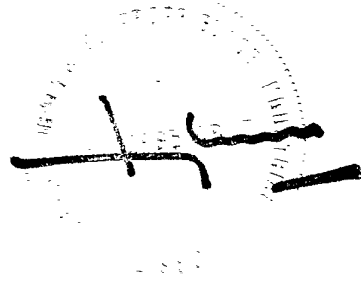


95.904



ITALFARMACO S.p.A.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE FERRO BIODISPONÍVEL-
-ALBUMINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

=====

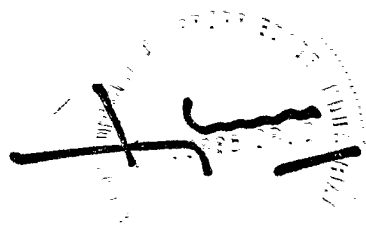
MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de derivados de ferro-albumina constituídos por albuminas aciladas com resíduos de ácido dicarboxílico e que contêm elevadas quantidades de ferro, insolúveis no meio de pH ácido do estômago e altamente solúveis no meio de pH intestinal.

Estes derivados são caracterizados por uma gastrolesividade e toxicidade muito baixas e por uma biodisponibilidade e eficácia terapêutica notáveis no tratamento de condições anêmicas.

O referido processo consiste na acilação das referidas albuminas com resíduos de ácidos dicarboxílicos, seguido de reacção das albuminas aciladas obtidas, de preferência em meio aquoso, com íões ferro.



O presente invento refere-se a albuminas aciladas com resíduos de ácido dicarboxílico, que contêm ferro numa forma biodisponível.

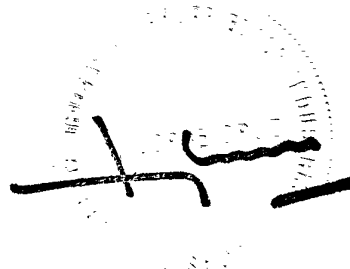
A utilização de complexos de ferro com proteínas para a terapia marcial oral é conhecida: ver, por exemplo, a Patente Italiana Nº 1 150 213, que revela um adutor de ferro que compreende proteínas succiniladas, que é obtido pela reacção de sais férricos com proteínas de suporte de origem animal, tais como proteínas provenientes do leite, órgãos ou soro, ou de origem vegetal.

Contudo, uma vez que as referidas proteínas têm uma composição variável, os compostos de composição constante são de difícil obtenção.

Além disso, mesmo apesar de poderem ser obtidos complexos de elevado conteúdo de ferro (até 20 %), a elevada quantidade de ferro nestes derivados também envolve um aumento da viscosidade da solução.

De facto, o derivado succinilado de proteína de ferro, (obtido de acordo com a Patente Italiana Nº 1 150 213) que é utilizado para a formulação farmacêutica apropriada e está hoje em dia disponível comercialmente, contém 5 % de ferro numa base ponderal. A possibilidade de se obterem derivados que dêem soluções de baixa viscosidade, mesmo quando quantidades bem mais elevadas do que 5 % de ferro numa base ponderal são suportadas por proteínas succiniladas, representaria um melhoramento notável na preparação de derivados para utilização medicinal.

Contudo, o aspecto mais importante a ser melhorado para esta classe de agentes terapêuticos consiste indubitavelmente na



redução ou completa remoção dos efeitos gastrolesivos e diarreicos relacionados com o princípio terapêutico.

Foi agora verificado, e é o objectivo do presente invento, que utilizando albumina como a proteína para a obtenção dos referidos compostos acilados, se obtêm compostos de ferro biodisponíveis que são altamente solúveis, mesmo quando contêm elevadas quantidades de ferro, que estão substancialmente isentos de toxicidade e que mostram efeitos laterais gastrolesivos e diarreicos reduzidos. As vantagens referidas, que são características destes medicamentos, podem ser relacionadas com uma solubilidade pobre dos derivados de ferro, ou com a precipitação ao nível do intestino, ou com a criação de radicais hidroxil que derivam da libertação do ferro na forma iónica.

Podem ser utilizadas diferentes albuminas na preparação dos compostos do presente invento, sendo particularmente preferidas a albumina do soro bovino e a lactalbumina altamente puras.

De acordo com o presente invento, as albuminas são aciladas com resíduos de ácido dicarboxílico tais como, por exemplo, as que derivam dos ácidos succínico, glutárico, maleico, málico, malónico, aspártico, glutâmico e semelhantes. É particularmente preferido o resíduo de ácido succínico, que prova ser o mais adequado para o melhoramento de algumas características da proteína, tais como a solubilidade e a degradabilidade por proteases.

Mais particularmente, o presente invento refere-se a compostos que compreendem ferro e albumina de soro bovino succinilado, que comportam quantidades de ferro desde 3 até 10 % numa base ponderal, assim como compostos que compreendem ferro e lactalbumina succinilada, que comportam quantidades de ferro até

20 % numa base ponderal, sendo ambos estes compostos altamente solúveis.

Os referidos compostos podem ser obtidos em meio aquoso pela reacção das albuminas succiniladas ou aciladas anteriormente mencionadas com iões ferro, a um pH que se situa numa gama desde 2 até 12, preferivelmente desde 3 até 7.

O presente invento será descrito com maior detalhe nos seguintes exemplos não limitantes.

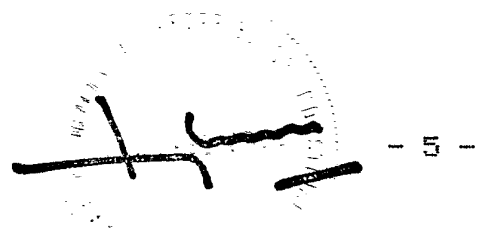
Os compostos descritos nos exemplos serão denominados da maneira que se segue:

Compostos dos Exemplos 1-3: Ferrossuccinilalbumina.
Compostos dos Exemplos 4-5: Ferrossuccinil-lactalbumina.
Compostos do Exemplo 6: Ferroaspartilalbumina.
Compostos do Exemplo 7: Ferromaleilalbumina.
Compostos do Exemplo 8: Ferroglutarilalbumina.

Exemplo 1

Preparação de Ferrossuccinilalbumina com 6 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

São dissolvidos 20 g de albumina de soro bovino em 400 ml de água. O pH é ajustado até 8,0 pela adição da NaOH. São adicionados em pequenas porções, sob agitação, 24 g de anidrido succínico, mantendo-se o pH desde 7,5 até 8 pela adição de NaOH 2 N e mantendo-se uma temperatura constante abaixo dos 25 °C, preferivelmente a 20 °C. Deixa-se reagir a mistura durante uma hora e, em seguida, baixa-se o pH para $3 \pm 0,5$ por



meio de HCl 2 N. Forma-se um precipitado branco que é recolhido por centrifugação.

O excesso de ácido succínico formado é removido por dissolução do precipitado em 400 ml de água a pH = 8, ajustando-se o pH da solução para $3 \pm 0,5$ por meio de HCl 2 N. Forma-se um precipitado branco que é recuperado por centrifugação. Este processo é repetido até o ácido succínico ser completamente removido. O precipitado final obtido é dissolvido em 400 ml de água, com adição de NaOH 2 N até pH = 8. São rapidamente adicionados sob agitação 7,20 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, equivalente a 1,48 g de Fe. Forma-se instantaneamente um precipitado vermelho acastanhado que é lavado com HCl 0,001 N, recuperado por filtração (ou centrifugação) e seco sob vácuo.

Obtém-se um pó vermelho acastanhado (19 g) que é insolúvel em água e se torna solúvel ajustando para um pH neutro, por adição de NaOH 2 N. O composto mostra à análise um conteúdo de ferro de 6,1-6,2 % numa base ponderal. Por electroforese sobre acetato de celulose (como se encontra descrito no item 4 abaixo) o composto move-se como uma mancha unitária, na qual se pode determinar o ferro.

Exemplo 2

Preparação de Ferrossuccinilalbumina com 3,8-4,1 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

O composto é preparado como se descreveu no Exemplo 1, mas adicionando 4,8 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (equivalente a 0,922 g de Fe).

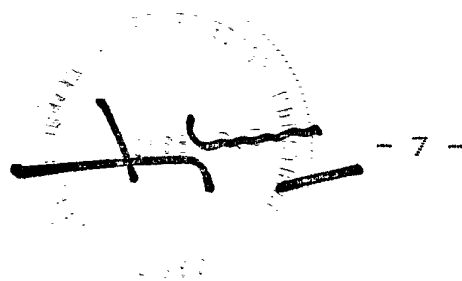
O composto, movendo-se sob o campo electroforético como uma mancha unitária na qual o ferro pode ser determinado, mostra um conteúdo de ferro de 3,8-4,1 % numa base ponderal.

Exemplo 3

Preparação de Ferrossuccinilalbumina com 9,5-10 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

São colocados num reactor 20 l de água desmineralizada e 1 kg de albumina de soro bovino, obtendo-se uma solução de pH = 6,7-6,8. Uma solução de NaOH 5 N é aí lentamente gotejada até pH = 7,5 e, em seguida, é adicionado 1,2 kg de anidrido succínico em pequenas porções, mantendo o pH desde 7,2 até 7,5 por adição de NaOH 5 N. No termo da adição, o pH é mantido a 7,5 durante 30 min e, em seguida, a solução é acidificada até pH = 3 com HCl 6 N, sob agitação. O precipitado que se obtém é centrifugado, completamente lavado com água desmineralizada e redissolvido em 20 ml de água desmineralizada com NaOH 5 N até pH = 7,5, para se obter uma solução límpida em 30 min. O processo de precipitação a pH ácido e o processo de dissolução a pH básico são repetidos duas vezes.

Em seguida, é lentamente adicionada à solução anterior uma solução de 578,5 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 l de água desmineralizada mantendo-se o pH desde 6,5 até 6,8 por adição de NaOH 5 N. Em seguida, a mistura é agitada a pH = 6,6-6,8 durante 30 min, acidificada até pH = 3 com HCl 6 N e deixada sob agitação durante 30 min. O precipitado é centrifugado e completamente lavado com água desmineralizada ajustando-se o pH para 8,5 com NaOH 5 N. Depois de ter sido mantida a pH de 8,5 durante cerca de uma hora, a solução obtida é filtrada através de Celite (300 g).



O processo de precipitação a pH ácido e o processo de dissolução a pH básico são repetidos por uma vez. A solução é filtrada sobre Celite (200 g), o produto é precipitado a pH = 3 com HCl 6 N, agita-se durante 30 min e, em seguida, é centrifugada e completamente lavada com água desmineralizada. O sólido castanho escuro é passado por um crivo e seco sob vácuo a 30 °C, para se obter 1 kg de ferrossuccinilalbumina.

O composto mencionado em título está preparado.

Exemplo 4

Preparação de Ferrossuccinil- α -lactalbumina com 11-11,45 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

É colocado num reactor 1 kg de albumina dissolvido em 20 ml de água desmineralizada. A solução que se obtém tem um pH entre 6,7 e 6,8. A proteína é succinilada e purificada a partir do ácido succínico como se descreveu no exemplo precedente. A solução da proteína succinilada é adicionado 1,2 kg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 l de água, mantendo o pH desde 6,5 até 6,9 por adição de NaOH 5 N. A reacção é levada a cabo como se descreveu no exemplo anterior para se obter, no fim da reacção, 1 kg do composto mencionado em título.

Exemplo 5

Preparação de Ferrossuccinil- α -lactalbumina com 18,3-18,55 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

É colocado num reactor 1 kg de α -lactalbumina dissolvido em 20 ml de água desmineralizada, para se obter uma solução com um pH entre 6,7 e 6,8. A proteína é succinilada e purificada como se descreveu no Exemplo 3. A solução da proteína

succinilada é adicionado 2,4 kg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 l de água, mantendo o pH desde 6,5 até 6,9 por adição de NaOH 5 N. A reacção é levada a cabo como se descreveu no Exemplo 3, para se obter 1 kg do composto mencionado em título.

Exemplo 6

Preparação de Ferroaspartilalbumina com 7,5 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

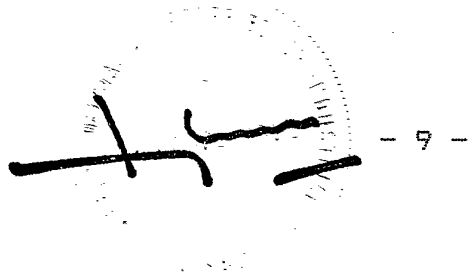
São dissolvidos 10 g de albumina de soro bovino em 200 ml de água e o pH é ajustado para 7,2 por adição da NaOH. São adicionados em pequenas porções, sob agitação, 10 g de anidrido acetilaspártico, mantendo-se o pH desde 7,2 até 7,3 pela adição de NaOH 2 N. A solução é ultrafiltrada, mantendo-se o volume constante por adição contínua e operando-se com uma membrana de ultrafiltração com 10 000 dalton de separação, durante 3 horas, de maneira a remover-se o ácido aspártico que passa através da membrana. A solução que contém a albumina aspartilada é recuperada do ultrafiltro. São adicionados 7,0 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: forma-se um precipitado vermelho acastanhado que é lavado com água a pH = 3, redissolvido ajustando-se o pH para 7,1 e seco por congelação.

Obtêm-se 9,5 g do composto mencionado em título.

Exemplo 7

Preparação de Ferromaleilalbumina com 6,5 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

O composto de ferro é preparado como se descreveu no Exemplo 6, mas utilizando-se anidrido maleico como agente de acetilação.



O composto mencionado em título está preparado.

Exemplo 8

Preparação de Ferromglutarilalbumina com 7,0 % de conteúdo de Fe numa base ponderal

O composto de ferro é preparado como se descreveu no Exemplo 6, mas utilizando-se anidrido glutárico como agente de acetilação.

O composto mencionado em título está preparado.

Os complexos de proteína preparados nos Exemplos anteriores foram analisados de acordo com as metodologias analíticas descritas a seguir.

1) Determinação do conteúdo de ferro

Em todos os compostos preparados de acordo com os Exemplos 1-8 o conteúdo de ferro foi determinado por extracção do ferro da amostra com HCl 2 N; a determinação quantitativa foi levada a cabo de acordo com o método descrito em Standard Methods, 14ª ed., 1975, pág. 208, APHA, AWWA, WPCF (reação com o-fenantrolina).

No composto referido, o ferro está presente no estado trivalente, como ficou evidenciado visto que nenhuns iões Fe podem ser determinados quando a reacção da o-fenantrolina é levada a cabo na ausência de agentes de redução.

2) Solubilidade como função do pH

Todos os compostos preparados de acordo com os Exemplos

anteriores são insolúveis em pH ácido e solúveis em pH básico.

O perfil de solubilidade da ferrossuccinilalbumina, preparada de acordo com o método descrito no Exemplo 3, é relatado a título de exemplo.

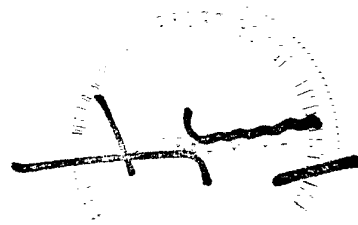
O perfil de solubilidade é conseguido a partir de medidas espectrofotométricas da diferença de absorvência a 500 nm e 280 nm de soluções obtidas pelo tratamento de 20 mg de ferrossuccinilalbumina com 50 ml de água, num pH que se situa numa gama desde 2,0 até 7,0. São diluídos 5 ml da amostra até 10 ml com água, centrifugados a 3000 rpm e o sobrenadante é lido no espectrofotómetro.

A ferrossuccinilalbumina é completamente solúvel a valores de pH iguais ou superiores a 6,5, ao passo que é insolúvel a pH abaixo de 6. A curva de precipitação invertida, que se obtém por acidificação da solução de ferrossuccinilalbumina (20 mg do composto em água a pH = 7), mostra que a precipitação se inicia a pH = 4,5.

3) Determinação do conteúdo de proteína

A quantidade de proteína nas amostras, preparadas de acordo com os Exemplo 1-8, foi determinada por titulação do azoto da proteína (utilizando o método descrito em Italian Official Pharmacopoeia, IX ed., vol. I, pág. 191-192).

Os valores encontrados situam-se numa gama desde um máximo de 85 % (no composto do Exemplo 3) até um mínimo de 65 % (no composto do Exemplo 5).



4) Electroforese sobre acetato de celulose

A electroforese foi levada a cabo durante 20 min a 40 V/cm, utilizando tampão de Tris-tricina 0,05 M, pH = 8,6, que detecta bandas à mesma distância electroforética para os compostos do invento e para as respectivas proteínas aciladas. Não puderam ser evidenciadas nenhuma bandas que pudessem ser atribuídas às albuminas de partida. A presença de ferro nas bandas dos compostos do invento pode ser detectada por meio da o-fenantrolina.

A título de exemplo, no caso de determinações levadas a cabo nos compostos dos Exemplos 1-3, a distância da mancha desde a origem é 37 mm.

5) Análise espectroscópica UV-VIS (Shimadzu UV-160)

O espectro UV-VIS na gama 200-600 nm, registado em soluções aquosas a pH = 7 que contém 1 mg/l dos compostos do invento evidencia um aumento de absorvência desde 600 até 340 nm.

6) Espectro de emissão de fluorescência

(Aparelho: espectrofluorómetro Kontron SFM25)

Os espectros de emissão de fluorescência em 400 nm e 200 nm (excitação em 236 nm) mostram uma emissão pobre, igual a cerca de 1/10 da da proteína de partida.

7) Espectroscopia ESR

Os espectros foram registados não só à temperatura ambiente mas também a -160 °C com um espectrómetro Varian E1D, e eles são caracterizados por um único pico de largura 1200 G entre

a inclinação máxima e mínima com um valor de $g = 2,00$. Estes sinais podem ser atribuídos a complexos polinucleares (neste caso complexos Fe^{3+}) caracterizados por fortes interações de permuta.

Não puderam ser evidenciados nenhuns outros sinais que pudessem ser atribuídos à presença de ferro na forma mononuclear.

8) Electroforese sobre sulfato de dodecilo e sódio (SDS)

A electroforese foi levada a cabo sobre gel de poliacrilamida a 7,5 % que continha 1 % numa base ponderal de SDS.

As bandas electroforéticas foram evidenciadas com Comassie Brilliant Blue. Foram utilizados os seguintes produtos como padrões de peso molecular: miosina (200 kd), β -galactosidase (116 kd), fosforilase b (97 kd), albumina bovina (68 kd), albumina do ovo (42 kd). Em determinações representativas, a ferrossuccinilalbumina mostrou uma banda isolada que corresponde ao peso molecular de 100 kd. Um comportamento electroforético semelhante foi mostrado pela ferrossuccinil- α -lactalbumina, mas o seu peso molecular é de 20 kd.

9) Determinação do grau de acilação e localização da acilação

O grau de acilação foi determinado não só espectrofotometricamente, de acordo com a reacção dos grupos amino livres da proteína com ninidrina, mas também por reacção fluorométrica com α -ftalaldeído (G. Goodno et al., Anal. Biochem., 115, 203, 1981). Ambos estes métodos foram utilizados para avaliar a localização da acilação na fracção da proteína que constitui os compostos preparados.

Os resultados obtidos provam que os grupos α -amino terminais e os grupos α -amino lisina são acilados em mais de 95 %.

Foram determinados os parâmetros adicionais seguintes para a ferrossuccinilalbumina, preparada como se descreveu no Exemplo 3.

10) Conteúdo de ácido succínico

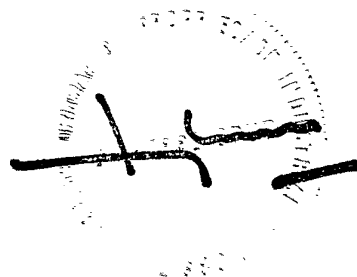
É de 7-13 %: foi determinado por GLC (Perkin Elmer 3B, coluna de 3 m x 2 mm GP 10 % SP 1200 H_3PO_4 sobre Chromosorb[®]) após hidrólise de uma quantidade conhecida de uma amostra com NaOH 2,5 N, a 100 °C, durante 5 horas, e subsequente acidificação até pH 2-3 com HCl 6 N. O ácido succínico libertado é quantitativamente transformado no succinato de metilo correspondente com BF_3/CH_3OH .

O succinato de metilo é determinado sob as seguintes condições, utilizando glutarato de metilo como padrão interno:

Azoto:	30 ml/min
Ar:	3 atm
Hidrogénio:	1,5 atm
Temperatura:	injector 255 °C
	coluna 140 °C
	detector F.I.D. 275 °C
Injecções:	5 μ l

11) Dicroísmo circular (aparelho JASCO 500C)

Os resultados, registados numa gama desde 300 até



200 nm em soluções de ferrossuccinilalbumina a pH = 7, em comparação com a albumina de partida, evidenciam que a reação de succinilação envolve a estrutura desordenada da proteína. A Figura 1 mostra o espectro de dicroísmo da albumina do soro bovino do composto acilado correspondente e do composto do Exemplo 3.

12a) Espectro de RMN-¹H (300 MHz; D₂O; aparelho Varian JASCO 500C)

O espectro mostra bandas largas e um sinal fraco em 2,4 ppm, sinal esse que está também presente no espectro da albumina succinilada correspondente, mas com uma mais nítida e definida configuração. O espectro é mostrado na Figura 2.

12b) Espectro de RMN-¹³C (aparelho Varian XL300)

O espectro mostra sinais em 15-70 ppm (CH alifático), 110-140 ppm (aromático) e 180 ppm (carboxílico). A pobre resolução e intensidade dos sinais em 29-32 ppm (resíduo hemissuccinil) devido à presença do ferro, sugere uma possível implicação dos grupos succinilo na ligação com ferro. O espectro é mostrado na Figura 3.

13) Espectro de raios X (aparelho: Difractômetro Siemens 500D)

O espectro no intervalo angular 2θ desde 9° até 51° não evidencia picos que possam ser atribuídos à presença de centros cristalinos, indicando por conseguinte a natureza amorfa do composto.

14) Determinações do peso molecular

Por meio de filtração gel sobre colunas Superose 6R^R obtém-se um perfil não gaussiano de peso molecular com um pico principal $> 10^6$ dalton e um patamar muito largo até 10^4 dalton.

Utilizando a técnica de Dispersão de Luz Laser com uma fonte de He-Na de 6328 angstrom, potência de saída de 25 mW, foi determinado um peso molecular de $17,5 \pm 2,5$ Mill#12.

15) Análise de aminoácido

A análise foi levada a cabo após a descomplexação do ferro que pode interferir na análise, sujeitando uma amostra a hidrólise ácida total com HCl 6 N a 105 °C durante 24 horas e determinando a composição de aminoácido com um analisador automático (Liquimat + III kontron) utilizando tampões de Na como eluentes.

O perfil de aminoácido é mostrado no Quadro 1.

QUADRO 1

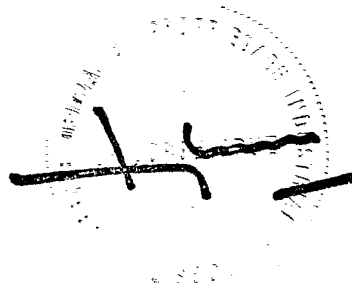
Composição em aminoácido (% de aminoácido por mole)

Acido aspártico	9,1	Valina	6,8
Treonina	5,4	Metionina	0,6
Serina	4,3	Isoleucina	2,4
Acido glutâmico	13,9	Leucina	10,5
Prolina	6,0	Tirosina	3,1
Glicina	3,2	Fenilalanina	4,3
Alanina	7,9	Lisina	9,3
1/2 Cisteína	5,0	Histidina	2,8
		Arginina	4,2

16) Proteólise

A hidrólise da enzima foi levada a cabo tratando 25 mg dissolvidos em 5 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH = 7,6, com quimotripsina (50 µg) e tripsina (50 µg). É drenado da mistura de reacção 1 ml, a intervalos de tempo definidos; são adicionados 2 ml de ácido tricloroacético (TCA). A mistura é centrifugada a 3000 rpm durante 110 min e o sobrenadante é lido espectrofotometricamente em 280 nm contra um branco de TCA.

A troca de absorvência como uma função do tempo representa a taxa de hidrólise, que mostra ser comparável à da albumina correspondente utilizada na preparação do composto, para evidenciar que o ferro presente no composto não deve inibir a acção das enzimas proteolíticas.



17) Imobilização do ferro

A imobilização do ferro é testada pela reação com desferrioxamina, que é controlada como função do tempo medindo o aumento de absorvência, em 487 nm, de uma solução que contém 7,0 µl de desferrioxamina, 500 µg de ferrossuccinilalbumina previamente neutralizada a pH = 7,4 em tampão Tris-HCl 20 mM.

O aumento de absorvência em 487 nm ao longo do tempo confirma que o ferro pode ser mobilizado a partir da ferrossuccinilalbumina. A taxa de libertação é de 2,2 A para 5 min.

18) Imobilização do ferro

Dissolve-se ferrossuccinilalbumina em água a pH = 7,2 em concentrações de 0,1, 1,2, 4,8 e 10 % numa base ponderal. As viscosidades das soluções obtidas são analisadas com um viscosímetro capilar ou um viscosímetro Brookfield. As soluções preparadas com ferroproteínossuccinilato (uma amostra a 5 % obtida como se encontra descrito na Patente Italiana Nº 1 150 213) são analisadas por comparação e às mesmas concentrações.

A viscosidade das amostras de ferrossuccinilalbumina, em todas as concentrações testadas, é notoriamente inferior à do ferroproteínossuccinilato.

19) Produção do radical hidroxi

Foi investigada, de acordo com B. Halliwell, J. Gutteridge, O. Aruoma, Anal. Biochem., 165, 215-219 (1987), a capacidade dos compostos de ferro do presente invento de

produzirem radicais OH . São utilizados como controles FeCl₃ e FeSO₄, que são conhecidos como capazes de gerar radicais OH.

São apresentados resultados representativos no Quadro 2.

QUADRO 2
Degradaco da desoxirribose a pH = 4,0

Fe [20 µM]	Ascorbato [100 µM]	em 532 nm
FeCl ₃	-	0,156
FeSO ₄	-	1,044
Ferrossuccinilalbumina	-	0,069
FeCl ₃	+	0,625
FeSO ₄	+	1,59
Ferrossuccinilalbumina	+	0,45

Na ausência de ascorbato, a formao de radicais livres é significativa com o FeSO₄ e, numa menor extensão, com o FeCl₃.

A produo de radicais livres que derivam da ferrossuccinilalbumina, na presença de ascorbato, é significativamente inferior à do FeSO₄.

20) Produo de radicais livres em fluidos biológicos

Foi utilizado o teste de bleomicina (Life Chemistry

Report, 1987, vol. 4, pág. 113-142 - J. Gutteridge, B. Halliwell) para a determinação de radicais livres, devido à presença de ferro livre, em fluidos biológicos.

São tratados intraperitonealmente grupos de ratas com ferrossuccinilalbumina e ferroproteinossuccinilato (preparado de acordo com a Patente Italiana Nº 1 150 213) (em quantidades correspondentes a 100 mg de ferro/kg) e com sulfato ferroso (em quantidades correspondentes a 25 mg de ferro/kg).

São recolhidas amostras de plasma após 2, 8 e 15 horas e é determinada a presença de ferro com o teste de bleomicina (ver Quadro 3).

QUADRO 3
Determinação de ferro livre no plasma

Produto	Fe [μ M]		
	2 h	8 h	15 h
Sulfato de Fe ⁺⁺	4,1	2,6	n.d.
	5,2	0,7	"
	6,2	n.d.	"
	4,6	0,7	"
Ferroproteínos-succinilato	5,2	1,5	n.d.
	4,8	n.d.	"
	4,1	0,9	"
	3,8	n.d.	"
Ferrossuccinil-albumina	n.d.	n.d.	n.d.
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
Controlos	n.d.	n.d.	n.d.
	"	"	"

A ferrossuccinilalbumina, ao contrário do sulfato ferroso e do ferroproteínossuccinilato, não induz ferro livre no plasma, proporcionando por conseguinte a ausência dos efeitos nocivos induzidos pelos radicais livres que derivam do ferro.

Estudo de toxicidade

Nos testes para a tolerância gastrointestinal, os animais foram tratados oralmente com ferrossuccinilalbumina (uma amostra preparada de acordo com o Exemplo 3, amostra essa que era significativa devido ao seu elevado conteúdo de ferro e, por conseguinte, sendo potencialmente mais tóxica) ou com sulfato ferroso em níveis de dose de 200 mg/kg. Os animais foram mortos em instantes diferentes, até às 24 horas. O exame do estômago e do intestino mostrou que as lesões gástricas e intestinais eram significativamente menos marcadas após a administração da ferrossuccinilalbumina do que do sulfato ferroso.

A toxicidade aguda da amostra foi comparada com a do sulfato ferroso e os resultados são relatados no Quadro 4.

A ferrossuccinilalbumina prova ser muito menos tóxica do que o sulfato ferroso e não deve induzir sintomas de toxicidade até 2000 mg/kg.

A toxicidade subaguda com doses repetidas por via oral foi testada com doses de 100, 250 e 600 mg/kg/dia do derivado (equivalente a 1, 2, 5 e 6 vezes o tratamento com 10 mg/kg/dia de ferro). Não foram tornados evidentes sinais de toxicidade durante o tratamento.

Testes em cães com doses de 100, 300 e 1000 mg/kg/dia (1, 3 e 10 vezes a dosagem terapêutica) também não evidenciaram sinais de toxicidade. O aumento de peso corporal, o apetite pela alimentação, as condições oftálmicas, assim como os dados das análises electrocardiográficas, hematológicas, bioquímicas e à urina não diferem dos dos controles.

No teste de Ames, o derivado foi testado utilizando 5 estirpes bacterianas (Salmonella Typhimurium Th 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 e TA 100), pelo tratamento na ausência e na presença de activação metabólica (pela fracção do fígado 89). Não foi evidenciada nenhuma actividade mutagénica.

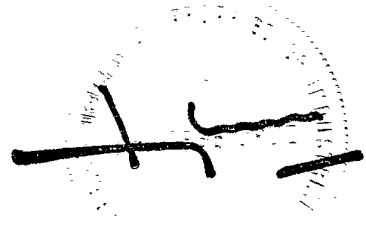
Os estudos de toxicidade provam que a ferrossuccinilalbumina é tolerada no tracto intestinal, tem uma baixa toxicidade aguda e não é mutagénica, em comparação com o sulfato ferroso, que causa ulcerações gástricas, é mais tóxico após uma administração única e tem propriedades mutagénicas.

QUADRO 4

Produto	Via de administração	LD50
Ferrossuccinilalbumina	i.p.	>2000 mg/kg
Sulfato ferroso	i.p.	250 mg/kg
Ferrossuccinilalbumina	o.s.	>2000 mg/kg
Sulfato ferroso	o.s.	1622 mg/kg

Testes farmacológicos

De modo a caracterizar farmacologicamente a ferrossuccinilalbumina, foram avaliados os seguintes parâmetros: libertação de ferro a nível gástrico, absorção e cinética do ferro e efeito antianémico após um tratamento prolongado, utilizando sulfato ferroso como controlo (em animais com anemia induzida experimentalmente). A ferrossuccinilalbumina utilizada para estes testes é a preparada no Exemplo 3.



A. Libertação de ferro no estômago

Ratazanas macho Wistar (Charles River-Calco), em jejum durante 24 horas, foram tratadas oralmente com 2 mg de equivalentes de Fe/kg em sulfato ferroso ou ferrossuccinilalbumina.

10, 20 e 30 minutos depois do tratamento, os animais são mortos, o estômago é retirado e o ferro livre no suco gástrico é doseado com o estojo de Fe ("Fe kit") (Wako).

Os resultados que se relatam no Quadro 5 (que se referem a uma amostra que contém 9,5 % de ferro, mas que é representativa de todos os outros compostos) mostram que a ferrossuccinilalbumina causa uma libertação de ferro mais do que 10 vezes menor do que a do sulfato ferroso, o que explica a menor gastrolesividade do composto do invento comparada com a do $FeSO_4$, que é um agente antianêmico largamente utilizado na terapia.

QUADRO 5

Tratamento	Tempos de tratamento		
	10'	20'	30'
Ferrossuccinilalbumina	9,0 ± 1,9	8,1 ± 1,8	11,3 ± 3,0
Sulfato de ferro	118,4 ± 7,6	116,7 ± 4,7	122,3 ± 10,2
Controlos	5,0 ± 2,2	2,9 ± 1,2	4,9 ± 2,6

N = 7

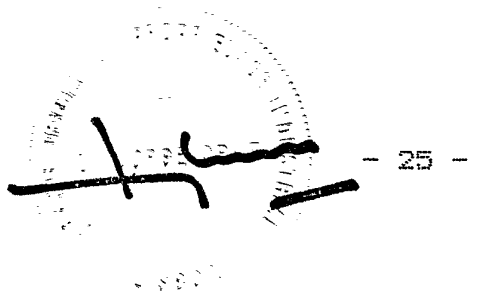
ANOVA#19(há mais) : Ferrossuccinilalbumina vs. sulfato ferroso
: p < 0,01

B. Absorção de ferro na ratazana anémica

Foi avaliada a sideremia pelo método da batofenantroli-
na (Teste de Combinação de Ferro - Boehringer Mannheim) na
ratazana anémica (a anemia foi induzida por meio de dieta isenta
de ferro na ratazana Sprague-Dawley e criada com animais de dieta
isenta de ferro de mães anémicas) uma hora depois do tratamento
com ferrossuccinilalbumina ou sulfato ferroso em diferentes
dosagens. Os resultados obtidos nos diferentes testes provaram
que o sulfato ferroso causa uma carga de ferro mais elevada do
que as amostras de ferrossuccinilalbumina.

C. Determinação da cinética do ferro

Foram medidos os valores de sideremia na ratazana
anémica em instantes diferentes após um único tratamento oral com
sulfato ferroso e ferrossuccinilalbumina a uma dose de 0,3 mg de
equivalente de Fe. Os resultados mostram para ambos os compostos



um pico de absorção de ferro uma hora depois do tratamento (ver Quadro 6).

QUADRO 6

Valores de sideremia na ratazana anêmica em instantes diferentes após um único tratamento oral com 0,3 mg/kg de ferro na forma de sulfato ferroso ou ferrossuccinilalbumina ($\mu\text{g}/100 \text{ ml} \pm \text{E.P.}$)

Tratamento	Tempos de tratamento			
	0	15'	30'	60'
Ferrossuccinil- -albumina	/	62,5 \pm 9,2**	117,3 \pm 17,6**	208,6 \pm 20,3** ++
FeSO ₄	/	197,8 \pm 18,5++	247,9 \pm 15,5++	307,7 \pm 19,2++
Controlos anêmicos		30,3 \pm 1,6		

QUADRO 6 (continuação)

Tratamento	Tempos de tratamento			
	2h	3h	6h	24h
-				
Ferrossuccinil- -albumina	118,3±14,3** ++	104,8±15,0** ++	55,8± 5,1	29,6±1,1
FeSO ₄	261,5±21,5++	219,7±28,1++	93,9±22,8++	23,0±0,8

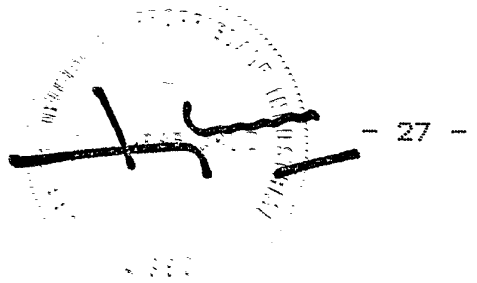
ANDVA em 2 factores: ** p < 0,01 * p < 0,05 : Ferrossuccinil-
albumina vs. FeSO₄
++ p < 0,01 + p < 0,05 : dentro dos gru-
pos vs. instante 0 (controlos anémicos)

D. Efeito antianémico

Foi levado a cabo um tratamento prolongado durante 6 semanas, na ratazana anémica, por administração oral de ferrossuccinilalbumina e sulfato ferroso como controlo, em doses de 3, 10 e 30 mg Fe/kg/dia.

Os animais, em grupos de 5 animais cada um, foram mortos nos dias 0, 7, 14, 21, 35 e 42 a partir do tratamento.

Os dados dos níveis de hemoglobina hemática e de ferro no soro (Teste de Combinação de Ferro - Boehringer Mannheim), obtidos com o composto preparado como se descreveu no Exemplo 3, são indicados no Quadro 7. Estes resultados mostram que os compostos são equiactivos na reposição dos níveis de hemoglobina,



ainda que o sulfato ferroso seja mais rápido e poderoso na reposição dos valores de ferro no soro.

QUADRO 7

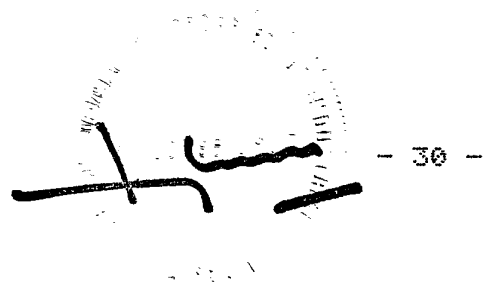
Parâmetros hematológicos durante um tratamento de 6 semanas em ratas anêmicas com diferentes compostos que contêm ferro (3, 10 e 30 mg Fe/kg/dia) (Média ± E.P.)

ANOVA: ** p < 0,01 * p < 0,05 vs. controles anêmicos

Parâmetros hematológicos	Tratamento mg Fe/kg/dia	Dias de tratamento		
		0	7	14
Hemoglobina (mg/dl)	Controles normais	13,3±1,0	13,3±0,5	13,7±0,6
	Controles anêmicos	3,3±0,2	3,4±0,2	4,0±0,2
	Ferrossuccinil- -albumina 3	/	7,9±0,6**	8,2±1,2**
	Ferrossuccinil- -albumina 10	/	10,0±0,7	11,1±0,4
	Ferrossuccinil- -albumina 30	/	11,2±0,3	12,8±0,2
	FeSO ₄ 3	/	8,0±0,3**	7,9±0,9**
	FeSO ₄ 10	/	11,2±0,1	11,2±0,8
	FeSO ₄ 30	/	11,5±0,3	12,1±0,2
Ferro sérico (µg/100 ml)	Controles normais	/	129,7±19,5**	111,0±11,4**
	Controles anêmicos	/	19,9± 6,5	38,9± 3,7
	Ferrossuccinil- -albumina 3	/	27,1± 1,6	54,2± 6,8*
	Ferrossuccinil- -albumina 10	/	142,7±31,7**	123,5±14,4**
	Ferrossuccinil- -albumina 30	/	184,6± 9,0**	102,6± 4,9**
	FeSO ₄ 3	/	67,8±7,8**	81,8±14,8**
	FeSO ₄ 10	/	n.d.	183,7±42,2**
	FeSO ₄ 30	/	189,6±38,0**	147,3±26,2**

QUADRO 7 (continuação)

Parâmetros		Dias de tratamento			
hemato-	Tratamento	21	28	35	42
lógicos	mg Fe/kg/dia				
Hemo- globina (mg/dl)	Controlos normais	13,8±0,4	13,6±2,2	15,1±0,5	14,8±0,8
	Controlos anêmicos	4,8±0,8	3,6±0,5	7,1±0,8	9,1±1,4
	Ferrossuccinil- -albumina 3	9,7±0,6**	10,2±1,0**		
	Ferrossuccinil- -albumina 10	12,1±0,3	13,0±0,1	13,9±0,1	14,9±0,1
	Ferrossuccinil- -albumina 30	11,9±0,4	12,9±0,3	14,1±0,9	12,7±0,5
	FeSO ₄ 3	12,5±1,0**	11,5±0,8**		
	FeSO ₄ 10	12,6±0,4	12,5±0,4	13,6±0	15,4±0,7
	FeSO ₄ 30	11,7±0,2	12,7±0,1	13,1±0,4	
Ferro sérico (µg/ /100 ml)	Controlos normais	121,1±7,3**	114,5±19,0 (**)	139,3±9,8 (**)	140,5±16,1 (**)
	Controlos anêmicos	34,2±3,0	30,7± 2,8	40,6±4,9	74,7±16,9
	Ferrossuccinil- -albumina 3	77,2±11,9*	143,5±38,0**		
	Ferrossuccinil- -albumina 10	153,5± 8,5 (**)	87,6± 4,5 (**)	113,5±2,3 (**)	202,8±16,9 (**)
	Ferrossuccinil- -albumina 30	133,6± 9,1**	112,4± 8,0 (**)	133,5±4,0 (**)	140,1±25,3 (**)
	FeSO ₄ 3	103,2±32,2**	133,8±10,8**		
	FeSO ₄ 10	133,8± 3,2 (**)	113,8± 9,2 (**)	129,3±23,8 (**)	219,6±3,3 (**)
	FeSO ₄ 30	105,2± 7,4**	125,7±13,4**	157,5±37,0**	



Os dados anteriores provam que a ferrossuccinilalbumina é um complexo de ferro e proteína (o conteúdo de ferro pode variar desde 3 até 20 % numa base ponderal), sendo a componente proteína a albumina ou a lactalbumina extensivamente aciladas, principalmente na cadeia lisina, como ficou evidenciado por análises físico-químicas, particularmente a electroforese, composição de aminoácido, conteúdo de ácido succínico, (RMN), com estrutura desorganizada (dicroísmo circular-CD).

A proteína pode complexar com elevadas quantidades de ferro na forma de um complexo hidratado polinuclear (ESR) com estrutura amorfa, em que os aquo-complexos são mantidos em solução pela proteína succinilada, formando desta maneira uma estrutura agregada com pesos moleculares maiores do que 10^6 Dalton.

Os compostos que se obtêm são altamente insolúveis em meio ácido e altamente solúveis em meios de valor de pH neutro ou básico.

Os compostos são caracterizados por uma muito baixa toxicidade no animal, devido à libertação de traços de ferro, que não podem dar origem a um aumento de radicais livres. Os efeitos acima mencionados são completamente imprevisíveis e são devidos à presença de albumina no composto.

O presente invento também se refere à utilização dos novos compostos como agentes eficazes no tratamento de anemias, assim como a todos os aspectos industriais relacionados com isto, incluindo a sua utilização em composições farmacêuticas, que constituem um outro objectivo específico do presente invento. Os compostos do presente invento podem ser incorporados em

composições farmacêuticas, particularmente em formulações adequadas à administração oral.

Para a administração oral, os compostos são formulados na forma de comprimidos, pós dispersíveis, cápsulas, drageias, granulados, suspensões, xaropes, elixires ou soluções. As preparações para a utilização oral podem conter um ou mais dos excipientes habituais, tais como adoçantes, aromatizantes, corantes, agentes de cobertura e de conservação, de modo a obter-se uma preparação agradável e saborosa. Os comprimidos podem conter o ingrediente activo misturado com os excipientes farmacêuticamente aceitáveis habituais, por exemplo diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, lactose e talco, agentes de granulação e desintegração, tais como ácido alginico e carboximetilcelulose de sódio, agentes de ligação, tais como amido, gelatina, goma arábica e polivinilpirrolidona, agentes de conservação, tais como benzoatos ou hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo, butilo ou de metais alcalinos, e lubrificantes tais como talco, estearato de magnésio, ácido esteárico, palmitoestearato de glicerilo e semelhantes.

Os xaropes, elixires, suspensões e soluções são preparados de acordo com os métodos conhecidos. Conjuntamente com o ingrediente activo, eles podem conter agentes de suspensão, tais como propileno-glicol, metilcelulose, hidroxietilcelulose, goma de tragacanto, agentes molhantes, tais como lecitina, estearato de polioxietileno e monooleato de polioximetilenossorbitano e os habituais conservantes, agentes tensioactivos, adoçantes e agentes de tamponização. A adição de um hidróxido de metal alcalino pode, por vezes, ser necessário. As formas mais preferidas das referidas formulações farmacêuticas são constituídas por ampolas bebíveis e saquetas, cujo conteúdo é dissolvido ou suspenso extemporaneamente em água.

As dosagens de ingrediente activo podem variar dentro de largos limites, dependendo da natureza do composto utilizado. Os resultados eficazes são geralmente obtidos administrando os compostos do presente invento em dosagens diárias que se situam numa gama desde cerca de 5 até cerca de 50 mg/kg de peso corporal. As formas de dosagem farmacêuticas contêm geralmente desde cerca de 300 até cerca de 1500 mg do ingrediente activo, conjuntamente com um ou mais dos agentes de suporte farmacêuticos sólidos ou líquidos convencionais, e elas podem ser administradas uma ou mais vezes por dia.

É em seguida indicada a descrição de alguns exemplos de composições farmacêuticas.

Exemplo 9

Um comprimido contém:

Ferrossuccinilalbumina (Exemplo 3)	400 mg	1200 mg
Palmitoestearato de glicerilo	55 mg	165 mg
Carboximetilcelulose de sódio	27 mg	80 mg
p-Hidroxibenzoato de metilo	1 mg	3 mg
p-Hidroxibenzoato de propilo	1 mg	3 mg

Exemplo 10

Um comprimido contém:

Ferrossuccinilalbumina (Exemplo 1)	1200 mg
Palmitoestearato de glicerilo	165 mg
Carboximetilcelulose de sódio	80 mg
p-Hidroxibenzoato de metilo	3 mg
p-Hidroxibenzoato de propilo	3 mg

Exemplo 11

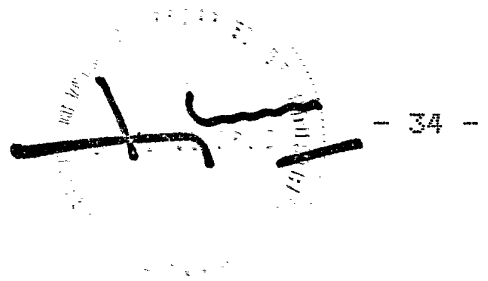
Uma ampola bebível contém:

Ferrossuccinilalbumina (Exemplo 3)	400 mg	600 mg	1200 mg
Propilenoglicol	1000 mg	1500 mg	3000 mg
Benzoato de sódio	35 mg	52 mg	105 mg
p-Hidroxibenzoato de metilo	30 mg	45 mg	90 mg
p-Hidroxibenzoato de propilo	15 mg	22 mg	45 mg
Sacarina de sódio	10 mg	15 mg	30 mg
Caramelo (E 150)	190 mg	285 mg	570 mg
Hidróxido de sódio 1 N	1000 mg	1500 mg	3000 mg
Água depurada q.b. para	10 ml	15 ml	30 ml

Exemplo 12

Uma ampola bebível contém:

Ferrossuccinil- α -lactalbumina (Exemplo 3)	400 mg
Propilenoglicol	1000 mg
p-Hidroxibenzoato de metilo	50 mg
p-Hidroxibenzoato de propilo	40 mg
Sacarina de sódio	30 mg
Caramelo	400 mg
Hidróxido de sódio 1 N	1000 mg
Água depurada q.b. para	20 ml



Exemplo 13

Uma ampola bebível contém:

Ferroaspartilalbumina	1200 mg
Metilcelulose	800 mg
Benzoato de sódio	500 mg
p-Hidroxibenzoato de propilo	20 mg
Sacarina de sódio	30 mg
Hidróxido de sódio 1 N	1000 mg
Água depurada q.b. para	15 ml

REIVINDICAÇÕES:

1ª. Processo para a preparação de albuminas aciladas com resíduos de ácido dicarboxílico, que contém ferro numa forma biodisponível, caracterizado por se proceder à acilação das referidas albuminas com resíduos de ácidos dicarboxílicos, seguido de reacção das albuminas aciladas obtidas, de preferência em meio aquoso, com iões ferro.

2ª. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as albuminas aciladas derivarem de albumina bovina ou de lactoalbumina.

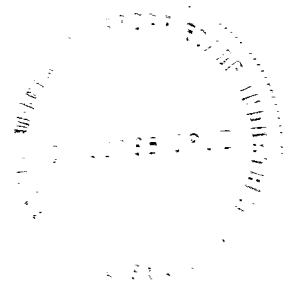
3ª. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por as albuminas serem aciladas com resíduos de ácido dicarboxílico escolhidos de entre os dos ácidos succínico, glutárico, maleico, málico, malónico, aspártico e glutâmico.

4ª. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por as albuminas serem aciladas com resíduos succinilo.

5ª. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 4, caracterizado por se obterem compostos que contém de 3 até 20 % de ferro numa base ponderal.

6ª. Processo para a preparação de compostos que contém ferro biodisponível, caracterizado por se a partir de albuminas aciladas com resíduos de ácido dicarboxílico e se submeter estas a interacção com iões ferro num meio aquoso de pH que se situa numa gama desde 2 até 12, preferivelmente desde 3 até 7.

7ª. Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado por se incluir nas referidas composições,



como ingrediente activo, um composto de acordo com as reivindicações 1 até 6, juntamente com um agente de suporte ou excipiente adequados.

88. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por se incluir nas referidas composições, o ingrediente activo em quantidades que podem variar entre desde cerca de 300 até cerca de 1500 mg.

92. Método para o tratamento de condições anémicas em animais de sangue quente, caracterizado por compreender a administração de uma dose terapêuticamente eficaz de um dos compostos de acordo com a reivindicação 1, dose essa que se situa numa gama desde cerca de 10 até cerca de 50 mg/kg de peso corporal.

Lisboa, 15 de Novembro de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10 - A 3.ª
1200 LISBOA