(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097765
(43) 공개일자 2017년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 31/07* (2006.01)
A61K 31/355 (2006.01) *A61K 33/26* (2006.01)
A61K 35/741 (2014.01) *A61K 36/06* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 47/14* (2017.01)
A61K 47/44 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0095 (2013.01)
A61K 31/07 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7020534
(22) 출원일자(국제) 2016년01월25일
심사청구일자 2017년07월21일
(85) 번역문제출일자 2017년07월21일
(86) 국제출원번호 PCT/PL2016/000008
(87) 국제공개번호 WO 2016/118028
국제공개일자 2016년07월28일
(30) 우선권주장
P.411062 2015년01월25일 폴란드(PL)

(71) 출원인
르조세크, 아르투르
폴란드 토미체 05-532 울란차 알렉산드라 프레드리 3
클리스, 피오트르
폴란드 스타라 이위츠나 05-500 울란차 슬로네츠나 105 엠. 82
씨에씨아라, 마리우슈
폴란드 토미체 06-532 울란차 알렉산드라 프레드리 9
(72) 발명자
르조세크, 아르투르
폴란드 토미체 05-532 울란차 알렉산드라 프레드리 3
클리스, 피오트르
폴란드 스타라 이위츠나 05-500 울란차 슬로네츠나 105 엠. 82
씨에씨아라, 마리우슈
폴란드 토미체 06-532 울란차 알렉산드라 프레드리 9
(74) 대리인
한상수

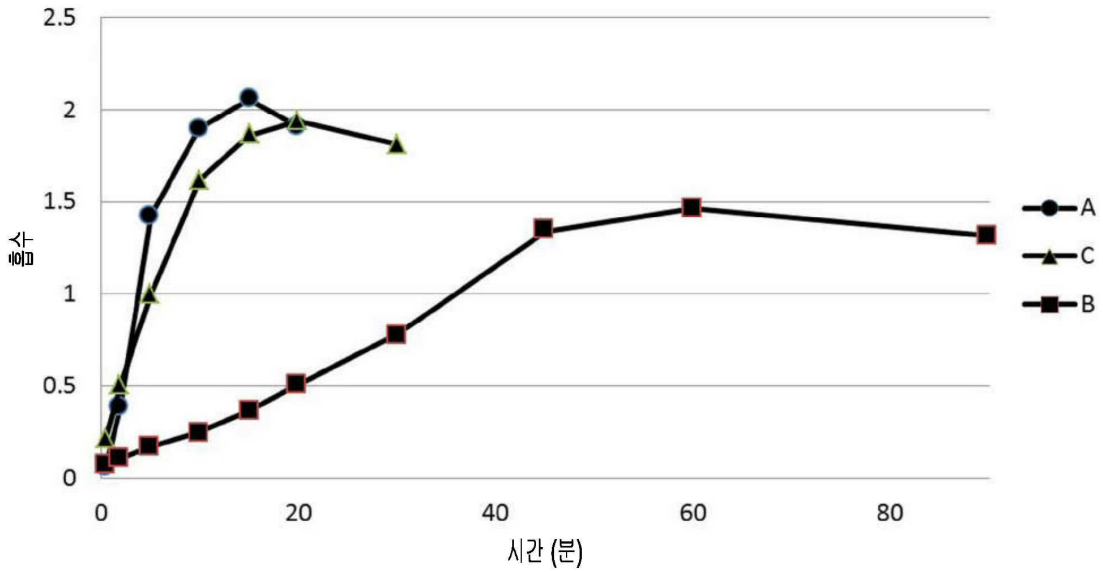
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **비-이온성 형태의 철 소스를 함유하는 유체 조성물 및 사용방법**

(57) 요 약

비-이온 형태의 철 공급원 및 매개물(vehicle)을 함유하는 유체 조성물로서, 상기 조성물은 0.1 내지 15.0% w/w의 양으로 7 내지 10 마이크로 미터의 평균 입자 크기, 및 바람직하게는 7㎛ < D_{50} <10㎛, D_{90} <15 ㎛의 특성을 갖는 입자 크기 분포를 갖는 원소 철, 및 개별적으로 또는 혼합물로 85% 내지 99.9% w/w의 양으로 유체 조성물 및 글리세롤 및/또는 식물성 오일 및/또는 생선 기름으로부터 선택된 매개물을 포함한다. 본 발명은 상기 조성물의 용도와 또한 관련된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/355 (2013.01)
A61K 33/26 (2013.01)
A61K 35/741 (2013.01)
A61K 36/06 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/14 (2013.01)
A61K 47/44 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

비-이온성 형태의 철 공급원 및 매개물(vehicle)을 함유하는 유체 조성물에 있어서,

상기 유체 조성물은 0.1 내지 15.0% w/w의 양으로 7 내지 10 마이크로 미터의 평균 입자 크기 D_{50}을 갖는 원소 철, 및 85% 내지 99.9% w/w의 양으로 글리세롤 및/또는 식물성 오일 및/또는 생선 오일로부터 개별적으로 또는 혼합물로 선택되는 매개물을 포함하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 원소 철은 $7\mu m < D_{50} < 10\mu m$, $D_{90} < 15\mu m$의 특성을 갖는 입자 크기 분포를 갖는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 오일은,

중쇄 지방산의 트리글리 세라이드 오일, 글리세롤, 옥수수 유, 평지 씨 유, 아마 인유, 미처리 야자 열매 유, 생선 간유, 대구 간 지방산 또는 다른 어유, 올리브 오일 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 오일은,

C6 내지 C14의 사슬 길이를 갖는 중쇄 지방산의 트리글리 세라이드를 개별적으로 또는 혼합물로 함유하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 유체 조성물은 C8-C10 사슬이 90% w/w 이상을 구성하는 중쇄 지방산의 트리글리 세라이드 혼합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 토코페롤, α-토코페롤, 레티노이드 그룹으로부터의 유기 화합물, 레티놀, 2-메틸-1, 4-나프토퀴논(naphthoquinone) 유도체, 비타민 D, 천연 유기 카로티노이드, 비타민 C, B 그룹의 비타민 및 이들의 혼합물로부터 선택된 1종 이상의 활성 성분을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 프로 바이오틱 박테리아, 비-병원성 순수 배양 효모, 프리 바이오틱(prebiotic) 특성을 갖는 폴리 사카라이드로부터 선택된 성분을 추가적으로 함유하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항 에 있어서,

상기 조성물에 함유된 추가의 활성 성분은 0.001 내지 10% w/w의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 보조 물질을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 조성물에 함유된 상기 보조 물질은 1% 내지 10% w/w의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 유체 조성물.

청구항 11

철 결핍을 보충하기 위한 제제의 제조 및/또는 인간을 포함한 포유류에서 철에 대한 증가된 요구를 만족시키기 위한 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 특정된 바와 같은 유체 조성물의 사용방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 유체 조성물은 유아, 소아, 임산부 및 임신을 계획하는 여성에게 투여, 치료 및 예방에 사용되는 것을 특징으로 하는 유체 조성물의 사용방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엄격하게 규정된 입자 크기를 갖는 비-이온성 형태의 철 소스를 함유하는 유체 조성물, 및 철 결핍에 대한 보충용 조성물의 사용방법에 관한 것이다. 상기 조성물은 약학 제제 또는 식이 보충제로서 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 철분은 유기체의 정상적인 기능에 필요한 가장 중요한 화학 원소 중 하나이다. 이러한 미세 성분은 산소를 운반하는 헤모글로빈의 주성분이다. 철분은 적혈구 및 헤모글로빈의 적절한 생산 과정을 제어하여 생물체의 정확한 산소 운반을 결정한다. 철분은 또한 세포 분열 과정에서, 적절한 인지 기능을 유지하고, 면역 기능의 적절한 기능에 중요한 역할을 한다. 철분에 대한 일일 요구량은 연령, 성별 및 건강 상태에 따라 다르다. 요구량은 외과적 중재로 인해 많은 출혈이 있는 사람들뿐만 아니라, 성인, 어린이, 임산부, 모유 수유 여성에서 서로 다르다.

2008년 11월 28일의 Commission Directive 2008/100/EC에 따르면 일일 평균 철분 요구량은 10-20mg이라고 가정한다. 철분에 대한 RDA는 14mg이다. 철분 관리의 장애는 유기체의 적절한 기능에 많은 좋지 않은 변화를 가져올 수 있고, 이들 중 빈혈이 가장 중요하다. 헤모글로빈 수치가 너무 낮고 적은 수의 적혈구에 의해 빈혈이 나타나는 것이, 가장 빈번하고 가장 널리 확산된 빈혈 유형이다.

[0003] 식품에서 얻는 철분은 상대적으로 적으며, 소량에서 최대 20%까지 다양하다. 그러므로, 많은 사람들은 철 함유 제제를 사용하지만, 과학적 연구 결과에서 볼 수 있듯이 가용성 염의 형태의 가용성은 높지 않으며. 보통 25%를 초과하지 않는다.

[0004] 철분 가용성의 어려운 파라미터 때문에, 이러한 요소는 특정 약제 형태 및 투여 경로에 적합하게, 다양한 약제 형태로 의약품에 사용된다. 가장 널리 사용되고 가장 자주 사용되는 형태는 가용성 철염을 포함한다. 철(II) 황산염(VI), 염화철(III), 이 인산 철 (III), 푸마르산 철(II) 또는 글루콘산 철(II)과 같은 무기 및 유기 화합물을 포함한다. 또한, 원소 철분을 함유하는 제제가 공지되어 있다. 가용성 염의 철분의 형태와 백분율은 원소의 흡수뿐만 아니라 그 후의 생물학적 활동을 결정한다. 염의 높은 몰 질량과 낮은 철분 함량 (10-36%), 및 생체 내 이용 가능성을 고려할 때, 원하는 치료 효과를 얻기 위해서는 고용량의 철염을 사용해야 하며, 이는 위장 체계에 부작용의 증가를 일으킬 수 있다. 더욱이, 고용량의 용해성 염을 사용하면 철 함유 제제의 중독 또는 과량 투여의 위험이 증가하며, 이러한 경우에는 의사의 개입이 필요하다. 용해성 염의 조성에 포함된 철의 산화 상태 또한 중요하다 - Fe3+ 이온은 Fe2+ 이온보다 현저히 낮은 생체 이용률을 나타낸다 (철분 전달 메커니즘은 DMT (2가 금속 운반체)와 연결됨).

[0005] 이러한 문제들 중 일부는 원소 철분을 사용하여 해결된다. 원소 철분은 위장과 그 속에 포함된 염산의 영향을 받아, 소화관보다 초기에 이온화된 형태로 변형된다. 원소 철분은 98%를 초과하는 높은 철분 함량과 낮은 몰 질량을 특징으로 하며, 철(II) 염의 철분 요구량과 비교하여, 철분에 대한 일일 수요를 충족시키기 위해 최소 투입량을 사용할 수 있다.

[0006] 철분 결핍을 보충하거나 철분에 대한 수요를 충족시키기 위한 광범위한 의약품 및 식이 보조제가 공지되어 있다. 이러한 제제는 정제, 발포성 정제, 캡슐 및 가루(sachet)의 형태뿐만 아니라 시럽 또는 강장제와 같은 유체 형태로 존재한다.

[0007] 철분 결핍 보충 계획은 개개인의 필요에 적응하여 선형 특성을 가져야 한다. 최적의 솔루션은 체중 1킬로그램당 철분을 투여하는 것을 허용하는 제제에 의해 구성된다. 정제, 발포성 정제, 캡슐 및 가루 형태의 제제는 임계 투약으로 특징지어지며, 단순한 계산이 필요한 방식으로 적용되는 철분 투여량을 개별적으로 조정할 가능성을 제공하지는 않는다. 시럽 또는 구강 솔루션 형태의 제품은 그러한 가능성을 제공한다; 그러나, 이들의 사용은 치아의 짙은 착색과 관련이 있다. 사용된 철분 공급원에 따라, 입안에서의 금속성 맛의 효과가 또한 발생하고, 이는 불리한 인상으로 인식된다.

[0008] 원소 철분을 함유하는 공지된 제제는 정제 또는 캡슐의 형태를 취한다. 매개물로서 물에 기반하여, 원소 철분의 형태로 비-이온성 철분 공급원을 함유하는 유체 조성물의 예도 공지되어 있다. 이러한 조성물은 물의 산화 특성을 고려하여 EDTA, 테트-부틸 하이드로 퀴논(TBHQ), 메틸 파라벤 또는 프로필 파라벤과 같은 광범위한 추가 물질, 보존제 및 안정제의 사용을 요구한다. 의약품 또는 식품 제품에서 이러한 물질의 양적 한계를 사용할 필요성으로 인해 소아 및 영아의 철분 결핍 보충을 위한 이러한 조성물의 사용을 제한 또는 심지어는 배제한다. 또 다른 문제점은 물의 산화 작용의 결과로서, 다양한 산화 상태 (Fe2+, Fe3+)를 갖는 철 이온뿐만 아니라 철을 변하지 않은 형태로 함유하는 삼원 혼합물(ternary mixture)이 형성될 수 있고, 이들 혼합물에 있는 3개의 형태의 비율은 알려지지 않았다.

[0009] 특허 출원 번호 WO 2010/146155A1에 개시된 인간 이외의 포유류의 영아에서 사용하기 위한 원소 철분을 함유하는 경구 수의학 조성물의 예도 또한 공지되어 있다. 본 출원은 매개물로서의 오일을 함유하는 미세한 원소 철분의 함량이 높은 겔의 형태를 갖는 제제에 관한 것이다. 제제 내의 철분 함량은 5 내지 30%, 바람직하게는 10 내지 25%, 가장 바람직하게는 20%일 수 있다. 원소 철분의 바람직한 입자 크기는 3 내지 7㎛ 범위로 정의된다.

[0010] 이러한 작은 입자 크기 및 결과적으로 이로부터 발생하는 활성 물질의 높은 표면적은 원소 철분의 Fe2+ 이온으로의 전환 속도를 증가시킨다. 이것은 짧은 시간에 유기체에서 이온 형태로 고농도의 철분에 도달하게 한다. 제재 내의 철분 함량이 높기 때문에 이온 농도의 급격한 증가의 효과가 추가적으로 향상된다. 작은 입자 크기와 관련하여, 제제 중의 철 함량이 높으면, 철 결핍의 보충과 관련하여 당업자에게 매우 바람직한 것처럼 보일 수 있다. Fe2+ 이온으로의 더 낮은 변환 속도를 갖는, 더 작은 표면적을 갖는 원소 철분의 더 큰 입자로 인해, 철

결핍의 보충 과정에서 동일한 시간 내에 달성된 농도가 더 낮기 때문에 덜 바람직한 것으로 보일 수 있다. 그러나 고농도의 철 이온은 유기체에서 발생하는 몇 가지 생화학적 과정에 의해 제한되기 때문에 높은 가용성에 미치지 못하다. 피 세포인 장 세포(enterocytes)가 음식물에서 철분을 흡수하는 역할을 하기 때문에 유기체의 철분 수준은 십이지장에 의해 조절된다. 가장 잘 알려진 철분 운반 메커니즘은 DMT (Divalent Metal Transporter)와 관련되어 있다. Divalent Metal Transporter (DMT1)는 산화 상태 II에서 철분 및 기타 금속을 장의 내강에서 장 세포로 수송하다. 이 단계에서는 음식물에 존재하는 철분을 감소시키는 보조 단백질의 존재가 필요하다. 그런 다음에만 장 세포에 존재하는 철분이 혈관으로 운반된다. 철 동화 과정의 생화학적 한계와 관련하여, 반응을 위한 작은 크기와 큰 표면적을 가진 입자를 사용하여 짧은 시간에 얻어지는 고농도의 Fe2+ 이온은 유기체에 의해 사용되지 않는 과량의 이온을 형성하게 된다. 고농도로 존재하는 미사용된 이온의 초과는 유기체의 장내 세균 군집의 미생물 학적 평형 장애의 범위를 초래할 수 있다. 동물과 인간 모델 모두를 사용하여 수행된 수많은 연구를 통해 철분 보충제가 면역 체계에 미치는 영향에 대한 논란이 확인되었다. *EUGENE D. WEINBERG, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Mar. 1978, Vol. 42, No. L, p. 45-66*에서 *Iron and Infection*의 제목을 갖는 논문에서 입증된 바와 같이, 생체 내의 흡수 용량을 초과하는 철분량(iron load)이 투여된 영아는 박테리아 감염에 대한 면역력이 현저하게 저하된다. 영아에 관한 연구에서도 비슷한 연관성이 있었으며, 여기서 그램 음성균(Gram-negative bacteria)에 의해 유도된 철분 공급 부족과 패혈증 발생 빈도와의 관계가 통계적으로 증명되었다. *Barry, D.M.J. 및 A.W.Reeve. 1977년. 근육 내 철분 투여로 인한 그램-음성 신생아 패혈증의 발병률 증가 (Increased incidence of gram-negative neonatal sepsis with intramuscular iron administration)* Pediatrica 10: 908-912.

[0011] 철분이 인간의 소화 시스템을 지배하는 일부 미생물의 성장과 병리학적 활동을 제한하는 요인이라는 것도 또한 의심할 여지없이 입증되었다. 장내 철분 운반 체계와 병원성 미생물에 의해 사용되는 철분 공급원에 대한 지속적인 경쟁이 이어졌다. 철 공급 과잉이 생체의 동화 능력을 초과하면 철분이 이러한 미생물에 의해 사용된다. 철분의 산화 환원 전위는 II에서 III 산화 상태로 전환되어, 많은 병원체의 원동력이 되어, 산화 스트레스를 유발하고 결과적으로 DNA, 지질 및 단백질의 구조에 손상을 준다. *감염 및 면역에서의 철분(Iron in Infection and Immunity) 제임스 E. 캐서 (James E. Cassat) 및 에릭 스카 (Eric P. Skaar) 세포주 및 미생물 (Cell Host & Microbe) 2013년 5월15 일 2013 Elsevier Inc.* 과학자들은 자연 면역 기전이 철 공급이 적은 환경을 유지하는 것을 엄격히 따른다고 보고했다 - 이러한 개체는 철 결합 단백질, 트랜스페린 및 락토페린의 특수한 구조에 의해 이러한 식으로 도움을 받는다 *(일부 임상 감염에서 철분의 중요한 역할(The Critical Role of Iron in Some Clinical Infections) J.J. Bullen, C.G. Ward, H.J. Rogers, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., August 1991, p. 613-617).* 철분이 천연 철분 포획 메커니즘 (10^{-18}을 초과하는 자유이온)의 용량을 초과하여 사용할 수 있게 되면, 이러한 메커니즘은 방해를 받는다 (*Bullen, JJ, Rogers, HJ and Griffiths, E. (1978) 박테리아 감염에서 철분의 역할(Role of iron in bacterial infection) Curr. Top, Microbiol.Immunol.80, 1-35*).

[0012] 이러한 이유로, 철분 제제는 매우 정확한 방출 프로파일, 가장 바람직하게는 선형 프로파일을 특징으로 하는 것이 가장 중요하다. 이러한 프로파일은 높은 철분 생체 이용률을 달성할 수 있어야 하며, 적절히 긴 방출 시간과 관련하여 유기체에 의한 최적의 흡수를 가능하게 하여 결과적으로 미사용 이온의 과도한 과량을 감소시킬 수 있어야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) WO 2010/146155 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 중독의 위험을 야기하지 않고 적절한 용량을 허용하여, 전술한 부작용 없이 철분 결핍을 보충하거나 또는 철분에 대한 증가된 요구량을 만족시키는 제재를 제조하는 문제를 해결한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명에 따른 조성물은 유체 형태를 가지며, 0.1 내지 15.0% w/w의 양의 7 내지 10 마이크로 미터 범위의 평균 입자 크기를 갖는 원소 철분 및 85% 내지 99.9% w/w의 양의 글리세롤, 식물성 및/또는 어유를 개별적으로 또는 혼합물로 함유할 수 있다. 바람직하게는, 원소 철은 7㎛ <D_{50} <10㎛, D_{90} <15㎛의 특성을 갖는 입자 크기 분포를 갖는다.

[0016] 오일로서, 상기 조성물은 바람직하게는, 바람직하게는 C6 내지 C14의 사슬 길이를 갖는 중쇄 지방산의 트리글리세라이드, 옥수수 유, 평지 씨 유, 아마 인유, 미처리 야자 열매 유, 생선 간유, 대구 간 지방산 또는 다른 어유, 올리브 오일 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0017] 가장 바람직하게는, 상기 조성물은 C6 내지 C14의 사슬 길이를 갖는 중쇄 지방산의 트리글리 세라이드 혼합물을 함유하고, 가장 바람직하게는 C8 내지 C10의 길이를 갖는 사슬은 혼합물의 90% w/w를 구성한다.

[0018] 본 발명에 따른 조성물은 순환계 및 조혈 과정의 기능에 중요한 역할을 하는 부가적인 성분으로 또한 농축될 수 있고, 여기서 철이 중요한 역할을 한다. 이들의 활동의 추가적인 물질과 메커니즘은 어린이와 유아, 임산부 또는 임신 계획 여성을 위하여 의도된 제품에 대하여 적합성 정도를 결정한다. 조성물을 풍부하게 할 수 있는 성분은, 토코페롤 (비타민 E) 및/또는 α-토코페롤, 레티노이드 그룹 (비타민 A) 및/또는 레티놀의 유기 화합물의 혼합물, 2-메틸-1, 4-나프토 퀴논 (비타민 K)의 유도체들, (phytomenadione, phytonadione, phylloquinone라고 불리는) 비타민 K_1 및 비타민 K_2 (menaquinone-6, farnoquinone)의 두 개의 가장 중요한 유도체인 화합물의 그룹, D 비타민으로 알려진 지용성 스테로이드 유기 화합물, 에고칼시페롤(ergocalciferol) (비타민 D_2) 및 콜레칼시페롤(cholecalciferol) (비타민 D_3), 비타민 C (아스코르 빈산) 및 B 그룹, 특히 B_6, B_9, 및/또는 이들의 감소된 안정화된 테트라 하이드로 폴레이트, 예컨대, L-5-MTHF, L-5- 메틸테트라히드로폴레이트 및 B12로부터의 비타민들로부터 두 개의 가장 중요한 비타민들의 그룹을 포함한다. 비타민 C는 철 흡수를 돕고 적혈구의 성숙을 자극할 뿐만 아니라, 엽산 (비타민 B_9)의 활성화 및 세포 호흡 과정에서 중요한 역할을 한다. 엽산은 조혈(haemopoiesis)에 중요한 역할을 하고 적혈구의 형성과 성숙의 조절에 비타민 B_{12}와 협력하다. 비타민 B_{12}는 엽산의 생물학적 활성 테트라 하이드로 폴레이트로의 전환에 관여하며, 그것의 적절한 수준은 악성 빈혈과 같은 질병을 예방하다. 비타민 B_6는 헤모글로빈 형성 과정에 참여하고 또한 유기체의 면역을 증가시킨다.

[0019] 본 발명에 따른 조성물은 루테인 및/또는 리코펜 및/또는 제아크산틴과 같은 천연 유기 카로티노이드 군으로부터의 물질로 농축될 수 있고, 강력한 항산화 및 신경 보호 특성을 갖는 것과 별도로, 철 생체 이용률에 영향을 미치고, 철분 결핍이 있거나 커피를 많이 마시는 철분에 대한 요구량이 증가한 성인에게 매우 중요한 이른바 "커피 효과 (coffee effect)"를 제거한다.

[0020] 본 발명에 따른 조성물은 또한 프로바이오틱 박테리아 군: *Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium animalis, Lactobacillus casei, Lactobacillus bulgaricus*, 비병원성 순수 배양 효모 *Saccharomyces boulardii* 또는 프리바이오 틱 특성을 갖는 다당류 군의 물질: *rabinogalactan, inulin*로 농축될 수 있다. 이러한 물질은 림프구에 영향을 줌으로써 면역계의 기능에 유리하게 작용하거나, 유용한 장내 미생물의 성장을 보조함으로써 강한 프리바이오틱 활성을 나타내며, 이는 유해한 미생물에 의한 장의 콜로니화(colonisation)에 대한 자연적 보호막이 된다. 이러한 성분은 장내 미생물 군의 병원성 장애에 고도로 노출된 환자, 즉 약화되거나 손상된 면역계를 가진 환자 및 미숙아, 특히 적혈구 생성 인자(erythropoietin)로 치료된 환자를 위한 제제의 적용에 유용할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 조성물은 성분 유형에 따라 0.001 내지 10% w/w의 양으로 추가의 활성 성분을 함유한다.

[0022] 본 발명은 또한 철 결핍 보충을 위한 제제의 제조 및/또는 인간을 비롯한 포유 동물에서의 철분에 대한 요구량 증가를 충족시키기 위한 전술한 조성물의 적용을 포함한다. 철분의 독특한 성질 때문에 조성물은 영유아, 소아, 임산부 및 임신 계획 여성에게 투여, 치료 및 예방에 대해 특히 적합하다.

[0023] 본 발명에 따른 조성물은 원소 철분을 5 내지 30% w/w의 양으로 매개물의 제1부분과 초기 혼합한 다음, 현탁액을 형성하기 위해 매개물의 다른 부분을 첨가하고 격렬히 교반하여 제조된다. 추가의 활성 성분은 최종 혼합 단계에서 현탁액에 첨가된다. 조성물의 혼합 및 패킹 공정은 바람직하게는 질소, 아르곤, 헬륨과 같은 불활성 가스의 보호 압력(protective atmosphere)하에서 수행된다.

[0024] 본 발명에 따른 조성물의 매개물은 글리세롤, 옥수수 오일, 올리브 오일, 처리된 올리브 오일과 같은 유아 및 영아용 제품에 사용하기 위하여, 제품의 성질 : 농축 오일 및 지용성 성분의 용해도를 향상시키기 위하여, 또는 향을 향상시킬 뿐만 아니라 개별 복용자의 맛 선호도에 적응시키기 위하여 일반적으로 권장된 다른 매개물과 임의의 비율로 혼합될 수 있다. 동시에, 매개물은 산화 특성을 가지지 않을 수 있고, 이는 다양한 산화 상태(Fe2+, Fe3+)를 갖는 이온 형태의 철분과 관련하여 원자 형태의 철분의 제어되지 않은 불균형을 야기할 수 있다. 이러한 매개물의 사용은 이온화된 형태의 존재로 인하여 철 생체 이용률이 저하될 것이다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 조성물은 미사용된 철 이온의 농도가 증가하는 것으로 나타나는 가능성을 감소시킨다. 이러한 성질은 위에 정의된 입자 크기를 갖는 철 원소를 적용한 결과로, 위산의 참여로 철이 철 이온으로의 전환 비율이 증가됨에 기인한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1 및 도 2 는 실시예 5에 따라 2.1 mg/ml의 농도에서 시간 대비 연구된 시료 A, B 및 C의 흡광도를 나타낸 그래프.

도 3 은 실시예 6에 따라 원소 철분에 기초한 약학 제제로부터의 철 이온의 방출 속도 대 시간의 비교를 도시한 그래프.

도4 는 실시예 7에 따라 획득된 샘플 A 및 B에 대한 철분의 농축 결과를 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 전술된 특성은 본 발명의 저자에 의해 수행된 0.1M 염산 중 철 원소의 시험 관내(*in vitro*) 용해 속도에 대한 연구를 통해 확인되었다. 입자 크기 중앙값과 비교하여 (특허 출원 번호 WO 2010/146155A1에서 개시된 범위에서의) 8.5㎛, 9.5㎛로 정의된 입자 크기 특성을 갖는 철 원소가 사용되었고, 대조용으로 5.2㎛가 사용되었다. 철분의 입자 크기 중앙값이 5.2μm인 경우 15분 후에 최대 흡광도가 이미 달성되었다. 중앙값이 8.5μm인 경우 최대 흡광도는 20분 후에, 9.5μm인 경우 60분 후에 달성되었고, 후자의 경우에 최대 45분 동안 철 방출의 선형 의존성이 획득되었다.

[0028] 기본적으로, 철분 입자가 작을수록 염산에서의 용해 반응은 더 빠르다. 본 발명의 저자는 매우 좁은 범위의 입자 크기가 있으며, 이러한 입자 크기에 대한 프로세스가 지수 의존성으로부터 선형 의존성으로 변화하고 나서 0차 특성에 접근함을 발견하였다. 이러한 경계는 7 내지 9.5 마이크로 미터 사이의 입자 크기 범위에 있다.

[0029] 0.1M 염산에서의 철 입자의 용해 특성은 정해진 크기의 입자를 함유하는 약학 제제에서의 철 방출 특성을 변환시킨다. 특허 출원 WO2010/146155A1의 명세서에 따라 MCT 오일 및 5.2 마이크로 미터 (중간 값 D_{50}) 크기의 입자를 갖는 겔의 형태로 제조된 제제는 철 이온의 지수 방출 경향을 나타낸다. 반면에, MCT 오일에 기초한 제조에서 8.5 마이크로 미터 크기의 입자의 사용으로 인해 선형 동역학을 따르고, 최대 농도는 위장의 통로에 대응하는 시간에서 획득되었다. 결과적으로, 동화 가능성이 가장 높은 것으로 결정된 투여량과 관련하여 본 발명에 따라 정의된 입자 크기 범위에 기초하여 제조된 약제학적 제제는, 장내에서 형성되는 과량의 철 이온이 비-생리적 박테리아 식물의 성장을 촉진할 수 있는 경우, 동화 능력을 초과하는 양으로 유기체에 철의 도입과 관련하여 매우 효율적인 가용성 및 부작용의 최소화된 제제를 구성한다.

[0030] 소장을 자극하는 조건하에서 병원성 박테리아에 대하여 미사용된 철 이온의 감소된 농도의 영향이 본 발명의 저자에 의해 수행된 또 다른 시험 관내 연구에서 나타났다. 이번 연구는 MRSA ATCC-BAA-36 메커니즘을 지닌 E. coli ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae BAA-1705, Enterococcus faecalis ATCC 2912 및 Staphylococcus aureus 균주를 사용하여 수행되었다. 선택된 균주는 이러한 균주가 패혈증의 주요 원인이라는 사실 때문에, 사람의 소화관의 세균총(flora)을 나타내며 신생아 및 영아에게 특히 중요하다. 철분의 공급원으로서, 본 발명의 대상인 제제 (시료 A) 및 특허 출원 제 WO 2010/146155A1 호에서 개시된 제제 (시료 B)를 사용하였다. 동일한 양의 300μl에서 두 가지 철분 공급원이 사용되었다. 이러한 연구에서, 연구된 균주에 의해 사용된 철분과 해리된 철분의 양 모두에서 유의한 차이가 동일한 항온 처리 시간 후에 두 샘플에서 관찰되었다. 24시간의 항온 처리 이후, 다음과 같이 S. aureus의 표준 균주에 비해 철분 소모량이 3배 높았고, E. faecalis 표준 균주에 비해 철분 소모량이 13배 높았으며, E. coli ATCC25922의 표준 균주에 비해 철분 소모량이 187배 높았고, 그리고 샘플 A에 비해 샘플 B에서 K. pneumoniae의 표준 균주에 의한 철분 사용에서의 약간의 차이 (약 1 배)가 발견되었

다.

[0031] 본 발명의 대상인 제제 (샘플 A)의 경우, 48시간 후에 35.6mg/l가 수성 상태(aqueous phase)로 방출되는 반면, 특허 출원 번호 WO2010/146155A1에서 설명된 제조 (샘플 B)에 대하여, 농도는 132.1 mg/l에 해당하였다. 재계산 결과와 같이, 철 농도가 0.026 mg/ml 일 때, E. coli ATCC 25922 개체수(population)의 1 log 성장이 관찰되었고, 연구된 두 샘플에서, 48시간 후에 미생물의 수는 비슷한 정도를 나타냈다. 그러나, 미생물에 의해 흡수된 철분 및 해리된 철분의 농도에 현저한 차이가 있기 때문에, 본 발명의 대상인 제제에 대하여, 병원균 개체수의 성장의 감소가 생체 내(in vivo) 상태하에서 기대되어야 한다. 시험 관내(in vitro) 연구의 결과는 철 원소의 입자 크기와 이온의 방출 속도 사이의 의존성뿐만 아니라 미사용 철 이온의 농도가 증가하는 경우에 흡수를 위한 박테리아의 능력이 증가함을 명백한 방식으로 보여준다. 수치 데이터에 의해 나타내지는 바와 같이, 흡수 용량, 및 따라서 병원성 박테리아 집단의 성장 능력은 철 원소의 입자 크기가 엄격하게 정의된 발명 조성물의 경우에는 상당히 제한적이다.

[0032] 언급된 특성들 및 적은 복용량을 사용할 수 있는 가능성 때문에, 엄격하게 규정된 입자 크기를 갖는 철분 원소를 함유하는 본 발명에 따른 제제는 극소량의 독성을 특징으로 하며, 부작용의 발생 및 강도가 최소로 감소된다. 동물 모델을 사용한 연구에서, 철 원소가 용해성 철염에 비해 독성이 30-150배 정도 낮다는 것이 입증되었다. 그러한 철분의 복용량을 최소한으로 감소시킬 수 있는 가능성이 - 철분 요소를 이온 형태로 전환하는데 있어서 위액의 참여에도 불구하고 - 영양 과정에서 핵심적인 역할을 하는 위산(gastric juices) 관리의 방해가 발생하지 않도록 한다.

[0033] 본 발명에 따른 조성물의 유체 형태는 체중 1킬로그램 당 제제량의 단순한 재계산에 의해 개별적으로 제제 투여량을 선택할 가능성을 제공한다. 이러한 제품은 부작용의 중독 또는 강화, 또는 철분에 대한 증가된 요구를 충족시키지 못하는 복용량을 수용하는 것으로 이어지는, 고형 제형의 임계 복용 용량의 단점들 및 과다 복용 위험과 관련된 단점들을 완전히 제거한다.

[0034] 본 발명에 따라 정의된 좁은 범위의 입자 크기를 갖는 원소 철의 적용은 인간 유기체에서 매우 높은 생물학적 이용 가능성을 유도하고 미사용 철 이온의 고농축 효과를 감소시킨다. 이러한 사실은 소화관에서의 느린 흡수와 관련되는 경우에, 원소 철이 점차적으로 그리고 선형적으로 방출되도록 한다. 결과적으로, 독성 및 부작용의 강도가 감소되고, 동시에 적절한 양의 이온을 동화시키는 데 필요한 시간이 길어지고, 실수로 과도한 투여를 할 경우 의학적 개입에 대해서도 그러하다.

[0035] 본 발명에 따른 조성물의 매개물은 철 공급원과의 반응성이 완전히 결여되어 있는 것을 특징으로 하고, 이들은 산화 특성을 갖지 않는다. 이러한 사실 때문에, 철분과 매개물은 상호 작용시 물리-화학적 성질을 안정적으로 유지하다. 따라서, 매개물로서의 물뿐만 아니라 조성물을 보존하고 안정화시키는 물질을 사용할 필요성은 제거되었다. 더욱이, 전술된 오일의 일부, 특히 MCT 오일은 특정 화학 구조로 인해 항균(antibacterial) 및 항진균성(antifungal properties)을 나타내고, 조성물의 높은 안정성에 추가로 기여하다. 중형 사슬 오일의 혼합물, 특히 MCT 그룹 (중쇄 트리글리 세라이드 혼합물)의 오일 복합체와 같은 적용은 매개물 자체의 긍정적 효과를 고려하면, 유기체에 유리하게 영향을 미친다는 점이 강조되어야 한다. 더욱이, 본 발명에 따른 조성물은 중성 맛과 향기를 제공한다.

[0036] 본 발명에 따른 제제로부터 철분 방출의 바람직한 프로파일은 최종 산물의 섭취된 투여량에서 활성 성분 대 매개물의 최적의 정량적 비율을 결정할 수 있게 한다. 매개물의 사용 안전성과 감각 자극에 반응하는 특성(organoleptic properties) (맛, 향기, 색)은 특히 소아과에서 사용되는 제품의 경우에 중요한 역할을 한다. 임산부 및 임신 계획 여성뿐만 아니라 어린이 및 영아를 위한 제제의 경우에 활성 성분과 관련하여 사용되는 매개물의 양도 또한 중요하지 않다.

[0037] 사용된 원소 철분 입자의 엄격하게 정의된 크기는 또한 유기체의 동화 능력을 초과하는 양으로 외인성 철분(exogenous iron)을 제공함으로써 장의 생리 세균총에 존재하는 박테리아 균주의 병리학적 활성의 유도와 관련된 위험을 최소화할 수있게 한다.

[0038] 본 발명에 따른 조성물의 조합은 조성물이 아래의 특성을 갖는다는 사실 때문에, 현재까지 존재하는 문제점을 해결하고 모든 철-함유 제제의 공통적인 특징을 구성한다:

[0039] - 개별 환자의 필요에 적응되도록 선형, 연속 투여량의 가능성.

[0040] - 단순 투여량 결정;

[0041] - 높은 철 생체 이용률;

[0042] - 추가적인 안정제 또는 방부제 사용의 필요성 제거;

[0043] - 시간 경과에 따른 안정성;

[0044] - 결정하기 어려운 산화 상태를 갖는 이온화된 형태의 형성 위험 제거;

[0045] - 생물학적 이용 가능성을 향상시키고 다량의 철분으로부터 유기체를 보호하기 위해 변형된 제제를 사용할 필요성 제거;

[0046] - 부작용 강도의 현저한 감소;

[0047] - 우발적인 또는 의도적인 제제의 과다 복용의 위험 감소

[0048] - 입안의 금속성 맛 제거;

[0049] - 철분 이온을 함유한 액상 제품에 특징적인 치아 변색의 제거;

[0050] - 겔 형태를 갖는 제제에 대한 불리한 특성의 결여: 철 입자의 침강 이후 제제의 균질성 복원의 어려움 및 시간 소모, 소화 체계의 초기 영역 및 식도(oesophagus)의 점막(mucous membranes)에 접착되는 겔의 경향 및 고점도의 제제와 관련된 투여량의 적용하는데 있어서의 불편함.

[0051] 이러한 특징으로 인해 본 발명에 따른 조성물은 철 결핍을 보충하거나 인간 유기체에서 철에 대한 증가된 요구를 만족시키는 독창적이고, 기술적으로 진보된 최신 제제를 만든다. 안정화제 및 방부제가 없기 때문에, 본 발명에 따른 제제는 소아뿐만 아니라 임산부에 의해 사용될 수 있다. 상기 조성물은 또한 다량의 음료를 마시는 사람에 대해 이른바 "커피 효과"를 제거하는데 있어 유용하다.

[0052] 본 발명의 주제는 아래의 하기 실시 예에서 상세히 설명된다.

[0053] **<실시예 1>**

[0054] D_{50} = 8.5㎛의 중간 섬도(medium fineness)를 갖는 2.958g 양의 원소 철 및 MCT 오일로 알려진 중쇄(medium-chain) C6-C14 트리글리세리드의 혼합물 95.600g을 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0055] 철분의 총 중량이 총 오일 량의 5%를 함유하는 탱크에 첨가되었다. 내용물은 투여 중에 적어도 50 rpm의 속도로 격렬하게 교반되었고, 물질의 가능한 응집(agglomeration)을 회피하기 위해 분말을 배치 형태로 첨가하였다. 분말을 투여 한후 15분 동안 교반을 계속 하였다. 획득된 현탁액을 잔여 오일로 완결시키고 적어도 50 rpm의 속도로 30분 동안 혼합하였다. 혼합이 공정의 전체 지속 기간 동안 계속되었고, 전체 공정은 실온에서 수행되었다.

[0056] **<실시예 2>**

[0057] D_{50} = 8.5㎛의 중간 정도의 섬도를 갖는 15.915g 양의 원소 철, 및 85.600g의 양의 MCT 오일을 하기 방식으로 제조하였다.

[0058] 철분의 총 중량이 오일의 총 중량과 함께 탱크에 첨가되었다. 내용물은 투여 중에 적어도 50 rpm의 속도로 격렬하게 교반되었고, 물질의 가능한 응집을 피하기 위해 분말을 배치 형태로 첨가하였다. 분말을 투여한 후, 혼합물을 25분 동안 더 교반 하였다. 혼합 공정은 실온에서 수행되었다.

[0059] **<실시예 3>**

[0060] D_{50} = 8.5㎛의 중간 정도의 섬도를 갖는 2.958g 양의 원소 철, 토코페롤 0.050g 및 글리세롤 95.600g으로 이루어지는 조성물을 다음과 같이 조제하였다.

[0061] 토코페롤을 글리세롤 총량의 5%를 함유하는 탱크에 넣고, 철분의 총 중량이 첨가되었다. 내용물은 투여 중에 적어도 50 rpm의 속도로 격렬하게 교반되었고, 물질의 가능한 응집을 피하기 위해 분말을 배치 형태로 첨가하였다. 분말을 투여한 후 20분 동안 계속 교반 하였다. 수득된 현탁액을 잔류하는 글리세롤로 완결시키고, 적어도 50 rpm의 속도로 30분 이상 동안 격렬하게 교반 하였다. 상기 공정은 실온에서 수행되었다.

[0062] **<실시예 4>**

[0063] D_{50} = 8.5㎛의 중간 섬도 2.958g 양의 원소 철, 0.050g의 토코페롤, 60.000g의 MCT 오일, 35.500g의 올리브 오

일, 비타민 B_{12} (글리세롤 중 0.1% 용액) 0.100g을 아래의 방식으로 제조하였다.

[0064] 총 MCT의 5%를 함유하는 탱크에 토코페롤을 첨가 한 다음, 철분의 총 중량이 첨가되었다. 내용물은 투여 중에 적어도 50 rpm의 속도로 격렬하게 교반되었고, 물질의 가능한 응집을 피하기 위해 분말을 배치 형태로 첨가하였다. 분말을 투여한 후 15분 동안 계속 교반 하였다. 그 다음, 계량된 양의 올리브유를 첨가하고, 탱크의 내용물을 추가로 15분 동안 혼합하였다. 수득된 현탁액을 나머지 MCT 오일로 완결시키고 적어도 50 rpm의 속도로 30분 이상 동안 격렬하게 교반 하였다. 전체 공정은 실온에서 수행되었다.

[0065] **<실시예 5>**

[0066] 0.1M 염산 중 원소 철의 용해 반응 속도에 대한 시험관 내 연구가 수행되었다. 시료 중의 철 이온의 농도는 착색 지시약인 페난트롤린과 관련하여 파장 511 nm에서의 흡광도를 측정하여 분광 광도계 법을 사용하여 결정하였다 (문헌 데이터에 따르면, 이 값은 철(II) - 페난트롤린 복합체의 최대 흡광도에 해당한다).

[0067] 이 연구에서 5.2㎛ (시료 A), 9.5㎛ (시료 B) 및 8.5㎛ (시료 C)의 입자 크기 중앙값을 갖는 원소 철 (카르보닐 철(carbonyl iron) - 파우더)이 사용되었다. 철 입자 크기의 특성을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0068] 이온 입자 크기의 특성

샘플 지정	입자 크기 및 크기 분포 중앙값D_{50} [㎛]	D_{10} [㎛]	D_{90} [㎛]
A	5.2	3.5	9.2
B	9.5	3.6	17.8
C	8.5	2.7	13.0

[0069] 10.5 mg의 각 시료 (A, B, C)가 계량된다. 37℃에서 0.1M의 염산 5㎖를 각 계량 물에 2.1mg/ml의 농도로 첨가하였다 (상기 산은 초음파 용기(bath)에서 이전에 온도 조절되었다). 샘플을 전체 측정 기간 동안 37℃에서 초음파 세척기에 보관되었고, 현탁액 형태의 샘플 10㎕가 특정 시간 후에 수집되었다. 수집 이전에, 전체 부피에 대해 균일한 농도를 얻기 위하여 시료를 흔든 다음, 흡광도 측정 중에 여전히 반응할 수 있고, 결과를 방해할 수 있는 비-이온화 철 입자를 제거하기 위해 네오디뮴 자석을 사용하여 용액에서 철이 분리된다. 일정한 농도의 철 (Ⅱ) 이온이 획득될 때까지 측정이 수행되는데, 시료 대 시간에서 철 (Ⅱ) 이온의 농도 곡선에서 고원(plateau)이었다. 염산 중의 철 (Ⅱ) 이온을 함유하는 조사된 용액 (각각 10㎕)의 일부가 표 2에 기재된 아래의 조성을 갖는 용액을 함유하는 세포로 전달되었다.

표 2

[0070] 철(II) 이온이 첨가되기 이전에 측정 셀 내의 샘플의 조성

샘플의 조성물	㎕
물	1720
시트르산 나트륨(sodium citrate) 10% w/w	20
히드록실아민 히드로클로라이드(hydroxylamine hydrochloride) 10% w/w	40
페난 트롤린 (phenanthroline) (0.1 M HCl 내에 0.25% w/w)	200

[0071] 철 (II) 이온을 함유하는 용액의 일부가 다른 시약을 함유하는 세포에 첨가된 직후에 흡수 스펙트럼이 기록되었다. Perkin Elmer Lambda 650 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여, 스펙트럼을 360 nm에서 700 nm 범위에서 1 nm의 해상도로 기록했다. 511 nm의 파장에 대해, 최대 흡광도가 관찰되었다 - 문헌의 데이터에 따르면, 이는 철(II)-페난 트롤린 복합체의 흡광도에 해당한다. 흡광도 측정은 파장 511 nm에 대응하여 최대로 수행되었다. 획득된 흡광도 값을 분석 곡선에 의거하여 시료 중의 철 (Ⅱ) 이온 농도의 계산에 사용하고 희석을 고려하였다 (모든 획득된 흡광도 값이 교정 커브(calibration curve)의 선형 범위 내에 있도록 측정 조건이 선택되었다). 샘플 대 시간에 대한 샘플의 철 (Ⅱ) 이온 농도의 변화에 대한 의존도가 도시되었다.

[0072] 시료 A에서 철이 가장 빨리 유리(liberate)되었다 - 15 분 후에 최대 흡광도가 이미 획득되었다. 샘플 C는 샘플

A보다 상대적으로 느리게 용해되었다 - 20 분 후에 최대 흡광도가 얻어졌다. 샘플 B의 경우, 철 방출의 선형 의존성이 최대 45 분을 넘어서 획득되었다다. 최대 흡광도는 60 분 후에 획득되었다.

[0073] 결과들이 그래프로 획득된다: 도 1 및 도 2는 2.1 mg/ml의 농도에서 시간 대비 연구된 시료 A, B 및 C의 흡광도를 나타낸다. 도 2는 본 발명의 요지를 정확히 예시하기 위해 2.1 mg/ml의 농도에 대한 샘플 A, B 및 C의 상세한 비교를 도시한다.

[0074] 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 5 내지 8.5 마이크로 미터 크기의 (D_{50} 중간 값으로 계산된) 철 입자는 반응의 지수 특성을 나타내지만, 반면에 임계 값 8.5 마이크로 미터를 초과하는 입자 크기의 약간의 증가 (연구에서 - 9.5 마이크로 미터의 중앙값)로 인해 이러한 의존성이 선형 형태로 이미 전환되고, 0차 동력학에 따라 행동하는 경향이 있다.

[0075] **<실시예 6>**

[0076] A와 C 철분 입자에 기초하여 개발된 약제에 관한 연구가 동일한 분석 방법을 사용하여 수행되었다. 샘플 A 입자에 기초한 제제는 특허 출원 번호 WO 2010/146155A1에 개시된 설명에 따라 구성되는 반면, 샘플 C 입자에 기초한 제제는 본 발명의 주제에 따른 설명에 따라 제조되었다.

표 3

[0077] 입자 A 및 C에 기반하는 약제 제재의 합성의 조성물

제품 지정	원소 철분	MCT	콜로이드 성 실리카(Colloidal silica)	산화 알루미늄(Aluminium oxide)
A	25%	Ad 100 g	0.625g	0.125g
C	1.52%	Ad 100 g	-	-

[0078] 제제 C의 중량을 계량하는 수집 이전에, 균일한 혼합물을 얻기 위해 균질화 기 (진폭 = 70%, 사이클 = 0.5)에서 5분간 흔들어 시료의 균질화를 수행하였다. 계량된 철 오일 현탁액 (MCT 내의 카르보닐 철, 1.52%, D_{50} = 8.5 μm) - 668.7 mg의 중량을 갖는 제재 - 이 0.1M 염산에 최대 2.1 mg/ml의 농도로 용해되었다. 일련의 측정은 실시 예 5의 경우와 같이 수행되었다. 반응 시간에 대한 철 (II) 이온의 "선형" 의존성은 511 nm에서 최대치에 대하여 5-45 분 동안 획득되었다 (R2 = 0.999).

[0079] 계량된 제재 A를 수집하기 이전에 균일한 혼합물을 얻기 위해 균질화기 (진폭 = 70%, 사이클 = 0.5)에서 5분간 흔들어 샘플의 균질화를 수행하였다. 42 mg의 중량을 갖는 철 오일 현탁액 (원소 철, 25%, D_{50} = 5.2 μm)의 무게를 0.1 M 염산에 최대 2.1 mg/ml의 농도로 용해되었다. 실시 예 5의 경우와 같이 일련의 측정이 수행되었다.

[0080] 조성을 비교하여 표 3 및 도 3에 나타내었다. 도 3은 원소 철분에 기초한 약학 제제로부터의 철 이온의 방출 속도 대 시간의 비교를 도시한다.

[0081] 실시 예 5에서 조사된 입자를 사용하여 제조된 약제학적 제제에서 방출 특성의 경향이 확인되었다. MCT 오일 및 5.2 마이크로 미터 (중간 값 D_{50}) 크기를 갖는 입자에 기초한 겔 형태의 제조 A는 철 이온의 지수 적 방출 경향을 나타낸다. 8.5 ㎛의 크기를 갖는 철 입자를 함유하는 제제 C는 선형 동역학을 따르고, 최대 농도는 위장의 통로에 대응하는 시간에서 획득되었다.

[0082] **<실시예 7>**

[0083] 병원성 균주에 의해 흡수된 철분 및 방출된 철분의 양의 차이를 보여주는 시험관 내 연구가 이온이 없는 M9 최소 배지, 또는 TSB (트립신 소이 브로스)를 사용하여 수행하였다. *E. coli*의 표준 균주인, *세균진락(Klebsiella pneumoniae)*을 37℃ +/-1℃에서 24시간 동안 M9 최소 배지에서 배양하였다. MRSA 메커니즘을 갖춘 *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*의 표준 균주를 TSB (트립신 소이 브로스) 배지에서 37℃ +/-1℃에서 24 시간동안 배양하였다. 이후, 표준 균주 배양물을 원심 분리 (2000rpm, 10 분)하고, 상층 액을 경사 분리하고, 바닥에 남아있는 세균 세포의 침전물을 상응하는 배지 M9 또는 TSB 10ml로 세척 한 다음 다시 한번 원심 분리하였다. 상기 절차가 두 번 반복되었다. 세포 침전물을 세척한 후, 상응하는 배지 M9 또는 TSB 10ml를 첨가되고 충분히 교반되었다. (10배 희석법에 의해) 집락 형성 단위(colony forming units) (cfu/ml)의 초기

수를 결정하기 위해 콜롬비아 한천 배지(Columbia agar medium) (*Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus*) 또는 맥콘키 한천(McConkey agar) (*E. coli, Klebsiella pneumoniae*)에 이렇게 제조된 순수 배양물을 접종(inoculate)하고, 그리고 나서 추가 시험에 사용하였다. 이렇게 제조된 배양물을 상응하는 배지 (TSB 또는 M9)에서 $10^2/10^3$ cfu/ml의 밀도로 현탁액으로 희석시켰다. 300㎕의 현탁액을 에펜도르프(Ependorff) 시험관에 넣고, 300㎕의 상응하는 샘플 A 또는 B 를 첨가하였다. 각각의 균주에 대해, 시료 A에 대하여 2개의 Ependorff 시험관과 시료 B에 대하여 2개의 Ependorff 시험관 (철분 농도 측정을 위한 첫 번째 시료, cfu/ml 및 OD 측정을 위한 두 번째 시료)이 이러한 방식으로 준비되었다. 배양되지 않은 2개의 대조 샘플도 300μl의 샘플 A 또는 B를 300μl의 M9 배지에 첨가함으로써, 같은 방법으로 준비되었다. 전술된 모든 것들은 37° C +/-+/-1° C에서 배양한 다음, 수성 상(aqueous phase)만을 사용하여 30분, 8시간, 24시간, 48시간 후 측정을 수행했다. 수성 상이를 전체적으로 원심 분리되었고, (세포에 의해 흡수된 철분의 양을 조사하기 위하여) 세포 펠렛 및 나머지 상청액을 별도로 시험에 사용하였다. 철분을 세포 펠렛으로부터 유리시키기 위해, 세포 펠렛을 60℃에서 3시간 동안 배양한 다음 유리 비드를 사용하여 분해시켰다. ELAN 6100 분광기 (Perkin Elmer, USA)를 이용한 유도 결합 플라즈마 질량 분석법 (ICP-MS)을 사용하여 철분 이온 농도를 측정하였다. 다음으로, 시료 (펠릿 및 상층 액)에 초고순도 질소(ultrapure nitric) (V) 산 1.2ml를 가하여 미네럴화 한 다음 100㎕를 수집하여 증류수로 5ml로 희석하였다. 동시에, OD가 또한 측정하고, 일련의 희석 방법에 의한 정량 배양(quantitative culture)을 실시하고, 동시에, 각 균주에 대해서도 양성 대조를 실시하였다. 획득된 샘플 A 및 B에 대한 철분의 농축 결과를 표 4 및 도 4에 나타내었다. 병원성 박테리아에 흡수된 철분의 농도를 표 5, 표 6에 나타내었다.

표 4

[0084] 샘플 A 및 B에 대하여 방출된 이온의 양

시간	제제 A	제제 B
	mg/L	mg/L
30'	41.53	108.68
8h	36.45	109.29
24h	37.85	103.96
48h	35.63	132.13

표 5

[0085] 균주에 의해 흡수된 철분 농도 : 샘플 A 및 B에 대한 S. aureus ATCC-BAA-36 및 E. faecalis ATCC 2912

	S. aureus ATCC -BAA-36 균주		*E. faecalis* ATCC 2912 균주	
	제제 A에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml	제제 B에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml	제제 A에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml	제제 B에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml
0 h	0	0	0	0
30'	0.03	0.05	0.018	0.05
8 h	0.04	0.12	0.029	0.06
24 h	0.05	0.159	0.04	0.54
48 h	0.122	0.157	0.04	0.98

표 6

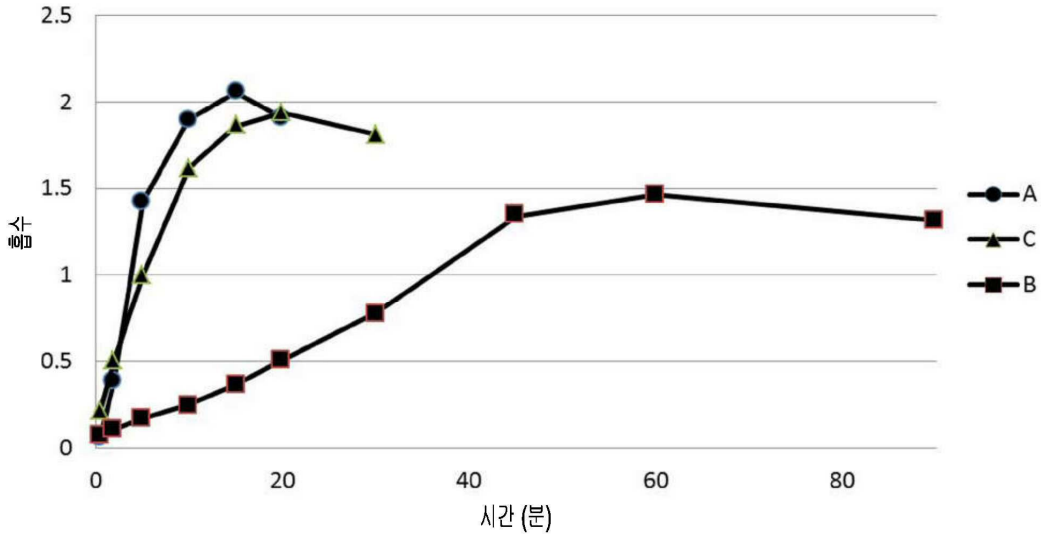
[0086] 균주에 의해 흡수된 철분 농도 : 샘플 A 및 B에 대한 E.coli ATCC25922 및 K. pneumoniae BAA-1705.

	E. coli ATCC25922 균주		*K. pneumoniae* BAA-1705 균주	
	제제 A에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml	제제 B에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml	제제 A에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml	제제 B에서 흡수된 철분의 농도, mg/0.3 ml
0 h	0	0	0	0
30'	0.016	0.04	0.013	0.029
8 h	0.019	2.88	0.023	0.026

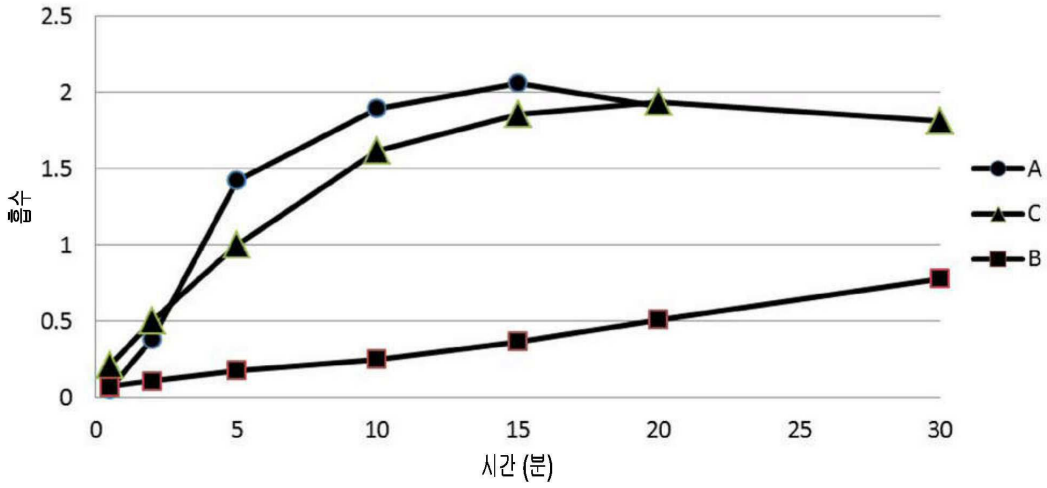
24 h	0.0155	2.81	0.015	0.02
48 h	0.018	0.01	0.025	0.028

도면

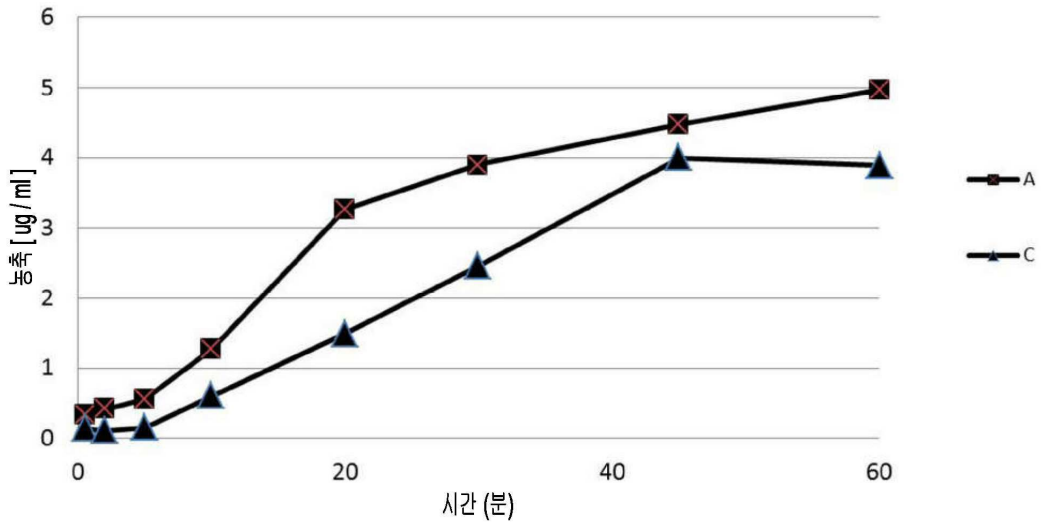
도면1



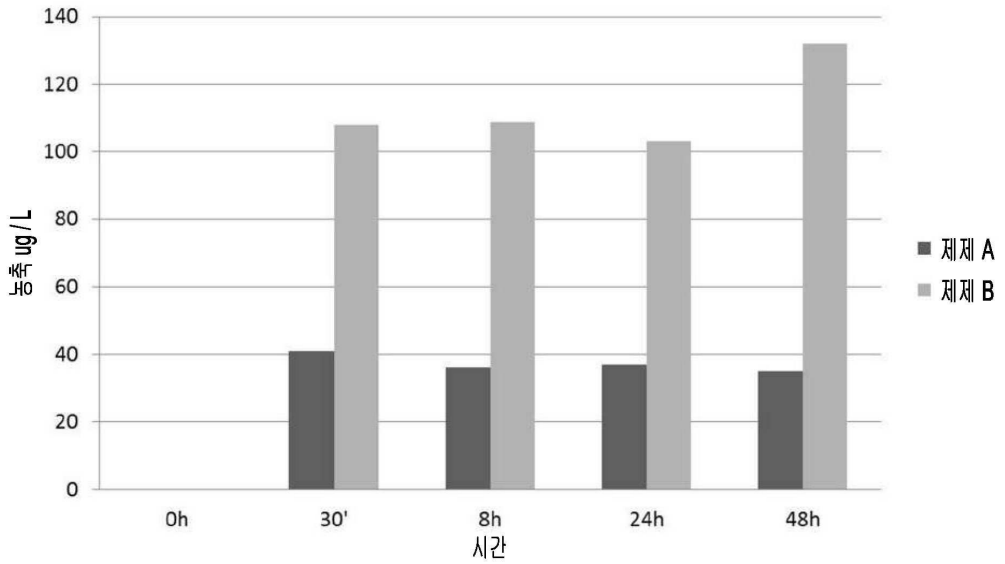
도면2



도면3


6
5
4
3
2
1
0
농축 [ug/ml]
0
20
40
60
시간 (분)
A
C

도면4


140
120
100
80
60
40
20
0
농축 ug/L
0h
30'
8h
24h
48h
시간
제제 A
제제 B