MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900646436
Data Deposito	24/12/1997
Data Pubblicazione	24/06/1999

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	G		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPLESSO DI FERRO-SUCCINILCASEINA, PROCESSO PER LA SUA PREPARAZIONE E COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CHE LO CONTENGONO

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Complesso di ferro-succinilcaseina, processo per la sua preparazione e composizioni farmaceutiche che lo contengono".

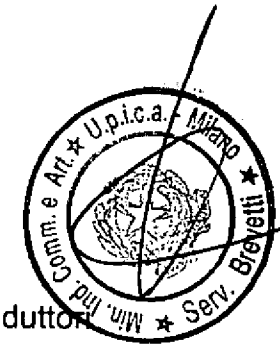
Titolare: CHEMI S.p.A.

MI 97 A 2875

con sede in: PATRICA (FR)

Inventori designati: BONIFACIO Fausto, MASSARDO Pietro, DI LEO Diego

Depositata il con il N.



****

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente domanda si colloca nel campo dei derivati proteici adduttori di ferro nell'organismo. Si descrive un nuovo complesso ferrico della caseina succinilata, il suo processo di preparazione, composizioni farmaceutiche che lo contengono, ed il loro uso nel trattamento terapeutico di stati patologici derivanti dalla carenza di ferro, quale l'anemia ipocromica sideropenica. Il complesso secondo la presente invenzione, ottenuto in alta resa ed esente da residui insolubili, presenta elevata tollerabilità ed assenza di effetti collaterali.

STATO DELLA TECNICA

Il ferro riveste nell'uomo e negli animali un ruolo fisiologico insostituibile, essendo presente come componente essenziale di proteine, enzimi, citocromi, ecc., in tutti i tessuti dell'organismo. I tessuti di un essere umano adulto contengono in media da 1,5 a 5 g di ferro, di cui il 60-65% è concentrato nei globuli rossi, mentre il 18-30% risulta legato alle proteine ferritina ed emosiderina, il ferro restante essendo distribuito in

vari sistemi enzimatici.

Il fabbisogno di tale metallo (1 mg/die) viene soddisfatto in parte mediante l'utilizzo di ferro endogeno, derivante dalla demolizione dei globuli rossi, ed in parte dall'assunzione di ferro esogeno attraverso gli alimenti. Tale fabbisogno spesso non viene soddisfatto, sia a causa di un insufficiente apporto dietetico, che in conseguenza di mal assorbimento, di alterazioni fisiologiche dovute ad emorragie periodiche, malattie infettive, gravidanza, allattamento, imperfetta utilizzazione metabolica.

Le suddette alterazioni fisiologiche si manifestano patologicamente con l'insorgenza dell'anemia ipocromica-sideropenica, la cui terapia più idonea consiste nell'apporto di ferro all'organismo, ottenuto con trattamento con adduttori di ferro somministrati per via orale, parenterale o intravenosa.

L'assunzione di ferro esogeno è spesso accompagnata da indesiderati effetti collaterali, usualmente connessi alla natura del veicolante utilizzato per la somministrazione.

Sono note nello stato della tecnica composizioni somministrabili per via orale a base di sali di acidi organici (quali citrato, colinato, aspartato, fumarato, gluconato, glicinato, lattato, ossalato e succinato) ed inorganici (quali cloruro ferrico, solfato ferroso e fosfato ferrico), o di vettori polimerici quali ad esempio ferro-polisaccaridi.

Le suddette composizioni per uso orale, per quanto efficaci, sono accompagnate dalla comparsa di effetti collaterali, dando luogo a seri danni gastrointestinali che si manifestano con diarrea e vomito nei casi

più gravi. Nel caso di trattamenti intramuscolari si sono riscontrate reazioni allergiche, sbalzi termici, tachicardia, leucocitosi e linfoadenopatia, mentre si sono riscontrati addirittura shock di tipo anafilattico, tromboflebiti e collasso circolatorio nei trattamenti intravenosi.

Ne deriva che il trattamento terapeutico della sideropenia è frequentemente influenzato dalla scarsa tollerabilità dei preparati, rendendo difficile la somministrazione continuata delle quantità di ferro necessarie.

Allo scopo di minimizzare i suddetti effetti collaterali, è generalmente suggerita la contemporanea assunzione di alimenti o di antiacidi, ma ciò conduce ad una riduzione dell'assorbimento del ferro, dipendente dalla composizione degli alimenti stessi.

Nella ricerca di agenti veicolanti alternativi per il ferro, scevri dai suddetti effetti collaterali, sono state proposte diverse proteine, aventi una certa affinità per il ferro, sia di origine animale (quali siero-proteine, proteine da organo, ovalbumina e lattoproteine) che vegetale (quali proteine di soia). Tuttavia, l'efficacia terapeutica dei suddetti veicolanti, usualmente ottenuti per reazione con sali ferrici, è pesantemente limitata da una serie di fattori negativi, tra cui:

- insolubilità dei complessi quando le quantità di ferro legato al veicolante proteico sono superiori a 0,5%, ed impossibilita di effettuare una precisa valutazione della quantità di ferro totale realmente legato alla proteina e di quella invece coprecipitata in forma di ossidi idrati, altamente gastrolesivi;

- disomogeneità nella somministrazione e difficoltà di ottenere composti contenenti ferro in concentrazioni riproducibili e costanti.

I suddetti svantaggi sono stati parzialmente risolti succinilando opportunamente le suddette proteine prima di complessarle con il ferro; in tal modo è stato infatti possibile ottenere dei derivati ferroproteici ad alto tenore di ferro, caratterizzate da buona solubilità a valori di pH superiore a 5.

La domanda di brevetto inglese GB-A-2115821 descrive complessi ferro protein succinilati ottenuti a partire da latte in polvere o miscele di proteine del latte. Tuttavia, durante la preparazione di questi complessi, accanto ai derivati solubili del ferro viene ottenuta, soprattutto operando su scala industriale, una frazione di derivati insolubili in forma di mucillagine; tali mucillagini sono difficilmente eliminabili, in quanto la loro formazione varia in modo incontrollabile in funzione di minime variazioni dei parametri sperimentali. La presenza di mucillagini rende necessaria l'adozione di misure particolari di purificazione al fine di ottenere prodotti perfettamente solubili.

La formazione di residui insolubili riduce inoltre la resa del prodotto finale desiderato.

In base ai problemi fin qui esposti, è sentita l'esigenza di disporre di nuovi complessi ferrici che, contrariamente ai composti sopra descritti, siano preparabili su scala industriale con alte rese, e senza formazione di residui insolubili. Tali complessi devono potere consentire la somministrazione di quantitativi di ferro precisi e riproducibili, senza indurre effetti collaterali.

SOMMARIO

Oggetto della presente invenzione è un nuovo derivato proteico del ferro, specificatamente complesso ferrico della caseina succinilata (indicata di seguito "ferro-succinilcaseina") ottenuto da caseina alimentare.

Costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione un nuovo processo per la preparazione di ferro - succinilcaseina a partire da caseina alimentare, caratterizzato dall'impiego di procedure specifiche di dilacerazione ed essiccamento.

Il processo dell'invenzione, facilmente realizzabile su scala industriale, conduce all'ottenimento di ferro-succinilcaseina in alte rese e senza formazione di residui insolubili.

La presente invenzione riguarda inoltre delle composizioni farmaceutiche comprendenti una quantità terapeuticamente efficace di ferro-succinilcaseina, in associazione con opportuni eccipienti, diluenti e conservanti di uso farmaceutico.

Il complesso ferrico secondo la presente invenzione viene vantaggiosamente utilizzato nel trattamento terapeutico degli stati patologici correlati alla carenza di ferro; detto complesso è infatti caratterizzato dall'assenza di effetti collaterali e da elevata tollerabilità.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Oggetto della presente invenzione è un nuovo derivato proteico del ferro, specificatamente complesso ferrico della caseina succinilata (indicata di seguito "ferro-succinilcaseina") ottenuto da caseina alimentare. Per caseina alimentare si intende la caseina ottenuta da

latte proveniente da allevamenti rigorosamente controllati; tale prodotto presenta una contaminazione inferiore a 1.000 UFC/g per i batteri, ed inferiore a 100 UFC/g per le muffe.

L'uso di caseina alimentare porta all'ottenimento di prodotti particolarmente puri rispetto a complessi analoghi ottenuti a partire da usuali proteine del latte.

Ulteriore oggetto dalla presente invenzione è un processo per l'ottenimento di ferro-succinilcaseina mediante reazione di caseina alimentare con anidride succinica e cloruro ferrico, tale processo essendo caratterizzato dal fatto che:

(a). la succinilcaseina e la ferro-succinilcaseina ottenute nel corso del processo, vengono dilacerate tramite pompe;

(b). la ferro-succinilcaseina finale viene essiccata in condizioni controllate.

La dilacerazione (a) è un processo ad elevata energia meccanica caratterizzato dall'uso di pompe, che permette di eliminare aggregazioni di materiale solido in sospensione non eliminabili tramite semplice agitazione meccanica. E' essenziale che la dilacerazione si svolga a pH compreso tra 6 e 11, preferibilmente tra pH 8 e 9; oltre il pH 11 si ha la degradazione delle proteine.

Come per la dilacerazione, anche l'essiccamento (b) contribuisce in modo critico all'ottenimento di ferro-succinilcaseina in alte rese e senza residui insolubili; l'essiccamento deve essere eseguito in un tempo di 15-36 ore, preferibilmente 20-24, ad una temperatura compresa tra 60°C e 80°C, e a pressione residua compresa tra 20 e 200 mmHg (0.0263 e

0.263 atmosfere); è inoltre essenziale che durante le prime 13 ore di essiccamento la temperatura sia compresa tra 70°C e 75°C. Il tipo di essiccatore utilizzato non è critico ai fini dell'invenzione.

Nel suo insieme, il processo di sintesi della ferro succinilcaseina secondo l'invenzione comprende i seguenti stadi:

1) succinilazione di caseina alimentare con anidride succinica, seguita dalla precipitazione e filtrazione della succinilcaseina ottenuta;

2) reazione della succinilcaseina con cloruro ferrico, precipitazione e filtrazione del complesso ferrico della caseina succinilata ottenuto;

3) purificazione ed isolamento del complesso ferrico della caseina succinilata ottenuto allo stadio 2)

4) essiccamento del prodotto ottenuto allo stadio 3).

I vari stadi vengono qui di seguito descritti in dettaglio.

Nello stadio 1), la succinilazione viene eseguita sciogliendo in acqua la caseina alimentare aggiungendo anidride succinica ad un pH compreso tra 6 e 9, preferibilmente tra 7.5 e 8.5. La reazione può essere favorita insufflando nella soluzione azoto gassoso al fine di evitare accumuli di anidride succinica.

Il prodotto succinilato viene precipitato mediante acidificazione a pH compreso tra 1 e 4, preferibilmente tra 2.5 e 3, e separato per filtrazione.

Il prodotto, raccolto dal filtro, viene sospeso in acqua e soda e sottoposto a dilacerazione con le modalità sopra descritte, e cioè a pH compreso tra 6 e 11, preferibilmente tra 8 e 9, fino all'ottenimento di una soluzione.

Nello stadio 2), la reazione con cloruro ferrico può essere eseguita

addizionando la soluzione ottenuta al termine dello stadio 1) con una soluzione acquosa di cloruro ferrico, fino al raggiungimento di un pH compreso tra 2.5 e 3. Si forma una sospensione che viene sottoposta a filtrazione recuperando, come fase insolubile, ferro-succinilcaseina grezza.

Nello stadio 3), la purificazione viene eseguita nel seguente modo: il derivato grezzo ottenuto nello stadio 2) viene sospeso in acqua e mantenuto in agitazione per circa 2 ore.

In questo stadio è possibile addizionare soluzioni acquose di conservanti. Esempi specifici di conservanti utili sono il metil-p-idrossibenzoato e il propil-p-idrossibenzoato. L'aggiunta di tali conservanti contribuisce al mantenimento della qualità microbiologica del prodotto, che deve rispondere ai requisiti microbiologici richiesti per le preparazioni farmaceutiche.

La sospensione, eventualmente contenente i conservanti, viene sottoposta ad una nuova fase di dilacerazione

condotta a pH compreso tra 6 e 11, preferibilmente tra 8 e 9, che conduce alla soluzione di ferro-succinilcaseina.

La fase acquosa viene ulteriormente chiarificata per filtrazione.

Dalla soluzione chiarificata si precipita mediante acidificazione il derivato ferro-succinilcaseina, che viene filtrato e recuperato.

Nello stadio 4), il derivato ferro-succinilcaseina viene sottoposto ad essiccamento ad una temperatura compresa tra 60°C e 80°C, a pressione compresa tra 20 e 200 mm Hg per un tempo compreso tra 15 e 36 ore, preferibilmente tra 20 e 24 ore. E' inoltre essenziale che

durante le prime 13 ore di essiccamento la temperatura sia compresa tra 70°C e 75°C.

Al termine dell'essiccamento il prodotto contiene un residuo massimo di umidità inferiore al 5%, ed un contenuto di ferro legato compreso tra il 5%e il 5.6% in peso calcolato sulla sostanza secca. La composizione dei prodotti secondo la presente invenzione è molto costante. Per una caratterizzazione completa del prodotto si fa riferimento ai dati riportati nell'esempio 1.

Il processo descritto permette di ottenere ferro-succinilcaseina esente da residui o derivati del ferro insolubili o scarsamente solubili in acqua. In particolare il prodotto risulta completamente solubile a valori neutri/alcalini di pH che competono al tratto intestinale, garantendo quindi la massima biodisponibilità di ferro ai fini dell'assorbimento intestinale.

Il processo descritto permette inoltre di ottenere la ferro-succinilcaseina in rese elevate, generalmente comprese tra 94% e 98%; tali rese sono sensibilmente superiori a quelle ottenibili secondo il processo descritto in GB-A-2115821.

I complessi di ferro succinilcaseina secondo la presente invenzione hanno composizione costante, hanno un'ottima attività farmacologica legata al loro comportamento come carrier di ferro e sono privi di effetti collaterali. L'impiego terapeutico di questo prodotto evita gli svantaggi dei composti noti a base di ferro, in particolare la gastrolesività.

Il prodotto secondo la presente invenzione può venire adeguatamente formulato in specialità farmaceutiche adatte alla somministrazione per

via orale.

La presente invenzione comprende dunque composizioni farmaceutiche contenenti ferro-succinilcaseina in associazione con opportuni eccipienti, diluenti e conservanti farmaceutici.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è costituito dall'uso del complesso ferrico sopra descritto per la preparazione di medicinali per il trattamento terapeutico di stati patologici derivanti dalla carenza di ferro in conseguenza ad esempio di alterazioni fisiologiche, emorragie periodiche, malattie infettive, gravidanza, allattamento, imperfetta utilizzazione metabolica. Esempi di tali infermità sono dati dalle anemie, in particolare l'anemia ipocromica sideropenica.

A scopo illustrativo ma non limitativo della presente invenzione, viene riportato il seguente esempio sperimentale.

Esempio 1 - Preparazione di ferro-succinilcaseina

(A) Succinilazione della caseina alimentare

L'acqua utilizzata nell'intero processo produttivo è microbiologicamente pura.

In un reattore di acciaio inox dotato di agitatore ad ancora e di una sonda per la lettura del valore di pH, si caricano 2700 l di acqua purificata e 200 kg di caseina alimentare e la miscela è mantenuta in agitazione fino ad ottenere una sospensione omogenea a pH 5. A tale sospensione si addizionano circa 20 l di una soluzione di NaOH al 15% p/v, ad una temperatura di 20°C, nel tempo di 20 minuti, fino ad ottenere un valore di pH pari a 8.

Alla soluzione così preparata vengono aggiunti, alla temperatura di

20°C, 60 kg di anidride succinica e circa 150 l di una soluzione al 15% di NaOH, in modo da mantenere il valore di pH tra 7.5 e 8.5. Durante il processo, che ha una durata di circa 2 ore, viene insufflato saltuariamente azoto gassoso dal fondo del reattore, allo scopo di evitare accumuli di anidride succinica.

Al termine della reazione, la miscela è lasciata riposare per 60 minuti.

(B) Trasferimento e purificazione di caseina succinilata mediante precipitazione

La soluzione ottenuta dallo stadio (A) viene trasferita in un reattore smaltato, dotato di agitazione e di un'opportuna sonda per la lettura del valore di pH.

La soluzione, mantenuta alla temperatura di 20°C, viene quindi acidificata con 150 l circa di una soluzione di HCl al 15% p/v nel tempo di 45 minuti, fino al raggiungimento di pH 3. La diminuzione di pH provoca la formazione di un precipitato di caseina succinilata purificata da altri sali, altri prodotti di reazione, impurezze solubili.

(C) Filtrazione e dilacerazione

La succinilcaseina ottenuta nello stadio (B) viene recuperata per filtrazione, lavando poi reattore e filtro con 100 l di acqua purificata. Il prodotto umido è scaricato dal filtro, caricato e sottoposto ad agitazione in un reattore di acciaio inox, dotato di agitatore ad ancora e di apposita sonda per la lettura del valore di pH, preventivamente caricato con 2700 l di acqua purificata.

La sospensione che si forma è mantenuta in agitazione per 1,5-2 ore, alla temperatura di 20°C, e quindi sottoposta a dilacerazione. Questa

operazione è determinante ai fini di ottenere alte rese e di evitare la formazione di indesiderati residui insolubili nel prodotto finale.

Dopo 30 minuti di dilacerazione, alla sospensione sono aggiunti 60 l circa di una soluzione di NaOH al 15% p/v, fino al raggiungimento di un valore stabile di pH compreso tra 8,2-8,5. Al termine dell'aggiunta, la massa di reazione è nuovamente trattata nello stesso reattore, per un tempo di circa 6 ore, mediante pompe dilaceratrici. L'operazione facilita la disgregazione delle particelle solide di caseina succinilata.

(D) Chiarificazione, reazione con cloruro ferrico e filtrazione di ferro-succinilcaseina grezza

Dopo aver interrotto l'agitazione per 30 minuti, la sospensione di caseina succinilata viene filtrata; il reattore ed il filtro sono quindi lavati con 200 l di acqua purificata e le acque di lavaggio sono riunite alla soluzione chiarificata.

Questa soluzione viene inviata in un reattore smaltato dotato di agitatore ad impeller e di una apposita sonda per la lettura del valore di pH.

Si aggiunge quindi una soluzione di 58.3 Kg di cloruro ferrico in 600 l di acqua alla temperatura di 20°C nel tempo di 40 minuti, fino al raggiungimento di un valore stabile di pH pari a 3 (eventuali correzioni di pH possono essere fatte con HCl al 15%). Si ottiene una sospensione di ferro- succinilcaseina. La massa di reazione è mantenuta sotto agitazione per 30 minuti e il derivato ferro-succinilcaseina grezzo viene recuperato per filtrazione.

Il reattore ed il filtro sono lavati con 100 l di acqua purificata.

(E) Parziale purificazione di ferro-succinilcaseina ed aggiunta dei

conservanti

Il derivato ferro-succinilcaseina grezzo, recuperato dal filtro allo stadio precedente, è caricato e sottoposto ad agitazione in un reattore di acciaio inox dotato di agitatore ad ancora e di apposita sonda per la lettura del valore di pH, contenente 3000 l di acqua purificata. La sospensione che si forma viene mantenuta sotto agitazione per 1 ora a temperatura ambiente e sottoposta all'azione di una pompa dilaceratrice per 1 ora.

Si aggiungono quindi 30 l circa di una soluzione acquosa di NaOH al 15%, sempre alla temperatura di 20°C, fino ad ottenere un valore di pH compreso tra 5,5-6,5.

Alla miscela di reazione sono quindi addizionate due soluzioni costituite rispettivamente da 13,3 kg di metil p-idrossibenzoato in 50 l di acqua purificata, e da 3,6 kg di propil p-idrossi-benzoato in 50 l di acqua purificata. Al termine dell'aggiunta dei suddetti conservanti, la massa di reazione presenta un pH pari a 7.2.

Alla sospensione così ottenuta sono aggiunti 10 l circa di una soluzione acquosa di NaOH al 15%, alla temperatura di 20-25°C, fino ad un valore stabile di pH pari a 8,3-8,5. Durante tale aggiunta, la massa di reazione è sottoposta a dilacerazione per 8 ore, attraverso pompe dilaceratrici. Si ottiene una soluzione che viene lasciata a riposo per 1 ora.

(F) Chiarificazione, purificazione ed isolamento di ferro-succinilcaseina pura umida

La soluzione ottenuta allo stadio precedente viene filtrata, dando

un residuo insolubile inferiore allo 0,5% in peso.

Alla soluzione limpida, caricata in un reattore smaltato dotato di agitatore ad impeller e di apposita sonda per la lettura del valore di pH, sono aggiunti per colaggio 40 l circa di una soluzione acquosa di HCl al 15%, alla temperatura di 20-25°C, nel tempo di circa 30-40 minuti, fino ad un valore di pH pari a 2,8-3.

Al termine dell'aggiunta, la massa è mantenuta sotto agitazione per 30 minuti, ed il precipitato di ferro -succinilcaseina pura formatosi viene recuperato per filtrazione e successivo lavaggio con acqua purificata.

(G) Essiccamento di ferro succinilcaseina

Il prodotto puro umido ottenuto allo stadio precedente, è essiccato ad una pressione pari a 150 mmHg (0.197 atm) , ad una temperatura crescente tra 60 e 80°C, per un tempo complessivo di 24 ore, ma mantenendo la temperatura tra 70°C e 75°C durante le prime 13 ore di essiccamento.

Al termine dell'essiccamento si sono ottenuti 225kg di ferro succinilcaseina pura, con un contenuto d'acqua < 5% in peso (Karl Fisher), avente le seguenti caratteristiche chimiche e chimico-fisiche:

colore:	marrone-rosso
solubilità:	solubile in NaOH pH=8
pH:	2,7
Fe libero:	< 50 ppm
Fe totale:	5,4% in peso
proteine:	76,52% in peso

acido succinico totale: 8% in peso

acido succinico libero: 0,9% in peso

cloruri: 1,58% in peso

metil p-idrossibenzoato: 3% in peso

propil p-idrossibenzoato: 1,05% in peso

Inoltre, accurate analisi hanno confermato l'assenza di contaminazioni microbiologiche.

RIVENDICAZIONI

1. Ferro-succinilcaseina ottenuta da caseina alimentare.

2. Processo per la preparazione di ferro-succinilcaseina mediante (a) reazione di caseina con anidride succinica a formare succinilcaseina, e (b) reazione della succinilcaseina con cloruro ferrico, a formare ferro-succinilcaseina, caratterizzato dal fatto che:

- la caseina utilizzata è caseina alimentare;
- la succinilcaseina e la ferro succinilcaseina ottenute nel corso del processo, vengono dilacerate tramite pompe dilaceratrici a pH compreso tra 6 e 11;
- la ferro-succinilcaseina ottenuta al termine del processo viene essiccata in un tempo di 15-36 ore, ad una temperatura compresa tra 60°C e 80°C, a pressione compresa tra 20 e 200 mmHg (0.0263 e 0.263 atmosfere), mantenendo la temperatura tra 70°C e 75°C durante le prime 13 ore di essiccamento.

3. Processo secondo la rivendicazione 2, dove le fasi di dilacerazione vengono condotte a pH compreso tra 8 e 9.

4. Processo secondo la rivendicazione 2, dove la fase di essiccamento viene condotta in un tempo compreso tra 20 e 24 ore.

5. Complesso ferrico succinilato di caseina alimentare ottenuto secondo il processo descritto nella rivendicazione 2.

6. Composizione farmaceutica per il trattamento terapeutico di stati patologici derivanti dalla carenza di ferro, contenente il complesso ferrico succinilato di caseina alimentare in associazione con opportuni eccipienti, diluenti e conservanti farmaceutici.

7. Uso del complesso ferrico di caseina alimentare succinilata per la preparazione di forme farmaceutiche orali medicinali per il trattamento terapeutico di stati patologici derivanti dalla carenza di ferro.

8. Uso secondo la rivendicazione 7, in cui lo stato patologico è l'anemia ipocromica sideropenica.

(GER/lm) .

Milano, li 24.12.1997

p. CHEMI S.p.A.

il Mandatario

Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.