



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1755/85

(22) Indleveringsdag: 18 apr 1985

(41) Alm. tilgængelig: 20 okt 1985

(44) Fremlagt: 13 maj 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 apr 1984 GB 8410289

(51) Int.Cl.⁵

C 07 D 213/69

C 07 D 309/40

A 61 K 31/35

A 61 K 31/40

A 61 K 31/555

(71) Ansøger: *NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION; 101 Newington Causeway; London SE1 6BU, GB

(72) Opfinder: Brian Albert *Callingham; GB, Robert Charles *Hider; GB, George *Kontoghiorghes; GB, Michael Arthur *Stockham;

GB

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Ferrikomplekser, deres anvendelse samt farmaceutiske præparater indeholdende disse

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 1352/83 (Pat. nr. 157856)

(57) Sammendrag:

1755-85

Jernkomplekser omfattende en ferri-kation i kombination med mindst to forskellige ligander, hvoraf mindst én er tilvejebragt af en forbindelse i form af:

(1) 3-hydroxy-4-pyron, hvori eventuelt et eller flere af de til ringcarbonatomerne bundne hydrogenatomer er erstattet med en alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbonatomer, eller

(2) 3-hydroxypyrid-2-on eller 3-hydroxypyrid-4-on, i hvilke hydrogenatomet bundet til nitrogenatomet er erstattet af en alifatisk acylgruppe, en alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbonatomer eller én med én eller flere substituer i form af alifatisk acyl, alkoxy, alifatisk amid, alifatisk ester, halogen og hydroxy-substitueret alifatisk carbonhydridgruppe, og, om ønsket, i hvilke et eller flere af de til ringcarbonatomerne bundne hydrogenatomer er erstattet med én af nævnte substituer, en alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbonatomer eller én med alkoxy, alifatisk ester, halogen eller hydroxy substitueret alifatisk carbonhydridgruppe,

idet ladningen på ferri-kationen neutraliseres af ladningen på de dertil covalent bundne ligander, fremstilles. Jernkomplekserne er især egnede til behandling af anæmi som følge af jernmangel.

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte ferrikomplekser, deres anvendelse samt farmaceutiske præparater indeholdende disse. Ferrikomplekserne ifølge opfindelsen er nyttige ved behandlingen af anæmi som følge af jernmangel.

- 5 En tilstrækkelig tilførelse af jern til legemet er et essentielt krav for væksthos både menneske og dyr. Skønt der normalt er en rigelig mængde jern i kosten, er niveauet for absorption af jern fra føden generelt lavt, således at tilførelsen af jern til legemet let kan blive kritisk under forskellige betingelser. Anæmi som følge af jern-
- 10 mangel forekommer ofte under graviditet og kan også være et problem hos nyfødte, specielt hos visse dyrearter såsom grisen. Ydermere er der ved visse patologiske tilstande en dårlig fordeling af jern i legemet, hvilket fører til en tilstand af kronisk anæmi. Dette observeres ved kroniske lidelser såsom rheumatoid arthritis, visse hæmolytiske sygdomme
- 15 og cancer.

Skønt en lang række jernforbindelser allerede er tilgængelige til behandling af anæmi som følge af jernmangel, er legemets jernoptagelsesgrad fra disse forbindelser ofte ganske lav, hvilket nødvendiggør administrering af relativt høje doseringsniveauer for forbindelserne.

- 20 Administrering af høje doser dårligt absorberede jernkomplekser kan forårsage siderosis i tarmvæggen og forskellige bivirkninger såsom kvalme, opkastning, forstoppelse og stærkt ildelugtende fækalier.

- I de danske patentansøgninger nr. 1352/83, 5513/83 og 1659/84 er beskrevet jernkomplekser af forskellige 3-hydroxypyrid-2-oner, 3-
- 25 hydroxypyrid-4-oner og 3-hydroxy-4-pyroner, der har vist sig at være af særlig værdi til anvendelse i relativt lave doseringsniveauer ved behandlingen af anæmi som følge af jernmangel. Det har nu vist sig, at visse fordele, der vil blive omtalt i det følgende, opnås ved anvendelse af komplekser, som ikke er beskrevet i disse tidligere ansøgninger,
- 30 hvilke komplekser indeholder én eller flere hydroxypyridon- eller hydroxypyronligander, men hvori de i komplekset tilstedeværende ligander ikke er identiske.

- Ferrikomplekset ifølge den foreliggende opfindelse er ejendommeligt ved, at det er et neutralt ferrikompleks, hvor en ferriion er bundet til
- 35 tre monobasiske bidentatligander, hvor den første og den anden ligand, som er identiske, tilvejebringes af en forbindelse udvalgt fra

(1) 3-hydroxy-4-pyron og 3-hydroxy-4-pyroner, hvori et eller flere af hydrogenatomerne bundet til ringcarbonatomer er erstattet med en

alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbonatomer, og

(2) 3-hydroxypyrid-2-oner og 3-hydroxypyrid-4-oner, i hvilke hydrogenatomet bundet til nitrogenatomet og om ønsket et eller flere af hydrogenatomerne bundet til ringcarbonatomer er erstattet af en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-6 carbonatomer og den tredje ligand, som
5 er forskellig fra de andre to ligander tilvejebringes af en forbindelse udvalgt blandt forbindelser af type (1) og (2), og

(3) gluconsyre, ascorbinsyre, glycin og leucin.

Det bemærkes, at en egenskab ved jernkomplekserne ifølge opfindelsen er, at de er neutrale, dvs. der er en indre ladningsbalance imellem
10 ferri-kationen og de dertil covalent bundne ligander, således at der ikke er noget behov for en eller flere yderligere ikke-covalent bundne anioner såsom chlorid til at opveje ladningen på ferri-kationen.

Hydroxypyridon- og hydroxypyronliganderne er hver især bidentate og
15 monobasiske (idet liganden indeholder en $-O^-$ i stedet for gruppen $-OH$, der er til stede i selve forbindelsen), hvilket også er tilfældet for liganderne tilvejebragt af gluconsyre, ascorbinsyre, glycin og leucin.

Det er imidlertid åbenbart, at 3:1 ligand:jernkomplekserne ifølge opfindelsen inden for de angivne grænser kan indeholde et antal forskellige kombinationer af de ovenfor beskrevne ligandtyper (1) til (3).
20 Således kan alle liganderne være af type (1) eller af type (2), skønt af forskellig art inden for disse typer, eller liganderne kan være en blanding af typerne (1) og (2), en blanding af typerne (1) og (3) eller blanding af typerne (2) og (3). Mest bekvemt indeholder komplekset tre
25 ligander af type (2) eller især af type (1), hvilke ligander stammer fra to forskellige forbindelser, eller komplekset indeholder to identiske ligander af type (2) eller især af type (1) sammen med en tredje ligand, som enten hhv. er af type (1) eller (2) eller mindre foretrukket af type (3).

30 Både de metalfri ligand-frembringende forbindelsers og jernkompleksets evne til at gennemtrænge membraner er vigtig i forbindelse med behandlingen af anæmi som følge af jernmangel og det er også ønskværdigt, at både forbindelser og komplekset i nogen grad er vandopløselige. En god indikation af en ligand-frembringende forbindelses og et jern-
35 kompleks' fysiske egenskaber i denne henseende tilvejebringes ved bestemmelse af værdien for fordelingskoefficienten (K_{part}), der opnås ved fordeling imellem n-octanol og trishydrochlorid (20 mM, pH 7,4; tris betegner 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) ved 20°C og udtrykkes

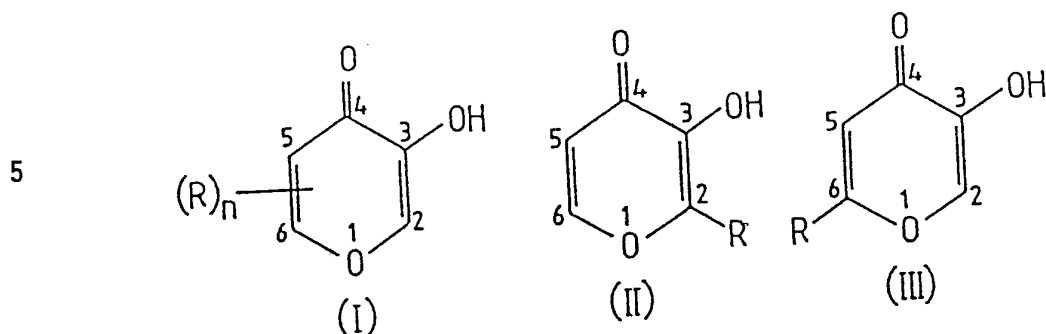
som forholdet (koncentration i organisk fase)/(koncentration i vandig fase). Foretrukne komplekser udviser en K_{part} -værdi for hver ligand-frembringende forbindelse på over 0,02 eller 0,05, men mindre end 3,0, især over 0,2, men mindre end 1,0, sammen med en K_{part} -værdi for 3:1 jern(III)-komplekset på over 0,02, men mindre end 6,0, især over 0,1 eller 0,2, men mindre end 1,0. Med hensyn til eksempler på måling af fordelingskoefficienter for metalfri hydroxypyridoner og hydroxypyroner samt for de tilsvarende jernkomplekser indeholdende de pågældende ligander henvises til eksempel 1 i hver af de tre ovennævnte GB- og DK-ansøgninger. I lyset af nævnte fordelingskoefficienter omhandles nedenfor de foretrukne ligandtyper (1) til (3), der kan finde anvendelse i komplekser ifølge den foreliggende opfindelse.

Hydroxypyronligander af type (1) er særligt værdifulde og komplekserne ifølge opfindelsen kan hensigtsmæssigt indeholde mindst én ligand af denne type. De substituerede 3-hydroxy-4-pyroner kan indeholde mere end én type alifatisk carbonhydridgruppe, men dette er ikke ofte forekommende og rent faktisk foretrækkes substitution med to snarere end med tre og især substitution med kun én type alifatisk carbonhydridgruppe. Betegnelsen alifatisk carbonhydridgruppe omfatter i det foreliggende både acycliske og cycliske grupper, som kan være umættede eller mættede, idet de acycliske grupper er forgrenede og især uforgrenede. Grupper med 1 til 4 carbonatomer og især med 1 til 3 carbonatomer er af største interesse. Mættede alifatiske carbonhydridgrupper fortrækkes, idet disse enten er cycloalkylgrupper, såsom cyclopropyl og især cyclohexyl, eller især alkylgrupper såsom n-propyl og isopropyl og specielt ethyl og methyl. Substitution ved 2- eller 6-stillingen er af særlig interesse, skønt når ringen er substitueret med større alifatiske carbonhydridgrupper, kan der være en fordel ved at undgå substitution på et carbonatom, der sidder i α -stilling, til

$$\begin{array}{c} \text{-C-C<} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$$

-systemet. Dette system er involveret i kompleksdannelsen med jern og naboskabet af én af de større alifatiske carbonhydridgrupper kan føre til steriske virkninger, der hindrer kompleksdannelse.

Foretrukne hydroxypyroner til tilvejebringelse af ligander, der er til stede i komplekser ifølge opfindelsen, har formel (I), idet specifikke hydroxypyroner af særlig interesse har formel (II) og (III):

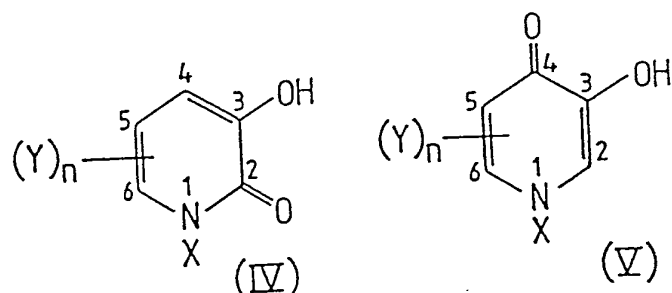


10

hvor R betegner en alkylgruppe, fx. methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl eller butyl, og n er 0, 1, 2 eller 3 (idet ringen ikke er substitueret med en alkylgruppe, når n er 0). Blandt disse forbindelser er 3-hydroxy-2-methyl-4-pyron (maltol; II, R = CH₃) af største interesse, mens 3-hydroxy-4-pyron (pyromeconsyre; I, n = 0), 3-hydroxy-6-methyl-4-pyron (isomaltol; III, R = CH₃) og specielt 2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron (ethylpyromeconsyre; II, R = C₂H₅) også har speciel interesse.

Med hensyn til hydroxypyridonliganderne af type (2) stammer disse fra hydroxypyridoner af den type, der omhandles i dansk patentansøgning nr. 1352/83. Hydroxypyridoner, der tilvejebringer ligander, som kan anvendes i komplekser ifølge den foreliggende opfindelse, har formel (IV) og (V)

25



30

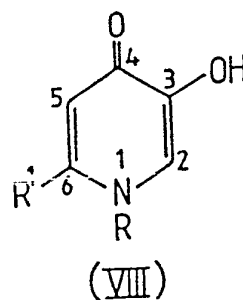
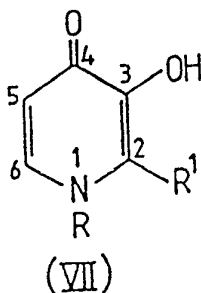
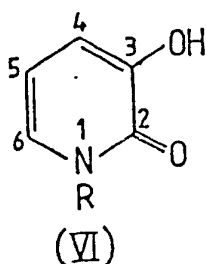
hvor X og Y er alifatiske carbonhydridgrupper med 1-6 carbonatomer, og n er 0, 1, 2 eller 3, idet 3-hydroxypyrid-2-onerne i almindelighed er af noget større interesse end 3-hydroxypyrid-4-onerne.

35 Præferencer med hensyn til art og stilling af substituentgrupperne i hydroxypyridonerne stemmer stort set overens med det i de tidligere DK-ansøgninger anførte. Således svarer præferencerne blandt de alifatiske carbonhydridgrupper i disse hydroxypyridoner stort set til det i

forbindelse med hydroxypyronerne anførte, idet methylgrupper hensigtsmæssigt anvendes til substitution på ringcarbonatomer, idet dog større alkylgrupper også er af særlig interesse til substitution på ringnitrogenatomer. Substituering på ringcarbonatomer med én snarere end to eller
 5 tre alifatiske carbonhydridgrupper er af særlig interesse i tilfælde af 3-hydroxypyrid-4-oner, fx. i 6- eller især i 2-stillingen, mens 3-hydroxypyrid-2-oner oftere kan anvendes uden yderligere alifatiske carbonhydridsubstituenter på ringcarbonatomerne. Hydroxypyridoner af særlig interesse har formel (VI), (VII) og (VIII)

10

15



hvor R betegner en alkylgruppe, fx. methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl
 20 eller butyl, og R¹ betegner hydrogen eller især en alkylgruppe som fx. methyl. Blandt sådanne forbindelser er 1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on, 3-hydroxy-1-propylpyrid-2-on, 3-hydroxy-1-(1-methylethyl)-pyrid-2-on, 1-butyl-3-hydroxypyrid-2-on, 1-ethyl-2-methyl-3-hydroxypyrid-4-on, 2-methyl-1-propyl-3-hydroxypyrid-4-on, 3-hydroxy-2-methyl-1-(1-methyl-
 25 ethyl)-pyrid-4-on og 1-butyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-on af særlig interesse, idet 3-hydroxypyrid-2-oner såsom 1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on specielt foretrækkes.

Med hensyn til ligander af type (3) er gluconsyre og ascorbinsyre af interesse ved tilvejebringelse af sådanne ligander, mens glycin er af
 30 mindre interesse end leucin.

Eksempler på specifikke ferrikomplekser ifølge opfindelsen er (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on)₂ (1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on) jern (III), (maltol)₂ (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on) jern(III), (maltol)₂ (ascorbinsyre) jern(III), (maltol)₂ (gluconsyre) jern(III) og især (maltol)₂
 35 (ethylpyromeconsyre) jern(III) og (ethylpyromeconsyre)₂ maltol jern(III). Det vil kunne forstås, at betegnelsen "maltol" anvendes i disse kompleksers navne til angivelse af liganden afledt af maltol og tilsvarende for andre ligander, idet denne anvendelse vil blive gennemført

overalt i det følgende.

Ferrikomplekserne fremstilles passende ved omsætning af en blanding af forbindelserne, der tilvejebringer liganderne, og ferri-ioner, idet sidstnævnte hensigtsmæssigt opnås fra et jernsalt, især et
5 ferri-halogenid og ferri-chlorid. Omsætningen udføres passende i et egnet fælles opløsningsmiddel og vand kan anvendes til dette formål. Om ønsket kan imidlertid en vandig/organisk opløsningsmiddelblanding eller et organisk opløsningsmiddel som fx. ethanol, methanol eller chloroform samt indbyrdes blandinger af disse opløsningsmidler og/eller, hvor dette
10 er hensigtsmæssigt, med vand, anvendes. I særdeleshed kan methanol eller specielt ethanol anvendes, hvor det ønskes at fremkalde separering af mindst en større del af et biprodukt såsom natriumchlorid ved udfældning, mens ferrikomplekset bibeholdes i opløsning.

Det opnåede produkts beskaffenhed vil til dels afhænge af de molære
15 forhold mellem de forskellige reaktanter, men også af reaktionsmediets pH-værdi. Til fremstilling af ferri-komplekserne indeholdende et 3:1 mol-forhold af ligand:jern(III) blandes således de ligand-tilvejebringende forbindelser og ferri-saltet i opløsning i et 3:1 mol-forhold og pH-værdien indstilles til en værdi i området 6 til 9, fx. 7 eller 8.
20 Skulle et tilsvarende overskud forbindelser:jern blive anvendt uden regulering af den lave pH-værdi, der fremkommer ved sammenblanding af forbindelserne og et ferrisalt såsom ferri-chlorid, ville istedet opnås en blanding af 2:1 og 1:1 komplekser. Indstilling af pH-værdien kan passende foretages ved tilsætning af natriumcarbonat som omhandlet i
25 eksempel 1 nedenfor. Et muligt alternativ, som er af særlig interesse ved fremstilling af ferrikomplekserne i charger på 20 g eller mere, er imidlertid at anvende en hydroxidbase såsom natrium- eller ammoniumhydroxid. Ved anvendelse af en hydroxidbase kan omsætningen passende udføres i et opløsningsmiddel i form af 4:1 vol./vol. ethanol:vand og
30 pH-værdien indstilles ved tilsætning af en 2 molær vandig opløsning af basen. Det er åbenbart, at nærværelsen af en mængde vand i reaktionsblandingen vil føre til tilbageholdelse af et biprodukt i ferrikomplekset ved afdampning af opløsningsmidlet (et chlorid, hvor jernsaltet er ferri-chlorid). Imidlertid kan biproduktet om ønsket fjernes ved
35 metoder såsom krystallisering fra et passende opløsningsmiddelssystem eller sublimering i det særlige tilfælde, hvor ammoniumchlorid forefindes.

De individuelle ligand-tilvejebringende forbindelser kan passende

anvendes i et 2:1 molært forhold sammen med et 1 molært forhold af ferri-saltet. Det vil imidlertid være åbenbart, at anvendelsen af sådanne forhold ikke udelukkende vil føre til et enkelt 2:1 kompleks, skønt denne kompleksform vil være den fremherskende, forudsat at de

5 ligand-tilvejebringende forbindelser har samme reaktivitet, idet denne kompleksform vil opnås i blanding med andre kompleksformer som omhandlet nedenfor. Hvis det således ønskes at forøge graden af sammenblanding af forskellige kompleksformer, der opnås, kan reaktantforholdene varieres med dette formål. Et 1,5:1,5 molært forhold af to forskellige ligander

10 kan således anvendes til at fremme dannelsen af en blanding af de to mulige 2:1 komplekstyper, som adskiller sig fra hinanden med hensyn til, hvilken ligand der er fremherskende.

Reaktionen til dannelse af ferrikomplekser er i almindelighed hurtig og vil normalt ialt væsentligt være forløbet til ende efter 5

15 minutter ved ca. 20°C, skønt en længere reaktionstid om nødvendigt kan anvendes. Efter fraseparering af eventuelt udfældet biprodukt såsom natriumchlorid i tilfælde af visse opløsningsmiddelsystemer kan reaktionsblandingen passende inddampes på en rotationsinddamper til dannelse af ferrikomplekset, der normalt til at begynde med vil være en olie, som

20 imidlertid ofte danner et glasagtigt produkt ved henstand.

Selvom det til nogle formål kan være hensigtsmæssigt at fremstille ferrikomplekset i en form, der er fri for fremstillede biprodukter bortset fra andre komplekser, kan i andre tilfælde, fx. hvor der er tale om en fast oral sammensætning som beskrevet i det følgende, nærværelsen af

25 biprodukter såsom natriumchlorid være helt acceptable. Imidlertid er i almindelighed det neutrale 3:1 jern(III)kompleks af særlig interesse i en form, der i alt væsentligt er fri for i det mindste de biprodukter, der er komplekser indeholdende andre totale forhold for ligand:jern. Således er 3:1 komplekset, skønt det sædvanligvis opnås og anvendes i en

30 form, hvori det er blandet med andre 3:1 komplekstyper som omhandlet nedenfor, fortrinsvis i alt væsentligt fri for 2:1 og 1:1 komplekser. Hertil kommer, at isolering af komplekset normalt vil tilvejebringe dette i en form, der i alt væsentligt er fri for enhver metalfri forbindelse svarende til en i komplekset tilstedeværende ligand.

35 Udtrykket "i alt væsentligt fri for" anvendes i det foreliggende til at indicere et indhold af det omhandlede materiale på 10 vægt-% eller mindre.

Visse af de ligand-tilvejebringende forbindelser såsom maltol er

handelsmæssigt tilgængelige. Med hensyn til andre er fremgangsmåder til fremstilling heraf omhandlet i ovennævnte tre DK-patentansøgninger. Således består fx. i mange tilfælde et passende udgangsmateriale for hydroxypyronerne af pyromeconsyre, som let opnås ved decarboxylering af meconsyre og som kan omsættes med et aldehyd til indførelse af en 1-hydroxyalkylgruppe i 2-stillingen, hvilken gruppe derpå kan reduceres til dannelse af en 2-alkyl-3-hydroxy-4-pyron. Fremstillingen af 2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron etc. ved denne metode omhandles i almindeligt tilgængelig US-patentansøgning nr. 310.141 (1960).

10 Det er åbenbart, at disse metoder ikke er de eneste tilgængelige til fremstilling af omhandlede forbindelser samt jernkomplekserne deraf og fagmanden vil være bekendt med forskellige alternativer.

Alle ferrikomplekserne ifølge opfindelsen besidder brugsmæssige fordele sammenlignet med de homogene 3:1 jern(III)komplekser ifølge de tre ovennævnte DK-patentansøgninger. For det første indebærer inklu-
15 sionen af en blanding af forskellige ligander i et kompleks en yderligere dimension ved udformningen af komplekser med optimerede egenskaber med hensyn til optagelse in vivo til tilvejebringelse af en kontrolleret jerntilførelse, der kan finde anvendelse i en særlig human eller veterinær sammenhæng. Nærmere betegnet antyder sammenlignelige resultater opnået med humane erythrocyter og ikke-udkrængede jejunal-
20 segmenter fra rotter, at komplekser indeholdende blandede ligander kan tilvejebringe en lettere tilgængelig kilde for jern end ferrikomplekser, hvor liganderne er ens. For det andet tilveje-bringer nærværende opfindelse bortset fra kompleksernes in vivo egenskaber særlige fordele i forhold til formuleringen af ferrikomplekserne. I visse sammenhæng, som omhandles nærmere i det følgende, er flydende formuleringer af ferrikomplekserne af særlig interesse, fx. til oral veterinær administrering og især til parenteral veterinær og human administrering og det har vist
25 sig, at til anvendelse i sådanne sammenhæng er opløseligheden af nogle af ferrikomplekserne ifølge ovennævnte tre DK-patentansøgninger mindre end ønsket.

De blandede ligandkomplekser ifølge opfindelsen udviser i almindelighed langt højere opløseligheder både i vand og i organiske opløsningsmidler end de komplekser, hvor liganderne er ens. Det er opfat-
35 telsen, at årsagen til dette skyldes mangfoldigheden af forskellige stereoisomere af et kompleks, som kan fremkomme, når en blanding af ligander er til stede, og som kan forøges ved nærværelsen af adskillige

forskellige komplekser i en reaktionsblanding opnået ved omsætning af ferriioner med mere end én ligand-frembringende forbindelse. Således kan et 3:1 jern(III) kompleks indeholdende tre identiske asymmetriske ligander eksistere i fire stereoisomere former, men når et kompleks frembringes ved omsætning af et 3 molært forhold af en blanding af to ligand-frembringende forbindelser (A og B) med ferri-ioner, kan følgende komplekstyper da være til stede i reaktionsblandingen: FeA_3 , FeB_3 , FeAB_2 og FeB_2A . Skønt de førstnævnte to komplekser vil eksistere i fire stereoisomere former, vil de sidstnævnte to komplekser ydermere hver eksistere i otte stereoisomere former. Det har vist sig, at de fire stereoisomere af et FeA_3 eller FeB_3 kompleks vil cokrystallisere med lethed, men med hensyn til et FeAB_2 eller FeB_2A kompleks modvirker det forøgede antal stereoisomerer og nærværelsen af andre 3:1 ligand:jern-(III) forbindelser en sådan cokrystallisation og sikrer, at produktet er en væske med forøget opløselighed sammenlignet med de sædvanlige faste FeA_3 og FeB_3 komplekser.

De farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen er ejendommelige ved, at de omfatter et ferrikompleks ifølge opfindelsen sammen med en fysiologisk acceptabel diluent eller bærer.

Ferrikomplekserne ifølge opfindelsen kan på forskellig måde formuleres til anvendelse som farmaceutiske midler til både veterinær, fx. i aviær eller især i mammal sammenhæng, og human brug. Forbindelserne kan fx. anvendes som vandige, olieagtige eller emulgerede præparater indeholdende et væskeformigt fortyndingsmiddel, som ofte kan benyttes til parenteral administrering og derfor passende kan være sterilt og pyrogenfrit. Oral administrering foretrækkes ofte ved mennesker til behandling af anæmi som følge af jernmangel og komplekserne ifølge opfindelsen kan indgives ad denne vej. Skønt præparater indeholdende et flydende fortyndingsmiddel kan anvendes til oral administrering, er det i det mindste ved mennesker mere sædvanligt at anvende præparater, der indeholder en fast bærer, fx. et konventionelt fast bærermateriale såsom stivelse, laktose, dextrin eller magnesiumstearat. Sådanne faste præparater kan passende være af en færdigformet type som fx. tabletter, kapsler (inklusive såkaldte spansules), etc.

Skønt faste præparater kan foretrækkes til behandling af anæmi som følge af jernmangel i visse sammenhæng, er flydende præparater af interesse i andre sammenhæng, fx. ved human og veterinær intermuskulær administrering og ved veterinær oral administrering som omhandlet

nedenfor. Det er i forbindelse med flydende præparater, at nærværende opfindelse er af særlig, skønt bestemt ikke udelukkende interesse. Det er således ofte ønskværdigt at fremstille flydende præparater, der indeholder en højere koncentration end umiddelbart opnåelig med et rent vandigt præparat eller ét indeholdende organiske opløsningsmidler såsom simple monovalente alkoholer. Med ferrikomplekserne omhandlet i de ovennævnte tre DK-patentansøgninger har det vist sig, at der kan opnås højere koncentrationer ved brug af opløsningsmidler indeholdende to eller flere hydroxygrupper eller en hydroxy- og en ethergruppe, især glycoler eller glycolethere, enten blandet med vand eller alene af hensyn til bedre opløselighedsgørelse. Glycolethere af særlig interesse er monoethere, der som etherdannende gruppe indeholder en alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbon-atomer som beskrevet ovenfor, fx. en methylgruppe, idet en sådan glycolmonoether kan være methylethylen-glycol. Imidlertid foretrækkes i almindelighed glycolerne selv. Eksempler på sådanne glycoler er de simple dihydroxyalkaner såsom ethylen-glycol såvel de mere komplekse forbindelser indeholdende to hydroxy-grupper bundet til en kæde, der indeholder både carbon og oxygenatomer såsom triethylenglycol, tetraethylenglycol og polyethylenglycol, fx. med en dalton molekyelvægt på 4000. Triethylenglycol og især tetraethylen-glycol er af særlig interesse p.g.a. meget lav toxicitet. Ved anvendelse af sådanne glycoler og glycolethere er det muligt at forøge opløseligheden for mange komplekser til 10 til 20 mg/ml. Skønt sådanne metoder også kan anvendes ved formuleringen af jernkomplekserne ifølge opfindelsen, vil den større opløselighed af disse komplekser ofte tillade, at man med fordel anvender simplere former for flydende præparater og stadig opnår koncentrationer, der i betydelig grad overstiger dette 10 til 20 mg/ml område.

Som antydnet er flydende præparater af særlig interesse med hensyn til parenteral administrering, som der opstår et behov for i visse humane sammenhæng, men også især i veterinære sammenhæng, fx. i forbindelse med grise. Problemerne med anæmi som følge af jernmangel-anæmi hos nyfødte grise opstår hovedsagelig i løbet af de første ca. 3 uger af deres liv, når en meget hurtig vægtforøgelse finder sted. Den sædvanlige administreringsvej for ferrikomplekserne ifølge opfindelsen til smågrise er parenteral, fx. intramuskulær eller oral, fx. som et flydende præparat, der "sprøjtes" ind i munden. En alternativ metode er imidlertid at forøge jernindholdet i mælken, hvorpå smågrisene opfodres,

ved behandling af soen under anvendelse af oral eller parenteral administrering, fx. med et injicerbart præparat af den type, der frigøres langsomt (idet en sådan metode også kan være af interesse i human sammenhæng). Når fodring af smågrisene med andre fødemidler end soens mælk finder sted, er det også muligt at udøve farmaceutisk administrering af ferrikomplekset i disse andre fødemidler.

Andre former for administrering end ved injektion eller via oral vej kan også overvejes både i human og veterinær sammenhæng, fx. anvendelse af suppositorier eller pessarer til human administrering.

10 En anden form for farmaceutisk præparat, der kan have interesse, er af en type udformet til buccal eller nasal administrering og sådanne præparater omhandles nærmere i det følgende.

Præparater kan formuleres på enhedsdosisform, dvs. i form af diskrete portioner indeholde en enhedsdosis eller et multiplum eller

15 en brøkdel af en enhedsdosis. Mens den indgivne dosis af omhandlede ferrikompleks vil afhænge af forskellige faktorer, herunder den særlige forbindelse, der anvendes i præparatet, kan det som vejledning anføres, at opretholdelse af mængden af jern, der er til stede i det menneskelige legeme på et tilfredsstillende niveau, ofte kan opnås under anvendelse

20 af en daglig dosis udtrykt som jernindholdet af forbindelsen, hvilken dosis ligger i området fra ca. 0,1 til 10 mg og ofte i området fra 0,5 til 10 mg, fx. 1 eller 2 mg, idet veterinære doser har et tilsvarende g/kg legemsvægtforhold. Det er imidlertid åbenbart, at det vil være passende under visse omstændigheder at indgive daglige doser, der enten

25 ligger under eller over disse niveauer. I almindelighed bør målet være at tilvejebringe den mængde jern, patienten har behov for, uden administrering af unødvendige overskud, og egenskaberne af de farmaceutiske præparater ifølge den foreliggende opfindelse er særligt egnede til opnåelse af dette mål.

30 I overensstemmelse med det ovenfor anførte vil det være åbenbart, at de farmaceutiske præparater kan indeholde mere end ét ferrikompleks ifølge opfindelsen eller naturligvis, at præparaterne kan indeholde andre aktive forbindelser som fx. forbindelser, der er egnede til at lette behandlingen af anæmi såsom cholinsyre. En anden yderligere

35 bestanddel, som præparaterne om ønsket kan indeholde, er en zinkkilde. Jernforbindelser, der anvendes ved behandling af anæmi som følge af jernmangel, kan inhibere legemets zinkoptagelsesmekanisme og dette kan forårsage alvorlige bivirkninger hos fostre ved behandling af gravide

for anæmi. Det formodes imidlertid, at ferrikomplekserne ifølge opfindelsen er i besiddelse af den yderligere fordel, at de enten ikke har denne virkning eller udviser virkningen i mildere grad end de forbindelser, der for tiden anvendes ved behandlingen af anæmi. Følgelig
5 kan det ofte være tilfældet, at behovet for tilsætning af zink-tilvejebringende forbindelser til præparaterne kan mindskes eller i forbindelse med foretrukne formuleringen af jernkomplekserne helt udelades.

Det er ikke åbenbart, at de i det foreliggende beskrevne, hidtil ukendte ferrikomplekser kan anvendes, oven i købet med stor fordel i
10 farmaceutisk sammenhæng. Den foreliggende opfindelse angår følgelig et ferrikompleks af den ovenfor beskrevne art til anvendelse ved behandling af jernmangel-anæmi.

Opfindelsen angår også anvendelsen af et ferrikompleks ifølge opfindelsen til fremstilling af et farmaceutisk præparat til anvendelse
15 til forøgelse af jernkoncentrationen i en patients blodstrøm.

De i det foreliggende beskrevne jernkomplekser er især egnede til behandling af jernmangelanæmi både i human og veterinær sammenhæng, især til behandling af forskellige pattedyrarter og specielt grise. Kompleksernes fordeling i n-octanol viser, at de er i stand til at gennemtrænge
20 biologiske membraner, idet denne egenskab kan bekræftes i praksis ved afprøvning af ⁵⁹Fe-mærkede ferrikomplekseres evne til at gennemtrænge erythrocyter. Forbindelsernes evne i denne henseende afhænger af de tilstedeværende liganders art og denne evne afspejles i de forskellige forbindelsers K_{part} -værdier som omhandlet ovenfor.

25 Visse aspekter ved formuleringen kan forøge ferrikompleksernes virkning i særlige sammenhæng. Skønt de neutrale ferrikomplekser indeholdende et 3:1 molært forhold af ligand:jern(III) er af særlig værdi som følge af stabilitet over et stort pH-område fra ca. 4 til 5 og op til 10, vil de dog ved oral administrering dissociere ved de i maven
30 herskende pH-værdier på under 4 til dannelsen af en blanding af 2:1 og 1:1 komplekser sammen med frie ligander. For det første kan én af flere variationer anvendes, hvorved ferrikompleksets udsættelse for de sure betingelser i maven undgås eller formindskes. Sådanne fremgangsmåder kan omfatte forskellige typer af kontrollerede frigørelsessystemer, der
35 strækker sig fra et system, som fx. kan være baseret på en polymer, der simpelthen tilvejebringer en tidsforsinket frigørelse af komplekset, via et system, der er modstandsdygtigt over for dissociering under sure betingelser, fx. ved anvendelse af puffere, til et system, der er

indrettet til frigørelse under de betingelser, der hersker i tyndtarmen, fx. et pH-følsomt system, der er stabilt ved en pH-værdi på 1 til 3, som fremhersker i maven, men ikke ved en pH-værdi på 7 til 9, som fremhersker i tyndtarmen. Da pH-værdien i maven er højere efter et måltid, kan
5 det være fordelagtigt, uanset hvilken formuleringsmetode der anvendes, at administrere ferrikomplekserne på et sådant tidspunkt.

En særlig bekvem måde at løse problemet med et præparat med kontrolleret frigørelse omfatter indkapsling af jernkomplekset med et materiale, der er modstandsdygtigt over for dissociering i maven, men
10 som er indrettet til dissociering i tyndtarmen (eller muligvis, hvis dissocieringen forløber langsomt, i tyktarmen). En sådan indkapsling kan opnås med liposomer, idet phospholipider i almindelighed er resistente over for dissociering under sure betingelser. De liposomalt omsluttede 3:1 jern(III) komplekser kan derfor overleve mavens sure miljø uden at
15 dissociere til 2:1 og 1:1 komplekser samt frie hydroxypyroner. Ved passage ind i tyndtarmen ødelægges bugspytkirtelenzymerne hurtigt liposomernes phospholipid-afhængige struktur, hvorved 3:1 komplekset frigøres. Liposomnedbrydning lettes yderligere af nærværelsen af galdesure salte. Det er imidlertid sædvanligvis mere bekvemt at udføre
20 indkapslingen, herunder mikro-indkapsling, under anvendelse af et fast præparat af pH-følsom art.

Fremstillingen af faste præparater, der er indrettet specielt at modstå dissociering under sure betingelser, men også indrettet til at dissociere under ikke sure betingelser, er velkendt i teknikken og
25 omfatter oftest brugen af enteriske overtræk, hvorved tabletter, kapsler, etc. eller de individuelle partikler eller granulater, der er indeholdt heri, overtrækkes med et passende materiale. Sådanne fremgangsmåder beskrives fx. i artiklen benævnt "Production of enteric coated capsules" af Jones i Manufacturing Chemist and Aerosol News, maj
30 1970, og i sådanne standardopslagsværker som "Pharmaceutical Dosage Forms", volumen III af Liebermann og Lackmann (udgivet af Marcel Decker). En særlig metode til indkapsling omfatter anvendelsen af gelatinekapsler overtrukket med et celluloseacetatphthalat/-diethylphthalat-lag. Dette overtræk beskytter gelatinekapslerne fra
35 påvirkning af vand under de sure betingelser i maven, hvor overtrækket protoneres og derfor er stabilt. Overtrækket destabiliseres imidlertid under de neutrale/alkaliske betingelser i tarmen, hvor det ikke er protoneret, hvorved vand kan påvirke gelatinen. Når først det vandop-

løselige 3:1 jern(III) kompleks er frigjort i tarmen, forløber gennem-
trængningen af tarmvæggen relativt konstant uanset hvor i tarmen, dvs. i
jejunum, ileum eller kolon, komplekset befinder sig. Andre eksempler på
anvendelige fremgangsmåder til formulering omfatter brugen af polymere
5 hydrogelformuleringer, som ikke ligefrem indkapsler ferrikomplekset, men
som er modstandsdygtige over for dissocieringen under sure betingelser.

En anden fremgangsmåde til at modvirke effekten af mavens sure
miljø er at formulere ferrikomplekserne som et farmaceutisk præparat,
der er indrettet til buccal eller nasal administrering. Da de buccale og
10 nasale hulheder repræsenterer et miljø med en pH-værdi omkring 7, vil et
neutralt 3:1 jern(III) kompleks således blive optaget af membranerne i
den buccale hulhed (omfattende tungen) og de nasale passager på neutral
form uden nogen væsentlig grad af omdannelse til de tilsvarende 2:1 og
1:1 komplekser. En sådan form for administrering tilvejebringer ofte en
15 simpel metode til beskyttelse af de neutrale 3:1 jern(III) komplekser
mod mavens stærkt sure miljø.

En yderligere fordel ved præparater til buccal eller nasal admi-
nistrering er, at de tilvejebringer en form for sikkerhedsforanstalt-
ning med hensyn til overdoser, fx. sådanne overdoser, der fremkommer
20 ved, at børn indtager medicinske præparater ordineret til voksne i samme
husholdning. Dette kan udgøre et betragteligt problem med eksisterende
jernpræparater og skønt ferrikomplekserne ifølge opfindelsen i alle
tilfælde er i besiddelse af en generelt lavere toxicitet og indebærer
lavere enhedsdosisniveauer, tilvejebringer præparaterne ifølge opfin-
25 delsen således en yderligere fordel. Det er således vanskeligt hurtigt
at indtage en stor mængde af ferrikomplekset fra den buccale hulhed
eller nasalpassagerne og overdoseringsproblemer opstår snarere, når
medikamentet sluges. Sker imidlertid dette og er ferrikomplekset ikke
formuleret på en sådan måde, at det er beskyttet imod mavens sure miljø,
30 vil omdannelse til 2:1 og 1:1 komplekserne finde sted, hvorved jern-
optagelsesniveauet fra overdosen reduceres væsentligt. Ferrikomplekser-
nes generelt lavere toxicitet vil bevirke, at meget af den lokale skade
på fordøjelseskanalen, som mange handelsmæssigt tilgængelige jernpræpa-
rater fremkalder under sådanne omstændigheder, undgås.

35 Fortyndingsmidler og bærere, der er egnet til formulering af
præparater til buccal eller nasal administrering, kan omfatte forskel-
lige materialer, som er almindeligt anvendt i præparater til sådan
administrering. Buccal administrering er af særlig interesse og i dette

- tilfælde foretrækkes et fast præparat. Sådanne præparater indrettet til retention i munden frem for at blive slugt og efterfølgende frigørelse af den aktive bestanddel i den buccale hulhed kan antage mange forskellige former. Sådanne former omfatter tyggegummi eller ballontyggegummi, slikkepinde, bolsjer, brusetabletter og især pastiller og tabletter. Sædvanligvis vil præparatet derfor blive tygget eller suttet, hvilket fører til frigørelse af ferrikomplekset i munden, skønt det også er muligt at anvende tabletter fx. i form af en skive af polymert materiale, som fastgøres til indersiden af den buccale hulhed og som gradvis frigør ferrikomplekset uden at blive suttet. Om ønsket kan flydende præparater anvendes i den buccale hulhed, specielt aerosolsprays, men disse er af mindre interesse. Alle disse præparatformer indtages gennem munden, men er i modsætning til de tidligere omhandlede orale præparater indrettet til at frigøre ferrikomplekset i munden frem for efter at være blevet slugt (skønt en del af ferrikomplekset under tygning, sugning, etc. naturligvis kan passere til maven). Foretrukne præparatformer er pastiller og piller og sådanne præparater beskrives under tiden med betegnelsen "linguet", idet dette er et præparat, der er egnet til sublingual anvendelse.
- Specifikke bærere, der kan anvendes i pastiller og piller, beskrives ved forskellige forsøg indbefattet i British Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia Codex og Martindale, Extra Pharmacopoeia. Et særligt eksempel på et udgangspunkt for pastiller beskrives i 1980 British Pharmacopoeia og består af en blanding af gelatine, glycerin, sukker, citronsyre og amarant. Hastigheden, hvormed pastillen opløses i munden, kan varieres efter behov under hensyn til opnåelse af et godt optagelsesniveau af jern, idet opløsningshastigheden fx. formindskes ved at forøge indholdet af gelatine. Pastiller kan passende fremstilles ved at danne en smelte indeholdende en passende mængde af ferrikomplekset og bæreren og derpå udhælde denne smelte i en form til tørring. Et særligt eksempel på et udgangspunkt for piller beskrives i 1959 British Pharmacopoeia Codex og består af en blanding af saccharose, akaciegummi og rosenolievand. Atter kan opløsningshastigheden kontrolleres ved ændring af udgangsmaterialets bestanddele. Piller kan passende fremstilles enten ved at danne en "dej", hvorfra pillerne udskæres, eller fortrinsvis ved presning. Om ønsket kan yderligere aromastoffer sættes til pastillerne eller pillerne, men jernkompleksernes smag er så acceptabel, at dette kan være unødvendigt undtagen måske til pædiatriske

formuleringer.

Hvor der anvendes præparater til nasal administrering, vil disse normalt være flydende og kan indeholde vand og/eller egnede opløsningsmidler. Sådanne præparater kan passende anvendes enten som dråber eller
5 i form af en arosolspray. Det er imidlertid muligt at anvende faste præparater i form af snus, hvis dette ønskes.

En tredje måde at modvirke effekten af det i maven forekommende sure miljø er beskrevet i DK-patentansøgning nr. 1352/83 og kan også indebære visse andre deri beskrevne fordele, hvilken metode går ud på at
10 formulere ferrikomplekset i det farmaceutiske præparat sammen med én eller flere af de metalfri ligand-tilvejebringende forbindelser, der indgår i komplekset. Skønt denne metode også kan overvejes i forbindelse med ferrikomplekserne ifølge opfindelsen, især under anvendelse af en metalfri forbindelse af type (1) eller (2), er den måske en hel del
15 mindre attraktiv i dette tilfælde under hensyn til muligheden for at fremkalde en udbytning mellem de metalfrie forbindelser i bundne ligander, især ligander af type (3) til fremstilling af en anden type kompleks. Anvendelsen af et ferrikompleks i blanding med et andet metalfrit jern-chelerende middel er ligeledes beskrevet i DK-patent-
20 ansøgning nr. 1352/83. Ligeledes denne metode kan overvejes anvendt med ferrikomplekserne ifølge opfindelsen, men er mindre attraktiv af tilsvarende årsager.

Udover den ovenfor omhandlede farmaceutiske anvendelse af ferrikomplekserne har de også potentiel betydning som jernkilde i forskellige
25 andre sammenhæng, herunder ved celle- og bakteriedyrkning, ved plantedyrkning, som farvningsmiddel og ved styring af jerntransport over membraner.

Opfindelsen belyses i det følgende nærmere med eksempler.

30 Eksempel 1

Fremstilling af ferrikomplekser

(A) En ethanolisk opløsning af ferri-chlorid omsættes i 5 minutter ved stuetemperatur med en chloroformopløsning indeholdende 2 mol-ækvivalenter maltol (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron) og 1 mol-ækvivalent 1-
35 ethyl-3-hydroxypyrid-2-on⁽¹⁾. Den resulterende opløsning neutraliseres ved tilsætning af fast natriumcarbonat under omrøring, det udfældede natriumchlorid fjernes ved filtrering og filtratet inddampes til dannelse af et i alt væsentligt kvantitativt udbytte som en olie

bestående af en blanding af 3:1 komplekserne, hvori (maltol)₂ (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on) jern(III) komplekset dominerer. Denne olie størkner ved henstand til dannelse af et glasagtigt stof, $\nu_{\max}$ (glas) 1525, 1560, 1620, 1645 cm⁻¹. (Det infrarøde spektrum af denne forbindelse og af de i det følgende omhandlede andre forbindelser tilvejebringes ved opløsning af det oprindelige glasagtige stof i chloroform og inddampning af denne opløsning in situ på natriumchloridplader til gendannelse af et glasagtigt stof, der anvendes til optagelse af det infrarøde spektrum).

De neutrale ferri-komplekser af (a) ethylpyromeconsyre (2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron) og maltol samt (b) 1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on og 1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on fremstilles på tilsvarende måde ved fremgangsmåde (A) til dannelse af (a) en blanding af 3:1 komplekser i form af et glasagtigt stof, hvori (ethylpyromeconsyre)₂ (maltol) jern(III) komplekset dominerer og (b) en blanding af 3:1 komplekser som et glasagtigt stof, hvori (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on)₂ (1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on) jern(III) komplekset dominerer, $\nu_{\max}$ 1525, 1610 cm⁻¹.

(B) En ethanolisk opløsning af ferri-chlorid behandles med en varm (60°C) ethanolisk opløsning indeholdende 2 mol-ækvivalenter maltol og 1 mol-ækvivalent ascorbinsyre⁽¹⁾ (anvendelsen af varm ethanol frem for kold chloroform som i fremgangsmåde (A) er nødvendig af hensyn til opløsning af ascorbinsyren) og blandingen afkøles til stuetemperatur i løbet af 30 minutter. Den tilvejebragte kolde opløsning neutraliseres ved tilsætning af fast natriumcarbonat under omrøring, idet det udfældede natriumchlorid fjernes ved filtrering og filtratet inddampes til dannelse af et i alt væsentligt kvantitativt udbytte som en olie bestående af en blanding af 3:1 komplekser, hvori (maltol)₂ (ascorbinsyre) jern(III) komplekset dominerer. Denne olie størkner ved henstand til dannelse af et glasagtigt stof, $\nu_{\max}$ (glas) 1500, 1560, 1600, 1790 cm⁻¹.

De neutrale ferri-komplekser af (a) maltol og leucin og (b) maltol og glycin fremstilles på tilsvarende måde ved fremgangsmåde (B) til dannelse af (a) en blanding af 3:1 komplekser i form af et glasagtigt stof, hvori (maltol)₂ (leucin) komplekset dominerer, $\nu_{\max}$ 1500, 1560, 1595 cm⁻¹, og (b) en blanding af 3:1 komplekser i form af et glasagtigt stof, hvori (maltol)₂ (glycin) jern(III) komplekset dominerer.

Bestemmelse af fordelingskoefficienter

Fordelingskoefficienten K_{part} , der er forholdet (koncentration af forbindelse i n-octanol)/(koncentration af forbindelse i vandig fase) ved fordeling imellem n-octanol og vandig trishydrochlorid (20 mM, pH 7,4, tris angiver 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) måles ved 20°C under anvendelse af spektrofotometri på 3:1 jern(III)komplekserne angivet i tabellen (ved 10^{-4}M), idet komplekset fremstillet i overensstemmelse med det ovenfor angivne først opløses i det vandige trishydrochlorid. Syrevasket glas anvendes overalt og efter blanding af 5 ml af den 10^{-4}M vandige opløsning med 5 ml n-octanol i 1 minut centrifugeres den vandige n-octanolblanding ved 1000 g i 30 sekunder. De to fremkomne faser separeres med henblik på en koncentrationsbestemmelse på hver især ved hjælp af spektrofotometri, hvorved området 34-640 nm anvendes. Typiske resultater fremgår af tabellen.

15

Tabel 1
Fordelingskoefficienter

	Jern(III) kompleks	Fordelingskoefficient
20	(maltol) ₂ (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on)	0,32
	(ethylpyromeconsyre) ₂ (maltol)	1,69
	(1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on) ₂	3,56
	(1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on)	
25	(maltol) ₂ (ascorbinsyre)	0,14
	(maltol) ₂ (leucin)	0,17
	(maltol) ₂ (glycin)	0,18

(1) Koncentrationen af den 1 mol-ækvivalente, ligand-tilvejebringende forbindelse er ca. 0,1M, skønt denne koncentration kan variere, fx. i området fra 0,1 til 1M, udelukkende i afhængighed af de særlige ligand-tilvejebringende forbindelsers opløselighed i det anvendte opløsningsmiddelssystem.

35

Eksempel 2Overførsel af jern til apotransferrin

(Maltol)₂ (ascorbinsyre) jern(III) fremstilledes in situ ved at opløse maltol og ascorbinsyre i et 2:1 mol-forhold i et vandigt medium indeholdende morpholinpropansulfonat (MOPS, 25 mM) og natrium-hydrogen-carbonat (30 mM), idet pH-værdien indstilledes til 7,4 med saltsyre (50% vol./vol.). Til reaktionsmediet sættes en opløsning af ⁵⁹Fe beriget jernchlorid i 0,1 M vandig saltsyre indeholdende jern i en mol-mængde ækvivalent med mængden af ascorbinsyre. Ens volumener af jernkompleks- opløsningen og af apotransferrin i samme vandige medium blandedes, hvorved opnåedes koncentrationer på 5×10^{-5} M apotransferrin og 1×10^{-4} M jern i blanding.

Blandingen inkuberedes ved stuetemperatur ved særskilte eksperimenter i 10 og 60 minutter og en alikvot sættes så til en "Sephadex G10" kolonne ækvilibreret med samme ovenfor beskrevne vandige medium og kolonnen elueredes med mediet, idet fraktioner opsamledes og analyseredes på grundlag af ⁵⁹Fe ved tælling. De procentvise indhold af ⁵⁹Fe, hhv. forbundet med apotransferrin og med liganderne, beregnes som cpm jern-apotransferrin/total cpm og cpm jern-(maltol)₂ (ascorbinsyre)/total cpm.

Det viste sig efter 10 minutter, at 43% af ⁵⁹Fe var forbundet med apotransferrin og 57% med liganderne, mens den efter 60 minutter til apotransferrin overførte mængde ⁵⁹Fe var steget til 75%, idet kun 25% forblev forbundet med liganderne.

25

Eksempel 3In vitro tests for ferrikompleksernes indtrængen i human-erythrocyter

Akkumuleringen af jern hos human-erythrocyter, der bringes sammen med (ethylpyromeconsyre)₂ (maltol) jern(III), (maltol)₂ (ethylpyromeconsyre) jern(III), (maltol)₂ (ascorbinsyre) jern(III) og (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on)₂ (1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on) jern(III), undersøgtes af sammenlignelighedsgrunde sammen med en gruppe af fire andre jernforbindelser omfattende 3:1 jernkomplekser med ens ligander (ethylpyromeconsyre)₃ jern(III) og (maltol)₃ jern(III) samt saltene, ferri-NTA (nitrilotrieddikesyre) og ferro-sulfat.

35

Jernforbindelserne anvendtes i opløsning i et vandigt medium indeholdende tris (20 mM) og natriumchlorid (130 mM), hvor pH-værdien var indstillet til 7,4 med saltsyre (50% vol./vol.). Ferri-NTA og ferro-

sulfat på fast form og mærket med ^{59}Fe opløstes i det vandige medium til dannelse af en 10^{-4} molær opløsning, mens jernkomplekserne fremstilledes in situ ved opløsning af den ligand-tilvejebringende forbindelse eller af et passende molforhold af ligand-tilvejebringende forbindelser i det vandige medium og ved tilsætning af en passende mol-mængde af ^{59}Fe beriget ferri-chlorid i 0,1 M saltsyre, idet slutkoncentrationen af jern var 10^{-4}M .

Pakkede human-erythrocyter (0,5 ml) inkuberedes i det vandige medium ved 37°C , i alle tilfælde i hhv. 5 og 30 minutter, ved særskilte eksperimenter, idet der kun for $(\text{maltol})_2$ (ascorbinsyre) jern(III) komplekserne udførtes en række eksperimenter i 2, 5, 10, 15, 30, 45 og 60 minutter. Efter inkuberingen separeredes en alikvot af erythrocyt-inkuberingsmediumblandingen ved centrifugering over 2 lag siliconeolie (hhv. $p = 1,07$ og $p = 1,2$). De med hver af erythrocyterne og inkuberingsmediet forbundne ^{59}Fe -niveauer taltes og er angivet som et fordelingsforhold (koncentration i erythrocyter/koncentration i medium) i tabel 2 med hensyn til 5 og 30 minutters eksperimenterne samt i tabel 3 med hensyn til de andre eksperimenter med $(\text{maltol})_2$ (ascorbinsyre) jern(III) (alle data i tabellerne angiver et middeltal for mindst tre uafhængige eksperimenter).

Det fremgår af tabel 2, at ethylpyromeconsyre er mere effektiv som ligand end maltol til at fremkalde optagelse af et ferrikompleks hos erythrocyter, idet optagelse både med hensyn til komplekset indeholdende tre ethylpyromeconsyreligander og komplekset indeholdende to sådanne ligander når ligevægtstilstanden efter kun 5 minutter. Det bør også bemærkes, at et højere jernoptagelsesniveau nås efter 30 minutter med hensyn til hver af de tre blandede ligandkomplekser indeholdende en hydroxypyronligand sammenlignet med de to komplekser indeholdende tre identiske hydroxypyronligander.

Tabel 2

5	Forbindelse	Ligand- koncen- tration (mM)	Fordelingsforhold	
			5 min.	30 min.
	Fe ^{III} (ethylpyromeconsyre) ₃	0,3	3,7	3,6
	Fe ^{III} (maltol) ₃	0,3	0,2	1,1
10	Fe ^{III} (ethylpyromeconsyre) ₂ maltol	0,2:0,1	5,6	5,2
	Fe ^{III} (maltol) ₂ (ethylpyro- meconsyre)	0,2:0,1	1,9	6,3
	Fe ^{III} (maltol) ₂ (ascorbinsyre)	0,2:0,1	1,5	5,2
15	Fe ^{III} (1-ethyl-3-hydroxypy- rid-2-on) ₂ (1-butyl-3-hy- droxypyrid-4-on)	0,2:0,1	0,4	1,4
	Fe ^{III} NTA	0,1	6,2	4,9 ⁽¹⁾
	Fe ^{II} SO ₄	0,1	5,0	4,3 ⁽¹⁾

20

(1) En undersøgelse af erythrocytmembranerne efter inkubering viser, at disse tilsyneladende høje jernoptagelsesniveauer skyldes, at de bindes til selve membranen og afspejler faktisk ikke de sande jernoptagelsesværdier.

25

Tabel 3

[Fe^{III}(maltol)₂(ascorbinsyre)]

30	Tid (minutter)	Fordelingsforhold
	2	6,1
	5	8,0
	10	10,2
	15	12,2
35	30	17,1
	45	26,5 ⁽¹⁾
	60	30,8 ⁽¹⁾

(1) Disse høje værdier skyldes dissociation af komplekset og overførsel af jern til intracellulær protein.

Eksempel 4

5 In vitro tests til bestemmelse af jernoptagelsen hos ikke-udkrængede rotte-jejunalsegmenter

Optagelsen af jern hos ikke-udkrængede rotte-jejunalsegmenter undersøgtes i forbindelse med (ethylpyromeconsyre)₂ (maltol) jern(III), (maltol)₂ (ethylpyromeconsyre) jern(III) og (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on)₂ (1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on) jern(III). Til sammenligning udførtes 10 tilsvarende eksperimenter med (ethylpyromeconsyre)₃ jern(III) og (maltol)₃ jern(III), idet sidstnævnte kompleks anvendes alene og i blanding med et overskud af maltol svarende til enten 1 mol-del eller 7 mol-dele fri maltol udover de i komplekset i forbindelse med 1 mol-del 15 jern(III) forbundne 3 mol-dele.

Ferrikomplekserne fremstilles in situ i oxygenet HEPES-puffer ved opløsning af en passende mængde af en ligand-tilvejebringende forbindelse eller af et passende molforhold af ligand-tilvejebringende forbindelser i pufferen og ved tilsætning af et passende molforhold 20 af ⁵⁹Fe-beriget ferri-chlorid i 0,1 molær saltsyre, idet jernets slutkoncentration er 10⁻⁴ molær.

Rotter (hankøn, Sprague Dawley, 70-90 g) aflivedes og jejunum fjernedes. Den deltes i længder af 3 cm, som hver især blev skåret op i længderetningen og åbnet. Disse længder blev yderligere udskåret i 25 30-35 mg segmenter (3 per inkuberingsflaske). Jejunum inkuberedes i 10 minutter ved 37°C under anvendelse af præ-inkuberede flasker, der hver især indeholdt tre segmenter i et medium af oxygenet HEPES-puffer indeholdende det behørigt jernkompleks. Vævet og mediet taltes derpå.

Optagelsen af ⁵⁹Fe beregnedes som et fordelingsforhold (koncentration i væv/koncentration i medium) korrigeret for vandindholdet (80%) 30 og den extracellulære fraktion (bestemt til 20% ved sulfat-pladsundersøgelse) i vævet. Resultaterne vises i tabel 4 og i modsætning til resultaterne opnået med erythrocyter fremgår det, at optagelsen af jern fra komplekset indeholdende tre ethylpyromeconsyreligander ikke er 35 større end optagelsen fra komplekset indeholdende tre maltolligander. Som ved erythrocytundersøgelsen er optagelsen af jern imidlertid større for de tre blandede ligandkomplekser indeholdende en hydroxypyronligand sammenlignet med begge komplekserne indeholdende tre hydroxypyron-

ligander.

Tabel 4

5	Forbindelse	Ligand- koncentration (mM)	Fordelings- forhold
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{maltol})_3 + \text{maltol}$	1	0,1
10	(1:7 molært forhold af kompleks:maltol)		
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{maltol})_3 + \text{maltol}$	0,4	0,6
	(1:1 molært forhold af kompleks:maltol)		
15	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{maltol})_3$	0,3	1,3
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{ethylpyromeconsyre})_3$	0,3	1,0
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{ethylpyromeconsyre})_2$	0,2:0,1	6,0
	(maltol)		
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{maltol})_2(\text{ethylpyromecon}$	0,2:0,1	4,3
20	syre)		
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{maltol})_2(\text{ascorbinsyre})$	0,2:0,1	9,7
	$\text{Fe}^{(\text{III})}(1\text{-ethyl-3-hydroxypyrid}$	0,2:0,1	2,4
	2-on) $_2$ -(1-butyl-3-hydroxypyrid-		
	4-on)		
25			

Eksempel 5Fremstilling af $(\text{maltol})_2$ -(1-ethyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-on)
jern(III)kompleks

- Den til fremstillingen af ovennævnte produkt anvendte udgangs-
- 5 forbindelse 1-ethyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-on fremstilles i analogi med den i dansk patentansøgning nr. 1352/83 anførte metode til fremstilling af hydroxypyridon-udgangsmaterialer, idet omsætning af 3-benzyloxy-2-methyl-4-pyron med ethylamin,hydrochlorid efter debenzylering fører til det ønskede 1-ethyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-on-
- 10 udgangsmateriale. Fage-komplekset dannes ved, som beskrevet under eksempel 1(A) i nærværende ansøgning, at omsætte ferrichlorid med 2 molækvivalenter maltol og 1 molækvivalent 1-ethyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-on. Det ønskede produkt $(\text{maltol})_2$ (1-ethyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-on) jern(III)kompleks opnås som et rødt pulver med et smelte-
- 15 punkt på 202,1-204,1°C under dekomponering. Det infrarøde spektrum som et glas, udviser toppe ved 1570, 1545, 1490 (skulder), 1345, 1275, 1200, 1035, 825 og 715 cm^{-1} .

PATENTKRAV

1. Ferrikompleks, **KENDETEGNET** ved, at det er et neutralt ferri-kompleks, hvor en ferriion er bundet til tre monobasiske bidentat-ligander, hvor den første og anden ligand, som er identiske, tilveje-
5 bringes af en forbindelse udvalgt fra
- (1) 3-hydroxy-4-pyron og 3-hydroxy-4-pyroner, hvori et eller flere af hydrogenatomerne bundet til ringcarbonatomer er erstattet med en alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbonatomer, og
- (2) 3-hydroxypyrid-2-oner og 3-hydroxypyrid-4-oner, i hvilke
10 hydrogenatomet bundet til nitrogenatomet og om ønsket et eller flere af hydrogenatomerne bundet til ringcarbonatomer er erstattet af en alifatisk carbonhydridgruppe med 1 til 6 carbonatomer, og
- den tredje ligand, som er forskellig fra de andre to ligander tilvejebringes af en forbindelse udvalgt blandt forbindelser af type (1)
15 og (2), og
- (3) gluconsyre, ascorbinsyre, glycin og leucin.
2. Kompleks ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den tredje ligand tilvejebringes af en forbindelse, hvis type afviger fra typen af den forbindelse, der tilvejebringer de første to ligander.
- 20 3. Kompleks ifølge krav 1 eller 2, **KENDETEGNET** ved, at forbindelsen af type (3) er ascorbinsyre.
4. Kompleks ifølge krav ethvert af kravene 1-3, **KENDETEGNET** ved, at mindst én ligand tilvejebringes af en forbindelse af type (1).
5. Kompleks ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at hver ligand separat
25 tilvejebringes af en forbindelse af type (1).
6. Kompleks ifølge ethvert af de foregående krav, **KENDETEGNET** ved, at forbindelsen af type (1) er udvalgt blandt 3-hydroxy-4-pyron og 3-hydroxy-4-pyroner, hvor ét eller flere af hydrogenatomerne knyttet til ringcarbonatomer er erstattet med methyl, ethyl, n-propyl eller
30 isopropyl.
7. Kompleks ifølge krav 6, **KENDETEGNET** ved, at de substituerede 3-hydroxy-4-pyroner indeholder en enkelt substituent i 2- eller 6-stillingen.
8. Kompleks ifølge krav 6, **KENDETEGNET** ved, at forbindelsen er 3-
35 hydroxy-4-pyron, 3-hydroxy-2-methyl-4-pyron, 3-hydroxy-6-methyl-4-pyron eller 2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron.
9. Kompleks ifølge krav 6, **KENDETEGNET** ved, at forbindelsen er 3-hydroxy-2-methyl-4-pyron eller 2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron.

10. Kompleks ifølge ethvert af kravene 1-4, **KENDETEGNET** ved, at mindst én ligand tilvejebringes af en forbindelse af type (2).

11. Kompleks ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at hver ligand separat tilvejebringes af en forbindelse af type (2).

5 12. Kompleks ifølge krav 10 eller 11, **KENDETEGNET** ved, at den eller hver af de alifatiske carbonhydridgrupper i forbindelsen af type (2) er en alkylgruppe med 1-4 carbonatomer.

13. Kompleks ifølge krav 10, 11 eller 12, **KENDETEGNET** ved, at forbindelsen af type (2) er en 3-hydroxypyrid-2-on.

10 14. Kompleks ifølge krav 13, **KENDETEGNET** ved, at 3-hydroxypyrid-2-onen er substitueret på nitrogenatomet med en substituent udvalgt blandt methyl, ethyl, n-propyl og isopropyl.

15. Kompleks ifølge krav 14, **KENDETEGNET** ved, at forbindelsen er 1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on.

15 16. Kompleks ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at det er (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on)₂ (1-butyl-3-hydroxypyrid-4-on) jern(III), (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron)₂ (1-ethyl-3-hydroxypyrid-2-on) jern(III), (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron)₂ (leucin) jern(III), (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron)₂ (glycin) jern(III), (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron)₂ (ascorbinsyre)
20 jern(III), (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron)₂ (2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron) jern(III) eller (2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron)₂ (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron) jern(III).

17. Kompleks ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at det er (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron)₂ (2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron) jern(III) eller (2-ethyl-3-hydroxy-4-pyron)₂ (3-hydroxy-2-methyl-4-pyron) jern(III).
25

18. Farmaceutisk præparat, **KENDETEGNET** ved, at det omfatter et ferrikompleks ifølge ethvert af kravene 1-17 sammen med en fysiologisk acceptabel diluent eller bærer.

19. Farmaceutisk præparat ifølge krav 18, **KENDETEGNET** ved, at det
30 er på fast form indrettet til oral administrering.

20. Farmaceutisk præparat ifølge krav 18, **KENDETEGNET** ved, at komplekset er indkapslet af et materiale, som er resistent overfor dissociation under vandige sure betingelser.

21. Farmaceutisk præparat ifølge krav 18, **KENDETEGNET** ved, at det
35 er på aerosolform.

22. Farmaceutisk præparat ifølge krav 18, **KENDETEGNET** ved, at det er på flydende form, som indeholder en steril pyrogen-fri diluent.

23. Ferrikompleks ifølge ethvert af kravene 1-22 til anvendelse ved

behandlingen af jernmangelanæmi.

24. Anvendelse af et ferrikompleks ifølge ethvert af kravene 1-22 til fremstillingen af et farmaceutisk præparat til anvendelse til forøgelse af jernkoncentrationen i en patients blodstrøm.

5

10

15

20