

Volume 78, Issue 3, August 2011

ISSN 0939-6411
78(3) 307-540

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics
Volume 78, Issue 3, August 2011, Pages 480-491

***A comparative study of the physicochemical properties of iron
isomaltoside 1000 (Monofer®), a new intravenous iron preparation
and its clinical implications***

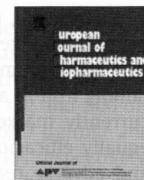
by

***Markus R. Jahn, Hans B. Andreassen, Sören Fütterer,
Thomas Nawroth, Volker Schünemann, Ute Kolb,
Wolfgang Hofmeister, Manuel Muñoz, Klaus Bock,
Morten Meldal, Peter Langguth***

Official Journal of



International Association for Pharmaceutical Technology
Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.
Association Internationale pour la Technologie Pharmaceutique



Сравнительное изучение физико-химических свойств железа (III) гидроксид олигоизомальтозата 1000 (Monofer®), нового препарата железа для внутривенного введения, и его клиническое значение.

Markus R. Jahn^a, Hans B. Andreasen^b, Sören Fütterer^a, Thomas Nawroth^a, Volker Schünemann^c, Ute Kolb^d, Wolfgang Hofmeister^e, Manuel Muñoz^f, Klaus Bock^g, Morten Meldal^g, Peter Langguth^{a,*}

^a Institute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes-Gutenberg University, Mainz, Germany

^b Pharmacosmos A/S, Holbaek, Denmark

^c Department of Physics, Technical University Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany

^d Institute of Physical Chemistry, Johannes-Gutenberg University, Mainz, Germany

^e Institute of Geosciences, Johannes-Gutenberg University, Mainz, Germany

^f Transfusion Medicine, School of Medicine, University of Málaga, Málaga, Spain

^g Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vej 10, Valby, Denmark

Article Info

Article history:

Received 14 December 2010

Accepted in revised form 15 March 2011

Available online xxxx

Ключевые слова

Неорганические наночастицы, коллоиды, стабильность, устойчивость, свободное железо, восполнение железа, скорость высвобождения

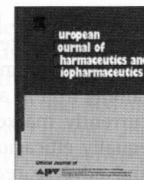
Абстракт

Лечение железодефицитной анемии многоядерными препаратами железа является признанным способом терапии как пациентов с хроническими заболеваниями почек, так и в других областях медицины: гастроэнтерология, кардиология, онкология, пред- и послеоперационный период, акушерство и гинекология. Парентеральные препараты железа представляют собой коллоидные системы в нижнем диапазоне нанометрового размера, которые состоят из железосодержащего ядра, окруженного оболочкой углеводов. В этой публикации мы впервые описываем новую матричную структуру железа изомальтозата 1000, которая отличается от традиционной формы в виде ядра, окруженного оболочкой углеводов. Несмотря на некоторые структурные сходства между различными формами железа, препараты значительно различаются по своим физико-химическим свойствам, таким как размер частиц, дзета-потенциал, содержание свободного и лабильного железа, высвобождение железа в сыворотке крови. Данное исследование сравнивает физико-химические свойства железа (III) гидроксид олигоизомальтозата 1000 (Monofer®) с имеющимися в настоящее время препаратами внутривенного железа и связывает их по их биофармацевтическим свойствам и утвержденным клиническим проявлениям.

Исследуемые препараты включают низкомолекулярный декстран железа (CosmoFer®), натрия железа глюконат (Ferrlecit®), железа сахарат (Venofer®), железа карбоксимальтозат (Ferinject®/Injectafer®) и ферумокситол (Feraheme®), которые сравниваются с железом (III) гидроксид олигоизомальтозатом 1000 (Monofer®). Показано, что есть значительное и клинически значимое различие между натрием железа глюконатом и железом сахаратом по количеству лабильного железа, а между декстраном железа, железом карбоксимальтозой, ферумокситолом и железом изомальтозатом 1000 – по стабильности многоядерных составов. Существуют различия по их иммуногенному потенциалу, обеспечению безопасности и удобству использования, по возможности введения высокой однократной дозы за короткое время. Monofer® является новым препаратом парентерального железа с очень низким иммуногенным потенциалом и очень низким содержанием лабильного и свободного железа. Это дает возможность назначать Monofer®, единственный среди препаратов железа для внутривенного введения, в качестве быстрого вливания высоких доз, в дозах, превышающих 1000 мг без применения тестовой дозы. Это позволяет гибко дозировать в том числе и высокие дозы, и добиваться быстрого насыщения железом, предлагая удобное однократное посещение для терапии железом широкого спектра пациентов.

1. Введение

Парентеральное введение препаратов железа сегодня широко используется для лечения железодефицитной анемии. Пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) также часто нуждаются в лечении парентеральным железом в дополнение к эритропоэтин-стимулирующим агентам [1]. Для пациентов с почечной недостаточностью, получающих лечение диализом, средняя потребность в железе из-за потери крови



эквивалентна 1-3 г элементарного железа в год [2]. Это достаточно легко может быть компенсировано путем частого внутривенного введения низких доз железа в ходе очередной процедуры диализа.

Изначально широко применяемая в нефрологии терапия препаратами парентерального железа распространилась в последние годы на другие медицинские области: гастроэнтерология [3], кардиология [4, 5], онкология [6], пред- и постоперационное ведение больных [7], акушерство и гинекология [8]. Однако, медицинские работники (врачи) этих направлений не так часто контактируют с пациентом, результатом чего стал повышенный спрос на удобное (доступное) назначение однократных высоких (больших) доз внутривенного железа.

Первые парентеральные препараты железа были токсичными, так как вводились в виде гидроксида железа. Эта проблема была решена с началом применения соединений, в которых углеводная оболочка окружает ядро из железа [9]. В настоящее время представленные на рынке препараты парентерального железа считаются одинаково эффективными, но отличаются по размеру молекулы, фармакокинетике, и профилю неблагоприятных реакций. В настоящее время внутривенные препараты железа включают высокомолекулярный декстран железа (Dexferrum®), низкомолекулярный декстран железа (НМДЖ) (CosmoFer®, INFeD®), натрия глюконат железа (Ferrlecit®), сахарат железа (Venofer®), карбоксимальтозат железа (Ferinject®/Injectafer®) и ферумокситол (Feraheme®). Использование высокомолекулярного декстрана железа было связано с повышенным риском анафилаксии и анафилактоидных реакций, и он не разрешен к применению в Европе [10-13]. Хотя эта проблема значительно уменьшена при применении низкомолекулярного декстрана железа [10-13], существует потребность тестовой дозы, а введение больших доз требует увеличения времени инфузии до 4-6 часов.

Натрия глюконат железа и сахарат железа, из-за относительной слабости комплекса железа, могут быть использованы только в умеренных дозировках [14]. Два новых парентеральных соединения железа, железа карбоксимальтозат и ферумокситол, недавно появились на фармацевтических рынках в ЕС и США, соответственно. *FDA не утвердил железа карбоксимальтозат для применения в США в связи с необъяснимой гипофосфатемией, увеличением числа неблагоприятных сердечных событий и дисбалансом в смертности в группе лечения по сравнению с контрольной группой в различных рандомизированных контролируемых исследованиях (RCTs) [15].*

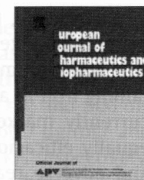
Несмотря на большую стабильность, чем у натрия глюконат железа и железа сахара, назначение железа карбоксимальтозата и ферумокситола все еще ограничено максимальной суммарной дозой 1000 мг и 510 мг, соответственно.

Новейший внутривенный железосодержащий препарат - железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000 (Monofer®) разработан и изготовлен Pharmacosmos в Дании и был принят к применению в Европе в 2010 году. Железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000 (Monofer®)

– это линейная химическая структура повторяющихся α 1-6 связанных молекул (единиц) глюкозы, со средним размером от 5,2 единиц (молекул) глюкозы и средней молекулярной массой 1000 Да соответственно. Этот неразветвленный, не провоцирующий анафилактоидных реакций комплекс углеводов [16, 17], структурно отличается от разветвленных полисахаридов, используемых в декстране железа (CosmoFer®).

Способ производства и короткий неионный олигоизомальтозат 1000 позволяет конструировать специальную матрицу с чередованием молекул железа и линейных изомальтозат-1000-олигомеров. Полученная матрица содержит около десяти молекул железа на одну пентамеру изомальтозата в виде сильно связанной структуры, что обеспечивает контролируемое и медленное высвобождение биологического железа в железосвязывающие протеины с минимальным риском токсичности свободного железа [18, 19]. Это позволяет безопасно назначать железа изомальтозат 1000 в виде быстрой внутривенной инфузии в высоких дозах или выполнять болюсные инъекции, предлагающие гибкость дозы, в том числе возможность полной компенсации потребности железа путем однократной инфузии, другими словами, введением одной насыщающей дозы железа.

В данной статье представлены и сравниваются физико-химические свойства железа (III) гидроксид олигоизомальтозата 1000 (Monofer®) с имеющимися в настоящее время на рынке другими препаратами железа. Кроме того, это сравнительное исследование многоатомных железосодержащих препаратов, используемых в настоящее время для лечения анемии, включает в себя взгляды на значимость свойств этих препаратов в отношении безопасности, эффективности и удобства введения.



2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Натрия глюконат железа (Ferrlecit[®], 12,5 мг Fe/мл в 3,2 мл ампулах; Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), железа сахарат (Venofer[®], 20 мг Fe/мл в ампулах по 5 мл; Vifor, München, Германия), низкомолекулярный декстран железа (CosmoFer[®], 50 мг Fe/мл в ампулах по 2 мл; Teva, Мерфэльд-Вальдорф, Германия), железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000 (Monofer[®], 100 мг Fe/мл во флаконах; Pharmacos-MOS, Holbaek, Дания), железа карбоксимальтозат (Ferinject[®], 50 мг Fe/мл в 2 мл флаконах; Vifor, Мюнхен, Германия) и ферумокситол (Feraheme[®], 30 мг Fe/мл, во флаконах по 17 мл; AMAG Pharmaceuticals, Lexington, MA, США) были получены в аптеке или непосредственно от изготовителя. Набор реактивов Феррозин был приобретен у Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Все препараты железа были использованы сразу же после открытия флакона или хранились при 4 °C в атмосфере азота. Разведение проводили дважды дистиллированной водой.

2.2. Гель-фильтрационная хроматография (ГФХ)

Очевидную среднюю молекулярную массу анализировали с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Перед проведением проб столбцы были откалиброваны с помощью стандартизованных декстранов. Стандартизованные декстраны, использованные для калибровки ГФХ, были коммерческими доступными стандартами от Фармакосмос и состояли из 25-ти декстранов: 50, 80, 150, 270, и 410 соответственно. Средний молекулярный вес M_w и пик средней молекулярной массы M_p были 23,000, 21,400; 48,600, 43,500; 80,900, 66,700; 147,600, 123,600; 273,000, 196,300; 409,800, 276,500 для 25-ти декстранов 50, 80, 150, 270, и 410, соответственно. Стандарты были проанализированы на соответствие Европейской Фармакопеи и Фармакопеи США декстран-пики стандартам.

Для ГФХ измерений применяли VE 3580 RI-детектор (Viscotec). Данные собраны, и расчеты произведены с использованием Omniscis 4.1 программным обеспечением от Viscotec.

Гидродинамический диаметр d_h рассчитывался по гидродинамическому объему $V_h = M_p |\eta|$, где характеристическая вязкость $|\eta|$ задается уравнением Mark Houwink [20]: $|\eta| = kM_v^a$, где M_v^a – вязкость средней молекулярной массы.

2.3. Динамическое рассеяние света (ДРС) и дзета-потенциал

Распределение размера и дзета-потенциала всей частицы, которая может включать гидроксид железа и оболочку из углеводов, были определены на ДРС. Разведенные образцы (0,4 мг Fe/мл бидистиллированной и стерильной фильтрованной воды) были измерены с помощью Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd.; Вустершир, Великобритания), с применением гелий-неонового лазера с длиной волны $\lambda=633$ нм, который освещал образцы и определял рассеивание информации под углом 173 градуса (неинвазивные технологии обратного рассеивания). Измерения дзета-потенциала проводились при различных значениях pH добавлением 0,1 нормального раствора HCl или NaOH, соответственно. Результаты были проанализированы программой Zetasizer Software DTSv612 в полученном объеме распределения.

2.4. Трансмиссивная электронная микроскопия (ТЭМ)

Размер ядра наночастицы комплекса железа был определен с помощью трансмиссивного электронного микроскопа EM420 (FEI/Philips, штат Орегон, США) при 120 кВ. Все препараты (1 мг Fe/мл, бидистиллированная вода) наносили на гидрофилизированные чашки (300 ячеек, диаметром 3 мм) и давали высохнуть. Медиана геометрического диаметра определялась по формуле: $d_g = \sqrt{(d_s^2 + d_l^2)/2}$, где $n=50$, d_s – наименьший размер, d_l – наибольший размер.

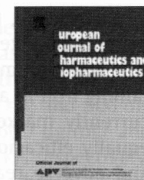
2.5. Дифракция рентгеновских лучей (ДРЛ)

Рентгенологическое измерение высушенного при 30 °C раствора было выполнено с ДРЛ 3000 TT (Seifert, Ahrensburg, Германия) с использованием Cu-излучения ($\lambda=1,54178$ Å, 40кВ, 30мА) в конфигурации Брэгга Брентано (Bragg Brentano) (автоматическое щелевое расхождение, с угловой скоростью 0,18 гр./мин).

Средний диаметр частиц d определяли по уравнению Scherrer: $d = \lambda / \beta \cos \theta$, где β – это полная ширина на половине высоты пика при $36^\circ 2\theta$ или $63^\circ 2\theta$.

2.6. Мессбауэровская спектроскопия (Mössbauer)

Спектры железа изомальтозата 1000 по Mössbauer были записаны с помощью обычного спектрометра в режиме постоянного ускорения. Изомерные сдвиги даны относительно α -железа при комнатной температуре. Спектры измеряли в закрытом циклическом криостате (Cryo Industries, USA) при 150 K, оснащенном



постоянным магнитом. Разложенные (расслоенные) магнитом спектры анализировались с применением наименьших квадратов с использованием Лоренцевых линий.

2.7. Разделенное железо в буфере

Количество свободного железа была определено с использованием диализной техники после выверки pH дисперсии (всего) каждого железа до 7,5. Дисперсионный объем, содержащий 150 мг железа (7,5 мл для низкомолекулярного железа декстрана, железа изомальтозата 1000, железа карбоксимальтозата и ферумокситола соответственно, 15,0 мл для натрия глюконата железа, а также 11,25 мл для железа сахараата) добавлялся до получения концентрации 20,0 мг Fe/мл для всех препаратов железа, за исключением натрия глюконата железа (10,0 мг Fe/мл) и железа сахараата (13,3 мг Fe/мл). Разведения были сделаны водой и 0,9% раствором хлорида натрия, соответственно. Объемы были помещены в диализатор (12000–14000 MWCO, Mediatech, London, UK) и диализировались в течение 24 ч при 20 °C со 100 мл воды или раствора хлорида натрия, соответственно. Общий объем, включая объем заполнения диализатора, составил 107,5 мл. Диализ каждого препарата железа проводили в дублях (дублирующих постановках). Железо в окружающем растворе определялось (подсчитывалось) с применением ICP-MS (индуктивно связанная плазма-масс-спектрометрия). Расчет проводили на аппарате 6000 Thermo ICAP ICP-OES (Thermo Scientific, Дания).

Железо оценивалось на 238,201 нм. Измерение производилось по оси. Применяли (использовали) двухточечную (слева направо) коррекцию базовой линии и внешнюю линейную калибровочную кривую.

Опыты проводили при комнатной температуре (20–24 °C). Для того чтобы оценить влияние pH на уровень разделения свободного железа, подобные эксперименты были проведены также для высокодозных внутривенных препаратов железа: низкомолекулярный декстран железа, железа изомальтозат, железа карбоксимальтозат и ферумокситол без изменения pH.

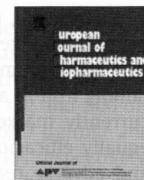
2.8. Кислоторастворимые FeOОН

Кислотный гидролиз FeOОН в $[\text{FeOОН}]_m\text{L}_n$ сопровождался количественным уменьшением концентрации FeOОН с ультрафиолетовой спектроскопией. Применяли спектрометр Лямбда 20 (Perkin Elmer). Считывание производили на 287,3 нм со сканированных данных с интервалом 1,0 нм, скорость сканирования 249 нм/мин, шаг 2,0 нм и плавность (сглаженность) 2,0 нм.

Поглощение вещества железа (10 мг Fe/л, 10 мм длины пути) в 0,9% NaCl/0,2375 M HCl измеряли при 287,3 нм от $t=0$ мин до $t=48$ ч, если не требовалось иное условие. После разбавления препарата железа начальное поглощение при $t \approx 0$ мин был установлено на 1, в соответствии с 100% нерастворяемым FeOОН, и все другие измерения были нормализованы к этому показателю. $\ln$ (нормализованные данные) противопоставлялись времени и соответствовали полиному второй степени ($R^2 > 0,990$). Период полужизни $t_{0,5}$ рассчитывали по $f_{\text{polynomial}}$ ($t_{0,5}$) = $\ln(0,5)$.

2.9. Феррозин® - определяемое лабильное железо

Растворение железа в сыворотке крови определяли методом с Феррозином® [21–24]. Феррозин® обнаруживает не только свободное железо, но и слабо связанное железо в комплексе, и железо, связанное с трансферрином в сыворотке крови, это определение позволяет определить *in vitro* пул лабильного железа в исследуемых препаратах для внутривенного введения. Этот метод определяет как двух-, так и трехвалентное железо, поскольку трехвалентное железо редуцируется аскорбатом (аскорбиновой кислотой) до двухвалентного. Вкратце, человеческую сыворотку инкубировали с препаратом железа в теоретических дозах 200 мг и 500 мг железа, что дает концентрацию в сыворотке 66,7 мкг/мл и 166,7 мкг/мл для человека с массой тела 70 кг, соответственно. Эти концентрации сыворотки следовали из объема крови 0,07 л/кг массы и сыворотки 60% от объема крови, что дает общий объем сыворотки крови приблизительно 3 л [25]. Эксперимент проводили при комнатной температуре (22 °C) в пробирках Eppendorf по 1,5 мл. Инкубация проводилась в течение 10 и 45 мин соответственно. Затем 100 мкл образца сыворотки анализировали путем добавления 700 мкл реагента 1, содержащего тиомочевину (115 ммоль) и лимонную кислоту (200 ммоль) с последующим добавлением 350 мкл реагента 2, содержащего натрий аскорбат (150 ммоль) и феррозин (6 ммоль). Поглощение комплекса измеряли на 562 нм примерно через 60 минут с использованием анализатора Lambda 20 Perkin Elmer (Perkin Elmer Инк, Waltham, Массачусетс, США) UV-VIS-спектрометра. Полученное поглощение в зависимости от кривой времени было обработано с применением полинома второй степени для каждого инкубационного периода, а значение точки пересечения с осью ординат рассчитывалось для получения сопоставимого теоретического количества железа, определенного методом с феррозином. Коэффициент регрессии для полиномиальной функции всегда был лучше, чем 0,995. Лабильный пул железа рассчитывался путем линейного регрессионного анализа полученных отрезков между двумя точками кривых инкубации при 10 мин и 45 мин инкубации.



2.10. Разъяснение (Выяснение) молекулярной структуры железа изомальтозата 1000

Протонный и углеродный ядерно-магнитно-резонансные (ЯМР) спектры были получены на приборе Bruker 800 МГц ЯМ, как приблизительно 5%-ные растворы в D₂O при 300°K. Сигналы были привязаны к внешнему диоксану.

Железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000 (10,3 мг) был растворен в D₂O (600 мкл). Проба была помещена в 5-и миллиметровую ЯМР-трубку, и ¹³C ЯМР-спектр был записан при 20 °C на приборе Bruker Avance 800 на 201,12 МГц для углерода (799,96 МГц для протона), интегрированный и сравнимый со спектром из олигосахаридов (7,3 мг) в D₂O (600 мкл) [26]. Оба образца были измерены снова, сигналы интегрированы после добавления 2,24 мг метил-β-мальтозида в качестве внутреннего стандарта.

Молекулярное моделирование: Во-первых, был создан изомальтодисахарид и МД (молекулярный динамический) расчет с использованием программы моделирования, MOE (Molecular Operating Environment, версия 2009.10, Chemi-CAL Computing Group Инк, Монреаль, Канада), при 450 °K, величине шага 0,1 фемтосекунды (Fs) четко показали значительное предпочтение гош-транс (gt) конфигурации C-5-C-6 связей независимо от начальной точки. O-1-C-6 гликозидная связь имела слабое предпочтение для трансрасположения, а ориентация C-1-O-1 связь соответствовала экзо-аномерному эффекту.

Пентамер изомальтозата (состоит из 5 α1-6 сопряженных молекул глюкозы) с глюцитолом на редуцированном конце был построен из дисахаридов в их предпочтительной форме и с минимизацией энергии. Молекулу пропитывали водой (восемь слоев/уровней) и молекулярная динамика выполнялась по указанным выше условиям, в течение 2 нс. Аддитивный эффект повторения стабилизации предпочтительной формы олигосахаридов по сравнению с дисахаридом был значительным. Полученная структура вновь пропитывалась и подвергалась минимизации энергии в воде.

3. Результаты

3.1. Общий размер частиц

3.1.1. Гель-фильтрационная хроматография

Рассчитанное по ГФХ хроматограммам распределение препаратов железа показало однородное распределение, за исключением ферумокситола и железа карбоксимальтозата, которые показывают дополнительные пики меньшего и большего диаметра (рис. 1). Гидродинамические диаметры d_h возрастают в порядке: железа сахарат < натрия глюконат железа < железа изомальтозат 1000 < низкомолекулярный декстран железа < железа карбоксимальтозат < ферумокситол (табл. 1). Ферумокситол был элюирован возле объема исключения, указывающего, что его диаметр и молекулярный вес могут быть недооценены.

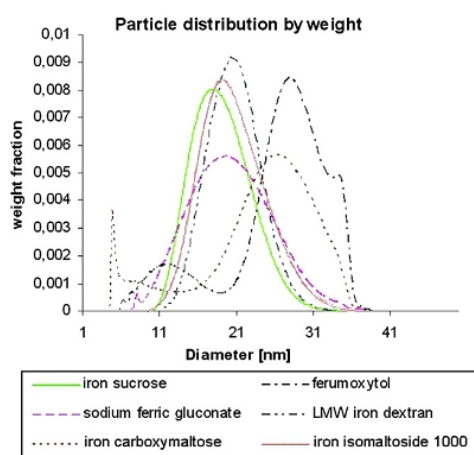


Рисунок 1. Распределение веса по отношению к диаметру частиц, определенному ГФХ (гель-фильтрационная хроматография).

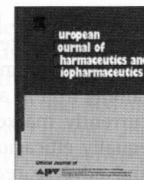


Таблица 1. Размеры оболочки/частицы, определенные при ГФХ (гельфильтрационная хроматография) и ДРС (динамическое рассеяние света)

Препарат железа	Молекулярная масса, кДа	Рассчитанный размер оболочки, Ø (нм) ^b	Оболочка, Ø (нм)		Поли-дисперсный индекс
			ГФХ	ДРС	
Железа натрия глюконат	164,1	20,3		8,6 ^a	0,244
Железа сахарат	140,1	19,1		8,3 ^a	0,192
НМДЖ	165,0	20,7		12,2 ^a	0,149
Железа гидрооксид олигоизомальтозат 1000	150,0	20,5		9,9^a	0,182
Железа карбоксимальтозат	233,1	23,8		23,1 ^a	0,07
Ферумокситол	275,7	26,3		23,6 ^a	0,143

^a-медиана Ø (диаметр)

^b-наиболее часто встречающийся в распределении диаметр частицы

3.1.2. Динамическое рассеяние света (ДРС)

Гидродинамический диаметр, определенный ДРС, также измеряет углеводные оболочки внутривенных препаратов железа и поэтому он больше, чем диаметр ядра оксида железа, определенного с помощью ПЭМ или РСА. На рис. 2 показаны диаметры всех частиц узким объемом распределения. Медианы гидродинамического диаметра увеличиваются с 8,3 до 23,6 нм в порядке: железа сахарат < натрия глюконат железа < железа олигоизомальтозат 1000 < низкомолекулярный декстран железа << ферумокситол < железа карбоксимальтозат (табл. 1). Дзета-потенциалы препаратов железа представлены в таблице 2. Без приведения в соответствие pH, все препараты железа заряжены отрицательно, за исключением железа карбоксимальтозата. Порядок заряда частиц, начинается с самого отрицательно заряженного препарата железа, которым является ферумокситол (-43,2 мВ) < натрия глюконат ≈ железа сахарат < железа изомальтозат 1000 < железа декстран < железа карбоксимальтозат (+3,7 мВ). Ацидификация (подкисление) проб увеличивала дзета-потенциал железа карбоксимальтозата и уменьшала отрицательное значение дзета-потенциала всех других соединений. При значении pH, близком к физиологическому, все препараты показали отрицательный дзета-потенциал, однако, для железа карбоксимальтозата он был наименьшим.

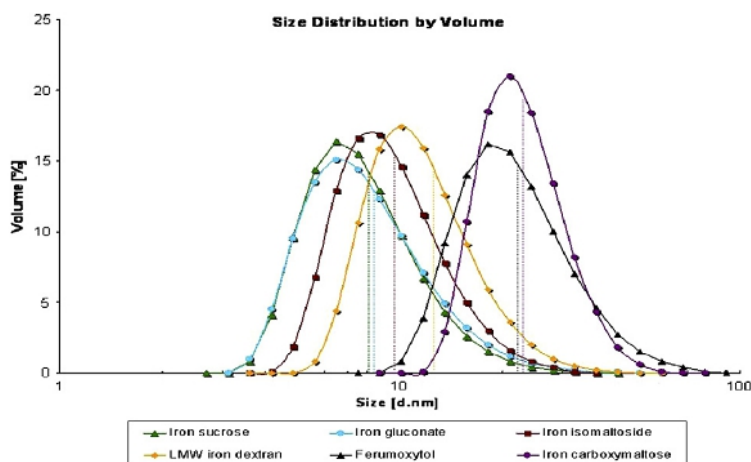
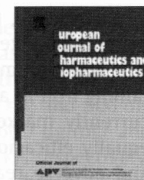


Рисунок 2. Объем распределения гидродинамических диаметров внутривенных препаратов железа, определенных методом динамического рассеяния света (ДРС). Условия: 0,4 мл Fe/мл. Вертикальные линии отражают медиану значений величин диаметров.



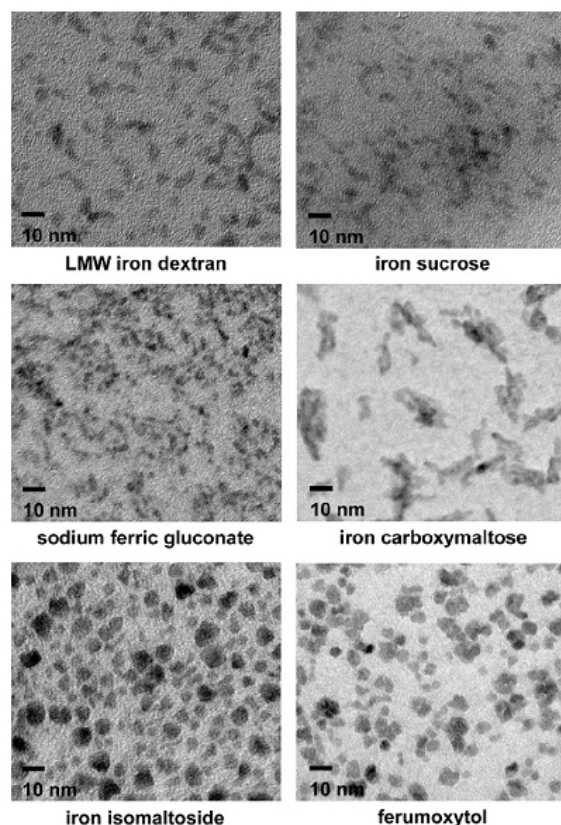
Железа глюконат		Железа сахарат		НМДЖ		Ферумокси- тол		Железа изомальтозат		Железа карбоксимальтозат	
pH	ζ(mV)	pH	ζ(mV)	pH	ζ(mV)	pH	ζ(mV)	pH	ζ(mV)	pH	ζ(mV)
4,35	-16,50	4,49	-14,25	3,02	-3,56	3,39	-11,95	3,3	-3,98	3,26	9,46
7,4	-29,70	7,43	-26,20	6,4 ^a	-15,30	6,6 ^a	-43,20	6,3 ^a	-22,00	5,36 ^a	3,68
8,36 ^a	-29,10	11,03 ^a	-28,15	7,31	-17,25	7,36	-30,55	7,35	-21,05	7,26	-8,52
10,5	-29,60			11,8	-15,75	10,4	-34,40	9,03	-28,95	9,54	-16,35
								11,5	-26,40		

Таблица 2. Дзета-потенциал ζ внутривенных препаратов железа при различных значениях pH^a-pH в дважды дистиллированной стерильной профильтрованной воде, без каких-либо коррекций pH

3.2. Размер и структура ядра

3.2.1. Просвечивающая (трансмиссивная) электронная микроскопия (ТЭМ)

ТЭМ-изображения внутривенных железосодержащих веществ показаны на рис. 3. Темные, электронно плотные, четко видимые структуры представляют ядра комплекса оксида железа, окруженные менее электронно плотной матрицей, которая может быть отнесена к углеводной части. Медианы геометрических диаметров ядра возрастают от 4,1 до 6,2 нм в порядке: натрия глюконат железа < железа сахарат < низкомолекулярный декстран железа < железа гидроксид олигоизомальтозат 1000 ≈ ферумокситол (табл. 3). В случае железа карбоксимальтозата ядра имеют тенденцию группироваться и отдельно не определяются. Медиана геометрического диаметра ядер этих кластеров $11,7 \pm 4,4$ нм.

**Рисунок 3.** Данные трансмиссивной электронной микроскопии. Условия: 1 мг Fe/мл.

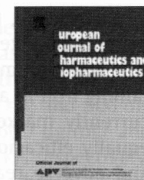


Таблица 3. Размеры ядра, определенные ТЭМ (трансмиссивная электронная микроскопия) и ДРЛ (диффракция рентгеновских лучей), стабильность при кислотном гидролизе, диализируемое железо с и без pH

Препарат железа	Ядро, Ø (нм)		$t_{0.5}$ (h)	Диализируемое железо ^e (%)		
	ТЭМ	ДРЛ		Кислотный гидролиз	Вода инъекций (WFI ^f)	для NaCl ^f NaCl ^g
Железа натрия глюконат	4,1 ^a ±1,7	3,4	4,0±0,1	0,789±0,048	1,338 ^d	
Железа сахарат	5,0 ^a ±0,8	3,3	4,9±0,1	0,057 ^b	0,067 ^d	
НМДЖ	5,6 ^a ±1,2	4,4	21,0±1,2	0,100±0,0096	0,207±0,0071	0,172 ^h ±0,0048
Железа олигоизомальтозат 1000	6,3^a±1,2	4,2	25,2±1,2	<0,002^c	<0,002^c	0,014^h±0,0029
Железа карбоксимальтозат	11,7 ^{a,b} ±4,4	4,3	25,6±1,6	<0,002 ^c	<0,002 ^c	0,2621 ^h ±0
Ферумокситол	6,2 ^a ±1,4	6,4	62,4±0,4	<0,002 ^c	<0,002 ^c	0,005 ^h ±0,0047

^a-медиана Ø (диаметр)

^b-медиана Ø (диаметр) скопления нескольких ядер. Единичные ядра не учитываются.

^c-ограничение определения (выявления)

^d-только одна проба

^e-рассчитано по измерениям индуктивно связанной плазма-масс-спектрометрии

^f-корректировка до pH 7,5

^g-без корректировки pH

^h-препарат одобрен для назначения в высоких дозах

3.2.2. Дифракция рентгеновских лучей (ДРЛ)

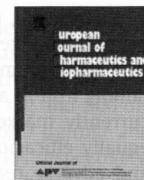
Средние диаметры ядер частиц были определены с помощью уравнения Scherrer и представлены в Таблице 3. Средние диаметры единичных (отдельных) комплексов ядер находятся в диапазоне 3,3–6,4 нм и появляются в соответствии с диаметрами измеренными с помощью ТЭМ.

На рис. 4 рентгеновские дифрактограммы внутривенных железосодержащих препаратов (верхняя часть рисунка) сравниваются с дифрактограммами стандартного оксида железа от ICDD (нижняя часть рисунка, Международный центр по результатам дифракции). Пики, принадлежащие углеводной части, отмечены стрелками. За исключением ферумокситола, внутривенные препараты железа показывают широкие области высоких интенсивностей по частично подобранным угловым величинам дифракции с аналогичными интенсивностями.

Модели сахара железа и натрия глюконата железа показывают структуру, похожую на 2-линейный ферригидрит, как есть только два основных пика оксида железа на $36^\circ 2\theta$ и $62^\circ 2\theta$. Два других в $14^\circ 2\theta$ и $22^\circ 2\theta$ относятся к аморфной сахарозе [27]. Малые отражения при $40^\circ 2\theta$ и $56^\circ 2\theta$ могут быть признаком, что и другие структуры смешиваются в вещество, подобное акаганеиту.

Результаты рентгеновского исследования железа карбоксимальтозата указывают на акаганеит-структуры с той же интенсивностью под тем же углом, за исключением второстепенного пика, вместо основного на $12^\circ 2\theta$. Низкомолекулярный декстран железа и железа изомальтозат 1000 показывают результат, который также похож на акаганеит, но соответствие не настолько полно (второстепенные пики вместо основных на $12^\circ 2\theta$ и $35^\circ 2\theta$, частично, отсутствуют второстепенные пики).

Дифрактограмма ферумокситола, который используется в качестве внутривенного препарата железа и контрастного вещества в магнитно-резонансной томографии, близка по структуре к магнетиту и маггемиту. Острые пики в дифрактограмме принадлежат кристаллическому манниту.



3.3. Содержание двухвалентного железа

3.3.1. Мессбауэровская спектроскопия

Мессбауэровский спектр железа изомальтозата 1000 показывает дублет (перестановку изомера) изомерного сдвига $\delta=0,44$ мм/с и четырехкратное расщепление $E_Q = 0,78$ мм/с (рис. 5). Оба параметра характерны для трехвалентного железа. Нет признаков наличия двухвалентного железа, а именно, отсутствуют характерные сдвиги и расщепления изомера.

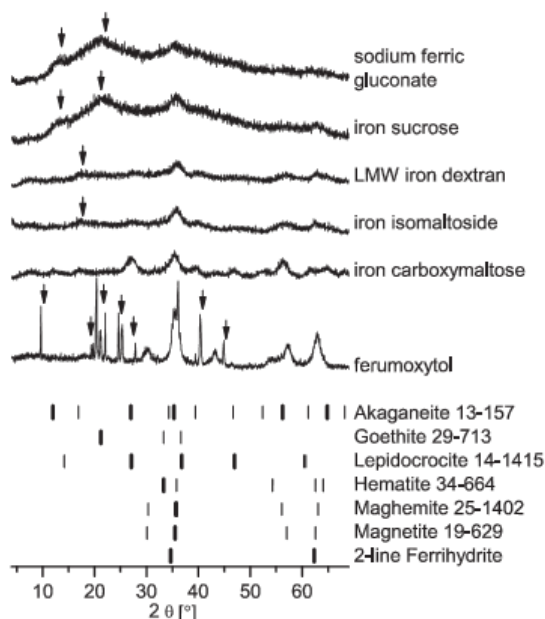


Рисунок 4. Рентгенологические спектры внутривенных препаратов железа. Внизу спектры сравниваются с данными дифракции стандартного оксида железа полученных из ICDD (Международный Центр Данных Дифракции). Толстые линии, отражающие стандарт оксида железа – интенсивность 70-100%. Тонкие линии, отражающие стандарт оксида железа – интенсивность 30-69%. Пики, принадлежащие (образованные) фракцией углевода указаны стрелками.

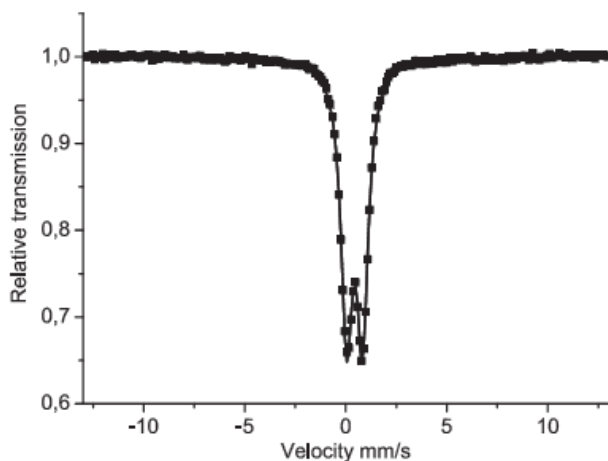
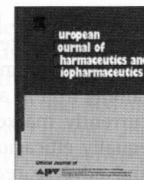


Рисунок 5. Спектроскопия по Мессбауэру (Mössbauer) Монофера в порошке (пудре), измеренная при 150 °К. Точки измерения снабжены линиями формы Лоренца. Перестановка изомеров $\delta=0,44$ мм/с, четырехкратное расщепление $E_Q=0,78$ мм/с, линейные широты $\Gamma=0,69$ мм/с.

3.4. Разделенное содержание железа

3.4.1. Диализ

Результаты определения содержания диализируемого «свободного» железа показаны в таблице 3. Похоже, что железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000, железа карбоксимальтозат и ферумокситол дают очень низкое содержание свободного железа, меньше, чем 0,002% от общего содержания железа. Это не зависит от жидкости, используемой для разведения и диализа (вода или раствор хлорида натрия). Декстран железа дал содержание свободного железа 0,1% и 0,2% при использовании воды и раствора хлорида натрия, соответственно. Наибольшее содержание свободного железа наблюдалось для натрия глюконата железа, дающего более чем 1% при разведении раствором хлорида натрия. Тем не менее, содержание свободного железа в железа сахарате (0,067% в NaCl и 0,057% в воде) была ниже, чем ожидалось. Эксперимент без коррекции pH показал, что



только железа карбоксимальтозат реагирует на pH. Как показано на [рис. 6](#) содержание свободного железа в железах карбоксимальтозате увеличивается от минимального предела обнаружения (<0,002%) при pH 7,5 до 0,262%, когда эксперимент проводится в небуферизированном растворе 0,9% NaCl.

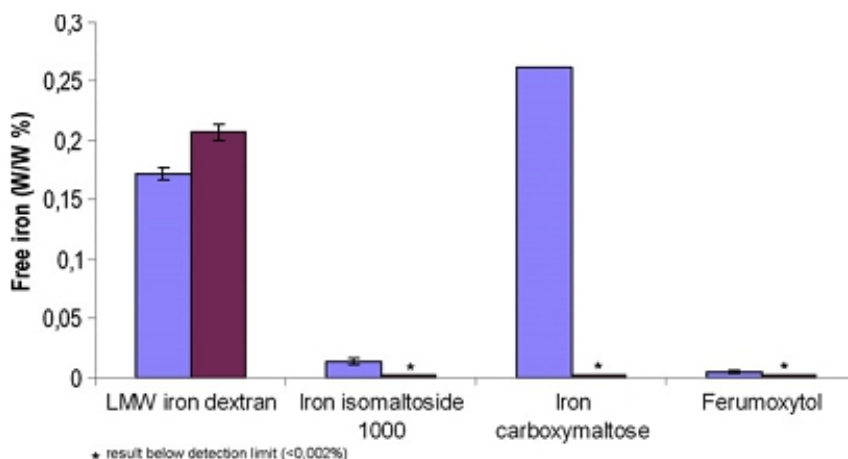


Рисунок 6. Сравнение содержания железа в высокодозных внутривенных препаратах железа. Порог определения – 0,002%. Красные столбцы отражают содержание железа при изменении до pH=7; синие – без изменения pH. Звездочки отражают концентрации ниже порога определения. Стандартные отклонения (SD's) приведены в таблице 3.

3.5. Лabileе железо

3.5.1. Железо, растворимое в кислоте

В кислом растворе FeOON диссоциирует: $\text{FeOON} + 3\text{HCl} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + 3\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O}$.

В этом исследовании препараты железа $[\text{FeOON}]_m\text{L}_n$ с различными углеводными лигандами L распадаются на составные части также:

$[\text{FeOON}]_m\text{L}_n + 3m\text{HCl} \rightarrow m\text{Fe}^{3+} + 3m\text{Cl}^- + 2m\text{H}_2\text{O} + n\text{L}$. Поскольку коэффициент экстинкции (затухания) комплекса на 287,3 нм ($\approx 3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) значительно выше, чем коэффициент экстинкции Fe^{3+} ($\approx 580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), или углеводов (не принимается во внимание), снижение концентрации FeOON примерно пропорционально определяемой абсорбции.

Уровень гидролиза есть мера относительной стабильности FeOON. На рисунке 7 можно видеть, что часть (фракция) FeOON уменьшается со временем, а в Таблице 3 сравниваются периоды полужизни FeOON распада различных препаратов железа. Стабильность комплекса возрастает в порядке: железа глюконат < железа сахарат << железа декстран < железа карбоксимальтозат $\approx$ железа изомальтозат 1000 << ферумокситол. Есть некоторые данные, указывающие, что уровень деградации зависит от площади поверхности железосодержащего комплекса и уменьшается при увеличении размера частицы (рисунок 8).

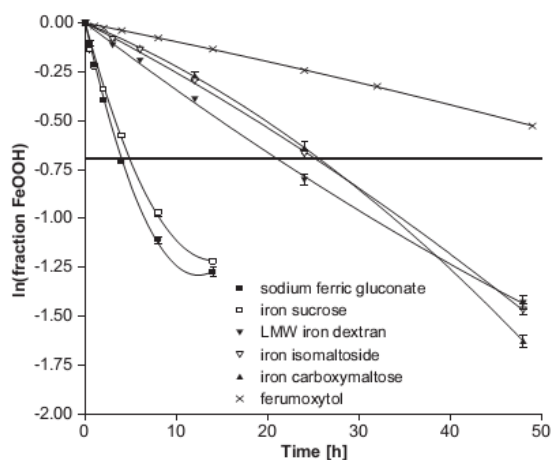


Рисунок 7. Растворение железа в кислоте. Концентрации 10 мкг Fe/мл, 0,2375 М HCl. При t=0 мин. фракция FeOON составляет 1 к 100% негидролизованного FeOON. Каждая точка графика представляет среднее из трех измерений; ошибки меньше символов. Данные обрабатывались с помощью полинома второй степени ($R^2 > 0,990$). Единичная линия отражает период полужизни. Стандартные отклонения (SD's) представлены в таблице 3. Для дальнейших деталей обратитесь к описанию методов.

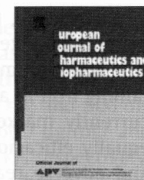
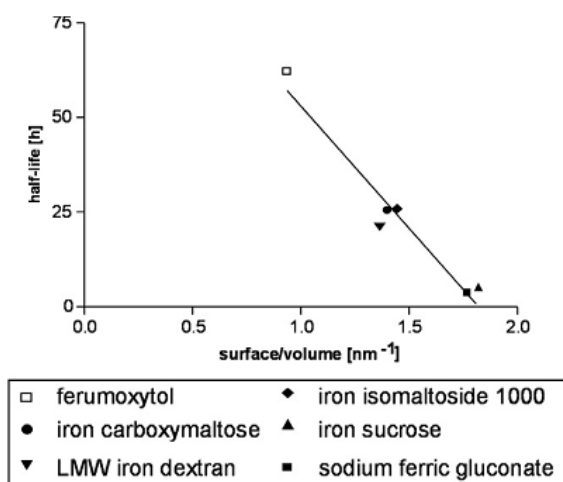


Рисунок 8. Соотношение периода полужизни гидролиза FeOON и поверхности ядра FeOON.



3.5.2. Феррозин®-определяемое лабильное железо в сыворотке человека

Результаты определения лабильного железа с феррозином показаны на рис. 9. Количество лабильного железа, определенное этим тестом, было практически эквивалентно дозе 200 мг и 500 мг, соответственно. Препаратами, которые показывают наибольшую фракцию лабильного железа, на сегодняшний день, оказались глюконат железа и железа сахарат ($3,2 \pm 0,4\%$ и $3,5 \pm 0,2\%$ соответственно, при дозе 200 мг). Для различных соединений доля лабильного железа уменьшается в порядке: сахарат железа $\approx$ железа глюконат $\gg$ декстран железа $>$ железа изомальтозат 1000 $\approx$ ферумокситол $>$ карбоксимальтозат железа.

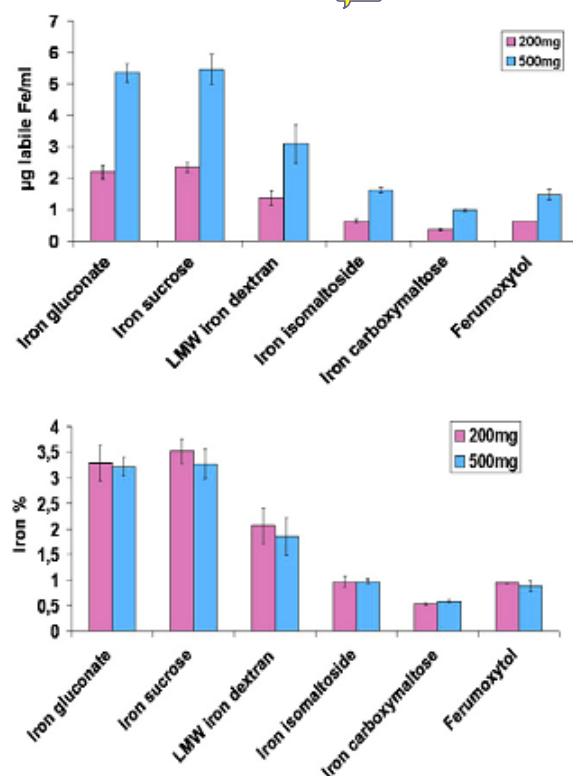
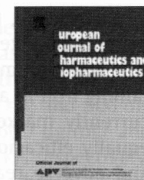


Рисунок 9. Сравнение объемов (пулов, фракций) лабильного железа в парентеральных препаратах железа. Верхняя диаграмма: концентрация феррозин-определяемого лабильного железа в мкг/мл. Столбцы отражают результат по крайней мере четырех измерений. Нижняя диаграмма: феррозин-определяемое лабильное железо в процентном соотношении с общей примененной (использованной) дозой. Для каждого измерения комплекс железа инкубировался в человеческой сыворотке 10 и 45 минут, соответственно. Затем, производилась реакция с феррозином, и в каждом случае рассчитывался отрезок на линии между двумя точками полинома второй степени регрессионной функции и кривой времени. Эти отрезки экстраполировались линейной регрессией ко времени инкубации $t=0$ мин, определяя пул лабильного железа для каждого внутривенного препарата железа.

3.6. Молекулярная структура железа изомальтозата 1000

Протонные ЯМР спектры, полученные на частоте 800 МГц 6-O-D-глицитил-олигоизомальтозат (изомальтозат 1000) показывают чистый пример высокого олигомерного изомальтозата 1000 со средней



полимеризацией около 5,2, т.е. осталось менее 1,5% восстанавливающих сахаров (данные не показаны). Данные протонного ЯМР, в частности константа связи между водородом Н-5 и Н-6 и Н-6', являющаяся для «внутренних» остатков 3,0 и 5,0 Гц соответственно, указывают соотношение вращающихся изомеров гидроксиметильной группы приблизительно как 60/40 для гош-транс/гош-гош (gt/gg) ротамеров [28]. ^{13}C ЯМР-спектры, полученные при 200 МГц для изомальтозата 1000, подтвердили выше упомянутые выводы, как показано на рис. 10а. Данные ^{13}C ЯМР-измерений для комплекса железа изомальтозата 1000, описанные в патенте [26], показали линейное уширение сигналов, как показано на рис. 10b. Спектр демонстрирует значительное линейное уширение сигналов углерода C-1, C-5 и C-6 и меньшее уширение C-3 и C-2 все из «внутренних» остатков глюкозы, предполагая, что комплексообразование железа в матрицу изомальтозата 1000 предварительно происходит в полости, показанной на рис.11. В то время как сигналы углерода в присутствии железа подвергаются некоторому расширению, никаких сигналов не может быть получено в протонном спектре комплекса. Подавление интенсивности сигнала в интегрированном сигнале отдельных атомов углерода было мерой комплексной формы между их атомами кислорода и атомами железа.

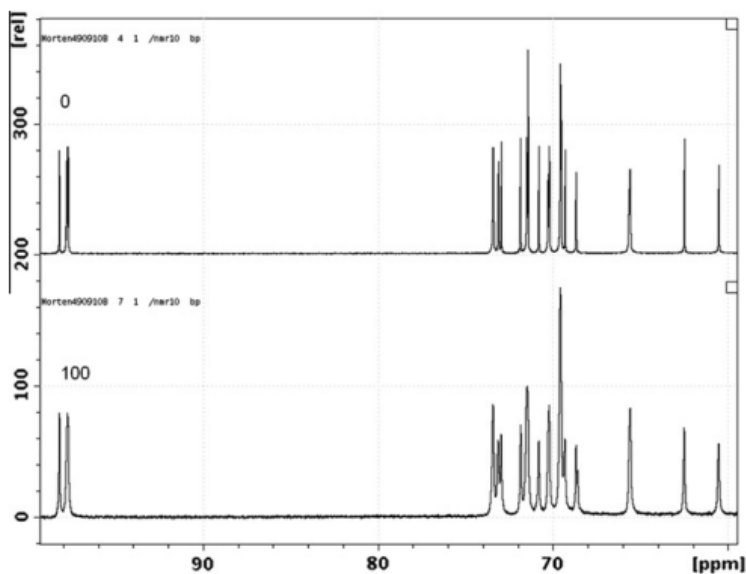


Рисунок 10. (a/b) ^{13}C -ЯМР спектр олигоизомальтозата (верх) и комплекса олигоизомальтозат/комплекс железа, приготовленный по ссылке [26].

Следующие относительные интенсивности по сравнению со свободными олигосахаридами были измерены для центральных остатков глюкозы в железа олигосахариде: C-1: 48% (98 м.д.); C-2: 60% (71,6 м.д.); C-3: 48% (73,7 м.д.); C-4: 67% (69,7 м.д.); C-5: 53% (70,4 м.д.); C-6: 52% (65,7 промилле). Это указывает на то, что формирование комплекса железа происходит в основном с помощью О-3, О-5, и О-6 этих глюкозных остатков.

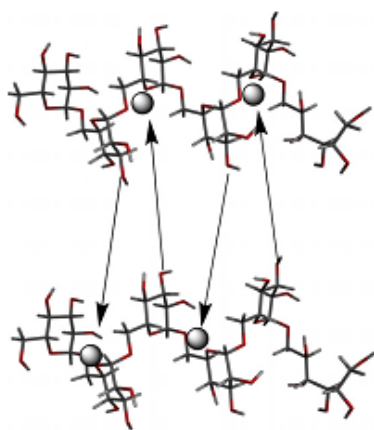
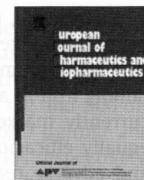


Рисунок 11. Схематичное представление возможного комплексования, основанное на данных ^{13}C -ЯМР.



Молекулярно-динамическое моделирование, сопровождавшееся минимизацией энергии 6-O-D-глицитил-изомальтопентазида изомальтозата 1000 с использованием программы MOE, привело к минимальной энергии конформации (формы) которая, со всеми вращающимися изомерами вокруг 6-положения в «gt»-форме (позиции), показывает, что структура повторяется каждый второй остаток глюкозы, оставляя O-5 и O-6 части от остатка, а O-3 часть остатка в соседней цепи расположена для взаимодействия и хелатирования с атомами железа. Это позволяет цепям скрепляться (соединяться) через связь железа и кислорода. Каждый второй остаток обращен в сторону молекулы для дальнейшего комплексообразования с железом (рис. 12).

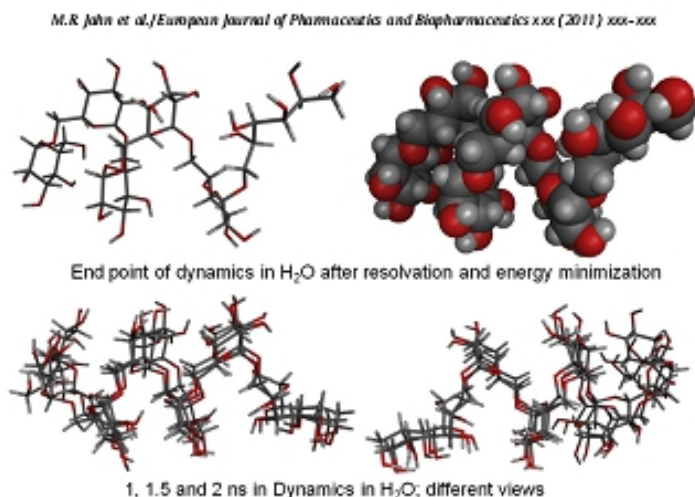


Рисунок 12. Результат (конечная точка) молекулярной динамической симуляции.

Обсуждение

4.1. Структура

Железа олигоизомальтозат 1000 содержит олигоизомальтозат 1000, чистую линейную химическую структуру повторяющихся α 1-6 связанных гликопиранозных остатков. Это неразветвленный неанафлактоидный углевод со средним размером глюкозных единиц 5,2 и средней молекулярной массой 1000 дальтон структурно отличается от разветвленных полисахаридов, представленных в декстране железа. Низкомолекулярный декстран имеет молекулярную массу около 5000 Да и в среднем одно α -1-3 ответвление из (на) 32 остатков глюкозы. Компьютерная модель, использующая подход, описанный в экспериментальной части одной из таких конструкций, показана на рис.13 и, конечно, очень отличается от изомальтозата 1000, показанного на рис.12. Олигоизомальтозат 1000 состоит преимущественно из 3-5 единиц глюкозы и готовится из олигомеров для предотвращения вызываемых декстраном анафилактических реакций. Таким образом, этот препарат не содержит декстран, и, следовательно, нет никакой необходимости в тестовой дозе. Анализ с помощью дифракции рентгеновских лучей не показывает острых дифракционных пиков для любого из препаратов железа, указывая структуры с малой кристалличностью (кристаллизацией), которая является следствием небольшого размера кристаллов и структурных нарушений. Железа гидроксид в составе железа олигоизомальтозата 1000, кажется, состоит из «перемешанного слоя» и похож на акаганеит.

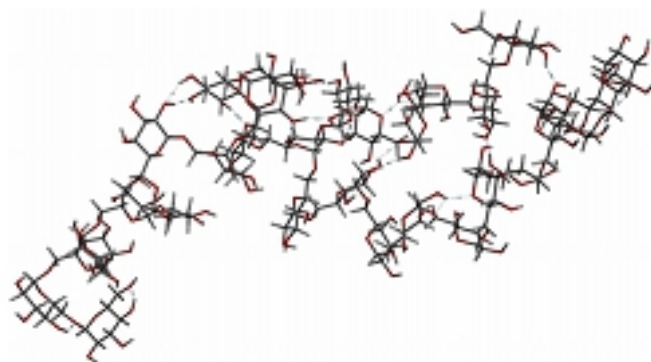
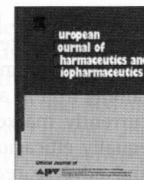


Рисунок 13. Компьютерная модель низкомолекулярного декстрана, 5000 Да, с одним ответвлением, основная цепочка -23 остатка, боковая цепочка -9 остатков.



Ядро железа сахарозата имеет структуру, близкую к 2х-слойному ферригидриту, возможно смешанному со слоями акаганеита. Ранние (предыдущие) исследования уже определили железа оксигидроксид ядра железа сахарата как 2х-слойный ферригидрит (рентгеновская дифракция, SEAD) [29, 30] и акаганеит (рентгеновская дифракция, мессбауэровская спектрометрия) [31], соответственно.

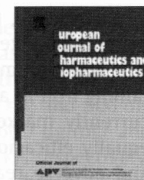
Узор железа карбоксимальтозата схож (соответствует) с акаганеитом. Информация, что расстояние между решетчатыми уровнями (слоями) при малых углах дифракции близко к 1 нм показывает, что 5-тинанометровое ядро – это несколько решетчатых слоев, расположенных в ширину, и что наличие определенного порядка, характерного для кристаллов, вряд ли возможно.

В случае железа натрия глюконата, предыдущие (более ранние) исследования уже определили ядро из железа оксигидроксида как акаганеит (Рентгеновская дифракция, мессбауэровская спектрометрия) [31]. Структуры низкомолекулярного декстрана и ферумокситола напоминают акаганеит и магнетит и маггемит, соответственно, наблюдение, которое не сообщалось прежде.

Внешний вид (компоновки, формования) формулировки железа, определенный трансмиссивной электронной микроскопией, значительно варьирует, как по размеру, так и по форме (рис. 3). Некоторые препараты были четко определены в виде частиц сферической формы (железа изомальтозат 1000), тогда как другие частицы имели неправильную форму, различались по размеру. Данные инструментального анализа размера парентеральных препаратов железа продемонстрировали, что эти результаты также частично зависят от методов определения. В этой работе были применены четыре различных способа анализа размеров, два из них – измерения гидродинамического диаметра (ГПХ, ДРС), а два других – определение диаметра железосодержащего ядра (РСА и ПЭМ). Два последних метода в целом дали меньшие размеры частиц, за исключением железа изомальтозата, где более или менее одинаковый диаметр был получен ДРС и ПЭМ, которые поддерживают образование структуры матричного типа и, следовательно, подтверждает структурные различия между железом изомальтозатом и другими комплексами железа. Расхождения между ДРС и ГФХ могут быть из-за эффекта разведения, так как более высокие концентрации препаратов железа имеют тенденцию к образованию кластеров, которые могут привести к увеличению диаметра соответствующей формы железа. Другое объяснение для различающихся результатов, полученных при ДРС и ГФХ, может быть дано по дзета-потенциалу исследуемых препаратов. Наибольшие различия наблюдались для железа глюконата, железа сахарата, низкомолекулярного декстрана железа и железа изомальтозата 1000 (табл. 1). Это может быть связано с их отрицательным зарядом при малом размере частиц, что может взаимодействовать со сферическими частицами кремнезема, содержащего полярные диолы в колонке материала, получая более короткое время ретенции (удержания) и, следовательно, большие гидродинамические радиусы при ГФХ. Ферумокситол, который также отрицательно заряжен, имеет гораздо больший диаметр, но поскольку отношение величины заряда к единице площади поверхности частицы меньше, то это приводит к меньшему взаимодействию с колонкой материала. Примечательно, что за исключением железа карбоксимальтозата, дзета-потенциалы всех препаратов железа показали, что они несли отрицательный заряд в диапазоне pH от 3 до 11 (табл. 2). Железа карбоксимальтозат подвергся (перенес) изменению знака дзета-потенциала с положительного в кислых и нейтральных pH-условиях на отрицательный при щелочном pH. Интересно, что на Советании Консультативного комитета FDA по безопасности железа карбоксимальтозата было указано на существование дисбаланса в возникновении клинически значимой гипофосфатемии после внутривенного введения высоких доз железа карбоксимальтозата, в то время как этот эффект не наблюдался в контрольной группе, получавшей препараты железа, и не был документирован для других препаратов внутривенного железа [15]. Вероятно, разница в дзета-потенциалах и положительный заряд железа карбоксимальтозата может иметь ведущую роль в объяснении механизма гипофосфатемии, индуцированной этим препаратом. Если железа карбоксимальтозат имеет положительный заряд, когда он находится в циркуляторном (кровеносном) русле, то отрицательно заряженные фосфаты потенциально могут быть заблокированы электростатическим взаимодействием с железом карбоксимальтозатом.

Следует также отметить, что за исключением железа карбоксимальтозата и ферумокситола, все парентеральные препараты железа имели мономодальное распределение по размеру. В соответствии с результатами ГПХ, как железа карбоксимальтозат, так и ферумокситол показали дополнительные пики при меньших размерах частиц, а ферумокситол, кроме этого, имел дополнительное плечо (кривую), которое отражает некоторую фракцию размера частицы, имеющей отчетливо (явно) более высокую молекулярную массу, чем среднее число данных (рис. 1).

Детальные исследования, представленные в этой работе с использованием ^{13}C -ЯМР и исследованиями по молекулярному моделированию убедительно свидетельствуют о сфероидальной матричной структуре для железа (III) гидроксид олигоизомальтозата 1000, в котором атомы железа связаны и рассеяны (рассыпаны по



молекуле) [приблизительно 10 атомов железа в одной молекуле олигосахарида]. Это представляется более правильным описанием молекулы железа изомальтозата 1000, чем железосодержащее ядро, окруженное оболочкой углеводов. Сравнение ПЭМ-изображения и ДРС кривых показывает, что они дают более или менее одинаковый диаметр железа (III) гидроксид олигоизомальтозата, тогда как для других комплексов железа диаметры, полученные при ДРС, сильно превышают диаметры, полученные при ПЭМ. Это также подтверждает результаты, что формируется настоящая (реальная) матрица, и что железа (III) гидроксид олигоизомальтозат довольно сильно отличается от других препаратов, поскольку все другие сравнения ПЭМ/ДРС предлагают структуру «ядро-оболочка». Возможным объяснением этой уникальной (особенной) молекулярной композиции могла бы быть короткая, линейная и неионная структура изомальтозата 1000 в сочетании с фирменной технологией производства Pharmacosmos. Это позволяет производить матричную структуру, состоящую из следующих друг за другом слоев линейного олигоизомальтозата 1000 и атомов железа, помещаемых в полость между и в пределах молекул олигосахарида (рис. 11 и 12).

Объединение ^{13}C ЯМР-спектра железа (III) гидроксидолигоизомальтозата 1000 и источника олигосахарида против внутренней связи показывает, что улавливаются более 90% сигналов железа.

Будущие исследования должны определить и изучить основной механизм для существования этих структурных различий в комплексе железа и углевода.

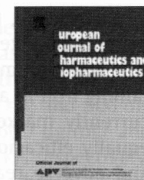
4.2. Свободное железо

Свободное железо было определено с помощью диализирования разбавленного препарата железа. В целом, свободные фракции железа наблюдались в малом количестве, хотя для натрия глюконата железа был выявлен 1,33% содержания свободного железа. Это совпадает с известной низкой стабильностью этого комплекса железа [32]. Удивительно, но содержание свободного железа другого комплекса с низкой стабильностью – сахарат железа – составляет менее 0,1%, значение которое не отражает лабильность комплекса. Как правило, железа сахарат рассматривается как полунестабильный умеренно сильный комплекс, в то время как глюконат железа является лабильным и слабым. Другие исследователи нашли аналогичные результаты для железа сахарата [25]. Основная причина этого наблюдения в настоящее время точно не известна, нельзя исключить взаимодействие комплекса с диализной мембраной. Для железа (III) гидроксидолигоизомальтозата 1000, железа карбоксимальтозата и ферумокситола содержание свободного железа было ниже порога чувствительности метода (<0,002%), когда эксперимент был проведен с рН 7,4, буфер 0,9% раствор хлорида натрия. *Интересно, что содержание свободного железа в железах карбоксимальтозата выросло (подпрыгнуло) с <0,002% до 0,262%, когда эксперимент проводился в стандартном солевом растворе, не содержащем буфера. Это показало, что диализированное железо железа карбоксимальтозата чувствительно к рН.* Стоит отметить, что разведение внутривенных препаратов железа для капельных вливаний проводят небуферизированным физиологическим солевым раствором. С другой стороны, для дозы железа в 1000 мг, это будет представлять освобождение в течение 24 ч максимум 2,62 мг свободного железа, что составляет только 40% емкости перехода в связанное железо, так что вероятность увеличения свободного железа в крови представляется низкой.

4.3. Лабильное железо

Лабильное железо не идентично свободному железу в препаратах железа, так как его можно рассматривать как слабо связанное железо в виде наночастиц, которые легко мобилизуются в результате химических реакций или в присутствии веществ, формирующих комплексы железа, таких как белки в плазме крови. В кислых растворах лабильное связанное железо может быть мобилизовано в присутствии ионов H_3O^+ из молекулы оксигидроксида. Железа сахарат и натрия глюконат железа высвобождали свое железо в самом большом количестве, за ними следовала группа, состоящая из декстрана железа, железа карбоксимальтозата и железа изомальтозата 1000, в то время как ферумокситол был наиболее устойчив к мобилизации железа в кислой среде (рис. 7). Одним из объяснений этих наблюдаемых различий может быть обратная корреляция между размером комплекса железа и размером оксигидроксидной частицы, что определено с помощью ПЭМ, и скоростью высвобождения, которая была самой низкой для ферумокситола (наибольший период полужизни (полураспада)) и самой большой для железа сахарата (наименьший период полужизни (полураспада)) (рис. 7 и 8). Как показано на Рис. 9, количества лабильного железа, определенного путем разбавления препаратов железа человеческой сывороткой (метод с феррозином) соответствуют количествам, полученным в экспериментах по освобождению железа в кислых условиях, и результатам наших исследований по лабильному и свободному железу. Процент освобожденного лабильного железа, как показано в этом исследовании, не зависит от дозы применяемого препарата и охватывает свободное железо, а также оно связывает железо с железо-связывающими белками, такими как трансферрин сыворотки и другие.

Таким образом, эти результаты показывают, что лабильное железо содержится во всех препаратах железа,



предназначенных для быстрого и высокодозного введения [железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000, железа карбоксимальтозат и ферумокситол], и составляет менее 1% от вводимой дозы железа. Поэтому эти препараты парентерального железа можно рассматривать как оптимизированные дозированные формы с хорошим высвобождением железа из железо-углеводного комплекса.

4.4. Иммуногенные свойства углеводов

Подобно риску развития реакции на свободное железо, анафилактические или анафилактоидные реакции традиционно вызывали озабоченность при использовании внутривенных соединений железа [9]. С одной стороны, было сделано предположение, что опосредованная антителами анафилактическая реакция, вызванная циркулирующими антителами к декстрану, возникает чаще при использовании декстранов железа. С другой стороны, индуцированные железом анафилактоидные реакции могут развиваться на все препараты внутривенного железа, но они, как правило, не рассматриваются как иммунный ответ [9]. Сегодня требуется проводить пробную дозу для Дексферрума (высокомолекулярный декстран железа), CosmoFera (низкомолекулярный декстран железа), а для Венофера (железа сахарат) – только в пределах Европы. Все новые высокодозные внутривенные препараты (Монофер® (железа III гидроксид олигоизомальтозат 1000), Феринъект/Injectafer® (Железа карбоксимальтозат), Feraheme® (Ферумокситол)) основаны на углеводах со сниженным иммуногенным потенциалом, и проведение тестовой дозы не требуется.

В случае с Монофером носитель углеводов изомальтозат 1000 изготовлен на основе химической модификации олигомеров, известных предотвращением анафилактических реакций, вызываемых декстраном. Способность олигомеров изомальтозата (5 единиц глюкозы) предотвращать или блокировать анафилактические реакции на декстран была впервые описана Коулсоном и Стивенсом [33] в 1960-х годах, но интенсивные исследования Рихтера и др. [34–36] в 1970-х и 1980-х годах показали его уникальную роль как специфического моно-валентного гаптена против циркулирующих антидекстрановых антител. Исследования Рихтера и др. документально подтвердили, что даже у животных, максимально сенсibilизированных против декстрана, изомальтозные олигомеры массой 1430 Da или меньше, обладали неанафилактогенными и десенсибилизирующими свойствами [16].

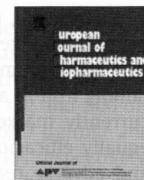
Термин гаптен определен как вещество, способное к связыванию со специфическими антителами без последующей анафилаксии или индукции образования антител. Таким образом, путем связывания с рецепторами на циркулирующем анти-декстран-IgG, изомальтозный олигомер блокирует и предотвращает возможность этих IgG участвовать в образовании больших иммунных комплексов, имеющих различные (поливалентные) IgG-эпитопы, тем самым избегая классических анафилактических реакций.

В более поздних международных клинических испытаниях с участием более 5 миллионов пациентов было показано, что предварительное введение изомальтозных олигомеров снижало риск анафилаксии в ответ на поливалентный клинический декстран от около 1 на 3 000 до менее чем 1 на 200 000 пациентов [33,35,37–39]. Таким образом, изомальтозные олигомеры – это хорошо задокументированные ингибиторы гаптенных декстранов, вызывающих анафилаксию, с убедительными клиническими данными, устанавливающими их неанафилактическую природу, что является обоснованием для устранения тестовой дозы при назначении Монофера.

4.5. Клиническое значение

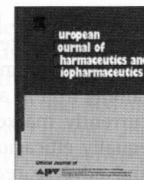
Эффективность внутривенного железа непосредственно связана с количеством вводимого препарата, но различия в размерах ядра и углеводной оболочки определяют фармакологические и биологические различия между различными препаратами. Они включают в себя клиренс после введения, высвобождение железа *in vitro*, ранние (первые) признаки биологической активности железа *in vivo* (в естественных условиях), максимальную безопасную дозу и скорость инфузии, а также влияние на оксидантные маркеры, склонность к индукции гипофосфатемии (Феринъект/Injectafer®), склонность вызывать транзиторную протеинурию (Венофер®), или повреждать печень (Феррилит®) после введения препарата [40–45]. Таким образом, эффективность, безопасность и удобство дозировки следует принимать во внимание при выборе препарата внутривенного железа.

Эффективность всех железосодержащих внутривенных препаратов для лечения анемии последовательно доказана в различных клинических исследованиях с очень низким уровнем серьезных нежелательных явлений, например [5], хотя комплексы декстрана железа могут привести к известным вызванным декстраном анафилактическим реакциям, которые значительно чаще встречаются при применении высокомолекулярного декстрана железа, чем низкомолекулярного декстрана железа [13]. Риски от общего нежелательных явлений (или 3,2, 95% ДИ 2,7–3,8) и опасных для жизни нежелательных явлений (ОШ 3,4, 95% ДИ 2,0–5,9) были значительно



выше среди получателей ВМДЖ сравнению с НМДЖ. Тем не менее, стоит отметить, что не было значительных различий в смертности между НМДЖ и железа глюконатом (или 0,3, 95% ДИ 0,1–1,3) или железа сахаратом (или 0,2, 95% ДИ 0,1–1,0), хотя опасные для жизни нежелательные явления были значительно более часты среди получателей НМДЖ [13]. Кроме того, за исключением ВМДЖ, темпы угрожающих жизни нежелательных явлений, связанных с внутривенным введением железа (1,4 на млн. доз), в том числе смертей, связанных с препаратами железа (0,3 на млн. доз) [13], значительно ниже, чем связанных с аллогенным переливанием крови (АПК) серьезных побочных эффектов (10 на миллион переливаний) и смертей, связанных с АПК (4 на миллион переливаний) [46].

Таким образом, за исключением ВМДЖ (повышенные показатели тяжелых нежелательных явлений и смертей), острые различия безопасности среди препаратов внутривенного железа малы и клинически не важны, если препарат назначается в рекомендуемых дозах, но все же, предпочтение следует отдавать препарату, основанному на углеводах и с пониженной иммуногенной активностью должны быть (для большей уверенности необходимы сравнительные исследования). В связи с этим все новые препараты внутривенного железа (Монофер®, Феринъект/Инжектофер® и Feraheme®) основаны на углеводах с уменьшенным иммуногенным свойством, тем самым устраняя необходимость в тестовой дозе (сокращение времени лечения). По крайней мере Монофер® и Феринъект, созданные на основе углеводов, имеют документально фиксированную пониженную иммуногенную активность. Feraheme® также был создан на углеводной основе с документально подтвержденной сниженной иммуногенной активностью, но недавно опубликованный случай показал, что пациенты, чувствительные к декстрану, могут реагировать также и на Feraheme® [47].

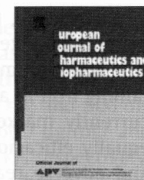
**Таблица 4.** Сводные данные клинических качеств внутривенных препаратов железа

Препарат	КосмоФер ^{®а} (низко-молекулярный декстран железа)	Феррлицит ^{®б} (железа глюконат)	Венофер ^{®а} (железа сахарат)	Феринъект ^{®а} (железа карбокси-мальтозат)	Ферагем ^{®с} (ферумокситол)	Монофер ^{®а} (железа изомальтозат 1000)
Углевод	Декстран (разветвленный полисахарид)	Глюконат (моносахарид)	Сахарат (дисахарид)	Карбокси-мальтозат (разветвленный полисахарид)	Карбоксиметил декстран (разветвленный полисахарид)	Изомальтозат 1000 (неразветвленный линейный олигосахарид)
Максимальная разовая доза	20 мг/кг	125 мг	200 мг	15 мг/кг, не более 1000 мг однократно	510 мг	20 мг/кг
Максимальная разовая доза, назначаемая мужчине 80 кг	1600 мг	125 мг	200 мг	1000 мг	510 мг	1600 мг
Максимальная разовая доза, назначаемая женщине 60 кг	1200 мг	125 мг	200 мг	900 мг	510 мг	1200 мг
Однократное восполнение запасов железа	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	Да
Введение в течение одного часа	Нет	Нет данных	Нет данных	Да	Да	Да
Необходимость тестовой дозы	Да	Нет данных	Да/Нет*	Нет	Нет, но надо подождать 60 минут после инъекции	Нет
Концентрация железа (мг/мл)	50	12,5	20	50	30	100
Объем распределения (мл)	2 и 10	5	5	2 и 10	17	1,5 и 10

^а-eMC, сводные данные характеристик препарата, электронное Медицинское Резюме.^б-Bridgewater, NJ; Sanofi Aventis, Inc., US Ferriedt Prescribing Information 2010.^с-AMAG Pharmaceuticals, Feraheme® Prescribing Information.

*-тестовая доза в Европе (да), но не в США (нет).

Все внутривенные препараты могут вызвать анафилактические реакции, вызванные лабильным железом, которые характеризуются тошнотой, гипотонией, тахикардией, болью в груди, одышкой (отек легких), а также двусторонним отеком рук и ног, и это не должно расцениваться как анафилаксия [40]. Таким образом, стабильность свободного и лабильного железа должны определять максимальную дозу и максимальную скорость инфузии. Соответственно, большие дозы железа (III) гидроксид олигоизомальтозата 1000 (20 мг/кг), железа карбоксимальтозы (15 мг/кг, не более 1000 мг), низкомолекулярного декстрана (20 мг/кг) и феррумукситола (510 мг) можно вводить в виде одной сессии, так все они являются сильными и надежными



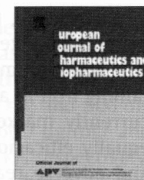
составами с очень низким содержанием свободного или лабильного железа (табл. 4). Тем не менее, Феринъект может привести к необъяснимой гипофосфатемии, и содержание в нем свободного железа очень чувствительно к pH (табл. 3, рис. 6) и разведению (согласно Феринъект SPC), тогда как введение больших доз INFeD/CosmoFer® требует длительного времени инфузии (4–6 час). В противоположность этому значимо меньшая разовая доза допускается для железа глюконата (125 мг) или железа сахарата (200 мг), так как они являются более лабильными и слабыми молекулами. Таким образом, коррекция дефицита железа с применением этих соединений является длительным и ресурсоемким процессом (8–12 сессий для введения 1500 мг железа). Краткое изложение клинически значимых характеристик препаратов приведено в Таблице 4.

5. Выводы

Все проанализированные многоядерные препараты железа характеризуются наноразмерными структурами, напоминающими лепидокрокит, акаганеит, ферригидрит, магнетит или маггемит, или смесь их в зависимости от препарата. Однородность (гомогенность) этих препаратов сильно отличается от железа изомальтозата 1000, у которого очень хорошо определены частицы сферической формы. За исключением железа карбоксимальтозата и ферумокситола, все парентеральные препараты железа обладают мономодальным распределением по размеру.

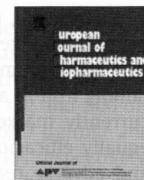
¹³C-ЯМР и молекулярные исследования моделирования показывают, что железа изомальтозат 1000 имеет структуру железо-углеводной матрицы по сравнению с классическим описанием железосодержащего ядра, окруженного углеводной оболочкой. Высокодозное внутривенное введение для всех препаратов железа характеризуется низким содержанием лабильного и свободного железа. Содержание свободного железа, измеряемое в физиологическом растворе, было самым низким у ферумокситола и железа изомальтозата 1000, за ними следовали низкомолекулярный декстран железа и железа карбоксимальтозат, которые имели высокое содержание свободного железа.

В заключение, железа (III) гидроскидолигоизомальтозат 1000 (Monofer®) является новым внутривенным источником железа, созданным на основе железа (III) и химически модифицированных изомальто-олигосахаридов. В отличие от полисахаридов железа декстрана, углеводы изомальтозата 1000 линейны, неразветвленные и с низкой иммунологической активностью. Таким образом, тестовая доза не требуется. По сравнению с существующими внутривенными препаратами железа, железа (III) гидроксид олигоизомальтозат 1000 содержит сильно связанное железо в железо-углеводной матрице, с очень низким содержанием лабильного и свободного железа. Это дает возможность Моноферу, как единственному среди всех субстанций внутривенного железа, быть назначенным в виде быстрых высокодозных инфузий в дозе более 1000 мг. Это позволяет гибко дозировать в том числе и высокие дозы, и добиваться быстрого насыщения железом, предлагая удобное однократное посещение для терапии железом широкого спектра пациентов.



Литература

- [1] NICE-Guideline, Chronic Kidney Disease – National Clinical Guideline for Early Identification and Management in Adults in Primary and Secondary Care, National Institute for Health and Clinical Excellence, 2008.
- [2] W.H. Horl, I.C. Macdougall, J. Rossert, R.M. Schaefer, OPTA-therapy with iron and erythropoiesis-stimulating agents in chronic kidney disease, *Nephrology Dialysis Transplantation* 22 (2007).
- [3] M. Muñoz, S. Gomez-Ramirez, J.A. Garcia-Erce, Intravenous iron in inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology* 15 (2009) 4666–4674.
- [4] S.D. Anker, C. Colet, Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency, *New England Journal of Medicine* 361 (2009) 2436–2448.
- [5] M. Muñoz, C. Breymann, J.A. García-Erce, S. Gómez-Ramírez, J. Comin, E. Bisbe, Efficacy and safety of intravenous iron therapy as an alternative/adjunct to allogeneic blood transfusion, *Vox Sanguinis* 94 (2008) 172–183.
- [6] M. Auerbach, H. Ballard, Intravenous iron in oncology, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network (JNCCN)* 6 (2008) 585–592.
- [7] M. Muñoz, R. Leal-Noval, J.A. García-Erce, Intravenous iron in cardiac surgery, in: *Seminars in Hematology*, Elsevier, 2006, pp. S39–S42.
- [8] C. Breymann, C. Richter, C. Huttner, R. Huch, A. Huch, Effectiveness of recombinant erythropoietin and iron sucrose vs. iron therapy only, in patients with postpartum anaemia and blunted erythropoiesis, *European Journal of Clinical Investigation* 30 (2000) 154–161.
- [9] I.C. Macdougall, Evolution of IV iron compounds over the last century, *Journal of Renal Care* 35 (2009) 8–13.
- [10] J.T. McCarthy, C.E. Regnier, C.L. Loebertmann, E.J. Bergstralh, Adverse events in chronic hemodialysis patients receiving intravenous iron dextran – a comparison of two products, *American Journal of Nephrology* 20 (2000) 455–462.
- [11] R. Fletes, J.M. Lazarus, J. Gage, G.M. Chertow, Suspected iron dextran-related adverse drug events in hemodialysis patients, *American Journal of Kidney Diseases* 37 (2001) 743–749.
- [12] G.M. Chertow, P.D. Mason, O. Vaage-Nilsen, J. Ahlmen, On the relative safety of parenteral iron formulations, *Nephrology Dialysis Transplantation* 19 (2004) 1571–1575.
- [13] G.M. Chertow, P.D. Mason, O. Vaage-Nilsen, J. Ahlme?n, Update on adverse drug events associated with parenteral iron, *Nephrology Dialysis Transplantation* 21 (2006) 378–382.
- [14] P. Geisser, M. Baer, E. Schaub, Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations, *Arzneimittel-Forschung* 42 (1992) 1439–1452.
- [15] Division of Medical Imaging and Hematology Products and Office of Oncology Drug Products and Office of New Drugs, New Drug Application 22-054 for Injectafer® (Ferric Carboxymaltose) for the Treatment of iron Deficiency Anemia in Patients with Heavy Uterine Bleeding or Postpartum Patients, FDA Advisory Committee Briefing Document, 2008, pp. 1–63.
- [16] W. Richter, Hapten inhibition of passive antidextran dextran anaphylaxis in guinea pigs. Role of molecular size in anaphylactogenicity and precipitability of dextran fractions, *International Archives of Allergy and Immunology* 41 (1971) 826–844.
- [17] K.-G. Ljungström, Invited commentary: pretreatment with dextran 1 makes dextran 40 therapy safer, *Journal of Vascular Surgery* 43 (2006) 1070–1072.
- [18] R.A. Zager, A.C. Johnson, S.Y. Hanson, H. Wasse, Parenteral iron formulations: a comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury, *American Journal of Kidney Diseases* 40 (2002) 90–103.
- [19] R.A. Zager, A.C. Johnson, S.Y. Hanson, Parenteral iron nephrotoxicity: potential mechanisms and consequences, *Kidney International* 66 (2004) 144–156.
- [20] G. Glöckner, *Polymer Characterization by Liquid Chromatography*, Elsevier Science Ltd., 1987.
- [21] ICSH, Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood. Iron panel of the international committee for standardization in haematology, *British Journal Haematology* 75 (1990) 615–616.
- [22] H.Y.a.A.Z. Yee, An autoanalyzer procedure for serum iron and total iron-binding capacity with use of ferrozine, *American Association of Clinical Chemistry* 19 (1971) 950–953.
- [23] P. Carter, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine), *Analytical Biochemistry* 40 (1971) 450–458.
- [24] C.R. Gibbs, Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator, *Analytical Chemistry* 48 (1976) 1197–1201.
- [25] V.S. Balakrishnan, M. Rao, A.T. Kausz, L. Brenner, B.J.G. Pereira, T.B. Frigo, J.M. Lewis, Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation, *European Journal of Clinical Investigation* 39 (2009) 489.
- [26] H.B. Andreasen, L. Christensen, Iron-dextran compound for the use as component in a therapeutic composition for prophylaxis or treatment of iron-deficiency, US Patent 6291,440, 2001.
- [27] M. te Booy, R.A. de Ruiter, A.L.J. de Meere, Evaluation of the physical stability of freeze-dried sucrose-containing formulations by differential scanning calorimetry, *Pharmaceutical Research* 9 (1992) 109–114.
- [28] K. Bock, J.Ø. Duus, A conformational study of hydroxymethyl groups in carbohydrates investigated by ¹H NMR spectroscopy, *Journal Carbohydrate Chemistry* 13 (1994) 513–543.
- [29] L. Gutiérrez, M. del Puerto Morales, F. José Lázaro, Magnetostructural study of iron sucrose, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (2005) 69–74.
- [30] F. Funk, G.J. Long, D. Hautot, R. Büchi, I. Christl, P.G. Weidler, Physical and chemical characterization of therapeutic iron containing materials: a study of several superparamagnetic drug formulations with the b-FeOOH or ferrihydrite structure, *Hyperfine Interactions* 136 (2001) 73–95.
- [31] D.S. Kudasheva, J. Lai, A. Ulman, M.K. Cowman, Structure of carbohydrate-bound polynuclear iron oxyhydroxide nanoparticles in parenteral formulations, *Journal of Inorganic Biochemistry* 98 (2004) 1757–1769.
- [32] M.R. Jahn, Y. Mrestani, P. Langguth, R.H.H. Neubert, CE characterization of potential toxic labile iron in colloidal parenteral iron



formulations using off-capillary and on-capillary complexation with EDTA, *Electrophoresis* 28 (2007) 2424–2429.

[33] E.J. Coulson, H. Stevens, Some observations on the immunochemistry of dextrans, *The Journal of Immunology* 86 (1961) 241.

[34] W. Richter, Minimal molecular size of dextran required to elicit heterologous passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs, *International Archives of Allergy and Immunology* 43 (1972) 252–268.

[35] W. Richter, Built-in hapten inhibition of anaphylaxis by the low molecular weight subfractions of a B 512 dextran fraction of Mw 3400, *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 45 (1973) 930.

[36] A.W. Richter, *Immune Complex Anaphylaxis Induced by Dextran and Its Elimination by Hapten Inhibition*, Springer-Verlag, 1986. pp. 272–283.

[37] H. Hedin, W. Richter, K. Messmer, H. Renck, Incidence, pathomechanism and prevention of dextran-induced anaphylactoid/anaphylactic reactions in man, *Developments in Biological Standardization* 48 (1980) 179.

[38] H. Renck, H.G. Ljungstrom, H. Hedin, W. Richter, Prevention of dextran induced anaphylactic reaction by hapten inhibition, *Acta Chirurgica Scandinavica* 149 (1983) 355–360.

[39] K.G. Ljungström, Safety of dextran in relation to other colloids – ten years experience with hapten inhibition, *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 20 (1993) 206–210.

[40] G.R. Aronoff, Safety of intravenous iron in clinical practice: implications for anemia management protocols, *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (Suppl. 2) (2004) S99–106.

[41] S.B. Silverstein, G.M. Rodgers, Parenteral iron therapy options, *American Journal of Hematology* 76 (2004) 74–78.

[42] S. Fishbane, E.A. Kowalski, The comparative safety of intravenous iron dextran, iron saccharate, and sodium ferric gluconate, *Seminars in Dialysis* 13 (2000) 381–384.

[43] B.G. Danielson, Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents, *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (Suppl. 2) (2004) S93–98.

[44] M. Lu, K.R. Suh, H.-Z. Lee, M.H. Cohen, D. Rieves, R. Pazdur, FDA review of ferumoxytol (Feraheme®) for the treatment of iron deficiency anemia in adults with chronic kidney disease, *American Journal of Hematology* 85 (2010) 315–319.

[45] D.W. Coyne, M. Auerbach, Anemia management in chronic kidney disease: intravenous iron steps forward, *American Journal of Hematology* 85 (2010) 311–312.

[46] D. Stainsby, H. Jones, D. Asher, C. Atterbury, A. Boncinelli, L. Brant, Serious hazards of transfusion: a decade of hemovigilance in the UK, *Transfusion Medicine Reviews* 20 (2006) 273–282.

[47] S. Santosh, P. Podarella, B. Miller, Anaphylaxis with elevated serum tryptase after administration of intravenous ferumoxytol, *NDT Plus* 3 (2010) 341–342.