

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 34319 B1** (51) Cl. internationale : **C07K 1/107; C07K 14/47**

(43) Date de publication :
01.06.2013

(21) N° Dépôt :
35466

(22) Date de Dépôt :
17.12.2012

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/IT2010/000287 30.06.2010

(71) Demandeur(s) :
ITALFARMACO S.P.A., VIALE FULVIO TESTI 330 I-20126 MILANO (IT)

(72) Inventeur(s) :
STEVENAZZI, Andrea ; DE FERRA, Lorenzo ; PINTO, Barbara

(74) Mandataire :
SABA & CO

(54) Titre : **CASÉINESUCCINYLATED DE FER (III) ET SON PROCÉDÉ DE PRÉPARATION**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un caséinesuccinylate de fer (III) caractérisé par une teneur en fer comprise entre 4,5 et 7 % en poids, et par une solubilité dans l'eau supérieure à environ 92 %. La présente invention concerne, en outre, un procédé de préparation d'un caséinesuccinylate de fer (III).

Titre : "Caséinesuccinylate de fer (III) et son procédé de préparation"

ABREGE

5 La présente invention concerne un caséinesuccinylate de fer (III) qui se caractérise par une teneur en fer comprise entre 4.5% et 7% en poids et par une solubilité dans l'eau supérieure à environ 92%.

En outre, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un caséinesuccinylate de fer (III).

10

Nombre de lignes : 760

(SEIZE PAGES)

ITALFARMACO S.P.A.
P. P. SABA & CO., Casablanca

Titre : "Caséinesuccinylate de fer (III) et son procédé de préparation"

La présente invention concerne un caséinesuccinylate de fer (III) qui se caractérise par une teneur en fer comprise entre 4.5% et 7% en poids et par une solubilité dans l'eau supérieure à environ 92%.

- 5 En outre, la présente invention concerne aussi un procédé de préparation d'un caséinesuccinylate de fer (III).

TECHNIQUE ANTERIEURE

Les dérivés du fer sont largement utilisés en médecine pour la prévention et la guérison de l'anémie ainsi que des carences en fer durant la grossesse, dans les cas du syndrome de
10 malabsorption, durant l'allaitement et la croissance. Parmi ceux-ci, la protéine succinylate du fer couramment désignée par l'acronyme IPS se distingue positivement sur le plan de ses caractéristiques de biodisponibilité et de tolérabilité.

Les propriétés chimiques, physiques et biologiques ainsi que la préparation d'IPS, appelée Ironlat, obtenue des protéines de lait sont décrites dans le brevet italien IT1150213. Par
15 ailleurs, la solubilité d'Ironlat est relevée au pH>5 qui est partielle pour le complexe contenant 6.7% de fer et complète pour celui contenant 4.6%.

Cremonesi et al. dans International Journal of Clinical Pharmacology Therapy and Toxicology vol. 31 (1993) pages 40-51 indique les propriétés chimiques et pharmacologiques du caséinesuccinylate de fer (III), le complexe de fer (III) obtenu à
20 partir de la caséine succinylée. Dans les expérimentations in vivo, ce produit, ayant une teneur en fer équivalente à 5%, révèle une meilleure tolérabilité gastro-intestinale par comparaison à d'autres dérivés du fer.

Le brevet européen EP939083B1 décrit un procédé de production du caséinesuccinylate de fer (III) au cours duquel des procédures de dilacération et de séchage spécifiques sont
25 appliquées pour surmonter le problème de la présence de composants insolubles dans le produit. Par ailleurs, ledit brevet décrit l'emploi de la caséine de qualité alimentaire comme matière première à utiliser dans le procédé de production du caséinesuccinylate de fer (III).

Afin de contribuer à maintenir le produit dans les limites spécifiées de la contamination microbiologique, des conservateurs tels le méthylparabène et le propylparabène sont
30 ajoutés durant le procédé ; leur présence aux proportions de 3% et 1.05% est respectivement déterminée quant analysant le produit fini. Un tel emploi de conservateurs est également décrit dans le brevet EP1776382B1 qui introduit l'emploi d'une granulation humide en combinaison avec un séchage par atomisation ou une lyophilisation du produit pour faciliter, au cours du procédé, les processus de solubilisation.

35 La demande de brevet EP319664 propose un procédé à base d'une dégradation enzymatique du caséinesuccinylate de fer (III) pour surmonter les problèmes de solubilité et de viscosité observés dans ce complexe, en particulier lorsque la valeur spécifique du fer dépasse 10%.

La demande internationale de brevet WO2007/065812 décrit la préparation du
40 caséinesuccinylate de fer (III) en exécutant à la fois une réaction de succinylation et une complexation ultérieure en utilisant l'ion de fer (III) actif en suspension, tandis que les aspects relatifs aux difficultés de solubilisation du caséinesuccinylate de fer (III) ne sont pas traités.

En réalité, cette demande de brevet ne fournit pas d'informations concernant la solubilisation du complexe obtenu, et la viscosité de la solution pouvant probablement être obtenue n'est pas mesurée.

De tels problèmes de solubilisation sont particulièrement accentués lorsque la teneur en fer
5 spécifique dépasse la limite de 5%.

Le phénomène d'élévation de la viscosité, observé lorsque la concentration du produit dans la solution aqueuse augmente, rend difficile ou même entrave l'emploi du caséinesuccinylate de fer (III) au-delà des concentrations déterminées.

La combinaison de ces effets limite le dosage du produit à une valeur qui ne dépasse pas
10 800 mg correspondant à environ 40 mg de fer (III) par dose sauf si on a recours à des formulations dépassant 15 ml de solution.

En outre, la viscosité d'une solution aqueuse de caséinesuccinylate de fer (III) complique les opérations de réduction de la teneur microbienne du produit moyennant une filtration ou une microfiltration, et nécessite l'emploi de quantités élevées de conservateurs.

15 D'où, il est évident que la technique actuelle n'offre pas de solutions simples pour surmonter les problèmes de solubilisation du caséinesuccinylate de fer (III), un médicament très efficace pour le traitement de diverses formes de carences en fer.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

On vient de découvrir qu'il est possible d'obtenir des avantages surprenants dans la
20 production du caséinesuccinylate de fer (III) si une caséine alimentaire – qui a été soumise à un procédé de purification visant à éliminer les impuretés protéiques, les impuretés inorganiques et/ou à élever le rapport phosphore/azote (rapport P/N) – est utilisée comme matière première. En effet, il est ainsi possible d'obtenir le caséinesuccinylate de fer (III) qui se caractérise non seulement par un profil protéique contenant moins d'impuretés mais
25 aussi et de façon imprévue par une solubilité améliorée dans l'eau. Une telle solubilité améliorée permet d'obtenir des solutions et/ou des suspensions aqueuses affichant une viscosité inférieure par comparaison à celle obtenue avec une caséine de qualité alimentaire commerciale.

En référence à la caséine, l'expression "impuretés protéiques" selon l'invention est utilisée
30 pour indiquer des protéines différentes de la caséine avec ses diverses variantes, mesurées au moyen d'une électrophorèse unidimensionnelle avec une coloration au bleu de Coomassie et une analyse densitométrique. De préférence, lesdites impuretés protéiques de l'invention sont des protéines différentes de la caséine alpha-S1, de la caséine alpha-S2, de la caséine bêta, de la caséine kappa et/ou de la caséine pseudo-kappa.

35 De même, en référence au caséinesuccinylate de fer (III), l'expression "impuretés protéiques" selon l'invention est utilisée pour indiquer des substances différentes de la caséine succinylée avec ses diverses variantes, mesurées au moyen d'une électrophorèse unidimensionnelle avec une coloration au bleu de Coomassie et une analyse densitométrique. De préférence, lesdites impuretés protéiques de l'invention sont des
40 protéines succinylées différentes des produits de succinylation de la caséine alpha-S1, de la caséine alpha-S2, de la caséine bêta, de la caséine kappa et/ou de la caséine pseudo-kappa.

L'expression "impuretés inorganiques" selon l'invention est utilisée pour indiquer des cendres sulfatées.

Le terme "rapport P/N" est utilisé pour indiquer le rapport entre la quantité en poids de phosphore présent dans l'échantillon, mesurée à l'aide de la technique ICP, et la quantité en poids d'azote, mesurée par une analyse élémentaire.

Conformément à la présente invention, les valeurs exprimées en pourcentage en poids (% en poids) sont données relativement au poids total du caséinesuccinylate de fer (III) ou de la caséine.

De là, la présente invention concerne le caséinesuccinylate de fer (III) qui se caractérise par une teneur en fer comprise entre 4.5 et 7% en poids et une solubilité dans l'eau supérieure à environ 92% en poids. De préférence, une telle solubilité dans l'eau doit être considérée comme une solubilité dans environ 11.5 parties d'eau.

Ledit caséinesuccinylate de fer (III) contient aussi une quantité d'impuretés protéiques inférieure à environ 15%, de préférence inférieure à environ 10% et/ou un rapport P/N supérieur à environ 5%, de préférence supérieur à environ 5.5%.

Un autre objectif de la présente invention concerne un procédé de préparation du caséinesuccinylate de fer (III), comprenant les étapes qui consistent à :

- a) faire réagir la caséine et l'anhydride succinique dans l'eau pour obtenir une caséine succinylée,
 - b) faire réagir la caséine succinylée avec le chlorure de fer (III) pour obtenir le caséinesuccinylate de fer (III),
- qui se caractérise par le fait que ladite caséine à l'étape a) est une caséine purifiée, ayant une faible teneur en impuretés protéiques et/ou impuretés inorganiques et/ou un rapport P/N élevé.

De préférence, ladite teneur en impuretés protéiques est inférieure à 15% en poids, la teneur en impuretés inorganiques est inférieure à 1% en poids et le rapport entre la teneur en poids de phosphore et la teneur en poids d'azote est supérieur à environ 5% en poids.

En particulier, la teneur en impuretés protéiques est inférieure à environ 10% en poids et/ou la teneur en impuretés inorganiques est inférieure à environ 0.4% en poids et/ou le rapport entre la teneur en poids de phosphore et la teneur en poids d'azote est supérieur à environ 5.5%.

Lesdites impuretés protéiques de l'invention sont des protéines différentes de la caséine alpha-S1, de la caséine alpha-S2, de la caséine bêta, de la caséine kappa et/ou de la caséine pseudo-kappa.

Les caséines alimentaires sont généralement identifiées d'après la technique de précipitation appliquée dans leur préparation : la précipitation des caséines acides est exécutée moyennant une acidification, tandis que les caséines obtenues avec la présure sont présamiques, également désignées couramment par caséines présure.

Conformément à la présente invention, la caséine alimentaire utilisée comme matière première peut être une caséine acide ou une caséine présamique.

Ces produits commerciaux, indépendamment du type (acide ou présamique), sont habituellement accompagnés d'une documentation analytique rare ; les paramètres habituellement indiqués sont la teneur en eau, la teneur en protéines (déterminée en appliquant un facteur de multiplication à la valeur totale de l'azote), le niveau de contamination microbienne et la granulométrie. Ce niveau de caractérisation convient

pleinement pour l'utilisation des caséines dans l'industrie alimentaire, mais nous venons de découvrir que la préparation du caséinesuccinylate de fer (III) nécessite une évaluation analytique en profondeur de cette matière première.

Les caséines alimentaires commerciales et les caséines purifiées utilisées comme matières premières selon la présente invention dans la préparation du caséinesuccinylate de fer (III) sont analysées au moyen d'une CLHP en phase inverse d'après le procédé indiqué dans Bonizzi et al. Journal of Chromatography A vol. 1261(2009) pages 165-168, incorporé dans la présente en référence.

Il est ainsi possible d'identifier trois types de caséines : alpha-S1, alpha-S2, bêta, kappa et pseudo-kappa.

Moyennant une analyse électrophorétique, à la fois unidimensionnelle et bidimensionnelle, en utilisant le bleu de Coomassie à titre de réactif indicateur, en plus de la séparation de divers types de caséine dont les diverses variétés découlent de leurs modifications post-transcriptionnelles (telles la glycosylation et la phosphorylation), il est également possible d'évaluer la présence d'impuretés protéiques.

En particulier, pour une détermination quantitative des impuretés protéiques, on a recours à une électrophorèse SDS-PAGE avec du gel de polyacrylamide 14%, une coloration au bleu de Coomassie et une analyse densitométrique à base d'une ligne d'étalonnage construite avec différentes quantités de BSA.

Lesdites caséines et caséines purifiées sont également analysées avec le procédé des cendres sulfatées d'après la Farmacopea Europea (method Eu.Pharm. 2.4.14). La teneur en phosphore (P) de ces caséines est ensuite déterminée moyennant la technique ICP et leur teneur en azote (N) est déterminée moyennant une analyse élémentaire et ainsi le rapport P/N % est calculé en divisant la quantité en poids observée de phosphore par la quantité en poids observée d'azote et en multipliant le résultat par 100. Le tableau 1 ci-dessous affiche les résultats obtenus pour les divers types de caséines, c'est-à-dire les caséines alimentaires commerciales (acides et présamiques) et les caséines purifiées d'après le procédé de la présente invention.

Caséine	Matière première pour	Impuretés protéiques	Cendres sulfatées	P/N %
Caséine acide	Exemples comp. 1 et 2	15%	1.6%	
Caséine présamique	Exemple comp. 3	20%	9.2%	
Exemple 4	Exemples 8A et 9A	5%	0.4%	5.5%
Exemple 5	Exemple 8B	9%	0.9%	5.1%
Exemple 6	Exemple 8C	8%	0.2%	5.6%
Exemple 7	Exemples 8D et 9B	10%	0.8%	5.2%

Tableau 1

Par conséquent, on observe que les caséines alimentaires commerciales analysées révèlent une teneur en impuretés protéiques équivalente à 15-20% du total de la protéine échantillon, tandis que le niveau de teneur en impuretés inorganiques, défini au moyen de la valeur des cendres sulfatées déterminées, est compris entre 1% et 2.5% en poids dans les caséines acides commerciales et entre 7% et 10% en poids dans les caséines présamiques, comme on peut le constater dans le tableau 1 ci-dessus.

D'où, un autre objectif de la présente invention concerne aussi un procédé de purification desdites caséines alimentaires, qui entraîne l'élimination partielle ou totale des impuretés protéiques, des impuretés inorganiques et/ou une élévation du rapport P/N.

10 Conformément à la présente invention, ladite caséine alimentaire est traitée avec de l'eau, un solvant organique polaire ou un mélange des deux ; de préférence avec de l'eau.

De préférence, ledit solvant organique polaire est un alcool C₁-C₄, de préférence davantage le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol ou un mélange de ces derniers.

Conformément à un premier mode de réalisation de la présente invention, le solvant sélectionné est utilisé pour la purification de la caséine de manière à dissoudre les impuretés protéiques et les impuretés inorganiques pour les séparer de la caséine non dissoute par centrifugation ou filtration. Les caractéristiques de solubilité de la caséine dans le solvant sélectionné en fonction de la température, du pH et/ou de l'ajout d'additifs tels, par exemple, le chlorure de sodium, le chlorure de calcium et/ou l'acétate d'ammonium, sont exploitées pour implémenter ce procédé de purification.

La caséine alimentaire utilisée dans le procédé de purification peut être placée directement en contact avec le solvant sélectionné dans les conditions de dissolution des impuretés protéiques et inorganiques et, après un temps de contact adéquat sous agitation, séparée de la solution contenant les impuretés par filtration ou centrifugation.

25 Conformément à un second mode de réalisation de la présente invention, la purification sera effectuée en dissolvant d'abord la caséine dans le solvant sélectionné et, par la suite, en la précipitant moyennant une variation adéquate du pH, de la température et/ou de l'ajout d'additifs tels, par exemple, le chlorure de sodium, le chlorure de calcium et/ou l'acétate d'ammonium. Même dans ce cas-là, la séparation de la caséine des impuretés protéiques et inorganiques devra être effectuée par filtration ou centrifugation, de telles impuretés étant finalement dissoutes dans le solvant utilisé pour la purification.

Conformément au premier mode de réalisation susmentionné de la présente invention, la caséine alimentaire est placée en contact avec le solvant sélectionné, le pH du mélange est éventuellement établi à un pH compris entre 3 et 5, ou à un pH compris entre 5 et 10.

35 Lesdits ajustements du pH peuvent être effectués par exemple en utilisant des solutions aqueuses d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Ledit mélange est porté à une température comprise entre 0°C et 40°C, de préférence entre 0°C et 10°C. Un additif, tel le chlorure de sodium, le chlorure de calcium et/ou l'acétate d'ammonium, peut être éventuellement ajouté. Le mélange résultant est laissé sous agitation pendant une période de temps comprise entre 1 et 24 heures, de préférence entre 2 et 10 heures.

Ledit solvant sélectionné est ainsi utilisé pour dissoudre les impuretés protéiques et les impuretés inorganiques et les séparer de la caséine non dissoute, de préférence la caséine est ensuite séparée des impuretés moyennant une centrifugation ou une filtration. La filtration peut être un type conventionnel ou peut être exécutée au moyen de membranes

ayant une porosité adéquate d'après le procédé de filtration à flux tangentiel ou une filtration frontale.

D'après le second mode de réalisation susmentionné de la présente invention, la caséine alimentaire est dissoute dans le solvant sélectionné, puis soumise à une précipitation qui la
5 porte à un pH compris entre 4 et 6, de préférence entre 4.5 et 5. Tout procédé connu des personnes du métier peut être utilisé pour séparer la caséine de la solution contenant les impuretés protéiques et les impuretés inorganiques, de préférence ladite caséine est séparée par filtration ou centrifugation.

Dans le but d'obtenir le degré souhaité de purification, ces étapes de purification peuvent
10 être répétées une ou plusieurs fois. Ainsi, le même procédé de purification peut être répété ou l'on peut choisir de mettre en œuvre des procédés de purification différents les uns des autres dans l'ordre.

De là, un autre objectif de la présente invention concerne une caséine alimentaire purifiée, pouvant être obtenue par l'un des procédés décrits auparavant de la présente invention,
15 ayant une teneur en impuretés protéiques préférentiellement inférieure à 15% en poids, de préférence davantage inférieure à 10% en poids ; une teneur en impuretés inorganiques préférentiellement inférieure à 1% en poids, de préférence davantage inférieure à 0.4% en poids et/ou un rapport entre la teneur en poids de phosphore et la teneur en poids d'azote supérieur à 5% en poids, de préférence davantage supérieur à 5.5% en poids.

20 Un autre objectif de la présente invention concerne l'utilisation de ladite caséine purifiée dans la préparation du caséinesuccinylate de fer (III).

La préparation du caséinesuccinylate de fer (III) peut être entreprise d'après des procédés connus des personnes compétentes du métier tels, par exemple, ceux décrits dans les brevets IT1150213 et EP939083B1, qui sont incorporés dans la présente en référence.

25 Dans un mode de réalisation de la présente invention, le procédé de préparation du caséinesuccinylate de fer (III) décrit ci-dessus comprend les étapes qui consistent à :

- a) faire réagir la caséine et l'anhydride succinique dans l'eau pour obtenir la caséine succinylée,
- b) faire réagir la caséine succinylée avec le chlorure de fer (III) pour obtenir le
30 caséinesuccinylate de fer (III),

où la caséine au point a) est une caséine purifiée présentant une faible teneur en impuretés protéiques et/ou en impuretés inorganiques et/ou un rapport P/N élevé tel décrit ci-dessus, qui est obtenue comme suit :

la caséine purifiée est succinylée dans l'eau avec l'anhydride succinique en maintenant le
35 pH durant la réaction préférentiellement entre 7.5 et 8.5 en ajoutant une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium.

La température de la réaction est environ 20-25°C. A la fin de la réaction, le produit est précipité en ajoutant – sous agitation – une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à un pH d'environ 3.

40 La caséine succinylée ainsi obtenue est filtrée et dissoute dans l'eau en ajoutant une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. La solution est filtrée pour en extraire les éventuels solides non dissous, ensuite une quantité définie de solution aqueuse de chlorure de fer (III) est ajoutée en fonction de la teneur en fer souhaitée dans le produit fini.

Durant l'ajout ont lieu une réduction du pH et une précipitation du caséinesuccinylate de fer (III).

Durant l'ajout de la solution de chlorure de fer (III), le pH peut être ajusté en utilisant une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium pour éviter des conditions excessivement acides.

- 5 Dans ce cas, à la fin de l'ajout du chlorure de fer (III), une précipitation du complexe est achevée en ajoutant une solution aqueuse d'acide chlorhydrique.

Le solide formé est récupéré par filtration et suspendu dans l'eau. A cette étape, il est possible d'ajouter des conservateurs (méthylparabène et propylparabène). Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium est ajoutée à un pH d'environ 8.5, la matière non dissoute

10 est éliminée par centrifugation et le caséinesuccinylate de fer (III) est précipité par acidification en utilisant l'acide chlorhydrique en solution aqueuse. Le produit est séché à basse pression. Alternativement au séchage à basse pression, le caséinesuccinylate de fer (III) peut être obtenu à partir d'une solution aqueuse de celui-ci au moyen d'un séchage par atomisation.

- 15 Ledit procédé peut également comprendre une étape additionnelle de microfiltration de la solution aqueuse de caséinesuccinylate de fer (III). Ladite étape de microfiltration conformément à l'invention est prévue pour réduire la contamination microbienne.

D'où, un autre sujet de la présente invention est le caséinesuccinylate de fer (III) pouvant être obtenu grâce au procédé décrit auparavant.

- 20 Ledit caséinesuccinylate de fer (III) de l'invention affiche des caractéristiques de solubilité améliorée dans l'eau, par comparaison à celui de la technique antérieure ; de préférence un tel caséinesuccinylate de fer (III) affiche une solubilité dans l'eau supérieure à environ 92%. Une telle valeur de solubilité est préférablement envisagée dans 11.5 parties d'eau.

Le calcul de la solubilité dans l'eau est fait en solubilisant l'échantillon à un pH d'environ

- 25 8.0 en utilisant l'hydroxyde de sodium selon un rapport final entre l'eau et le caséinesuccinylate de fer (III) équivalent à 11.5 en poids, en filtrant la préparation sur un filtre ayant une porosité équivalente à 6 μm et en déterminant par pesage de filtre, après séchage, la quantité non dissoute. Le pourcentage de solubilité de l'échantillon est calculé par soustraction du poids de l'échantillon en soi de celui du composant laissé sur le filtre et
- 30 en comparant le résultat au poids initial de l'échantillon. La viscosité de diverses préparations aqueuses est mesurée à un pH d'environ 8.0 des produits avec des concentrations équivalentes à 5%, 6% et 8% en poids.

En outre, les vitesses de filtration sont mesurées sur des membranes dont la porosité est équivalente à 0.45 μm pour établir, pour les différents échantillons préparés, la possibilité

- 35 de réduire la contamination microbienne au moyen d'une microfiltration. Ce calcul est fait en mesurant le temps requis pour passer – au moyen d'un système sous vide – 5 mL d'une solution de l'échantillon dans l'eau à un pH d'environ 8.0 avec une concentration de 5% en poids à travers une membrane de 3 cm^2 ayant une porosité de 0.45 μm .

Le tableau 2 ci-dessous donne les résultats obtenus.

Echantillon	Solubilité dans 11.5 parties d'eau	Viscosité de la solution (mPa·sec)			Temps de filtration 5 mL de solution 5% dans l'eau sur 0.45µm (sec)
		5% dans l'eau	6% dans l'eau	8% dans l'eau	
Ex. comp. 1	89%	17	54	715	∞ (bloqué)
Ex. comp. 2	84%	21	67	957	∞ (bloqué)
Ex. comp. 3	85%	17	53	863	560
Ex. comp. 8A	97%	14	29	207	120
Ex. comp. 8B	94%	13	33	351	150
Ex. comp. 8C	98%	11	24	195	90
Ex. comp. 8D	93%	15	44	387	180
Ex. comp. 9A	98%	12	28	240	180
Ex. comp. 9B	92%	14	36	411	120

Tableau 2

Un autre objectif de la présente invention concerne une composition contenant le caséinesuccinylate de fer (III) de la présente invention et au moins un excipient physiologiquement acceptable.

- 5 Ladite composition est préférablement formulée en forme solide ou liquide, de préférence davantage en forme liquide. Ladite forme liquide est préférablement une solution ou une suspension, de préférence davantage une solution aqueuse. Ladite solution aqueuse peut être administrée par voie orale ou parentérale. Ladite composition comprend une quantité de caséinesuccinylate de fer (III) selon l'invention préférablement comprise entre 10 et 200
- 10 mg de fer, de préférence davantage entre 20 et 100 mg de fer, le mieux d'environ 40 mg, 60 mg ou 80 mg de fer.

Conformément à un mode de réalisation préféré de l'invention, ladite composition est une solution aqueuse comprenant environ 40 mg, 60 mg ou 80 mg de fer dissous dans 15 mL de solution.

- 15 Par ailleurs, on vient de découvrir avec étonnement que les compositions liquides à base de caséinesuccinylate de fer (III) selon la présente invention révèlent une réduction importante de la viscosité par comparaison aux compositions de la technique antérieure.

La viscosité des compositions liquides contenant le caséinesuccinylate de fer (III) de l'invention est considérablement basse par rapport à celle des compositions de la technique antérieure présentant une valeur équivalente en fer. Une telle réduction de la viscosité dans les préparations contenant le caséinesuccinylate de fer (III) de l'invention est observable

5 dans les préparations obtenues à partir du caséinesuccinylate de fer (III) présentant une teneur en fer équivalente à 5% et, même plus clairement, en comparant des produits ayant une teneur supérieure en fer, en particulier des produits présentant une teneur en fer de 6% et au-delà, comme on peut l'observer dans le tableau 2.

De préférence, la viscosité d'une composition liquide contenant – en forme solubilisée –

10 environ 8% en poids de caséinesuccinylate de fer (III) de l'invention est inférieure à 400 mPa·sec, de préférence davantage inférieure à 300 mPa·sec.

Ces caractéristiques surprenantes de solubilité supérieure du caséinesuccinylate de fer (III) de l'invention et de viscosité inférieure des compositions liquides les contenant, sont particulièrement utiles pour la préparation du caséinesuccinylate de fer (III) avec une

15 concentration supérieure de fer (comme, par exemple, égale ou supérieure à 40 mg pour 15 ml de solution). Une solution préférée selon la présente invention contient une quantité de caséinesuccinylate de fer (III) comprise entre 4 et 15% en poids, de préférence entre 4.5 et 12% en poids, de préférence davantage entre 5 et 8% en poids, par rapport au poids total.

Une telle caractéristique de basse viscosité permet aussi la microfiltration des compositions

20 liquides contenant le caséinesuccinylate de fer (III) de l'invention.

Cette opération est extrêmement utile pour sauvegarder les propriétés du produit, de la formulation ultérieure et les préserver. Une fois l'opération de microfiltration effectuée et la contamination microbienne réduite, il est également possible de réduire, ou même d'éviter, l'emploi de conservateurs tels, par exemple, les parabènes conventionnellement

25 utilisés afin de prévenir la prolifération microbienne.

Au fait, ceci permet de réduire considérablement la teneur microbienne des formulations, de préférence des formulations liquides, contenant le caséinesuccinylate de fer (III) selon l'invention.

Jusqu'à nos jours, la viscosité élevée des formulations liquides (par exemple, des solutions

30 aqueuses) à base de caséinesuccinylate de fer (III), obtenues à partir de la caséine alimentaire non soumise à un procédé de purification adéquat, a entravé une telle opération de microfiltration au lieu de la guider.

La microfiltration selon l'invention peut avoir lieu sur des membranes à porosité contrôlée ou une microfiltration tangentielle a lieu sur des membranes à porosité contrôlée dans le

35 but de réduire la contamination microbienne.

Une telle opération de microfiltration, pouvant être associée aussi à la basse viscosité des compositions liquides (de préférence des solutions aqueuses) de caséinesuccinylate de fer (III), est particulièrement utile pour la préparation de compositions liquides orales à longue durée de vie sans nécessiter des quantités élevées contestables de conservateurs.

40 Les exemples suivants visent uniquement à illustrer quelques modes de réalisation de l'invention et ne seront nullement considérés restrictifs de l'invention.

EXEMPLES

EXEMPLE 1

Exemple comparatif de préparation de caséinesuccinylate de fer (III) ayant une teneur en fer équivalente à environ 5% à partir d'une caséine acide commerciale.

- 5 600 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés à 50 g de caséine acide alimentaire, le mélange est remué pendant 30 minutes et le pH est porté au pH stable de 8.4 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 9.5%.
15 g d'anhydride succinique sont ajoutés en petites portions sous agitation continue. Durant l'ajout, le pH est maintenu à environ 8.4 en ajoutant la solution de chlorhydrate de sodium à 9.5% progressivement. Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 17% est ajoutée à un pH stable de 2.8. L'isolation est entreprise en filtrant la caséine succinyle précipitée qui est resuspendue dans 600 mL d'eau déminéralisée. Le pH est porté à 8.5 en utilisant l'hydroxyde de sodium aqueux à 9.5%, le mélange est maintenu sous agitation, la petite fraction non dissoute est filtrée sur un papier filtre et une solution constituée de 14.1 g de chlorure de fer (III) hexahydraté dans 119 mL d'eau est ajoutée sous agitation. Durant l'ajout ont lieu une réduction du pH et une précipitation du caséinesuccinylate de fer (III). Après une mise sous agitation pendant 30 minutes, le pH=2.9 et le produit est filtré. Le produit est suspendu dans 600mL d'eau et l'hydroxyde de sodium aqueux à 5% est ajouté progressivement et sous agitation au pH stable de 8.5. Une centrifugation est effectuée pour éliminer le composant insoluble qui est équivalent à environ 20 g d'humidité ; le pH est ajusté en utilisant l'acide chlorhydrique en solution aqueuse à 17% au pH stable de 2.8. Le précipité est filtré et séché obtenant 54.1 g de caséinesuccinylate de fer (III).

EXEMPLE 2

- 25 **Exemple comparatif de préparation de caséinesuccinylate de fer (III) ayant une teneur en fer équivalente à environ 6% à partir d'une caséine acide commerciale.**
600 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés à 50 g de caséine acide alimentaire, le mélange est remué pendant 30 minutes et le pH est porté au pH stable de 8.4 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 9.5%.
30 15 g d'anhydride succinique sont ajoutés en petites portions sous agitation continue. Durant l'ajout, le pH est maintenu à environ 8.4 en ajoutant une solution de chlorhydrate de sodium à 9.5% progressivement. Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 17% est ajoutée à un pH stable de 2.8. L'isolation est entreprise en filtrant la caséine succinyle précipitée qui est resuspendue dans 600 mL d'eau déminéralisée. Le pH est porté à 8.5 en utilisant l'hydroxyde de sodium aqueux à 9.5%, le mélange est maintenu sous agitation, la petite fraction non dissoute est filtrée sur un papier filtre et une solution constituée de 17 g de chlorure de fer (III) hexahydraté dans 150 mL d'eau est ajoutée sous agitation. Durant l'ajout de la solution de chlorure ferrique, le pH est maintenu dans la plage comprise entre 6.0 et 6.5 en ajoutant simultanément l'hydroxyde de sodium en solution aqueuse à 5%. A la fin de l'ajout de la solution de chlorure ferrique, le pH est ajusté à 2.8 en utilisant l'acide chlorhydrique aqueux à 17%. La suspension est maintenue sous agitation pendant 30 minutes et le produit est filtré. Le produit est suspendu dans 600 mL d'eau et l'hydroxyde de sodium aqueux à 5% est ajouté progressivement et sous agitation au pH stable de 8.5. Une centrifugation est effectuée pour éliminer le composant insoluble qui est équivalent à environ 25 g d'humidité ; le pH est ajusté en utilisant l'acide chlorhydrique en solution

aqueuse à 17% au pH stable de 2.8. Le précipité est filtré et séché obtenant 53.5 g de caséinesuccinylate de fer (III).

EXEMPLE 3

5 Exemple comparatif de préparation de caséinesuccinylate de fer (III) ayant une teneur en fer équivalente à environ 5% à partir d'une caséine présamique commerciale.

D'après le procédé décrit dans l'exemple 1, le caséinesuccinylate de fer (III) est préparé à partir de 50 g de caséine présamique alimentaire. Après séchage, on obtient 54.2 g de caséinesuccinylate de fer (III).

10 EXEMPLE 4

Purification d'une caséine acide commerciale.

6 L d'eau déminéralisée sont ajoutés à 180 g de caséine acide alimentaire, le pH est ajusté à 7.0 avec une solution aqueuse 1 M d'hydroxyde de sodium. Le mélange est refroidi à 4°C, le pH est porté à 4.5 avec une solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant 16 heures et le solide est filtré sur un filtre Büchner.

Le produit humide est suspendu dans 6 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à 7.0 avec une solution aqueuse 1 M d'hydroxyde de sodium. Le mélange est refroidi à 4°C, le pH est porté à 4.5 avec la solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant 3 heures et le solide est filtré sur un filtre Büchner.

Le produit humide est resuspendu dans 3 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à 7.0 avec la solution aqueuse 1 M d'hydroxyde de sodium. Le mélange est refroidi à 4°C, le pH est porté à 4.5 avec la solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant 3 heures, 390 g de solides humides sont filtrés sur un filtre Büchner, et le produit est séché dans un sécheur rotatif pendant 20 heures à 25°C et 30 mmHg obtenant 146 g de caséine purifiée.

EXEMPLE 5

Purification d'une caséine acide commerciale.

6 L d'eau déminéralisée sont ajoutés à 18 g de caséine acide alimentaire, le pH est ajusté à 7.0 avec une solution aqueuse 1 M d'hydroxyde de sodium. Le mélange est refroidi à 4°C, le pH est porté à 4.5 avec une solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant 16 heures et le solide est filtré sur un filtre Büchner. 408 g de solides humides, qui sont séchés dans un sécheur rotatif pendant 20 heures à 25°C et 30 mmHg obtenant 162 g de caséine purifiée, sont obtenus.

35 EXEMPLE 6

Purification d'une caséine acide commerciale.

42 L d'eau déminéralisée sont ajoutés à 144 g de caséine acide alimentaire. Le pH est ajusté à un pH stable de 7.0 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 8% dans l'eau. Le pH est porté à 3.0 avec une solution 0.5 M d'acide chlorhydrique aqueux. Le mélange est refroidi à 2°C et le pH est porté à 4.0 avec l'hydroxyde de sodium aqueux 0.01 M. La suspension est maintenue sous agitation pendant une heure, 318 g de solides humides sont filtrés sur un filtre Büchner, et le produit est séché dans un sécheur rotatif pendant 20 heures à 25°C et 30 mmHg obtenant 126 g de caséine purifiée.

EXEMPLE 7

Purification d'une caséine présamique commerciale.

6 L d'eau déminéralisée sont ajoutés à 180 g de caséine présamique alimentaire, le mélange est remué pendant 30 minutes, refroidi à 4°C et maintenu sous agitation pendant

- 5 16 heures, le pH est porté à 4.5 avec une solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant une heure et le solide est filtré sur un filtre Büchner.

- 10 Le produit humide est suspendu dans 6 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à 7.0 avec une solution aqueuse 1 M d'hydroxyde de sodium. Le mélange est refroidi à 4°C, le pH est porté à 4.5 avec la solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant 3 heures et le solide est filtré sur un filtre Büchner.

- 15 Le produit humide est resuspendu dans 6 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à 7.0 avec la solution aqueuse 1 M d'hydroxyde de sodium. Le mélange est refroidi à 4°C, le pH est porté à 4.5 avec la solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La suspension est maintenue sous agitation pendant 16 heures et le solide est filtré sur un filtre Büchner.

290 g de solides humides, qui sont séchés dans un sécheur rotatif pendant 20 heures et 30 mmHg obtenant 126 g de caséine purifiée, sont obtenus.

EXEMPLE 8

- 20 **Préparation de caséinesuccinylate de fer (III) ayant une teneur en fer équivalente à environ 5% à partir des caséines purifiées telles définies dans les exemples 4, 5, 6 et 7.**

D'après le procédé décrit dans l'exemple 1, le caséinesuccinylate de fer (III) est préparé à partir des caséines purifiées obtenues telles décrites dans les exemples 4, 5, 6 et 7.

Le tableau ci-dessous illustre les quantités relatives à chacune des préparations.

Caséinesuccinylate de fer (III)	Matière première	Quantité de caséine utilisée	Quantité de caséinesuccinylate de fer (III) obtenue
Exemple 8A	Caséine acide purifiée de l'exemple 4	50 g	54.6 g
Exemple 8B	Caséine acide purifiée de l'exemple 5	50 g	55.2 g
Exemple 8C	Caséine acide purifiée de l'exemple 6	50 g	54.3 g
Exemple 8D	Caséine présamique purifiée de l'exemple 7	50 g	52.7 g

Tableau 3

25

EXEMPLE 9

Préparation de caséinesuccinylate de fer (III) ayant une teneur en fer équivalente à environ 6% à partir des caséines purifiées telles définies dans les exemples 4 et 7.

- 30 D'après le procédé décrit dans l'exemple 2, le caséinesuccinylate de fer (III) est préparé à partir des caséines purifiées obtenues telles décrites dans les exemples 4 et 7.

Le tableau ci-dessous illustre les quantités relatives à chacune des préparations.

Caséinesuccinylate de fer (III)	Matière première	Quantité de caséine utilisée	Quantité de caséinesuccinylate de fer (III) obtenue
Exemple 9A	Caséine acide purifiée de l'exemple 4	50 g	56.0 g
Exemple 9B	Caséine présamique purifiée de l'exemple 7	50 g	52.5 g

Tableau 4

5

10

15

20

REVENDEICATIONS

1. Le caséinesuccinylate de fer (III) qui se caractérise par une teneur en fer comprise entre 4.5 et 7% en poids, par une solubilité supérieure à environ 92% et par un rapport phosphore/azote supérieur à environ 5% en poids, de préférence supérieur à environ 5.5% en poids.
2. Le caséinesuccinylate de fer (III) conformément à la revendication 1, qui se caractérise par le fait qu'il contient une quantité d'impuretés protéiques inférieure à environ 15% en poids, de préférence inférieure à environ 10% en poids.
3. Un procédé de préparation du caséinesuccinylate de fer (III) comprenant les 10 étapes qui consistent à :
 - a. faire réagir la caséine et l'anhydride succinique dans l'eau pour obtenir la caséine succinylée,
 - b. faire réagir la caséine succinylée avec le chlorure de fer (III) pour obtenir le caséinesuccinylate de fer (III),
 - 15 c. qui se caractérise par le fait que ladite caséine de l'étape a) est une caséine purifiée, ayant une teneur en impuretés protéiques inférieure à 15% en poids et/ou en impuretés inorganiques inférieure à 1% en poids et/ou un rapport phosphore/azote supérieur à environ 5%.
4. Le procédé conformément à la revendication 3, qui se caractérise par le fait que 20 ladite teneur en impuretés protéiques est inférieure à environ 10% en poids et/ou ladite teneur en impuretés inorganiques est inférieure à environ 0.4% en poids.
5. Le procédé conformément à la revendication 3, qui se caractérise par le fait que lesdites impuretés protéiques sont des protéines différentes de la caséine alpha-S1, la caséine alpha-S2, la caséine bêta, la caséine kappa, la caséine pseudo-kappa.
- 25 6. Le procédé conformément à la revendication 3, qui se caractérise par le fait que ladite caséine purifiée présente un rapport phosphore/azote supérieur à environ 5% en poids.
7. Le procédé conformément à la revendication 3, qui se caractérise par le fait que ladite caséine purifiée est obtenue de la caséine acide ou de la caséine présamique.
- 30 8. Le procédé conformément à la revendication 3, comprenant une étape additionnelle de microfiltration de la solution aqueuse de caséinesuccinylate de fer (III).
9. Le caséinesuccinylate de fer, pouvant être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 3-8.
10. Une composition pharmaceutique contenant le caséinesuccinylate de fer (III) 35 selon les revendications 1 à 2 et/ou 9 et au moins un excipient physiologiquement acceptable.
11. La composition conformément à la revendication 10, qui se caractérise par le fait qu'elle existe en forme liquide ou solide, de préférence en forme liquide.
12. La composition conformément à la revendication 11, qui se caractérise par le 40 fait que ladite forme liquide est une solution ou une suspension, de préférence une solution aqueuse.

13. La composition conformément à la revendication 10, qui se caractérise par le fait que ladite composition est une solution contenant environ 8% en poids de caséinesuccinylate de fer (III) ayant une viscosité inférieure à environ 400 mPa·sec, de préférence inférieure à environ 300 mPa·sec.

5 14. La composition conformément à l'une des revendications précédentes où le caséinesuccinylate de fer (III) est contenu en une quantité comprise entre 5 et 15% en poids, de préférence entre 6 et 12% en poids, de préférence davantage entre 7 et 9% en poids, par rapport au poids total de la composition.

10 15. La composition conformément à l'une des revendications précédentes pour l'administration orale ou parentérale, de préférence l'administration orale.

16. La composition conformément à l'une des revendications précédentes, à utiliser dans le traitement des carences en fer.

15 17. La composition conformément à la revendication 16, à utiliser dans le traitement de l'anémie, de la carence en fer durant la grossesse, du syndrome de malabsorption, de la carence en fer durant l'allaitement et de la carence en fer durant la croissance.

20

25

30

35

40

45

/