



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월27일

(11) 등록번호 10-2403292

(24) 등록일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 33/26 (2006.01)

A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)

A61K 9/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0095 (2013.01)

A61K 33/26 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7029764

(22) 출원일자(국제) 2017년03월15일

심사청구일자 2020년03월13일

(85) 번역문제출일자 2018년10월15일

(65) 공개번호 10-2019-0006946

(43) 공개일자 2019년01월21일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/056134

(87) 국제공개번호 WO 2017/158030

국제공개일자 2017년09월21일

(30) 우선권주장

16160539.9 2016년03월15일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2013044246 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

솔보트린 테라퓨틱스 리미티드

아일랜드 코 코크주 코크 인체라 리틀 아일랜드

(72) 발명자

길머 존

아일랜드 더블린주 레드갭 라스쿨

가버 래덕스

아일랜드 미스주 던쇼린 18 폴드릭스 패스

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이형준

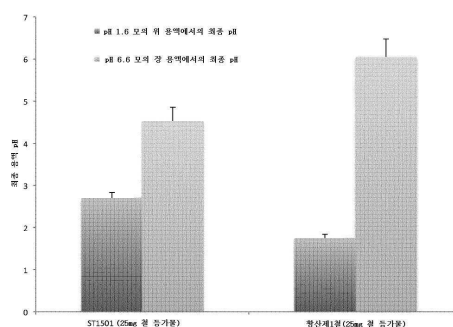
(54) 발명의 명칭 포유동물에서 철 섭취를 증가시키기 위한 조성물 및 방법

## (57) 요약

대상체에서 혈청 철을 증가시킬 수 있는, 철, 완충제 및 변성 단백질을 함유하는 조성물이 제조되었다. 예를 들어, 위장 보호 효과를 제공하고, 철을 더 이용 가능한  $Fe^{2+}$  형태로 보존하며, 대상체에 철을 전달하기 위한 이전에 공지된 비히클에 비해 인간에서의 철 생체 이용가능성을 개선시키는 완충 조성물 중의 단백질 기질 내에 포획된 철 및 비결합 철을 함유하는 분무 건조된 마이크로비드가 제조되었다.

## 대표도 - 도5

모의 위액 및 장액에서의 본 발명의 조성물  
(ST1501, 황산제1철)의 pH 프로파일



(52) CPC특허분류

*A61K 47/22* (2013.01)

*A61K 47/42* (2013.01)

*A61K 9/06* (2013.01)

*A61K 9/1658* (2013.01)

(72) 발명자

**웰레한 마이클**

아일랜드 미스주 라탕간 46 세인트 모히 로드 뉴타운

**왕 준**

아일랜드 더블린주 던 리어리 6 클레어몬트 애버뉴  
허니 파크

**오펀린 팻**

아일랜드 코크주 더글라스 레드옥스 메리버러 오차드

**르위지 마크**

아일랜드 코크주 더글라스 14 메리버러 오차드

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

철, 완충제 및 변성 단백질을 포함하는 담체를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액(simulated gastric fluid) 중에서 1시간의 과정에 걸쳐 제1철로서 상기 조성물 내 철의 총량의 적어도 71 중량%를 방출하고, 그리고 상기 조성물이 pH 1.6에서 모의 위액 중에 놓일 때 30분 후에 상기 pH는 적어도 2까지 완충되고, 그리고 상기 조성물이 pH 6.6에서 모의 장액(simulated intestinal fluid) 중에 놓일 때 30분 후에 pH는 최대 5.5까지 완충되며, 그리고 상기 조성물이 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크(trough to peak) 비가 등물 용량의 경구 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 중량 기준 적어도 120%이고,

상기 조성물은 2.5 중량% 내지 20 중량%의 총 철 함량을 가지며,

상기 변성 단백질은 변성 유청(whey) 단백질, 변성 유청 단백질 단리물, 변성 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합을 포함하고, 상기 변성 단백질은 30 중량% 내지 80 중량%의 양으로 존재하고,

상기 완충제는 5 중량% 내지 20 중량%의 양으로 존재하며 아세테이트 및 아세트산을 포함하고,

상기 조성물은 마이크로비드 형태이고, 및

상기 조성물의 수분 함량은 10 중량% 미만인, 조성물.

#### 청구항 2

철 및 변성 단백질 코어, 철 염 및 완충제를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은 pH 1.6에서의 위 조건에서 철의 총량의 적어도 71 중량% 및 상기 완충제의 적어도 50 중량%를 방출하되, 상기 조성물은 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 중량 기준 적어도 120%이고,

상기 조성물은 5 중량% 내지 10 중량%의 총 철 함량을 가지며,

상기 변성 단백질은 변성 유청(whey) 단백질, 변성 유청 단백질 단리물, 변성 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합을 포함하고, 상기 변성 단백질은 30 중량% 내지 80 중량%의 양으로 존재하고,

상기 완충제는 5 중량% 내지 20 중량%의 양으로 존재하며 아세테이트 및 아세트산을 포함하고,

상기 조성물은 마이크로비드 형태이고, 및

상기 조성물의 수분 함량은 10 중량% 미만인, 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, pH 1.6에서 모의 위액 중 30분의 과정에 걸쳐 상기 완충제의 적어도 50 중량% 또는 적어도 71 중량% 또는 적어도 75 중량% 또는 적어도 80 중량%를 방출하는, 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 철:단백질 비는 중량 기준으로 1:50 내지 5:1, 또는 1:40 내지 1:3인, 조성물.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 총 철 함량이 2.5 중량% 내지 50 중량%이거나,

완충제:단백질 비는 중량 기준으로 1:50 내지 5:1 또는 1:40 내지 1:3이거나,

완충제:철 비는 중량 기준으로 1:10 내지 10:1 또는 1:3 내지 3:1이거나,

비정질이거나,

상기 변성 단백질은 중량 기준 적어도 50%, 80% 또는 90% 변성되거나,

상기 변성 단백질은 중량 기준 적어도 50%, 80% 또는 90% 변성된 베타 락토글로불린을 포함할 수 있거나,

상기 변성 단백질은 2가 금속 철 제거 공정이 실시된 것이거나,

상기 조성물의 수분 함량은 중량 기준으로 20% 미만, 15% 미만 또는 10% 미만이거나,

상기 조성물은 변성된 응집 단백질 기질을 포함하는 코어(core)를 가지거나,

상기 조성물은 코어 및 표피(skin)를 갖고, 상기 표피는 변성된 응집 단백질을 포함하거나,

상기 조성물은 코어를 갖고, 상기 코어는 변성된 응집 단백질 기질을 포함하거나,

상기 변성 단백질은, 철을 제외하고, 100g의 단백질당 500mg 미만의 2가 금속 이온, 또는 100g의 단백질당 300mg 미만의 2가 금속 이온, 또는 100g의 단백질당 100mg의 2가 금속 이온을 함유하거나,

인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 트로프 대 피크 비의 중량 기준 적어도 130%, 140%, 150%, 160% 또는 175%이거나,

인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 트로프 대 피크 비의 중량 기준 적어도 130%, 140% 또는 150%일 수 있거나,

상기 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 70 중량% 초과, 또는 71 중량% 초과를 방출할 수 있고; 상기 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 75 중량% 초과를 방출할 수 있으며; 상기 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 80 중량% 초과를 방출할 수 있고; 상기 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 85 중량% 초과를 방출할 수 있으며; 상기 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 90 중량% 초과를 방출할 수 있고; 상기 조성물은 pH 6.6에서 모의 장액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 총 철 함량의 10 중량%, 20 중량%, 30 중량%, 40 중량%, 50 중량% 또는 60 중량% 초과를 방출할 수 있거나, 상기 조성물은 pH 6.6에서 모의 장액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 총 철 함량의 80 중량% 초과를 방출할 수 있는, 조성물.

## 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 아스코르브산, 아스코르브산염에서 선택되는 안정제, 또는 L-아스코르브산, L-아스코르브산나트륨, L-아스코르브산칼슘, 팔미트산아스코빌(팔미토일 L-아스코르브산), 에리소르빈산(D-아이소아스코르브산) 및 에리소르빈산나트륨(D-아이소아스코르브산나트륨) 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 안정제를 더 포함하거나,

상기 철:단백질 비는 중량 기준으로 1:20 내지 1:3, 또는 1:40 내지 1:3, 또는 1:15 내지 1:4, 또는 1:6 내지 1:12이거나,

상기 조성물은 평균 입자 크기가 2000 마이크론 이하, 1000 마이크론 이하, 600 마이크론 이하, 500 마이크론 이하, 또는 300 마이크론 이하, 또는 100 마이크론 이하 또는 80 마이크론 이하 또는 60 마이크론 이하, 또는 40 마이크론 이하 또는 20 마이크론 이하인 입자로 이루어지거나,

상기 조성물 중의 상기 철은 중량 기준 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 제1철을 포함하거나,

상기 변성 단백질은 변성된 유청 단백질, 변성된 유청 단백질 단리물, 변성된 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합물을 포함하는, 조성물.

## 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 완충제로서 염, 또는 단쇄 지방산의 염, 또는 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>5</sub> 지방산의 염을 포함하는, 조성물.

## 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 완충제로서 인산, 1가 염을 포함하는 아세트산염, 프로피온산염, 부티르산염, 인산염 및 시트르산염으로부터 선택되는 염을 포함하는 염, 또는 나트륨염 중 적어도 하나를 포함하거나,

상기 완충제는 3중량% 초과 또는 4중량% 초과 또는 5중량% 초과 또는 6중량% 초과 또는 7중량% 초과 또는 8중량% 초과 또는 10중량% 초과 또는 12중량% 초과 또는 15중량% 초과, 또는 17중량%의 양으로 존재하는, 조성물.

## 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 변성 단백질, 염을 포함하는 완충제 및 철을 포함하는 액체 조성물로부터 형성되되, 상기 변성 단백질은 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 5% 내지 80% 또는 20% 내지 60%, 또는 30 내지 50%의 양으로 존재하거나,

상기 조성물에서 상기 완충제는 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 5중량% 내지 50중량%, 6중량% 내지 20중량%, 또는 6중량% 내지 15중량%의 양으로 존재하는, 조성물.

## 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 액체 조성물에서, 상기 철은 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 5중량% 내지 50중량%, 5중량% 내지 20중량%, 또는 5중량% 내지 10중량%의 양으로 존재하는, 조성물.

## 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 변성 단백질은 100g의 총 단백질당 500mg 미만의 칼슘, 100g의 총 단백질당 300mg 칼슘, 100g의 총 단백질당 200mg 미만의 칼슘, 또는 100g의 총 단백질당 100mg 미만의 칼슘을 함유하거나,

철 및 단백질을 포함하는 탈수된 하이드로겔의 코어를 포함하거나,

조성물로서,

철; 및

변성된 유청 단백질을 포함하는 담체를 포함하되,

상기 철:단백질 비가 중량 기준으로 1:50 내지 5:1이고,

상기 변성된 단백질은 철을 제외하고 100g의 단백질당 500mg 미만의 2가 금속 이온, 100g의 단백질당 300mg 미만의 2가 금속 이온, 또는 100g의 단백질당 100mg 미만의 2가 금속 이온을 함유하며,

상기 조성물의 수분 함량은 30중량%, 15중량% 또는 10중량% 미만이고,

상기 담체는 변성된 응집 단백질 기질 코어를 포함하며,

상기 철의 적어도 50, 60 또는 70중량%는 제1철이고,

상기 조성물은 아세트산나트륨을 포함하는 완충제로 더 코팅되며

상기 조성물은, 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 적어도 중량 기준 150%인, 조성물.

## 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 혈청 철의 증가가 필요한 포유류에서 혈청 철을 증가시키는데 사용하기 위한, 조성물.

## 청구항 13

철의 전달을 위한 건조 물질의 생산 방법으로서,

변성 단백질, 철 및 완충제를 함유하는 액체로부터 겔을 형성하는 단계;

상기 액체 내에서 겔 입자를 형성하기 위해 상기 겔을 전단 처리하는 단계; 및

상기 겔 입자를 함유하는 액체를 건조처리하여, 건조된 입자를 포함하는 건조 물질을 형성하는 단계를 포함하되,

상기 완충제는 아세트산나트륨/아세트산 완충 시스템이고;

상기 겔은 하이드로겔이고,

상기 변성 단백질은 변성 유청 단백질, 변성 유청 단백질 단리물, 변성 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합을 포함하고,

상기 입자는 마이크로비드를 포함하는, 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 방법은 건조된 입자를 형성하고, 상기 건조된 입자는 평균 입자 직경이 5 내지 15 마이크로미터, 또는 15 내지 30 마이크로미터, 또는 30 내지 50 마이크로미터, 또는 50 내지 75 마이크로미터, 또는 10 내지 75 마이크로미터인, 방법.

#### 청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 겔 입자를 함유하는 액체를 건조 처리하는 것은 건조된 입자를 형성하기 위해 분무 건조를 포함하는, 방법.

#### 청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 액체 제형은 1 또는 3 또는 5 또는 7분까지 동안 전단 작용 처리되고, 상기 전단 작용에 의해 형성되는 겔 입자를 10 내지 120분, 20 내지 40분, 또는 30분 동안 방치하는, 방법.

#### 청구항 17

제13항 또는 제14항에 있어서, 건조는 300분 미만, 또는 120분 미만, 또는 60분 미만, 또는 30분 미만, 또는 5분 미만, 또는 1분 미만 동안 수행되는, 방법.

#### 청구항 18

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 건조 중인 물질은 40 내지 100℃, 50 내지 90℃, 또는 60 내지 80℃의 승온에 노출되는, 방법.

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 포유류에 철을 전달하는데 적합한 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 경구 철은 포유류에서 종종 불량하게 흡수되며 용인되고, 세계보건기구(World Health Organisation: WHO)에 따르면 철 결핍증은 선진국 및 개발도상국에서 2십억명 이상에 영향을 미친다. 이는 인지 기능, 산소 운반, 대사 및 면역 기능에 유해한 효과를 초래할 수 있다.

[0003] 철은 2가 금속 수송체 1(DMT-1)을 통한 신체 필요에 반응하여 적극적으로 흡수되고, 또한 불량한 경구 생체 이용 가능성 및 내약성을 갖는 제1철( $Fe^{2+}$ )로서 대부분 경구로 보충된다. 제2철( $Fe^{3+}$ ) 이온은 보통 위장 관점으로부터 더 양호하게 용인되지만, 제1철보다 더 불량한 생체 이용 가능성을 갖는 경향이 있다. 제1철은 계속해서 경구 철 흡수를 위한 국제 금 표준이 되며 WHO 필수 의약품 목록에 언급된 유일한 염은 제1철염이다. 황산제1철은 가장 잘 흡수되는 경구 철이다. 그러나, 이는 불량하게 흡수된 채로 남아있다. 불량한 경구 철 흡수에 대한 약제학적 접근은 용량을 증가시키는 것이다. 그러나, 이는 상당한 위장 곤란을 초래한다. 철이 있거나 또는 없



는 지연 방출 및/또는 위장 보호 제형(예를 들어 장용 코팅됨)이 시판되었지만, 덜 생체 이용 가능한 것으로 당업자에게 오랫동안 인정되고 있고, 따라서 권장되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Walker S., et al., "Bioavailability of iron in oral ferrous sulfate preparations in healthy volunteers," Canadian Medical Association Journal 1989; (141): 543-547] 참조. 보충을 위해 사용되는 경구 철의 현재 형태는 상당한 제한을 가지며, 선진국과 개발 도상국에서 우세한 유일한 영양소 결핍증인 철 결핍증의 높은 발생률을 설명하는 것을 돕는다. 본 발명자들은 놀랍게도 변성 단백질, 예를 들어 변성된 유청 단백질에 포획된 철의 위장 보호의, 맛 좋은 제형, 예를 들어 황산제1철 이상으로 개선된 생체 이용 가능성을 갖는 마이크로캡슐화된 제형이 생성될 수 있다는 것을 나타내었다. 이들은 경구 섭취용 제품, 예를 들어 식품 또는 보충물의 제조에 특히 적합하며, 이용 가능한 철은 식미 및 안정성 문제를 야기한다. 그러나, 적합한 제형은 고 단백질/철 비를 필요로 하는 경향이 있으며, 부피가 커지는 경향이 있고, 생산하는 것이 상대적으로 비싸고 경구 용량 형태, 예컨대 캡슐 또는 정제로 보충물의 제형에 그 자체를 용이하게 제공하지 않는다.

[0004] 따라서, 처리되어야 할 한 가지 문제는 저 비용의, 부피가 크지 않은 제품에서 양호한 철 흡수를 제공하는 경구 전달용 제형, 예를 들어 정제 또는 캡슐을 제공하는 것이다. 이러한 제형은 그 자체를 측정 가능한 방식으로만 들어지도록 제공하여야 한다. 이러한 제형은 신체에서 이용 가능한 철을 효과적으로 증가시키도록 철의 효과적인 전달을 제공하여야 한다. 바람직하게는 이러한 제형은 투여되는 총 용량이 더 낮다. 바람직하게는 이러한 제형은 양호한 위 내약성을 가진다. 바람직하게는 이러한 제형은 더 하부의 GI 관 내로의 감소된 철 통과를 달성한다. 적합하게는, 이러한 제형은 다른 철 제형에 비해 감소된 부작용을 입증한다.

### 발명의 내용

[0005] 본 발명은 철, 완충제, 및 변성 단백질을 포함하는 담체를 포함하는 조성물을 제공하되, 조성물이 pH 1.6에서 모의 위액(simulated gastric fluid) 중에서 30분의 과정에 걸쳐 제1철로서 철의 총 부하의 적어도 71%, 예를 들어 적어도 75%, 예컨대 적어도 80%를 방출하고, 그리고 상기 조성물이 pH 1.6에서 모의 위액 중에 놓일 때 (30분 후에) pH는 적어도 2까지 완충되고, 그리고 상기 조성물이 pH 6.6에서 모의 장액(simulated intestinal fluid) 중에 놓일 때 (30분 후에) pH는 최대 5.5, 예를 들어, pH 5.0까지 완충되며, 그리고 상기 조성물이 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크(trough to peak) 비가 등물 용량의 경구 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 적어도 120%이다.

[0006] 본 발명의 조성물은 인간을 포함하는 포유류에 대한 투여에 적합하다.

[0007] 본 발명의 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 30분의 과정에 걸쳐 그의 완충제의 적어도 50% 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 75%, 예컨대 적어도 80%를 방출한다.

[0008] 본 발명의 조성물에서 철의 방출 및 완충제의 방출은 물비, 예를 들어, 1:1 비로 생기는 것이 바람직하다. 예를 들어 물 비가 1:1인 경우, 방출되는 완충제의 중량에 의한 양은 방출되는 철의 중량에 의한 양과 실질적으로 매칭될 수 있다.

[0009] 본 발명은 철 및 변성 단백질 코어, 철 염 및 pH 조절제를 포함하는 조성물을 제공하되, 조성물은 위 조건에서 철 페이로드의 적어도 71%, 예를 들어 적어도 75%, 예컨대 적어도 80% 및 1시간에 걸쳐 그의 pH 조절제의 적어도 50% 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 75%, 예컨대 적어도 80%를 방출하고, 조성물은 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸쳐 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크 비는 산성화된 물에서 (즉시 방출) 황산제1철의 등물 용량의 경구로 투여된 트로프 대 피크 비의 적어도 120%이다.

[0010] 본 발명의 조성물은 우세하게 즉시 방출 제형 특징을 가진다. 놀랍게도, 즉시 방출 특징을 가짐에도 불구하고, 이는 잘 용인되며 다량의 철을 방출하는 조성물을 제외한 유형의 유해한 부작용을 유도하지 않는다. 더 느리게 방출하는 다른 제형이 잘 용인되는 것으로 교시되는데, 용량이 시간에 따라 서서히 방출되고 더 양호한 내약성을 허용하기 때문이다. 이들은 불량하게 흡수되는 단점이 있다. 본 발명의 조성물은 위장 보호 특징을 가진다.

[0011] 본 발명의 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 30분의 과정에 걸쳐 그의 완충제의 적어도 50% 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 75%, 예컨대 적어도 80%를 방출할 수 있다.

[0012] 조성물은 중량으로 1:50 내지 5:1, 예를 들어 1:40 내지 1:3의 철: 단백질 비를 가질 수 있다.

[0013] 본 발명의 조성물은 2.5중량% 내지 50중량%, 예를 들어 5중량% 내지 10중량%의 총 철 함량을 가질 수 있다.

[0014] 조성물은 중량으로 1:50 내지 5:1, 예를 들어 1:40 내지 1:3의 완충제/pH 조절제(예를 들어, 아세트산염/아세트

산): 단백질 비를 가질 수 있다.

- [0015] 조성물은 중량으로 1:10 내지 10:1, 예컨대 1:3 내지 3:1, 예를 들어 1:1.25 내지 2:1의 완충제/pH 조절제(예를 들어 아세트산염/아세트산과 같은 산): 철 비를 가질 수 있다.
- [0016] 조성물은 (실질적으로) 비정질일 수 있다. 이는 XRD에 의해 확인되었다.
- [0017] 변성 단백질은 적어도 50%, 80% 또는 90% 변성될 수 있다.
- [0018] 변성 단백질은 적어도 50%, 80% 또는 90% 변성된 베타 락토글로불린을 함유할 수 있다.
- [0019] 변성 단백질은 2가 금속 철 제거 공정 처리될 수 있다.
- [0020] 조성물의 물 함량은 30중량% 미만, 20중량% 미만, 예컨대 15중량% 미만, 또는 약 10중량% 미만일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 변성된 응집 단백질 기질을 포함하는 코어를 가질 수 있다.
- [0022] 담체는 코어(core) 및 표피(skin)를 포함할 수 있되, 표피는 변성된 응집 단백질을 포함한다. 선택적으로, 표피는 겔화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 코어는 변성된 응집 단백질 기질을 포함할 수 있다. 선택적으로, 변성 단백질은 철을 제외하고 100g의 단백질당 500mg 미만의 2가 금속 이온, 예컨대 100g의 단백질당 300mg 미만의 2가 금속 이온, 예를 들어 100g의 단백질당 100mg의 2가 금속 이온을 함유한다.
- [0024] 조성물은 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 트로프 대 피크 비가, 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 트로프 대 피크비의 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150% 또는 175%일 수 있다.
- [0025] 조성물은 대상체에게 투여되고, 혈청 철은 금식한 대상체에서 측정된다. 금식은 8시간 동안의 금식을 의미한다.
- [0026] 조성물은, 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 혈청 철의 트로프 대 피크 비의 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 160%, 적어도 175%일 수 있다.
- [0027] 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 70중량% 초과, 예를 들어 71중량% 초과를 방출할 수 있고; 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 75중량% 초과를 방출할 수 있고; 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 80중량% 초과를 방출할 수 있으며; 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 85중량% 초과를 방출할 수 있고; 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 제1철로서 총 철 함량의 90중량% 초과를 방출할 수 있으며; 조성물은 pH 6.6에서 모의 장액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 총 철 함량의 10중량%, 20중량%, 30중량%, 40중량%, 50중량% 또는 60중량% 초과를 방출할 수 있고; 그리고/또는 조성물은 pH 6.6에서 모의 장액 중에서 15분, 또는 30분, 또는 45분, 또는 60분의 과정에 걸쳐 총 철 함량의 80중량% 초과를 방출할 수 있다.
- [0028] 조성물은 안정제, 예컨대 아스코르브산 및 아스코르브산염을 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어 이는 L-아스코르브산, L-아스코르브산나트륨, L-아스코르브산칼슘, 팔미트산아스코빌(팔미토일 L-아스코르브산), 에리소르빈산(D-아이소아스코르브산) 및 에리소르빈산나트륨(D-아이소아스코르브산나트륨) 또는 이들의 조합물로부터 선택될 수 있다.
- [0029] 철:단백질 비는 1:20 내지 1:3, 예를 들어 1:40 내지 1:3, 예컨대 1:15 내지 약 1 내지 4, 예컨대 약 1:6 내지 약 1:12일 수 있다.
- [0030] 조성물은 평균 입자 크기가 2000 마이크로미터 이하, 1000 마이크로미터 이하, 600 마이크로미터 이하, 500 마이크로미터 이하, 또는 300 마이크로미터 이하, 또는 100 마이크로미터 이하 또는 80 마이크로미터 이하, 또는 60 마이크로미터 이하, 또는 40 마이크로미터 이하 또는 20 마이크로미터 이하인 입자로 이루어질 수 있다.
- [0031] 일 실시형태에서, 조성물 중의 철은 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 제1철을 포함한다.
- [0032] 조성물은 가속 저장 조건(40℃ 및 75% 상대 습도)에서 밀봉 용기에 저장될 때 적어도 6개월 동안 제1철 함량 및

미생물 부담에 대해 바람직하게 안정하다.

- [0033] 일 실시형태에서, 조성물은 적어도 24개월 동안 주위 조건에서 밀봉 용기에 저장될 때 제1철 함량에 대해 안정하다.
- [0034] 일 실시형태에서, 변성 단백질은 변성된 유청 단백질, 변성된 유청 단백질 단리물, 변성된 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 일 실시형태에서, 조성물은 염, 예를 들어, 단쇄 지방산, 예를 들어 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>5</sub> 지방산의 염을 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 염은, 예를 들어 용액 중에서 완충 효과를 가질 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 염은, 예를 들어 본 발명의 조성물이 용액 중에 있을 때, pH 조절제일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 완충제, 예컨대 pH 완충 효과를 갖는 염을 포함한다. 예를 들어 본 발명의 조성물의 액체 조성물을 이용하여 만들어지는 고체 입자의 형태로 제공되는 경우에, 완충제, 예를 들어 염은 입자로부터 만들어지는 액체 조성물 중의 완충제로서 작용하는 것이 바람직하다.
- [0037] 적합한 완충제는 적합한 염, 예컨대 아세트산염, 프로피온산염, 뷰티르산염, 인산염 및 시트르산염을 포함한다. 적합한 염은 1가 금속 이온의 염, 예컨대 나트륨 염을 포함한다. 적합한 염은 아세트산나트륨; 프로피온산나트륨; 뷰티르산나트륨, 시트르산나트륨을 포함한다. 하나의 적합한 염은 아세트산나트륨이다. 이러한 물질은 수소 이온(양성자) 공급원의 존재 하에 있을 때 완충제로서 작용할 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0038] 본 발명의 조성물에서, 완충제/pH 조절제는 약 3% 초과, 예컨대 약 4% 초과, 약 5% 초과, 예를 들어 약 6% 초과, 약 7% 초과, 약 8% 초과, 예를 들어 약 10% 초과, 약 12% 초과, 예를 들어 약 15%, 예컨대 약 17%일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 변성 단백질, 완충제, 예컨대 염 및 철로부터 형성될 수 있다. 이러한 조성물에서, 변성 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 5중량% 내지 80중량%; 예컨대 20중량% 내지 60중량%, 예를 들어 30 내지 50중량%의 양으로 바람직하게 존재한다. 이 조성물은 적합한 담체 액체 중에서 수행될 수 있다.
- [0040] 이러한 조성물에서, 완충제는 조성물의 총 중량을 기준으로 5중량% 내지 50중량%; 예컨대 6중량% 내지 20중량%, 예를 들어 6중량% 내지 15중량%의 양으로 바람직하게 존재한다. 이 조성물은 적합한 담체 액체에서 수행될 수 있다.
- [0041] 이러한 조성물에서, 철은 조성물의 총 중량을 기준으로 5중량% 내지 50중량%; 예컨대 5중량% 내지 20중량%, 예를 들어 5중량% 내지 10중량%의 양으로 바람직하게 존재한다.
- [0042] 바람직하게는 변성 단백질은 유청 단백질, 변성된 유청 단백질 단리물, 변성된 베타 락토글로불린, 베타 락토글로불린을 함유하는 유단백질 조성물, 또는 베타 락토글로불린을 함유하는 단백질, 또는 완두콩 단백질, 또는 이들의 조합물로부터 선택된 단백질이다. 하나의 적합한 단백질은 변성된 유청 단백질이다.
- [0043] 바람직하게는 철은 제1철, 예를 들어 본 명세서에 제시된 제1철 물질의 형태로 존재한다.
- [0044] 바람직하게는 변성 단백질은 총 100g의 단백질당 500mg 미만의 칼슘, 총 100g의 단백질당 300mg 칼슘, 예를 들어, 총 100g의 단백질당 200mg 미만의 칼슘, 예를 들어 총 100g의 단백질당 100mg 미만의 칼슘을 함유한다.
- [0045] 본 발명의 조성물의 한 가지 적합한 형태는 건조된 형태이다. 바람직하게는, 건조된 형태는 상기 논의한 액체 조성물로부터 형성된다.
- [0046] 본 발명의 조성물의 건조된 형태는 변성 단백질, 완충제, 예컨대 염 및 철을 포함할 것이다.
- [0047] 바람직하게는 조성물의 건조된 형태는 액체로부터의 임의의 물질의 분리 없이 액체 조성물로부터 형성된다. 그에 의해 운반되는 액체 및 물질은 함께 건조되는 것이 바람직하다. 따라서 분리, 예컨대 여과, 원심분리 등이 없다. 따라서, 예를 들어 건조 전에 완충제의 제거는 없다. 따라서 조성물이 수행되는 모액이 있으며, 건조 전에 해당 모액으로부터의 분리가 없고, 예를 들어, 겔 및/또는 완충제의 분리가 없다.
- [0048] 놀랍게도 액체 형태로부터 형성된 건조 물질에서 액체 형태의 완충제의 남아있는 양은 황산제1철과 같은 다른 형태보다 더 효과적이고 더 양호한 건조 물질을 초래한다는 것을 발견하였다. 완충제의 양은 고갈되지 않기 때문에(또는 실질적으로 고갈되지 않기 때문에), 액체 형태 중에서 완충 효과를 가질 뿐만 아니라, 건조 물질 중에 존재하는 철의 안정성 및 생체 이용 가능성에서 어떤 역할을 할 수 있다는 것이 생각된다. 예를 들어 산화에 대해 철의 제1철 형태를 보호할 수 있다. 이어서, 전형적으로 건조 물질은 더 높은 완충제, 예를 들어, 염, 예

를 들어 아세트산나트륨, 농도를 가질 것이다.

- [0049] 건조된 물질(도)(겔도)에 세척 처리되지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 세척 단계를 필요로 하지 않는 공정을 사용하는 것이 유용하다. 건조된 물질의 세척은 완충제, 예를 들어 아세트산나트륨과 같은 염을 제거할 수 있다는 것이 생각된다. 이는 결국 조성물로부터의 철의 방출 프로파일에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 후속적 건조를 위해 모액으로부터 겔도 분리시킬 수 있다.
- [0050] 본 발명은,
- [0051] 철; 및
- [0052] 변성된 유청 단백질을 포함하는 담체
- [0053] 를 포함하는 조성물에 관한 것이되,
- [0054] 철:단백질 비는 중량으로 1:50 내지 5:1이고,
- [0055] 상기 변성 단백질은, 철을 제외하고, 100g의 단백질당 500mg 미만의 2가 금속 이온, 예컨대 100g의 단백질당 300mg 미만의 2가 금속 이온, 예를 들어 100g의 단백질당 100mg 미만의 2가 금속 이온을 함유하며,
- [0056] 조성물의 수분 함량은 30중량%, 15중량% 또는 10중량% 미만이고,
- [0057] 상기 담체는 변성된 응집 단백질 기질 코어를 포함하며,
- [0058] 상기 철의 적어도 50, 60 또는 70중량%는 제1철이고,
- [0059] 상기 조성물은 pH 조절제, 예컨대 아세트산나트륨을 함유하며,
- [0060] 상기 조성물은, 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 적어도 150%이다.
- [0061] 본 발명의 조성물은 탈수된 철, 단백질 하이드로겔의 코어를 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명은
- [0063] 철; 및
- [0064] 변성 단백질을 포함하는 담체
- [0065] 를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 혈청 철의 증가가 필요한 포유류에서 혈청 철을 증가시키는 방법에 관한 것이되,
- [0066] 철:단백질 비는 중량으로 1:50 내지 1:3이고,
- [0067] 상기 조성물은, 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸친 혈청의 상대적 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 (즉시 방출) 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 적어도 150%이고 그리고 선택적으로,
- [0068] 상기 변성 단백질은, 철을 제외하고, 100g의 단백질당 500mg 미만의 2가 금속 이온, 예컨대 100g의 단백질당 300mg 미만의 2가 금속 이온, 예를 들어 100g의 단백질당 100mg 미만의 2가 금속 이온을 함유한다.
- [0069] 포유류, 예컨대 인간에 대한 투여는 위에서 위 pH를 위쪽으로 조절하고 장 pH를 (십이지장에서) 아래쪽으로 조절하는 것으로 생각된다.
- [0070] 본 발명은 철 및 완충제를 포함하는 조성물을 제공하되, 조성물은 pH 1.6에서 모의 위액 중에서 30분의 과정에 걸쳐 제1철로서 철의 총 부하의 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%를 방출하고, 그리고 조성물은, pH 1.6에서 모의 위액에 놓일 때 pH를 적어도 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0으로 완충시키고, 그리고 조성물은, pH 6.6에서 모의 장액 중에 놓일 때 용액을 최대 pH 5.5, 5.4, 5.3, 5.2, 5.1, 5.0, 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1, 4.0으로 완충시키며, 그리고 조성물은, 인간에게 경구로 투여될 때, 2시간에 걸쳐 혈청 철의 상대적 트로프 대 피크 비가 등물 용량의 경구로 투여된 즉시 방출 황산제1철 조성물의 상대적 트로프 대 피크 비의 적어도 120%이다.
- [0071] 이러한 조성물은 상기 제시한 바와 같은 단백질, 예컨대 변성 단백질을 선택적으로 포함할 수 있다. 본 명세서에 논의된 본 발명의 모든 양상은 이러한 조성물에 마찬가지로 적용된다.
- [0072] 본 발명은 철, 완충제 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하되, 완충제는 조성물의 약 3중량% 초과, 예컨대 약 4



중량% 초과, 약 5중량% 초과, 예를 들어 약 6중량% 초과, 약 7중량% 초과, 예컨대 약 8중량% 초과, 예를 들어 약 10중량% 초과, 약 12중량% 초과, 예를 들어 약 15중량% 초과, 예컨대 약 17중량%의 양으로 존재한다.

- [0073] 이러한 조성물은 담체, 예컨대 단백질, 예컨대 상기 제시한 바와 같은 변성 단백질을 선택적으로 포함할 수 있다. 본 명세서에 논의된 본 발명의 모든 양상은 이러한 조성물에 적용된다.
- [0074] 본 발명은 철의 전달을 위해 건조 물질을 생산하는 방법을 제공하며; 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0075] 변성 단백질 및 철 및 선택적으로 완충제를 함유하는 액체로부터 겔을 형성하는 단계;
- [0076] 겔에 전단 처리하여 액체 내에서 겔 입자를 형성하는 단계; 및
- [0077] 겔 입자를 함유하는 액체를 건조 처리하여 건조된 물질, 예컨대 건조된 입자를 형성하는 단계.
- [0078] 필수적이지 않을 수도 있지만, 본 발명의 조성물은 적합한 겔을 형성하기 위해 또는 적합한 겔을 형성하는 것을 보조하기 위해 겔화제를 포함할 수 있다.
- [0079] 겔 입자를 함유하는 액체를 건조처리, 예를 들어 분무 건조시킴으로써, 액체와 겔 입자는 둘 다 함께 건조된다. 이는 액체(예를 들어 모액)가 처음 제거되고, 이어서 남아있는 물질이 가공되는, 예를 들어 그것이 입자로 형성되는 공정과 대조적이다.
- [0080] 본 발명의 공정의 사용은 물질이 액체의 제거에 의해 달리 제거되고, 건조된 물질이 될 수 있다는 것을 의미한다. 이는 건조된 물질에서 유리한 조성 변화를 초래한다.
- [0081] 예를 들어 건조된 물질 중에 존재하는 더 다량의 완충제, 예를 들어 염, 예를 들어 아세트산나트륨에 의해, 이는 위의 pH를 상승시켜 위-보호를 제공할 수 있다. 이는 2+ 상태로 철을 보존하도록 도울 수 있다(상기 참조). 또한 철의 흡수를 도울 수 있는 십이지장의 pH를 감소시킬 수 있다.
- [0082] 본 발명의 공정이 건조된 입자를 형성하는 경우, 건조된 입자는 평균 입자 직경이 5 내지 15 마이크론, 또는 15 내지 30 마이크론, 또는 30 내지 50 마이크론, 또는 50 내지 75 마이크론일 수 있다.
- [0083] 바람직하게는 겔 입자를 함유하는 액체를 건조처리하는 단계는 건조된 입자를 형성하기 위해 분무 건조를 포함한다. 다른 건조 기법을 사용하는 것, 예컨대 최대 80℃, 또는 85℃, 또는 90℃ 또는 95℃ 또는 100℃로 제어되는 트레이 건조, 진공 건조, 드럼 건조, UV 건조를 이용하는 것이 가능하다.
- [0084] 바람직하게는 완충제가 존재하며, 2.5 내지 6.5, 또는 3.0 내지 6.0, 또는 3.3 내지 4.0의 pH를 유지한다. pH는 조성물이 액체 형태일 때 유지된다.
- [0085] 적합한 완충제는 염/산 완충제 시스템, 예컨대 아세트산나트륨/산 완충제 시스템이다.
- [0086] 건조된 입자는 철의 중량에 의해 조성물의 총 중량을 기준으로 3중량% 내지 30중량%; 예를 들어 4중량% 내지 10중량%의 양을 평균적으로 함유한다.
- [0087] 건조된 입자는 변성 단백질의 20중량% 내지 96중량%의 양을 평균적으로 함유한다.
- [0088] 변성 단백질은 유청 단백질 또는 높은 베타 락토글로불린 함량을 갖는 다른 단백질, 예컨대 완두콩 단백질일 수 있다.
- [0089] 변성 단백질은 선택적으로 2가 금속 이온 제거 공정 처리된 단백질일 수 있다.
- [0090] 철은 우세하게 제1철로서 액체 중에 존재할 수 있다.
- [0091] 바람직하게는 전단 작용은 상대적으로 짧은 시간 기간 동안 수행된다. 예를 들어 액체 제형은 1, 또는 3 또는 5, 또는 7분까지 동안 전단 작용 처리될 수 있다.
- [0092] 점성도를 증가시키는 전단 작용에 의해 형성되고 건조 처리 되기 전에 더 밀집하게 되는 겔 입자를 허용하는 것이 바람직하다. 예를 들어 겔 입자를 함유하는 액체 조성물은 최소 시간 기간, 예를 들어 10 내지 120분, 예를 들어 20 내지 40분, 예컨대 약 30분 동안 방치되도록 허용될 수 있다. 방치된 후에, 이어서, 겔 입자를 함유하는 액체 조성물은 건조처리된다. 또한, 이는 황산제1철보다 더 양호한 생체이용 가능성을 갖는 건조된 물질을 초래한다.
- [0093] 전단은 습식상에서 그리고 건조된 물질이 형성된 후보다는 건조되기 전에 적용된다는 것이 인식될 것이다.
- [0094] 더 짧은 시간 기간, 예를 들어 300분 미만, 또는 120분 미만, 또는 60분 미만, 또는 30분 미만, 또는 5분 미만,

또는 1분 미만에 걸쳐 건조 공정을 수행하는 것이 바람직하다. 건조 중인 물질이 승온 40℃ 내지 100℃, 예컨대 50℃ 내지 90℃, 예를 들어 60℃ 내지 80℃에 노출되도록 건조 공정을 수행하는 것이 바람직하다.

- [0095] 바람직하게는 본 발명의 공정은 평균 직경이 10 내지 75 마이크론의 범위인 입자를 형성한다.
- [0096] 겔은 하이드로겔일 수 있다.
- [0097] 공정 특징이지만, 또한 조성물의 완충 능력을 증가시키는 세척 단계의 결여는 또한 확장성, 수율을 증가시키고, 상품 비용을 감소시키며, 빠르게 건조될 수 있는, 예를 들어 분무 건조될 수 있는 조성물을 초래한다.
- [0098] 본 발명의 조성물은 적어도 철의 용량 수준의 3배 초과를 갖는 제형만큼 양호한 생체 이용 가능성을 달성한다.
- [0099] 더 적은 용량으로 양호한 생체 이용 가능성을 달성하는 것은 생성물이 더 큰 즉시 방출이더라도, 더 양호한 내약성을 허용한다.
- [0100] 예를 들어 도 10에 나타내는 바와 같이, 철 용량이 25mg인 본 발명의 조성물은 황산제1철의 80mg 철 용량을 갖는 명칭 탈디페론(Tardyferon)(상표명) 하에 판매되는 제형을 능가한다.
- [0101] 본 발명에서, 아세트산나트륨이 특히 유용하다. 아세트산나트륨은 아세트산, 다른 유기산(예를 들어, 뷰티르산, 아스코르브산)으로부터의 양성자 또는 위액 또는 장액에 존재하는 양성자에 대한 노출 시 완충제를 형성한다는 것이 상정된다. 이는 아세트산나트륨과 아세트산 사이의 평형상태로부터 초래된다. pH 범위 3.7 내지 5.6로 위에서 완충제를 형성할 수 있다는 것이 생각된다. 이 완충 효과는 철의 생체 이용 가능성에 기여할 수 있다는 것이 생각된다. 더 나아가 아세트산은 건조된 물질로부터 형성된 액체 조성물 중에 존재할 수 있지만, 이들 중 대부분은 건조 동안 증발될 수 있다는 것이 상정된다. 물질이 위의 낮은 pH 환경에서 양성자에 노출될 때, pH는 상승되어 위보호를 제공한다. 이 국소적 pH 완충 작용은 장 pH가 황산제1철 단독의 경우에서보다 더 저수준에서 유지되는 경우 장으로 확장되어 DMT-1의 흡수 동안 철 II를 보존할 수 있다.
- [0102] 더 나아가, 아세트산나트륨(및 게다가 아세트산)은 식품 등급 성분이다.
- [0103] 대상체에서 혈청 철을 증가시킬 수 있는, 철, 완충제 및 변성 단백질을 함유하는 조성물이 제조되었다. 예를 들어, 위장 보호 효과를 제공하는 완충 조성물 중에서 단백질 기질 내에 포획된 철 및 비결합 철을 함유하고 더 이용 가능한  $Fe^{2+}$  형태로 철을 보존하며 대상체에 철을 전달하기 위한 이전에 공지된 비히클에 비해 인간에서 철 생체 이용 가능성을 개선시킨 분무 건조된 마이크로비드가 제조되었다. 이는 작은 입자 크기, 예를 들어 80 마이크론 미만으로 달성된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0104] 도 1은 겔 형성 및 전단 입자 크기 감소를 이용하여 생성된 본 발명의 겔 마이크로비드의 입자 크기 분포를 도시한 도면. 경화 용액(500mM 황산제1철, 500mM 내지 5M 아세트산나트륨)을 IKA LR-1000에 넣고 나서, 40℃로 가열하였다. 대략 500ml의 변성된 유청 단백질 용액(10.5%)을 30초 기간에 걸쳐 첨가하였다. 유청 단백질 용액 및 겔 형성의 첨가 후에, 경화 용액을 15,000rpm에서 2분 동안 투랙스 회전 교반기(Turrax rotary-stirrer)를 이용하여 교반시키고, 용액을 낮은 교반 속도(교반기 100RPM)에서 60분 동안 경화시켜 더 점성의 겔 현탁액을 생성하였다. 형성된 습윤 입자는 또한 매우 작았는데(말번사(Malvern)로부터의 입자 크기 결과를 나타냄) D50이 33 마이크론이고 D90이 121 마이크론인 양봉형 패턴을 나타낸다. 이 예에서 건조를 위해, 샘플을 80℃로 가열하였고, 이 용액을 진공 하에 여과시켜 모액을 제거하였다. 남아있는 샘플을 80℃로 오븐에서 밤새 트레이 건조시켰다.

도 2는 본 발명의 실시형태의 양상에 따라 사용되는 장비 설비를 도시한 도면. 처음에 단백질 용액을 이하에 기재하는 바와 같이 준비하고, 이하에 기재하는 바와 같이 경화 용액과 혼합하여 겔을 형성하였다. 겔은 전단력(예를 들어, 로터 스테이터 또는 블레이드)을 이용하여 입자 크기가 감소되어 겔 입자의 목적으로 하는 입자 크기를 달성한다. 이어서, 겔 현탁액은 분무 건조기에서 2개의 유체 노즐로 펌핑되기 전에 적어도 30분 동안 부드럽게 교반된다. ①에서, 현탁액은 140℃ 내지 160℃로 가열된다. ② 이어서, 점적은 뷰키(Buchi) B-290에서 2-유체 노즐을 이용하여 형성된다. ③ 전도성 열 교환은 건조 gas와 샘플 점적 사이에 일어난다. 이는 모액으로부터 과량의 유체를 제거하며, 또한 겔 비드 내에서 유체를 제거한다. ④ 입자는 사이클론 기술을 이용하여 수집된다. ⑤ 배출구 필터에서 미세한 입자의 수집이 있다. ⑥ 건조 gas는 흡입기에 의해 전달된다.

도 3은 분무 건조에 의해 제조되는 조성물의 마이크로비드 이미지를 나타내는 저배율 SEM을 도시한 도면. 주사 전자현미경(SEM) 이미지를 제미니(Gemini)(등록상표) 칼럼(제이스(Zeiss))을 이용하여 제이스 울트라 플러스 필

드 방출 SEM(Zeiss Ultra Plus Field Emission SEM) 상에 기록하였다. 건조 샘플 비드를 임의의 추가적인 제제 또는 샘플 코팅 없이 수행 탄소 테이프 상에 두었다. 2 내지 3kV의 가속화 전압을 사용하여 광대한 방전 효과를 극복하였다.

**도 4**는 겔 형성, 전단력 입자 크기 감소 및 분무 건조를 이용하여 생성된 조성물의 ST1501 마이크로비드의 대부분의 즉시 방출 조성물을 나타내는 펄스(pH 1.6 용액)의 존재 하에 pH 1.6에서 용해 시 비교되는 철 II 프로파일의 예를 도시한 도면(실시예 1). 상술한 방법을 이하에 기재한다. 이 프로파일은 조성물이 위를 모방하는 실험 조건(낮은 pH, 소화 효소)에서 높은(71% 초과) 철 II를 방출한다는 것을 나타낸다.

**도 5**는 펄스(pH 1.6 용액) 및 판크레아틴(pH 6.6 용액)의 존재 하에 30분 후에 pH 1.6 및 pH 6.6에서 조성물의 마이크로비드로부터의 용해에서 pH 프로파일의 예를 도시한 도면. 황산제1철에서 등물 용량의 철과의 비교를 나타낸다. 상술한 방법을 이하에 기재한다. 이 프로파일은 본 발명의 조성물이 황산제1철 또는 위를 모방하는 실험 조건(낮은 pH, 소화 효소)에서 완충제가 없는 조성물보다 더 높은 pH에서 위 pH를 완충시킨다는 것을 나타낸다. 이는 철에 결합하고/하거나 그의 흡수를 차단시킬 수 있는 다른 완충제와 달리 위보호를 제공할 수 있다. 이 프로파일은 또한 본 발명의 조성물이 장을 모방하는 실험 조건(더 높은 pH, 소화 효소 및 담즙산염)에서 황산제1철보다 더 낮은 pH에서 장 pH를 완충시킨다는 것을 나타낸다. 더 높은 pH는 철 II의 산화를 지연시킬 수 있고, DMT-1에서 철 흡수를 용이하게 할 수 있다.

**도 6**은 2시간에 걸쳐 공복 대상체(n=3)에서 등물의 철 용량으로 본 발명의 ST1501 마이크로비드 및 황산제1철의 비교가 되는 혈청 철 트로프 대 피크 비의 예를 도시한 도면.

**도 7**은 변성된 유청 단백질에 비해 영역 1560 내지 1410cm<sup>-1</sup>에서 조성물 중의 특징적 아세트산나트륨 피크의 특징적 존재를 나타내는 FTIR을 도시한 도면. 4000 내지 650cm<sup>-1</sup>의 퍼킨엘머 스펙트럼(PerkinElmer Spectrum) 100 FT-IR 분광기 상에서 그리고 감쇠 전반사(attenuated total reflection: ATR) 샘플링을 이용하여 적외선 측정을 수행하였다. 도 7B는 감소된(3% w/w 미만) 아세트산나트륨 조성, 감소된 아세트산염:철 비 및 감소된 아세트산염:단백질 비를 반영하는 영역 1560 내지 1410cm<sup>-1</sup>에서 조성물 중의 감소된 아세트산나트륨 피크를 나타내는 FTIR을 도시한 도면.

**도 8**은 분무 건조 단독(A) 후에 그리고 80℃에서 추가적인 건조와 함께 분무 건조 후에 본 발명의 마이크로비드의 건조 시 손실의 열중량 분석(TGA)을 도시한 도면. 칭량된, 분말 샘플(10 내지 15mg)을 개방 세라믹 팬에서 분석하였다. TGA 측정을 위해, TA-기기 열중량 분석기 TGA-Q50 기기를 다음의 온도 프로그램에 따라 사용하였다: 샘플을 120℃(10℃/분)으로 가열, 120℃에서 45분 등온.

**도 9A**는 본 발명의 조성물의 대체로 비정질 특성을 나타내는 분말 XRD를 도시한 도면. 결정질 황산철(II)과 관련된 전형적인 PXRD 피크는 존재하지 않는다. 리가쿠 미니플렉스(Rigaku Miniflex) II 데스크탑 X-선 회절계(일본 도쿄에 소재한 리가쿠(Rigaku))를 이용하여 낮은 배경 실리콘 샘플 홀더에 넣은 샘플에 대해 PXRD 측정을 수행하였다. PXRD 패턴을 0.05° /s 단계에서 2θ 규모로 5° 로부터 80° 까지 기록하였다. Cu 애노드( $\lambda$ CuK $\alpha$ 01.54 Å)로 구성된 X선 관을 전압 30 kV 및 전류 15mA 하에 작동시켰다. 그러나 광범위 기준 피크는 단백질 구조에서 저수준 규모를 반영한다. **도 9B**는 결정도의 증거를 나타내는 황산제1철 7수화물과 물리적으로 혼합된 변성된 유청 단백질의 X선 회절 프로파일을 도시한 도면.

**도 10**은 원소 철 용량 105mg에서 페로그라드 C(Ferrograd C)를 섭취하고 후속적으로 ST1501에 대해 교차된 공복 대상체(n=3)에서의 혈청 철 농도를 도시한 도면.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105]

본 명세서에서 사용되는 용어 "칼슘-고갈된" 또는 "석회질 제거된" 또는 "적어도 부분적으로 2가 금속 이온 제거 처리된"은 칼슘의 제거를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 2가 금속 이온 제거 공정을 겪은 단백질 원 재료를 지칭할 것이다. 바람직하게는, 석회질 제거된 단백질은 100g의 단백질당 500mg 미만의 칼슘, 100g의 단백질당 200mg 미만의 칼슘, 100g의 단백질당 100mg 미만의 칼슘, 100g의 단백질당 50mg 미만의 칼슘, 또는 단지 미량의 칼슘을 포함한다. 대안적으로, 석회질 제거된 단백질은 (철을 제외하고) 1% 미만의 2가 금속 이온(w/w), 0.5% 미만의 2가 금속 이온(w/w), 0.1% 미만의 2가 금속 철s (w/w), 또는 단지 미량의 2가 금속 이온을 함유할 수 있다. (a) 투석 및/또는 한외여과 및/또는 정용여과를 이용하는 산성화, 및 또는 (b) 칼슘 킬레이트제/격리제(들)를 이용하는 것 그리고/또는 (c) 양이온 교환 방법을 이용하는 것을 포함하는, 당업자에게 명백한 단백질의 탈석회화의 표준 방법이 있다.

- [0106] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "단백질계 담체"는 조성물 내로 철의 형성과 조합된 단백질계 공급원으로부터 적어도 부분적으로 유래된 물질을 의미하도록 취해져야 한다. 담체는 그의 의도된 목적에 적합한 조성물을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 목적은 포유류 대상체에 대한 철의 효과적인 전달일 수 있다. 단백질 담체는 조성물에 이점을 제공할 수 있다. 이러한 이점의 예는 조성물에 유리하게 변형된 철-방출 프로파일을 제공하는 것, 조성물에 추가적인 항산화 효과를 부여하는 것, 조성물의 투여로부터 초래된 위장의 불편함 수준을 감소시키는 것 및 철 흡수 수준을 개선시키는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0107] 본 명세서에서 사용되는 용어 "변성 단백질"은 적어도 부분적으로 변성된, 즉, 적어도 5% 변성 단백질을 의미한다.
- [0108] 본 명세서에서 사용되는 "캡슐화" 또는 "포획된"은 기질(보통 비드 또는 구체 또는 마이크로비드로서 지칭됨) 또는 코어-겍질 캡슐(보통 캡슐로서 지칭됨) 내의 사전 선택된 물질(들)의 완전한 환경(포착)을 수반하여 크기가 몇 백 나노미터로부터 몇 센티미터까지의 범위에 있는 입자를 제공하는 공정을 의미한다.
- [0109] 본 명세서에서 사용되는 "결합된 철"은 용이하게 세척되지 않는 철을 지칭하고, "비결합 철"은 용이하게 세척될 수 있다. 이들 용어는 공유 또는 이온 결합을 나타내도록 의도되지 않는다.
- [0110] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대체로 비정질"은 결정도와 관련된 XRD에서 단거리 질서 증거의 부재를 의미한다. 다시 말해서, 낮은 결정도 - 예를 들어, 도 9를 참조한다.
- [0111] 본 명세서에서 사용되는 "비정질" 물질은 대체로 비정질 물질을 포함한다.
- [0112] 캡슐은 정해진 그리고 독특한 코어(캡슐화된 물질로 이루어짐) 및 서로 분리된 겍질 부분으로 구성된다. 바람직한 실시형태에서 마이크로비드는 구조(즉, 기질) 전체적으로 분포된 (캡슐화된) 물질을 갖는 구체 구조이다. 마이크로비드는 내부와 동일한 조성을 갖지만 내부와 상이한 구조 및 화학적 특성을 갖는 표면층("표피")을 가질 수 있다. 표피 두께 및 구조는 마이크로비드 특성 및 거동 - 예를 들어, 팽윤, 굽힘성 및 페이로드 확산에 영향을 미칠 수 있다.
- [0113] 본 발명의 바람직한 실시형태는 황산제1철과 달리 위 pH를 조절함으로써 위에서의 유해 효과를 감소시킨다(도 5). 이는 의학 제품의 유해 효과를 경험하지 않고 철 흡수를 유지하는 방법을 제공한다. 이는 다른 유해 효과, 예컨대 철 흡수와 관련된 불량한 식미 없이 보충물을 이용하여 철 흡수를 더 효과적으로 유지하는 방법을 제공한다.
- [0114] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 별개의 마이크로비드를 포함하는 마이크로비드 제제를 제공하며, 이때 마이크로비드는 철 및 변성 단백질을 포함한다. 일 실시형태에서, 철은 변성 단백질 기질 코어 내에 포획된다. 선택적으로 비드는 또한 겔화제, 예컨대 복합 탄수화물, 예컨대 알긴산염 또는 단백질, 예컨대 젤라틴을 함유할 수 있다.
- [0115] 선택적으로 비드는 가공을 돕는 활택제를 함유할 수 있다. 적합한 활택제는 류신, 스테아르산마그네슘, 콜로이드 이산화규소, 전분 및 탈크 및 이들의 조합물을 포함한다.
- [0116] 추가적인 철 부하는 철 용액에서 경화 전에 미세액적의 표면 상에 음전하를 적용함으로써 또는 경화 온도 또는 단백질 변성 수준을 달리함으로써 또는 철을 킬레이트화하는 것으로 알려진 물질, 예컨대 비타민 C(아스코르브산)를 혼입함으로써 달성될 수 있다.
- [0117] 일 실시형태에서, 단백질 기질 내 단백질은 칼슘 고갈을 초래하는 2가 금속 이온 제거 공정 처리되었다.
- [0118] 적합하게, 단백질 기질 내 단백질은 유청 단백질, 베타 락토글로불린을 함유하는 다른 우유 단백질 조성물, 또는 완두콩 단백질을 포함한다. 바람직하게는 단백질은 변성된 유청 단백질 또는 칼슘 고갈된 변성된 유청 단백질이다.
- [0119] 일 실시형태에서, 마이크로비드는 2.5 내지 50% 철을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 건조 중량에 대해 20% w/w까지, 5% w/w 초과, 또는 5 내지 10%의 철 함량을 함유한다.
- [0120] 철 백분율은 마이크로비드의 분해 후에 기기 분석 또는 비색 분석에 의해 추정될 수 있다. 칼슘 고갈된 마이크로비드에서 철을 반영하는 총 잔여 무기물 함량은 고온 열중량 분석에 의해 추정될 수 있다. 대안적으로, 마이크로비드는 바람직하게는 약 1:50 내지 약 1:1, 약 1:40 내지 약 1:1, 약 1:30 내지 약 1:2, 약 1:20 내지 약 1:3 or 1:5, 약 1:10 내지 약 1:3, 또는 약 1.2:100 내지 약 1:2 범위, 또는 이들 비의 다른 범위의 철:단백질



의 비를 가진다.

- [0121] 전형적으로, 마이크로비드 내 철은, 예를 들어, 황산제1철, 푸마르산제1철, 글루콘산제1철, 비스글리신산제1철, 타우린산제1철, 시트르산제1철, 아스코르브산제1철, 염화제1철, 질산제1철, 락트산제1철, 아세트산제1철, 탄산제1철/능철석, 산화제1철 또는 철 아미노산 또는 철 탄수화물 킬레이트 또는 착물로부터 유래되도록 수 있는 제1철(II)을 함유한다. 본 발명의 조성물은 제2철(III) 또는 철 II와 철 III의 혼합물을 함유할 수 있다. 조성물의 철 함량은 바람직하게는 적어도 10, 25, 50, 75, 90, 95, 98 또는 99중량%의 제1철을 함유한다.
- [0122] 바람직하게는, 마이크로비드는 아세트산염, 시트르산염, 인산염 또는 아스코르브산염 반대이온을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 이들 이온은 제1철의 산화를 감소시킴으로써 안정성을 개선시키고/시키거나 방출 특징을 개선시킨다.
- [0123] 본 발명은 또한 포유류에 본 발명에 따른 조성물(바람직하게는 마이크로비드)을 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 생체 이용 가능한 철을 증가시키는, 예컨대 철 결핍증을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0124] 본 발명에 따른 조성물은 당업계에 공지된 임의의 전달 비히클에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 실시형태는 식용 제형, 예컨대 분말(예컨대 영아용 조제식), 태아 비타민 제형, 멀티비타민 제형, 보충물, 츄어블 보충물, 구미(gummy), 식품(예컨대, 초콜렛 또는 지방/오일), 음료, 동물 사료, 정제, 캡슐 또는 현탁액이다. 더 낮은-식미 실시형태는 바람직하게는 캡슐 또는 코팅 정제의 형태이다.
- [0125] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 유효량을 전달하기에 충분한 투약량으로 투여된다. 당업자는 특정 대상체의 필요를 결정할 수 있고 적절한 투약 요법을 결정하기 위해 본 발명의 조성물의 생체 이용 가능성을 고려한다.
- [0126] 일 실시형태에서, 비드는 변성 단백질을 포함하는 담체 및 철을 제공하고; 담체를 미세액적으로 형성하며; 미세액적을 비드로 경화시키고; 그리고 비드의 수분 함량이 10중량% 미만, 7중량% 미만, 5중량% 미만 또는 3중량% 미만일 때까지 비드를 건조시킴으로써 제조된다.
- [0127] 다른 실시형태에서 비드는 변성 단백질을 포함하는 담체 및 선택적으로 철을 제공하고; 담체를 미세액적으로 형성하며; 철을 함유하는 경화 용액 중에서 미세액적을 비드로 경화시키고; 그리고 비드의 수분 함량이 10중량% 미만, 7중량% 미만, 5중량% 미만 또는 3중량% 미만일 때까지 비드를 건조시킴으로써 제조된다.
- [0128] 바람직하게는, 비드는 변성된 응집 단백질 표피를 가진다.
- [0129] 철을 함유하는 경화 용액 내로 미세액적을 점적함으로써 미세액적이 경화된다면, 철에 추가로, 경화 용액은 100 내지 1000mM 범위에서 나트륨과 같은 1가 이온을 함유할 수 있다. 적합한 나트륨 염은 아세트산나트륨, 염화나트륨 및 황산나트륨을 포함한다. 경화 용액은 또한 계면활성제, 예를 들어, 트윈(tween)을 함유할 수 있다. 경화 용액의 pH는 단백질 응집(마이크로비드의 경화)을 촉진시키기 위해 HCl 또는 아세트산 또는 아스코르브산을 도입함으로써 변형될 수 있다. 마이크로비드 내로의 추가적인 철 흡수 및 개선된 형상은, 예를 들어 정전기적 하전 장치를 이용하는 것에 의해 경화 전에 미세액적의 표면 상에 음전하를 적용시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0130] 바람직하게는 경화 용액은 pH의 변형을 통해 그리고 단백질 측쇄 상에 반대 이온을 전달함으로써 응집 및 경화(단백질 응집)에 영향을 미치는 유기산, 예컨대 아세트산을 함유한다. 아세트산염 또는 비슷한 반대 이온의 존재는 적외선 분광학과 같은 기법에 의해 얻어진 마이크로비드에서 검출될 수 있다.
- [0131] 경화된 비드가 건조 전에 비결합 또는 약하게 결합된 철을 제거하기 위해 세척될 수 있지만, 그들은 세척되지 않는 것이 바람직하다. 세척된다면, 탈이온수를 이용하여 또는 예를 들어 아세트산염 완충제, 시트르산염 또는 아스코르브산나트륨의 수용액을 이용하여 수행될 수 있다. 더 많은 세척은 일반적으로 조성물 중의 철 및/또는 완충제의 양을 감소시킬 것이다.
- [0132] 건조는 40 내지 100℃, 바람직하게는 약 80℃에서 오븐에서 행해질 수 있다. 대안적으로, 건조는 더 낮은 온도, 예컨대 실온에서 진공 하에 행해질 수 있다. 바람직하게는 건조는 질소 또는 아르곤 분위기 하에 수행된다.
- [0133] 다른 실시형태에서, 건조는 15℃ 내지 90℃, 25℃ 내지 60℃, 또는 실온에서 일어난다. 일부 실시형태에서, 건조 단계는 대기압 하에 수행될 수 있다. 일부 실시형태의 다른 양상에서, 건조 단계는 적어도 부분적 진공 하에 수행될 수 있다.
- [0134] 일부 실시형태의 양상에서, 건조 단계는 조성물의 총 중량의 40% 내지 90% 또는 조성물의 총 중량의 70 내지 80%의 상실을 초래한다.

- [0135] 건조는 대기 산소에 대한 노출을 감소시키는 한편, 건조 입자의 들러붙음을 방지하는 일정한 움직임으로 입자를 유지하기 위해 진공 하에 회전 드럼 건조기에서 수행될 수 있다. 건조를 위해 사용되는 다른 기법은 제어 가능한 대기 조건 하에 입자의 움직임을 유지하는 건조를 허용하는 진동 유동층 건조기 또는 회전 증발기, 또는 입자의 빠른 건조를 달성하기 위한 분무 건조를 이용하는 것을 포함한다. 건조는 또한 마이크로비드 위로 일정한 기류 또는 질소 흐름을 공급함으로써 수행될 수 있다.
- [0136] 일 실시형태에서, 본 발명은 마이크로비드의 제조에 관한 것이며, 이때 마이크로비드는 기질 내에서 마이크로캡슐화된 그리고/또는 포획된 철을 갖는 변성된 칼슘 고갈 단백질로부터 형성된 중합된 기질을 포함한다.
- [0137] 전형적으로, 마이크로비드는 일반적으로 스페로이드(spheroid) 형상을 가진다. 일부 실시형태에서, 평균 직경은 2000 마이크로미터 이하, 1000 마이크로미터 이하, 600 마이크로미터 이하, 500 마이크로미터 이하, 또는 300 마이크로미터, 또는 80 마이크로미터 미만이다. 일부 실시형태에서, 입자 크기 분포는 좁다.
- [0138] 일부 실시형태에서 입자는 평균 직경이 0.2 내지 4000 마이크로미터이다. 입자는 직경이 0.2 내지 4000 마이크로미터, 50 내지 2000 마이크로미터, 150 내지 1000 마이크로미터, 또는 300 내지 600 마이크로미터인 입자 크기를 갖는 비드의 형태일 수 있다. 일부 실시형태에서, 입자는 직경이 0.2 내지 75 마이크로미터, 1 내지 60 마이크로미터, 5 내지 50 마이크로미터, 또는 10 내지 50 마이크로미터인 평균 직경을 가진다. 일부 실시형태에서 특정 크기 이상의 비드가 바람직하데, 그들이 더 양호한 유동 특성을 나타내어, 조절 동안 응집 가능성 및 케이킹 방지제 등의 사용에 대한 필요를 감소시킬 수 있기 때문이다. 대안적으로, 입자는 크기가 0.2 마이크로미터 미만인 나노입자일 수 있다.
- [0139] 조성물은 입자 그 자체를 포함할 수 있거나, 또는 조성물은 1회 이상의 추가적인 가공 단계를 겪는 이러한 입자의 최종 결과를 포함할 수 있었다. 이는 사용 시, 단백질의 비드 바깥쪽 주변의 보호 코팅을 형성할 수 있기 때문에 유리할 수 있다. 이는 단계적 방출 프로파일을 초래할 수 있다.
- [0140] 본 발명의 마이크로비드는 바람직하게는 빠르게, 승온에서 진공 하에 또는 질소 분위기에서 건조된다. 얻어진 마이크로비드는 (건조 후에) 바람직하게는 열중량 분석에 의해 표시되는 바와 같이 10% 미만의 수분을 가진다 (예를 들어 도 8 참조).
- [0141] 다른 실시형태에서, 제1철 함유 용액이 제조되고, 별개로 칼슘 고갈된 변성된 유청 단백질 현탁액이 제조된다.
- [0142] 본 발명의 일 실시형태는 철, 완충제, 및 변성 단백질을 포함하는 담체를 포함하는 조성물이다. 조성물 중의 철은 바람직하게는 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 제1철을 포함한다. 변성 단백질은 바람직하게는 유청 단백질, 유청 단백질 단리물, 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합물을 포함한다. 바람직하게는, 변성 단백질은 적어도 5% 변성된다. 일 실시형태에서, 변성 단백질은 적어도 5% 변성된 베타 락토글로불린을 함유한다. 철:단백질 비는 중량으로 바람직하게는 약 1:50 내지 약 1:3이다.
- [0143] 바람직하게는, 조성물은, 인간에게 경구로 투여될 때, 산성화된 물 중에서 황산제1철의 등물 용량의 경구로 투여된 용액의 생체 이용 가능성보다 적어도 20%, 30%, 40% 또는 50% 더 큰 생체 이용 가능성 또는 산성화된 물 중에서 황산제1철의 등물 용량의 경구로 투여된 용액의 생체 이용 가능성보다 적어도 120%, 130%, 140% 또는 150%의 상대적 생체 이용 가능성을 가진다. 생체 이용 가능성은 혈청 철 AUC를 측정하기 위해 본 명세서에 기재된 시험 방법에 기반한다.
- [0144] 바람직하게는, 조성물의 수분 함량은 10중량% 미만, 7중량% 미만, 약 3 내지 10%, 약 3 내지 7중량%, 또는 약 5 내지 7중량%이다.
- [0145] 일 실시형태에서, 조성물은 안정제, 예컨대 아스코르브산, 또는 아스코르브산염(아스코르브산나트륨, 아스코르브산칼슘, 아스코르브산의 지방산 에스터), 토코페롤(알파-토코페롤, 감마-토코페롤, 델타-토코페롤), 갈산프로필, 갈산옥틸, 갈산도데실, 에리소르빈산, 에리소르빈산나트륨, 3차-뷰틸 하이드로퀴논, 뷰틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 뷰틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0146] 바람직한 실시형태에서, 조성물은 산성화된 물 중에서 상업적으로 입수 가능한 철 제형, 예컨대 황산제1철보다 더 맛이 좋다.
- [0147] 바람직한 실시형태에서, 조성물은 pH 1.6 및 pH 6.6에서 그의 용해 프로파일이 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만으로 변하거나 또는 주위 조건에서 밀봉 용기에서 저장될 때 적어도 6개월, 바람직하게는 적어도 2년 동안 철 II 방출에 대해 실질적으로 변하지 않는다는 점에서 안정하다. 바람직한 실시형태에서, 조성물은 주위 온도에서 밀봉 용기에서 저장될 때, 적어도 6개월, 바람직하게는 적어도 2년 동안 미생물 부패에 대해 안정하다. 미생물 부패에 대한 안정성은 조성물이 "언을 수 있는 미생물이 없다"는 것을 의미하는데, 해당 어구는 21 CFR

211.165의 FDA에 의해 해석되기 때문이다. 바람직하게는, 이는  $10^3$  cfu/1000mg의 최대 허용량(Maximum Tolerable amount)에 따른 총 생균 계수 및  $10^2$  cfu/1000mg의 최대 허용되는 총 효모 및 곰팡이, 및 이콜라이(E-Coli)의 부재를 포함한다.

[0148] 바람직한 실시형태에서, 조성물은 경구 투여를 위한 마이크로비드의 형태이다. 바람직하게는, 경구 투여 후에, 브리스톨 대변 척도(본 명세서에 기재됨)를 이용하여 평가되는 바와 같은 변비의 발생률은 적어도 50%만큼 감소되고/되거나 변형된 위장 증상 등급 척도(Gastrointestinal Symptom Rating Score)(본 명세서에 기재)를 이용하여 평가되는 구역의 발생률은 적어도 50%만큼 감소된다.

[0149] 조성물에 적용되는 용어 "칼슘 고갈된"은 조성물이 100g의 단백질당 500mg 미만의 2가 금속 이온(예컨대 칼슘), 예컨대 100g의 단백질당 300mg 미만의 2가 금속 이온, 예를 들어 100g의 단백질당 100mg 미만의 2가 금속 이온을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 표준 방법에 의해 측정되는 2가 이온/칼슘의 0.1% 미만 또는 미량만을 함유한다.

[0150] 특정 실시형태에서, 본 발명의 마이크로비드는 (건조 중량%로서): 75 내지 95% 또는 85 내지 95% 변성된, 선택적으로 칼슘 고갈된, 유청 단백질 또는 유청 단백질 단리물; 및 2.5 내지 10.0% 철을 포함한다.

[0151] 변성된 유청 단백질은, 예를 들어, 변성된 유청 단백질 농축물 또는 변성된 유청 단백질 단리물일 수 있다. 유청 단백질을 변성시키는 방법은 당업자에게 공지될 것이며, 열 변성 및 압력-유도 변성을 포함한다. 본 발명의 일 실시형태에서, 유청 단백질은 70°C 내지 140°C, 바람직하게는 약 80°C의 온도에서 열 변성된다. 유청 단백질은 15분 초과 동안 70°C 초과 온도에서 가열된다. 보통, 유청 단백질은 변성 동안 교반된다. 가용성 올리고머의 비폴딩/변성 및 형성을 모니터링하는 몇몇 방법이 공지될 것이다. 이들은 동적광산란 및 크기 배제 기법을 포함한다. 이는 노출된 티올과의 반응 시 착색된 부산물을 생성하는 5,5'-다이티오비스-(2-나이트로벤조산) 또는 DTNB를 이용하여 유청 단백질 용액에서의 티올 노출 정도를 모니터링하는 데 유용하다. 바람직한 실시형태에서, 단백질 또는 베타 락토글로불린의 변성 정도는 80% 초과 또는 90% 초과인데, 이는 DTNB를 이용하여 측정될 수 있다.

[0152] 일부 실시형태에서, 본 발명의 공정에서 사용되는 단백질은 (수분, 탄수화물 및 지방이 없을 때 기준으로) 적어도 90%, 94% 또는 98% 단백질 함량을 가진다.

[0153] 적합하게는, 적어도 부분적으로 변성 단백질 용액/현탁액의 농도는 4 내지 30%, 바람직하게는 7 내지 30%, 및 이상적으로는 9 내지 16%(w/v)이다. 전형적으로, 단백질은 유청 단백질이고, 이상적으로는, 현탁액은 점진적으로 감소되는 기공 크기를 갖는 일련의 필터를 통과한다.

[0154] 철 염의 예는 황산제1철, 푸마르산제1철, 글루콘산제1철, 비스글리신산제1철, 타우린산제1철, 시트르산제1철, 아스코르브산제1철, 염화제1철, 질산제1철, 락트산제1철, 아세트산제1철, 탄산제1철/능철석, 산화제1철을 포함한다. 이들 염의 제2철 형태뿐만 아니라 이인산제2철나트륨, 시트르산제2철암모늄 및 염화제2철을 포함한다.

[0155] 다른 실시형태에서, 예를 들어 황산염, 인산염, 염산염, 아세트산염, 프로피온산염, 말레산염, 벤조산염, 살리실산염, 푸마르산염, 글루탐산염, 아스파르트산염, 시트르산염, 락트산염, 숙신산염, 타르타르산염, 글리콜산염, 핵산산염, 옥탄산염, 데칸산염, 올레산염, 스테아르산염, 비스글리신산염, 푸마르산염, 글루콘산염을 함유하는 무수 또는 수화된 상태로 제2철 및/또는 제1철 이온 착물 또는 염을 함유하거나 또는 이들을 갖는 조성물이 제조될 수 있었다. 사용되는 이들 철 복합체 및 염은 또한 상이한 산화철, 산화물-수산화물 또는 수산화물일 수 있었다. 혼합된 산화 상태로 철 염, 및 그들의 수화물을 갖는 조성물이 제조될 수 있었다.

[0156] 일 실시형태에서, 제1철 용액은 pH가 5 미만 또는 4.5 미만이다.

[0157] 겔화 용액은 전형적으로 칼슘 이온이 없다. 겔화 용액은 0.1 내지 1M 또는 전형적으로 0.2 내지 0.5M의 나트륨 농도를 가진다. 적합하게는, 용액은 유기산 농도가 0.1 내지 0.6M, 전형적으로 0.15 내지 0.25M이고, 그리고 이상적으로는 약 0.2M이다. 전형적으로, 용액은 pH 3 내지 4.5, 적합하게는 4 미만이다. 일반적으로, 용액은 온도가 20 내지 65°C, 전형적으로는 약 45°C이다. 전형적으로, 산성 겔화 용액은 형성된 마이크로비드의 응집을 방해하거나 또는 저해하기 위해 계면활성제를 포함한다. 적합하게는, 계면활성제는 폴리솔베이트 계면활성제, 이상적으로는 트윈 20이다. 겔화 용액은 활택제, 예컨대 류신 또는 스테아르산마그네슘을 함유할 수 있다. 혼합 시, 변성 단백질 용액 및 산성화/겔화 용액, 하이드로겔 망이 즉시 형성된다. 이는 산성 환경에서 추가로 경화되는 하이드로겔 미립자를 형성하는 고전단 혼합에 의해 파괴된다.

- [0158] 적합하게는, 형성된 마이크로비드는 적어도 15분의 기간 동안 (겔화 후에), 그리고 바람직하게는 적어도 20분의 기간 동안 겔화 용액 중에서 연장된 경과 기간으로 처리된다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 형성된 마이크로비드는 20 내지 180, 20 내지 120, 또는 20 내지 60분의 시간 기간 동안 경화된다. 이상적으로는, 경화 용액은 경화 과정 동안 교반된다.
- [0159] 본 발명의 마이크로비드는 전형적으로 포유류 위를 통한 통과 동안 무손상으로 잔존할 수 있고 그리고 위 말단의 위장에서, 예를 들어 소장에서 제1철을 방출할 수 있다. 용어 "위에서 무손상으로 잔존하는"은 마이크로비드가 위장 수술 동안 포유류 위에서 위 및 펩신 파괴에 저항한다는 것을 의미한다.
- [0160] 미세액적을 생산하는 바람직한 방법은 진동 기법에 의한 프릴링(prilling)이며, 이때 노즐을 통한 압출 바로 전에 또는 동안에 그리고 정해진 애퍼처 크기를 갖는 노즐에 정해진 진폭을 갖는 S자형 진동수를 적용함으로써 압출 라미나 제트(laminar jet)의 라미나 파괴가 유도될 때까지 변성된 칼슘 고갈된 단백질 및 철 염은 별개로 제조되고 혼합되지 않는다. 진동 노즐 기계의 예는 캡슐화기(ENCAPSULATOR)(스위스 플라빌에 소재한 뷔키 래버테크니크 아게(BUCHI Labortechnik AG)), 닛소 엔지니어링 아게(Nisco Engineering AG)에 의해 생산된 기계, 또는 동등한 스케일업 버전, 예컨대 BRACE GmbH 등에 의해 생산된 것이다.
- [0161] 전형적으로, 노즐은 애퍼처가 60 내지 2000 마이크로미터, 바람직하게는 100 내지 500 마이크로미터, 적합하게는 140 내지 300 마이크로미터, 및 이상적으로는 약 150 마이크로미터이다.
- [0162] 적합하게는, 진동 노즐의 작동 주파수는 100 내지 20,000Hz이다. 선택적으로 정전기 퍼텐셜은 액적에 첨가되되, 노즐과 경화 용액 사이의 정전기 퍼텐셜은 전형적으로 0.15 내지 0.3V이다. 적합하게는, 진폭은 4.7kV 내지 7kV이다. 전형적으로, 낙하 거리는 (노즐로부터 산성화 욕까지) 50cm 미만, 바람직하게는 40cm 미만, 적합하게는 20 내지 40cm, 바람직하게는 25 내지 35cm, 그리고 이상적으로는 약 30cm이다. (노즐을 통과하는) 현탁액의 유속은 전형적으로 3.0 내지 20ml/분이고; 이상적인 유속은 공정 내에 이용되는 노즐 크기에 의존한다.
- [0163] 일 실시형태에서, 상기 공정은 적합성을 위해 생성되는 초기 마이크로비드의 크기를 모니터링하는 단계를 수반한다.
- [0164] 적합한 조성물은 식용 제품, 예컨대 식료품 및 음료, 및 임의의 형태의 식품 보충물, 예를 들어 단위 용량 제품, 분말 등을 포함한다. 전형적으로 식료품은 건강 드링크, 요거트 및 요거트 드링크, 헬스바 등을 포함한다. 조성물은, 예를 들어, 영아용 조제식 분말, 태아기 비타민, 멀티비타민, 보충물, 츄어블 보충물, 구미, 식품, 음료, 동물 사료, 정제, 캡슐 또는 현탁액으로서 식용의 그리고 경구 활성인 제형의 성분일 수 있다.
- [0165] 본 발명의 마이크로비드의 제제는 건조 형태, 예를 들어, 분무 건조, 드럼 건조, 탈수 또는 냉동 건조된 형태로 제공될 수 있거나, 또는 그들은 현탁액으로서 적합한 용매, 예를 들어, 물과 함께 제공될 수 있다.
- [0166] 변성된 칼슘 고갈된 유청 단백질 단리물(whey protein isolate: WPI)은 본 발명의 마이크로비드를 생산하는 데 바람직하다. 유청 단백질 농축물(Whey protein concentrate: WPC)은 가능한 캡슐화 물질이다.
- [0167] 본 기법의 일 양상은 변성된 칼슘 고갈된 유청 단백질 단리물/농축물의 사용을 수반한다. 일부 실시형태에서, 단백질 원료의 2가 금속 함량을 감소시키는 것은 가공 동안 단백질 용액의 자발적 겔화를 감소시키고, 그의 철 결합 특징을 향상시키며, 포유류에 대한 투여 후 칼슘 방출을 감소시키고, 따라서 철 흡수를 향상시킨다. 칼슘은 DMT-1를 통해 철 흡수를 저해한다.
- [0168] 건조된 칼슘-고갈 WPI는 철 마이크로캡슐화를 위한 최적의 조성물 중에 적합하게 용해된다. 칼슘 고갈된 유청 단백질 단리물(WPI)은 아세트산나트륨 및 황산제1철의 존재 하에 압출 및 캡슐화에 적합한 단백질 응집물의 가용성 분산물의 생산을 가능하게 하기 위해 적절한 환경 조건(pH, 염, 고체 농도)에서 초기에 변성될 수 있다. 이 공정은 유청 단백질 마이크로스피어의 기질 망에서 제1철 화합물을 안정화시키기 위해 사용될 수 있다. 이 공정은 유청 단백질 하이드로겔 용액이 전해질 농도, pH, 교반 및 온도의 최적 조건이 될 때 순간적으로 일어난다. 경화 용액 중의 제1철 및 황산염 이온은 경화에 도움을 줄 수 있으며, 확산 및 포획을 통해 비드 내로의 철 흡수를 허용한다.
- [0169] 제1철 캡슐화 물질을 형성하기 위한 칼슘 고갈된 유청 단백질(예를 들어, WPI)의 제조는 전형적으로 하기를 수반한다:
- [0170] 1. 4 내지 30%(w/w), 7 내지 30%(w/w), 또는 9 내지 16%(w/w)의 범위의 농도로 수 중에서 칼슘 고갈된 WPI의 분산. 이는, 예를 들어, 0.01 내지 0.1%(w/w) 범위에서, 바람직하게는 0.04 내지 0.09%(w/w)의 범위로 블레이드 믹서 또는 울트라-투락스(Ultra-Turrax)에서 고전단 교반을 이용하여, 5.0 내지 9.0 범위의 pH, 바람직하게는



6.0 내지 7.0 범위의 pH로 달성될 수 있다.

- [0171] 2. 여과 기공 크기가 200 마이크론 미만인 임의의 변성 물질을 제거하기 위한 여과의 적용.
- [0172] 3. 단백질 변성(비폴딩)을 유도하는 열 처리의 적용. 단백질 변성은 60 내지 140℃, 바람직하게는 70 내지 121℃로 5.0 내지 8.5 범위, 바람직하게는 6.0 내지 8.2 범위의 pH에서 적합하게 수행된다.
- [0173] 칼슘 고갈된 변성 단백질 현탁액은 높은 유속에서 합체/응집을 감소시키기 위해 계면활성제 및 지속적 교반을 이용하여 pH 3 내지 4.5로 아세트산/아세트산나트륨(0.1 내지 5M) 완충 시스템을 함유하는 경화 용액 내로 동심원 노즐을 통해 황산제1철 용액과 함께 압출될 수 있다. 변성 단백질 용액의 pH를 그의 등전점("PI")에 가깝게 가져오는 것은 쿨롱 척력을 감소시킴으로써 응집을 촉진시키는 것으로 이해될 것이다.
- [0174] 본 발명의 마이크로비드를 얻기 위해 다수의 기법이 사용될 수 있다. 단순함을 위해, 상기 방법은 기계적, 화학적 또는 생화학적 공정으로서 범주화될 수 있고, 화학적; 인시추 중합 및 계면 중합; 생리화학; 복합 코아세르베이션 및 기계; 분무 건조 및 압출 기반 방법과 같은 기법을 포함한다.
- [0175] 기계적 기법은 노즐(오리피스)을 통해 압출된 중합체로부터 또는 액체 분사의 파괴로부터 액적을 생성하는 원리에 기반한다. 그들은 오리피스에서 정상 드리핑(dripping) 공정을 증가시키기 위해 기계적 수단(즉, 절단 또는 진동력)을 이용하여 작동하거나, 또는 그들은 노즐을 통과할 때 중합체에 의해 생성된 압출된 액체 스트림을 파괴한다. 생산 후에, 액적은 물리적 수단, 예를 들어 냉각 또는 가열, 또는 화학적 수단, 예를 들어 겔화에 의해 구체/캡슐로 즉시 고정화된다. 최종 요망되는 특징을 갖는 입자를 생산하기 위해 유청 단백질 기질 내에 철 및 다른 물질을 캡슐화하도록 몇몇 상이한 기계 기반 기법이 사용될 수 있다. 단순한 드리핑은 입자의 생산을 위한 가장 오래된 기법이다. 낮은 속도로 오리피스(노즐)를 통한 유청 단백질 용액의 압출은 중력이 표면 장력을 극복하기에 충분히 높게 될 때까지 노즐의 에지에 압출 액체가 들러붙도록 초래하여, 점적의 방출을 초래한다. 속도의 약간의 상승은 형성된 액적의 수를 증가시키는 반면, 추가적인 상승은 액적 형성을 훨씬 더 증폭시킨다. 형성 후에 액적은 즉시 경화되고 얻어진 입자의 크기는 오리피스 직경에 주로 의존한다. 생성된 비드는 보통 크기가 2mm 초과이다.
- [0176] 분무 건조는 액체 중합체가 처음에 압축공기 스트림에 의해 원자화되고 후속적으로 건조 챔버에서 별개의 뜨거운 가스 흐름에 의해 건조되어, 입자의 형성을 허용하는 단위 작업이다. 공기가 바깥 통로를 통과하고 액체 스트림이 내부 통로를 통과하는 2-유체 노즐이 사용된다. 액체 스트림은 칼슘 고갈된 변성된 유청 단백질, 완충제 및 철 용액의 마이크로입자의 겔 분산물로 이루어지고, 완충제 및 철을 포획하는 유청 단백질 비드 내로의 순간 증발에 의해 즉시 건조되는 노즐에서 미세한 입자로 원자화된다. 생산된 입자는 사이클론 기술을 이용하여 수집된다. 이 기법은 10 내지 50 마이크론의 유청 단백질 철 입자를 생산한다. 건조된 입자는 필요하다면 추가적인 경화 용액 중에서 추가로 처리될 수 있다.
- [0177] 당업자에게 공지된 2가지의 다른 기법은 분무 건조기 및 미소유체 장치와 함께 사용되는 3유체 노즐 기법이다.
- [0178] 본 발명의 실시형태의 일 양상은 단백질계 담체와 회합된 철 염의 비정질 제조를 포함하는 조성물을 포함한다. 조성물 중의 철은 일부 제2철( $\text{Fe}^{3+}$ )을 포함할 수 있다. 이는 GI 관에 전달될 때 제2철이 제1철에 비해 위장의 불편함을 감소된 수준으로 일어날 수 있기 때문에 유리할 수 있다. 제2철은 장에서 DMT1 활성을 위한 기질인 제1철로의 환원을 겪을 수 있다. 그러나, 단백질계 담체와 관련된 철 염의 비정질 제제는 전형적으로 장의 창자세포 DMT-1에 의해 매개되는 흡수를 통해 적절한 생체 이용 가능성을 가능하게 하는 적어도 50%의 제1철( $\text{Fe}^{2+}$ )을 가진다. 더 나아가, 제1철은 낮은 pH에서 본 발명의 조성물로부터 방출되고, 위를 보호하기 위해 캡슐과 같은 위액 성분의 존재 하에서 제한되고, 구역, 구토 및 심와부통증을 제한한다.
- [0179] 본 발명의 실시형태의 일 양상에서, 조성물은 철-함유 조성물을 단백질계 조성물과 혼합함으로써, 그리고 얻어진 혼합물을 건조시킴으로써 형성될 수 있다. 다른 양상에서, 혼합물이 제1철을 포함하는 경우, 건조시키는 단계는 혼합물 중의 제1철의 적어도 일부를 단백질계 담체와 관련된 제2철 형태에서의 철염의 비정질 제제로 전환시키는 것을 초래할 수 있다. 건조 공정은 건조 동안 조성물의 "케이킹(caking)"을 방지하기 위해 이산화규소와 같은 추가적인 물질을 사용하게 할 수 있다.
- [0180] 이 건조된 조성물은 저장 시, 특히 산화에 대해, 그리고 그들의 생산과 불일치되게 더 가변적이고/이거나 덜 안정할 수 있는 비-건조 조성물(겔 제제를 포함) 이상으로 유리할 수 있으며, 제형화, 스케일업 및 용량 최적화를 위한 도전을 총괄적으로 제시한다. 가열/건조 처리되지 않은 비드는 그들의 벌크 때문에 추가적인 제형화 도전을 제시한다. 더 나아가, 다중 활성 보충물, 예를 들어 멀티비타민 및/또는 멀티 미네랄 보충물 내로 철을 혼입하는 것이 바람직하다면, 철의 건조되지 않은 조성물은 적합성 관점으로부터 기술적 및 비용적 도전이

존재한다.

[0181] 일부 실시형태에서, 조성물의 생산 동안 제1철(2+)의 제2철(3+)로의 전환은 건조 동안 초래될 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1철(2+)의 제2철(3+)로의 전환은 유청 단백질의 황산화 효과에 의해, 빠른 건조(예를 들어, 분무 건조)에 의해, 비활성(예를 들어, 질소) 분위기에서 건조에 의해, 그리고/또는 황산화 효과를 갖는 안정제의 혼입에 의해 건조 동안 제조될 수 있다. 이는 전체적으로 또는 부분적으로 다음을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다: 베타-카로텐 및 카로테노이드; 비타민 c; 비타민 e; 아연; 셀레늄; 구리; 망간; 아스타잔틴; 검은 후추 추출물; 코엔자임 Q10; 라이코펜; 라이신계 황산화제, 메틸코발라민; 포도씨 추출물; 루테인; 인삼; 시트러스 바이오플라보노이드, 오렌지 껍질 추출물, 녹차 추출물, 은행나무, 스피루리나, 밀순, 보리순, 알팔파, 아마씨, 바나나 잎 추출물.

[0182] 본 발명의 일 실시형태는 완충된 철-함유 조성물을 제조하는 단계; 단백질계 조성물(바람직하게는 변성된, 칼슘 고갈된 유청 단백질/베타-락토글로불린)을 제조하는 단계; 상기 제1철 함유 조성물을 상기 단백질계 조성물과 혼합하는 단계; 및 혼합물의 철 함량의 적어도 일부를 단백질계 담체와 관련된 철 염의 비정질 제제로 전환시키는 단계를 포함하는, 조성물의 제조 방법이다. 철-함유 조성물은 제1철을 포함할 수 있다. 혼합물의 철 함량의 적어도 일부는 단백질계 담체와 관련된 제2철의 대체로 비정질 제제로 전환될 수 있다.

[0183] 다른 실시형태에서 상기 방법은 제1철-함유 조성물이 용액이고; 단백질계 조성물이 단백질계 물질의 현탁액이 되며; 그리고 혼합은 현탁액이 미세액적의 형태로 압출되도록 진동 노즐을 통해 현탁액을 압출시키고, 비드가 생성되도록 미세액적은 용액을 포함하는 욕 내로 압출되며, 조성물은 상기 비드를 포함하도록 추가로 구체화될 수 있다.

[0184] 일부 실시형태에서 전환은 조성물의 건조 동안 달성된다. 건조 공정이 공기 중에서 또는 산소의 존재 하에 수행된다면, 이 건조 공정은 우세하게 제1철(2+) 상태에서부터 단백질계 담체와 관련된 철 염의 비정질 제제로 변화시키도록(철의 일부는 제2(3+) 상태임) 철 함량의 적어도 일부를 산화시키는 효과를 갖는 것으로 여겨진다.

[0185] 다른 실시형태에서, 2가 금속 이온은 본 명세서에 기재된 조성물에서 철을 대체한다. 이러한 금속 이온은 아연, 망간, 구리, 크로뮴, 셀레늄, 폴리브덴, 이들의 조합물, 또는 철과의 조합물을 포함한다. 특정 실시형태에서 얻어진 비드는 개선된 맛을 가진다(예를 들어, 황산철, 황산아연).

[0186] 실험

#### [0187] 마이크로비드의 생성

[0188] (a) 유청 단백질의 탈회

[0189] 2가(예를 들어, 칼슘) 양이온을 1가 양이온으로 대체하기 위해 WPI를 이온 교환 수지로 처리하였다.

[0190] (b1) 제1철의 캡슐화 - 실시예 1 (ST1501)

[0191] (100 g당) 1g 초과 원소 철 및 95그램까지의 단백질을 함유하는 칼슘-고갈 WPI를 이용하여 제1철 캡슐화 시스템을 제조하였다. 유청 단백질 용액(WPS)의 저장 용액을 pH 범위 6.0 내지 7.0에서 0.01 내지 0.1%(w/w)의 범위에서 계면활성제의 존재 하에 블레이드 믹서 또는 울트라-투락스에서 제조하였다. 용액을 150 마이크로 필터를 통해 여과시켰다. 후속적으로 유청 단백질 단리물(WPI)을 적절한 환경 조건(pH 7.0, >78°C; 4 내지 11% w/w 단백질 함량)에서 열변성시켰다. 70 내지 140°C에서 5.0 내지 8.5의 범위에서 열처리를 수행하였다. 단백질 응집물의 가용성 현탁액의 생성을 가능하게 하기 위해 교반(150 내지 200rpm) 하에 열 변성을 수행하였다. 30 내지 90분 동안 열 변성을 수행하여 소수성 부위의 변성 및 노출을 허용하였다.

[0192] 단백질 황산화(즉, 열 변성) 후에, 응집물의 용액을 실온으로 빠르게 냉각시켰다. 필요하다면, 밤새 4°C에서 일정한 교반에 의해 저장할 수 있었다. 마이크로비드의 생성을 위해 500g의 단백질 용액을 사용하였다.

[0193] 다음과 같이 생성 직전에 경화 용액을 제조하고 나서, 단백질 용액의 혼합 및 압출 전에 두 용액(아세트산을 함유하는 250g의 5M 아세트산나트륨 완충제 pH 3.8 및 250g 1M 황산철 용액)의 제조를 수반한다. 500g의 경화 용액을 제조하기 위해 일단 용액이 둘 다 합쳐지면, 트윈-20 및 L-아스코르브산을 경화 용액에 첨가하고, 이어서, 이 용액을 사용하여 젤화시키고, 10,000RPM에서 1분 동안 회전 교반기를 이용하여 입자 크기 감소 전에 500g의 변성된 유청 단백질을 침전시켰다. 178.3g 초순수 중에 14.3g의 무수 아세트산나트륨(MWt 82.03g/mol)을 용해시킴으로써 5M 아세트산나트륨 완충제 용액을 제조하였다. 염의 완전한 용해 후에, 57g의 빙초산을 서서히 첨가하는 한편, 교반시켰다. 적어도 10분 동안 완충제 용액을 교반시키고 남겨져 있다면 재교반시킨다. 180.5g 초순수

중에 69.5g의 황산철(II) 7수화물을 용해시킴으로써 1M FeSO<sub>4</sub> 용액을 제조하였다. 용액을 둘 다 함께 혼합하여 (각각 250g) 500ml의 "경화 용액"을 구성하였다. 용액을 밀봉하여 LR-1000에서 증발을 방지하고, 40℃로 가열하였다. 용액 pH는 3.4였다. 총 0.22g의 트윈-20을 경화 용액에 첨가하고 나서, 적어도 5분 동안 혼합하였다. 이는 다음에 8.80g의 L-아스코르브산의 첨가가 이어졌고 또한 용액을 5분 동안 혼합하였다.

[0194] IKA LR-1000 내에서 경화 용액을 교반시킴으로써 그리고 경화 용액에 변성된 WPS(상기 제조한 바와 같음)를 첨가함으로써 겔 형성을 달성하여, 그것이 형성됨에 따라 겔을 파괴하기 위한 적절한 교반이 수행되도록 적절한 교반이 수행되는 것을 보장하였다. 또한 유청 단백질-경화 용액의 온도를 40℃에서 유지하였다. 1 내지 2분의 기간에 걸쳐 서서히 눈금 실린더를 이용하여 WPS를 첨가한다. 유청 단백질-경화 용액의 상당한 거품이 생긴다면, 교반 속도를 감소시킨다. 과도한 거품은 용액의 분사를 매우 어렵게 만든다. 거품을 감소시키기 위해 용액에 탈포기를 또한 첨가할 수 있다. 모든 WPS가 첨가된 후에, 교반(배합)을 지속하고 경화 용액에서 30분 동안 겔을 방지시켰다. 겔 입자의 D90은 80 마이크론 이하이어야 한다. 이는 2-유체 노즐을 통한 입자의 더 용이한 펌핑을 가능하게 하며, 막힘을 방지한다.

[0195] BUCHI B-290 미니 분무 건조기(연구실 규모)에 대한 겔 현탁액 경화의 30분 후, 겔 입자의 D90은 80 마이크론 미만이어야 한다. 이는 2-유체 노즐을 통한 입자의 더 용이한 펌핑을 가능하게 하며, 클로깅을 방지한다. 유입 건조 공기를 처리하기 위해 탈습유기를 이용하여 분무 건조기를 표준 개방 방식으로 사용하였다. 생성물의 많은 회수를 가능하게 하기 위해 고성능 사이클론을 사용하였다. 용액의 분무를 위한 시작점으로서 다음의 매개변수를 사용하였다.

[0196] • 배출구 온도를 80℃에서 유지하였다

[0197] • 로터미터(분무 기체 유속)를 게이지 상에서 40mm의 높이로 설정하고, 473 ℓ/hr의 유동으로 전환시켰다

[0198] • 노즐 주변의 열 교환기를 통해 수돗물을 펌핑하여 분무 공정 동안 그것을 냉각시켰다.

[0199] 공정 동안, 주입구 온도를 191℃로 증가시켰다.

[0200] 얻어진 스페로이드 입자는 결합 및 비결합 철을 함유하였고, 단, 실질적으로 즉시 방출 프로파일(도 4)은 D90이 15 $\mu$ m 미만(비드의 SEM을 도 3에 나타냄)이며, 비정질(도 9A)이고 15%의 건조 시 초기 손실(도 8A)은 80℃에서 추가 건조 시 8% 미만으로 감소되었다(도 8B). 이들 입자는 10.8% w/w의 철을 가졌다. 이들 입자는 8% w/w의 아세트산염을 가졌다. FTIR 추적은 도 7A에서, 1560 내지 1410cm<sup>-1</sup>에서 특징적 아세트산나트륨 피크의 존재를 나타낸다.

[0201] (b2) 제1철의 캡슐화 - 실시예 2 (ST1502)

[0202] 상기와 같이, (100 g당) 1g 초과와 원소 철 및 95그램까지의 단백질을 함유하는 칼슘-고갈 WPI를 이용하여 제1 철 캡슐화 시스템을 제조하였다. 유청 단백질 용액(WPS)의 저장 용액을 pH 범위 6.0 내지 7.0에서 0.01 내지 0.1%(w/w)의 범위에서 계면활성제의 존재 하에 블레이드 믹서 또는 울트라-투락스에서 제조하였다. 용액을 150 마이크론 필터를 통해 여과시켰다. 후속적으로 유청 단백질 단리물(WPI)을 적절한 환경 조건(pH 7.0, >78℃; 4 내지 11% w/w 단백질 함량)에서 열변성시켰다. 70 내지 140℃에서 5.0 내지 8.5의 범위에서 열처리를 수행하였다. 단백질 응집물의 가용성 현탁액의 생성을 가능하게 하기 위해 교반(150 내지 200rpm) 하에 열 변성을 수행하였다. 30 내지 90분 동안 열 변성을 수행하여 소수성 부위의 변성 및 노출을 허용하였다.

[0203] 이어서, 조성물의 마이크로비드를 경화 용액(500mM 황산제1철, 상기 기재한 500mM 아세트산나트륨)에 의해 제조하였고, IKA LR-1000에 넣고 40℃로 가열하였다. 대략 500ml의 변성된 유청 단백질 용액(10.5%)을 30초 기간에 걸쳐 첨가하였다. 유청 단백질 용액 및 겔 형성의 첨가 후에, 경화 용액을 15,000rpm에서 2분 동안 투락스 회전 교반기를 이용하여 교반시키고, 용액을 낮은 교반 속도(교반기 100RPM)에서 60분 동안 경화시켰다. 형성된 습윤 입자는 또한 매우 작았는데(말변으로부터의 입자 크기 결과를 나타냄) 이는 트레이 건조 및 80℃에서 추가적인 크기 감소 전에 33 마이크론의 D50을 갖는 양봉형 패턴을 나타낸다.

[0204] 마이크로비드의 특징

[0205] X-선 회절

[0206] Ni-여과된 Cu K $\alpha$  방사선( $\lambda=1.54\text{\AA}$ )을 이용하는 미니플렉스 II 리가쿠 회절계를 이용하여 분말 X-선 분석을 수행하였다. 사용한 관 전압 및 관 전류는 각각 30kV 및 15mA였다. 5 내지 80°의 2 $\theta$  범위에 걸쳐 0.05°/s의 단

계 크기로 각각의 샘플을 스캐닝하였다. 도 9로부터 알 수 있는 바와 같이, 분말 XRD 자국은 분말 비드 구조가 본질적으로 비정질이라는 것을 나타낸다(Y 축은 강도이고, X 축은 2 $\theta$  산란각이다).

[0207] **열중량 분석**

[0208] 분무 건조 단독(A) 후에 그리고 80℃에서 추가적인 건조와 함께 분무 건조 후에 본 발명의 마이크로비드의 건조 시 손실의 열중량분석(TGA). 칭량한, 분말 샘플(10 내지 15mg)을 개방 세라믹 팬에서 분석하였다. TGA 측정을 위해, TA-기기 열중량 분석기 TGA-Q50 기기를 다음의 온도 프로그램에 따라 사용하였다: 샘플을 120℃(10℃/분)로 가열하였고, 45분 동안 120℃에서 등온(도 8)이었다.

[0209] **푸리에 변환 적외선 분석**

[0210] 4000 내지 650cm<sup>-1</sup>의 퍼킨엘머 스펙트럼(PerkinElmer Spectrum) 100 FT-IR 분광기 상에서 감쇠 전반사(ATR) 샘플링을 이용하여 적외선 측정을 수행하였다(도 7).

[0211] **주사 전자 현미경**

[0212] 제미니(등록상표) 칼럼(제이스)이 있는 제이스 울트라 플러스 전계 방출 SEM(Zeiss Ultra Plus Field Emission SEM) 상에서 주사전자현미경(SEM) 이미지를 기록하였다. 건조 샘플 비드를 임의의 추가적인 제조 또는 샘플 코팅 없이 수행하는 탄소 테이프 상에 두었다. 2 내지 3kV의 가속화 전압을 사용하여 광범위 방전 효과를 극복하였다.

[0213] **시험관내 용해**

[0214] **철 II의 측정**

[0215] pH 1.8 KCl 완충제를 이용하여 물(10mM) 중의 황산철(II) 용액을 연속희석시켰다. 희석 용액의 분취액(100 $\mu$ l)을 100 $\mu$ l의 1,10-페난트롤린(5mM)을 함유하는 96웰 플레이트에 첨가하였다. 교정 곡선을 구성하기 위해 멀티웰 플레이트 판독기 상에서 490nm에서 플레이트를 판독하였다. 용해 샘플을 pH 1.6에서 페난트롤린(5mM)에 전형적으로 10배 희석시키고, 샘플을 N<sub>2</sub> 블랭킷(blanketing) 하에 용이하게 판독하였다.

[0216] **철 III의 측정**

[0217] 50mg 양의 비드를 10M HCl(10ml)을 함유하는 바이알에 전달하고 밤새 실온에 두었다. 얻어진 용액을 진탕시키고, 이어서, 100 $\mu$ l 분취액을 900 $\mu$ l의 10M HCl에 전달하였다. 희석 용액의 100 $\mu$ l 분취액을 1M 티오시안산나트륨(100 $\mu$ l)을 함유하는 96웰 플레이트에 첨가하였다. 멀티웰 플레이트 판독기 상에서 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 일련의 철 III 표준 용액을 참고로 철 III의 농도를 추정하였다.

[0218] **모의 장 용해 방법**

[0219] 마이크로비드의 정확하게 칭량한 샘플(대략 50mg)을 3목 용기에 전달하고 이를 37℃에서 15ml pH 6.6 완충제(0.1M 중탄산나트륨, 10mg/ml 담즙산 추출물, 1.85mg/ml 판크레아틴을 함유, 1M HCl을 이용하여 pH 6.6으로 조절)에 두었다. 일반적으로, 1, 15, 30, 45, 60 및 때때로 90, 120분 시점에, 철 (II) 및 철 (III) 측정을 위해 샘플을 취하였다. 철 II 측정을 위해, 100 $\mu$ l의 용해 상청액을 900 $\mu$ l pH 1.8 완충제에 희석시켰다. 철 III 측정을 위해, 용해 상청액의 100 $\mu$ l 분취액을 10M HCl 중에서 900 $\mu$ l로 희석시키고, 실온에서 밤새 두었다. 최종 시점 후에, 모든 완충제 용액을 취하고 나서, 10ml 10M HCl을 플라스크에 첨가하고 밤새 두었다. 비드를 밤새 완전히 용해시키고, 총 철 III 수준 측정을 위해 100 $\mu$ l 용액을 900 $\mu$ l 10M HCl에 첨가하였다.

[0220] **모의 위산 용해 방법**

[0221] 정확하게 칭량한 샘플(대략 50mg)의 마이크로비드를 NaCl(34.2mM), 타우로콜산나트륨(80  $\mu$ M), 0.1mg/ml 펩신을 함유하는 15ml의 pH 1.6 완충제에 전달하고 나서, 37℃에서 1M HCl을 이용하여 pH 1.6으로 조절하였다. 샘플을 전형적으로 1, 15, 30, 45, 60, 90, 120분에 철(II) 및 철(III) 측정을 위해 취하였다. 철 II 측정을 위해, 100 $\mu$ l의 용액을 제거하고 나서, 900 $\mu$ l pH 1.8 완충제로 희석하였다. 철 III 측정을 위해, 100 $\mu$ l의 용액을 10M HCl 중에서 900 $\mu$ l로 희석시키고, 밤새 실온에 두었다. 2시간 시점 후에, 모든 완충제 용액을 취하고 나서, 10ml 10M HCl을 플라스크에 첨가하고 나서 밤새 두었다. 마이크로비드를 이후 밤새 완전히 용해시켰다. 120분 용해 후 총 철 측정 및 잔여 철의 간접적 추정을 위해 100 $\mu$ l 분취액을 900 $\mu$ l 10M HCl에 첨가하였다.

[0222] 정확도 및 정밀성을 위해 철 II 및 철 III 용해 방법을 입증하였다.



- [0223] **마이크로비드의 철 II 측정**
- [0224] 막자사발에서 마이크로비드 샘플을 찌거나 또는 볼 밑에서 밀링하였다. 1g의 샘플을 자기 교반기를 구비한 유리 바이알에 옮겼고, 이에 산소를 제거하기 위해 질소를 살포한 10ml의 묽은 수성 HCl(0.1M)을 첨가하였다. 현탁액을 50℃로 가열하고, 이어서, 찌운 비드가 용해될 때까지 초음파 처리하였다. 질소 하에 0.1ml 분취액을 제거하고 나서, 상기 기재한 페난트롤린 방법을 이용하여 철 II의 측정을 위해 빠르게 옮겼다.
- [0225] **pH 측정**
- [0226] 샘플(230mg 대략 25mg 철을 함유)을 10ml의 pH 1.6 완충제(NaCl(34.2mM), 타우로콜산나트륨(80 μM), 0.1mg/ml 펩신)을 함유)에 첨가하였다. 용액의 pH 값은 30분 내에 2배가 되었다.
- [0227] 샘플(230mg 대략 25mg 철을 함유)을 10ml의 pH 6.6 완충제(0.1M 중탄산나트륨, 10mg/ml 담즙산 추출물, 1.85mg/ml 판크레아틴을 함유)에 첨가하였다. 용액의 pH 값은 30분 내에 2배가 되었다.
- [0228] 동일한 절차를 이용하여 동일한 용액 중에서 등몰량의 황산제1철을 또한 평가하였고, 결과를 도 5에 제시한다.
- [0229] **생체내 효능 데이터**
- [0230] 대상체는 건강한 성인 여성이었고, 혈청 페리틴이 15μg/l 초과인 양호한 건강상태였다. 그들은 사전 동의서에 서명하였고, 임신하지 않았다. 각각의 대상체는 매일 25mg의 원소 철 용량: 황산제1철 25mg 원소 철 및 ST1501 25mg 원소 철을 단일 용량, 크로스오버 평가로 2개의 경구 처리군 중 하나를 받았다. 별개의 분석에서, 생성물을 탈디페론 80mg 원소 철에 대한 사례 보고의 부분으로서 비교하였다. 종말점은 장 및 시험 처리의 투여 후 금식(8시간 초과) 혈청 철 2시간의 트로프 대 피크 비였다.
- [0231] 선별 방문 시 금식 혈액 샘플(8ml)을 수집하고 나서, 전체 혈액 계수(full blood count: FBC), 혈청 철 및 페리틴을 평가하였다. 연구일 동안, 기준(8ml), 2시간(4ml) 및 4시간(4ml)에 혈액을 또한 수집하였다. 기준에서 전체 혈액 계수, 혈청 철, 페리틴 및 철 결합 능력을 측정하였고, 혈청 철을 2 및 4시간에 평가하고 나서, 철 결합 능력을 또한 측정하였다. 분석을 위해 모든 샘플을 승인된 계약 실험실에 운송하였다. 연구 내내 총 24ml의 혈액을 수집하였다.
- [0232] **실시예 3: 최적의 혼합 수단 결정**
- [0233] 본 발명의 일 실시형태에서, 9% 유청 단백질 단리물과의 혼합을 위한 철의 최대 프레믹스 부하는 10 내지 15mM 황산제1철이었다. 일부 실시형태에서, 단백질계 물질의 사전 가공, 용액 pH 및 사용한 철의 형태는 생성물에 효과를 가졌다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 단백질계 물질의 적절한 수화가 필요하며, 황산제1철 7수화물은 더 양호한 수 용해도 및 순도 때문에 건조된 황산제1철에 바람직한 것으로 발견하였다.
- [0234] **실시예 4: 단백질계 용액의 제조**
- [0235] 본 발명의 일 실시형태에서, 유청 단백질 단리물(WPI)을 250ml 멸균수 10.5% w/v 중에 분산시키고, 4℃에서 약간 교반(180rpm) 하에 2 내지 16시간 동안 수화물로 남겨두었다. HCl을 이용하여 분산물의 pH를 7로 조절하였다. pH 조절된 분산물을 연속 필터를 통해 선택적으로 여과시키고, 이어서 선택적으로 최종적으로 듀라포어(Durapore)(등록상표)0.45μm HVLP를 통해 여과시켰다. 이어서, 단백질 분산물을 교반(95rpm) 하에 45 내지 60분 동안 80(75 내지 90)℃로 가열하였다. 이어서, 분산물을 얼음 상에서 냉각시키고, 4℃에서 16시간 동안 저장하였다.
- [0236] **실시예 5: 경화 용액의 제조**
- [0237] 본 발명의 일부 실시형태에서, 철 염-함유 경화 용액(0.1 내지 5.0M 범위에서 완충제와 함께 1가 금속 이온을 함유)의 pH를 pH 3.2 내지 6.5로 조절하였다. 이상적으로는 경화 용액에 대해 3.5 내지 4.0의 pH를 사용하였다. 황산제1철(0.1 내지 1.0M)을 경화 용액에 첨가하였고, pH를 추가로 조절하였다. 이어서, 용액을 40℃로 가열하였다. 선택적으로 저농도 계면활성제를 첨가하였다. 이어서, 용액을 40℃에서 유지하였다.
- [0238] **실시예 6: 단백질과 관련된 철의 건조, 비정질 제제의 생성**
- [0239] 겔 비드를 25℃에서 16시간 동안 또는 80℃까지에서 2 내지 16시간 동안 건조시켜 단백질 비드와 관련된 철의 건조, 비정질 제제를 형성한다. 열중량 분석을 사용하여 비정질 철의 물 함량을 결정한다. 비드를 샘플링(알려진 중량)하고, 10M HCl 중의 용해 후에 티오시안산나트륨 방법을 이용하여 배취에 대한 w/w 건조 비드당 비드의 철 함량을 확인한다. 건조, 비정질 철-단백질 비드를 기밀 용기에 밀봉시킨다.

[0240] **실시예 7: 비드 분석**

[0241] 단백질 비드의 총 철 함량을 결정하기 위해 표준 티오시안산나트륨 방법을 사용하고, %w/w 비드로서 표현한다. 비드를 완전히 용해시키기 위해 60℃에서 2시간 동안 100ml의 10M HCl을 이용하여 대략 100mg 비드를 처리함으로써 총 철을 결정하였다. 이어서, 용액을 10M HCl 중에서 10회 희석시켰다. 100 $\mu$ l의 희석 용액을 100 $\mu$ l 1M 티오시안산나트륨과 반응시켰다. 495nm에서 착물의 흡광도를 측정하고, 교정 곡선과 비교함으로써 철 III 이온의 농도를 결정하였다. 광 현미경에 추가로, 마이크로-캡슐 형상 평가의 목적을 위해 레이카(Leica) TCS SP5 공초점 주사 레이저 현미경(confocal scanning laser microscope: CSLM)을 이용하여 추가적인 이미지 분석을 수행하였다. 배워당 50개 비드를 이용하여 평균 크기 분포 및 D(v, 0.9)(누적 용적이 총 용적의 90%에 도달되는 크기)을 평가하고, 최대 배율 X40에서 명시야 현미경을 이용하여 분석하였다.

[0242] 37℃에서 pH 1.6, pH 6.6, 및 pH 8.4 완충제 중에서 비드를 인큐베이션시킴으로써 비드의 용해 프로파일을 연구하였다. 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120분 시점에 철 II 및 철 III 수준을 측정하였다. 각각의 시점에 900 $\mu$ l 물에 100 $\mu$ l의 용액을 취함으로써 철 II 수준을 측정하였고, 450nm에서 착물의 흡광도를 측정하고 표준 곡선을 비교함으로써 5mM 1,10 페난트롤린을 이용하는 표준 작업 적정에 의해 철 II 이온을 결정하였다. 질소 분위기 하에 분석을 수행함으로써 철 III으로의 인공 산화의 적절한 억제제를 이용하여 철 II 측정을 수행하였다. 철 III 측정을 위해, 100 $\mu$ l의 용액을 900 $\mu$ l 10M HCl로 희석시키고, 실온에서 밤새 완전히 산화물로 두었다. 상기 기재한 티오시안산나트륨 방법을 이용하여 철 III 함량을 결정하였다.

[0243] 대략 9% 베타 락토글로불린 - BLG - (9% BLG와 동등한 11% 변성된 WPI)의 상한을 사용하여 BLG/WPI의 자발적 겔화를 피하였다. 250 내지 1000mM 황산제1철과 함께 250 내지 1000mM 아세트산나트륨을 포함하는 경화 용액을 이용하여, 30분 동안 경화시키면서 비드 생성을 수행하였다. 생성된 겔 비드는 0.5 내지 2% w/w 철을 함유하였고 16시간 동안 15℃ 내지 2시간 동안 70℃의 범위의 조건을 이용하여 건조시켰을 때, 조성물은 각각 2.5% w/w 철 내지 10% w/w 철을 가졌다.

[0244] 생성된 건조, 비정질 철-단백질 마이크로비드는 지속 가능하며 안정하다. 몇 개월 동안 주위 및 가속화된 안정성 저장 조건에 남아있는 건조, 비정질 철-단백질 마이크로비드는 본래의 비드와 유사한 고체-상태 특징을 나타내고 또한 pH 6.6에서 철 II 방출에 대해 새로 만들어진 샘플에 대해서도 수행된다는 것을 나타내었다.

[0245] 건조, 비정질 철-단백질 비드가 수 중에 용해될 때, 그들은 15분 내에 물을 흡수하고, 겔 확산층은 건조 비드 주위에 형성되는데, 이는 변형된 철 방출 프로파일을 초래한다.

[0246] 분쇄, 냉동 건조된 비드는 생체내에서 훨씬 덜 효과적이다. 또한 분쇄, 불량하게 형성된 건조 겔 비드의 시험관 내 용해는 더 즉시의 방출 프로파일을 초래한다.

[0247] **실시예 8: 조성물의 시험관내 용해**

[0248] 대략 2 내지 4mg의 원소 철을 함유하는 알려진 양의 비드를 10ml의 완충 용액에 용해시켜 pH 1.6에서 황산제1철에 대한 침전 조건을 보장하였고, 온도 제어 욕에서 37℃에서 유지하였다. 증발을 방지하기 위해 용액에 커버를 씌웠다. 기준 및 15, 30, 45, 60, 90, 120분 시점에, 철의 분석을 위해 용액의 2 x 100 $\mu$ l 분취액을 제거하였다. 분취액 중 하나를 900 $\mu$ l 물에 즉시 희석시켜 1,10 페난트롤린에 의한 표준 작업 적정에 의해 용액 중의 철 II 함량을 측정하였다. 철 III 측정을 위해 다른 분취액을 보존하였고, 100 $\mu$ l의 용액을 900 $\mu$ l 10M HCl에 희석시키고 나서, 밤새 실온에서 완전히 산화물로 두었다. 표준 실험 아이소티오사이아네이트 방법을 이용하여 철 III 함량을 결정하였다. 실험을 3회 중복해서 수행하였다.

[0249] **결과**

[0250] Ni-여과 Cu K $\alpha$  방사선( $\lambda=1.54\text{\AA}$ )을 이용하는 미니플렉스(Miniflex) II 리가쿠 회절계를 사용하여 분말 X-선 분석을 수행하였다. 사용한 관 전압 및 관 전류는 각각 30kV 및 15mA였다. 2 $\theta$  범위 5 내지 80° 에 걸쳐 단계 크기 0.05 ° /s로 각각의 샘플을 스캐닝하였다. 도 9로부터 알 수 있는 바와 같이, ST1501(건조 Fe<sup>2+</sup> 방출 비드)의 조성물과 유사한 비율로 유청 단백질과 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 물리적 조합에 대한 XRD 추적은 ST1501이 없는 산란각 2 $\theta$ (°) = 12.9, 16.3, 19.9, 22.5, 26.3 및 30.1에서 피크의 존재를 나타내는데, 이는 황산제1철 조성물이 대체로 비정질 물리적 상태라는 것을 확인한다.

[0251] **실시예 9: 안정성 시험**

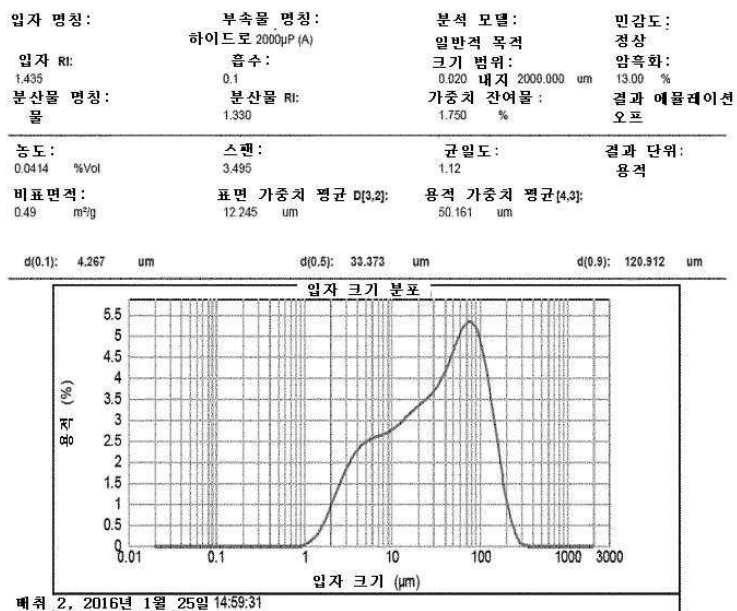
[0252] 중간체 겔 비드는 산화에 대해 안정하지 않으며 이는 용해 매질에서 제1철(II)의 감소된 방출에 반영된다는 것을 주목하는 것은 중요하다. 이에 따르면, 24시간 초과 동안 제조된 겔 비드는 가변성이며 임상적으로 불량한

성능을 가지고, 측정 가능하거나 또는 상업적으로 허용 가능하지 않다. 더 나아가, 이들 겔 중간체는 미생물 성장의 경향이 있다. 본 발명의 ST1501 마이크로비드는 pH 1.6 및 pH 6.6에서 용해 프로파일이 주위 조건에서 밀봉 용기에서 저장될 때 적어도 6개월 동안 철 II 방출에 대해 실질적으로 변하지 않았다는 점에서 안정한 것을 발견하였다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시형태에서, 주위 조건 하에 [1] 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로스 (HPMC) 캡슐에서 그리고 알루미늄에서 추가 밀봉 하에 [2] HPMC 캡슐에서, 실온에서 밀봉 챔버 내 질소 하에 블리스터 패키징할 때, 조성물은 장기간 저장 후에 pH 6.6에서 용해 실험 동안 1시간에 걸쳐 기준(100% 설정)에서 방출된 철 II 함량의  $98.2\% \pm 2.5\%$  및  $97.3\% \pm 2.3\%$ 를 방출하였다. 더 나아가, 조성물은 둘 다  $10^3$  cfu/1000 mg의 최대 허용량에 따른 총 생균 계수 및  $10^2$  cfu/1000mg의 최대 허용되는 총 효모 및 곰팡이, 및 이콜라이(E-Coli)의 부재를 포함하여, 불쾌한 미생물이 없었다.

## 도면

### 도면1

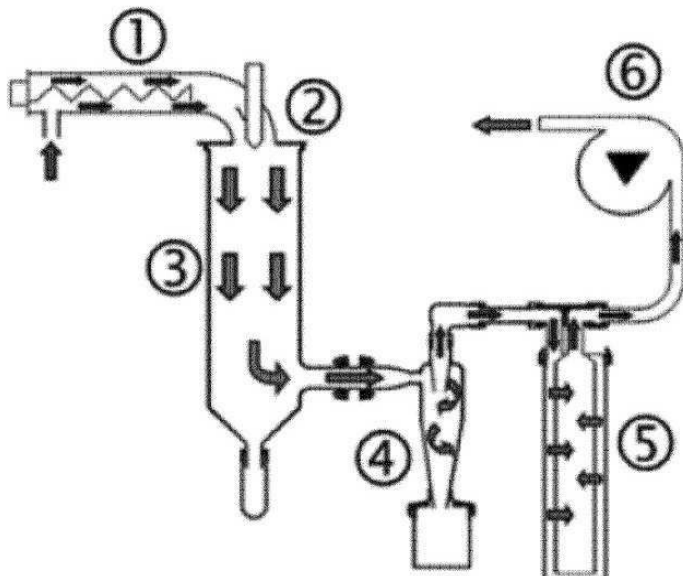
## 겔 마이크로비드의 입자 크기 프로파일



경화 용액(500mM 황산제1철, 500mM 내지 5M 아세트산나트륨)을 IKA LR-100에 넣고 40°C로 가열하였다. 대략 500ml의 변성 유청 용액(10.5%)을 30초 기간에 걸쳐 첨가하였다. 유청 단백질 용액 및 겔 형성의 첨가 후에, 경화 용액을 투락스 회전-교반기를 이용하여 15,000rpm에서 2분 동안 교반시키고, 용액을 60분 동안 낮은 교반 속도(교반기 100RPM)에서 경화시켰다. 형성된 습윤 입자는 또한 매우 작아서(말번사로부터의 입자 크기 결과를 나타냄) 80°C에서 트레이 건조 전에 33마이크론의 D50을 갖는 양봉형 패턴을 나타내었다.

도면2

## 전형적 분무건조 설비의 개략도



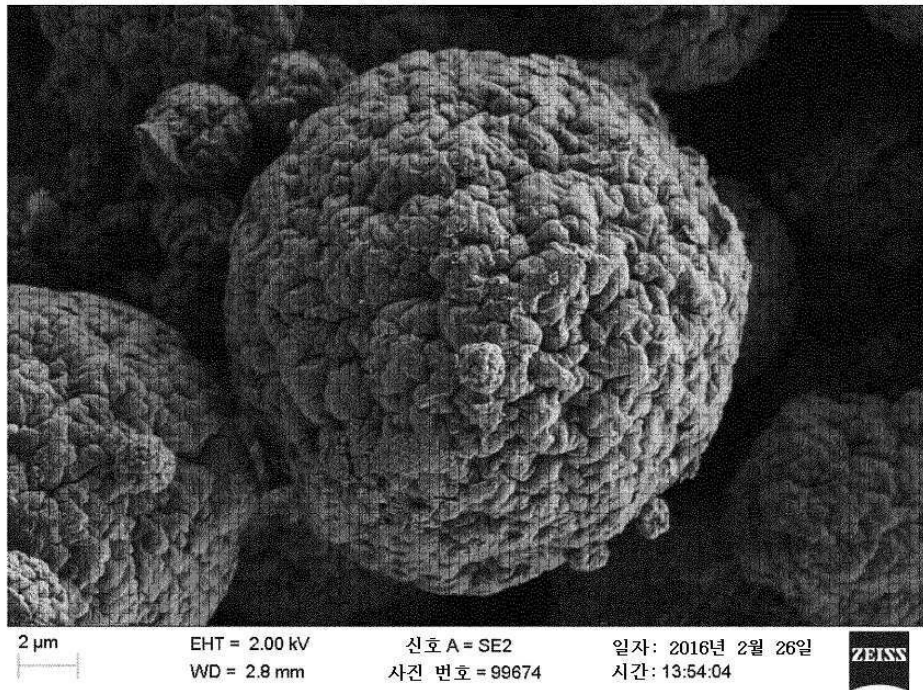
첫번째 단백질 용액 (10.5%까지)을 상기 기재한 바와 같이 제조하고 나서, 이하에 기재하는 바와 같이 경화 용액과 혼합하여 겔을 형성한다. 겔에 전단력 (예를 들어, 로터 스테이터 또는 블레이드)을 이용하는 입자 크기 감소 공정 처리하여 겔 입자의 목적으로 하는 입자 크기를 달성하였다. 이어서, 겔 현탁액을 분무 건조기에 펌핑하기 전에 적어도 30분 동안 부드럽게 교반시켰다. ①에서, 현탁액을 140°C 내지 160°C로 가열하였다. ② 이어서, 부키 B-290에서 2-유체 노즐을 이용하여 액적을 형성한다. ③ 건조 기체와 샘플 액적 간에 전도성 열 교환이 일어난다. 이는 모액으로부터 과량의 유체를 제거하고, 또한 겔 비드 내에서 유체를 이용하여 형성한다. ④ 사이클론 기술을 이용하여 입자를 수집한다. ⑤ 배출구 필터에서 미세 입자의 수집이 있다. ⑥ 흡입기에 의해 건조 가스를 전달한다.

[www.buchi.com/products/b-290](http://www.buchi.com/products/b-290)로부터의 개략도



도면3

## 마이크로비드의 주사 전자 현미경

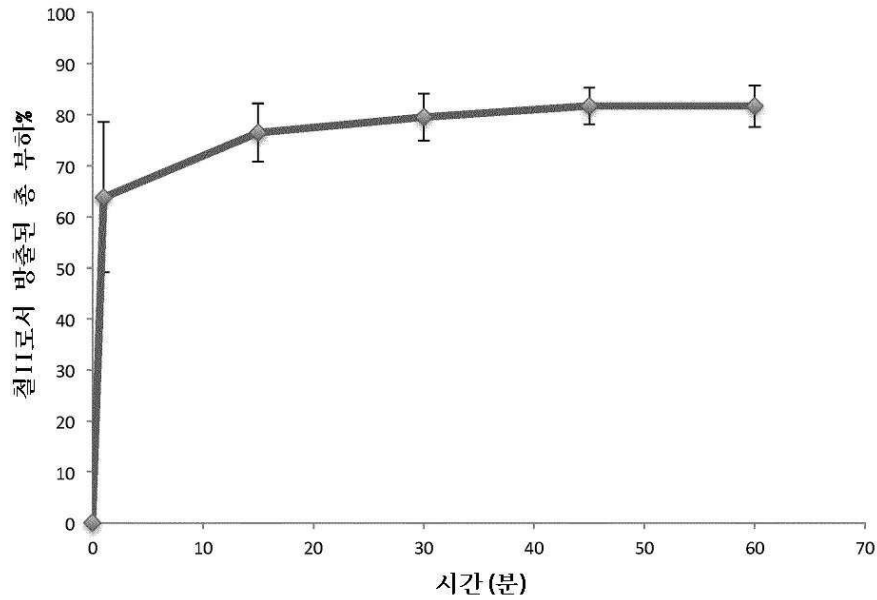


분무 건조에 의해 제조한 조성물의 마이크로비드 이미지를 나타내는 저배율 SEM. 주사 전자 현미경 (SEM) 이미지를 제미니 (등록상표) 칼럼 (제이스)이 있는 제이스 울트라 플러스 전계 방출 SEM 상에서 기록하였다. 건조 샘플 비드를 임의의 추가적인 제조 또는 샘플 코팅 없이 수행 탄소 테이프 상에 두었다. 2 내지 3kV의 가속화 전압을 사용하여 광범위 방전 효과를 극복하였다.

도면4

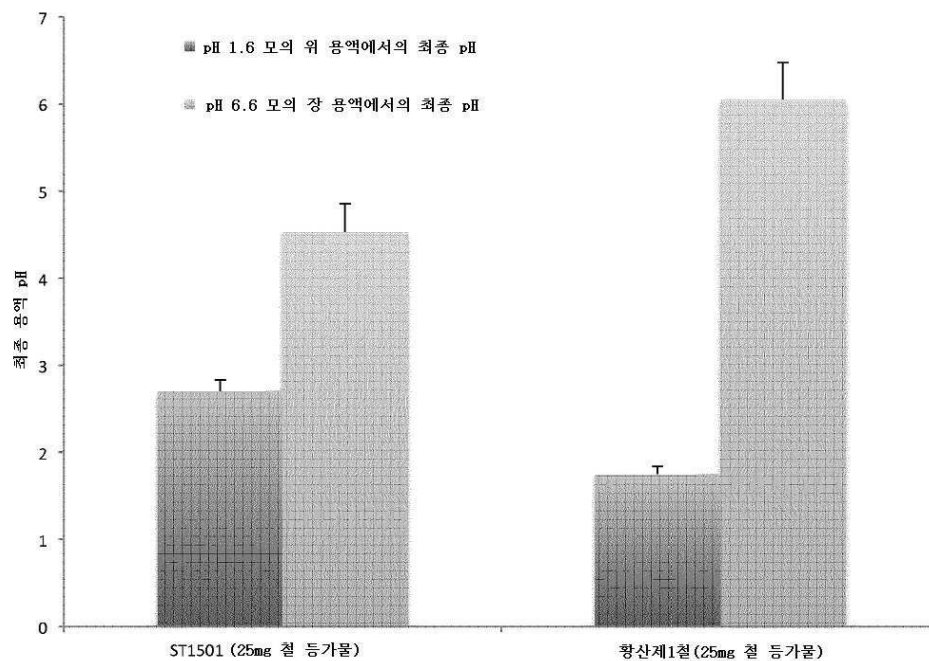
## ST1501에서의 즉시 방출 프로파일

Fe<sup>2+</sup> 로서의 평균 방출



도면5

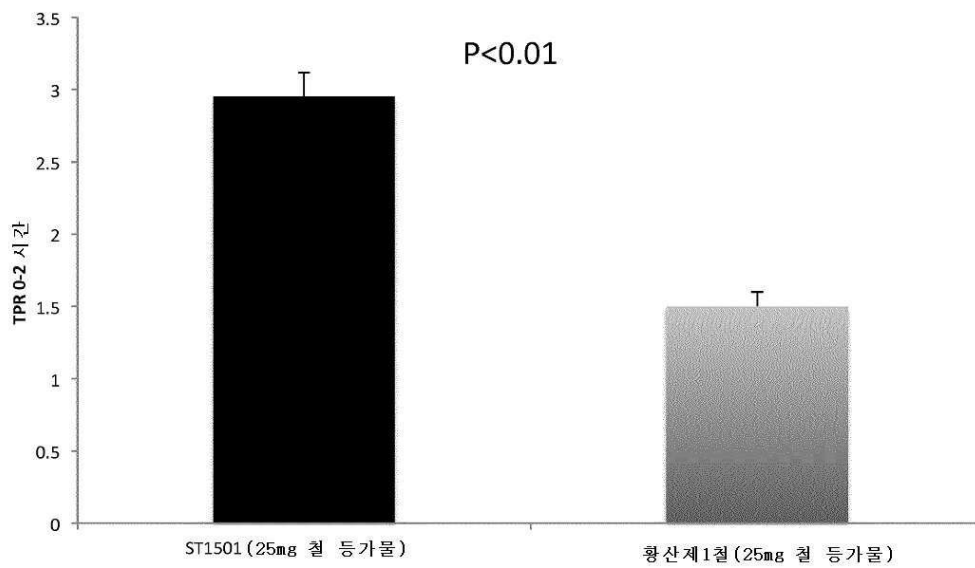
## 모의 위액 및 장액에서의 본 발명의 조성물 (ST1501, 황산제1철)의 pH 프로파일



도면6

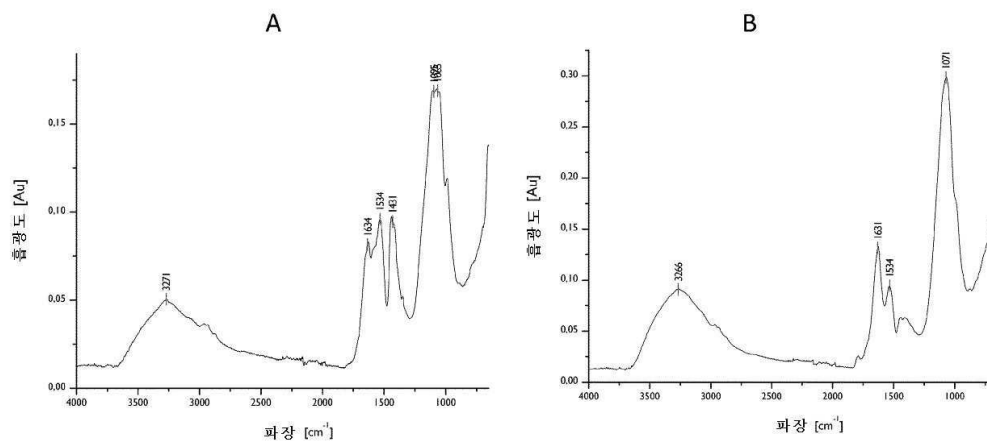
## 공복 대상체에서 2시간에 걸친 혈청 철 트로프 대 피크 비

트로프 대 피크비 혈청 철



도면7

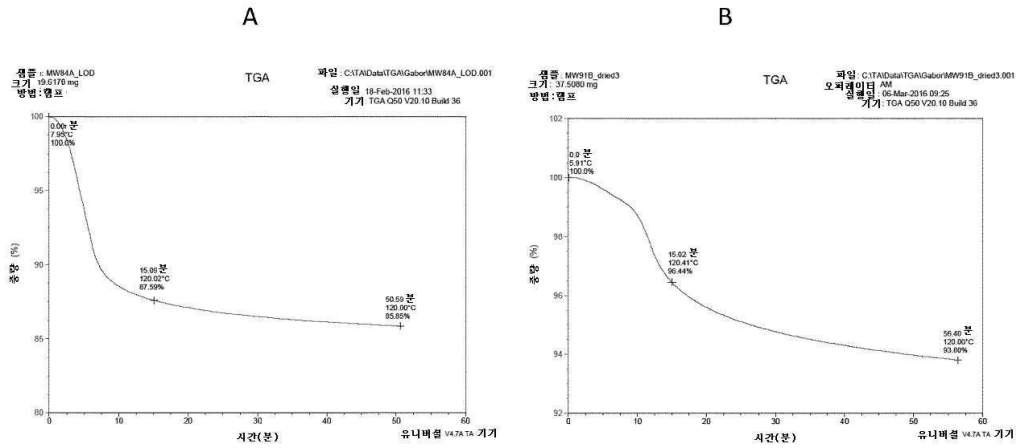
## 조성물의 마이크로비드의 FTIR



변성된 유청 단백질에 비해 영역 1560 내지 1410 $\text{cm}^{-1}$  내 조성물의 마이크로비드에서 특징적 아세트산나트륨 피크의 특징적 존재를 나타내는 FTIR, 도 7B는 감소된 (3% w/w 미만) 아세트산나트륨 조성물, 감소된 아세트산염:철 비 및 감소된 아세트산염:단백질비를 반영하는 영역 1560 내지 1410  $\text{cm}^{-1}$  내 조성물에서의 감소된 아세트산나트륨 피크를 나타내는 FTIR을 도시한다.

도면8

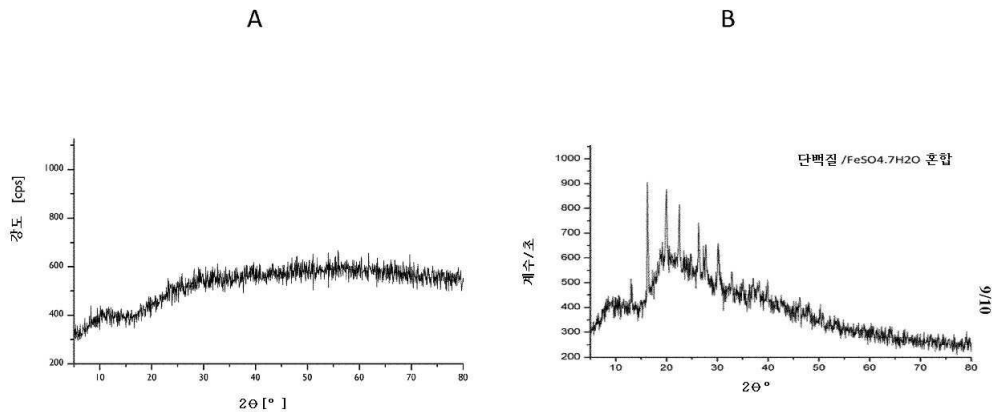
## 조성물의 마이크로비드의 TGA 분석



분무 건조 단독 (A) 후에 그리고 80°C에서 추가적인 건조와 함께 분무 건조 후에 본 발명의 마이크로비드의 건조 시 손실의 열중량 분석 (TGA)을 도시한 도면. 칭량된, 분말 샘플 (10 내지 15 mg)을 개방 세라믹 팬에서 분석하였다. TGA 측정을 위해, TA-기기 열중량 분석기 TGA-Q50 기기를 다음의 온도 프로그램에 따라 사용하였다:  
샘플을 120°C (10°C/분)으로 가열, 120°C에서 45분 등온.

도면9

## 조성물의 마이크로비드의 pXRD 분석

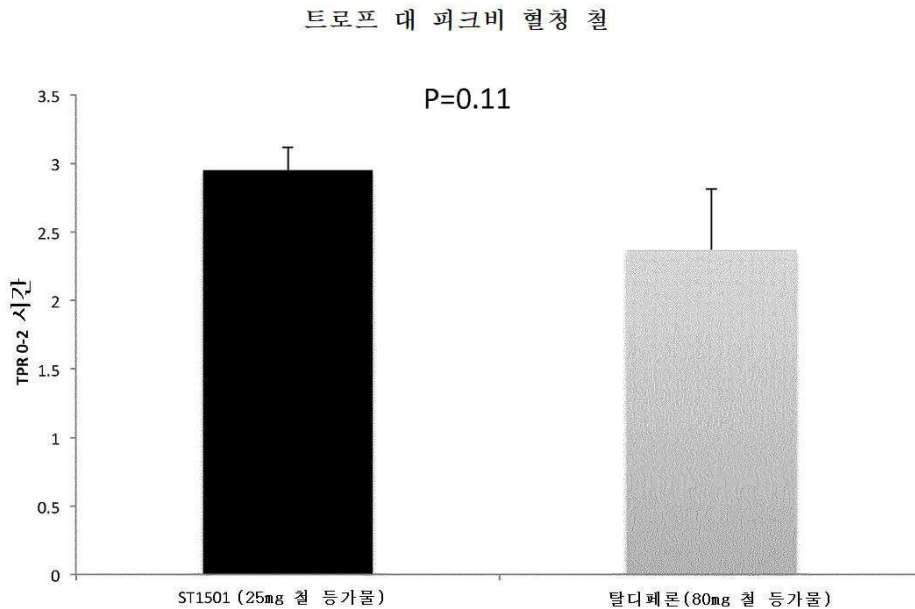


본 발명의 조성물의 대부분의 비정질 특성을 나타내는 분말 XRD 분석 [A]. 결정질 황산철 (II)과 관련된 전형적인 PXRD 피크는 존재하지 않는다. 그러나 기준 피크는 단백질 구조에서의 낮은 수준의 규모를 반영한다. 분말 XRD 패턴 [B]는 결정도의 증거를 나타내는 황산제1철 7수화물과 물리적으로 혼합된 변성된 유청 단백질의 X선 회절 프로파일을 도시한다.



도면10

공복 대상체에서 2시간에 걸친  
혈청 철 트로프 대 피크비



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 아스코르브산, 아스코르브산염에서 선택되는 안정제, 또는 L-아스코르브산, L-아스코르브산나트륨, L-아스코르브산칼슘, 팔미트산아스코빌(팔미토일 L-아스코르브산), 에리소르빈산(D-아이소아스코르브산) 및 에리소르빈산나트륨(D-아이소아스코르브산나트륨) 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 안정제를 더 포함하거나,

상기 철:단백질 비는 중량 기준으로 1:20 내지 1:3, 또는 1:40 내지 1:3, 또는 1:15 내지 약 1 내지 4, 또는 약 1:6 내지 약 1:12이거나,

상기 조성물은 평균 입자 크기가 2000 마이크론 이하, 1000 마이크론 이하, 600 마이크론 이하, 500 마이크론 이하, 또는 300 마이크론 이하, 또는 100 마이크론 이하 또는 80 마이크론 이하 또는 60 마이크론 이하, 또는 40 마이크론 이하 또는 20 마이크론 이하인 입자로 이루어지거나,

상기 조성물 중의 상기 철은 중량 기준 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 제1철을 포함하거나,

상기 변성 단백질은 변성된 유청 단백질, 변성된 유청 단백질 단리물, 변성된 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합물을 포함하는, 조성물.

【변경후】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 아스코르브산, 아스코르브산염에서 선택되는 안정제, 또는 L-아스코르브산, L-아스코르브산나트륨, L-아스코르브산칼슘, 팔미트산아스코빌(팔미토일 L-아스코르브산), 에리소르빈산(D-아이소아스코르브산) 및 에리소르빈산나트륨(D-아이소아스코르브산나트륨) 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 안정제를 더 포함하거나,

상기 철:단백질 비는 중량 기준으로 1:20 내지 1:3, 또는 1:40 내지 1:3, 또는 1:15 내지 1:4, 또는 1:6 내지 1:12이거나,

상기 조성물은 평균 입자 크기가 2000 마이크론 이하, 1000 마이크론 이하, 600 마이크론 이하, 500 마이크론 이하, 또는 300 마이크론 이하, 또는 100 마이크론 이하 또는 80 마이크론 이하 또는 60 마이크론 이하, 또는 40 마이크론 이하 또는 20 마이크론 이하인 입자로 이루어지거나,

상기 조성물 중의 상기 철은 중량 기준 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 제1철을 포함하거나,

상기 변성 단백질은 변성된 유청 단백질, 변성된 유청 단백질 단리물, 변성된 베타 락토글로불린, 또는 이들의 조합물을 포함하는, 조성물.