

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031968**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.03.29

(51) Int. Cl. **C07K 14/47 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201790902

(22) Дата подачи заявки
2015.10.22

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА(III) С N-АЦЕТИЛАСПАРТИЛИРОВАННЫМ КАЗЕИНОМ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЯХ

(31) **14386034.4**

(32) **2014.12.19**

(33) **EP**

(43) **2017.10.31**

(86) **PCT/EP2015/074482**

(87) **WO 2016/096203 2016.06.23**

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:
ЦЕТИ ЮЛИЯ (GR)

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2006021843
EP-B1-0243322**

LAZZARI FLAVIO ET AL.: "Overview of clinical trials in the treatment of iron deficiency with iron-acetyl-aspartylated casein", CLINICAL DRUG INVESTIGATION, vol. 25, no. 11, 2005, pages 679-689, XP009182971, ISSN: 1173-2563, cited in the application, the whole document

BURON ET AL.: "On the racemisation of aspartic anhydride during its preparation", TETRAHEDRON ASYMMETRY, PERGAMON PRESS LTD, OXFORD, GB, vol. 18, no. 13, 17 July 2007 (2007-07-17), pages 1625-1627, XP022181932, ISSN: 0957-4166, DOI: 10.1016/J.TETASY.2007.07.003, cited in the application

(57) В изобретении в целом описан новый способ получения комплексов железа(II) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином. Продукт, который можно получить способом, предлагаемым в настоящем изобретении, можно безопасно использовать для населения в целом или для животных при лечении дефицита железа. Способ, предлагаемый в настоящем изобретении, включает стадии (a) реакции казеина с N-ацетил-L-аспартилхлоридом с получением N-ацетил-L-аспартилированного казеина, (b) последующей реакции N-ацетил-L-аспартилированного казеина с хлоридом железа(III) и (c) получения комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином.

B1

031968

031968 B1

Настоящее изобретение в целом относится к комплексам железа(III) с белком и к способам их получения. Продукт, который можно получить способом, предлагаемым в настоящем изобретении, можно безопасно использовать для лечения дефицита железа у населения в целом или животных.

Уровень техники

Лечение содержащими железо препаратами необходимо в целом ряде клинических случаев, включая беременность, химиотерапию, острое или хроническое кровотечение, гемодиализ, воспалительную болезнь кишечника, несбалансированное питание и желудочно-кишечную операцию.

Пероральное лечение содержащими железо препаратами является существенно менее дорогостоящим, чем альтернативное парентеральное лечение содержащими железо препаратами, а также снижает вероятность возникновения серьезных аллергических реакций. В этой связи в заявке на патент Великобритании № 910321 (Olivieir Paul Gaudin) описан улучшенный способ получения солей железа(II) с аспарагиновой кислотой. Эти соли можно использовать в качестве лекарственных средств, предназначенных для лечения дефицита железа.

В публикации Cremonesi P et al., in 1984 (Arzneimittel-Forschung, 34(9):948-952) впервые описаны содержащие железо производные модифицированного молочного белка. Кроме того, утверждают, что продукт, содержащий большое количество железа и обладающий всеми характеристиками стабильности и растворимости, необходимыми для лекарственного средства, можно получить путем сукцинилирования молочных белков, проводимого до реакции с солью железа. Эти продукты могут обладать особыми преимуществами. Железо, находящееся в форме олигомерного комплекса, прочно связано с белком не посредством образования хелатных структур с основными остатками, а путем включения в несколько участков белковой цепи. Растворимость комплекса с железом обеспечена увеличенной доступностью карбоксильных групп, образующихся вследствие реакции сукцинилирования.

В это же время в патенте US № 4493829 описаны содержащие железо производные сукцинилированного белка, не приводящие к поражениям желудка и обладающие улучшенной биологической доступностью. В Европейском патенте № 0243322 описаны превращения того же белка (растительного и животного происхождения), проводимые по реакции белков с ангидридами алифатических C₃-C₁₀-дикарбоновых кислот с введением в белок карбоксильных групп, приводящим к облегчению образования комплекса с железом.

Исследования химических и биологических характеристик комплекса железа с сукцинилированным белком, проведенные на крысах и собаках, описаны в публикации Cremonesi P et al. (International Journal of Clinical Pharmacology, therapy, and toxicology, 31(1):40-51). В экспериментах показана лучшая переносимость желудочно-кишечным трактом комплекса железа с сукцинилказеином, содержащего 5% железа.

В EP 0939083 раскрыт способ получения комплекса ферросукцинилказеина, полученного из пищевого казеина, использующегося в пищевой промышленности.

В US 2001031748 описаны поступающие из пищевых источников различные металлы, включая железо, вводимые в комбинации с поступающим из пищевых источников лигандом, таким как аскорбат, сукцинат, аспарат и другие лиганды. Комбинация таких поступающих из пищевых источников веществ может содействовать лечению симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта.

В публикации Lazzari et al. (Clinical Drug Investigation, 2005; 25(11):679-689) приведен обзор 16 клинических исследований лечения дефицита железа комплексом железа с ацетиласпартилированным казеином (Fe-ASP), для которого установлено, что он является эффективным переносчиком для обеспечения высокой биологической доступности железа. В открытых клинических исследованиях у пациентов всех категорий, страдающих вызванной дефицитом железа анемией, обнаружено очень существенное улучшение клинических показателей и показателей крови после лечения с помощью Fe-ASP. В контролируемых клинических исследованиях изменения профилей клинических показателей и показателей крови при использовании Fe-ASP являлись практически таким же, как при использовании комплекса железа с сукцинилированным белком (IPS), и эффективность использования Fe-ASP также сравнима с эффективностью парентерального лечения глюконатом железа. Не обнаружено связанных с безопасностью затруднений. Fe-ASP обладает высокой эффективностью при лечении вызванной дефицитом железа анемии и является чрезвычайно хорошо переносимым средством переноса железа. Fe-ASP представляет собой эффективное средство, альтернативное IPS, и в отдельных клинических случаях является перспективной альтернативой содержащим железо препаратам, использующимся при парентеральном лечении.

В более позднем патенте WO № 2006021843 раскрыт способ получения комплексов железа с сукцинилказеином и железа с ацетиласпаратказеином, в которых вещество получают при воздействии среды с небольшими изменениями pH и температуры. В способе используют ангидрид ацетиласпарагиновой кислоты. Кроме того, в способе не требуется использование специальных насосов (насосов для разрушения).

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении описаны новые способы получения стабильных комплексов железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином. Способ получения комплексов железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином, указанные комплексы и фармацевтические композиции, содержащие указанные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, определены в формуле изобретения.

Комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, являются стабильными и обладают высокой стабильностью во времени. Поэтому продукты можно использовать для лечения дефицита железа у людей или животных.

Подробное описание изобретения

Объектом настоящего изобретения является способ получения содержащих железо производных белков, а именно комплекса трехвалентного железа с N-ацетил-L-аспартил-казеином (ниже в настоящем изобретении называемый "ферро-N-ацетил-L-аспартил-казеином" и комплексом железа(III) с N-ацетил-L-аспартил-казеином), предпочтительно полученного из пищевого казеина, т.е. казеина, используемого в пищевой промышленности. Термин "пищевой казеин" означает казеин, полученный из молока, полученного из строго контролируемых племенных хозяйств. Этот продукт обладает степенью загрязнения бактериями, составляющей менее 1000 КОЕ/г (КОЕ - колониеобразующие единицы), и степенью загрязнения плесневыми грибами, составляющей менее 100 КОЕ/г, предпочтительно, если эти степени загрязнения определяют так, как это описано в современном издании Eur. Pharm (Европейская фармакопея), статьи 2.6.12 для полного количества жизнеспособных аэробных микроорганизмов, 2.6.13 для конкретных микроорганизмов и 2.6.14 для бактериальных эндотоксинов. Использование пищевого казеина позволяет получить чрезвычайно чистые продукты, что отличает их от аналогичных комплексов, полученных из обычных молочных белков.

Настоящее изобретение относится к способу получения комплексов железа(III) с N-ацетил-L-аспартил-казеином, предпочтительно включающему следующие стадии.

(a) N-Ацетил-L-аспартил-казеин, предпочтительно пищевого казеина, с использованием хлорангидрида N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты, полученного *in situ* путем хлорирования N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты хлорирующим реагентом, таким как тионилхлорид. Хотя ангидрид N-ацетил-аспаргиновой кислоты обычно является пригодным исходным веществом для модификации казеина, он обладает некоторыми недостатками. Например, он является сравнительно дорогостоящим для использования в промышленности, а также является неустойчивым к воздействию влаги при хранении. Кроме того, существует возможность частичной рацемизации ангидрида N-ацетил-аспаргиновой кислоты (Tetrahedron: Asymmetry 18 (2007) 1625-1627). Поэтому в контексте настоящего изобретения использование N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты в комбинации с хлорирующим реагентом обеспечивает преимущество по сравнению с использованием ангидрида N-ацетил-аспаргиновой кислоты.

(b) Последующая реакция N-ацетил-L-аспартил-казеина с хлоридом железа(III). Предпочтительно, если на стадии (a) получают растворенный казеин.

Ниже подробно описаны предпочтительные варианты осуществления, где для определения настоящего изобретения каждый из этапов 1-9 можно применять по отдельности или в комбинации с любыми другими этапами, наиболее предпочтительно, если все этапы 1-9 применяют так, как это описано ниже:

Стадия (a).

На этапе 1) проводят растворение казеина, предпочтительно пищевого, в щелочной среде при значении pH, равном от 8 до 9, предпочтительно равном от 8,4 до 8,6. Казеин растворяют в воде.

На этапе 2) *in situ* получают N-ацетил-L-аспартилхлорид из N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты и хлорирующего реагента, такого как тионилхлорид.

На этапе 3) проводят N-ацетил-аспартил-казеин по реакции растворенного казеина, полученного на этапе 1), с N-ацетил-L-аспартилхлоридом, полученным на этапе 2). Реакцию можно провести при температуре, находящейся в диапазоне, составляющем от 15 до 40°C, например при комнатной температуре (20°C), предпочтительно, если ее проводят при температуре, находящейся в диапазоне, составляющем от 30 до 40°C. Предпочтительно, если во время реакции казеина с N-ацетил-L-аспартилхлоридом значение pH поддерживают находящимся в диапазоне, составляющем 8-9.

N-Ацетил-L-аспартилхлорид получают *in situ* (без проведения какого-либо выделения) и используют в реакции с растворенным казеином. Предпочтительно, если используемое соотношение количества N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты к количеству казеина составляет 1:2.

На этапе 4) после проведения осаждения N-ацетил-L-аспартил-казеин продукт очищают путем подкисления до значения pH, находящегося в диапазоне, составляющем от 2,5 до 4, предпочтительно составляющем от 2,5 до 3, и выделяют фильтрованием.

На этапе 5) продукт выделяют фильтрованием, суспендируют в воде и гидроксиде натрия и разрушают при значении pH, находящемся в диапазоне, составляющем от 6 до 11, предпочтительно составляющем от 8 до 9, до получения раствора.

Стадия (b).

На этапе 6) реакцию с хлоридом железа(III) можно провести путем добавления водного раствора хлорида железа(III) к раствору, полученному в конце этапа 5), до обеспечения значения pH, равного от 2,5 до 3. Получают суспензию, которую обрабатывают фильтрованием и неочищенный ферро-N-ацетил-L-аспартил-казеин выделяют в виде нерастворимой фазы.

5 г Модифицированного казеина можно ввести в реакцию с 6,2 г 26,9% (мас./мас.) раствора FeCl₃.

На этапе 7) очистку проводят следующим образом: неочищенное производное, полученное на этапе 6), суспендируют в воде, подщелачивают до обеспечения значения pH, равного 8,5, и затем перемешивают.

вают в течение 30 мин до растворения продукта. Очищенный комплекс осветляют путем последующего фильтрования раствора.

На этапе 8) ферро-N-ацетил-L-аспартилированный казеин осаждают из осветленного раствора, полученного на этапе 7), путем подкисления до обеспечения значения pH, равного 2,5, и затем фильтруют и выделяют.

На этапе 9) комплекс, ферро-N-ацетил-L-аспартилированный казеин, обезвоживают при температуре, равной от 60 до 80°C, в течение промежутка времени, составляющего от 18 до 36 ч, предпочтительно составляющего от 20 до 24 ч.

После завершения обезвоживания остаточное содержание влаги в продукте составляет менее 5% и содержание образовавшего комплекс железа составляет от 5 до 6 мас.% в пересчете на сухое вещество. Результаты полной характеристики продукта приведены в примерах 1-3.

Описанный способ обеспечивает возможность получения комплекса, ферро-N-ацетил-L-аспартилированного казеина, не содержащего остаточных веществ или не содержащего производных железа, которые нерастворимы или плохо растворимы в воде. В частности, установлено, что продукт полностью растворим в щелочной среде, т.е. при значениях pH, типичных для кишечника, что обеспечивает максимальную биологическую доступность железа при всасывании в кишечнике.

Продукт, предлагаемый в настоящем изобретении, можно соответствующим образом добавить в фармацевтические препараты, подходящие для перорального введения.

Поэтому в объем настоящего изобретения входят фармацевтические композиции, содержащие ферро-N-ацетил-L-аспартилированный казеин и соответствующие инертные наполнители, такие как разбавители и фармацевтические консерванты.

Другим объектом настоящего изобретения является применение комплексов железа(III), описанных выше, для приготовления лекарственных средств, предназначенных для лечения патологических состояний, обусловленных дефицитом железа, возникающим вследствие, например, физиологического изменения, периодического кровотечения, инфекционных заболеваний, беременности, грудного вскармливания и нарушенного обмена веществ. Одним примером таких патологических состояний является анемия, в частности, гипохромная сидеропеническая анемия.

Для иллюстрации настоящего изобретения приведены представленные ниже экспериментальные примеры, которые никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение комплекса железа с N-ацетил-L-аспартилированным казеином.

(А) Растворение казеина.

В изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный соответствующим встряхивающим устройством и устройством для измерения значения pH, добавляют 5 г казеина, используемого в пищевой и фармацевтической промышленности, в 70 г деионизированной микробиологически чистой воды. Смесь выдерживают при перемешивании до получения однородной суспензии. При температуре, равной 20°C, в течение 10 мин добавляют примерно 1,5 г 15% (мас./мас.) раствора гидроксида натрия (NaOH) до обеспечения значения pH, равного 8,5±0,1. Раствор встряхивают в течение еще 15 мин.

(В) Получение N-ацетил-L-аспартилхлорида.

В изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный соответствующим встряхивающим устройством, добавляют 15,6 мл (15 экв.) тионилхлорида (SOCl₂), 2,5 г N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты и смесь выдерживают при перемешивании при 75°C. Смесь выдерживают при перемешивании до завершения реакции (в течение 1-1,5 ч) с образованием продукта - ацилхлорида. Образующиеся в ходе этой реакции диоксид серы (SO₂) и хлорид водорода (HCl) представляют собой газообразные вещества и их можно удалить из реакционного сосуда, что обеспечивает дальнейшее протекание реакции. Избыток тионилхлорида выпаривают путем нагревания реакционной смеси при температуре, равной 75°C, близкой к температуре кипения SOCl₂ (74,6°C).

(С) Ацетиласпартилирование казеина.

Раствор, полученный на стадии (А), растворенный казеин, при комнатной температуре постепенно добавляют к N-ацетил-L-аспартилхлориду (В) при одновременном добавлении примерно 3,1 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH, поддерживая значение pH, равным 8,5±0,1. Полученный раствор выдерживают при энергичном перемешивании в течение 2 ч.

(D) Перенос ацетиласпартилированного казеина и его очистка путем осаждения.

Раствор, полученный на стадии (С), переносят в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством и подходящим датчиком для измерения значений pH. Затем раствор, выдерживаемый при температуре, равной 20°C, в течение 40 мин подкисляют с помощью примерно 2,28 г 6N. раствора HCl до обеспечения значения pH, равного 3. После обеспечения целевого значения pH добавление кислоты прекращают и получают осадок. Уменьшение значения pH приводит к образованию осадившегося N-ацетил-L-аспартилированного казеина, очищенного от других солей, других продуктов реакции и других растворимых примесей.

(Е) Фильтрация и разрушение.

N-Ацетил-L-аспартилированный казеин, полученный на стадии (D), выделяют фильтрованием. Влажный продукт удаляют с фильтра и затем помещают в изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный перемешивающим устройством с якорной мешалкой и датчиком для измерения значений pH, в который добавлено 70 мл очищенной воды, и затем перемешивают. Суспензию выдерживают при перемешивании при температуре, равной 20°C, в течение 10 мин, и затем разрушают. После разрушения в течение 20 мин к суспензии добавляют примерно 3,1 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH до обеспечения устойчивого значения pH, равного от 8,1 до 8,4. Суспензию аспартилизованного казеина фильтруют, реактор и фильтр промывают с помощью 50 мл очищенной воды и затем к осветленному раствору повторно добавляют промывочную воду.

(F) Реакция с хлоридом железа(III) и фильтрование неочищенного ферро-N-ацетил-L-аспартилизованного казеина.

Раствор, полученный на стадии (E), переносят в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством с лопастной мешалкой и датчиком для измерения значений pH. К этому однородному раствору добавляют всего 6,2 г 26,9% (мас./мас.) раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (раствор железа) следующим образом:

i) добавляют 1,7 г раствора железа с одновременным пошаговым добавлением 0,6 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH для обеспечения значения pH, равного 8,3-8,5. Раствор выдерживают при перемешивании в течение 15 мин;

ii) добавляют оставшиеся 4,5 г раствора железа до обеспечения значения pH раствора, равного 2,8-3,0. Суспензию выдерживают при перемешивании в течение 1 ч. Значение pH регулируют бн. раствором HCl или 15% (мас./мас.) раствором NaOH соответственно.

Получают суспензию ферро-N-ацетил-L-аспартилизованного казеина. Продукт реакции выдерживают при перемешивании в течение 20 мин и неочищенное производное, ферро-N-ацетил-L-аспартилированный казеин, выделяют фильтрованием.

(G) Растворение комплекса и фильтрование.

Твердый комплекс диспергируют в 70 г очищенной воды и затем добавляют 3,85 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH до обеспечения значения pH, равного $8,5 \pm 0,1$. Раствор выдерживают при перемешивании в течение 30 мин. Оставшийся раствор фильтруют для отделения нерастворившихся примесей. Содержание нерастворимого остатка составляет менее 0,5 мас. %.

(H) Осаждение и выделение чистого влажного ферро-N-ацетил-L-аспартилизованного казеина.

К прозрачному раствору, помещенному в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством с лопастной мешалкой и датчиком для измерения значения pH, при температуре, равной от 20 до 25°C, в течение примерно 20-30 мин путем вливания добавляют 2,28 г бн. водного раствора HCl до обеспечения значения pH, равного 2,8-3,0. После завершения добавления продукт реакции выдерживают при перемешивании в течение 20 мин и образовавшийся осадок чистого ферро-N-ацетил-L-аспартилизованного казеина выделяют фильтрованием и затем промывают очищенной водой.

(I) Обезвоживание ферро-N-ацетил-L-аспартилизованного казеина.

Чистый влажный продукт, полученный на предыдущей стадии, сушат в вакууме, при температуре, повышающейся от 60 до 70°C, в течение всего 24 ч. После обезвоживания получают 6,5 г чистого комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином, обладающего содержанием воды, составляющим <5 мас. % (Karl Fisher), и обладающего следующими химическими и физико-химическими характеристиками:

Характеристики продукта	Значение
Цвет	коричнево-красный
Растворимость	растворим в NaOH при pH = 8
pH	2,8
Свободное железо (не образовавшее комплекс)	<0,05% (мас./мас.)
Полное содержание железа	5,5 % (мас./мас.)
Белки	75,2 % (мас./мас.)
Образовавшая комплекс N-ацетил-L-аспаргиновая кислота	7,1 % (мас./мас.)
Свободная N-ацетил-L-аспаргиновая кислота	0,1 % (мас./мас.)
Хлориды	1,8 % (мас./мас.)
Содержание бактерий	<10 ³ КОЕ/г
Содержание плесневых грибов и дрожжей	<10 ² КОЕ/г

Пример 2. Получение комплекса железа с N-ацетил-L-аспартилированным казеином.

(A) Растворение казеина.

В изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный соответствующим встряхивающим устройством и устройством для измерения значения pH, добавляют 5 г казеина, используемого в пищевой и фармацевтической промышленности, в 70 г деионизированной микробиологически чистой воды. Смесь выдерживают при перемешивании до получения однородной суспензии. При температуре, равной 20°C, в течение 10 мин добавляют примерно 1,5 г 15% (мас./мас.) раствора гидроксида натрия (NaOH) до обеспечения значения pH, равного $8,5 \pm 0,1$. Раствор встряхивают в течение еще 15 мин.

(В) Получение N-ацетил-L-аспартилхлорида.

В изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный соответствующим встряхивающим устройством, добавляют 15,2 мл (15 экв.) тионилхлорида (SOCl_2), каталитическое количество диметилформамида (ДМФ), составляющее 40 мкл, 2,5 г N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты и смесь кипятят с обратным холодильником при 75°C . Смесь выдерживают при перемешивании до завершения реакции с образованием продукта - ацилхлорида. Образующиеся в ходе этой реакции диоксид серы (SO_2) и хлорид водорода (HCl) представляют собой газообразные вещества и их можно удалить из реакционного сосуда, что обеспечивает дальнейшее протекание реакции. Избыток тионилхлорида выпаривают путем постепенного нагревания реакционной смеси до температуры, равной 75°C , близкой к температуре кипения SOCl_2 ($74,6^\circ\text{C}$).

(С) Ацетиласпартирование казеина.

Раствор, полученный на стадии (А), растворенный казеин, при комнатной температуре постепенно добавляют к N-ацетил-L-аспартилхлориду, полученному на стадии (В), при одновременном добавлении примерно 3,1 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH , поддерживая значение pH, равным $8,5 \pm 0,1$. Полученный раствор выдерживают при энергичном перемешивании в течение 2 ч.

(D) Перенос ацетиласпартированного казеина и его очистка путем осаждения.

Раствор, полученный на стадии (С), переносят в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством и подходящим датчиком для измерения значений pH. Затем раствор, выдерживаемый при температуре, равной 20°C , в течение 40 мин подкисляют с помощью примерно 2,28 г бн. раствора HCl до обеспечения значения pH, равного 3. После обеспечения целевого значения pH добавление кислоты прекращают и получают осадок. Уменьшение значения pH приводит к образованию осадившегося N-ацетил-L-аспартированного казеина, очищенного от других солей, других продуктов реакции и других растворимых примесей.

(Е) Фильтрация и разрушение.

N-Ацетил-L-аспартированный казеин, полученный на стадии (D), выделяют фильтрованием. Влажный продукт удаляют с фильтра и затем помещают в изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный перемешивающим устройством с якорной мешалкой и датчиком для измерения значений pH, в который добавлено 70 мл очищенной воды, и затем перемешивают. Суспензию выдерживают при перемешивании при температуре, равной 20°C , в течение 1 ч, и затем разрушают. После разрушения в течение 20 мин к суспензии добавляют примерно 3,1 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH до обеспечения устойчивого значения pH, равного от 8,1 до 8,4. После завершения добавления продукт реакции еще раз обрабатывают в этом же реакторе в течение примерно 2 ч. Эта процедура облегчает разрушение твердых частиц N-ацетил-L-аспартированного казеина. Суспензию аспартированного казеина фильтруют, реактор и фильтр промывают с помощью 50 мл очищенной воды и затем к осветленному раствору повторно добавляют промывочную воду.

(F) Реакция с хлоридом железа(III) и фильтрация неочищенного ферро-N-ацетил-L-аспартированного казеина.

Раствор, полученный на стадии (Е), переносят в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством с лопастной мешалкой и датчиком для измерения значений pH. К этому однородному раствору добавляют всего 6,2 г 26,9% (мас./мас.) раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (раствор железа) следующим образом:

i) добавляют 1,7 г раствора железа с одновременным пошаговым добавлением 0,6 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH для обеспечения значения pH, равного 8,3-8,5. Раствор выдерживают при перемешивании в течение 15 мин;

ii) добавляют оставшиеся 4,5 г раствора железа до обеспечения значения pH раствора, равного 2,8-3,0. Суспензию выдерживают при перемешивании в течение 1 ч. Значение pH регулируют бн. раствором HCl или 15% (мас./мас.) раствором NaOH соответственно.

Получают суспензию ферро-N-ацетил-L-аспартированного казеина. Продукт реакции выдерживают при перемешивании в течение 20 мин и неочищенное производное, ферро-N-ацетил-L-аспартированный казеин, выделяют фильтрованием.

(G) Растворение комплекса и фильтрация.

Твердый комплекс диспергируют в 70 г очищенной воды и затем добавляют 3,85 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH до обеспечения значения pH, равного $8,5 \pm 0,1$. Раствор выдерживают при перемешивании в течение 30 мин. Оставшийся раствор фильтруют для отделения нерастворившихся примесей. Содержание нерастворимого остатка составляет менее 0,5 мас. %.

(H) Осаждение и выделение чистого влажного ферро-N-ацетил-L-аспартированного казеина.

К прозрачному раствору, помещенному в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством с лопастной мешалкой и датчиком для измерения значения pH, при температуре, равной от 20 до 25°C , в течение примерно 20-30 мин путем вливания добавляют 2,28 г бн. водного раствора HCl до обеспечения значения pH, равного 2,8-3,0. После завершения добавления продукт реакции выдерживают при перемешивании в течение 20 мин и образовавшийся осадок чистого ферро-N-ацетил-L-

аспартилизованного казеина выделяют фильтрованием и затем промывают очищенной водой.

(I) Обезвоживание ферро-N-ацетил-L-аспартилизованного казеина.

Чистый влажный продукт, полученный на предыдущей стадии, сушат в вакууме, при температуре, повышающейся от 60 до 70°C, в течение всего 24 ч. После обезвоживания получают 6,6 г чистого комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилизированным казеином, обладающего содержанием воды, составляющим < 5 мас. % (Karl Fisher), и обладающего следующими химическими и физико-химическими характеристиками:

Характеристики продукта	Значение
Цвет	коричнево-красный
Растворимость	растворим в NaOH при pH = 8
pH	2,7
Свободное железо (не образовавшее комплекс)	<0,05% (мас./мас.)
Полное содержание железа	5,7 % (мас./мас.)
Белки	84,1 % (мас./мас.)
Образовавшая комплекс N-ацетил-L-аспаргиновая кислота	7,3 % (мас./мас.)
Свободная N-ацетил-L-аспаргиновая кислота	0,2 % (мас./мас.)
Хлориды	1,6 % (мас./мас.)
Содержание бактерий	<10 ³ КОЕ/г
Содержание плесневых грибов и дрожжей	<10 ² КОЕ/г

Пример 3. Получение комплекса железа с N-ацетил-L-аспартилизированным казеином.

(A) Растворение казеина.

В изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный соответствующим встряхивающим устройством и устройством для измерения значения pH, добавляют 5 г казеина, используемого в пищевой и фармацевтической промышленности, в 70 г деионизированной микробиологически чистой воды. Смесь выдерживают при перемешивании до получения однородной суспензии. При температуре, равной 20°C, в течение 10 мин добавляют примерно 1,5 г 15% (мас./мас.) раствора гидроксида натрия (NaOH) до обеспечения значения pH, равного 8,5±0,1. Раствор встряхивают в течение еще 15 мин.

(B) Получение N-ацетил-L-аспартилхлорида.

В изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный соответствующим встряхивающим устройством, добавляют 15,6 мл (15 экв.) тионилхлорида (SOCl₂), каталитическое количество диметилформамида (ДМФ), составляющее 100 мкл, и 2,5 г N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты. Смесь выдерживают при перемешивании при кипячении с обратным холодильником при 75°C до завершения реакции с образованием продукта - ацилхлорида. Образующиеся в ходе этой реакции диоксид серы (SO₂) и хлорид водорода (HCl) представляют собой газообразные вещества и их можно удалить из реакционного сосуда, что обеспечивает дальнейшее протекание реакции. Избыток тионилхлорида выпаривают путем проводимого без использования холодильника постепенного нагревания реакционной смеси до температуры, равной 75°C, близкой к температуре кипения SOCl₂ (74,6°C).

(C) Ацетиласпартилизация казеина.

Раствор, полученный на стадии (A), растворенный казеин, при комнатной температуре добавляют к N-ацетил-L-аспартилхлориду, полученному на стадии (B), при одновременном добавлении примерно 3,1 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH, поддерживая значение pH, равным 8,5±0,1. Полученный раствор выдерживают при энергичном перемешивании в течение 2 ч.

(D) Перенос ацетиласпартилизованного казеина и его очистка путем осаждения.

Раствор, полученный на стадии (C), переносят в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством и подходящим датчиком для измерения значений pH. Затем раствор, выдерживаемый при температуре, равной 20°C, в течение 40 мин подкисляют с помощью примерно 2,28 г бн. раствора HCl до обеспечения значения pH, равного 3. После обеспечения целевого значения pH добавление кислоты прекращают и получают осадок. Уменьшение значения pH приводит к образованию осадившегося N-ацетил-L-аспартилизованного казеина, очищенного от других солей, других продуктов реакции и других растворимых примесей.

(E) Фильтрование и разрушение.

N-Ацетил-L-аспартилизированный казеин, полученный на стадии (D), выделяют фильтрованием. Влажный продукт удаляют с фильтра и затем помещают в изготовленный из нержавеющей стали реактор, снабженный перемешивающим устройством с якорной мешалкой и датчиком для измерения значений pH, в который добавлено 70 мл очищенной воды, и затем перемешивают. Суспензию выдерживают при перемешивании при температуре, равной 20°C, в течение 1 ч, и затем разрушают. После разрушения в течение 20 мин к суспензии добавляют примерно 3,1 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH до обеспечения устойчивого значения pH, равного от 8,1 до 8,4. После завершения добавления продукт реакции еще раз обрабатывают в этом же реакторе в течение примерно 2 ч. Эта процедура облегчает разрушение и последующую солубилизацию твердых частиц N-ацетил-L-аспартилизованного казеина. Суспензию аспартилизованного казеина фильтруют, реактор и фильтр промывают с помощью 50 мл очищенной воды и затем к осветленному раствору повторно добавляют промывочную воду.

(F) Реакция с хлоридом железа(III) и фильтрование неочищенного ферро-N-ацетил-L-аспартилированного казеина.

Раствор, полученный на стадии (E), переносят в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством с лопастной мешалкой и датчиком для измерения значений pH. К этому однородному раствору добавляют всего 6,2 г 26,9% (мас./мас.) раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (раствор железа) следующим образом:

i) добавляют 1,7 г раствора железа с одновременным пошаговым добавлением 0,6 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH для обеспечения значения pH, равного 8,3-8,5. Раствор выдерживают при перемешивании в течение 15 мин;

ii) добавляют оставшиеся 4,5 г раствора железа до обеспечения значения pH раствора, равного 2,8-3,0. Суспензию выдерживают при перемешивании в течение 1 ч. Значение pH регулируют бн. раствором HCl или 15% (мас./мас.) раствором NaOH соответственно.

Получают суспензию ферро-N-ацетил-L-аспартилированного казеина. Продукт реакции выдерживают при перемешивании в течение 20 мин и неочищенное производное, ферро-N-ацетил-L-аспартилированный казеин, выделяют фильтрованием.

(G) Растворение комплекса и фильтрование.

Твердый комплекс диспергируют в 70 г очищенной воды и затем добавляют 3,85 г 15% (мас./мас.) раствора NaOH до обеспечения значения pH, равного $8,5 \pm 0,1$. Раствор выдерживают при перемешивании в течение 30 мин. Оставшийся раствор фильтруют для отделения нерастворившихся примесей. Содержание нерастворимого остатка составляет менее 0,5 мас. %.

(H) Осаждение и выделение чистого влажного ферро-N-ацетил-L-аспартилированного казеина.

К прозрачному раствору, помещенному в эмалированный реактор, снабженный перемешивающим устройством с лопастной мешалкой и датчиком для измерения значения pH, при температуре, равной от 20 до 25°C, в течение примерно 20-30 мин путем вливания добавляют 2,28 г бн. водного раствора HCl до обеспечения значения pH, равного 2,8-3,0. После завершения добавления продукт реакции выдерживают при перемешивании в течение 20 мин и образовавшийся осадок чистого ферро-N-ацетил-L-аспартилированного казеина выделяют фильтрованием и затем промывают очищенной водой.

(I) Обезвоживание ферро-N-ацетил-L-аспартилированного казеина.

Чистый влажный продукт, полученный на предыдущей стадии, сушат в вакууме, при температуре, повышающейся от 60 до 70°C, в течение всего 24 ч. После обезвоживания получают 6,4 г чистого комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином, обладающего содержанием воды, составляющим < 5 мас. % (Karl Fisher), и обладающего следующими химическими и физико-химическими характеристиками:

Характеристики продукта	Значение
Цвет	коричнево-красный
Растворимость	растворим в NaOH при pH = 8
pH	2,8
Свободное железо (не образовавшее комплекс)	<0,05% (мас./мас.)
Полное содержание железа	5,3 % (мас./мас.)
Белки	88,0 % (мас./мас.)
Образовавшая комплекс N-ацетил-L-аспаргиновая кислота	7,0 % (мас./мас.)
Свободная N-ацетил-L-аспаргиновая кислота	0,6 % (мас./мас.)
Хлориды	1,8 % (мас./мас.)
Содержание бактерий	<10 ³ КОЕ/г
Содержание плесневых грибов и дрожжей	<10 ² КОЕ/г

Цитированная литература

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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином, включающий стадии:

(a) реакции казеина с N-ацетил-L-аспартилхлоридом с получением N-ацетил-L-аспартилированного казеина;

(b) последующей реакции N-ацетил-L-аспартилированного казеина с хлоридом железа(III) и (c) получения комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином.

2. Способ по п.1, в котором используемым казеином является пищевой казеин.

3. Способ по п.1, в котором стадия (a) включает получение раствора казеина и в котором добавление N-ацетил-L-аспартилхлорида к раствору казеина проводят при значении pH, равном от 6 до 9.

4. Способ по п.1, в котором N-ацетил-L-аспартилхлорид получают *in situ*, из N-ацетил-L-аспаргиновой кислоты и хлорирующего реагента, выбранного из группы, включающей тионилхлорид (SOCl₂), пентахлорид фосфора (PCl₅), трихлорид фосфора (PCl₃), тетрахлорид углерода (CCl₄), оксалилхлорид (COCl)₂, фосфорилхлорид (POCl₃), 2-хлор-1,3-бис-(метоксикарбонил)гуанидин (Palau'Chlor), хлорангидрид циануровой кислоты и N-хлорсукцинимид.

5. Способ по п.1, в котором комплекс железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным казеином, полученный на стадии (c), осветляют и затем обезвоживают или сушат распылением, или сушат вымораживанием.

6. Способ приготовления фармацевтической композиции, содержащей комплекс железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным пищевым казеином, который включает объединение комплекса железа(III) с N-ацетил-L-аспартилированным пищевым казеином, полученного способом по любому из пп.1-5 с фармацевтическими инертными наполнителями, выбранными из группы, включающей разбавители и консерванты.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2