(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 655 238**

(51) Int. CI.:

C07K 14/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14386034 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 3034512**

(54) Título: **Un proceso para producir complejos de caseína N-acetil-aspartilada y hierro (III) y uso de los mismos en composiciones farmacéuticas**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2018

(73) Titular/es:

TSETI, IOULIA (100.0%)
13 Pavlou Mela Street
145 61 Kifissia Attikis, GR

(72) Inventor/es:

TSETI, IOULIA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Un proceso para producir complejos de caseína N-acetil-aspartilada y hierro (III) y uso de los mismos en composiciones farmacéuticas

La presente invención se refiere de forma general a complejos de proteína hierro (III) y a procesos de fabricación de los mismos. El producto que se obtiene según el método de la presente invención puede usarse con seguridad para la administración en la población general o en animales que estén en terapia de deficiencia de hierro.

Antecedentes de la técnica

La terapia con hierro es necesaria en una amplia variedad de situaciones clínicas que incluyen el embarazo, la quimioterapia, las hemorragias agudas o crónicas, la hemodiálisis, la enfermedad inflamatoria del intestino, una dieta inadecuada y la cirugía gastrointestinal.

La terapia con hierro oral es considerablemente más barata que la terapia alternativa con hierro parenteral, y también presenta menos riesgos de reacción alérgica grave. En base a ello, en la solicitud de patente Británica nº 910321 (Olivieur Paul Gaudin), se describe un proceso mejorado para la preparación de sales ferrosas con ácido aspártico. Estas sales podrían usarse como medicamento para la deficiencia de hierro.

Cremonesi P et al., en 1984 (Arzneimittel-Forschung, 34(9): 948-952) presentaron los primeros derivados de hierro de proteína de leche modificada. Adicionalmente, se plantea que se puede preparar un producto que contenga una cantidad elevada de hierro, y que mantenga todas las características necesarias de estabilidad y solubilidad para un fármaco, mediante succinilación de las proteínas lácteas, antes de la reacción con la sal de hierro. Para estos derivados se podría obtener una ventaja particular. El hierro, en forma de complejo oligomérico, se une fuertemente a la proteína, no en estructuras queladas con residuos básicos, sino implicando varios sitios de la cadena proteica. La solubilidad del complejo de hierro queda asegurada por el aumento de disponibilidad de grupos carboxilo que resulta de la reacción de succinilación.

La Patente de EE.UU. nº 4493829, del mismo periodo, describe derivados proteína succinilada-hierro sin lesiones gástricas y con una biodisponibilidad mejorada. Las mismas modificaciones de proteína (vegetal y animal) se describen en la patente Europea nº 0243322, mediante reacción de las proteínas con anhídridos de ácido dicarboxílico alifático 3-10, introduciendo grupos de ácido carboxílico en la proteína, y facilitando de este modo la formación de complejos con el hierro.

La caracterización química y biológica del hierro-succinilato de proteína en ratas y perros se describe en Cremonesi P et al (International Journal of Clinical Pharmacology, therapy, and toxicology, 31(1): 40-51). Los experimentos demostraron una mejor tolerancia gastrointestinal a un complejo de hierro succinil caseína que contenía un 5% de hierro.

El documento EP0939083 describe un proceso para la preparación de un complejo de ferro-succinilcaseína obtenido a partir de caseína de grado alimentario usado con fines alimenticios.

El documento US2001031748 se refiere a un dietético de diversos metales, incluido el hierro, en combinación con la administración de un ligando dietético tal como ascorbato, succinato, aspartato y otros ligandos. La combinación de dicho dietético puede contribuir a tratar los síntomas gastrointestinales.

Lazzari et al. publicaron (Clinical Drug Investigation, 2005; 25(11): 679-689) una revisión de 16 ensayos clínicos de tratamiento de la deficiencia de hierro con hierro-caseína acetil-aspartilada (Fe-ASP), que demostró ser un vehículo eficaz para generar una elevada biodisponibilidad. En ensayos clínicos abiertos, se observaron mejoras muy significativas en los parámetros clínicos y hematológicos tras el tratamiento con Fe-ASP en todas las categorías de pacientes con anemia de deficiencia de hierro. En ensayos clínicos controlados, los cambios observados con el Fe-ASP en los perfiles clínicos y hematológicos fueron virtualmente idénticos a los observados con hierro succinilato de proteína (IPS), y también se comparó el Fe-ASP con gluconato de hierro parenteral. No surgieron consideraciones de seguridad. El Fe-ASP muestra una elevada eficacia en el tratamiento de anemia de deficiencia de hierro, y es un vehículo de hierro tolerado extremadamente bien. El Fe-ASP representa una alternativa válida al IPS y es un sustituto prometedor para la terapia de hierro parenteral en situaciones clínicas seleccionadas.

Más reciente, la patente WO nº 2006021843 describe un proceso para producir complejos de hierro succinil caseína y acetil-aspartato hierro caseína en los que la sustancia es poco expuesta a las condiciones de pH y temperatura. El proceso emplea anhídrido de acetil-aspartato. Además, este proceso no requiere el uso de bombas especiales (bombas de dilaceración).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la preparación de complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada, que comprende las etapas de (a) reacción de caseína con cloruro de N-acetil-L-aspartilo, para formar caseína N-acetil-L-

aspartilada, (b) reacción posterior de la caseína N-acetil-L-aspartilada con cloruro férrico; y (c) obtener el complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada.

Además, la presente invención se refiere a un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende un complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada de grado alimentario, comprendiendo dicho proceso el proceso de preparación del complejo de hierro (III) tal como se establece en las reivindicaciones 1-5, y combinar dicho complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada de grado alimentario con excipientes farmacéuticos, en particular seleccionados entre diluyentes y conservantes.

Los complejos de la presente invención son estables y muestran una elevada estabilidad con el tiempo. Por tanto, los productos pueden usarse para la terapia de deficiencia de hierro en humanos o animales.

Descripción detallada de la invención

La presente invención queda establecida más detalladamente en las reivindicaciones dependientes anexadas.

Por tanto, la presente invención sugiere un nuevo proceso para producir derivados de hierro de proteínas, a saber, un complejo férrico de caseína N-acetil-L-aspartilada (referida en la presente memoria como “caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada” y complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada), preferiblemente obtenido a partir de caseína de grado alimentario, es decir, de caseína usada con fines alimentarios. Con la expresión “caseína de grado alimentario” se pretende indicar caseína obtenida a partir de leche procedente de granjas de cría bajo un control estricto. Dicho producto presenta un nivel de contaminación inferior a 1000 CFU/g de bacterias, e inferior a 100 CFU/g de moho, niveles de contaminación que preferiblemente se determinan como se describe en la Farmacopea Europea actual, monografías *2.6.12 for Total viable aerobic count*, *2.6.13 for specified microorganisms* y *2.6.14 for Bacterial endotoxins*. El uso de caseína de grado alimentario permite obtener productos particularmente puros, en comparación con complejos similares obtenidos a partir de proteínas de la leche habituales.

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de complejos de hierro (III) caseína N-acetil-L-aspartilada que comprende las siguientes etapas, y que preferiblemente consiste en las mismas:

(a) N-acetil-L-aspartilación de caseína, preferiblemente de caseína de grado alimentario, con cloruro de ácido N-acetil-L-aspártico, preparado *in situ* mediante cloración del ácido N-acetil-L-aspártico con un reactivo de cloración tal como cloruro de tionilo. Aunque generalmente el anhídrido N-acetil aspártico es útil como reactivo de partida para la modificación de la caseína, presenta varias desventajas. Por ejemplo, es relativamente caro para uso industrial y también es inestable frente a la humedad durante el almacenamiento. Además, existe un riesgo de racemización parcial del anhídrido N-acetil aspártico (Tetrahedron: Asymmetry 18 (2007) 1625-1627). Por ello, el uso de ácido N-acetil-L-aspártico en combinación con el agente de cloración ofrece ventajas frente al uso del anhídrido N-acetil aspártico en el contexto de la presente solicitud. (b) Reacción posterior de la caseína N-acetil-L-aspartilada con cloruro férrico. La etapa (a) preferiblemente comprende proporcionar caseína disuelta.

A continuación se describen en detalle las realizaciones preferidas, en donde cada una de las fases 1 a 9 pueden usarse solas o en combinación con cualesquier otras fases para definir la presente invención, lo más preferiblemente todas las fases 1 a 9 se aplican como se describe a continuación:

Etapa (a):

En la fase 1), la disolución de caseína, preferiblemente de grado alimentario, se lleva a cabo a un pH alcalino de entre 8 y 9, preferiblemente de entre 8,4 y 8,6. La caseína se disuelve en agua.

En la fase 2) se prepara el cloruro de N-acetil-L-aspartilo *in situ* con ácido N-acetil-L-aspártico y un reactivo de cloración tal como cloruro de tionilo.

En la fase 3) se lleva a cabo la N-acetil-aspartilación mediante reacción de la caseína disuelta de la fase 1) con el cloruro de N-acetil-L-aspartilo preparado en la fase 2). La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura en el rango de 15ºC a 40ºC, tal como a temperatura ambiente (20ºC), preferiblemente se lleva a cabo a una temperatura en un rango entre 30 y 40ºC. Preferiblemente, el valor de pH se mantiene dentro del rango de pH 8-9 durante la reacción de la caseína con el cloruro de N-acetil-L-aspartilo.

El cloruro de N-acetil-L-aspartilo se prepara *in situ* (sin aislamiento alguno) y se prepara para la reacción con caseína soluble. La relación de ácido N-acetil-L-aspártico a caseína que se usa preferiblemente es 1:2.

En la fase 4) el producto N-acetil-L-aspartilado es purificado tras precipitación vía acidificación a un valor de pH de entre 2,5 y 4, preferiblemente de entre 2,5 y 3, y separado por filtración.

En la fase 5), el producto se recupera por filtración, se suspende en agua e hidróxido sódico y se somete a dilaceración a un pH de entre 6 y 11, preferiblemente 8 y 9, hasta obtener una disolución.

Etapa (b):

En la fase 6) la reacción con cloruro férrico se puede llevar a cabo añadiendo una disolución acuosa de cloruro férrico a la disolución obtenida al final de la fase 5), hasta que se obtiene un pH de entre 2,5 y 3. Se forma una suspensión, que es sometida a filtración, y se recupera la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada cruda como una fase insoluble.

Se pueden hacer reaccionar 5 g de caseína modificada con 6,2 g de una disolución de $FeCl_3$ al 26,9 % p/p.

En la fase 7), la purificación se lleva a cabo como se indica a continuación: el derivado crudo sin purificar obtenido en la fase 6) es suspendido en agua, se alcaliniza a pH 8,5 y a continuación se agita durante 30 minutos hasta la disolución del producto. El complejo purificado es clarificado mediante una filtración posterior de la disolución.

En la fase 8) la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada es precipitada a partir de la disolución clarificada de la fase 7) mediante acidificación a pH 2,5, y a continuación es filtrada y recuperada.

En la fase 9), el complejo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada es sometido a secado a una temperatura de 60ºC y 80ºC, durante un periodo de tiempo de entre 18 y 36 horas, preferiblemente de entre 20 y 24 horas.

Al final del secado, el producto contiene una humedad residual máxima de menos de un 5% y un contenido de hierro en forma de complejo de entre un 5% y un 6% en peso, calculado en base seca. Para una caracterización completa del producto, se hace referencia a los datos proporcionados en los Ejemplos 1 a 3.

El proceso descrito hace posible obtener el complejo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada libre de residuos o de derivados de hierro que sean insolubles o poco solubles en agua. En particular, se observa que el producto es completamente soluble a valores de pH alcalinos, es decir, los habituales en el tracto intestinal, garantizando de este modo una máxima biodisponibilidad del hierro para el propósito de absorción intestinal.

El producto según la presente invención puede incluirse de forma adecuada en formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral.

La presente invención comprende por tanto composiciones farmacéuticas que contienen caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada y excipientes apropiados, tales como diluyentes y conservantes farmacéuticos.

Un objetivo adicional de la invención se refiere al uso de los complejos férricos descritos anteriormente para la preparación de medicamentos para el tratamiento de afecciones patológicas originadas por una deficiencia de hierro debida, por ejemplo, a una alteración fisiológica, una hemorragia periódica, enfermedades infecciosas, embarazo, lactancia y una utilización metabólica imperfecta. Un ejemplo de dichas afecciones patológicas es la anemia, en particular la anemia sideropénica hipocrómica.

Los siguientes ejemplos experimentales se proporcionan a fin de aportar una ilustración de la presente invención, no suponiendo en modo alguno una limitación del alcance de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Preparación de complejo hierro caseína N-acetil-L-aspartilada

(A) Disolución de caseína.

En un reactor de acero inoxidable con una agitación suficiente y un detector de pH, se añaden 5 g de caseína usada con fines alimentarios o farmacéuticos a 70 g de agua desionizada microbiológicamente pura. La mezcla se mantiene con agitación hasta que se obtiene una suspensión homogénea. Se añaden aproximadamente 1,5 g de una disolución de hidróxido sódico (NaOH) al 15 % p/p, a una temperatura de 20ºC, en un periodo de 10 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de 8,5 ± 0,1. La disolución se agita durante otros 15 minutos.

(B) Preparación de cloruro de N-acetil-L-aspartilo

En un reactor de acero inoxidable con agitación suficiente se añaden 15,6 mL (15 equivalentes) de cloruro de tionilo ($SOCl_2$), 2,5 g de ácido N-acetil-L-aspártico y la mezcla se mantiene con agitación a 75ºC. La mezcla se mantiene con agitación hasta que se completa la reacción (1-1,5 h) con la formación del producto de cloruro de acilo. En esta reacción, el dióxido de azufre (SO_2) y el cloruro de hidrógeno (HCl) generados son ambos gases que pueden abandonar el recipiente de reacción, haciendo avanzar la reacción. El exceso de cloruro de tionilo es evaporado calentando la mezcla a 75 ºC, cerca del punto de ebullición (74,6 ºC) del $SOCl_2$.

(C) Acetil-aspartilación de la caseína.

La disolución obtenida en la etapa (A), de caseína disuelta, se añade gradualmente al cloruro N-acetil-L-aspártico de la etapa (B), con la adición simultánea de aproximadamente 3,1 g de NaOH al 15 % p/p, manteniendo el pH en 8,5 ± 0,1, a temperatura ambiente. La disolución obtenida se deja bajo una agitación fuerte durante 2h.

(D) Transferencia y purificación de acetil aspartato de caseína mediante precipitación.

La disolución obtenida en la etapa (C) es transferida a un reactor esmaltado provisto de un mezclador y una sonda adecuada para lectura de valores de pH. La disolución, mantenida a una temperatura de 20 ºC, es acidificada a continuación con aproximadamente 2,28 g de una disolución 6 N de HCl en un periodo de 40 minutos, hasta que se obtiene un pH de 3. Tras obtener el pH objetivo, se detiene la adición de ácido y se obtiene un precipitado. El descenso del valor de pH provoca la formación de un precipitado de caseína N-acetil-L-aspartilada depurada de otras sales, otros productos de reacción y otras impurezas solubles.

(E) Filtración y dilaceraciones.

La caseína N-acetil-L-aspartilada obtenida en la etapa (D) es recuperada por filtración. El producto húmedo es retirado del filtro, y a continuación se coloca en un reactor de acero inoxidable equipado con un mezclador de ancla y con una sonda para leer valores de pH que ha sido cargado con 70 mL de agua depurada, y a continuación es sometido a agitación. La suspensión se mantiene con agitación durante 10 minutos, a una temperatura de 20 ºC, y a continuación es sometida a dilaceración. Después de 20 minutos de dilaceración, se añaden a la suspensión aproximadamente 3,1 g de una disolución de NaOH al 15 % p/p, hasta que se obtiene un valor de pH estable de entre 8,1 y 8,4. La suspensión de caseína aspartilada se filtra, el reactor y el filtro se lavan con 50 mL de agua depurada, y el agua de lavado se añade nuevamente a la disolución clarificada.

(F) Reacción con cloruro férrico y filtración de la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada cruda.

La disolución de la etapa (E) es enviada a un reactor esmaltado equipado con un mezclador de turbina y con una sonda para lectura de valores de pH. A esta disolución homogénea se añaden 6,2 g en total de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ al 26,9% p/p (disolución de hierro), de la siguiente manera:

i) Adición de 1,7 g de disolución de hierro con adición incremental simultánea de 0,6 g de NaOH al 15 % p/p a fin de fijar el valor de pH en el rango 8,3-8,5. La disolución se deja agitando durante 15 minutos.

ii) Adición de los restantes 4,5 g de disolución de hierro hasta que el pH de la disolución se mantenga en el rango 2,8-3,0. La suspensión se mantiene con agitación durante 1 h. El pH se ajusta con una disolución de HCl 6N o con una disolución de NaOH al 15% p/p, respectivamente.

Se obtiene una suspensión de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada. El producto de reacción se mantiene en agitación durante 20 minutos, y el derivado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada cruda es recuperado mediante filtración.

(G) Disolución y filtración del complejo.

El complejo sólido es dispersado en 70 g de agua purificada y a continuación se añaden 3,85 g de una disolución de NaOH al 15 % p/p hasta un pH de 8,5 ± 0,1. La disolución se mantiene con agitación durante 30 minutos. La disolución en reposo es filtrada a fin de separar las impurezas no disueltas. El residuo insoluble es inferior al 0,5 % p/p.

(H) Precipitación y aislamiento de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada húmeda pura.

A la disolución transparente, que es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de turbina y con una sonda de lectura del valor de pH, se añaden vertiendo 2,28 g de una disolución acuosa de HCl 6 N, a una temperatura de entre 20 ºC y 25 ºC, en aproximadamente 20-30 minutos, hasta obtener un valor de pH de 2,8-3,0. Al final de la adición, el producto de reacción se mantiene en agitación durante 20 minutos, y el precipitado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada pura que se ha formado es recuperado mediante filtración y posterior lavado con agua purificada.

(I) Secado de la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada.

El producto húmedo puro obtenido en la etapa previa se seca a vacío, a una temperatura ascendente entre 60 ºC y 70 ºC, durante un periodo total de 24 horas. Tras el proceso de secado, se obtienen 6,5 g de complejo de hierro (III) de caseína N-acetil-L-aspartilada puro, con un contenido de agua < 5 % p/p (Karl Fisher), que presenta las siguientes características químicas y fisicoquímicas:

Característica del producto	Valor
Color	Marrón-rojizo
Solubilidad	Soluble en NaOH pH = 8
pH	2,8
Hierro libre (no acomplejado)	<0,05% p/p
Hierro total	5,5 % p/p
Proteínas	75,2 % p/p
Ácido N-acetil-L-aspártico acomplejado	7,1 % p/p

Característica del producto	Valor
Ácido N-acetil-L-aspártico libre	0,1 % p/p
Cloruros	1,8 % p/p
Contenido bacteriano	$<10^3$ CFU/g
Contenido de moho y levadura	$<10^2$ CFU/g

Ejemplo 2 – Preparación de complejo hierro caseína N-acetil-L-aspartilada

(A) Disolución de caseína.

En un reactor de acero inoxidable con una agitación suficiente y un detector de pH, se añaden 5 g de caseína usada con fines alimentarios o farmacéuticos a 70 g de agua desionizada microbiológicamente pura. La mezcla se mantiene con agitación hasta que se obtiene una suspensión homogénea. Se añaden aproximadamente 1,5 g de una disolución de hidróxido sódico (NaOH) al 15 % p/p, a una temperatura de 20ºC, en un periodo de 10 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de 8,5 ± 0,1. La disolución se agita durante otros 15 minutos.

(B) Preparación de cloruro de N-acetil-L-aspartilo

En un reactor de acero inoxidable con agitación suficiente se añaden 15,2 mL (15 equivalentes) de cloruro de tionilo ($SOCl_2$), una cantidad catalítica de 40 µL de dimetil formamida (DMF), 2,5 g de ácido N-acetil-L-aspártico y la mezcla se calienta a 75ºC en condiciones de reflujo. La mezcla se mantiene con agitación hasta que se completa la reacción con la formación del producto de cloruro de acilo. En esta reacción, el dióxido de azufre (SO_2) y el cloruro de hidrógeno (HCl) generados son ambos gases que pueden abandonar el recipiente de reacción, haciendo avanzar la reacción. El exceso de cloruro de tionilo es evaporado calentando la mezcla a 75 ºC, cerca del punto de ebullición (74,6 ºC) del $SOCl_2$.

(C) Acetil-aspartilación de la caseína.

La disolución obtenida en la etapa (A), de caseína disuelta, se añade al cloruro N-acetil-L-aspártico de la etapa (B), con la adición simultánea de aproximadamente 3,1 g de NaOH al 15 % p/p, manteniendo el pH en 8,5 ± 0,1, a temperatura ambiente. La disolución obtenida se deja bajo una agitación fuerte durante 2h.

(D) Transferencia y purificación de acetil aspartato de caseína mediante precipitación.

La disolución obtenida en la etapa (C) es transferida a un reactor esmaltado provisto de un mezclador y una sonda adecuada para lectura de valores de pH. La disolución, mantenida a una temperatura de 20 ºC, es acidificada a continuación con aproximadamente 2,28 g de una disolución 6 N de HCl en un periodo de 40 minutos, hasta que se obtiene un pH de 3. Tras obtener el pH objetivo, se detiene la adición de ácido y se obtiene un precipitado. El descenso del valor de pH provoca la formación de un precipitado de caseína N-acetil-L-aspartilada depurada de otras sales, otros productos de reacción y otras impurezas solubles.

(E) Filtración y dilaceraciones.

La caseína N-acetil-L-aspartilada obtenida en la etapa (D) es recuperada por filtración. El producto húmedo es retirado del filtro, y a continuación se coloca en un reactor de acero inoxidable equipado con un mezclador de ancla y con una sonda para leer valores de pH que ha sido cargado con 70 mL de agua depurada, y a continuación es sometido a agitación. La suspensión se mantiene con agitación durante 1 hora, a una temperatura de 20 ºC, y a continuación es sometida a dilaceración. Después de 20 minutos de dilaceración, se añaden a la suspensión aproximadamente 3,1 g de una disolución de NaOH al 15 % p/p, hasta que se obtiene un valor de pH estable de entre 8,1 y 8,4. Al final de la adición, el producto de reacción se vuelve a tratar otra vez en el mismo reactor, durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Esta operación facilita la disgregación de las partículas sólidas de caseína N-acetil-L-aspartilada. La suspensión de caseína aspartilada se filtra, el reactor y el filtro se lavan con 50 mL de agua depurada, y el agua de lavado se añade nuevamente a la disolución clarificada.

(F) Reacción con cloruro férrico y filtración de la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada cruda.

La disolución de la etapa (E) es enviada a un reactor esmaltado equipado con un mezclador de turbina y con una sonda para lectura de valores de pH. A esta disolución homogénea se añaden 6,2 g en total de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ al 26,9% p/p (disolución de hierro), de la siguiente manera:

i) Adición de 1,7 g de disolución de hierro con adición incremental simultánea de 0,6 g de NaOH al 15 % p/p a fin de fijar el valor de pH en el rango 8,3-8,5. La disolución se deja agitando durante 15 minutos.

ii) Adición de los restantes 4,5 g de disolución de hierro hasta que el pH de la disolución está en el rango 2,8-3,0. La suspensión se mantiene con agitación durante 1 h. El pH se ajusta con una disolución de HCl 6N o con una disolución de NaOH al 15% p/p, respectivamente.

Se obtiene una suspensión de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada. El producto de reacción se mantiene en agitación durante 20 minutos, y el derivado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada crudo es recuperado mediante filtración.

(G) Disolución y filtración del complejo.

El complejo sólido es dispersado en 70 g de agua purificada y a continuación se añaden 3,85 g de una disolución de NaOH al 15 % p/p hasta un pH de 8,5 ± 0,1. La disolución se mantiene con agitación durante 30 minutos. La disolución en reposo es filtrada a fin de separar las impurezas no disueltas. El residuo insoluble es inferior al 0,5 % p/p.

(H) Precipitación y aislamiento de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada húmeda pura.

A la disolución transparente, que es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de turbina y con una sonda de lectura del valor de pH, se añaden vertiendo 2,28 g de una disolución acuosa de HCl 6 N, a una temperatura de entre 20 ºC y 25 ºC, en aproximadamente 20-30 minutos, hasta obtener un valor de pH de 2,8-3,0. Al final de la adición, el producto de reacción se mantiene en agitación durante 20 minutos, y el precipitado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada pura que se ha formado es recuperado mediante filtración y posterior lavado con agua purificada.

(I) Secado de la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada.

El producto húmedo puro obtenido en la etapa previa se seca a vacío, a una temperatura ascendente entre 60 ºC y 70 ºC, durante un periodo total de 24 horas. Tras el proceso de secado, se obtienen 6,6 g de complejo de hierro (III) de caseína N-acetil-L-aspartilada puro, con un contenido de agua < 5 % p/p (Karl Fisher), que presenta las siguientes características químicas y fisicoquímicas:

Característica del producto	Valor
Color	Marrón-rojizo
Solubilidad	Soluble en NaOH pH = 8
pH	2,7
Hierro libre (no acomplejado)	<0,05% p/p
Hierro total	5,7 % p/p
Proteínas	84,1 % p/p
Ácido N-acetil-L-aspártico acomplejado	7,3 % p/p
Ácido N-acetil-L-aspártico libre	0,2 % p/p
Cloruros	1,6 % p/p
Contenido bacteriano	$<10^3$ CFU/g
Contenido de moho y levadura	$<10^2$ CFU/g

Ejemplo 3 – Preparación de complejo hierro caseína N-acetil-L-aspartilada

(A) Disolución de caseína.

En un reactor de acero inoxidable con una agitación suficiente y un detector de pH, se añaden 5 g de caseína usada con fines alimentarios o farmacéuticos a 70 g de agua desionizada microbiológicamente pura. La mezcla se mantiene con agitación hasta que se obtiene una suspensión homogénea. Se añaden aproximadamente 1,5 g de una disolución de hidróxido sódico (NaOH) al 15 % p/p, a una temperatura de 20ºC, en un periodo de 10 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de 8,5 ± 0,1. La disolución se agita durante otros 15 minutos.

(B) Preparación de cloruro de N-acetil-L-aspartilo

En un reactor de acero inoxidable con agitación suficiente se añaden 15,6 mL (15 equivalentes) de cloruro de tionilo ($SOCl_2$), una cantidad catalítica de 100 µL de dimetil formamida (DMF) y 2,5 g de ácido N-acetil-L-aspártico. La mezcla se mantiene en agitación a 75ºC en condiciones de reflujo hasta que se completa la reacción con la formación del producto de cloruro de acilo. En esta reacción, el dióxido de azufre (SO_2) y el cloruro de hidrógeno (HCl) generados son ambos gases que pueden abandonar el recipiente de reacción, haciendo avanzar la reacción. El exceso de cloruro de tionilo es evaporado calentando la mezcla gradualmente hasta 75 ºC, sin condensador refrigerado, cerca del punto de ebullición (74,6 ºC) del $SOCl_2$.

(C) Acetil-aspartilación de la caseína.

La disolución obtenida en la etapa (A), de caseína disuelta, se añade al cloruro N-acetil-L-aspártico de la etapa (B), con la adición simultánea de aproximadamente 3,1 g de NaOH al 15 % p/p, manteniendo el pH en 8,5 ± 0,1, a temperatura ambiente. La disolución obtenida se deja bajo una agitación fuerte durante 2h.

(D) Transferencia y purificación de acetil aspartato de caseína mediante precipitación.

La disolución obtenida en la etapa (C) es transferida a un reactor esmaltado provisto de un mezclador y una sonda adecuada para lectura de valores de pH. La disolución, mantenida a una temperatura de 20 ºC, es acidificada a continuación con aproximadamente 2,28 g de una disolución 6 N de HCl en un periodo de 40 minutos, hasta que se obtiene un pH de 3. Tras obtener el pH objetivo, se detiene la adición de ácido y se obtiene un precipitado. El descenso del valor de pH provoca la formación de un precipitado de caseína N-acetil-L-aspartilada depurada de otras sales, otros productos de reacción y otras impurezas solubles.

(E) Filtración y dilaceraciones.

La caseína N-acetil-L-aspartilada obtenida en la etapa (D) es recuperada por filtración. El producto húmedo es retirado del filtro, y a continuación se coloca en un reactor de acero inoxidable equipado con un mezclador de ancla y con una sonda para leer valores de pH que ha sido cargado con 70 mL de agua depurada, y a continuación es sometido a agitación. La suspensión se mantiene con agitación durante 1 hora, a una temperatura de 20 ºC, y a continuación es sometida a dilaceración. Después de 20 minutos de dilaceración, se añaden a la suspensión aproximadamente 3,1 g de una disolución de NaOH al 15 % p/p, hasta que se obtiene un valor de pH estable de entre 8,1 y 8,4. Al final de la adición, el producto de reacción se vuelve a tratar otra vez en el mismo reactor, durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Esta operación facilita la disgregación de las partículas sólidas de caseína N-acetil-L-aspartilada. La suspensión de caseína aspartilada se filtra, el reactor y el filtro se lavan con 50 mL de agua depurada, y el agua de lavado se añade nuevamente a la disolución clarificada.

(F) Reacción con cloruro férrico y filtración de la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada cruda.

La disolución de la etapa (E) es enviada a un reactor esmaltado equipado con un mezclador de turbina y con una sonda para lectura de valores de pH. A esta disolución homogénea se añaden 6,2 g en total de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ al 26,9% p/p (disolución de hierro), de la siguiente manera:

i) Adición de 1,7 g de disolución de hierro con adición incremental simultánea de 0,6 g de NaOH al 15 % p/p a fin de fijar el valor de pH en el rango 8,3-8,5. La disolución se deja agitando durante 15 minutos.

ii) Adición de los restantes 4,5 g de disolución de hierro hasta que el pH de la disolución está en el rango 2,8-3,0. La suspensión se mantiene con agitación durante 1 h. El pH se ajusta con una disolución de HCl 6 N o con una disolución de NaOH al 15% p/p, respectivamente.

Se obtiene una suspensión de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada. El producto de reacción se mantiene en agitación durante 20 minutos, y el derivado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada crudo es recuperado mediante filtración.

(G) Disolución y filtración del complejo.

El complejo sólido es dispersado en 70 g de agua purificada y a continuación se añaden 3,85 g de una disolución de NaOH al 15 % p/p hasta un pH de 8,5 ± 0,1. La disolución se mantiene con agitación durante 30 minutos. La disolución en reposo es filtrada a fin de separar las impurezas no disueltas. El residuo insoluble es inferior al 0,5 % p/p.

(H) Precipitación y aislamiento de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada húmeda pura.

A la disolución transparente, que es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de turbina y con una sonda de lectura del valor de pH, se añaden vertiendo 2,28 g de una disolución acuosa de HCl 6 N, a una temperatura de entre 20 ºC y 25 ºC, en aproximadamente 20-30 minutos, hasta obtener un valor de pH de 2,8-3,0. Al final de la adición, el producto de reacción se mantiene en agitación durante 20 minutos, y el precipitado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada pura que se ha formado es recuperado mediante filtración y posterior lavado con agua purificada.

(I) Secado de la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada.

El producto húmedo puro obtenido en la etapa previa se seca a vacío, a una temperatura ascendente entre 60 ºC y 70 ºC, durante un periodo total de 24 horas. Tras el proceso de secado, se obtienen 6,4 g de complejo de hierro (III) de caseína N-acetil-L-aspartilada puro, con un contenido de agua < 5 % p/p (Karl Fisher), que presenta las siguientes características químicas y fisicoquímicas:

Característica del producto	Valor
Color	Marrón-rojizo
Solubilidad	Soluble en NaOH pH = 8
pH	2,8
Hierro libre (no acomplejado)	<0,05% p/p
Hierro total	5,3 % p/p
Proteínas	88,0 % p/p
Ácido N-acetil-L-aspártico acomplejado	7,0 % p/p
Ácido N-acetil-L-aspártico libre	0,6 % p/p
Cloruros	1,8 % p/p
Contenido bacteriano	$<10^3$ CFU/g
Contenido de moho y levadura	$<10^2$ CFU/g

Bibliografía citada

1. GB910321 “Improvements in and relating to a process of preparing Ferrous Salts of Aspartic Acid and Medicines containing these Salts”.

2. Arzneimittel-Forschung, 1984; 34(9): 948-952 “Iron derivatives of modified milk protein”.

3. US4493829, 1985, “Bio-available succinylated protein-iron derivatives which do not cause gastric lesions, method of preparation and related pharmaceutical compounds”.

4. EP0243322, 1987, “Compounds containing bioavailable iron, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them”.

5. International Journal of Clinical Pharmacology, therapy, and toxicology, 1993; 31(1): 40-51 “Chemical and biological characterization of iron-protein succinylate (ITF 282)”.

6. EP0939083 “Ferro-succinylcasein complex, process for its preparation and pharmaceutical compositions containing it”.

7. US2001031748 “Use of metal complexes to treat gastrointestinal infections”.

8. Clinical Drug Investigation, 2005; 25(11): 679-689 “Overview of clinical trials in the treatment of iron deficiency with iron-acetyl-aspartylated casein”.

9. WO2006021843 “A process for producing iron succinyl casein and acetyl-aspartate iron casein complexes and use thereof in pharmaceutical mixtures”.

10. Tetrahedron: Asymmetry 18 (2007) 1625-1627.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de complejos de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada, que comprende las etapas de

(a) reacción de la caseína con cloruro de N-acetil-L-aspartilo, para formar caseína N-acetil-L-aspartilada,

(b) reacción posterior de la caseína N-acetil-L-aspartilada con cloruro férrico;

y

(c) obtención del complejo de hierro (III) con la caseína n-acetil-L-aspartilada.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la caseína utilizada es caseína de grado alimentario.

3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa (a) comprende proporcionar una disolución de caseína, y en donde la adición de cloruro de N-acetil-L-aspartilo a la disolución de caseína se lleva a cabo a un pH de entre 6 y 9.

4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el cloruro de N-acetil-L-aspartilo se prepara in situ, preferiblemente usando reactivos de cloración seleccionados del grupo que consiste en cloruro de tionilo ($SOCl_2$), pentacloruro de fósforo (PCl_5), tricloruro de fósforo (PCl_3), tetracloruro de carbono (CCl_4), cloruro de oxalilo $(COCl)_2$, cloruro de fosforilo ($POCl^3$), 2-cloro-1,3-bis(metoxicarbonil)guanidina (Palau'Chlor), cloruro cianúrico y N-clorosuccinimida.

5. El proceso de la reivindicación 1, en donde el complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada obtenido en la etapa (c) es clarificado antes de ser enviado a secado estándar o a secado por pulverización o a secado por congelación.

6. Un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende un complejo de hierro (III) con caseína de grado alimentario N-acetil-L-aspartilada, comprendiendo dicho proceso el proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y combinando dicho complejo de hierro (III) con caseína de grado alimentario N-acetil-L-aspartilada con excipientes farmacéuticos, seleccionados en particular entre diluyentes y conservantes.