



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 258 391**

② Número de solicitud: 200402640

⑤ Int. Cl.:

C07K 14/77 (2006.01)

A23J 1/00 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **03.11.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

Fecha de la concesión: **22.10.2007**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2007**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

⑦ Titular/es: **TEDEC-MEJI FARMA, S.A.**
Ctra. M-300, Km. 30,500
28802 Alcalá de Henares, Madrid, ES
SYNTEX URUGUAYA, S.A.

⑧ Inventor/es: **Díaz, Víctor Bautista**

⑨ Agente: **Rodríguez Pérez, Jesús**

⑩ Título: **Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente y método para su obtención.**

⑪ Resumen:

Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente y método para su obtención.

Se trata de aductos solubles en agua con complejos de polialcoholes monosacáridos con hierro trivalente con ovoalbúmina soluble y desensibilizada, para la formación de composiciones farmacéuticas o veterinarias junto con excipientes aceptables, o composiciones dietéticas junto con otros aditivos opcionales, empleados para el tratamiento de estados carenciales de hierro en personas o animales; siendo el polialcohol un compuesto que contiene más de un grupo hidroxilo y que es capaz de formar complejos con hierro (III), la ovoalbúmina ha sido sometida a un proceso térmico, alcalino, enzimático y oxidante para su solubilización y purificación, sin afectar mayormente a su peso molecular, destruyendo a la vez impurezas indeseables y fenómenos de alergia e inmunotoxicidad, el aducto se obtiene mezclando la solución del complejo férrico con la solución de ovoalbúmina tratada.

ES 2 258 391 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente y método para su obtención.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un producto formado a base de aductos de ovoalbúmina soluble con complejos formados entre polialcoholes derivados de monosacáridos y el hierro trivalente, para su posterior utilización en composiciones tanto farmacéuticas como dietéticas, que van a ser empleadas en el tratamiento terapéutico de estados carenciales de hierro en personas o animales.

Otro objeto de esta invención lo constituye un método para el tratamiento de ovoalbúmina que permite su solubilización sin afectar mayormente a su peso molecular, así como eliminar fenómenos de alergia e inmunotoxicidad asociados con dicha ovoalbúmina, y eliminación, dentro del ámbito de preparación industrial, de fenómenos de gelificación inutilizante del lote, y de aparición azarosa, debido a la presencia incontrolable de impurezas naturalmente presentes en la ovoalbúmina comercial.

Antecedentes de la invención

La albúmina es un carrier, es decir un vehículo o transportador fisiológico que, como es sobradamente conocido, transporta en el medio interno productos de por sí insolubles como pueden ser ácidos grasos, esteroides, compuestos hidroxilados, etc. Así, las albúminas en general desarrollan funciones de depósito, de intercambio y aún de cesión regulada de moléculas bioactivas pequeñas, y generalmente insolubles en agua.

Como es conocido existen albúminas procedentes de tres orígenes distintos, a saber, suero sanguíneo, leche o la clara del huevo.

La seroalbúmina es específica de cada especie, y lleva asociados riesgos de contaminación con otras proteínas, así como con partículas virales, originando problemas de transmisión de patologías entre especies. Además, es difícilmente soluble en agua y tiene un precio elevado.

La lactoalbúmina, presente en la leche, sólo dispone de una única fuente de obtención técnica, la leche bovina. Hecho este que hace que esta proteína sea cara y difícil de aislar y purificar.

La ovoalbúmina es mayoritaria en la clara de huevo, es barata y comercialmente asequible. Constituye de hecho el 75% de la clara de huevo de gallina, en donde está acompañado de cantidades minúsculas de avidina, lisozima, conalbúmina y ovomucoide. Desafortunadamente, la utilización de ovoalbúmina como vehículo farmacéutico, está severamente limitada por diversos factores. En particular, es desnaturalizada por temperaturas no demasiado altas, de aproximadamente 56°C, por agitación energética, y porque la avidina, su acompañante natural, es un factor tóxico que inactiva la biotina, de aquí su nombre de factor nocivo de la clara de huevo, producto del cual la purificación resulta muy difícil.

A todo esto hay que añadir otra dificultad adicional importante en la utilización de la ovoalbúmina como vehículo farmacéutico, es la referida al problema de la alergia e inmunotoxicidad que induce, en no pocas personas, la administración de clara de huevo. Por tanto, para la utilización de la ovoalbúmina en tales vehículos, es necesario efectuar tratamientos que eliminen la toxicidad intrínseca, así como la asociada a impurezas, fundamentalmente avidina.

La modificación química de las albúminas debe también solucionar problemas de falta de solubilidad de las mismas, sin afectar su capacidad de transportar, así como eliminar inconvenientes por desnaturalización de tales albúminas por calor, agitación o por la adición de metales de transición, muchos de ellos, por cierto, biológicamente activos, como hierro, cobalto, etc.

El problema de la falta de solubilidad de las albúminas, en orden a constituir aductos estables, químicamente definidos e industrialmente aptos de ser preparados, no es un problema menor. En particular, la ovoalbúmina acarrea serios problemas de insolubilidad y aún de gelación, es decir de formación de geles, hidrocoloides de viscosidad elevada, que no fluyen y que son responsables del fracaso en la obtención industrial de no pocos lotes de producción. Como se ha establecido, la ovoalbúmina comercial no contiene más que un 75% en peso de ovoalbúmina propiamente dicha, y son las impurezas acompañantes las responsables de los procesos de gelificación en solución acuosa. En particular, la presencia de ovomucoide es la que ofrece mayores inconvenientes al logro de un aducto de ovoalbúmina perfectamente soluble en combinación con complejos ferri-polialcohólicos.

En el ámbito de la investigación farmacéutica se han efectuado esfuerzos muy importantes para vehiculizar eficientemente sustancias terapéuticas activas, mejorando la tasa de aceptabilidad gástrica, protegiendo a la molécula activa de la degradación gástrica o intestinal, mejorando la eficacia terapéutica, etc.

Existen numerosos y excelentes ejemplos sobre cómo preparar y vehiculizar complejos férricos para la administración terapéutica en medicina humana y veterinaria.

Así, por ejemplo, se han descrito las propiedades quelantes de metales por parte de la conalbúmina (J. Am. Chem. Soc. 75, 5094, 1953). También se han descrito unos derivados lácteos adecuadamente modificados con objeto de solubilizar metales de transición a pH fisiológico (Drug Res. 34 (II) N° 9, 1984), así como también complejos de hierro trivalente con coligandos de tipo hidratos de carbono (Inorg. Chim. Acta, 124, 55-59, 1986) entre los cuales se encuentra el sorbitol (Inorg. Chim. Acta 80, 251-254, 1983).

Más aún, la preparación de sacarato y de fructato férrico, estabilizados y vehiculizados con compuestos aminados, ha sido descrita en la solicitud de patente europea EP 0223153 (Mediolanum Farmaceutici), que está relacionada con la mejor forma de vehiculizar y administrar terapéuticamente complejos férricos inestables.

La solicitud de patente española n° 9602180 (15 de octubre de 1996) describe métodos de tratamiento de la ovoalbúmina con álcali (NaOH), calefacción y oxidación controlada con peróxido de hidrógeno en solución, esto último con fines inactivantes de riesgo biológico.

Si bien es cierto que el citado tratamiento térmico, alcalino y oxidante hace posible la preparación de aductos estables con complejos ferri-polialcohólicos, el ejercicio de este método en la práctica técnica, demuestra que el proceso de gelificación que aparece en no pocos lotes de producción no ha sido solucionado en su totalidad, constituyendo así un inconveniente mayor para la preparación a gran escala de estos productos antianémicos. Es verdad que cuando la ovoalbúmina comercial se somete a penosos procesos de purificación, tal como los bien citados de fraccionamiento con sulfato de amonio (Sorensen *et al*, Rev. Trav. Lab. Carisberg, 12, 12, (1917)) el fenómeno se soluciona, pues el ovomucoide resulta así eliminado.

Pero sucede que la purificación con sulfato de amonio por el método Sorensen es aplicable a la clara de huevo tal cual, y no a la albúmina comercial en forma sencilla, en parte porque esta ovoalbúmina está desnaturalizada por el secado en espray, y en parte porque las fuertes concentraciones de sulfato amónico utilizadas hacen imperiosa una diálisis posterior, la cual es dificultosa por tratarse de diálisis de hidrocoloides nativos.

De manera que, en otras palabras, no es posible económicamente trabajar con ovoalbúmina pura, siendo además impracticable la purificación a gran escala por el método descrito de la ovoalbúmina comercial, para privarla de ovomucoide. Por tanto, se deberían realizar grandes esfuerzos para lograr un método que, en asociación a los procesos térmicos, alcalinos y oxidantes, eliminaran "*in situ*" la indeseable interferencia que ocasiona la presencia de ovomucoide sin necesidad de penosas y aún impracticables etapas de purificación de la ovoalbúmina inicial. Ninguna de las artes previas citadas describen la idea de remediar el comportamiento fisiológico de un transportador proteico natural, a través de tratamientos químicos que aseguren la eliminación de efectos indeseables, como alergias, inmunotoxicidad, presencia viral, etc., la generación de métodos industriales de preparación sin inconveniente de tales aductos, y la potenciación de efectos deseables tal como la solubilidad, protección gástrica, cesión regulada del hierro, etc.

Descripción de la invención

El método para la obtención de aductos de ovoalbúmina soluble con complejos de polialcoholes monosacáridos con hierro trivalente, que la invención propone resuelve de forma plenamente satisfactoria la problemática anteriormente expuesta, en todos los aspectos comentados.

En un primer objeto de la invención, se proporciona un método para el tratamiento de la ovoalbúmina, que permite su solubilización sin afectar mayormente su peso molecular, así como la eliminación de fenómenos de alergia e inmunotoxicidad asociados, como anteriormente se ha comentado, con dicha albúmina.

Son numerosos los estudios y ensayos que han puesto de manifiesto que, cuando se trata la ovoalbúmina en condiciones controladas de alcalinidad, a través de un método que regula temperaturas, tiempos y adición de oxidantes, conduce a la obtención de un tipo de ovoalbúmina soluble, útil para preparar aductos con compuestos polialcohólicos de hierro trivalente.

Así, el método de tratamiento de la ovoalbúmina que la invención propone, comprende una serie de etapas que se describen a continuación.

En primer lugar se añade una solución de una base concentrada, preferentemente hidróxido sódico (NaOH), a una suspensión de albúmina en agua, en la cantidad que sea necesaria para alcanzar una concentración final de NaOH de 1 M, agitando de manera enérgica, llevándose a cabo a la vez un fuerte calentamiento hasta alcanzar una temperatura comprendida entre 63°C y 67°C, manteniendo dicho calentamiento y agitación durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 minutos y una hora.

El siguiente paso consiste en neutralizar la solución anteriormente preparada por adición de un ácido adecuado, por ejemplo HCl, hasta ajustar el pH a un valor comprendido entre 8.5 y 10.

Seguidamente se añade una proteasa alcalina, de procedencia fúngica o bacteriana, en proporción 1% sobre el peso de ovoalbúmina inicial, procediendo a una cuidadosa proteólisis controlada que actúa fundamentalmente, dentro de los tiempos en que se practica, hidrolizando el ovomucoide dejando a la ovoalbúmina prácticamente inalterada.

ES 2 258 391 B1

Finalmente se añade H₂O₂ en cantidad comprendida entre el 4 y el 8% respecto de la ovoalbúmina. El tratamiento proteolítico llevado a cabo en el paso anterior, hace innecesaria todo proceso de purificación que se pudiese llevar a cabo posteriormente, por ejemplo, por ultrafiltración que elimine sales, peróxido y sustancias de bajo peso molecular producidas por la calefacción alcalina, procediéndose directamente a la aducción con complejos férricos, tal como se detallará más adelante.

La suspensión de ovoalbúmina en agua contendrá, ventajosamente, una concentración foral de ovoalbúmina comprendida entre el 3% y el 7% en relación peso/volumen. La suspensión se realiza mediante la adición de la ovoalbúmina, normalmente en forma de polvo, al agua en una cantidad adecuada para dar la concentración final antes citada.

La solución así obtenida contiene la ovoalbúmina tratada, apta para vehiculizar los complejos férricos antes mencionados, para la formación de aductos moleculares.

En relación con las condiciones operativas del método descrito previamente, se ha podido comprobar que:

- Una concentración de ovoalbúmina inferior al 3% (p/v) no es aconsejable pues resulta agredida en su integridad molecular por el ataque alcalino, mientras que a concentraciones superiores al 7%, la elevada concentración proteica conduce a soluciones con tendencia a formar geles, tanto más cuanto más se baje el pH, al neutralizar el NaOH.

- La concentración mas apropiada de NaOH en la solución es de 1 M, ya que es la concentración adecuada y validada para la inactivación viral.

- La temperatura de calentamiento debe estar comprendida entre 63°C y 67°C ya que temperaturas mayores producen una hidrólisis alcalina de la estructura proteica a dicha concentración de NaOH, mientras que a temperaturas inferiores a los 63°C, la inactivación alcalina puede no transcurrir totalmente, además de rendir productos finales con una solubilidad cuestionable.

- El tiempo de tratamiento alcalino debe estar comprendido entre 15 y 60 minutos, ya que por debajo de 15 minutos, los productos resultantes no son adecuadamente solubles, mientras que por encima de 60 minutos, procede una importante degradación alcalina de la estructura proteica, sin conservación del peso molecular de la proteína nativa.

- La proteasa alcalina debe agregarse al pH citado en la cantidad mencionada de 1% del peso de ovoalbúmina, pues dicha cantidad asegura la destrucción de impurezas gelificantes y una inalterabilidad de la ovoalbúmina en sí misma. Así mismo, el plazo de dos horas de digestión resulta el adecuado, con menos tiempo la inactivación de la capacidad de formar geles no es segura; con mayor tiempo de tratamiento proteolítico comienza la degradación de la ovoalbúmina medida por el enzima.

- El H₂O₂ debe añadirse en la cantidad mencionada entre el 4 y el 8% respecto a la ovoalbúmina, pues dicha cantidad está dentro de los límites necesarios para que, compensando la destrucción parcial del H₂O₂, en el medio acuoso a pH 8,5 - 10 se equipare a la actividad inactivante de la biotina por medio de la radiólisis del agua pura. Concentraciones menores de H₂O₂ no son necesariamente inactivantes, mientras que concentraciones mayores originan depolimerización de la ovoalbúmina, modificando fuertemente su condición de vehículo de los citados complejos férricos. Es importante mencionar que el método de tratamiento de la albúmina anteriormente descrito, no afecta mayormente al peso molecular de la proteína, permitiendo operar en condiciones térmicas en las que la proteína nativa no sería soluble. Tratada de esta forma, la proteína no es coagulable por la acción de cationes floculantes, tal como el Fe³⁺, vehiculizando en solución complejos férricos que son insolubles en agua a pH fisiológico. Por otra parte, el citado tratamiento enzimático proteolítico asegura que la ovoalbúmina no formará productos gelificados durante los procesos de preparación industrial y durante su aducción con los citados complejos férricos, lo que originaría cuantiosas pérdidas económicas por el descarte obligado de lotes de producción. Dicho tratamiento permite eliminar problemas de inmunotoxicidad y alergia que están basados en la presencia de avidina y en las características alergénicas de la proteína. El problema del choque alérgico se elimina a través de la digestión alcalina efectuada a temperatura controlada en medio acuoso. La avidina se destruye por calefacción y por irradiación, sobre todo en solución acuosa. En efecto, irradiando el agua con rayos X o δ electrónicos de alta energía, se obtienen varias especies radicalarias sumamente reactivas (HO \cdot , H \cdot , HO₂) que como es conocido, desnaturalizan y fragmentan las lábiles moléculas de proteínas y de ácidos nucleicos. En particular, los sistemas biológicos se muestran muy sensibles a la radiación, más aún cuando son irradiados en presencia de oxígeno o de aires. Existe una marcada imposibilidad técnica en el criterio de irradiación de soluciones acuosas a escala industrial. La adición de agentes oxidantes que se descomponen termolíticamente generando una cascada similar de radicales libres, ha resuelto esta imposibilidad técnica de la irradiación de soluciones acuosas a gran escala, permitiendo la destrucción controlada de la avidina por medio de la peroxidólisis del agua oxigenada. En condiciones controladas, esta descomposición radicalaria no afecta a la ovoalbúmina pero permite destruir a la avidina. La descomposición espontánea termolítica del H₂O₂ por la reacción de Haber-Weiss conduce a la obtención de las mismas especies radicalarias que la radiólisis del agua:



ES 2 258 391 B1

Asimismo, este cuidadoso tratamiento térmico, alcalino y oxidante, ha resultado validado como el más eficiente para la eliminación de virus convencionales y lentos. Con el método de tratamiento de la ovoalbúmina proporcionado por esta invención, se han obtenido aductos estables de complejos polialcohólicos de cationes trivalentes, en particular de Fe^{3+} , con la ovoalbúmina así tratada.

De este modo la invención proporciona unos aductos estables de complejos polialcohólicos de hierro (III) con ovoalbúmina soluble. En una realización particular de los aductos de esta invención, dicho polialcohol es un polialcohol derivado de un monosacárido. En una realización particular y preferida, dicho polialcohol se selecciona del grupo formado por manitol y sorbitol.

Según una realización particular, los aductos formados según la invención responden a la siguiente fórmula general:

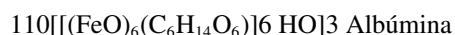


donde x es un número entero seleccionado entre 5, 6 ó 12; o bien de fórmula general:



donde x tiene el significado previamente indicado, es decir, x se selecciona entre 5, 6 ó 12.

En una realización particular y preferida de esta invención, el aducto responde a la siguiente fórmula molecular:



La obtención de tales aductos comprende, por tanto, una etapa de tratamiento de la ovoalbúmina, otra etapa de formación del complejo poliólico de hierro trivalente y una tercera etapa de formación del aducto por reacción de la ovoalbúmina tratada con dicho complejo polialcohólico de hierro trivalente.

Para la formación de los complejos polialcohólicos de hierro trivalente se mezclan y disuelven en agua una fuente de iones férricos, por ejemplo cloruro férrico, y el polialcohol en medio básico, obteniéndose una solución que se calienta a una temperatura de 95°C aproximadamente para completar la complejación, posteriormente se enfría.

Para la formación de los aductos de ovoalbúmina con complejos polialcohólicos de hierro (III) se añade la solución de ovoalbúmina tratada sobre la solución acuosa del complejo férrico bajo agitación.

El aducto resultante de alto peso molecular, se purifica a través de una etapa de ultrafiltración que elimina péptidos de bajo peso molecular,

complejos férricos de bajo peso molecular y restos de polisacáridos provenientes de la estructura catenaria del ovomucoide destruido “*in situ*” a través del tratamiento porteolítico citado.

El aducto así purificado, sin necesidad de etapas de aislamiento de los productos intermedios, se descarga del ultrafiltro, se ajusta a pH 7,8 - 8,2 y se liofiliza.

El producto obtenido, aducto de albúmina con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, puede ser utilizado para la administración oral con fines terapéuticos en la terapia de reposición de hierro.

De este modo la invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos uno de los aductos previamente descritos, junto con un excipiente aceptable farmacéuticamente o en veterinaria. La invención también proporciona una composición dietética que comprende al menos uno de los aductos previamente descritos, junto con, opcionalmente, otros aditivos y/o sustancias alimenticias.

Los aductos proporcionados por esta invención son adecuados para el tratamiento de estados carenciales de hierro, por ejemplo para el tratamiento de anemias ferropénicas, así como para el aporte o suplemento de hierro, aunque no sea debido a una patología, a una persona o animal en necesidad de ello.

Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1.- Muestra una representación de un espectro ^{13}C -RMN característico de una ovoalbúmina tratada según el procedimiento descrito en la presente invención.

ES 2 258 391 B1

La figura 2.- Muestra un espectro ^{13}C -RMN característico de un aducto de un complejo de hierro (III) - manitol, con ovoalbúmina tratada, proporcionado por esta invención.

La figura 3.- Muestra un cromatograma de permeación característico de ovoalbúmina tratada de acuerdo con el método descrito en la presente invención.

Ejemplos de realización de la invención

Con los siguientes ejemplos se pretende ilustrar realizaciones particulares del objeto de esta invención, y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Aducto entre ovoalbúmina tratada y complejo de hierro (III) - manitol

a) Complejo hierro - manitol: 31,5 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disuelven junto con 7,9 g de manitol en 400 ml de agua. Se agrega bajo fuerte agitación una solución de 18 g de NaOH en 48 ml de agua. Se calienta a 95°C dejando enfriar espontáneamente hasta lograr temperatura ambiente.

b) Ovoalbúmina tratada: 37,50 g de ovoalbúmina comercial en polvo se dispersan bajo fuerte agitación en 180 ml de agua. Se calienta a parte a 65°C una solución de 30 g de NaOH en 550 ml de agua. Se agrega la dispersión proteica sobre la solución alcalina y se procede a digerir a 65°C durante 15 minutos, ajustando entonces el pH al valor de 8,5 - 10 con el HCl 6 M. Manteniendo la solución a 50°C y pH 8,5 - 10 se agrega Esperase[®] (NOVO-NORDISK) en cantidad de 1% sobre albúmina inicial (37,5 mg) digiriendo proteolíticamente bajo suave agitación 2 horas a 50°C sin efectuar corrección de pH. Cumplido el plazo, el pH espontáneo es de 8,5. Se calienta la solución a 80°C para inactivar restos de actividad enzimática, se ajusta pH a 10 con NaOH 10 M y cuando la temperatura desciende a 65°C se agrega 2 ml/l de H_2O_2 al 30% p/v. Se deja enfriar a temperatura ambiente, con lo que precipita un floculo blanco fácilmente filtrable, dejando una solución limpia, de color ambarino y sin olor.

c) Aducto ovoalbúmina - hierro - manitol: se agrega la solución acuosa de hierro manitol sobre la solución proteica obtenida en b), bajo suave agitación. Se ajusta a pH 10 con HCl 2 M y se filtra con Supercel como ayuda filtrante, con lo cual se obtiene una solución limpia de color rojo oscuro. Se concentra por ultrafiltración (Cut Off 10000 Da) hasta un tercio del volumen inicial y se diafiltra a volumen constante contra 10 volúmenes de agua destilada. Se descarga del equipo de ultrafiltración, se ajusta a pH de 8,0 - 8,2 con HCl 2 M, se filtra por placa de profundidad y se liofiliza. Se obtienen 20 g de un polvo liofilizado, color rojo oscuro, que presenta el siguiente análisis característico:

Pérdida por secado:	2%
Hierro total:	15,3%
Hierro orgánico:	15,2%
N total:	8,5%
N amoniacal:	800 ppm
Solubilidad 1%:	limpia
PH al 1%:	8,0
Peso molecular (HPSEC):	200.000 Da*

(*) Columna Bio Sep Sec 4000 (300 x 7,5); solvente NaCl 0,1 M, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,5 M, pH 7,4; detección 280 nm. Calibración efectuada con patrones de peso molecular conocido: Ciocromo 13000 Da, Seroalbúmina bovina 65000 Da, Catalasa 230000 Da, Ferritina Equina 440000 Da.

Ejemplo 2

Aducto de ovoalbúmina tratada con complejo de hierro (III) - sorbitol

a) Complejo de hierro (III) - sorbitol: 31,50 g de $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 400 ml de agua destilada junto con 7,90 g de sorbitol. Se agrega bajo fuerte agitación una solución 10 M de NaOH (45 ml). Se calienta bajo agitación a 95°C , dejando luego enfriar espontáneamente hasta alcanzar temperatura ambiente.

b) Ovoalbúmina tratada: 37,50 g e ovoalbúmina comercial en polvo se tratan en idénticas condiciones en que se procedió en el ejemplo 1.

c) Aducto ovoalbúminba tratada - hierro (III) - sorbitol: se procede a homogeneizar bajo agitación la solución obtenida en a) con la solución proteica de b), procediendo entonces a purificar por ultrafiltración según el ejemplo 1. La solución purificada así obtenida se liofiliza, obteniéndose 20,6 g de un polvo suave, de color rojo oscuro, que presenta el siguiente análisis característico:

ES 2 258 391 B1

Pérdida por secado:	2%
Hierro total:	15,6%
Hierro orgánico:	15,2%
N total:	8,6%
PH al 1%:	8,0

Se procede ahora a la caracterización química y espectroscópica de productos intermedios y finales obtenidos.

En cuanto a la ovoalbúmina tratada, el ejercicio del método de producción, detallado en el ejemplo 1, hace que el intermedio “ovoalbúmina tratada”, no sea aislado ni tenga necesidad de purificación alguna, antes de la aducción con la solución del complejo férrico y esto es debido a las ventajas que aporta al método la proteólisis enzimática controlada de la ovoalbúmina.

Con objeto de obtener el producto intermedio en cuestión, se parte de ovoalbúmina comercial, la cual se somete a los tratamientos de digestión alcalina, proteolítica y oxidante, procediendo luego a purificar el material así obtenido con objeto de caracterización. Esta purificación, como puede verse en los ejemplos 1 y 2, no es necesaria a los fines preparativos, de ahí la simplicidad del método de producción descrito en la invención.

Para su aislamiento y caracterización analítica se procede entonces de acuerdo con el siguiente protocolo: 37,50 g de ovoalbúmina comercial en polvo se dispersan bajo fuerte agitación en 180 ml de agua destilada y se vierten agitando fuertemente sobre una solución constituida por 30 g de NaOH en 550 ml de agua a 65°C. Se digiere con agitación a 65°C durante 15 minutos, se ajusta el pH a 10 con HCl 6 M y se enfría a 48 - 52°C. Se agregan 37 mg de Eperase® digiriendo dos horas a esa temperatura, sin corrección de pH, dejando que el mismo evolucione libremente. Transcurridas 2 horas se calienta a 80°C para inactivar todo resto enzimático, se enfría a 65°C y se agrega 2 ml/l de H₂O₂ al 30%. Se enfría a temperatura ambiente, se filtra para obtener una solución limpia y brillante, lo que no se logra sin la proteólisis enzimática, y se procede a diafiltrar en ultrafiltro hasta reacción negativa de cloruros y frente al reactivo de biuret en los permeatos, lo cual se logra con 15 volúmenes de agua destilada. Es preciso hacer notar que, en el curso de la hidrólisis enzimática se produce la destrucción “*in situ*” del ovomucoide acompañante, responsable de procesos indeseables de gelificación de lotes industriales durante la preparación técnica de los aductos citados. Ello se comprueba porque si en el proceso de ultrafiltración aquí citado se practica una reacción de Molisch sobre gotas del permeato de 10000 Da, se puede ver que se obtiene fuerte reacción positiva de carbohidratos, probablemente productos de degradación proteolítica de la glicoproteína ovomucoide, destruida por el ataque enzimático controlado. Si no se practica el ataque enzimático los citados permeatos dan una reacción de Molisch negativa. De la misma manera, la reacción en los permeatos es negativa si el ataque enzimático aquí detallado se practica sobre ovoalbúmina purificada por el método de Sorensen con sulfato de amonio.

La presencia de oligosacáridos en los permeatos de 10 kDa no provienen de la digestión enzimática de la ovoalbúmina, ni por la digestión alcalina de la ovoalbúmina comercial, sino debido a la degradación proteolítica de las impurezas que, en la práctica técnica, son responsables de fenómenos de gelificación, coagulación en la reacción con el hierro, etc.

El producto liofilizado así obtenido, sea el intermedio ovoalbúmina tratada, presenta el siguiente análisis característico:

	Ovoalbúmina tratada	Ovoalbúmina tratada sin proteasas	Ovoalbúmina datos de bibliografía
N Total	14,0%	14,2%	14,0%
Na Total	1,9%	2,3%	
C	48,0%	47,96%	46,2%
H	7,2%	7,35%	7,7%
O	28,9%	28,2%	

El peso molecular, obtenido por cromatografía de permeación (HPSEC) es de 43000 Da en el caso de un producto tratado sin proteasas, de 43000 Da en el caso de un producto con tratamiento proteolítico tal como el caso de la presente invención, y 45000 Da para ovoalbúmina nativa. Las condiciones operativas de HPSEC son las citadas en el ejemplo 1. Los cromatogramas de permeación característicos aparecen representados en la figura 3.

El espectrograma ¹³C-RNM característico de este intermedio está representado en la figura 1, y muestra la típica complejidad de las estructuras macro moleculares proteicas. El espectro puede ser dividido en tres regiones:

- señales alifáticas (10 - 80 ppm)
- señales aromáticas (120 - 140 ppm)

ES 2 258 391 B1

- señales carboxílicas y amídicas (150 - 190 ppm)

señales menores que reconocen estructuras remanentes de carbohidratos son visibles entre 70 - 110 ppm.

5 En cuanto al aducto de ovoalbúmina tratada con complejo de hierro (III) - manitol, obtenido según el método descrito en el ejemplo, presenta el siguiente análisis característico:

a) sicoanálisis elemental: 33,50% de C, 5,0% de H, 8,6% de N, 1,2% de Cl, 18,3% de Fe, 1,83% de Na y 32,57% de O.

10 b) Peso moleculares: según el método HPSEC, previamente descrito, el valor encontrado es de 210000 Da.

c) relación ovoalbúmina/complejo de hierro (III) - manitol: del porcentaje de N hallado en el aducto (8,62%), y de la relación C/N en la ovoalbúmina tratada (3,42) se desprende que el porcentaje en el aducto perteneciente a la fracción proteica en el aducto es:

$$8,62 \times 3,42 = 29,48\% \text{C perteneciente a la proteína.}$$

20 El % C restante corresponde a la contribución del manitol, esto es: $33,53 - 29,48 = 4,05\% \text{ C}$. Además si 47,96% es el % C en la albúmina tratada, el total de proteínas será:

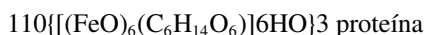
$$25 \quad \frac{29,48 \times 100}{47,96} = 61,5\% \text{ de ovoalbúmina tratada}$$

y para el manitol:

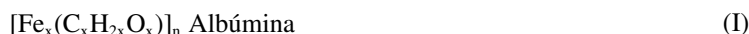
$$30 \quad \frac{4,05 \times 182}{6 \times 12} = 10,2\% \text{ de manitol}$$

por tanto, el aducto contiene 61,5% de ovoalbúmina tratada y 28,5% de complejo de hierro (III) - manitol.

35 d) Fórmula molecular:



40 y en general, aductos de fórmula genérica (I):



45 o bien, de fórmula genérica (II):



50 en donde x es 5, 6 ó 12.

e) ^{13}C -RNM: el espectograma correspondiente, representado en la figura 2, muestra peculiares modificaciones en el perfil del espectro de la proteína, demostrando interacciones entre la ovoalbúmina y el complejo de hierro (III) - manitol, así como modificaciones estructurales en la unidad proteica.

55

60

65

ES 2 258 391 B1

REIVINDICACIONES

1. Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, para la formación de composiciones farmacéuticas o veterinarias junto con excipientes aceptables, o composiciones dietéticas junto con otros aditivos opcionales, empleados para el tratamiento de estados carenciales de hierro en personas o animales, **caracterizado** porque presenta la siguiente fórmula general:

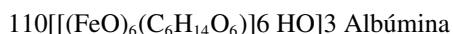


donde x es un número entero seleccionado entre 5, 6 ó 12; o bien de fórmula general:



donde x tiene el significado previamente indicado.

2. Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque en una realización particular y preferida presenta la siguiente fórmula molecular:



3. Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el compuesto polialcohólico es capaz de formar complejos con el hierro (III).

4. Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 3ª, **caracterizado** porque dicho compuesto polialcohólico es un polialcohol derivado de hidratos de carbono monosacáridos.

5. Aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 4ª, **caracterizado** porque dicho compuesto polialcohólico se selecciona entre sorbitol o manitol.

6. Procedimiento para la obtención del aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende una etapa de tratamiento de la ovoalbúmina, otra etapa de formación del complejo poliólico de hierro trivalente y una tercera etapa de formación del aducto por reacción de la ovoalbúmina tratada con dicho complejo polialcohólico de hierro trivalente.

7. Procedimiento para la obtención del aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, **caracterizado** porque dicha fase de tratamiento de la ovoalbúmina está formada por las siguientes etapas:

a) añadir una solución de una base concentrada, preferentemente hidróxido sódico (NaOH), a una suspensión de albúmina en agua, en la cantidad que sea necesaria para alcanzar una concentración final de NaOH de 1 M, agitando de manera enérgica, llevándose a cabo a la vez un fuerte calentamiento hasta alcanzar una temperatura comprendida entre 63°C y 67°C, manteniendo dicho calentamiento y agitación durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 minutos y una hora;

b) neutralizar la solución anteriormente preparada por adición de un ácido adecuado, por ejemplo HCl, hasta ajustar el pH a un valor comprendido entre 8.5 y 10;

c) agregar una proteasa alcalina, de procedencia fúngica o bacteriana, en proporción 1% sobre el peso de ovoalbúmina inicial, y digerir sin corrección de pH durante 2 horas a 48 - 52°C, elevando luego la temperatura hasta alcanzar 80°C, con lo cual se logra la destrucción de impurezas glicificantes;

d) añadir seguidamente H₂O₂ en cantidad comprendida entre el 4 y el 8% respecto de la ovoalbúmina.

8. Procedimiento para la obtención del aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 7ª, **caracterizado** porque la suspensión de ovoalbúmina en agua contiene una concentración final de ovoalbúmina comprendida entre el 3% y el 7% p/v.

9. Procedimiento para la obtención del aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 6ª, **caracterizado** porque para la formación de los complejos polialcohólicos de hierro trivalente se mezclan y disuelven en agua una fuente de iones férricos y el polialcohol en medio básico, obteniendo una solución que se calienta a una temperatura de 95°C aproximadamente para completar la complejación, dejándola posteriormente enfriar.

10. Procedimiento para la obtención del aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 6ª, **caracterizado** porque para la formación de los aductos de ovoalbúmina con com-

ES 2 258 391 B1

plejos de hierro (III) se añade la solución de ovoalbúmina tratada sobre la solución acuosa del complejo férrico bajo agitación.

5 11. Procedimiento para la obtención del aducto de ovoalbúmina soluble con complejos polialcohólicos de hierro trivalente, según reivindicación 6ª, **caracterizado** porque comprende una etapa adicional de purificar el aducto resultante mediante una concentración por ultrafiltración seguida de diafiltración con agua destilada, en ultrafiltro provisto de membrana de ultrafiltración con un peso molecular de 10000 Da.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

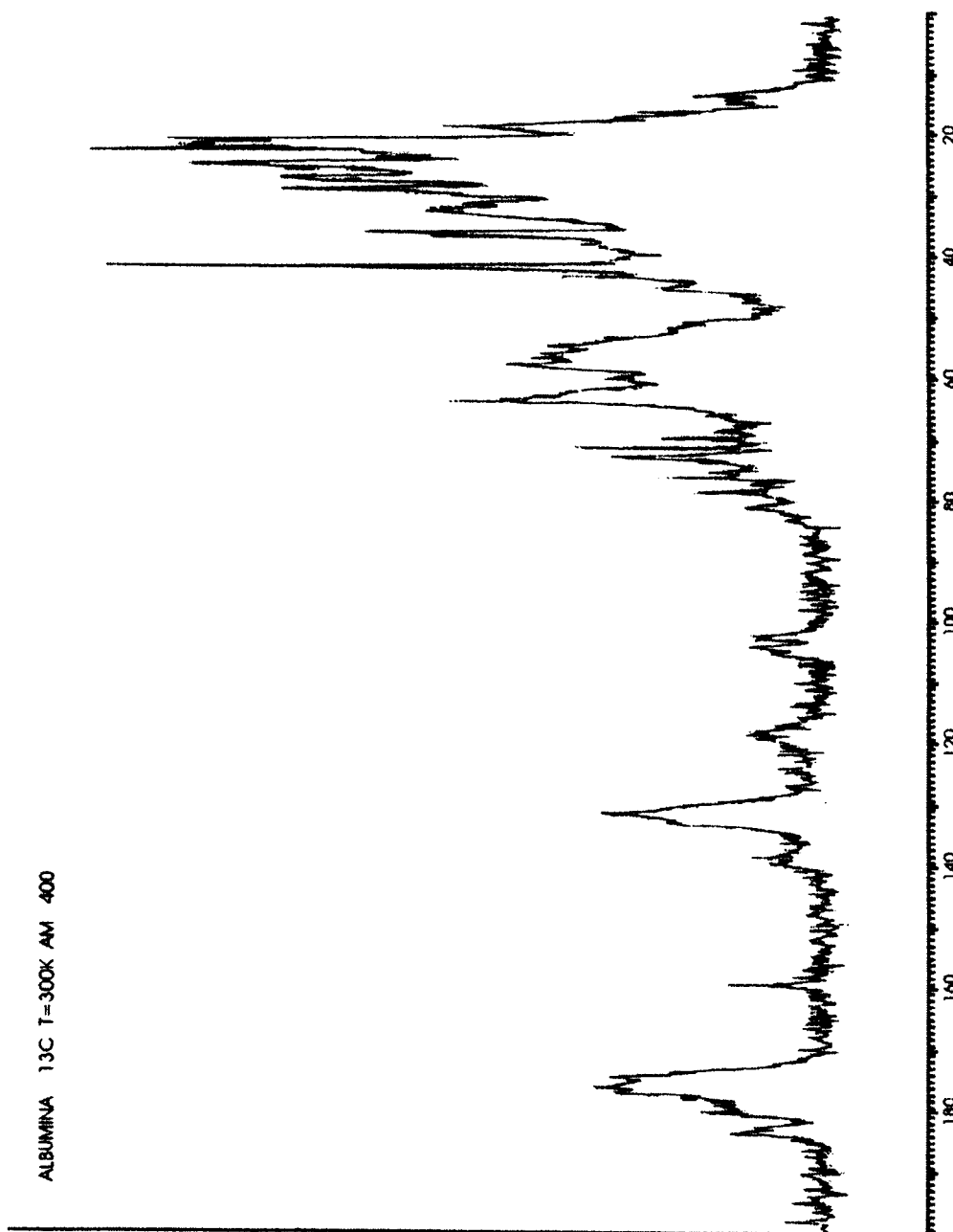


Fig. 1

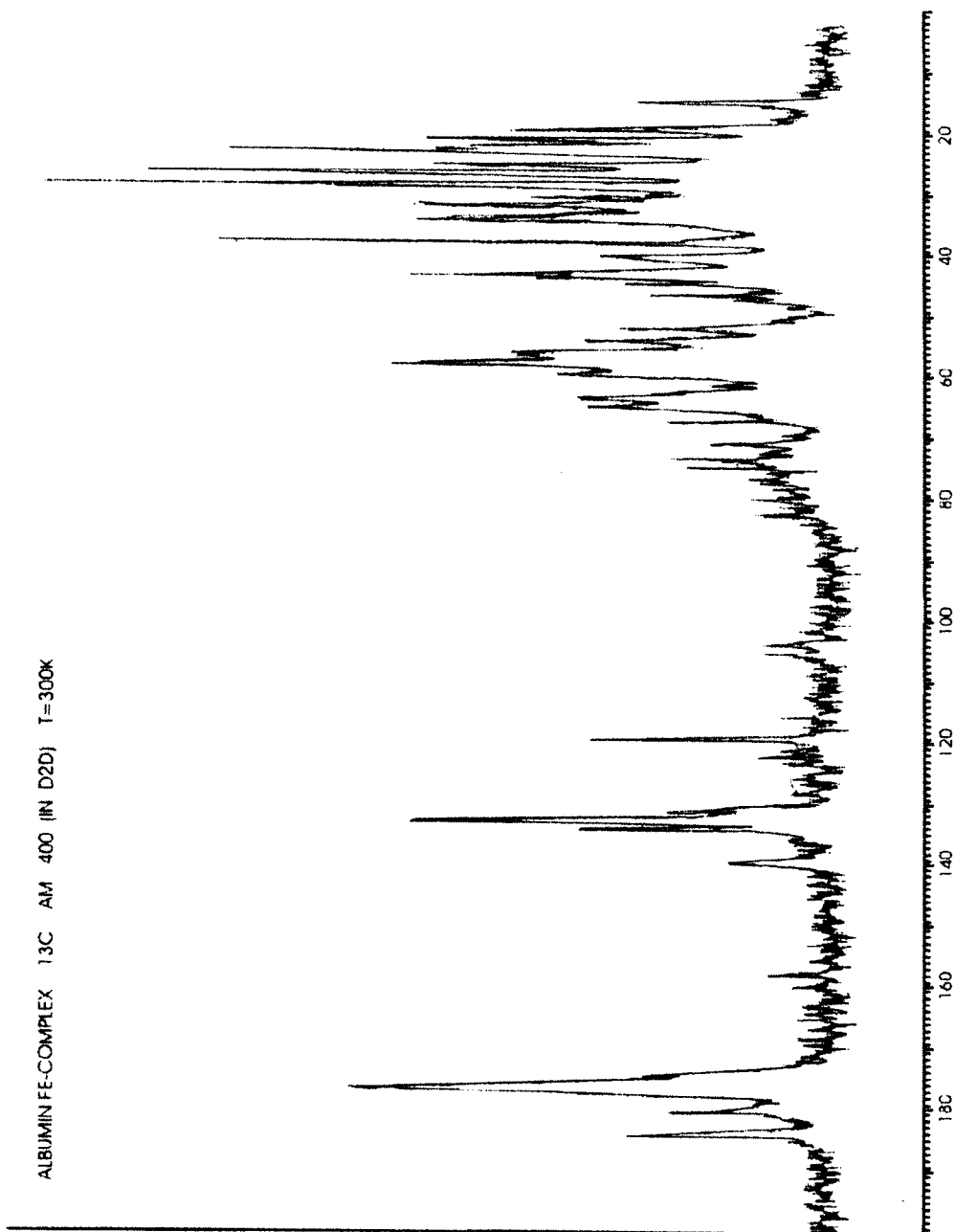


Fig. 2

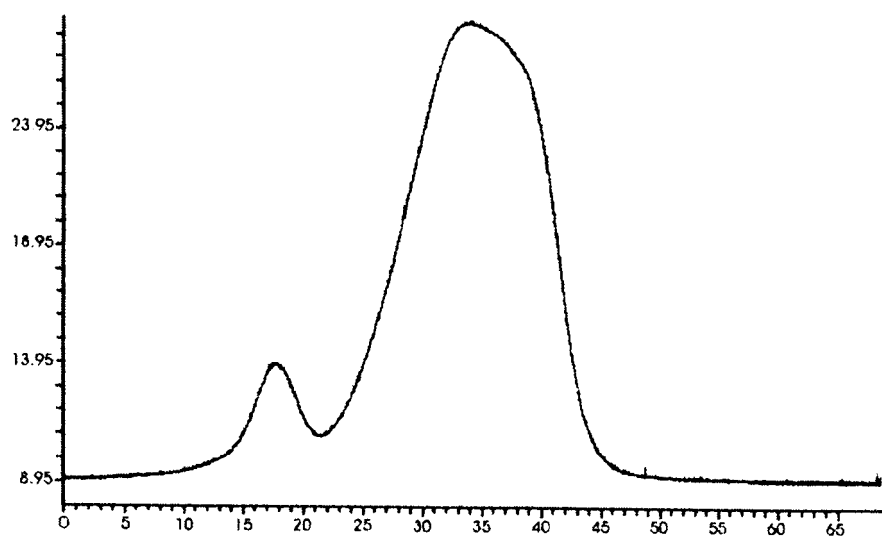


Fig. 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 258 391

② Nº de solicitud: 200402640

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2123432 A1 (SYNTEX S.A.) 01.01.1999, reivindicaciones 1-8,10,13; ejemplos 1,2.	1-6,9-11
X	ES 2188336 A1 (TEDEC MEIJI FARMA, S.A. SYNTEX URUGUAYA S.A.) 16.06.2003, reivindicaciones 1-8,10,13; ejemplos 1,2.	1-6,9-11
A	EP 357776 A1 (PEOPKIPOPOI) 14.03.1990, página 4, líneas 5-7; página 9, línea 19 - página 10, línea 25.	7
A	JAE-SEUNG Y. y col. Changes in Biochemical properties of Ovomuroid by radiation. Radiation Physics and Chemistry. 1996, Vol. 48, Nº 6, páginas 731-735, ISSN 0969-806X. Página 731, columna izquierda.	7
X	EP 875249 A (LABORATORI DERIVATI ORGANICI S.P.A.) 04.11.1998, reivindicaciones 1,13.	1,3-5,9,10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.06.2006

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/77 (2006.01)

A23J 1/00 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)