

## **Un proceso para la producción de complejos de caseína N-acetil-aspartilada de hierro (III) y uso del mismo en composiciones farmacéuticas**

5 La presente invención se refiere en general a complejos de proteínas de hierro (III) y a procesos para la elaboración de los mismos. El producto obtenible de acuerdo con el método de la presente invención puede ser usado de modo seguro para la administración a la población en general o los animales en el  
10 tratamiento de la deficiencia de hierro.

### **ESTADO DEL ARTE**

La terapia con hierro es necesaria en una amplia variedad de  
15 situaciones clínicas incluyendo el embarazo, la quimioterapia, la hemorragia aguda o crónica, la hemodiálisis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la dieta inadecuada y la cirugía gastrointestinal.

20 La terapia oral con hierro es considerablemente menos costosa que la terapia alternativa parenteral con hierro, y también presenta menores riesgos de reacciones alérgicas graves. Sobre esta base, en la solicitud de patente británica No. 910321 (Olivieur Paul Gaudin) se describe un proceso mejorado  
25 para la preparación de sales ferrosas con ácido aspártico.

Estas sales podrían utilizarse como medicamentos para la deficiencia de hierro.

Cremonesi P et al, en 1984 (Arzneimittel-Forschung, 5 34(9):948-952) reportaron los primeros derivados de hierro de proteína de leche modificada. Además, se afirma que un producto que contiene una alta cantidad de hierro y que mantiene todas las características necesarias de estabilidad y solubilidad para un fármaco se puede preparar a través de la succinilación de las proteínas de la leche antes de la reacción con la sal de hierro. Para estos derivados se podría lograr una ventaja particular. El hierro, en forma de complejo oligomérico, está estrechamente unido a la proteína, no en estructuras quelatadas con residuos básicos, sino involucrando 10 varios sitios de la cadena proteica. La solubilidad del complejo de hierro es asegurado a través de la mayor disponibilidad de grupos carboxilo que sigue a la reacción de succinilación.

20 La patente de los Estados Unidos No. 4493829, del mismo período, describe derivados succinilados de proteína de hierro sin lesiones gástricas y biodisponibilidad mejorada. Las mismas modificaciones de proteínas (vegetales y animales) se describen en la patente Europea No. 0243322, a través de la 25 reacción de las proteínas con anhídridos de ácido dicarboxílico alifáticos 3 a 10, introduciendo grupos de ácido carbo-

xílico a la proteína, facilitando de ese modo la complejación del hierro .

La caracterización química y biológica del succinilato de  
5 proteína de hierro en ratas y perros es descrita por Cremone-  
si P et al. (International Journal of Clinical Pharmacology,  
therapy, and toxicology, 31(1):40-51). Los experimentos de-  
mostraron una mejor tolerabilidad gastrointestinal a un com-  
plejo de succinil caseína de hierro que contiene un 5 % de  
10 hierro.

El documento EP0939083 revela un proceso para la preparación  
de un complejo de ferro-succinilcaseína obtenido a partir de  
caseína de grado alimenticio utilizada con fines alimenti-  
15 cios.

El documento US2001031748 se refiere a la dieta de varios  
metales, hierro incluido, en combinación con la administra-  
ción de un ligando dietético tal como ascorbato, succinato,  
20 aspartato y otros ligandos. La combinación de una dieta de  
este tipo puede ayudar en el tratamiento de los síntomas gas-  
trointestinales.

Lazzari et al. reportaron (Clinical Drug Investigation, 2005;  
25 25(11):679-689) un resumen de 16 ensayos clínicos en el tra-  
tamiento de la deficiencia de hierro con caseína ferro-

acetil-aspartilada (Fe-ASP), que resultó ser un vehículo eficiente para proporcionar hierro con una alta biodisponibilidad. En ensayos clínicos abiertos, se observaron mejoras muy significativas en los parámetros clínicos y hematológicos  
5 después del tratamiento con la Fe-ASP en todas las categorías de pacientes con anemia por deficiencia de hierro (anemia ferropénica). En los ensayos clínicos controlados, los cambios en los perfiles clínicos y hematológicos observados con la Fe-ASP fueron virtualmente idénticos a los observados con  
10 el succinilato de proteína de hierro (IPS), y la Fe-ASP también se comparó bien con el gluconato de hierro parenteral. No se plantearon consideraciones de seguridad. La Fe-ASP muestra una alta eficacia en el tratamiento de la anemia ferropénica, y es un vehículo de hierro extremadamente bien  
15 tolerado. La Fe-ASP representa una alternativa válida al IPS y muestra ser una promesa como un sustituto de la terapia con hierro parenteral en determinadas situaciones clínicas.

Más recientemente, la patente WO No. 2006021843 revela un  
20 proceso para la producción de succinil caseína de hierro y complejos acetil-aspartato de caseína de hierro en los que la sustancia es poco expuesta a condiciones de pH y temperatura. El procedimiento utiliza anhídrido de acetil-aspartato. Además, este proceso no requiere el uso de bombas especiales  
25 (bombas de dilaceración).

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente solicitud describe nuevos procesos para la producción de complejos estables de caseína N-acetil-L-aspartilada de hierro (III). El proceso para la preparación  
5 de los complejos de caseína N-acetil-L-aspartilada de hierro (III), dichos complejos y las composiciones farmacéuticas que comprenden los complejos de la invención, se definen en las reivindicaciones.

10

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

15

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

El objeto de la presente invención es un nuevo proceso para la producción de derivados proteicos de hierro, a saber, un  
20 complejo férrico de caseína N-acetil-L-aspartilada (en lo sucesivo denominada "caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada" y complejo de hierro (III) con caseína N-acetil-L-aspartilada), de preferencia obtenido a partir de caseína de grado alimenticio, es decir caseína utilizada para fines alimenticios.  
25 Por el término "caseína de grado alimenticio" se entiende la caseína obtenida a partir de leche procedente de granjas de

crianza estrictamente controladas. Este producto presenta un nivel de contaminación menor a 1000 UFC/g para bacterias, y menor a 100 UFC/g para mohos, niveles de contaminación que son determinados de modo preferible como se describe en la actual Farmacopea Europea, monografías 2.6.12 para *Recuento aeróbico viable total* (Total viable aerobic count), 2.6.13 para *microorganismos especificados* (specified microorganisms) y 2.6.14 para *Endotoxinas bacterianas* (Bacterial endotoxins). El uso de caseína de grado alimenticio permite la obtención de productos particularmente puros, en comparación con complejos similares obtenidos a partir de las proteínas lácteas habituales.

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de complejos de caseína N-acetil-L-aspartilada de hierro (III) que comprende, y de modo preferible está constituido por, las siguientes etapas :

(a) La N-acetil-L-aspartilación de la caseína, de modo preferible caseína de grado alimenticio, con cloruro de ácido N-acetil-L-aspartico, preparado *in situ* por cloración del ácido N-acetil-L-aspartico con un reactivo de cloración tal como cloruro de tionilo. Aunque el anhídrido N-acetil aspártico es generalmente un material de partida útil para la modificación de la caseína, tiene varias desventajas. Por ejemplo, es relativamente caro para el uso industrial y también es inesta-

ble contra la humedad en el almacenamiento. Además existe un riesgo de racemización parcial para el anhídrido N-acetil aspártico (Tetrahedron: Asymmetry 18 (2007) 1625-1627). En el contexto de la presente solicitud, el uso de ácido N-acetil-  
5 L-aspártico en combinación con el reactivo de cloración es ventajoso con respecto al uso del anhídrido N-acetil aspártico. (B) La reacción posterior de la caseína N-acetil-L-aspartilada con cloruro férrico. La etapa (a) comprende de modo preferible proporcionar caseína disuelta.

10

Las realizaciones preferidas se describen en detalle como sigue, en donde cada una de las fases 1 a 9 puede usarse sola o en combinación con cualquier otra fase para definir la presente invención, de modo más preferible todas las fases 1 a 9  
15 se aplican como se describe a continuación:

#### Etapa (a):

En la fase 1), la disolución de la caseína, de modo preferi-  
20 ble de grado alimenticio, se realiza a un pH alcalino entre 8 y 9, de modo preferible entre 8,4 y 8,6. La caseína se disuelve en agua.

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

En la fase 3), la N-acetil-aspartilación se realiza a través de la reacción de la caseína disuelta de la fase 1) con el cloruro de N-acetil-L-aspartilo preparado en la fase 2). La  
5 reacción puede ser realizada a una temperatura en el intervalo de 15 a 40 °C, tal como a temperatura ambiente (20 °C), de modo preferible se realiza a una temperatura en el intervalo de 30 a 40 °C. De modo preferible, el valor de pH se mantiene dentro del intervalo de pH 8 a 9 durante la reacción de la  
10 caseína con el cloruro de N-acetil-L-aspartilo.

El cloruro de N-acetil-L-aspartilo se prepara in situ (sin ningún aislamiento) y se ajusta para la reacción con caseína soluble. La proporción del ácido N-acetil-L-aspartico con la  
15 caseína, que se usa de modo preferible, es 1:2.

En la fase 4), el producto N-acetil-L-aspartilado se purifica después de la precipitación a través de una acidificación a un valor de pH entre 2,5 y 4, de modo preferible entre 2,5 y  
20 3, y se separa por filtración.

En la fase 5), el producto se recupera por filtración, se suspende en agua e hidróxido de sodio y se somete a una dilaceración a un pH entre 6 y 11, de modo preferible entre 8 y  
25 9, hasta que se obtiene una solución.

Etapla (b):

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

10 5 g de caseína modificada pueden reaccionar con una solución de 6,2 g de  $\text{FeCl}_3$  al 26,9 % p/p.

En la fase 7), la purificación se realiza como sigue: el derivado crudo obtenido en la fase 6) se suspende en agua, se  
15 alcaliniza a pH 8,5 y luego se agita durante 30 minutos hasta la disolución del producto. El complejo purificado se clarifica a través de una filtración subsiguiente de la solución.

En la fase 8), la caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada se  
20 precipita a partir de la solución clarificada de la fase 7) por acidificación a pH 2,5 y luego se filtra y se recupera.

En la fase 9), el complejo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada se somete a una desecación a una temperatura de  
25 60 °C y 80 °C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 18 y 36 horas, de modo preferible entre 20 y 24 horas.

Al final de la desecación, el producto contiene un residuo de humedad máximo inferior al 5 % y un contenido de hierro complejoado entre 5 % y 6 % en peso, calculado sobre la sustancia  
5 seca. Para una caracterización completa del producto, se hace referencia a los datos proporcionados en los Ejemplos 1 a 3.

El proceso descrito permite obtener un complejo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada libre de residuos o de derivados  
10 de hierro insolubles o poco solubles en agua. En particular, se ha encontrado que el producto es completamente soluble a valores de pH alcalinos, es decir, los típicos del tracto intestinal, garantizando así la biodisponibilidad máxima del hierro con el propósito de absorción intestinal.

15

El producto de acuerdo con la presente invención se puede combinar adecuadamente en formulaciones farmacéuticas adecuadas para una administración oral.

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

25 Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de los complejos férricos descritos anteriormente para la prepara-

ción de medicamentos para el tratamiento de afecciones patológicas resultantes de la deficiencia de hierro debida a, por ejemplo, alteraciones fisiológicas, hemorragias periódicas, enfermedades infecciosas, embarazo, lactancia materna y utilización metabólica imperfecta. Un ejemplo de estas afecciones patológicas es la anemia, en particular la anemia hipocrómica sideropénica.

Con la finalidad de proporcionar una ilustración de la presente invención, que de ninguna manera limita el alcance de la misma, se dan los siguientes ejemplos experimentales.

## **EJEMPLOS**

### **15 Ejemplo 1 - Preparación del Complejo de Caseína N-acetil-L-aspartilada de Hierro**

(A) Disolución de la caseína.

20 En un reactor de acero inoxidable con un agitador suficiente y un detector de pH, se añaden 5 g de caseína usada con propósitos alimenticios o farmacéuticos en 70 g de agua microbiológicamente pura y desionizada. La mezcla es mantenida bajo agitación hasta que se obtiene una suspensión homogénea.  
25 Se añaden aproximadamente 1,5 g de una solución de hidróxido de sodio al 15 % p/p (NaOH), a una temperatura de 20 °C, en

un período de 10 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de  $8,5 \pm 0,1$ . La solución es agitada durante otros 15 minutos.

5 (B) Preparación del Cloruro de N-Acetil-L-Aspartilo.

En un reactor de acero inoxidable con un agitador suficiente, se añaden 15,6 mL (15 equivalentes) de cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ), 2,5 g de ácido N-acetil-L-aspartico, y la mezcla es  
10 mantenida bajo agitación a  $75\text{ }^\circ\text{C}$ . La mezcla es mantenida bajo agitación hasta la culminación de la reacción (1 a 1,5 h) a través de la formación del producto cloruro de acilo. En esta reacción, el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y el cloruro de hidrógeno ( $\text{HCl}$ ) generados son gases que pueden abandonar el vaso  
15 de reacción, impulsando la reacción hacia adelante. El exceso de cloruro de tionilo es evaporado a través del calentamiento de la mezcla de la reacción a  $75\text{ }^\circ\text{C}$ , cerca al punto de ebullición ( $74,6\text{ }^\circ\text{C}$ ) del  $\text{SOCl}_2$ .

20 (C) Acetil-aspartilación de la Caseína.

La solución obtenida a partir de la fase (A), de la caseína disuelta, es añadida de forma gradual al cloruro de N-acetil-L-aspartico (B), con la adición de forma simultánea de aproximadamente 3,1 g de NaOH al 15 % p/p, manteniendo el pH a  
25

8,5  $\pm$  0,1, a temperatura ambiente. La solución obtenida se deja bajo una agitación fuerte durante 2 h.

(D) Transferencia y purificación del acetyl aspartato de caseína a través de precipitación.

La solución obtenida a partir de la fase (C) es transferida a un reactor esmaltado provisto con un mezclador y una sonda apropiada para la lectura de los valores de pH. La solución, mantenida a una temperatura de 20 °C, es posteriormente acidificada con aproximadamente 2,28 g de una solución de HCl 6 N en un período de 40 minutos, hasta que se obtiene un pH de 3. Al alcanzar el pH objetivo, se detiene la adición de ácido y se obtiene un precipitado. La reducción en el valor de pH genera la formación de un precipitado de caseína N-acetyl-L-aspartilada depurada a partir de otras sales, otros productos de la reacción, y otras impurezas solubles.

(E) Filtración y dilaceraciones.

20

La caseína N-acetyl-L-aspartilada obtenida en la fase (D) es recuperada a través de una filtración. El producto húmedo es removido del filtro, y luego colocado en un reactor de acero inoxidable equipado con un mezclador de anclaje y con una sonda para la lectura de los valores de pH que ha sido cargada con 70 mL de agua depurada, y posteriormente sometido a

25

agitación. La suspensión es mantenida bajo agitación durante 10 minutos, a una temperatura de 20 °C, y luego sometida a una dilaceración. Después de 20 minutos de dilaceración, se añaden aproximadamente 3,1 g de una solución de NaOH al 15 % p/p a la suspensión, hasta que se obtiene un valor de pH estable de entre 8,1 y 8,4. La suspensión de caseína aspartilada es filtrada, el reactor y el filtro son lavados con 50 mL de agua depurada, y el agua de lavado es posteriormente añadida otra vez a la solución clarificada.

10

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

La solución de la fase (E) es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de impulsor y con una sonda para la lectura de los valores de pH. A esta solución homogénea se le añaden 6,2 g en total de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 26,9 % p/p (solución de hierro), por consiguiente:

20 i) Adición de 1,7 g de la solución de hierro con una adición gradual simultánea de 0,6 g de NaOH al 15 % p/p con la finalidad de ajustar el valor de pH entre 8,3 y 8,5. La solución es dejada en agitación durante 15 minutos.

25 ii) Adición de los restantes 4,5 g de la solución de hierro hasta que el pH de la solución se mantenga entre 2,8 y 3,0.

La suspensión es mantenida en agitación durante 1 h. El pH es ajustado con una solución de HCl 6 N o una solución de NaOH al 15 % p/p, respectivamente.

- 5 Se obtiene una suspensión de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada. El producto de la reacción es mantenido en agitación durante 20 minutos, y el derivado crudo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada es recuperado a través de una filtración.

10

(G) Disolución del complejo y filtración.

- El complejo sólido es dispersado en 70 g de agua purificada y luego se añaden 3,85 g de una solución de NaOH al 15 % p/p hasta que se obtiene un pH de  $8,5 \pm 0,1$ . La solución es mantenida en agitación durante 30 minutos. La solución restante es filtrada con la finalidad de separar las impurezas no disueltas. El residuo insoluble es menor que el 0,5 % en peso.

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

- A la solución clara, la cual es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de impulsor y con una sonda para la lectura del valor de pH, se le añaden 2,28 g de una solución acuosa de HCl 6 N por vertimiento, a una temperatura

de entre 20 °C y 25 °C, en aproximadamente 20 a 30 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de 2,8 a 3,0. Hacia el final de la adición, el producto de la reacción es mantenido en agitación por 20 minutos, y el precipitado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada pura que se ha formado es recuperado a través de una filtración y un posterior lavado con agua purificada.

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

10

El producto húmedo puro obtenido en la fase previa es secado en el vacío, a una temperatura en incremento desde 60 °C a 70 °C, por un período general de 24 horas. Después del proceso de dsecación, se obtienen 6,5 g del complejo de caseína N-acetil-L-aspartilada pura de hierro (III), con un contenido en agua < 5 % en peso (Karl Fisher), el cual tiene las siguientes características químicas y fisicoquímicas:

| Características del producto            | Valor                     |
|-----------------------------------------|---------------------------|
| Color                                   | Marrón rojizo             |
| Solubilidad                             | Soluble en NaOH pH<br>= 8 |
| pH                                      | 2,8                       |
| Hierro libre (no en complejos)          | < 0,05 % p/p              |
| Hierro total                            | 5,5 % p/p                 |
| Proteínas                               | 75,2 % p/p                |
| Acido N-acetil-L-aspartico en complejos | 7,1 % p/p                 |
| Acido N-acetil-L-aspartico libre        | 0,1 % p/p                 |
| Cloruros                                | 1,8 % p/p                 |
| Contenido bacteriano                    | < 10 <sup>3</sup> UFC/g   |
| Contenido de mohos y levaduras          | < 10 <sup>2</sup> UFC/g   |

## **Ejemplo 2 - Preparación del Complejo de Caseína N-acetil-L-aspartilada de Hierro**

5

(A) Disolución de la caseína.

En un reactor de acero inoxidable con un agitador suficiente y un detector de pH, se añaden 5 g de caseína usada con pro-  
10 pósitos alimenticios o farmacéuticos en 70 g de agua micro-

biológicamente pura y desionizada. La mezcla es mantenida bajo agitación hasta que se obtiene una suspensión homogénea. Se añaden aproximadamente 1,5 g de una solución de hidróxido de sodio al 15 % p/p (NaOH), a una temperatura de 20 °C, en  
5 un período de 10 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de  $8,5 \pm 0,1$ . La solución es agitada durante otros 15 minutos.

#### (B) Preparación del Cloruro de N-Acetil-L-Aspartilo.

10

En un reactor de acero inoxidable con un agitador suficiente, se añaden 15,2 mL (15 equivalentes) de cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ), una cantidad catalítica de 40  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida (DMF), 2,5 g de ácido N-acetil-L-aspartico, y la mezcla es  
15 calentada a 75 °C bajo condiciones de reflujo. La mezcla es mantenida bajo agitación hasta la culminación de la reacción a través de la formación del producto cloruro de acilo. En esta reacción, el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y el cloruro de hidrógeno (HCl) generados son gases que pueden abandonar el  
20 vaso de reacción, impulsando la reacción hacia adelante. El exceso de cloruro de tionilo es evaporado a través del calentamiento de la mezcla de la reacción de forma gradual hasta 75 °C, cerca al punto de ebullición (74,6 °C) del  $\text{SOCl}_2$ .

#### 25 (C) Acetil-aspartilación de la Caseína.

La solución obtenida a partir de la fase (A), de la caseína disuelta, es añadida al cloruro de N-acetil-L-aspartico de la fase (B), con la adición de forma simultánea de aproximadamente 3,1 g de NaOH al 15 % p/p, manteniendo el pH a  $8,5 \pm 0,1$ , a temperatura ambiente. La solución obtenida se deja  
5   bajo una agitación fuerte durante 2 h.

(D) Transferencia y purificación del acetil aspartato de caseína a través de precipitación.

10

La solución obtenida a partir de la fase (C) es transferida a un reactor esmaltado provisto con un mezclador y una sonda apropiada para la lectura de los valores de pH. La solución, mantenida a una temperatura de 20 °C, es posteriormente acidificada con aproximadamente 2,28 g de una solución de HCl 6  
15   N en un período de 40 minutos, hasta que se obtiene un pH de 3. Al alcanzar el pH objetivo, se detiene la adición de ácido y se obtiene un precipitado. La reducción en el valor de pH genera la formación de un precipitado de caseína N-acetil-L-aspartilada depurada a partir de otras sales, otros productos  
20   de la reacción, y otras impurezas solubles.

(E) Filtración y dilaceraciones.

25   La caseína N-acetil-L-aspartilada obtenida en la fase (D) es recuperada a través de una filtración. El producto húmedo es

removido del filtro, y luego colocado en un reactor de acero inoxidable equipado con un mezclador de anclaje y con una sonda para la lectura de los valores de pH que ha sido cargada con 70 mL de agua depurada, y posteriormente sometido a  
5 agitación. La suspensión es mantenida en agitación durante 1 hora, a una temperatura de 20 °C, y luego sometida a una dilaceración. Después de 20 minutos de dilaceración, se añaden aproximadamente 3,1 g de una solución de NaOH al 15 % p/p a la suspensión, hasta que se obtiene un valor de pH estable de  
10 entre 8,1 y 8,4. Hacia el final de la adición, el producto de la reacción es tratado una vez más en el mismo reactor, por un período de aproximadamente 2 horas. Esta operación facilita la disgregación de las partículas sólidas de caseína N-acetil-L-aspartilada. La suspensión de caseína aspartilada es  
15 filtrada, el reactor y el filtro son lavados con 50 mL de agua depurada, y el agua de lavado es posteriormente añadida otra vez a la solución clarificada.

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

La solución de la fase (E) es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de impulsor y con una sonda para la lectura de los valores de pH. A esta solución homogénea se  
25 le añaden 6,2 g en total de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 26,9 % p/p (solución de hierro), por consiguiente:

i) Adición de 1,7 g de la solución de hierro con una adición gradual simultánea de 0,6 g de NaOH al 15 % p/p con la finalidad de mantener el valor de pH entre 8,3 y 8,5. La solución  
5 es dejada en agitación durante 15 minutos.

ii) Adición de los restantes 4,5 g de la solución de hierro hasta que el pH de la solución esté entre 2,8 y 3,0. La suspensión es mantenida en agitación durante 1 h. El pH es ajustado con una solución de HCl 6 N o una solución de NaOH al 15  
10 % p/p, respectivamente.

Se obtiene una suspensión de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada. El producto de la reacción es mantenido en agitación durante 20 minutos, y el derivado crudo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada es recuperado a través de una  
15 filtración.

(G) Disolución del complejo y filtración.

20

El complejo sólido es dispersado en 70 g de agua purificada y luego se añaden 3,85 g de una solución de NaOH al 15 % p/p hasta que se obtiene un pH de  $8,5 \pm 0,1$ . La solución es mantenida en agitación durante 30 minutos. La solución restante  
25 es filtrada con la finalidad de separar las impurezas no disueltas. El residuo insoluble es menor que el 0,5 % en peso.

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

5 A la solución clara, la cual es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de impulsor y con una sonda para la lectura del valor de pH, se le añaden 2,28 g de una solución acuosa de HCl 6 N por vertimiento, a una temperatura de entre 20 °C y 25 °C, en aproximadamente 20 a 30 minutos,  
10 hasta que se obtiene un valor de pH de 2,8 a 3,0. Hacia el final de la adición, el producto de la reacción es mantenido en agitación por 20 minutos, y el precipitado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada pura que se ha formado es recuperado a través de una filtración y un posterior lavado con  
15 agua purificada.

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

El producto húmedo puro obtenido en la fase previa es secado  
20 en el vacío, a una temperatura en incremento desde 60 °C a 70 °C, por un período general de 24 horas. Después del proceso de dsecación, se obtienen 6,6 g del complejo de caseína N-acetil-L-aspartilada pura de hierro (III), con un contenido en agua < 5 % en peso (Karl Fisher), el cual tiene las si-  
25 guientes características químicas y fisicoquímicas:

| <b>Características del producto</b>     | <b>Valor</b>            |
|-----------------------------------------|-------------------------|
| Color                                   | Marrón rojizo           |
| Solubilidad                             | Soluble en NaOH pH = 8  |
| pH                                      | 2,7                     |
| Hierro libre (no en complejos)          | < 0,05 % p/p            |
| Hierro total                            | 5,7 % p/p               |
| Proteínas                               | 84,1 % p/p              |
| Acido N-acetil-L-aspartico en complejos | 7,3 % p/p               |
| Acido N-acetil-L-aspartico libre        | 0,2 % p/p               |
| Cloruros                                | 1,6 % p/p               |
| Contenido bacteriano                    | < 10 <sup>3</sup> UFC/g |
| Contenido de mohos y levaduras          | < 10 <sup>2</sup> UFC/g |

### **Ejemplo 3 - Preparación del Complejo de Caseína N-acetil-L-aspartilada de Hierro**

(A) Disolución de la caseína.

En un reactor de acero inoxidable con un agitador suficiente y un detector de pH, se añaden 5 g de caseína usada con pro-

pósitos alimenticios o farmacéuticos en 70 g de agua microbiológicamente pura y desionizada. La mezcla es mantenida bajo agitación hasta que se obtiene una suspensión homogénea. Se añaden aproximadamente 1,5 g de una solución de hidróxido de sodio al 15 % p/p (NaOH), a una temperatura de 20 °C, en un período de 10 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de  $8,5 \pm 0,1$ . La solución es agitada durante otros 15 minutos.

#### 10 (B) Preparación del Cloruro de N-Acetil-L-Aspartilo.

En un reactor de acero inoxidable con un agitador suficiente, se añaden 15,6 mL (15 equivalentes) de cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ), una cantidad catalítica de 100  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida (DMF), y 2,5 g de ácido N-acetil-L-aspartico. La mezcla es mantenida bajo agitación a 75 °C bajo condiciones de reflujo hasta la culminación de la reacción a través de la formación del producto cloruro de acilo. En esta reacción, el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y el cloruro de hidrógeno ( $\text{HCl}$ ) generados son gases que pueden abandonar el vaso de reacción, impulsando la reacción hacia adelante. El exceso de cloruro de tionilo es evaporado a través del calentamiento de la mezcla de la reacción de forma gradual hasta 75 °C, sin el condensador de enfriamiento, cerca al punto de ebullición (74,6 °C) del  $\text{SOCl}_2$ .

25

#### (C) Acetil-aspartilación de la Caseína.

La solución obtenida a partir de la fase (A), de la caseína disuelta, es añadida al cloruro de N-acetil-L-aspartico de la fase (B), con la adición de forma simultánea de aproximada-  
5 mente 3,1 g de NaOH al 15 % p/p, manteniendo el pH a  $8,5 \pm 0,1$ , a temperatura ambiente. La solución obtenida se deja bajo una agitación fuerte durante 2 h.

(D) Transferencia y purificación del acetil aspartato de ca-  
10 seína a través de precipitación.

La solución obtenida a partir de la fase (C) es transferida a un reactor esmaltado provisto con un mezclador y una sonda apropiada para la lectura de los valores de pH. La solución,  
15 mantenida a una temperatura de 20 °C, es posteriormente acidificada con aproximadamente 2,28 g de una solución de HCl 6 N en un período de 40 minutos, hasta que se obtiene un pH de 3. Al alcanzar el pH objetivo, se detiene la adición de ácido y se obtiene un precipitado. La reducción en el valor de pH  
20 genera la formación de un precipitado de caseína N-acetil-L-aspartilada depurada a partir de otras sales, otros productos de la reacción, y otras impurezas solubles.

(E) Filtración y dilaceraciones.

La caseína N-acetil-L-aspartilada obtenida en la fase (D) es recuperada a través de una filtración. El producto húmedo es removido del filtro, y luego colocado en un reactor de acero inoxidable equipado con un mezclador de anclaje y con una sonda para la lectura de los valores de pH que ha sido cargada con 70 mL de agua depurada, y posteriormente sometido a agitación. La suspensión es mantenida en agitación durante 1 hora, a una temperatura de 20 °C, y luego sometida a una dilaceración. Después de 20 minutos de dilaceración, se añaden aproximadamente 3,1 g de una solución de NaOH al 15 % p/p a la suspensión, hasta que se obtiene un valor de pH estable de entre 8,1 y 8,4. Hacia el final de la adición, el producto de la reacción es tratado una vez más en el mismo reactor, por un período de aproximadamente 2 horas. Esta operación facilita la dilaceración y posterior solubilización de las partículas sólidas de caseína N-acetil-L-aspartilada. La suspensión de caseína aspartilada es filtrada, el reactor y el filtro son lavados con 50 mL de agua depurada, y el agua de lavado es posteriormente añadida otra vez a la solución clarificada.

20

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

La solución de la fase (E) es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de impulsor y con una sonda para la lectura de los valores de pH. A esta solución homogénea se

le añaden 6,2 g en total de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 26,9 % p/p (solución de hierro), por consiguiente:

i) Adición de 1,7 g de la solución de hierro con una adición  
5 gradual simultánea de 0,6 g de NaOH al 15 % p/p con la finalidad de ajustar el valor de pH entre 8,3 y 8,5. La solución es dejada en agitación durante 15 minutos.

ii) Adición de los restantes 4,5 g de la solución de hierro  
10 hasta que el pH de la solución esté entre 2,8 y 3,0. La suspensión es mantenida en agitación durante 1 h. El pH es ajustado con una solución de HCl 6 N o una solución de NaOH al 15 % p/p, respectivamente.

15 Se obtiene una suspensión de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada. El producto de la reacción es mantenido en agitación durante 20 minutos, y el derivado crudo de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada es recuperado a través de una filtración.

20

(G) Disolución del complejo y filtración.

El complejo sólido es dispersado en 70 g de agua purificada y luego se añaden 3,85 g de una solución de NaOH al 15 % p/p  
25 hasta que se obtiene un pH de  $8,5 \pm 0,1$ . La solución es mantenida en agitación durante 30 minutos. La solución restante

es filtrada con la finalidad de separar las impurezas no disueltas. El residuo insoluble es menor que el 0,5 % en peso.

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

A la solución clara, la cual es colocada en un reactor esmaltado equipado con un mezclador de impulsor y con una sonda para la lectura del valor de pH, se le añaden 2,28 g de una solución acuosa de HCl 6 N por vertimiento, a una temperatura de entre 20 °C y 25 °C, en aproximadamente 20 a 30 minutos, hasta que se obtiene un valor de pH de 2,8 a 3,0. Hacia el final de la adición, el producto de la reacción es mantenido en agitación por 20 minutos, y el precipitado de caseína ferro-N-acetil-L-aspartilada pura que se ha formado es recuperado a través de una filtración y un posterior lavado con agua purificada.

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

20

El producto húmedo puro obtenido en la fase previa es secado en el vacío, a una temperatura en incremento desde 60 °C a 70 °C, por un período general de 24 horas. Después del proceso de dsecación, se obtienen 6,4 g del complejo de caseína N-acetil-L-aspartilada pura de hierro (III), con un contenido

25

en agua < 5 % en peso (Karl Fisher), el cual tiene las siguientes características químicas y fisicoquímicas:

| <b>Características del producto</b>     | <b>Valor</b>            |
|-----------------------------------------|-------------------------|
| Color                                   | Marrón rojizo           |
| Solubilidad                             | Soluble en NaOH pH = 8  |
| pH                                      | 2,8                     |
| Hierro libre (no en complejos)          | < 0,05 % p/p            |
| Hierro total                            | 5,3 % p/p               |
| Proteínas                               | 88,0 % p/p              |
| Ácido N-acetil-L-aspartico en complejos | 7,0 % p/p               |
| Ácido N-acetil-L-aspartico libre        | 0,6 % p/p               |
| Cloruros                                | 1,8 % p/p               |
| Contenido bacteriano                    | < 10 <sup>3</sup> UFC/g |
| Contenido de mohos y levaduras          | < 10 <sup>2</sup> UFC/g |

## Literatura citada

1. GB910321 "Improvements in and relating to a process of preparing Ferrous Salts of Aspartic Acid and Medicines containing these Salts".  
5
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".  
10
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  
15 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  
20 testinal 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. W02006021843 "A process for producing iron succinyl casein and acetyl-aspartate iron casein complexes and use  
25 thereof in pharmaceutical mixtures".

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