
Mittlere Dosierung mit Eisen-L-Threonat	10,12±0,66*	11,46±0,36*	12,98±0,38**
Niedrige Dosierung mit Eisen-L-Threonat	8,74±0,44	10,76±0,37*	11,87±0,50**
Eisengluconat	9,08±0,65	11,66±0,54*	12,40±0,58**

\*P < 0,05, \*\*P < 0,01 im Vergleich zur Modellgruppe

Tabelle 9: Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC) und der Granulophilozyten (GPC) sowie der Gehalt an Serum-Ferritin (SF) und Blut-Eisen bei Ratten mit ernährungsbedingter Eisenmangelanämie nach 21-tägiger Behandlung, n = 10

Gruppen	RBC ( $\times 10^{12}/\text{L}$ )	GPC (%)	Blut-Eisen ( $\mu\text{ml}$ )	SF (ng/ml)
Normale Kontrollgruppe	7,197±0,28	2,30±0,35	308,54±17,38	161,62±7,04
Modellgruppe	3,273±0,23	12,30±0,87	200,31±28,78	74,35±9,93
Hohe Dosierung mit Eisen-L-Threonat	6,564±0,65	2,29±0,54	304,37±14,12	156,00±9,99
Mittlere Dosierung mit Eisen-L-Threonat	6,116±0,21	2,63±0,76	302,02±18,92	139,23±10,22
Niedrige Dosierung mit Eisen-L-Threonat	5,957±0,44	4,18±1,12	290,78±20,13	119,84±8,96
Eisengluconat	6,286±0,36	2,36±0,79	297,50±14,83	135,91±14.01

**[0053]** Die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich der Hämochrom-Gehalt bei IDA-Ratten (solcher mit ernährungsbedingtem Eisenmangel), die mit Eisen-L-Threonat behandelt wurden, nach dem Ende einer 7-tägigen Behandlung zu erhöhen begann und im Vergleich zur normalen Kontrollgruppe fast normale Werte erreichte.

**[0054]** Die Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC), der Gesamt-Blut-Eisen-Gehalt und der Serum-Ferritin-(SF)-Gehalt erhöhten sich bei den mit Arzneimitteln behandelten Gruppen (siehe: Tabelle 9) nennenswert, während die Blut-Granulophilozyten-Zahl dieser Gruppen im Vergleich zur Modellgruppe abnahm. Des weiteren veränderten sich diese Werte im Vergleich zum bekannten Arzneimittel Eisengluconat bei Verwendung von Eisen-L-Threonat weitaus besser (bei Gabe äquivalenter Mengen elementaren Eisens), was nahe legt, dass Eisen-L-Threonat eine bessere Wirksamkeit bei der Behandlung ernährungsbedingter Eisenmangelanämien (IDA) zeigt.

## (3) Ergebnisse der Modellstudie zur Blutverlustanämie

Tabelle 10: Blut-Hämochrom-Gehalt bei Ratten mit Blutverlustanämie, n = 10

Gruppen	Vor der Behandlung	6 Tage nach der Behandlung	12 Tage nach der Behandlung	18 Tage nach der Behandlung
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	7,88±0,28	8,70±0,43	11,01±0,34	12,40±0,63
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	7,40±0,54	8,35±0,21	10,67±0,37	12,14±0,27
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	7,61±0,53	8,00±0,42	10,20±0,49	11,26±0,79
Eisengluconat	7,50±0,76	7,95±0,30	10,50±0,61	11,80±0,63
Eisenfumarat	7,43±0,85	7,80±0,24	10,12±0,52	11,84±0,45
Modellgruppe	7,51±0,63	7,42±0,26	9,03±0,56	10,39±0,46

Tabelle 11: Veränderungen der Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC) und der Granulophilizyten (GPC) nach der Behandlung, n = 10

Gruppen	RBC ( $\times 10^{12}/L$ )		GPC (%)	
	12 Tage	18 Tage	12 Tage	18 Tage
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	5,67±0,313	5,84±0,199	10,04±0,97	7,84±0,871
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	4,810±0,178	5,210,194	12,58±1,54	8,440,753
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	4,242±0,128	4,76±0,228	13,12±1,84	8,91±1,277
Eisengluconat-Gruppe	4,488±0,271	5,14±0,342	12,66±2,04	9,04±0,793
Eisenfumarat-Gruppe	4,200±0,271	4,94±0,264	13,80±1,37	9,99±0,879
Modellgruppe	4,046±0,147	4,37±0,310	16,50±1,47	11,58±1,108

Tabelle 12: Veränderungen des Gesamt-Blut-Eisengehalts und des Serum-Ferritins (SF) nach der Behandlung, n = 10

Gruppen	Gesamt-Blut-Eisengehalt ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		SF (ng/ml)	
	12 Tage	18 Tage	12 Tage	18 Tage
Hohe Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	5,567 $\pm$ 0,490	8,973 $\pm$ 0,952	92,100 $\pm$ 2,071	160,792 $\pm$ 5,162
Mittlere Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	5,304 $\pm$ 0,594	8,8790,890	82,392 $\pm$ 1,432	152,765 $\pm$ 4,556
Niedrige Dosierung mit Eisen- <i>L</i> -Threonat	4,508 $\pm$ 0,235	6,384 $\pm$ 1,188	72,642 $\pm$ 4,978	124,643 $\pm$ 7,734
Eisengluconat-Gruppe	5,450 $\pm$ 0,376	7,027 $\pm$ 0,799	80,792 $\pm$ 0,722	148,840 $\pm$ 8,860
Eisenfumarat-Gruppe	4,583 $\pm$ 0,794	6,446 $\pm$ 0,745	76,412 $\pm$ 4,725	131,157 $\pm$ 6,525
Modellgruppe	3,358 $\pm$ 0,286	5,077 $\pm$ 0,937	54,182 $\pm$ 2,903	92,445 $\pm$ 9,424

**[0055]** Die in den Tabellen 10-12 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass bei identischer Eisendosierung Eisen-*L*-Threonat bessere Effekte bei der Behandlung einer Eisenmangelanämie zeigt als Eisengluconat oder Eisenfumarat.

### Experiment 3

#### Klinische Studie von Eisen-*L*-Threonat bei der Behandlung von Kindern mit Eisenmangelanämie

Arzneimittel: Eisen-*L*-Threonat-Tabletten, weiss, 7,5mg Eisen und 30 mg Vitamin C in jeder Tablette (zur Verfügung gestellt vom Beijing Juneng Asia-Pacific Life Sience Research Center).

Probanden: 30 Schulkinder im Alter zwischen 8 bis 13 Jahren aus Haerbin City/China.

Methoden: Blutproben mit einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  wurden vom Ohr sowie von 5 ml aus der Armvene jedes Patienten für die weitere Messung entnommen.

(1) Messung der RBC: die 10  $\mu\text{l}$  Blutproben wurden auf 2 ml verdünnt und die Mischung wurde geschüttelt. Ein Tropfen dieser Suspension wurde mit Hilfe eines Glasstabes in eine Zähl-Küvette gegeben. Die Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC) wurde mit Hilfe eines Mikroskops durch Aufbringen der Zählplatte auf den Mikrostäben vorgenommen.

(2) Bestimmung des Hämoglobin-(Hb)-Gehalts: Zur Bestimmung des Hb wurde die Eisencyanidmethode verwendet. 10  $\mu\text{l}$  Blutproben wurden zu 5 ml sauren Lösungsmittels gegeben, um durch Schütteln eine vollständig vermengte Mischung zu erhalten. Der Hb-Wert wurde mittels eines SH-Hämoglobinmeters, hergestellt durch die Huauang Instrument Company/Jianshu Province, ermittelt. Eisencyanid wurde vom Medical Examination Institute of Shanghai beschafft.

(3) Messung von FEP: 0,05 ml einer Gesamt-Blutprobe, die mittels Heparin antikoaguliert wurde, wurden mit 3,5 ml saurem, wasserfreiem Ethylalkohol verdünnt, die Mischung für 5 Minuten geschüttelt und dann bei einer Geschwindigkeit von 3000 r/min zentrifugiert. Das Zentrifugat der Mischung wurde für die Messung mit der fluorometrischen Methode verwendet (400 nm beim anregenden, optischen Filter und 600 nm für den emittierenden, optischen Filter).

Gemäß der unten angegebenen Formel kann somit der FEB-Wert berechnet werden.

$$FEP(\mu\text{g/L RBC}) = 35 \times \frac{Fu}{PCV},$$

wobei Fu und PCV den Fluoreszenz bzw. den Hämatokrit-Wert angeben.

(4) Bestimmung von SF: die SF-Reagenzienbox wurde von der Tianjing Jiuding Biotechnology Company beschafft und ein SM-682 Radioimmun-γ-zähler wurde von der Rihuan Instrument Company, Nuclearmedical Institute of Shanghai hergestellt.

**[0056]** Von einer zentrifugierten 2 ml Blutprobe wurde die obenstehende Lösung zur Messung des SF-Wertes mit Hilfe der Methode des Radioimmun-Konkurrenz-Inhibition Programms („radio-imune competition-inhibition program“) verwendet.

Testschritte:

**[0057]** (1) Bestimmung des Grades der Anämien: Gemäß den von der WHO und von China gesetzten Standards zur Bestimmung der Vorbeugung und Behandlung von Eisenmangelanämien ( $Hb < 120\text{g/L}$ ,  $FEP < 500\mu\text{g/L}$ ,  $SF < 16\mu\text{g/L}$  und  $RBC < 4 \text{ Millionen/mm}^3$ ) wurden mit Hilfe von klinischen Untersuchungen von 300 Jungen und 274 Mädchen 39 männliche und 22 weibliche Kinder als Eisenmangelanämiepatienten ( $Hb < 120\text{g/l}$ ) identifiziert.

**[0058]** Unter diesen 62 Eisenmangelanämiepatienten wurden nach dem Zufallsprinzip 30 Kinder zur Behandlung mit Eisen-L-Threonat ausgewählt.

**[0059]** 30 andere Kinder mit einer Eisenmangelanämie von einer anderen Schule wurden mit denselben Diagnose-Standards ausgewählt und bildeten die Kontrollgruppe.

**[0060]** (2) Wirksamkeitstests: Kinder mit Eisenmangelanämie mochten normalerweise keine körperliche Aktivität, zeigten Konzentrations- und Aufmerksamkeitsschwierigkeiten und waren apathisch, schlafelig, hatten nur wenig Appetit und eine blasse Gesichtsfarbe.

**[0061]** Die behandelte Gruppe und die Kontrollgruppe wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet und es wurde bezüglich der körperlichen Aktivität und der Ernährung der Kinder nicht eingegriffen.

**[0062]** (3) Dosierungen: Jedes Kind der Behandlungsgruppe wurde zweimal täglich mit Eisen-L-Threonat-Tabletten behandelt, bei jeder Behandlung eine einzelne Tablette. Während die normale Kontrollgruppe mit einem Placebo mit derselben Methode behandelt wurde.

Ergebnisse:

Tabelle 13: Veränderungen von Hb und FEP vor und nach der Behandlung

Gruppen	Vor der Behandlung ( $X \pm SD$ )		Nach der Behandlung ( $X \pm SD$ )	
	Hb (g/L)	FEP ( $\mu\text{g/L}$ )	Hb (g/L)	FEP ( $\mu\text{g/L}$ )
Behandelte Gruppe	104,8±6,1	669,1±72,0	120,4±11,2	445,1±80,9
Kontrollgruppe	102,8±6,7	754,5±76,4	103,6±9,1	748,9±85,5

Tabelle 14: Veränderungen der Serum-Ferritin-(SF)-Konzentration und der Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC) vor und nach der Behandlung

Gruppen	Vor der Behandlung (X±SD)		Nach der Behandlung (X±SD)	
	SF (µg/L)	RBC (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	SF (µg/L)	RBC (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )
Behandelte Gruppe	12,45±1,50	387±6,67	17,01±1,99	401,5±12,4
Kontrollgruppe	12,0±0,9	377±9,7	12,7±1,5	380±8,8

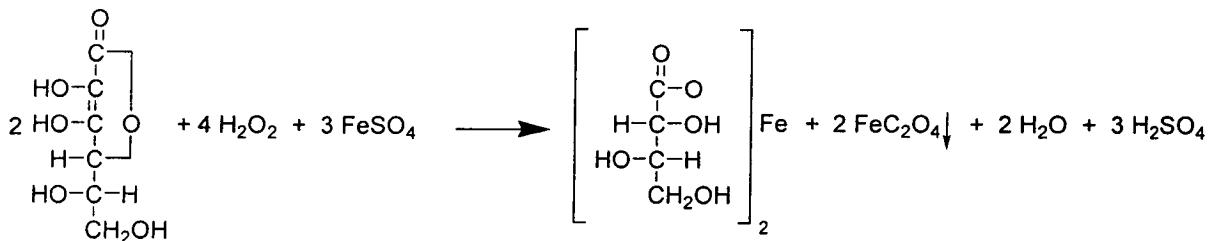
**[0063]** Die in den Tabellen 13 und 14 gelisteten Ergebnisse bezüglich der Hb-, SF- und RBC-Werte, die vor bzw. nach der Behandlung aufgenommen wurden, zeigen, dass die Veränderung jedes Parameters im Fall der behandelten Gruppe signifikante Veränderungen ( $P < 0,01$ ) zeigten. Zudem sind die Veränderungen dieser Parameter bei der behandelten Gruppe nach einer 30-tägigen Behandlung mit Eisen-L-Threonat signifikant besser als bei der Kontrollgruppe ( $P < 0,01$ ).

Tabelle 15: Wirksamkeit der Nahrungsergänzung mit Eisen-L-Threonat

Gruppen	Hb>120g/L und $\Delta$ Hb>5g/L (%)	$\Delta$ Hb>10g/L (%)	Keine Wirksamkeit (%)	Total (%)
Behandelte Gruppe	17 (56,7%)	7 (23,3%)	6 (20,0%)	30 (100%)
Kontrollgruppe	0 (0%)	0 (0%)	30 (100,0%)	0 (100,0%)

**[0064]** Damit lag die Effektivität von Eisen-L-Threonat bei der Verbesserung von Eisenmangelanämien bei Kindern bei über 80%.

## Beispiel 1. Herstellung von Eisen-L-Threonat



**[0065]** 0,1 mol Vitamin C wurden in 50 ml 2-fach destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde mittels 0,1 mol/L Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) auf einen schwach basischen pH-Wert (pH = 7-9) eingestellt, und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mit einer Konzentration von 30% wurden tropfenweise unter Rühren hinzugegeben. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei etwa 10°C gehalten, dann wurde Aktivkohle hinzugegeben und die Lösung auf 80°C gebracht, um überschüssiges Wasserstoffperoxid zu zersetzen. Nachdem die Bildung von Sauerstoff aufgehört hatte, wurde die Lösung heiß filtriert und das Filtrat auf Raumtemperatur für die weitere Verarbeitung abgekühlt. Unter einer Schutzgasatmosphäre, wie etwa einer Stickstoff( $\text{N}_2$ )-atmosphäre, wurden 0,15 mol Eisenulfat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) vorsichtig in kleinen Portionen zum Filtrat gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für zwei Stunden gerührt, filtriert und das Filtrat unter reduziertem Druck konzentriert. Die blaß-grünen Kristalle, die sich im Laufe mehrer Stunden bildeten, wurden durch Filtration separiert und schließlich zweifach aus destilliertem Wasser umkristallisiert. Das so erhaltene Produkt war Eisen-L-Threonat mit zwei äquivalenten Kristallwasser,  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_{10}\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Anal. Calc. für  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_{10}\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : C 26,52, H 5,01, Fe 15,42. gemessen: C 26,66, H 4,19, Fe 15,23.

**[0066]** Durch Erwärmung von  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_{10}\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  bei 50°C und reduziertem Druck (10mmHg) wurden Ei-

sen-L-Threonat mit einem Äquivalent Kristallwasser erhalten.

Anal.Calc. für  $C_8H_{14}O_{10}Fe \cdot 2H_2O$ : C 27,91, H 4,69, Fe 16,23. gemessen: C 27,66, H 4,94, Fe 16,53.

**[0067]** Wasserfreies Eisen-L-Threonat wurde durch Trocknung von  $Fe(C_4H_7O_5)_2 \cdot H_2O$  bei einem Druck von 5 mmHg und einer Temperatur von 120°C erhalten.

Anal.Calc. für  $C_8H_{14}O_{10}Fe$ : C 29,45, H 4,33, Fe 17,13. gemessen: C 29,11, H 4,39, Fe 17,60.

## Beispiel 2

### Zusammensetzung der Eisen-L-Threonat-Tabletten

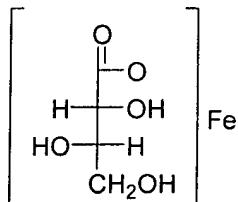
Formulierung für 1000 Tabletten:

Eisen-L-Threonat	48,5g
Vitamin C	30 g
Mannitol	180 g
Stärke	80 g
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge
Aroma	in geeigneter Menge

**[0068]** Die oben genannten Komponenten wurden granuliert, getrocknet und verpresst, um so 1000 Eisen-L-Threonat-Tabletten zu erhalten.

## Patentansprüche

1. Eisen-L-Threonat der Formel (I) und dessen Hydrate.



(I)

2. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine wirksame Menge an Eisen-L-Threonat oder eines seiner Hydrate und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

3. Eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das Eisen-L-Threonat in einer Menge von ungefähr 10 bis 90 Gew.-% bezogen auf die Zusammensetzung vorliegt.

4. Eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das Eisen-L-Threonat in einer Menge von ungefähr 30 bis 80 Gew.-% bezogen auf die Zusammensetzung vorliegt.

5. Eine pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, welche zusätzlich Vitamin C und/oder Vitamin B12 umfasst.

6. Ein Verfahren zur Herstellung von Eisen-L-Threonat, umfassend die Schritte, dass

a) L-Threonsäure einer Neutralisationsreaktion mit einem anorganischen Eisensalz, -oxid oder -hydroxid unterworfen wird; oder

b) Calcium-L-Threonat mit einem anorganischen Eisensalz derart umgesetzt wird, dass Eisen-L-Threonat erhalten wird.

7. Eisen-L-Threonat oder eines seiner Hydrate zur Verwendung als Medikament.

8. Eisen-L-Threonat oder eines seiner Hydrate zur Verwendung der Behandlung der Anämie.
9. Eisen-L-Threonat oder eines seiner Hydrate zur Verwendung der Behandlung von ernährungsbedingter Eisenmangelanämie, Blutungsanämie (hämorrhagische Anämie) oder hämolytischer Anämie.
10. Verwendung von Eisen-L-Threonat oder eines seiner Hydrate für die Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung der Anämie.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen