

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 306**

51 Int. Cl.:

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/IT2010/000287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12001712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10747311 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2588488**

54 Título: **Succinilato de caseína de hierro (III) y procedimiento para la preparación del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:
**ITALFARMACO SPA (100.0%)
Viale Fulvio Testi 330
20126 Milano, IT**

72 Inventor/es:
**STEVENAZZI, ANDREA;
DE FERRA, LORENZO y
PINTO, BARBARA**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 628 306 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Succinilato de caseína de hierro (III) y procedimiento para la preparación del mismo

5 La presente invención se refiere a un succinilato de caseína de hierro (III) caracterizado por un contenido de hierro comprendido entre 4,5% y 7% en peso y por una solubilidad en agua mayor que aproximadamente 92% y por que tiene una proporción de fósforo/nitrógeno mayor que 5% en peso

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III).

TÉCNICA ANTERIOR

10 Los derivados de hierro se usan ampliamente en la medicina para la prevención y cura de la anemia y la ferropenia gestacional, en los casos de síndrome de hipoabsorción, durante la lactancia materna y el crecimiento. Entre ellos, la proteína de hierro succinilato comúnmente denominada por el acrónimo IPS se distingue de manera positiva por las características de biodisponibilidad y tolerabilidad de la misma.

15 Las propiedades químicas, físicas y biológicas, así como la preparación de IPS, llamada Ironlat, obtenida a partir de proteínas de la leche se describen en la patente italiana IT1150213. Además, la solubilidad de Ironlat se indica a pH>5, que es parcial para el complejo que contiene un 6,7% de hierro y completa para el que contiene un 4,6%.

Cremonesi et al. en International Journal of Clinical Pharmacology Therapy and Toxicology vol.31 (1993) páginas 40-51 indica las propiedades químicas y farmacológicas del succinilato de caseína de hierro (III), complejo de hierro (III) obtenido a partir de la caseína succinilada. En la experimentación *in vivo*, este producto, con un contenido de hierro equivalente al 5%, revela mejor tolerabilidad gastrointestinal con respecto a otros derivados de hierro.

20 La patente europea EP939083B1 describe un procedimiento para producir succinilato de caseína de hierro (III), que proporciona el uso de procedimientos de dilaceración y secado específicos para superar el problema de la presencia de componentes insolubles en el producto. Además, se describe el uso de caseína de calidad alimentaria como materia prima que se va a usar en el procedimiento de producción de succinilato de caseína de hierro (III).

25 Con el fin de contribuir a mantener el producto dentro de unos límites especificados con respecto a la contaminación microbiológica, se añaden conservantes de metilparabeno y propilparabeno durante el procedimiento; se determina la presencia a niveles de 3% y 1,05%, respectivamente cuando se analiza el producto terminado. Dicho uso de conservantes también se describe en la patente EP1776382B1 que introduce el uso de la granulación húmeda en combinación con secado por pulverización o liofilización del producto para facilitar, durante el procedimiento, los procesos de solubilización.

30 La solicitud de patente EP319664 propone un procedimiento basado en la degradación enzimática de succinilato de caseína de hierro (III) para superar los problemas de solubilidad y viscosidad observados en este complejo, en particular cuando el valor específico de hierro excede el 10%.

35 La solicitud de patente internacional WO2007/065812 describe la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) realizando tanto la reacción de succinilación y la posterior complejación usando el ion de hierro (III) que opera en suspensión, mientras que los aspectos relativos a las dificultades de solubilización del succinilato de caseína de hierro (III) no son abordados. De hecho, esta solicitud de patente no proporciona información con respecto a la solubilización del complejo obtenido, y no se mide la viscosidad de la solución que posiblemente se puede obtener.

Dichos problemas de solubilización son particularmente evidentes cuando el contenido específico de hierro excede el límite del 5%.

40 El fenómeno de aumento de la viscosidad, que se observa a medida que la concentración del producto en la solución acuosa se incrementa, hace que sea difícil, o incluso impide el uso de succinilato de caseína de hierro (III) más allá de concentraciones determinadas.

45 La combinación de estos efectos limita la dosificación del producto a un valor que no excede 800 mg que corresponde a aproximadamente 40 mg como hierro (III) por dosis a menos que se utilicen formulaciones que superen 15 ml de solución.

Además, la viscosidad de una solución acuosa de succinilato de caseína de hierro (III) complica las operaciones de reducir el contenido microbiano del producto a través de la filtración o microfiltración, y requiere el uso de grandes cantidades de conservantes.

50 Por tanto, es evidente cómo la técnica actual no ofrece soluciones sencillas para superar los problemas de solubilización del succinilato de caseína de hierro (III), un fármaco muy empleado en el tratamiento de diversas formas de ferropenia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- Ahora se ha descubierto que se pueden obtener ventajas sorprendentes en la producción de succinilato de caseína de hierro (III) si se usa caseína alimentaria —que ha sido sometida a un procedimiento de purificación dirigido a la eliminación de impurezas proteicas, impurezas inorgánicas y/o para incrementar la proporción de fósforo/nitrógeno (proporción P/N)— como materia prima. De hecho, de ahí que es posible obtener succinilato de caseína de hierro (III) no solo caracterizado por un perfil proteico que contiene menos impurezas pero inesperadamente también por una solubilidad mejorada en agua. Dicha solubilidad mejorada implica la posibilidad de obtener soluciones y/o suspensiones acuosas que revelan una menor viscosidad con respecto a la obtenida a partir de caseína comercial de calidad alimentaria.
- Haciendo referencia a la caseína, la expresión "impurezas proteicas" de acuerdo con la invención se usa para indicar proteínas diferentes de la caseína en sus diversas variantes, medidas por medio de una electroforesis dimensional con tinción de azul de Coomassie y análisis densitométrico. Preferentemente, dichas impurezas proteicas de la invención son proteínas diferentes de caseína alfa S1, caseína alfa S2, caseína beta, caseína kappa y/o caseína pseudo-kappa.
- De forma análoga, en referencia al succinilato de caseína de hierro (III), la expresión "impurezas proteicas" de acuerdo con la invención se usa para indicar sustancias diferentes de caseína succinilada en sus diversas variantes, medidas por medio de una electroforesis dimensional con tinción de azul de Coomassie y análisis densitométrico. Preferentemente, dichas impurezas proteicas de la invención son proteínas succiniladas diferentes de los productos de succinilación de caseína alfa-S1, caseína alfa-S2, caseína beta, caseína kappa y/o caseína pseudo-kappa.
- La expresión "impurezas inorgánicas" de acuerdo con la invención se usa para indicar cenizas sulfatadas.
- El término "proporción N/P" se usa para indicar la proporción entre la cantidad en peso de fósforo presente en la muestra, medida por medio de la técnica de ICP, y la cantidad en peso de nitrógeno, medida a través de análisis elemental.
- De acuerdo con la presente invención, los valores expresados en porcentaje en peso (% en peso) significan con respecto al peso total del succinilato de caseína de hierro (III) o de caseína.
- Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo succinilato de caseína de hierro (III) que se caracteriza por un contenido de hierro comprendido entre 4,5 y 7% en peso y una solubilidad en agua mayor que aproximadamente 92% y por que tiene una proporción de fósforo/nitrógeno mayor que 5% en peso. Preferentemente, dicha solubilidad en agua debe ser considerada como la solubilidad en aproximadamente 11,5 partes de agua.
- Dicho succinilato de caseína de hierro (III) contiene además una cantidad de impurezas proteicas inferior a aproximadamente el 15%, preferentemente inferior a aproximadamente el 10% y/o una proporción P/N mayor que 5%, preferentemente mayor que aproximadamente 5,5%.
- Un objetivo adicional de la presente invención es un procedimiento para preparar succinilato de caseína de hierro (III) descrito anteriormente, que comprende las siguientes etapas:
- a) hacer reaccionar caseína y anhídrido succínico en agua para obtener caseína succinilada,
 - b) reacción de la caseína succinilada con cloruro de hierro (III) para obtener succinilato de caseína de hierro (III),
- caracterizado por que dicha caseína de acuerdo con la etapa a) es caseína purificada, que tiene un bajo contenido de impurezas proteicas y/o impurezas inorgánicas y/o una alta proporción P/N.
- Preferentemente, dicho contenido de impurezas proteicas es inferior a 15% en peso, el de dichas impurezas inorgánicas es inferior al 1% en peso y la proporción entre el contenido en peso de fósforo y el contenido en peso de nitrógeno es mayor que 5% en peso,
- Más preferentemente, el contenido de dichas impurezas proteicas es inferior a aproximadamente el 10% en peso y/o dicho contenido impurezas inorgánicas es inferior a aproximadamente el 0,4% en peso y/o la proporción entre el contenido en peso de fósforo y el contenido en peso de nitrógeno es mayor que aproximadamente el 5,5%.
- Dichas impurezas proteicas de la invención son proteínas distintas de la caseína alfa-S1, caseína alfa-S2, caseína beta, caseína kappa y/o caseína pseudo-kappa.
- Las caseínas alimentarias se identifican generalmente de acuerdo con la técnica de precipitación empleada en la preparación de las mismas: en cuanto a las caseínas ácidas, la precipitación se lleva a cabo por medio de acidificación, mientras que aquellas obtenidas usando cuajo son presámicas, también comúnmente denominadas caseínas de cuajo.
- De acuerdo con la presente invención, la caseína alimentaria que se usa como materia prima puede ser caseína ácida o caseína presámica.

Estos productos comerciales, independientemente del tipo (ácido o presámico) suelen acompañarse de escasa documentación analítica; los parámetros indicados típicamente son el contenido de agua, el contenido de proteína (determinado por la aplicación de un factor de multiplicación al valor total de nitrógeno), el nivel de contaminación microbiana y la granulometría. Este nivel de caracterización es totalmente adecuado para el uso de las caseínas en la industria alimentaria, pero ahora se ha descubierto que la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) requiere una evaluación analítica en profundidad de esta materia prima.

Las caseínas alimentarias comerciales y las caseínas purificadas usadas como materias primas de acuerdo con la presente invención para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) se analizaron por medio de HPLC de fase inversa de acuerdo con el procedimiento indicado en Bonizzi et al. en Journal of Chromatography A vol. 1261 (2009), páginas 165-168

Por tanto, es posible identificar tres tipos de caseínas: alfa-S1; alfa-S2, beta, kappa y pseudo-kappa.

A través del análisis de electroforesis, tanto monodimensional como bidimensional, usando azul de Coomassie como indicador reactivo, junto con la separación de diversos tipos de caseína y de las diversas variedades de la misma que derivan de sus modificaciones postranscripcionales (tales como glucosilación y fosforilación), también es posible evaluar la presencia de las impurezas proteicas.

En particular la electroforesis SDS-PAGE con gel de poliacrilamida al 14%, tinción con azul de Coomassie y análisis densitométrico basándose en una línea de calibración construida con diferentes cantidades de BSA, se usó para la determinación cuantitativa de las impurezas proteicas.

Dichas caseínas y caseínas purificadas también se analizaron usando el procedimiento de ceniza sulfatada de acuerdo con la Farmacopea Europea (procedimiento Eu.Pharm. 2.4.14). El contenido de fósforo (P) de las mismas se determinó a continuación a través de la técnica de ICP y el contenido de nitrógeno (N) se determinó por análisis elemental y por lo tanto la proporción en % de P/N se calculó dividiendo la cantidad en peso observada con respecto al fósforo entre la cantidad en peso observada en relación con el nitrógeno y multiplicando el resultado por 100. La tabla 1 a continuación muestra los resultados obtenidos para los diversos tipos de caseínas, es decir, las caseínas alimentarias comerciales (ácidas y presámicas) y las caseínas purificadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Caseína	Materias primas para	Impurezas proteicas	Cenizas sulfatadas	% de P/N
Caseína ácida	Ejemplos comp. 1 y 2	15%	1,6%	
Caseína presámica	Ejemplo comp. 3	20%	9,2%	
Ejemplo 4	Ejemplos 8A y 9A	5%	0,4%	5,5%
Ejemplo 5	Ejemplo 8B	9%	0,9%	5,1%
Ejemplo 6	Ejemplo 8C	8%	0,2%	5,6%
Ejemplo 7	Ejemplos 8D y 9B	10%	0,8%	5,2%

Tabla 1

Por lo tanto, se observó que las caseínas alimentarias comerciales analizadas revelan un contenido de impurezas proteicas equivalentes a 15-20% del total de la proteína de muestra, mientras que el nivel del contenido de impurezas inorgánicas, definido por medio del valor de las cenizas sulfatadas determinadas, está comprendido entre 1% y 2,5% en peso en las caseínas ácidas comerciales y entre 7% y 10% en peso en las caseínas presámicas, como se ejemplifica de manera observable en la tabla 1 anterior.

Por lo tanto, un objetivo adicional de la presente invención es también un procedimiento para purificar dichas caseínas alimentarias, que lleva a la eliminación parcial o total de impurezas proteicas, impurezas inorgánicas y/o al incremento de la proporción P/N.

De acuerdo con la presente invención, dicha caseína alimentaria se trata con agua, un disolvente orgánico polar o una mezcla de los mismos; preferentemente con agua.

Preferentemente, dicho disolvente orgánico polar es un alcohol C₁-C₄, más preferentemente metanol, etanol, isopropanol o una mezcla de los mismos.

De acuerdo con un primer modo de realización de la presente invención, el disolvente seleccionado se usa para la purificación de la caseína, de tal manera como para disolver las impurezas proteicas e impurezas inorgánicas para separarlas de la caseína no disuelta mediante centrifugación o filtración. Las características de solubilidad de la caseína en el disolvente seleccionado como una función de la temperatura, el pH y/o la adición de aditivos tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio y/o acetato de amonio, se usan para la implementación de este procedimiento de purificación.

La caseína alimentaria usada en el procedimiento de purificación se puede poner directamente en contacto con el disolvente seleccionado en las condiciones de la disolución de las impurezas proteicas e inorgánicas y, tras un

tiempo adecuado de contacto bajo agitación, separarse de la solución que contiene las impurezas por filtración o centrifugación.

5 De acuerdo con un segundo modo de realización de la presente invención, la purificación se llevará a cabo disolviendo en primer lugar la caseína en el disolvente seleccionado y posteriormente precipitándola por medio de una variación adecuada de pH, temperatura y/o adición de aditivos tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio y/o acetato de amonio. Incluso en este caso, la separación de la caseína de la proteína e impurezas inorgánicas se llevará a cabo a través de la filtración o centrifugación, y dichas impurezas terminan disueltas en el disolvente usado para la purificación.

10 De acuerdo con dicho primer modo de realización de la presente invención, la caseína alimentaria se pone en contacto con el disolvente seleccionado, el pH de la mezcla se lleva opcionalmente a un pH comprendido entre 3 y 5, o a un pH comprendido entre 5 y 10. Dichas correcciones de pH se pueden realizar por ejemplo usando soluciones acuosas de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Dicha mezcla se lleva a una temperatura comprendida entre 0°C y 40°C, preferentemente entre 0°C y 10°C. Un aditivo, tal como por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de calcio y/o acetato de amonio, puede añadirse de manera opcional. La mezcla resultante se deja bajo agitación
15 durante un período de tiempo comprendido entre 1 y 24 horas, preferentemente entre 2 y 10 horas.

Dicho disolvente seleccionado se usa por lo tanto para disolver las impurezas proteicas y las impurezas inorgánicas y las separa de la caseína no disuelta, preferentemente la caseína se separa a continuación de las impurezas a través de centrifugación o filtración. La filtración puede ser de tipo convencional o puede realizarse por medio de membranas de porosidad adecuada de acuerdo con el procedimiento de filtración por flujo tangencial o el de tipo
20 filtración en línea. De acuerdo con el segundo modo de realización anteriormente mencionado de la presente invención, la caseína alimentaria se disuelve en el disolvente seleccionado, y posteriormente se somete a la precipitación llevándola a un pH comprendido entre 4 y 6, preferentemente entre 4,5 y 5. Cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica puede usarse para separar la caseína de la solución que contiene las impurezas proteicas e inorgánicas, preferentemente dicha caseína se separa por medio de filtración o centrifugación.

25 Con el objetivo de obtener el grado deseado de purificación, estas etapas de purificación pueden repetirse una o varias veces. Así, el mismo procedimiento de purificación se puede repetir o se puede optar por operar procedimientos de purificación diferentes entre sí en secuencia.

En la presente solicitud se divulga una caseína alimentaria purificada, que puede obtenerse a través de uno de los procedimientos descritos anteriormente de la presente invención, que tiene un contenido de impurezas proteicas preferentemente menor que 15% en peso, más preferentemente menor que 10% en peso; un contenido de impurezas inorgánicas preferentemente menor que 1% en peso, más preferentemente menor que 0,4% en peso y/o una proporción entre el contenido en peso de fósforo y el contenido en peso de nitrógeno mayor que 5% en peso, más preferentemente mayor que 5,5% en peso.

35 En la presente solicitud también se divulga el uso de dicha caseína purificada, para preparar succinilato de caseína de hierro (III).

La preparación de succinilato de caseína de hierro (III) puede realizarse de acuerdo con procedimientos conocidos por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, los descritos en las patentes IT1150213 y EP939083B1.

En un modo de realización de la presente invención, el procedimiento para la preparación del succinilato de caseína de hierro (III) descrito anteriormente, comprende las etapas de:

40 a) hacer reaccionar caseína y anhídrido succínico en agua para obtener la caseína succinilada,
b) hacer reaccionar la caseína succinilada con cloruro de hierro (III) para obtener succinilato de caseína de hierro (III),

45 en el que la caseína del punto etapa a) es caseína purificada que tiene un contenido bajo en impurezas proteicas y/o impurezas inorgánicas y/o una alta proporción P/N como se describe anteriormente, se realiza de la siguiente manera:

la caseína purificada se succinila en agua usando anhídrido succínico manteniendo el pH durante la reacción comprendido preferentemente entre 7,5 y 8,5 mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio.

50 La temperatura de reacción es de aproximadamente 20-25 °C. Al final de la reacción, el producto se precipita mediante la adición —bajo agitación— de una solución acuosa de ácido clorhídrico hasta un pH de aproximadamente 3.

La caseína succinilada obtenida de este modo se filtra y se disuelve en agua mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio. La solución se filtra por los posibles sólidos no disueltos; a continuación, se añade una solución acuosa de cloruro de hierro (III) en la cantidad definida en función del contenido de hierro deseado en el producto terminado.

Durante la adición, se produce la reducción del pH y la precipitación del succinilato de caseína de hierro (III).

5 Durante la adición de la solución de cloruro de hierro (III), el pH puede corregirse, usando una solución acuosa de hidróxido de sodio para evitar condiciones excesivamente ácidas. En este caso, al final de la adición de cloruro de hierro (III), la precipitación del complejo se completa mediante la adición de una solución acuosa de ácido clorhídrico.

El sólido formado se recupera por filtración y se suspende en agua. En esta etapa, es posible añadir conservantes (metilparabeno y propilparabeno). Se añade una solución acuosa de hidróxido de sodio hasta un pH de aproximadamente 8,5, la parte no disuelta se retira por centrifugación y el succinilato de caseína de hierro (III) se precipita por acidificación usando ácido clorhídrico en solución acuosa. El producto se seca a baja presión.

10 Alternativamente al secado a baja presión, el succinilato de caseína de hierro puede obtenerse a partir de una solución acuosa del mismo por medio de secado por pulverización.

Dicho procedimiento puede comprender también una etapa adicional de microfiltración de la solución acuosa de succinilato de caseína de hierro (III). Dicha etapa de microfiltración de acuerdo con la invención está destinada a reducir la contaminación microbiana.

15 Dicho succinilato de caseína de hierro (III) de la invención ha mejorado las características de solubilidad en agua, con respecto a la técnica anterior; preferentemente dicho succinilato de caseína de hierro (III) tiene una solubilidad en agua mayor que aproximadamente el 92%. Dicho valor de solubilidad se pretende preferentemente cuando está en 11,5 partes de agua.

20 El cálculo de la solubilidad en agua se realizó mediante la solubilización de la muestra a un pH de aproximadamente 8,0 usando hidróxido de sodio con una proporción final entre el agua y el succinilato de caseína de hierro (III) equivalente a 11,5 en peso, y el filtrado de la preparación sobre un filtro con una porosidad equivalente a 6 μm y mediante la determinación por pesafiltros, tras el secado, la cantidad no disuelta. La solubilidad en porcentaje de la muestra se calculó restando del peso de la propia muestra el del componente que restaba en el filtro y comparando el resultado con el peso inicial de la muestra. La viscosidad de diversas preparaciones acuosas se midió a un pH de aproximadamente 8,0 de los productos con concentraciones equivalentes al 5%, 6% y 8% en peso.

25 Además, las velocidades de filtración se midieron en las membranas con una porosidad equivalente a 0,45 μm para establecer, para las diferentes muestras preparadas, la posibilidad de reducir la contaminación microbiana a través de la microfiltración. Este cálculo se realizó midiendo el tiempo requerido para pasar —por medio de un sistema bajo vacío— 5 ml de una solución de la muestra en agua a un pH de aproximadamente 8,0 de concentración de 5% en peso a través de una membrana con una porosidad de 0,45 μm de 3 cm^2 .

30 La tabla 2 a continuación muestra los resultados.

Muestra	Solubilidad en 11,5 partes de agua	Viscosidad de la solución (mPa s)			Tiempo de filtración 5 ml de solución al 5% en agua en 0,45 μm (s)
		5% en agua	6% en agua	8% en agua	
Ej comp. 1	89%	17	54	715	∞ (bloqueado)
Ej comp. 2	84%	21	67	957	∞ (bloqueado)
Ej comp. 3	85%	17	53	863	560
Ejemplo 8A	97%	14	29	207	120
Ejemplo 8B	94%	13	33	351	150
Ejemplo 8C	98%	11	24	195	90
Ejemplo 8D	93%	15	44	387	180
Ejemplo 9A	98%	12	28	240	180
Ejemplo 9B	92%	14	36	411	120

Tabla 2

Un objeto adicional de la presente invención es una composición que contiene succinilato de caseína de hierro (III) de la presente invención y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

35 Dicha composición se puede formular preferentemente en forma sólida o líquida, más preferentemente en forma líquida. Dicha forma líquida es preferentemente una solución o una suspensión, más preferentemente una solución acuosa. Dicha solución acuosa puede administrarse por vía oral o parenteral. Dicha composición comprende una cantidad de succinilato de caseína de hierro (III) de acuerdo con la invención, preferentemente comprendida entre 10 y 200 mg de hierro, más preferentemente entre 20 y 100 mg de hierro, aún más preferentemente de aproximadamente 40 mg, 60 mg u 80 mg de hierro.

40 De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, dicha composición es una solución acuosa que comprende alrededor de 40 mg, 60 mg u 80 mg de hierro disuelto en 15 ml de solución.

Además, se ha descubierto de manera sorprendente que las composiciones líquidas a base de succinilato de caseína de hierro (III) de acuerdo con la presente invención ponen de manifiesto una reducción considerable de la viscosidad con respecto a las composiciones de la técnica anterior.

5 La viscosidad de las composiciones líquidas que contienen succinilato de caseína de hierro (III) de la invención es considerablemente baja con respecto a la de las composiciones de la técnica anterior con un valor de hierro equivalente. Dicha reducción de la viscosidad en las preparaciones que contienen succinilato de caseína de hierro (III) de la invención, puede observarse en las preparaciones, obtenidas a partir de succinilato de caseína de hierro (III) con un contenido de hierro equivalente a 5% y, aún más claramente, en la comparación entre los productos con un mayor contenido de hierro, en particular entre los productos con un contenido de hierro del 6% o más, como se observa en la tabla 2. Preferentemente, la viscosidad de una composición líquida que contiene - en forma solubilizada —aproximadamente el 8% en peso de succinilato de caseína de hierro (III) de la invención es inferior a 400 mPa s, más preferentemente inferior a 300 mPa s.

15 Estas sorprendentes características de mayor solubilidad del succinilato de caseína de hierro (III) de la invención, y menor viscosidad de las composiciones líquidas que los contienen, son particularmente útiles para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) a una alta concentración de hierro (tal como, por ejemplo, igual o mayor que 40 mg para 15 ml de solución). Una solución preferente de acuerdo con la presente invención contiene una cantidad de succinilato de caseína de hierro (III) comprendida entre 4 y 15% en peso, preferentemente entre 4,5 y 12% en peso, más preferentemente entre 5 y 8% en peso, con respecto al peso total.

20 Dicha característica de baja viscosidad también permite la microfiltración de composiciones líquidas que contienen el succinilato de caseína de hierro (III) de la invención.

Esta operación es extremadamente útil para la protección de las propiedades del producto, la posterior formulación y la conservación del mismo. Después de haber realizado la operación de microfiltración y la reducción de la contaminación microbiana también es posible reducir, o incluso evitar el uso de conservantes tales como, por ejemplo, los parabenos convencionalmente usados para evitar la proliferación microbiana.

25 En realidad, esto permite reducir considerablemente el contenido microbiano de las formulaciones, preferentemente formulaciones líquidas, que contienen succinilato de caseína de hierro (III) de acuerdo con la invención.

Hasta la fecha, la elevada viscosidad de las formulaciones líquidas (por ejemplo, soluciones acuosas) a base de succinilato de caseína de hierro (III), obtenido a partir de la caseína alimentaria no sometida a un procedimiento de purificación adecuado, impedía dicha operación de microfiltración en lugar de llevarla a cabo.

30 La microfiltración de acuerdo con la invención se puede producir en membranas con porosidad controlada o microfiltración tangencial en membranas con porosidad controlada con el objetivo de reducir la contaminación microbiana.

35 Dicha operación de microfiltración, que también puede asociarse con la menor viscosidad de las composiciones líquidas (preferentemente soluciones acuosas) de succinilato de caseína de hierro (III), es particularmente útil para preparar composiciones líquidas orales de alto período de validez sin requerir el uso de cantidades de conservantes cuestionables y elevadas.

Los siguientes ejemplos tienen el único propósito de ilustrar algunos modos de realización de la invención y no se considerarán restrictivos de la misma en modo alguno.

EJEMPLOS

40 EJEMPLO 1

Ejemplo comparativo para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) con un contenido de hierro equivalente a alrededor del 5% a partir de caseína ácida comercial

Se añaden 600 ml de agua desmineralizada a 50 g de caseína ácida alimentaria, la mezcla se agita durante 30 minutos y el pH se lleva a un pH estable=8,4 con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 9,5%.

45 Se añaden 15 g de anhídrido succínico en pequeñas porciones manteniéndose bajo agitación. Durante la adición, el pH se mantiene a aproximadamente 8,4 mediante la adición de la solución de hidrócloruro de sodio al 9,5% con el tiempo. Una solución acuosa de ácido clorhídrico al 17% se añade hasta un pH estable=2,8. El aislamiento se realiza mediante el filtrado de la succinilcaseína precipitada que se resuspende en 600 ml de agua desmineralizada. El pH se lleva a pH=8,5 usando hidróxido de sodio acuoso al 9,5%, se mantiene bajo agitación, la pequeña fracción no disuelta se filtra en un filtro de papel y, una solución constituida por 14,1 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado y 119 ml de agua se añade bajo agitación. Durante la adición hay una reducción del pH y la precipitación de succinilato de caseína de hierro (III). Tras mantenerse bajo agitación durante 30 minutos hay un pH=2,9 y se filtra el producto. El producto se suspende en 600 ml de agua e hidróxido de sodio acuoso al 5% se añade de forma gradual y bajo agitación hasta un pH estable=8,5. La centrifugación se realiza para eliminar el componente insoluble

equivalente a alrededor de 20 g humedad; el pH se corrige usando ácido clorhídrico en solución acuosa al 17% hasta un pH estable=2,8. El precipitado se filtra y se seca obteniendo 54,1 g de succinilato de caseína de hierro (III).

EJEMPLO 2

5 **Ejemplo comparativo para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) con un contenido de hierro equivalente a alrededor del 6% a partir de caseína ácida comercial**

Se añaden 600 ml de agua desmineralizada a 50 g de caseína ácida alimentaria, la mezcla se agita durante 30 minutos y el pH se lleva a un pH estable=8.4 con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 9,5%.

10 Se añaden 15 g de anhídrido succínico en pequeñas porciones y se mantiene bajo agitación. Durante la adición el pH se mantiene a aproximadamente 8,4 mediante la adición de la solución de hidrocloreuro de sodio al 9,5% con el tiempo. Una solución acuosa de ácido clorhídrico al 17% se añade hasta un pH estable=2,8. El aislamiento se realiza mediante el filtrado de la succinilcaseína precipitada que se resuspende en 600 ml de agua desmineralizada. El pH se lleva a pH=8,5 usando hidróxido de sodio acuoso al 9,5%, se mantiene bajo agitación, la pequeña fracción en 150 ml de agua se adiciona bajo agitación. Durante la adición de la solución de cloruro férrico, el pH se mantiene en el intervalo comprendido entre pH=6,0 y pH=6,5 añadiendo simultáneamente hidróxido de sodio en solución acuosa al 5%. Después de completar la adición de la solución de cloruro férrico se corrige el pH a pH=2,8 usando ácido clorhídrico acuoso al 17%. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 30 minutos y se filtra el producto. El producto se suspende en 600 ml de agua e hidróxido de sodio acuoso al 5% se añade gradualmente y bajo agitación hasta un pH estable=8,5. La centrifugación se realiza para eliminar el componente insoluble equivalente a alrededor de 25 g humedad; el pH se corrige usando ácido clorhídrico en solución acuosa al 17% hasta un pH estable=2,8. El precipitado se filtra y se seca obteniendo 53,5 g de succinilato de caseína de hierro (III).

EJEMPLO 3

Ejemplo comparativo para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) con un contenido de hierro equivalente a alrededor del 5% a partir de caseína presámica comercial

25 Siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1 el succinilato de caseína de hierro (III) se prepara a partir de 50 g de caseína presámica alimentaria. Después del secado, se obtienen 54,2 g de succinilato de caseína de hierro (III).

EJEMPLO 4

Purificación de caseína ácida comercial

30 Se añaden 6 l de agua desmineralizada se añaden a 180 g de caseína ácida alimentaria, se corrige el pH a pH=7,0 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se enfría hasta 4°C, el pH se lleva a pH=4,5 con una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 16 horas y el sólido se filtra en un Büchner.

35 El producto húmedo se suspende en 6 l de agua desmineralizada, se corrige el pH a pH=7,0 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se enfría hasta 4°C, el pH se lleva a pH=4,5 con la solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 3 horas y el sólido se filtra en un Büchner.

40 El producto húmedo se resuspende en 3 l de agua desmineralizada, se corrige el pH a pH=7,0 con la solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se enfría hasta 4°C, el pH se lleva a pH=4,5 con la solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 3 horas y 390 g de sólido húmedo se filtran en un Büchner, el producto se seca en un secador rotatorio durante 20 horas a 25°C y 30 mmHg, obteniéndose 146 g de caseína purificada.

EJEMPLO 5

Purificación de caseína ácida comercial

45 Se añaden 6 l de agua desmineralizada a 18 g de caseína ácida alimentaria, se corrige el pH a pH=7,0 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se enfría hasta 4°C, el pH se lleva a pH=4,5 con una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 16 horas y el sólido se filtra en un Büchner.

Se obtienen 408 gramos húmedos, que se secan en un secador rotatorio durante 20 horas a 25°C y 30 mmHg, obteniéndose 162 g de caseína purificada.

50 EJEMPLO 6

Purificación de caseína ácida comercial

5 Se añaden 42 litros de agua desmineralizada a 144 g de caseína ácida alimentaria. El pH se corrige a pH estable=7,0 con una solución al 8% de hidróxido de sodio en agua. El pH se lleva a pH=3,0 con una solución de ácido clorhídrico acuoso 0,5 M. La mezcla se enfría hasta 2°C y el pH se lleva a pH=4,0 con hidróxido de sodio acuoso 0,01 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante una hora y 318 g de sólido húmedo se filtran en un Büchner, el producto se seca en un secador rotatorio durante 20 horas a 25°C y 30 mmHg, obteniéndose 126 g de caseína purificada.

EJEMPLO 7

Purificación de caseína presámica comercial

10 Se añaden 6 l de agua desmineralizada a 180 g de caseína presámica alimentaria, la mezcla se agita durante 30 minutos, se enfría hasta 4°C, la mezcla se mantiene bajo agitación durante 16 horas, el pH se lleva a pH=4,5 con una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante una hora y el sólido se filtra en un Büchner.

15 El producto húmedo se suspende en 6 L de agua desmineralizada, se corrige el pH a pH=7,0 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se enfría hasta 4°C, el pH se lleva a pH=4,5 con la solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 3 horas y el sólido se filtra en un Büchner.

El producto húmedo se suspende nuevamente en 6 l de agua desmineralizada, se corrige el pH a pH=7,0 con la solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se enfría hasta 4°C, el pH se lleva a pH=4,5 con la solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M. La suspensión se mantiene bajo agitación durante 16 horas y el sólido se filtra en un Büchner.

20 Se obtienen 290 gramos húmedos, que se secan en un secador rotatorio durante 20 horas a 25°C y 30 mmHg, obteniéndose 126 g de caseína purificada.

EJEMPLO 8

Preparación de succinilato de caseína de hierro (III) con un contenido de hierro equivalente a alrededor del 5% a partir de caseínas purificadas tal como se define en los Ejemplos 4,5,6 y 7

25 Siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1, el succinilato de caseína de hierro (III) se prepara a partir de caseínas purificadas obtenidas tal como se describe en los ejemplos 4, 5, 6 y 7.

La siguiente tabla muestra las cantidades relativas a cada una de las preparaciones.

Succinilato de caseína de hierro (III)	Materia primas	Cantidad de caseína usada	Cantidad de succinilato de caseína de hierro (III) obtenido
Ejemplo 8A	Caseína ácida purificada en el ejemplo 4	50 g	54,6 g
Ejemplo 8B	Caseína ácida purificada en el ejemplo 5	50 g	55,2 g
Ejemplo 8C	Caseína ácida purificada en el ejemplo 6	50 g	54,3 g
Ejemplo 8D	Caseína presámica purificada en el ejemplo 7	50 g	52,7 g

Tabla 3

EJEMPLO 9

30 **Preparación de succinilato de caseína de hierro (III) con un contenido de hierro equivalente a alrededor de 6% a partir de las caseínas purificadas tal como se define en los ejemplos 4 y 7**

Tras el procedimiento descrito en el ejemplo 2 el succinilato de caseína de hierro (III) se prepara a partir de las caseínas purificadas obtenidas como se describe en los ejemplos 4 y 7.

La tabla a continuación muestra las cantidades en relación con cada una de las preparaciones

Succinilato de caseína de hierro (III)	Materia prima	Cantidad de caseína usada	Cantidad de succinilato de caseína de hierro (III) obtenido
Ejemplo 9A	Caseína ácida purificada en el ejemplo 4	50 g	56,0 g
Ejemplo 9B	Caseína presámica purificada en el ejemplo 7	50 g	52,5 g

Tabla 4

35

REIVINDICACIONES

1. Succinilato de caseína de hierro (III), caracterizado por un contenido de hierro comprendido entre 4,5 y 7% en peso, por una solubilidad mayor que aproximadamente el 92% y por que tiene una proporción de fósforo/nitrógeno mayor que 5% en peso, preferentemente mayor que aproximadamente 5,5% en peso.
- 5 2. Succinilato de caseína de hierro (III) de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque contiene una cantidad de impurezas proteicas inferior a aproximadamente el 15% en peso, preferentemente inferior a aproximadamente el 10% en peso.
3. Procedimiento para la preparación de succinilato de caseína de hierro (III) de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) hacer reaccionar caseína y anhídrido succínico en agua para obtener caseína succinilada,
- b) hacer reaccionar la caseína succinilada con cloruro de hierro (III) para obtener succinilato de caseína de hierro (III),
- c) caracterizado por que dicha caseína de acuerdo con la etapa a) es caseína purificada, que tiene un contenido de impurezas proteicas inferior a 15% en peso y/o un contenido de impurezas inorgánicas inferior a 15
- 1% en peso y/o una proporción de fósforo/nitrógeno mayor que el 5%.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que dicho contenido de impurezas proteicas es inferior a aproximadamente el 10% en peso y/o dicho contenido de impurezas inorgánicas es inferior a aproximadamente el 0,4% en peso.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que dichas impurezas proteicas son proteínas distintas de caseína alfa-S1, caseína alfa-S2, caseína beta, caseína kappa, caseína pseudo-kappa.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que dicha caseína purificada tiene una proporción de fósforo/nitrógeno mayor que aproximadamente el 5% en peso.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que dicha caseína purificada se obtiene de la caseína ácida o caseína presámica.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una etapa adicional de microfiltración de la solución acuosa de succinilato de caseína de hierro (III).
9. Composición farmacéutica que contiene succinilato de caseína de hierro (III) de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2 y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
10. Composición de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada por que está en forma líquida o sólida,
- 30 preferentemente en forma líquida.
11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por que dicha forma líquida es una solución o una suspensión, preferentemente una solución acuosa.
12. Composición de acuerdo con la reivindicación 9 caracterizada por que dicha composición es una solución que contiene aproximadamente el 8% en peso de succinilato de caseína de hierro (III) que tiene una viscosidad inferior a aproximadamente 400 mPa s, preferentemente inferior a aproximadamente 300 mPa s.
- 35 13. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que el succinilato de caseína de hierro (III) está contenido en una cantidad comprendida entre 5 y 15% en peso, preferentemente entre 6 y 12% en peso, más preferentemente entre 7 y 9% en peso, con respecto al peso total de la composición.
14. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 para uso oral o parenteral,
- 40 preferentemente para uso oral.
15. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14 para su uso en el tratamiento de ferropenias.
16. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el tratamiento de la anemia, ferropenia gestacional, síndrome de hipoabsorción, ferropenia durante la lactancia materna y ferropenia durante el crecimiento.