



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031526

(51)⁷ C07K 14/47

(13) B

(21) 1-2017-02289

(22) 22/10/2015

(86) PCT/EP2015/074482 22/10/2015

(87) WO2016/096203 A1 23/06/2016

(30) 14386034.4 19/12/2014 EP

(45) 25/04/2022 409

(43) 27/11/2017 356A

(76) TSETI Ioulia (GR)

13 Pavlou Mela Street, GR-145 61 Kifissia Attikis (GR)

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ PHỨC HỢP SẮT (III) VỚI CAZEIN N-AXETYL-
ASPARTYL HÓA VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC
HỢP NÀY

(57) Sáng chế này nói chung liên quan đến quy trình để điều chế các phức hợp sắt (III) N-axetyl-aspartyl hóa. Sản phẩm thu được theo phương pháp của sáng chế này có thể được sử dụng an toàn cho cộng đồng dân cư hoặc động vật nói chung trong điều trị thiếu sắt. Quy trình của sáng chế bao gồm các bước sau:

(a) phản ứng của casein với N-axetyl-L-aspartyl clorua, tạo thành casein N-axetyl-L-aspartyl hóa,

(b) phản ứng tiếp theo của casein N-axetyl-L-aspartyl hóa với sắt clorua; và

(c) thu được phức hợp sắt (III) với casein N-axetyl-L-aspartyl hóa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến phức hợp protein sắt (III) và các quy trình để sản xuất chúng. Sản phẩm thu được theo phương pháp của sáng chế này có thể an toàn để dùng cho cộng đồng dân cư hoặc động vật nói chung để điều trị thiếu sắt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Điều trị bằng sắt là cần thiết trong nhiều tình huống lâm sàng bao gồm thai kỳ, hóa trị liệu, xuất huyết cấp tính hoặc mãn tính, thâm tách máu, viêm loét đại tràng, chế độ ăn uống không đầy đủ và phẫu thuật đường tiêu hóa.

Liệu pháp uống sắt rẻ hơn đáng kể so với liệu pháp bằng sắt thay thế ngoài đường tiêu hóa và cũng ít gây ra nguy cơ dị ứng nghiêm trọng hơn. Trên cơ sở này, trong đơn đăng ký sáng chế của Anh số 910321 (Olivieur Paul Gaudin), quy trình cải tiến được mô tả để điều chế các muối sắt với axit aspartic. Các muối này có thể được sử dụng làm thuốc chữa thiếu sắt.

Cremonesi P et al, vào năm 1984 (Arzneimittel-Forschung, 34(9):948-952) báo cáo các dẫn xuất sắt đầu tiên của protein sữa biến đổi. Ngoài ra, báo cáo cho rằng một sản phẩm có chứa lượng sắt cao và duy trì được tất cả các đặc điểm cần thiết của tính ổn định và tính hòa tan của thuốc có thể được điều chế bằng cách succinic hóa các protein sữa, trước khi phản ứng với muối sắt. Đối với các dẫn xuất này, có thể có được một lợi thế đặc biệt. Sắt, dưới dạng phức hợp oligome, liên kết chặt chẽ với protein không theo cấu trúc chelat hóa với phần gốc cơ bản mà bao gồm nhiều vị trí của chuỗi protein. Độ tan của phức hợp sắt được đảm bảo bởi sự khả dụng gia tăng của các nhóm cacboxyl theo sau phản ứng succinyl hóa.

Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4493829, cùng thời kỳ, mô tả các dẫn xuất sắt-protein succinyl hóa không làm tổn thương dạ dày và cải thiện độ khả dụng sinh

học. Sự thay đổi protein tương tự (thực vật và động vật) được mô tả trong Bảng sáng chế Châu Âu số 0243322, do phản ứng của các protein với 3 đến 10 anhydrit axit dicarboxylic béo, đưa các nhóm axit cacboxylic vào protein, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo phức hợp của sắt.

Đặc tính hóa học và sinh học của sắt-protein succinyl hóa ở chuột và chó được mô tả bởi Cremonesi P et al. (International Journal of Clinical Pharmacology, therapy, and toxicology, 31(1):40-51). Các thí nghiệm chứng minh khả năng dung nạp đường tiêu hóa tốt hơn đối với phức hợp casein sắt-succinic chứa 5% sắt.

EP0939083 bộc lộ quy trình điều chế phức hợp sắt- casein succinyl thu được từ casein cấp thực phẩm được dùng cho mục đích làm thực phẩm.

US2001031748 đề cập đến chế độ ăn kiêng với các kim loại khác nhau, bao gồm sắt, dùng cùng với phối tử theo chế độ ăn kiêng như ascorbat, succinat, aspartat và các phối tử khác. Sự kết hợp chế độ ăn kiêng này có thể giúp điều trị các triệu chứng tiêu hóa.

Lazzari et al. đã báo cáo (Clinical Drug Investigation, 2005; 25(11):679-689) tổng quan về 16 thử nghiệm lâm sàng trong điều trị thiếu sắt với sắt-casein axetyl-aspartyl hóa (Fe-ASP), chứng minh đây là chất dẫn thuốc hiệu quả cho việc cung cấp sắt với độ khả dụng sinh học cao. Trong các thử nghiệm lâm sàng mở, thu được các thông số lâm sàng và huyết học cải thiện rất đáng kể sau khi điều trị bằng Fe-ASP ở tất cả các nhóm bệnh nhân thiếu máu thiếu sắt. Trong các thử nghiệm lâm sàng có kiểm chứng, thu được các thay đổi trong các dữ liệu lâm sàng và huyết học do Fe-ASP hầu như giống hệt với các thay đổi do sắt protein succinyl hóa (IPS), và Fe-ASP cũng được so sánh tương ứng với gluconat sắt trong ruột. Không có vấn đề an toàn nào được đề cập. Fe-ASP cho thấy hiệu quả cao trong điều trị thiếu máu thiếu sắt, và nó là dung môi sắt được dung nạp rất tốt. Fe-ASP là sự thay thế hiệu quả cho IPS và cho thấy hứa hẹn sẽ là sự thay thế cho phương pháp điều trị bằng đường tiêm sắt trong một số trường hợp lâm sàng nhất định.

Gần đây hơn, Công bố đơn sáng chế số WO 2006021843 bộc lộ quy trình sản xuất sắt casein succinyl và phức hợp casein sắt axetyl-aspartat, trong đó chất này ít bị đặt trong các điều kiện độ pH và nhiệt độ. Quy trình này sử dụng anhydrit axetyl-aspartat. Hơn nữa, quy trình này không đòi hỏi phải sử dụng bơm chuyên dụng (bơm nghiền nhỏ).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế này là mô tả các quy trình mới để sản xuất phức hợp ổn định sắt (III) casein N-axetyl-L-aspartyl hóa. Quy trình điều chế các phức hợp sắt (III) casein N-axetyl-L-aspartyl hóa, các phức hợp và các dược phẩm bao gồm các phức hợp của sáng chế đã được xác định theo các yêu cầu bảo hộ.

Các phức hợp của sáng chế này là ổn định và thể hiện tính ổn định cao qua thời gian. Do đó các sản phẩm này có thể được sử dụng để điều trị chứng thiếu sắt ở người hoặc động vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế này là quy trình mới để sản xuất dẫn xuất protein của sắt, cụ thể là phức hợp sắt của casein N-axetyl-L-aspartyl hóa (N-axetyl-L-aspartylated casein) (sau đây gọi là "sắt- casein N-axetyl-L-aspartyl hóa" và phức hợp sắt (III) với casein N-axetyl-L-aspartyl hóa), tốt hơn là thu được từ casein cấp thực phẩm, tức là casein được sử dụng làm thực phẩm. Theo thuật ngữ "casein cấp thực phẩm" có nghĩa là casein thu được từ sữa từ các trang trại chăn nuôi được kiểm soát chặt chẽ. Sản phẩm này có mức nhiễm bẩn thấp hơn 1000 CFU/g đối với vi khuẩn, và thấp hơn 100 CFU/g đối với nấm mốc, mức độ nhiễm bẩn được xác định tốt hơn là theo như tài liệu chuyên khảo hiện tại, Eur. Pharm, 2.6.12 *for Total viable aerobic count*, 2.6.13 *for specified microorganisms* và 2.6.14 *for Bacterial endotoxins*. Việc sử dụng casein cấp thực phẩm cho phép thu được các sản phẩm

tinh khiết đặc biệt, so với các phức hợp tương tự thu được từ các protein sữa thông thường.

Sáng chế này đề cập đến quy trình để điều chế phức hợp sắt (III) casein N-axetyl-L-aspartyl hóa gồm có, tốt hơn là bao gồm, các bước sau:

(a) phản ứng của N-axetyl-L-aspartyl hóa của casein, tốt hơn là casein cấp thực phẩm, với clorua của axit N-axetyl-L-aspartic, được điều chế *in situ* bằng cách clo hóa axit N-axetyl-L-aspartic với chất thử clo hóa như thionyl clorua. Mặc dù anhydrite của N-axetyl aspartic thường là chất khởi đầu hữu ích cho việc biến đổi casein, nó có nhiều nhược điểm. Ví dụ, nó tương đối đắt tiền cho sử dụng công nghiệp và cũng không bền trước độ ẩm khi lưu trữ. Hơn nữa, có rủi ro đối với anhydrit của N-axetyl aspartic do bị racemic hóa từng phần (Tetrahedron: Asymmetry 18 (2007) 1625-1627). Điều đó cho thấy, việc sử dụng axit N-axetyl-L-aspartic kết hợp với thuốc thử clo hóa lợi thế hơn việc sử dụng anhydrit của N-axetyl aspartic trong bối cảnh của đơn này. (b) Phản ứng tiếp theo của casein N-axetyl-L-aspartyl hóa với sắt clorua. Bước (a) tốt hơn bao gồm cả việc cung cấp casein hòa tan.

Các phương án được ưu tiên được mô tả chi tiết như sau, trong đó mỗi giai đoạn từ 1 đến 9 có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với bất kỳ giai đoạn nào khác để xác định sáng chế, tốt nhất là tất cả các giai đoạn 1 đến 9 được áp dụng như mô tả dưới đây:

Bước (a):

Trong giai đoạn 1), pha loãng casein, tốt hơn là casein cấp thực phẩm, được thực hiện ở độ pH kiềm nằm trong khoảng từ 8 đến 9, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 8,4 đến 8,6. Casein được hòa tan trong nước.

Trong giai đoạn 2) N-axetyl-L-aspartyl clorua được điều chế *in situ* bằng axit N-axetyl-L-aspartic và chất thử clo hóa như thionyl clorua.

Trong giai đoạn 3) phản ứng N-axetyl-aspartyl hóa được thực hiện bằng phản ứng của casein hòa tan trong giai đoạn 1) với N-axetyl-L-aspartyl clorua được điều chế trong giai đoạn 2). Phản ứng có thể được thực hiện ở nhiệt độ trong khoảng từ 15°C đến 40°C, chẳng hạn như ở nhiệt độ phòng (20°C), tốt hơn là nó được thực hiện ở nhiệt độ trong khoảng từ 30 đến 40°C. Tốt hơn là, giá trị pH được giữ trong khoảng độ pH từ 8 đến 9 trong phản ứng của casein với N-axetyl-L-aspartyl clorua.

N-axetyl-L-aspartyl clorua được điều chế *in situ* (không bị tách riêng) và thiết lập để phản ứng với casein hòa tan. Tỷ lệ axit N-axetyl-L-aspartic với casein được sử dụng tốt hơn là 1:2.

Trong giai đoạn 4) sản phẩm N-axetyl-L-aspartyl hóa được tinh chế sau kết tủa qua sự axit hóa ở giá trị pH trong khoảng từ 2,5 đến 4, tốt hơn là trong khoảng từ 2,5 đến 3, và được tách ra bằng cách lọc.

Trong giai đoạn 5), sản phẩm được thu lại bằng cách lọc, được tạo hỗn dịch trong nước và natri hydroxit và pha loãng ở độ pH trong khoảng từ 6 đến 11, tốt hơn là từ 8 đến 9, cho đến khi thu được dung dịch.

Bước (b):

Trong giai đoạn 6), phản ứng với sắt clorua có thể được thực hiện bằng cách thêm dung dịch nước sắt clorua vào dung dịch thu được ở cuối giai đoạn 5), cho đến khi đạt được độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3. Huyền phù được tạo thành, được lọc, và sắt casein -N-axetyl-L-aspartyl hóa thô được thu lại dưới trạng thái không hòa tan.

5 g casein đã biến đổi có thể phản ứng với 6,2 g FeCl_3 26,9% trọng lượng dung dịch.

Trong giai đoạn 7), việc tinh chế được thực hiện như sau: dẫn xuất thô thu được ở giai đoạn 6) được tạo hỗn dịch trong nước, kiềm hóa ở độ pH 8,5 và sau đó khuấy trong 30 phút cho đến khi hòa tan sản phẩm. Hệ phức tinh chế được làm sạch bằng cách lọc dung dịch sau đó.

Trong giai đoạn 8) sắt casein -N-axetyl-L-aspartyl hóa được kết tủa từ dung dịch đã làm sạch của giai đoạn 7) bằng sự axit hóa ở độ pH 2,5 và sau đó được lọc và thu lại.

Trong giai đoạn 9), phức hợp sắt casein -N-axetyl-L-aspartyl hóa đã được sấy khô ở nhiệt độ 60°C và 80°C, trong thời gian từ 18 đến 36 giờ, tốt hơn là từ 20 đến 24 giờ.

Vào cuối quá trình làm khô, sản phẩm chứa dư lượng độ ẩm tối đa dưới 5% và hàm lượng sắt phức hợp nằm trong khoảng từ 5% đến 6% trọng lượng, tính trên chất khô. Để biểu thị đầy đủ đặc tính của sản phẩm, tham chiếu được thực hiện với dữ liệu được cung cấp trong các ví dụ từ 1 đến 3.

Quy trình đã mô tả cho phép thu được phức hợp sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa từ dư lượng hoặc từ các dẫn xuất sắt không hòa tan hoặc tan ít trong nước. Đặc biệt, sản phẩm được phát hiện là có thể hòa tan hoàn toàn ở các giá trị pH kiềm, tức là những chất điển hình của đường ruột, do đó đảm bảo lượng sắt khả dụng sinh học tối đa cho mục đích hấp thu đường ruột.

Các sản phẩm theo sáng chế này có thể được kết hợp thích đáng trong các công thức dược phẩm thích hợp cho việc uống.

Sáng chế này bao gồm các dược phẩm có chứa sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa và các tá dược thích hợp, như chất pha loãng và chất bảo quản dược phẩm.

Mục đích khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng các phức hợp sắt được mô tả ở trên để điều chế các dược phẩm điều trị các điều kiện bệnh lý do thiếu sắt vì, ví dụ như, thay đổi sinh lý, xuất huyết định kỳ, bệnh truyền nhiễm, mang thai, nuôi bằng sữa mẹ, và sử dụng sự trao đổi chất không hoàn hảo. Ví dụ của các điều kiện bệnh lý này là thiếu máu, đặc biệt thiếu máu do giảm sắc hồng cầu.

Để minh họa cho sáng chế này, không giới hạn phạm vi của nó, các ví dụ thực nghiệm sau được đưa ra.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Điều chế phức hợp sắt casein N-axetyl-L-aspartyl hóa

(A) Sự hòa tan casein.

Trong lò phản ứng bằng thép không gỉ với máy lắc đầy đủ và dụng cụ đo độ pH, thêm 5 g casein dùng cho thực phẩm hoặc dược phẩm vào 70 g nước tinh khiết vi sinh khử ion hóa. Hỗn hợp được khuấy cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất. Khoảng 1,5 g dung dịch natri hydroxit (NaOH) 15% trọng lượng được thêm vào, ở nhiệt độ 20°C, trong thời gian 10 phút, cho đến khi đạt được độ pH $8,5 \pm 0,1$. Dung dịch được lắc thêm 15 phút nữa.

(B) Điều chế N-Axetyl-L-Aspartyl Clorua.

Trong một lò phản ứng bằng thép không gỉ với máy lắc đầy đủ được thêm vào, 15,6 mL (tương đương 15) của thionyl clorua (SOCl_2), 2,5 g axit N-axetyl-L-aspartic và hỗn hợp được khuấy ở 75°C. Hỗn hợp được khuấy cho đến khi kết thúc phản ứng (từ 1 đến 1,5 giờ) bằng sự hình thành sản phẩm axyl clorua. Trong phản ứng này, lưu huỳnh đioxit (SO_2) và hydro clorua (HCl) được tạo ra đều là loại khí có thể rời khỏi bình phản ứng, đẩy phản ứng về phía trước. Thionyl clorua còn lại được làm bay hơi bằng cách nung nóng hỗn hợp phản ứng ở 75°C, gần với điểm sôi (74,6°C) của SOCl_2 .

(C) phản ứng casein axetyl-aspartyl hóa.

Dung dịch thu được từ giai đoạn (A) của casein đã được hòa tan được thêm từ từ vào dung dịch N-axetyl-L-aspartic clorua (B), đồng thời thêm vào khoảng 3,1 g NaOH 15% trọng lượng, duy trì độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$, ở nhiệt độ phòng. Dung dịch thu được được khuấy mạnh trong 2 giờ.

(D) Chuyển và tinh chế casein axetyl aspartat qua kết tủa.

Dung dịch thu được từ giai đoạn (C) được chuyển vào lò phản ứng tráng men được cung cấp với máy trộn và bộ cảm biến phù hợp để đọc các giá trị pH. Dung dịch, giữ ở nhiệt độ 20°C, sau đó được axit hóa với khoảng 2,28 g dung dịch HCl 6 N trong thời gian 40 phút, cho đến khi đạt được độ pH bằng 3. Khi đạt đến độ pH mục tiêu, ngừng bổ sung axit và thu được kết tủa. Sự giảm giá trị pH gây ra sự hình thành kết tủa của casein N-axetyl-L-aspartyl hóa được lọc từ các muối khác, các sản phẩm phản ứng khác, và các tạp chất hoà tan khác.

(E) Lọc và nghiền nhỏ.

Casein N-axetyl-L-aspartyl hóa thu được trong giai đoạn (D) được thu lại bằng cách lọc. Các sản phẩm ẩm được lấy ra khỏi bộ lọc, và sau đó đưa vào lò phản ứng bằng thép không gỉ được trang bị với máy trộn mỏ neo và với bộ cảm biến để đọc các giá trị pH đã được nạp 70 ml nước đã làm sạch, và sau đó phải khuấy. Huyền phù được khuấy trong 10 phút, ở nhiệt độ 20°C, và sau đó được nghiền nhỏ. Sau 20 phút nghiền nhỏ, khoảng 3,1 g dung dịch NaOH 15% trọng lượng được thêm vào huyền phù, cho đến khi đạt được độ pH ổn định nằm trong khoảng từ 8,1 đến 8,4. Huyền phù casein được aspartyl hóa được lọc, lò phản ứng và bộ lọc được rửa với 50 ml nước đã làm sạch, sau đó nước rửa được thêm vào dung dịch đã làm sạch.

(F) Phản ứng với sắt clorua và lọc sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa thô.

Dung dịch ở giai đoạn (E) được đưa đến lò phản ứng tráng men được trang bị máy trộn cánh quạt và với bộ cảm biến để đọc các giá trị pH. Dung dịch đồng nhất này được thêm tổng cộng 6,2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 26,9% trọng lượng (dung dịch sắt), sau đó:

i) Thêm 1,7 g dung dịch sắt và thêm đồng thời 0,6 g NaOH 15% trọng lượng để giữ độ pH nằm trong khoảng từ 8,3 đến 8,5. Dung dịch được khuấy trong 15 phút.

ii) Thêm 4,5 g dung dịch sắt còn lại cho đến khi độ pH của dung dịch duy trì trong khoảng từ 2,8 đến 3,0. Huyền phù được khuấy trong vòng 1 giờ. Độ pH được điều chỉnh bằng dung dịch HCl 6 N hoặc dung dịch NaOH 15% trọng lượng, tương ứng.

Huyền phù của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa đạt được. Sản phẩm phản ứng được khuấy trong 20 phút, và dẫn xuất sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa thô được thu lại bằng cách lọc.

(G) Hòa tan phức hợp và lọc.

Phức hợp rắn được phân tán trong 70 g nước tinh khiết và sau đó thêm 3,85 g dung dịch NaOH 15% trọng lượng cho đến khi độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$. Dung dịch được khuấy trong 30 phút. Dung dịch còn lại được lọc theo thứ tự các tạp chất không hoà tan được tách ra. Dư lượng không hòa tan ít hơn 0,5% trọng lượng.

(H) Kết tủa và tách riêng của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa ẩm tinh khiết.

Dung dịch trong, mà được đưa vào lò phản ứng có tráng men được trang bị máy trộn cánh quạt và bộ cảm biến để đọc giá trị pH, được thêm 2,28 g dung dịch nước HCl 6 N, ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C, trong khoảng từ 20 đến 30 phút, cho đến khi đạt được độ pH từ 2,8 đến 3,0. Vào thời điểm cuối của việc bổ sung, sản phẩm phản ứng được khuấy trong 20 phút, và kết tủa của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa tinh khiết đã hình thành được thu hồi bằng cách lọc và rửa tiếp với nước đã lọc sạch.

(I) Sấy khô sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa.

Sản phẩm tinh khiết ẩm thu được trong giai đoạn trước được sấy khô dưới chân không, ở nhiệt độ tăng từ 60°C đến 70°C, trong khoảng thời gian là 24 giờ. Sau quá trình sấy khô, thu được 6,5 g phức hợp sắt (III) casein N-axetyl-L-aspartyl

hóa tinh khiết, với hàm lượng nước < 5% trọng lượng (Karl Fisher), có các đặc tính hóa học và hóa lý sau:

Đặc tính sản phẩm	Giá trị
Màu	Nâu đỏ
Độ hòa tan	Hòa tan trong NaOH có độ pH = 8
Độ pH	2,8
Sắt tự do (không được tạo phức)	<0,05% trọng lượng
Tổng lượng sắt	5,5% trọng lượng
Protein	75,2% trọng lượng
Axit N-axetyl-L-aspartic được tạo phức	7,1% trọng lượng
Axit N-axetyl-L-aspartic tự do	0,1% trọng lượng
Clorua	1,8% trọng lượng
Hàm lượng vi khuẩn	<10 ³ CFU/g
Hàm lượng nấm mốc và men	<10 ² CFU/g

Ví dụ 2 - Điều chế phức hợp sắt casein N-axetyl-L-aspartyl hóa

(A) Sự hòa tan casein.

Trong một lò phản ứng bằng thép không gỉ với máy lắc đầy đủ và dụng cụ đo độ pH, thêm 5 g casein dùng cho thực phẩm hoặc dược phẩm vào 70 g nước tinh khiết vi sinh khử ion hoá. Hỗn hợp được khuấy cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất. Khoảng 1,5 g dung dịch natri hydroxit (NaOH) 15% trọng lượng được thêm vào, ở nhiệt độ 20°C, trong thời gian 10 phút, cho đến khi đạt được độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$. Dung dịch được lắc thêm 15 phút nữa.

(B) Điều chế N-Axetyl-L-Aspartyl Clorua.

Trong một lò phản ứng bằng thép không rỉ với máy lắc đầy đủ được thêm vào, 15,2 ml (tương đương 15) thionyl clorua (SOCl_2), chất xúc tác là 40 μl dimethyl focmamit (DMF), 2,5 g axit N-axetyl-L-aspartic và hỗn hợp được làm nóng đến 75°C trong điều kiện hồi lưu. Hỗn hợp được khuấy cho đến khi hoàn thành phản ứng bằng việc hình thành sản phẩm axyl clorua. Trong phản ứng này, lưu huỳnh dioxit (SO_2) và hydro clorua (HCl) được tạo ra đều là loại khí có thể rời khỏi bình phản ứng, đẩy phản ứng về phía trước. Thionyl clorua còn lại được làm bay hơi bằng cách nung nóng hỗn hợp phản ứng dần dần lên đến 75°C , gần với điểm sôi ($74,6^\circ\text{C}$) của SOCl_2 .

(C) phản ứng casein axetyl-aspartyl hóa.

Dung dịch thu được từ giai đoạn (A) của casein đã được hòa tan được thêm từ từ vào dung dịch N-axetyl-L-aspartic clorua của giai đoạn (B), đồng thời thêm vào khoảng 3,1 g NaOH 15% trọng lượng, duy trì độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$, ở nhiệt độ phòng. Dung dịch thu được được khuấy mạnh trong 2 giờ.

(D) Chuyển và tinh chế casein axetyl aspartat qua kết tủa.

Dung dịch thu được từ giai đoạn (C) được chuyển vào lò phản ứng tráng men được cung cấp với máy trộn và bộ cảm biến phù hợp để đọc các giá trị pH. Dung dịch, giữ ở nhiệt độ 20°C , sau đó được axit hóa với khoảng 2,28 g dung dịch HCl 6 N trong thời gian 40 phút, cho đến khi đạt được độ pH bằng 3. Khi đạt đến độ pH mục tiêu, ngừng bổ sung axit và thu được kết tủa. Sự giảm giá trị pH gây ra sự hình thành kết tủa casein N-axetyl-L-aspartyl hóa được lọc sạch từ các muối khác, các sản phẩm phản ứng khác, và các tạp chất hoà tan khác.

(E) Lọc và nghiền nhỏ.

Cazein N-axetyl-L-aspartyl hóa thu được trong giai đoạn (D) được thu lại bằng cách lọc. Các sản phẩm ẩm được lấy ra khỏi bộ lọc, và sau đó đưa vào lò phản ứng bằng thép không gỉ được trang bị với máy trộn mỏ neo và với bộ cảm biến để đọc các giá trị pH đã được nạp 70 ml nước đã làm sạch, và sau đó phải khuấy. Huyền phù được khuấy trong 1 giờ, ở nhiệt độ 20°C, và sau đó phải nghiền nhỏ. Sau 20 phút nghiền nhỏ, khoảng 3,1 g dung dịch NaOH 15% trọng lượng được thêm vào huyền phù, cho đến khi đạt được độ pH ổn định nằm trong khoảng từ 8,1 đến 8,4. Vào thời điểm cuối của việc bổ sung, sản phẩm phản ứng được xử lý một lần nữa trong cùng một lò phản ứng, trong khoảng thời gian khoảng 2 giờ. Hoạt động này tạo điều kiện cho việc phân rã của các hạt rắn cazein N-axetyl-L-aspartyl hóa. Huyền phù cazein aspartyl hóa được lọc, lò phản ứng và bộ lọc được rửa với 50 ml nước đã làm sạch, sau đó nước rửa được thêm vào dung dịch đã làm sạch.

(F) Phản ứng với sắt clorua và lọc sắt cazein-N-axetyl-L-aspartyl hóa thô.

Dung dịch ở giai đoạn (E) được đưa đến lò phản ứng tráng men được trang bị máy trộn cánh quạt và với bộ cảm biến để đọc các giá trị pH. Dung dịch đồng nhất này được thêm 6,2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 26,9% trọng lượng (dung dịch sắt), sau đó:

i) Thêm 1,7 g dung dịch sắt và thêm đồng thời 0,6g NaOH 15% để duy trì độ pH nằm trong khoảng từ 8,3 đến 8,5. Dung dịch được khuấy trong 15 phút.

ii) Thêm 4,5 g dung dịch sắt còn lại cho đến khi độ pH của dung dịch trong khoảng từ 2,8 đến 3,0. Huyền phù được khuấy trong vòng 1 giờ. Độ pH được điều chỉnh bằng dung dịch HCl 6 N hoặc dung dịch NaOH 15%, tương ứng.

Huyền phù của sắt cazein-N-axetyl-L-aspartyl hóa đạt được. Sản phẩm phản ứng được khuấy trong 20 phút, và dẫn xuất sắt cazein-N-axetyl-L-aspartyl hóa thô được thu lại bằng cách lọc.

(G) Hòa tan phức hợp và lọc.

Phức hợp rắn được phân tán trong 70 g nước tinh khiết và sau đó thêm 3,85 g dung dịch NaOH 15% trọng lượng cho đến khi độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$. Dung dịch được khuấy trong 30 phút. Dung dịch còn lại được lọc theo thứ tự các tạp chất không hoà tan được tách ra. Dư lượng không hòa tan ít hơn 0,5% trọng lượng.

(H) Kết tủa và tách riêng sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa ẩm tinh khiết.

Dung dịch trong, mà được đưa vào lò phản ứng có tráng men được trang bị máy trộn cánh quạt và bộ cảm biến để đọc giá trị pH, được thêm 2,28 g dung dịch nước HCl 6 N, ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C, trong khoảng từ 20 đến 30 phút, cho đến khi đạt được độ pH từ 2,8 đến 3,0. Vào thời điểm cuối của việc bổ sung, sản phẩm phản ứng được khuấy trong 20 phút, và kết tủa của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa tinh khiết đã hình thành được thu hồi bằng cách lọc và rửa tiếp với nước đã lọc sạch.

(I) Sự sấy khô của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa.

Sản phẩm tinh khiết ẩm thu được trong giai đoạn trước được sấy khô dưới chân không, ở nhiệt độ tăng từ 60°C đến 70°C, trong khoảng thời gian là 24 giờ. Sau quá trình sấy khô, thu được 6,6 g phức hợp sắt (III) casein N-axetyl-L-aspartyl hóa tinh khiết, với hàm lượng nước < 5% trọng lượng (Karl Fisher), có các đặc tính hóa học và hóa lý sau:

Đặc tính sản phẩm	Giá trị
Màu	Nâu đỏ
Độ hòa tan	Hòa tan trong NaOH có độ pH = 8
Độ pH	2,7
Sắt tự do (không được tạo phức)	<0,05% trọng lượng

Tổng lượng sắt	5,7% trọng lượng
Protein	84,1% trọng lượng
Axit N-axetyl-L-aspartic được tạo phức	7,3% trọng lượng
Axit N-axetyl-L-aspartic tự do	0,2% trọng lượng
Clorua	1,6% trọng lượng
Hàm lượng vi khuẩn	$<10^3$ CFU/g
Hàm lượng nấm mốc và men	$<10^2$ CFU/g

Ví dụ 3 - Điều chế phức hợp sắt casein N-axetyl-L-aspartyl hóa

(A) Sự hòa tan casein.

Trong một lò phản ứng bằng thép không gỉ với máy lắc đầy đủ và dụng cụ đo độ pH, thêm 5 g casein dùng cho thực phẩm hoặc dược phẩm trên 70 g nước tinh khiết vi sinh khử ion hoá. Hỗn hợp được khuấy cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất. Khoảng 1,5 g dung dịch natri hydroxit (NaOH) 15% trọng lượng được thêm vào, ở nhiệt độ 20°C, trong thời gian 10 phút, cho đến khi đạt được độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$. Dung dịch được lắc thêm 15 phút nữa.

(B) Điều chế N-Axetyl-L-Aspartyl Clorua.

Trong một lò phản ứng bằng thép không gỉ với máy lắc đầy đủ được thêm vào, 15,6 ml (tương đương 15) thionyl clorua (SOCl_2), chất xúc tác là 100 μl dimetyl focmamit (DMF), 2,5 g axit N-axetyl-L-aspartic. Hỗn hợp được làm nóng đến 75°C trong điều kiện hồi lưu cho đến khi phản ứng kết thúc bằng sự hình thành sản phẩm acyl clorua. Trong phản ứng này, lưu huỳnh dioxide (SO_2) và hydro clorua (HCl) được tạo ra đều là loại khí có thể rời khỏi bình phản ứng, đẩy phản ứng về phía trước. Thionyl clorua còn lại được làm bay hơi bằng cách nung nóng hỗn hợp phản ứng dần dần lên đến 75°C, gần với điểm sôi (74,6°C) của SOCl_2 .

(C) phản ứng casein axetyl-aspartyl hóa.

Dung dịch thu được từ giai đoạn (A) của casein đã được hòa tan được thêm từ từ vào dung dịch N-axetyl-L-aspartic clorua của giai đoạn (B), đồng thời thêm vào khoảng 3,1 g NaOH 15% trọng lượng, duy trì độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$, ở nhiệt độ phòng. Dung dịch thu được được khuấy mạnh trong 2 giờ.

(D) Chuyển và tinh chế casein axetyl aspartat qua kết tủa.

Dung dịch thu được từ giai đoạn (C) được chuyển vào lò phản ứng tráng men được cung cấp với máy trộn và bộ cảm biến phù hợp để đọc các giá trị pH. Dung dịch, giữ ở nhiệt độ 20°C, sau đó được axit hóa với khoảng 2,28 g dung dịch HCl 6 N trong thời gian 40 phút, cho đến khi đạt được độ pH bằng 3. Khi đạt đến độ pH mục tiêu, ngừng bổ sung axit và thu được kết tủa. Sự giảm giá trị pH gây ra sự hình thành kết tủa của casein N-axetyl-L-aspartyl hóa được lọc ra từ các muối khác, các sản phẩm phản ứng khác, và các tạp chất hoà tan khác.

(E) Lọc và nghiền nhỏ.

Casein N-axetyl-L-aspartyl hóa thu được trong giai đoạn (D) được thu lại bằng cách lọc. Các sản phẩm ẩm được lấy ra khỏi bộ lọc, và sau đó đưa vào lò phản ứng bằng thép không gỉ được trang bị với máy trộn mỏ neo và với bộ cảm biến để đọc các giá trị pH đã được nạp 70 ml nước đã làm sạch, và sau đó phải khuấy. Huyền phù được khuấy trong 1 giờ, ở nhiệt độ 20°C, và sau đó phải nghiền nhỏ. Sau 20 phút nghiền nhỏ, khoảng 3,1 g dung dịch NaOH 15% trọng lượng được thêm vào huyền phù, cho đến khi đạt được độ pH ổn định nằm trong khoảng từ 8,1 đến 8,4. Vào thời điểm cuối của việc bổ sung, sản phẩm phản ứng được xử lý một lần nữa trong cùng một lò phản ứng, trong khoảng thời gian khoảng 2 giờ. Hoạt động này tạo điều kiện cho sự phân rã và sau đó là sự hòa tan các hạt rắn casein N-axetyl-L-aspartyl hoá. Huyền phù casein aspartyl hóa được lọc, lò phản ứng và bộ

lọc được rửa với 50 ml nước đã làm sạch, sau đó nước rửa được thêm vào dung dịch đã làm sạch.

(F) Phản ứng với sắt clorua và lọc sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa thô.

Dung dịch ở giai đoạn (E) được đưa đến lò phản ứng tráng men được trang bị máy trộn cánh quạt và với bộ cảm biến để đọc các giá trị pH. Dung dịch đồng nhất này được thêm tổng cộng 6,2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 26,9% trọng lượng (dung dịch sắt), sau đó:

i) Thêm 1,7 g dung dịch sắt và thêm đồng thời 0,6g NaOH 15% để độ pH nằm trong khoảng từ 8,3 đến 8,5. Dung dịch được khuấy trong 15 phút.

ii) Thêm 4,5 g dung dịch sắt còn lại cho đến khi độ pH của dung dịch trong khoảng từ 2,8 đến 3,0. Huyền phù được khuấy trong vòng 1 giờ. Độ pH được điều chỉnh bằng dung dịch HCl 6 N hoặc dung dịch NaOH 15%, tương ứng.

Huyền phù của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa đạt được. Sản phẩm phản ứng được khuấy trong 20 phút, và dẫn xuất sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa thô được thu lại bằng cách lọc.

(G) Hòa tan phức hợp và lọc.

Phức hợp rắn được phân tán trong 70 g nước tinh khiết và sau đó thêm 3,85 g dung dịch NaOH 15% trọng lượng cho đến khi độ pH bằng $8,5 \pm 0,1$. Dung dịch được khuấy trong 30 phút. Dung dịch còn lại được lọc theo thứ tự các tạp chất không hoà tan được tách ra. Dư lượng không hòa tan ít hơn 0,5% trọng lượng.

(H) Kết tủa và tách riêng sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa ẩm tinh khiết.

Dung dịch trong, mà được đưa vào lò phản ứng có tráng men được trang bị máy trộn cánh quạt và bộ cảm biến để đọc giá trị độ pH, được thêm 2,28 g dung dịch nước HCl 6 N, ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C, trong khoảng từ 20 đến 30 phút, cho đến khi đạt được độ pH từ 2,8 đến 3,0. Vào thời điểm cuối của việc bổ sung,

sản phẩm phản ứng được khuấy trong 20 phút, và kết tủa của sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa tinh khiết đã hình thành được thu hồi bằng cách lọc và rửa tiếp với nước đã lọc sạch.

(I) Sấy khô sắt casein-N-axetyl-L-aspartyl hóa.

Sản phẩm tinh khiết ẩm thu được trong giai đoạn trước được sấy khô dưới chân không, ở nhiệt độ tăng từ 60°C đến 70°C, trong khoảng thời gian là 24 giờ. Sau quá trình sấy khô, thu được 6,4 g phức hợp sắt (III) casein N-axetyl-L-aspartyl hóa tinh khiết, với hàm lượng nước < 5% trọng lượng (Karl Fisher), có các đặc tính hóa học và hóa lý sau:

Đặc tính sản phẩm	Giá trị
Màu	Nâu đỏ
Độ hòa tan	Hòa tan trong NaOH có độ pH = 8
Độ pH	2,8
Sắt tự do (không phức hợp)	<0,05% trọng lượng
Tổng số sắt	5,3% trọng lượng
Protein	88,0% trọng lượng
Axit N-axetyl-L-aspartic được tạo phức	7,0% trọng lượng
Axit N-axetyl-L-aspartic tự do	0,6% trọng lượng
Clorua	1,8% trọng lượng
Hàm lượng vi khuẩn	<10 ³ CFU/g
Hàm lượng nấm mốc và men	<10 ² CFU/g

Tài liệu trích dẫn

1. GB910321 “Improvements in and relating to a process of preparing Ferrous Salts of Aspartic Acid and Medicines containing these Salts”.
2. Arzneimittel-Forschung, 1984; 34(9):948-952 “Iron derivatives of modified milk protein”.
3. US4493829, 1985, “Bio-available succinylated protein-iron derivatives which do not cause gastric lesions, method of preparation and related pharmaceutical compounds”.
4. EP0243322, 1987, “Compounds containing bioavailable iron, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them”.
5. International Journal of Clinical Pharmacology, therapy, and toxicology, 1993; 31(1):40-51 “Chemical and biological characterization of iron-protein succinylate (ITF 282)”.
6. EP0939083 “Ferro-succinylcasein complex, process for its preparation and pharmaceutical compositions containing it”.
7. US2001031748 “Use of metal complexes to treat gastrointestinal infections”.
8. Clinical Drug Investigation, 2005; 25(11):679-689 “Overview of clinical trials in the treatment of iron deficiency with iron-acetyl-aspartylated casein”.
9. WO2006021843 “A process for producing iron succinyl casein and acetyl-aspartate iron casein complexes and use thereof in pharmaceutical mixtures”.
10. Tetrahedron: Asymmetry 18 (2007) 1625–1627.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình điều chế phức hợp sắt (III) với casein N-axetyl-L-aspartyl hóa, bao gồm các bước:

(a) phản ứng của casein với N-axetyl-L-aspartyl clorua, tạo thành casein N-axetyl-L-aspartyl hoá,

(b) phản ứng tiếp theo của casein N-axetyl-L-aspartyl hóa với sắt clorua; và

(c) thu được phức hợp sắt (III) với casein N-axetyl-L-aspartyl hóa.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó casein được sử dụng là casein cấp thực phẩm.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước (a) bao gồm việc cung cấp dung dịch casein, và trong đó việc bổ sung N-axetyl-L-aspartyl clorua vào dung dịch casein được thực hiện ở giá trị pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó N-axetyl-L-aspartyl clorua được điều chế *in situ*, tốt hơn là bằng cách sử dụng các thuốc thử clo hóa được chọn từ nhóm gồm thionyl clorua (SOCl_2), phospho pentaclorua (PCl_5), phospho triclорua (PCl_3), cacbon tetrachlorua (CCl_4), oxalyl clorua (COCl_2), phosphoryl clorua (POCl_3), 2-chloro-1,3-bis(metoxycarbonyl)guanidin (Palau'Chlor), cyanuric clorua và N-chlorosuccinimide.

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó phức hợp sắt (III) với casein N-axetyl-L-aspartyl hoá đã thu được trong bước (c) được làm sạch trước khi được đưa vào để làm khô hoặc sấy phun hoặc làm khô đông lạnh.

6. Quy trình điều chế dược phẩm chứa phức hợp sắt (III) với casein cấp thực phẩm được N-axetyl-L-aspartyl hóa, quy trình này bao gồm quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và kết hợp phức hợp sắt (III) với casein cấp thực phẩm được N-axetyl-L-aspartyl hóa với các tá dược, cụ thể là được chọn từ chất pha loãng và chất bảo quản.