

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 312**

51 Int. Cl.:

**C13K 3/00** (2006.01)

**C07H 3/04** (2006.01)

**A61K 31/7016** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2004 E 04756860 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **20.12.2006 EP 1733058**

54 Título: **Complejos de hierro sacarosa y método de producción de los mismos**

30 Prioridad:

**16.03.2004 US 553712 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.01.2013**

73 Titular/es:

**NAVINTA LLC (50.0%)  
1499 Lower Ferry Road  
Ewing, NJ 08618-1414, US**

72 Inventor/es:

**NEWTON, CRISTOPHER, BENNY y  
RANGISETTY, JAGADEESH, BABU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 394 312 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Complejos de hierro sacarosa y método de producción de los mismos

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de complejos de hierro sacarosa.

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## A. Terapia de hierro por vía intravenosa

La terapia de hierro es necesario para reponer las reservas de hierro totales del cuerpo en pacientes con anemia por deficiencia de hierro. Las composiciones terapéuticamente activas que contienen hierro comprenden hierro en una forma capaz de aumentar la cantidad de hemoglobina en la sangre. La vía intravenosa (IV) se utiliza sobre todo para los pacientes que no pueden tolerar la terapia con hierro oral, no son capaces de absorber adecuadamente el hierro de la dieta, o que sufren insuficiencia hematopoyética.

## B. Efectos secundarios potenciales de la terapia con hierro IV

Una formulación de hierro, hierro dextrano, se ha asociado con efectos adversos significativos. Estos efectos se presentan en aproximadamente en el 26% de los pacientes que reciben hierro dextrano. Véase, Gupta *et al*, *Kidney Int.*, 1999 Mayo; 55 (5):1891-8. La causa subyacente de las reacciones severas inmediatas no está clara. Sin embargo, se conocen reacciones anafilácticas al dextrano lo que le ha implicado como la causa de las reacciones graves al hierro dextrano IV. Se piensa que los productos de hierro IV libres de dextrano disminuyen o evitan estas reacciones graves.

Un producto que está libre de dextrano es el complejo de hierro sacarosa en sacarosa (Venofer®). Informes de seguridad del producto para el hierro sacarosa demuestran una baja incidencia de efectos adversos. Un estudio de 77 pacientes que recibieron un total de 757 dosis, informó sólo de 4 pacientes que presentaron eventos adversos relacionados con la administración de hierro sacarosa. Los hechos denunciados fueron diarrea, dolor abdominal, náuseas, estreñimiento, y un sabor a menta transitorio. Diez de los pacientes en este estudio tenían antecedentes documentados de reacciones de sensibilidad al hierro dextrano que fueron consistentes con anafilaxia y ninguno experimentó una reacción de hipersensibilidad con el hierro sacarosa. Véase, Charytan *et al.*, *Am J Kidney Dis.* 2001 Febrero; 37 (2) :300-7

El documento de patente IN 187116 describe un procedimiento para la preparación de óxido de hierro azucarado en polvo a partir de (i) filtrar una solución de carbonato de sodio en agua destilada; (ii) filtrar una solución de cloruro férrico en agua destilada, (iii) añadir la solución de la etapa (ii) a la solución de la etapa (iii) con agitación constante durante al menos 45 minutos; (iv) ajustar el pH de 7 a 7,5 por adición de carbonato de sodio a temperatura ambiente; (v) decantar el líquido sobrenadante de la papilla de hidróxido férrico así formado, (vi) separar el hidróxido férrico, (vii) mezclar la sacarosa en polvo con hidróxido férrico de la etapa (vi); (viii) calentar la mezcla y ajustar el pH en el intervalo de 6,5 a 7,5 con hidróxido de sodio al 15%, y (ix) secar a 85° C para obtener hidróxido de hierro en polvo.

## 35 C. Pureza de los complejos de hierro sacarosa

El complejo de hierro sacarosa en sacarosa generalmente contiene contaminantes que incluyen excipientes, sacarosa libre y los subproductos de la síntesis del complejo, que se detectan fácilmente mediante técnicas tales como cromatografía de permeación de gel (GPC). El método compendio de análisis para el complejo de hierro sacarosa en sacarosa se describe en la Farmacopea de Estados Unidos (USP 26).

Un método cromatográfico para la separación y purificación de un producto de complejo de hierro sacaroideo se da a conocer en los documentos publicados de solicitud de la patente de Estados Unidos US 2002/0076821 y 2003 /0153086. Un complejo de hierro sacarosa, sustancialmente libre de excipientes que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 5.000 daltons, se describe también.

Pequeñas variaciones en la estructura molecular y la composición pueden determinar la diferencia entre un complejo de hierro activo que no tiene efectos adversos, y otro complejo de hierro que puede inducir reacciones adversas. Véase, "Raising the Bar for Quality Drugs", páginas 26-31, *Chemical and Engineering News*, American Chemical Society, 19 de marzo de 2001. Hay descrita una correlación entre la toxicidad de los complejos de hierro sacaroideo y el mayor peso molecular y la variabilidad del tamaño del complejo. Véase, Fishbane *et al.*, *Semin Dial.* 2000 Noviembre-Diciembre; 13 (6):381-4.

Una composición de complejo de hierro sacarosa que comprende una distribución de peso molecular más estrecha puede producir una terapia más segura y más eficaz. Existe una necesidad de un método preparativo para el complejo de hierro sacarosa que produzca un producto con una distribución de peso molecular más estrecha en comparación con las composiciones existentes.

**Compendio de la invención**

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un procedimiento de preparación de un complejo de hierro sacarosa que contiene no más del 15% (p/p) de excipientes, según la reivindicación 1.

5 La relación molar seleccionada de sacarosa a hidróxido férrico es de 2:1 a 50:1, preferiblemente de 2:1 a 20:1, más preferiblemente de 5:1 a 20:1.

Los iones de sodio están presentes en la mezcla de reacción acuosa en una relación molar de iones de sodio a sacarosa en el intervalo de 1,0:0,5 a 1:20, preferiblemente de 1: 1 a 1:10; más preferiblemente de 1:3 a 1:8.

El pH de la mezcla de reacción acuosa está en el intervalo de 6,5 a 13, preferiblemente de 7 a 13, preferiblemente de 8 a 12, más preferiblemente de 8 a 10.

10 La temperatura seleccionada de la mezcla de reacción acuosa es una temperatura en el intervalo de 75° C a 120° C, preferiblemente en el intervalo de 95° C a 120° C. El intervalo de tiempo seleccionado está en el intervalo de 2 minutos a 40 horas, preferiblemente en el intervalo de 2 minutos a 300 minutos.

Según algunas sub-realizaciones de la invención, la mezcla de reacción acuosa comprende de 0,2% p/p a 8% p/p en base al peso de la mezcla de reacción.

15 La mezcla de reacción acuosa puede ser concentrada antes de la etapa de aislamiento del complejo de hierro sacarosa para reducir el volumen de la mezcla de reacción a un volumen que esté preferiblemente en el intervalo de 20% a 80% del volumen original de la misma, más preferiblemente en el intervalo de 20% a 70% del volumen original de la misma.

20 Según una realización de la invención, el peso molecular promedio en peso del complejo de hierro sacarosa aislado está en el intervalo de 20.000 a 400.000 daltons, preferiblemente, en el intervalo de 20.000 a 120.000 daltons, más preferiblemente en el intervalo de 30.000 a 60.000 daltons. De acuerdo con ciertas sub-realizaciones de la invención, el peso molecular promedio en peso del complejo de hierro sacarosa preparado es de alrededor de 35.000, alrededor de 40.000, alrededor de 45.000, alrededor de 50.000, alrededor de 55.000, alrededor de 60.000, alrededor de 65.000, alrededor de 70.000, alrededor de 75.000, alrededor de 80.000, alrededor de 85.000, alrededor de 90.000, alrededor de 95.000, alrededor de 100.000, alrededor de 105.000, alrededor de 110.000, alrededor de 115.000, alrededor de 130.000, alrededor de 135.000, alrededor de 140.000, alrededor de 145.000, alrededor de 150.000, alrededor de 155.000, alrededor de 160.000, alrededor de 165.000, o alrededor de 170.000 daltons.

30 Según una sub-realización de la invención, la etapa de aislamiento del hierro sacarosa comprende concentrar la mezcla de reacción de la etapa (b) para formar un residuo que comprende un complejo de hierro sacarosa.

Según otra sub- realización de la invención, la etapa de aislamiento del complejo de hierro sacarosa comprende

(i) formar una mezcla mediante la adición a la mezcla de reacción de la etapa (b) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa; y

(ii) recoger el complejo de hierro sacarosa precipitado, de la mezcla formada en la etapa (i).

35 Según una realización de la etapa de aislamiento del complejo de hierro sacarosa, la etapa de recolección del complejo de hierro sacarosa precipitado comprende la filtración de la mezcla formada en la etapa (i).

Según otra realización de aislamiento del complejo de hierro sacarosa, la etapa de recolección del complejo de hierro sacarosa precipitado comprende la centrifugación de la mezcla formada en la etapa (i).

40 Según otra realización de aislamiento del complejo de hierro sacarosa, la etapa de recolección del complejo de hierro sacarosa precipitado comprende la liofilización de la mezcla formada en la etapa (i).

Según una realización preferida de la invención, el hidróxido férrico utilizado para formar el complejo de hierro sacarosa según la invención se prepara haciendo reaccionar al menos una sal férrica, preferiblemente, cloruro férrico, nitrato férrico, o una mezcla de los mismos, con al menos una base en una mezcla de reacción que comprende un medio acuoso.

45 El complejo de hierro sacarosa recogido se purifica opcionalmente, tal como por medio de:

(a) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso;

(b) formar una mezcla mediante la adición a la solución del complejo de hierro sacarosa de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución; y

(c) separar el complejo de hierro sacarosa purificado de la mezcla formada en la etapa (b).

Según una realización de la purificación del complejo de hierro sacarosa recogido, la etapa de separación del complejo de hierro sacarosa purificado precipitado comprende la filtración de la mezcla formada en la etapa (b).

5 Según otra realización de la purificación del complejo de hierro sacarosa recogido, la etapa de separación del complejo de hierro sacarosa precipitado purificado comprende la centrifugación de la mezcla formada en la etapa (b).

El complejo de hierro sacarosa purificado opcionalmente se seca.

Según otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento de preparación de una solución acuosa de sacarosa y del complejo de hierro sacarosa, que comprende las etapas de:

10 (a) hacer reaccionar el hidróxido de hierro y la sacarosa en una mezcla acuosa de reacción que comprende iones de sodio, en una relación molar seleccionada de sacarosa a hidróxido férrico, durante un intervalo de tiempo seleccionado, a una temperatura seleccionada, y a un pH en el intervalo de 6,5 a 13;

(b) aislar el complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción;

(c) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso para formar una solución;

15 (d) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (c) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;

(e) recoger el complejo purificado de hierro sacarosa de la mezcla formada en la etapa (d); y

20 (f) disolver el complejo de hierro sacarosa purificado, preparado según la etapa (e), en una solución de sacarosa en agua, preferiblemente en una solución de sacarosa en agua que contiene en el intervalo del 20% al 40% (p/p) de sacarosa en agua, más preferiblemente en una solución al 30% (p/p) de sacarosa en agua.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento de preparación de un co-precipitado que comprende el complejo hierro sacarosa y sacarosa, el procedimiento comprende las etapas de:

25 (a) hacer reaccionar el hidróxido de hierro y la sacarosa en una mezcla de reacción acuosa que comprende iones de sodio, en una relación molar seleccionada de sacarosa a hidróxido férrico, durante un intervalo de tiempo seleccionado, a una temperatura seleccionada, y a un pH en el intervalo de 6,5 a 13;

(b) aislar complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción;

(c) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso para formar una solución;

(d) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (c) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;

30 (e) recoger el complejo de hierro sacarosa purificado a partir de la mezcla formada en la etapa (d);

(f) disolver el producto del complejo de hierro sacarosa preparado según la etapa (e) en una solución de sacarosa acuosa;

35 (g) formar una mezcla mediante la adición a la solución de complejo de hierro sacarosa formado en la etapa (f) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para co-precipitar el complejo de hierro sacarosa y sacarosa;

(h) recoger el co-precipitado formado en la etapa (g), y opcionalmente

(i) secar el co-precipitado.

40 La relación del complejo de hierro sacarosa purificado a la sacarosa en la solución acuosa de sacarosa en la etapa (a) del método de preparación del co-precipitado es de 1:0,1 a 1:20 en peso (p/p), preferiblemente en el intervalo de 1:0,5 a 1:5 en peso (p/p). La concentración de la solución de sacarosa empleada para producir el co-precipitado está preferiblemente en el intervalo de 10% a 50% en peso/volumen de sacarosa en agua.

Según otra realización de la invención, se proporciona otro procedimiento para la preparación de un co-precipitado que comprende el complejo de hierro sacarosa y sacarosa. El procedimiento comprende las etapas de:

(a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende una sal férrica disuelta en un medio acuoso;

45 (b) añadir a la mezcla de reacción una primera base en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 equivalentes basados en la cantidad de sal férrica;

(c) permitir que la mezcla de reacción se equilibre durante un intervalo de tiempo en el intervalo de 10 a 60 minutos;

(d) formar una mezcla mediante la adición de sacarosa a la mezcla de reacción equilibrada de la etapa (c) en una relación molar seleccionada según la cantidad de sal férrica en la mezcla de reacción;

5 (e) calentar la mezcla formada en la etapa (d) a una primera temperatura;

(f) formar una mezcla mediante la adición a la mezcla calentada formada en la etapa (e) de una segunda base en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la mezcla de reacción a un pH seleccionado;

(g) calentar la mezcla formada en la etapa (f) a una segunda temperatura durante un intervalo de tiempo seleccionado;

10 (h) después del intervalo de tiempo seleccionado, enfriar la mezcla de reacción a una temperatura en el intervalo de 20° C a 30° C, y

(i) aislar el co-precipitado de la mezcla de reacción enfriada.

15 La primera temperatura seleccionada está preferiblemente en el intervalo de 60° C a 90° C, más preferiblemente de 60° C a 80° C y la segunda temperatura seleccionada está en el intervalo de 75° C a 120° C, preferiblemente en el intervalo de 95° C a 120° C. Las bases adecuadas para uso como la primera y/o segunda bases seleccionadas incluyen, por ejemplo, carbonatos de metales alcalinos, por ejemplo, carbonato de sodio; bicarbonatos de metales alcalinos, por ejemplo, bicarbonato de sodio; hidróxidos de metales alcalinos, por ejemplo, hidróxido de sodio; aminas solubles en agua, por ejemplo, tris-hidroximetil-aminometano, y mezclas de los mismos.

20 La relación molar seleccionada de sacarosa a sal férrica en la etapa (d) está en el intervalo de 2:1 a 50:1, preferiblemente, en el intervalo de 2:1 a 20:1.

La etapa de aislamiento del co-precipitado preferiblemente comprende las etapas de:

(a) formar una mezcla mediante la adición a la mezcla de reacción enfriada formada en la etapa (h) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para co-precipitar el complejo de hierro sacarosa y sacarosa;

25 (b) recoger el co-precipitado formado en la etapa (a); y opcionalmente

(c) secar el co-precipitado.

30 La mezcla de reacción enfriada de la etapa (h) puede ser opcionalmente concentrada para reducir el volumen de la mezcla de reacción a un volumen en el intervalo preferiblemente del 20% al 80% del volumen original de la mezcla de reacción de la etapa (h), más preferiblemente del 20% al 70% del volumen original de la mezcla de reacción de la etapa (h) antes de la adición del disolvente orgánico miscible con agua;

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento de preparación de una solución acuosa de sacarosa y complejo de hierro sacarosa que comprende las etapas de:

35 (a) hacer reaccionar hidróxido de hierro y sacarosa en una mezcla acuosa de reacción que comprende iones de sodio, en una relación molar seleccionada de sacarosa a hidróxido férrico, durante un intervalo de tiempo seleccionado, a una temperatura seleccionada, y a un pH en el intervalo de 6,5 a 13;

(b) aislar el complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción;

(c) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso para formar una solución;

(d) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (c) de al menos un disolvente orgánico miscible en agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;

40 (e) recoger el complejo de hierro sacarosa purificado de la mezcla formada en la etapa (d);

(f) disolver el producto del complejo de hierro sacarosa purificado formado en la etapa (e) en una solución acuosa de sacarosa;

45 (g) formar una mezcla mediante la adición a la solución del complejo de hierro sacarosa formado en la etapa (f) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para co-precipitar el complejo de hierro sacarosa y la sacarosa;

(h) recoger el co-precipitado formado en la etapa (g), y

(i) disolver el co-precipitado recogido en agua.

Según otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de una solución acuosa de sacarosa y complejo de hierro sacarosa, que comprende las etapas de:

5 (a) combinar hidróxido férrico y sacarosa, en una mezcla de reacción acuosa, en una proporción molar de sacarosa a hidróxido férrico seleccionada, a una temperatura seleccionada y a un pH en el intervalo de 7 a 13, preferiblemente de 8 a 12, más preferiblemente de 9,5 a 12, lo más preferible de 10,5 a 12;

(b) mantener la mezcla de reacción a la temperatura seleccionada durante un intervalo de tiempo de 2 a 300 minutos; y

(c) añadir a la mezcla de reacción una cantidad seleccionada de sacarosa.

10 La temperatura seleccionada está en el intervalo de 75° C a 120° C, preferentemente en el intervalo de 95° C a 120° C, y la relación molar seleccionada de sacarosa a hidróxido férrico en la etapa (a) está en el intervalo de 2:1 a 50:1, preferiblemente, en el intervalo de 2:1 a 20:1, más preferiblemente, en el intervalo de 5:1 a 20:1.

La cantidad de sacarosa añadida en la etapa (c) es preferiblemente de 1 a 50 veces la cantidad de hidróxido de hierro usado en la etapa (a), en unas bases de mol/mol, más preferiblemente de 1 a 20 veces la cantidad de hidróxido de hierro usado en la etapa (a), sobre una base mol/mol.

15 Los complejos de hierro sacarosa preparados de acuerdo con el procedimiento de la invención comprenden de 1 a 60% de hierro férrico (peso/peso), preferiblemente de 1 a 55% de hierro férrico (peso/peso), más preferiblemente de 1 a 50% de hierro férrico (peso/peso). De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, el complejo de hierro sacarosa preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención comprende de 30% a 50% de hierro férrico (peso/peso), más preferiblemente alrededor 45% de hierro férrico. De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el complejo de hierro sacarosa preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención comprende de 2% a 15% de hierro férrico (peso/peso), más preferiblemente alrededor de 5% de hierro férrico (peso/peso).

20 Según otra realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica en una forma de dosificación sólida que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un complejo de hierro sacarosa que tiene un peso molecular en el intervalo de 20.000 a 400.000 daltons.

25 Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención comprende un complejo de hierro sacarosa preparado por el procedimiento según la presente invención.

### Definiciones

30 La expresión "sustancialmente libre de excipientes," utilizada para describir el producto complejo de hierro sacarosa formado por el método de la invención significa que el producto contiene 15% (peso/peso) de excipientes o menos, y correspondientemente contiene 85% (peso/peso) o más del complejo de hierro sacarosa. Preferiblemente, el complejo de hierro sacarosa formado por el método de la invención contiene 10% (peso/peso) de excipientes o menos. Más preferiblemente, el complejo de hierro sacarosa formado por el método de la invención contiene 5% (peso/peso) de excipientes o menos.

35 El término "excipientes" tal como se utiliza en este documento, se refiere a los componentes del producto de un procedimiento de la invención que son distintos del complejo de hierro sacarosa. Los ejemplos incluyen, sacarosa libre, agua y disolventes y sustancias relacionadas con el procedimiento de síntesis. Por "sustancias relacionadas con el procedimiento de síntesis" se entiende los reactivos utilizados en la síntesis y los productos de degradación de cualquiera de los reactivos de síntesis o de los productos de reacción.

40 La expresión "peso molecular promedio en peso" a menos que se indique de otra manera, es una expresión del peso molecular de una sustancia que comprende una distribución de pesos moleculares en lugar de un peso molecular único. El "peso molecular promedio en peso" se calcula como una suma de los cuadrados de los pesos de una fracción de la distribución de peso molecular, dividido por el peso total de las moléculas. El peso molecular promedio en peso puede determinarse por cromatografía de permeación en gel (GPC) utilizando el índice de refracción, dispersión de la luz, dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS), o por la velocidad de sedimentación.

45 La expresión "metal alcalino", como se emplea en este documento se refiere a metales o iones de metales que se encuentran en el Grupo I de la tabla periódica. Los metales alcalinos preferidos son litio, sodio y potasio.

50 El término "base" tal como se utiliza en este documento, se refiere a una especie química que dona electrones o iones hidróxido (definición de Arrhenius) o que acepta protones (definición de Brønsted). Las bases incluyen bases fuertes, es decir, bases que están completamente disociadas en solución acuosa y bases débiles, o sea, bases que están sólo parcialmente disociadas en solución acuosa. Ejemplos de bases fuertes incluyen hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. Ejemplos de bases débiles incluyen amoníaco y aminas de alquilo.

La expresión "disolvente orgánico miscible con agua", a menos que se indique otra cosa, se refiere a un disolvente orgánico que es soluble en agua en todas las proporciones a temperatura y presión estándar. Disolventes orgánicos miscible con agua adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dioxano, dimetil formamida, dimetil acetamida, y N-metilpirrolidinona.

- 5 El término "co-precipitación", usado en este documento, se refiere a la precipitación simultánea de más de una sustancia disuelta a partir de una solución o suspensión.

Las expresiones, "medio acuoso" y "disolvente acuoso" se refieren, a menos que se indique otra cosa, a un disolvente o medio que es el agua, o una mezcla de agua y uno o más disolventes orgánicos miscibles con agua.

- 10 La expresión "sustancialmente libre de material cristalino" se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un material que no se puede distinguir por medio de la difracción de rayos X en polvo del mismo material presente exclusivamente como un sólido amorfo.

La expresión "forma de dosificación sólida" significa una preparación farmacéutica sólida en forma de, por ejemplo un comprimido, cápsula, píldora, polvo, o gránulos.

### Descripción de las figuras

- 15 La figura 1 muestra un trazado de cromatografía de permeación en gel (GPC) de un complejo de hierro sacarosa preparado por el procedimiento de la invención, que tiene un peso molecular promedio en peso de 49.000 daltons.

La figura 2 muestra un trazado de GPC de un complejo de hierro sacarosa en solución acuosa al 20% preparado por el procedimiento de la invención, en donde el complejo de hierro sacarosa tiene un peso molecular promedio en peso de 50.000 daltons.

- 20 La figura 3 muestra un trazado de GPC de un complejo de hierro sacarosa de la marca Venofer® en el que el complejo de hierro sacarosa en sacarosa tiene un peso molecular promedio en peso de 46.000 daltons.

La figura 4 muestra un trazado de GPC de un complejo de hierro sacarosa en el que el complejo de hierro sacarosa tiene un peso molecular promedio en peso de 90.000 daltons.

- 25 La figura 5 muestra un difractograma de rayos X de un complejo de hierro sacarosa purificado seco, preparado en el Ejemplo 6 que es amorfo y sustancialmente libre de sacarosa.

La figura 6 muestra un difractograma de rayos X de un complejo de hierro sacarosa, purificado, seco preparado en el Ejemplo 8 que contiene una cantidad detectable del complejo hierro sacarosa cristalino.

### **Descripción detallada de la invención**

- 30 Los complejos de hierro sacarosa actualmente empleados en terapia contienen cantidades significativas de contaminantes detectables por análisis de GPC. La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de complejos de hierro sacarosa que están sustancialmente libres de excipientes. Los complejos de hierro sacarosa, sustancialmente libres de excipientes, se pueden utilizar para formular una composición terapéutica de hierro sacarosa que contiene niveles más bajos de contaminantes.

#### A. Hidróxido férrico

- 35 El término "hidróxido férrico", como se emplea en este documento, incluye las diversas formas de hidróxido férrico, incluyendo, por ejemplo, óxido férrico hidratado, hidróxido oxiférrico, hidróxido férrico polimérico, gel de hidróxido férrico, sales férricas parcialmente neutralizadas y sales férricas poliméricas parcialmente neutralizadas. Las diversas formas de hidróxido férrico se puede expresar de acuerdo con la Fórmula I:



- 40 en la que "a" y "z" representan números enteros que son independientemente de 1 a alrededor de 1000, preferiblemente de 1 a alrededor de 500; "Y" es un catión distinto de Fe<sup>III</sup>, por ejemplo, amonio o alquil-amonio; "b", "d", "k" y "m" representan números enteros que son independientemente de 0 a aproximadamente 1000, preferiblemente de 0 a aproximadamente 500; "X" es un anión, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, acetato, citrato, y otros aniones de ácidos; "e" representa el número equivalente del anión X.

- 45 B. Preparación del hidróxido férrico

El hidróxido férrico utilizado como material de partida en el proceso de la presente invención se puede preparar por reacción de una sal férrica con al menos alrededor de un equivalente molar de una base, basado en la cantidad de la sal férrica. Pueden emplearse una mezcla de sales férricas, y/o una mezcla de bases. Sales férricas adecuadas incluyen sales férricas en las que el anión es un anión de un ácido tal como, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro,

nitrate, sulfato, acetato, citrato y otros aniones de ácidos. Sales férricas preferidas incluyen, por ejemplo cloruro férrico y nitrate férrico.

5 Las bases adecuadas para la reacción con la sal férrica incluyen, por ejemplo, carbonatos de metales alcalinos, bicarbonatos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos, aminas solubles en agua y mezclas de las mismas. Las bases preferidas incluyen carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, tris-hidroximetil aminoetano y mezclas de los mismos.

10 El hidróxido férrico se pueden preparar por medio de (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una sal férrica disuelta en un medio acuoso; (b) añadir a la mezcla de reacción una primera base en una cantidad de 1 a 2 equivalentes basados en la cantidad de sal férrica, (c) permitir que la mezcla de reacción se equilibre durante un intervalo de tiempo mayor de aproximadamente 10 minutos, preferiblemente de 10 minutos a 120 minutos, más preferiblemente de 10 minutos a 60 minutos, (d) añadir a la mezcla de reacción equilibrada una segunda base en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la mezcla de reacción a un pH seleccionado, y (e) recoger el hidróxido férrico a partir de la mezcla de reacción.

Las bases primera y segunda puede ser la misma, o pueden ser diferentes bases.

15 Las bases se pueden añadir a la mezcla de reacción en solución o suspensión en un disolvente acuoso. Alternativamente, las bases se pueden añadir como tal, es decir, una base tal como carbonato de sodio se puede añadir como un sólido seco.

20 La primera base se puede añadir a la mezcla de reacción por cargas, es decir, todo de una vez, o de forma continua o semi continua durante un intervalo de tiempo a una velocidad de adición constante o variable. Una adición lenta continua se puede realizar como una valoración en la que el pH de la mezcla se controla continuamente, preferiblemente utilizando un medidor de pH. La adición de la base puede ser detenida cuando un pH seleccionado, preferentemente en el intervalo de 2,0 a 2,5, se consigue en la mezcla de reacción. La tasa de adición de la base para la adición continua lenta es preferiblemente de 0,02 a 0,2 equivalentes de la base por minuto, basado en la cantidad de la sal férrica en la mezcla de reacción.

25 Después de la adición de la primera base a la mezcla de reacción, la mezcla de reacción se deja equilibrar, con o sin agitación. La temperatura se mantiene preferiblemente en el intervalo de 20° C a 30° C. El pH de la mezcla de reacción se observa típicamente que cae a un pH en el intervalo de 1,4 a 1,8 durante el intervalo de tiempo en que la mezcla de reacción se deja equilibrar.

30 La segunda base se añade preferiblemente a la mezcla de reacción continuamente a una velocidad de adición constante, mientras que se controla el pH de la mezcla resultante. Las tasas de adición adecuadas son de 0,02 a 0,2 equivalentes de la base por minuto, basado en la cantidad de la sal férrica en la mezcla de reacción.

35 La adición de la segunda base a la mezcla de reacción se continúa hasta que el pH de la mezcla de reacción está en el intervalo de 3,5 a 9. Según algunas formas de realización, el pH deseado es de aproximadamente 4. De acuerdo con otras realizaciones, el pH deseado es de aproximadamente 7. De acuerdo con aún otras realizaciones, el pH deseado es de aproximadamente 8,3. El hidróxido férrico se forma como un precipitado en la mezcla de reacción durante la adición de la segunda base. El hidróxido férrico precipitado se empieza a formar a un pH de aproximadamente 3.

40 Después de la adición completa de la segunda base, la mezcla de reacción, que comprende una suspensión de hidróxido de hierro, se deja equilibrar durante un intervalo de tiempo de alrededor de 5 minutos a alrededor de 60 minutos. El precipitado de hidróxido férrico se observa que se asienta durante el periodo de equilibrio.

El precipitado de hidróxido férrico puede ser recogido de la mezcla de reacción por cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, filtración, centrifugación, o decantación. La filtración es el preferido. Los métodos adecuados de filtración incluyen filtración al vacío, por ejemplo, a través de un embudo Buckner. Para mayor escala u operaciones de fabricación, un filtro nucha con agitación es lo preferido.

45 La torta del filtrado resultante que comprende el hidróxido de hierro se lava con agua y se prepara después como una papilla en un disolvente acuoso. Los disolventes acuosos adecuados incluyen agua y mezclas de agua con uno o más disolventes orgánicos miscibles con agua, en el que el disolvente orgánico miscible con agua comprende hasta aproximadamente 30% del disolvente acuoso.

### C. Preparación del hierro sacarosa

50 Para preparar el hierro sacarosa, una suspensión o una papilla de hidróxido férrico, como se preparó anteriormente, se hace reaccionar con sacarosa en una mezcla de reacción que comprende iones de sodio. La sacarosa se proporciona preferiblemente como una solución de sacarosa en un disolvente acuoso, en el que la relación de sacarosa al disolvente acuoso está preferiblemente en el intervalo de 1:0,1 a 1:4, más preferiblemente en el intervalo de 1:0,2 a 1:4. Los iones de sodio se proporcionan preferiblemente por adición de una base de sodio, preferiblemente hidróxido de sodio acuoso. La mezcla del hidróxido de hierro y sacarosa puede hacerse básica con



la adición de la base de sodio. La base de sodio se puede añadir al medio acuoso, y el hidróxido férrico puede ser posteriormente añadido. Alternativamente, la base de sodio puede ser añadido a la mezcla del hidróxido de hierro y la sacarosa en el medio acuoso.

5 La mezcla de reacción es opcionalmente enfriada a una temperatura en el intervalo de 20° C a 30° C, antes de la etapa de aislamiento del complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción.

La reacción de hidróxido férrico y sacarosa pueden ser opcionalmente monitorizada para determinar el peso molecular promedio en peso y la pureza del producto de hierro sacarosa. El seguimiento puede realizarse mediante la toma de una parte alícuota de la mezcla de reacción y la realización de un análisis del peso molecular en la parte alícuota.

10 Cuando la reacción de hidróxido de hierro y sacarosa se completa (como se determina por la observación de la transparencia de la mezcla de reacción y por análisis por GPC de alícuotas de la reacción) el complejo de hierro sacarosa se aísla de la mezcla de reacción. El aislamiento se puede lograr mediante la adición de uno o más disolventes orgánicos miscibles con agua a la mezcla de reacción para precipitar el complejo de hierro sacarosa. La cantidad de disolvente orgánico miscible con agua que se añade a la mezcla de reacción está preferiblemente en el intervalo de 0,3 a 10 veces el volumen de la mezcla de reacción a la que se añade. El producto complejo de hierro sacarosa que precipita de la mezcla de reacción después de la adición del disolvente orgánico miscible con agua se recoge de la mezcla de reacción. Métodos adecuado para la recogida del producto incluyen, por ejemplo, filtración, centrifugación y decantación. El producto preferiblemente se recoge por filtración. La selección de medios de filtración adecuados, por ejemplo, una placa de vidrio sinterizada o un embudo de Buckner, está dentro de la capacidad de un experto en la técnica.

25 Alternativamente, el complejo de hierro sacarosa se aísla de la mezcla de reacción por concentración de la mezcla de reacción para formar un residuo que comprende el complejo de hierro sacarosa. La concentración de la mezcla de reacción puede llevarse a cabo a presión reducida o a presión atmosférica, utilizando técnicas de concentración, como la liofilización, destilación o centrifugación al vacío. La concentración de la mezcla de reacción se realiza preferiblemente a una temperatura: de -80° C a 105° C, más preferiblemente a una temperatura de 35° C a 105° C. El aislamiento del complejo de hierro sacarosa por concentración de la mezcla de reacción a baja temperatura y baja presión se denomina en esta solicitud "liofilización". La liofilización se puede realizar usando un aparato comercialmente disponible de liofilización por enfriamiento de la mezcla de reacción por debajo de la temperatura de congelación, preferentemente de -80° C a -50° C y aplicando vacío, preferentemente una presión en el intervalo de 10 militorr a 50 torr, más preferiblemente en el intervalo de 10 militorr a 10 torr, lo más preferible de 10 militorr a 1 torr.

35 El producto complejo de hierro sacarosa así obtenido en la forma de un filtrado o un residuo como se ha descrito anteriormente, puede ser opcionalmente purificado mediante (a) disolver el hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso, (b) formar una mezcla mediante la adición de al menos un disolvente orgánico miscible con agua a la solución formada en la etapa (a), el disolvente se añade en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la mezcla formada en la etapa (b) y (c) recoger el complejo de hierro sacarosa precipitado purificado.

40 El disolvente acuoso utilizado para disolver el filtrado o el residuo se emplea preferiblemente en una cantidad en el intervalo de 0,2 a 10 veces el peso del filtrado o residuo que se disuelve en el mismo, más preferiblemente de 0,3 a 7 veces el peso del filtrado o residuo que se disuelve en el mismo. El pH de la solución resultante se ajusta preferiblemente a un pH en el intervalo de 8 a 14, preferiblemente de 9 a 13, más preferiblemente de 10 a 14, mediante la adición de una base tal como hidróxido de sodio. Los disolventes orgánicos miscibles con agua adecuados para la precipitación del complejo de hierro sacarosa purificado incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, acetona, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo y mezclas de los mismos. La cantidad del disolvente orgánico miscible con agua añadido a la solución del residuo o filtrado para precipitar el complejo de hierro sacarosa se encuentra preferiblemente en el intervalo de una relación de 15:1 a una relación de 1:7 de disolvente orgánico miscible con agua a disolvente acuoso (peso/peso), más preferiblemente de una relación de 1:0,3 a una relación de 1:7 o de una relación de 15:1 a una relación de 1:1 (peso/peso) del disolvente orgánico miscible con agua a disolvente acuoso.

50 El complejo de hierro sacarosa purificado obtenida de este modo, opcionalmente se seca. El secado del complejo de hierro sacarosa purificado se puede llevar a cabo bajo vacío o a presión atmosférica, en el aire o en una atmósfera inerte tal como, por ejemplo, nitrógeno. Preferentemente, el producto purificado se seca a una temperatura de 25° C a 140° C.

55 El complejo de hierro sacarosa purificado preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención contiene preferiblemente no más de aproximadamente 10% peso/peso de sacarosa libre. El complejo de hierro sacarosa purificado preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención preferiblemente contiene no más de aproximadamente 10% (peso/peso) de sales de sodio, tales como por ejemplo cloruro de sodio, bromuro de sodio, yoduro de sodio, nitrato de sodio, sulfato de sodio, acetato de sodio o citrato de sodio, o mezclas de los mismos.

El complejo de hierro sacarosa purificado contiene preferiblemente no más de alrededor del 15% peso/peso de agua y disolvente. El complejo de hierro sacarosa purificado puede existir en una forma hidratada:  $[\text{Complex}]_u[\text{H}_2\text{O}]_v$ ; en donde "Complex" es el complejo de hierro sacarosa; "u" es un número entero: de 1 a 1000, preferiblemente de 1 a 500, y v es un número racional de 0,2 a 50, preferiblemente de 0,2 a 25, más preferiblemente de 0,2 a 10.

- 5 El complejo de hierro sacarosa precipitado purificado así obtenido, puede formularse como una formulación parenteral de hierro. Un ejemplo de una formulación parenteral de hierro comprende disolver el complejo de hierro sacarosa precipitado purificado, que contiene de 20% a 50% de hierro férrico, en una solución acuosa de sacarosa, preferiblemente sacarosa acuosa al 20%, para formar una formulación de hierro parenteral. La concentración de complejo de hierro precipitado purificado en la solución de sacarosa se selecciona de tal manera que la composición es adecuada como una forma inyectable de hierro férrico. Otro ejemplo de una formulación parenteral de hierro comprende disolver el complejo de hierro sacarosa precipitado purificado, que contiene de 2% a 15% de hierro férrico, en agua para inyección para formar una formulación parenteral de hierro. La concentración de complejo de hierro sacarosa precipitado purificado en la solución acuosa se selecciona de manera que la composición sea adecuada como una forma inyectable de hierro férrico.
- 10
- 15 De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica en dosificación sólida que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un complejo de hierro sacarosa que tiene un peso molecular en el intervalo de 20.000 a 400.000 daltons . La composición farmacéutica de la invención puede ser formulada para administración oral y puede estar en la forma de un comprimido, cápsula, píldora, polvo, gránulo o en otra forma de dosificación sólida adecuada con excipientes y aditivos adecuados.

- 20 Por ejemplo, el complejo de hierro sacarosa formado por el procedimiento de la presente invención puede combinar se con al menos un excipiente tal como un agente de relleno, aglutinante, humectante, agente disgregante, retardador de solución, acelerador de la absorción, agentes humectantes, agente absorbente o lubricantes. Según una forma de realización de una forma de dosificación sólida de un complejo de hierro sacarosa formado según el procedimiento reivindicado, el agente activo se puede combinar con carboximetilcelulosa de calcio, estearato de magnesio, manitol y almidón, y después formado en comprimidos por métodos convencionales de formación de comprimidos.
- 25

La composición farmacéutica según la invención comprende un complejo de hierro sacarosa que contiene de 1 a 60% de hierro férrico en peso, preferiblemente de 1 a 50% de hierro férrico en peso, más preferiblemente de 30 a 50% de hierro férrico en peso.

- 30 La composición farmacéutica según la invención contiene preferentemente de 5 a 200 mg de hierro férrico, más preferiblemente de 10 a 150 mg, más preferiblemente de 25 a 100 mg.

La práctica de la invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

Los métodos de análisis siguientes se emplean en los Ejemplos a continuación

- 35 Determinación del peso molecular para el complejo de hierro sacarosa

Se realizaron análisis de GPC utilizando un Shimadzu clase VP, SCL10AVP, con una bomba de LC10AD, equipado con un detector de índice de refracción (Shimadzu RID 10A). La fase móvil utilizada fue un tampón acuoso preparado por disolución de 7,12g de dihidrato de fosfato dibásico de sodio, 5,52 g de fosfato monobásico de sodio, y 0,40 g de azida de sodio en 2 litros de agua.

- 40 Los medios de separación se componen de dos columnas Waters OPC de 7,8 mm x 30 cm (columnas Waters Ultrahydrogel GPC con relleno de la columna que contiene L39, con tamaños de poro de 1000 Å y 120 Å, respectivamente) dispuestas en serie. Las temperaturas de las columnas se mantuvieron a 45° +/- 2° y la velocidad de flujo fue de alrededor de 0,5 ml por minuto.

- 45 Soluciones estándar (Waters dextrano de peso molecular estándar kit parte # WAT 054392) se prepararon pesando con precisión aproximadamente 20 mg de cada patrón de polisacárido de peso molecular (5.000 - 400.000 Da) en una serie de matraces volumétricos de 5 ml. La fase móvil (aproximadamente 4 ml) se añadió a cada matraz y la mezcla resultante se dejó en reposo a o por debajo de 25° C durante un mínimo de 12 horas. Después de que las partículas de aglomerado de cada solución estándar se hincharan en toda su extensión, cada solución estándar se agitó suavemente hasta que el polisacárido se disolvió. Los cromatogramas de las soluciones patrones recientemente preparadas regularmente muestran un pico pequeño secundario no identificado después del pico principal. Cualquier solución estándar en la que el segundo pico alcanzó la mitad de la altura del pico principal se descartó.
- 50

Una solución de prueba de la aptitud del sistema fue también preparada disolviendo 200 mg de dextrano de alto peso molecular y 100 mg de glucosa en 20 ml de la fase móvil.

Las soluciones de la muestra del complejo de hierro sacarosa para el análisis fueron preparadas por transferencia de aproximadamente 250 mg de cada complejo de hierro sacarosa a un matraz aforado de 10-ml, se diluyó hasta la línea con la fase móvil, y se mezcló. Las muestras de ensayo que eran alícuotas de la reacción se prepararon diluyendo 1 ml de la mezcla de reacción hasta 10 ml con fase móvil.

- 5 Alrededor del 25 µl de cada solución estándar y la solución de la muestra de prueba fue inyectada (Shimadzu auto inyector SIL10A-VP) en la columna. Los cromatogramas se registraron y los tiempos de retención y las áreas de los picos de todos los componentes por encima del umbral de detectabilidad se midieron. Los tiempos de retención de los analitos fueron los siguientes:

Pico complejo de hierro sacarosa: alrededor de 27 minutos

- 10 pico de sacarosa (libre): alrededor de 38 minutos

Los tiempos de retención de las soluciones estándar y sus pesos moleculares se trazaron para generar una curva de calibración de tercer orden (cúbico). El coeficiente de correlación obtenido no fue inferior a 0,98. El peso molecular del complejo fue calculado usando la curva de calibración. La curva de distribución del peso molecular de cada muestra fue cortada en fracciones. El peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) se calculó según la fórmula:

15 
$$\Sigma (A_T M_T) / \Sigma A_T$$

en donde  $A_T$  es el área de cada fracción de la distribución de la muestra; y  $M_T$  es el peso molecular promedio correspondiente de cada fracción como se determina a partir de su tiempo de retención en la curva de calibración. La curva de distribución de peso molecular obtenida para la inyección se ajustaba a los siguientes parámetros:

$M_w = 34.000-60.000$  Da,

- 20  $M_n =$  no menos de 24.000 Da, y

$M_w/M_n =$  no más de 1,7.

#### Análisis de FTIR del complejo de hierro sacarosa:

- 25 Aproximadamente 50 mg del complejo de hierro sacarosa fue finamente aplastado con un mortero y mano de ágata. La muestra triturada fue colocada sobre la parte cóncava de la placa del ensamblaje de reflectancia total atenuada horizontalmente (HATR) de un espectrómetro de Perkin Elmer FTIR Spectrum 1. El espectro fue registrado (4 análisis, 4000 a 800  $\text{cm}^{-1}$ ) y corregido en cuanto a señales de fondo.

#### Análisis de RMN del complejo de hierro sacarosa:

- 30 Aproximadamente 5 mg del complejo de hierro sacarosa se disolvieron en 1,5 ml de  $\text{D}_2\text{O}$  y fueron transferidos a un tubo de muestras de RMN. Se registró el RMN de protón (-5 a 20 ppm, espectrómetro de RMN de Varian de 400 MHz) utilizando parámetros estándar, con la sal sódica del ácido 3-trimetilsililpropiónico (TSP) como estándar interno.

#### Determinación del contenido de hierro por espectroscopia de absorción atómica (AAS)

- 35 Se preparó una curva de calibración de contenido de hierro trazando las absorbancias en la línea de emisión de hierro a 248,3 nm frente a la concentración ( $\mu\text{g}$  por ml) con una serie de soluciones estándar de hierro. Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 5000 equipado con una lámpara de cátodo hueco de hierro y llama de aire-acetileno, y usando una solución de cloruro cálcico como la muestra en blanco. Alícuotas de reacción de las reacciones que se realizaron en la preparación de los complejos de hierro sacarosa de la invención se disolvieron en agua, y se registró la absorbancia a 248,3 nm. El contenido de hierro en las muestras preparadas de las alícuotas de reacción se determinó según la curva de calibración preparada.
- 40

#### Análisis elementales

Se realizaron análisis elementales (carbono e hidrógeno) por Atlantic MicroLabs, Norcross, GA.

#### Determinación del grado de cristalinidad de los complejos de hierro sacarosa por análisis de difracción en polvo por rayos X

- 45 Se realizaron análisis de difracción en polvo por rayos X en los productos secos purificados de las reacciones realizadas en la preparación de los complejos de hierro sacarosa de la invención. Cada muestra de complejo de hierro sacarosa de la invención se analizó como un polvo fino. Los productos de reacción purificados secos no requirieron ningún procesamiento adicional antes del análisis de difracción por rayos X. La muestra de polvo para el análisis se colocó sobre un soporte de cero emisiones y se insertó en un difractómetro Philips PW1800 XR. El análisis por rayos X comprendía radiación de Cu sobre el rango angular (theta) de 5° a 60° con un tamaño de paso
- 50

de 0,03°. Los análisis en cada paso requirieron de alrededor de 5 a alrededor de 30 segundos dependiendo del grado de cristalinidad de la muestra.

### **Ejemplo 1: Preparación del complejo hierro sacarosa**

#### Etapa 1 - Preparación del hidróxido férrico

5 Hexahidrato de cloruro férrico anhidro (5 g, 18,5 mmoles) fue disuelto en agua desionizada (20 ml) a una temperatura de alrededor de 20° C. Se añadió a la solución de cloruro férrico agitada una solución acuosa de carbonato de sodio al 30% p/v gota a gota y se monitorizó el pH de la solución de cloruro férrico durante la adición (primera adición de base). La adición se detuvo cuando el pH alcanzó 2,2. El pH de la mezcla se monitorizó usando un medidor de pH. La temperatura de la mezcla se mantuvo a unos 20° C. Después de la adición del carbonato de sodio, la mezcla resultante era de marrón oscuro a marrón rojizo de color. Se permitió que la mezcla reposara durante unos 30 minutos, tiempo durante el cual se observó que el pH de la mezcla de reacción caía a 1,7. Se añadió más solución de carbonato de sodio (segunda adición de base) y se monitorizó el pH de la mezcla. Un precipitado gelatinoso apareció a un pH de aproximadamente 3,0. Se continuó la adición de solución de carbonato de sodio hasta que el pH de la mezcla alcanzó 4,0, proporcionando una suspensión de hidróxido férrico. Tras la adición de la solución de carbonato sódico, se permitió que la mezcla de reacción reposara durante unos 10 minutos para permitir que el precipitado se asentara. El precipitado de hidróxido férrico fue recogido por filtración y lavado con agua (25 ml). La torta húmeda (aproximadamente 15 g) se convirtió en una pasta con agua (aproximadamente 20 ml).

#### Etapa 2 - Preparación del complejo de hierro sacarosa

20 A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 100 ml, equipado con montaje de agitador y condensador de reflujo, se agregó agua (15 ml) y sacarosa (30 g). La mezcla resultante se calentó en un baño de aceite mantenido a 120° C durante alrededor de 10 minutos. Se alcanzó la temperatura de alrededor de 100-105° C en la mezcla. Se añadió hidróxido de sodio (aproximadamente 2 ml, 20% p/v) a la mezcla de reacción caliente. Luego la mezcla de hidróxido férrico preparada en la etapa 1 se añadió a la mezcla de sacarosa durante alrededor de 15 minutos. La mezcla de reacción formó una solución marrón oscura transparente después de que se completara la adición de la suspensión de hidróxido férrico. Tras la adición de la papilla de hidróxido férrico, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a alrededor de 100 a 105° C durante alrededor de 2 horas. La mezcla de reacción fue posteriormente enfriada a temperatura ambiente (20 a 25° C). Se tomó una alícuota (1 ml) de la mezcla de reacción para análisis por GPC para confirmar el peso molecular promedio en peso del producto de complejo de hierro sacarosa (unos 55.000 daltons).

#### Etapa 3 - Aislamiento del complejo de hierro sacarosa

35 Se añadió un disolvente orgánico miscible con agua (etanol, aproximadamente 350 ml) a la mezcla de reacción formada en la etapa 2, a aproximadamente 25° C con agitación. Se formó un precipitado marrón oscuro y fue recogido por filtración. El producto recogido se purificó adicionalmente por disolución en agua (10 ml) y agregación posterior de etanol (50 ml) al producto disuelto para precipitar un producto purificado. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con etanol y se secó al vacío a alrededor de 50° C. El producto purificado fue identificado como un complejo de hierro sacarosa y fue analizado por GPC. El análisis de GPC mostró que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso se mantenía en unos 55.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3. Se determinaron los valores de peso molecular y de peso molecular promedio en peso usando curvas de calibración y ajuste de tercer orden. El procedimiento para la determinación del peso molecular del hierro sacarosa fue el mismo que se describe en la USP 26, página 1016. Se determinó el contenido de Fe, C e H para el complejo de hierro sacarosa precipitado: Fe, 47%; C, 25%; H, 7%;

### **Ejemplo 2: preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 1, excepto que la sal férrica utilizada en el paso 1 fue el nonahidrato del nitrato férrico (7,5 g, 18,5 mmoles).

50 El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 45.000 daltons.

### **Ejemplo 3: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 1, excepto que la adición de la segunda base fue continuada hasta alcanzar el pH 7,0.

El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 65.000 daltons.

#### **Ejemplo 4: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

- 5 Se siguió el procedimiento del ejemplo 1, excepto que la adición de la segunda base fue continuada hasta alcanzar el pH 8,3.

El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 90.000 daltons (Fig. 4).

#### **10 Ejemplo 5: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 1, excepto que en la etapa 2, se agregó la solución de hidróxido de sodio al 20% (2 ml) después de la finalización de la adición de la papilla de hidróxido férrico y en el paso 3, el disolvente miscible con el agua fue metanol.

- 15 El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 120.000 daltons.

#### **Ejemplo 6: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

- 20 Se siguió el procedimiento del ejemplo 1, excepto que la adición de la primera base comprendió la adición de la base (solución acuosa de carbonato de sodio al 30% p/v) como una sola porción de 3,3 ml (aproximadamente 1 equivalente basado en la cantidad de sal férrica).

- 25 El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 50.000 daltons. El análisis de GPC del producto purificado se muestra en la figura 1. Este pico corresponde al pico de hierro sacarosa obtenidos en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la Figura 3.

El análisis de difracción en polvo se obtuvo en una muestra del producto final purificado y seco. El análisis de difracción en polvo se reproduce en la figura 5. El análisis de difracción en polvo indica la presencia de un producto amorfo que está sustancialmente libre de sacarosa cristalina.

#### **Ejemplo 7: preparación del complejo de hierro sacarosa**

- 30 Se siguió el procedimiento del ejemplo 1, excepto que la adición de la primera base comprendió la adición por carga de la base (solución acuosa de carbonato de sodio al 30% p/v) como una sola porción de 6,6 ml (aproximadamente 2 equivalentes basado en la cantidad de sal férrica).

- 35 El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 45.000 daltons.

#### **Ejemplo 8: preparación del complejo de hierro sacarosa**

##### Etapa 1 - preparación del hidróxido férrico

- 40 Se siguió la etapa-1 del procedimiento del ejemplo 1 excepto que la adición de la primera base comprendió la adición por carga de la base (solución acuosa de carbonato de sodio al 30% p/v) como una sola porción de 6,6 ml (aproximadamente 2 equivalentes basado en la cantidad de sal férrica).

##### Etapa 2 - Preparación de los complejos de hierro sacarosa

Se siguió la etapa 2 del procedimiento del ejemplo 1.

##### Etapa 3 - Aislamiento del complejo de hierro sacarosa

- 45 La mezcla de reacción formada en la etapa 2 se concentró por destilación durante alrededor de 30 minutos a aproximadamente 105° C con agitación para formar un residuo. El producto purificado se precipitó del residuo mediante la adición de etanol (50 ml). El precipitado se recogió por filtración, se lavó con etanol y se secó al vacío a alrededor de 50° C. El producto purificado fue identificado por GPC como un complejo de hierro sacarosa. El análisis de GPC mostró un peso molecular correspondiente al pico del complejo de hierro sacarosa de unos 45.000 daltons y un pico adicional de sacarosa.

El análisis de difracción en polvo se obtuvo en una muestra del producto purificado seco. El análisis de difracción en polvo se reproduce en la figura 6. El análisis de difracción en polvo indica un producto que contiene una cantidad significativa de complejo de hierro sacarosa cristalino.

#### **Ejemplo 9: preparación del complejo de hierro sacarosa**

- 5 Se siguió el procedimiento del ejemplo 7, excepto que la adición de la segunda base continuó hasta que el pH alcanzó el valor de 7,0.

El análisis de GPC de la alícuota de reacción y del producto final purificado y seco indicó que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 60.000 daltons.

#### **10 Ejemplo 10: preparación del complejo de hierro sacarosa y análisis de la variación en el peso molecular promedio en peso con el tiempo**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto por los siguientes cambios en las etapas 1 y 2.

Etapas 1: La cantidad de la adición de la primera base fue de 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol.

- 15 Etapas 2: Se tomó una alícuota de la mezcla de reacción inmediatamente después de la finalización de la adición de la papilla de hidróxido férrico. La mezcla de reacción luego se mantuvo a 100-105° C durante unas dos horas, y luego se enfrió a temperatura ambiente (20 a 25° C). Se tomó una segunda parte alícuota de la mezcla de reacción. Se realizó el análisis de GPC sobre las alícuotas primeras y segunda. El peso molecular promedio en peso determinado para la primera alícuota fue de alrededor de 85.000 daltons. El peso molecular promedio en peso determinado para la segunda alícuota fue de alrededor de 50.000 daltons.

- 20 El análisis de GPC del producto final purificado y seco indicó un peso molecular promedio en peso de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

#### **Ejemplo 11: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto por los siguientes cambios en las etapas 1 y 2.

- 25 Etapas 1: La cantidad de la adición de la primera base fue de 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol.

Etapas 2: El disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo fue metanol (350 ml), y el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo purificado fue metanol (50 ml).

- 30 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

#### **Ejemplo 12: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

- 35 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo en la etapa 2 fue yodopropanol (350 ml), y el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue isopropanol (50 ml).

- 40 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

#### **Ejemplo 13: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

- 45 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo en la etapa 2 fue acetona (350 ml), y el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo purificado fue acetona (50 ml).

Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el promedio del peso molecular fue de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis de la sacarosa de hierro en sacarosa comercializada (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

**Ejemplo 14: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

5 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml), y el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetona (50 ml).

Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

**10 Ejemplo 15: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, y el producto purificado se secó al vacío a una temperatura de 120° C. Además, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo y para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml y 50 ml, respectivamente).

15 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

**Ejemplo 16: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

20 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, y la cantidad de sacarosa usada en la etapa 2 fue 15 g. Además, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo y para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml y 50 ml, respectivamente).

25 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 75.000 daltons.

**Ejemplo 17: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

30 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 1 g de carbonato de sodio añadido como un sólido. Además, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo y para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml y 50 ml, respectivamente).

Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 55.000 daltons.

**35 Ejemplo 18: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la adición de la primera base en la etapa 1 fue bicarbonato de sodio sólido (la primera adición fue de 1,6 g añadidos de una vez). Además, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo y para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml y 50 ml, respectivamente).

40 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 55.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

**Ejemplo 19: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

45 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la primera base añadida en la etapa 1 fue bicarbonato de sodio sólido (la primera adición fue de 1,6 g añadidos de una vez) y la segunda base añadida fue hidróxido sódico (solución acuosa al 20%). Además, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo y para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml y 50 ml, respectivamente).

50 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 80.000 daltons.

**Ejemplo 20: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

5 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la primera base añadida en la etapa 1 fue tris-hidroxi-etilaminometano (la primera adición fue de 2,2 g añadidos de una vez) y la segunda base añadida fue hidróxido sódico (solución acuosa al 20%). Además, el disolvente orgánico miscible con agua utilizado para precipitar el complejo y para precipitar el complejo purificado en la etapa 2 fue acetonitrilo (350 ml y 50 ml, respectivamente).

Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 160.000 daltons.

**10 Ejemplo 21: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, y en la etapa 2 la temperatura de calentamiento fue de 80° C y el tiempo de calentamiento fue de alrededor de 4 horas.

15 Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 80.000 daltons.

**Ejemplo 22: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

20 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol. Además, en la etapa 2, el disolvente fue 5 ml de agua y 5 ml de etanol, la temperatura de la reacción fue de alrededor de 80° C, y el tiempo de calefacción fue de aproximadamente 4 horas.

Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción de la etapa 2 y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 90.000 daltons.

**25 Ejemplo 23: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol.

En la etapa 2, el análisis de GPC de la alícuota mostró un peso molecular promedio en peso del producto de unos 50.000 daltons.

30 Además en la etapa 3, la mezcla de reacción se concentró por destilación al vacío a 35° C, antes de la adición de etanol (50 ml), lo que sirvió para precipitar el complejo de hierro sacarosa. Además, se llevó a cabo la purificación de la etapa 3 disolviendo el producto en una solución de sacarosa en agua al 40% p/vol (10 ml) y posteriormente añadiendo etanol (50 ml) al producto disuelto para precipitar un producto purificado. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con etanol y secado al vacío a alrededor de 50° C.

35 El producto purificado fue identificado como un complejo de hierro sacarosa coprecipitado con sacarosa y fue analizado por GPC. El análisis de GPC, que se muestra en la figura 2, demostró que el peso molecular promedio en peso del producto era aproximadamente 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

**Ejemplo 24: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

40 Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol.

En la etapa 2, el análisis de GPC de la alícuota mostró un peso molecular promedio en peso del producto de unos 50.000 daltons.

45 Además en la etapa 3, la mezcla de reacción se concentró por destilación al vacío a 35° C, antes de la adición de etanol (50 ml), lo que sirvió para precipitar el complejo de hierro sacarosa. Además, se llevó a cabo la purificación de la etapa 3 disolviendo el producto en una solución de cloruro sódico en agua al 20% p/vol (10 ml) y posteriormente añadiendo etanol (50 ml) al producto disuelto para precipitar un producto purificado. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con etanol y secado al vacío a alrededor de 50° C.

50 El producto purificado fue identificado como un complejo de hierro sacarosa coprecipitado con cloruro sódico confirmado con la prueba para cloruro sódico usando nitrato de plata. El producto fue también analizado por GPC.



**Ejemplo 25: Preparación del complejo de hierro sacarosa**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 9, excepto que la cantidad de la adición de la primera base en la etapa 1 fue 3,3 ml de carbonato de sodio acuoso al 30% p/vol, y la sal férrica usada en la etapa 1 consistió en una combinación de hexahidrato de cloruro férrico (2,5 g, 9,25 mmoles) y nonahidratado de nitrato férrico (3,75 g, 9,25 mmoles).

- 5 Además en la etapa 3, la mezcla de reacción se concentró por destilación al vacío a 35° C, antes de la adición de etanol (50 ml), lo que sirvió para precipitar el complejo de hierro sacarosa.

Los análisis de GPC de la alícuota de la reacción y del producto final purificado y seco indicaron que el complejo correspondiente al pico principal estaba presente en más del 95% de pureza y que el peso molecular promedio en peso fue de alrededor de 50.000 daltons. Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

**Ejemplo 26: Aislamiento del complejo de hierro sacarosa a través de la concentración de la mezcla de reacción según la etapa 2 del ejemplo 6**

Se siguió el procedimiento del ejemplo 6, excepto que la mezcla de reacción de la etapa 2 fue sometida a destilación al vacío a 50 a 60° C para reducir el volumen de la mezcla de reacción a un 30% de su volumen original. La temperatura de la mezcla resultante se ajustó a 25° C, y se añadió etanol (50 ml) con agitación. Se formó un precipitado de color marrón oscuro. El precipitado fue recogido por filtración. El producto recogido fue purificado por disolución en agua (10 ml). La adición de etanol (50 ml) al producto disuelto sirvió para formar un precipitado. Este precipitado fue recogido por filtración, se lavó con etanol y se secó al vacío a alrededor de 50° C. El producto fue identificado como un complejo de hierro sacarosa coprecipitado con sacarosa. El análisis (GPC) del producto purificado, y de la alícuota obtenida en la etapa 2, proporcionó un peso molecular promedio en peso para el pico correspondiente al complejo de hierro sacarosa de alrededor de 70.000 daltons.

**Ejemplo 27: Preparación (escala de 18 mmoles) del complejo de hierro sacarosa sin aislar el hidróxido férrico por filtración**Etapa 1 - Preparación del hidróxido férrico

25 Hexahidrato de cloruro férrico (5 g) fue disuelto en agua desionizada (20 ml) a una temperatura de alrededor de 20° C. A la solución de cloruro férrico agitada se le añadió carbonato de sodio (3,3 ml de solución acuosa al 30% p/v). El pH de la mezcla fue monitorizado usando un medidor de pH. La temperatura de la mezcla se mantuvo a 20° C. Después de la adición de carbonato de sodio, la mezcla resultante era de marrón oscuro a marrón rojizo. Se dejó reposar la mezcla unos 30 minutos, tiempo durante el cual se observó que el pH de la mezcla de reacción caía a 1,7.

Etapa 2 - Preparación del complejo de hierro sacarosa

Se añadió a la suspensión de hidróxido férrico a pH de 1,7 preparada anteriormente, sacarosa (30 g). La mezcla resultante se calentó a una temperatura de alrededor de 80° C. Se añadió carbonato de sodio para ajustar el pH a 7,0. La mezcla resultante se calentó a una temperatura de 100° C y se agitó a 100° C durante unos 15 minutos. Se añadió hidróxido de sodio (aproximadamente 3 ml, 20% p/v) a la mezcla de reacción caliente. La mezcla de reacción formó una solución marrón oscuro transparente después de que se completó la adición de la suspensión de hidróxido férrico. Tras la adición de la solución de hidróxido de sodio, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a alrededor de 100 a 105° C durante aproximadamente 3 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente (20 a 25° C). Se tomó una alícuota (1 ml) de la mezcla de reacción para que el análisis de GPC confirmara el peso molecular promedio en peso del producto complejo de hierro sacarosa (unos 80.000 daltons).

Etapa 3 - Aislamiento del complejo de hierro sacarosa

La mezcla de reacción se concentró por destilación al vacío de 50 a 60° C a alrededor del 30% de su volumen original. Se añadió etanol (aproximadamente 50 ml) a la mezcla de reacción concentrada a 25° C con agitación. Un precipitado marrón oscuro se formó y fue recogido por filtración. El producto recogido fue purificado adicionalmente por disolución en agua (10 ml) y posteriormente añadiendo etanol (50 ml) al producto disuelto para precipitar un producto purificado. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con etanol y secado al vacío a alrededor de 50° C. El producto purificado fue identificado como complejo de hierro sacarosa y fue analizado por GPC.

**Ejemplo 28: Preparación (escala de 180 mmoles) del complejo de hierro sacarosa**Etapa 1 - Preparación del hidróxido férrico

50 Hexahidrato de cloruro férrico (50 g) fue disuelto en agua desionizada (200 ml) a una temperatura de alrededor de 20° C. A la solución de cloruro férrico agitada se le añadió carbonato de sodio (33 ml de solución acuosa al 30% p/v). El pH de la mezcla fue monitorizado usando un medidor de pH. La temperatura de la mezcla se mantuvo a 20° C. Después de la adición de carbonato de sodio, la mezcla resultante era marrón oscuro a marrón rojizo. Se dejó

5 reposar la mezcla unos 30 minutos, tiempo durante el cual se observó que el pH de la mezcla de reacción caía a 1,7. Se añadió solución de carbonato de sodio adicional y el pH de la mezcla fue monitorizado. Un precipitado gelatinoso apareció a un pH de aproximadamente 3,0. Se añadió solución de carbonato de sodio adicional hasta que el pH de la mezcla alcanzó 4,0, produciendo una suspensión de hidróxido férrico. Después de la adición de la solución de carbonato de sodio, se dejó reposar la mezcla de reacción unos 10 minutos para permitir que el precipitado se depositara. El hidróxido férrico precipitado fue recogido por filtración y lavado con agua (250 ml). La torta de filtro mojado (aproximadamente 150 g) se hizo una papilla con agua (unos 200 ml).

#### Etapa 2 - Preparación del complejo de hierro sacarosa

10 A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 1000 ml, equipado con montaje de agitador y condensador de reflujo, se agregó agua (50 ml) y sacarosa (300 g). La mezcla resultante se calentó en un baño de aceite mantenido a 120° C durante alrededor de 20 minutos. Se alcanzó la temperatura de alrededor de 100-105° C en la mezcla. Se añadió hidróxido de sodio (aproximadamente 20 ml, 20% p/v) a la mezcla de reacción caliente. Luego se añadió la mezcla de hidróxido férrico preparada en la etapa 1 durante alrededor de 25 minutos. La mezcla de reacción formó una solución marrón oscura transparente un minuto después de que se completara la adición de la suspensión de hidróxido férrico. Tras la adición, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a alrededor de 100 a 105° C durante alrededor de 2 horas. La mezcla de reacción fue posteriormente enfriada a temperatura ambiente (20 a 25° C). Se tomó una alícuota (1 ml) de la mezcla de reacción para análisis por GPC para confirmar el peso molecular promedio en peso del producto de complejo de hierro sacarosa (unos 50.000 daltons). Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

#### Etapa 3 - Aislamiento del complejo de hierro sacarosa

25 Se añadió etanol (aproximadamente 3500 ml) a la mezcla de reacción formada en la etapa 2, a 25° C con agitación. Se formó un precipitado marrón oscuro y fue recogido por filtración. El producto recogido se purificó adicionalmente por disolución en agua (100 ml) y agregación posterior de etanol (500 ml) al producto disuelto para precipitar un producto purificado. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con etanol y se secó al vacío a alrededor de 50° C. El producto purificado fue identificado como un complejo de hierro sacarosa y fue analizado por GPC que produjo un peso molecular promedio en peso de alrededor de 50.000 daltons para el pico principal, que estaba presente en más del 95 % de pureza.

### **Ejemplo 29: Preparación del complejo de hierro sacarosa en solución inyectable**

#### Etapa 1 - Preparación del hidróxido férrico

30 Hexahidrato de cloruro férrico (5 g, 18,5 mmoles) fue disuelto en agua desionizada (20 ml) a una temperatura de alrededor de 20° C. A la solución de cloruro férrico agitada se le añadió carbonato de sodio (3,3 ml de solución acuosa al 30% p/v). El pH de la mezcla fue monitorizado usando un medidor de pH. La temperatura de la mezcla se mantuvo a alrededor de 20° C. Después de la adición de carbonato de sodio, la mezcla resultante era marrón oscuro a marrón rojizo. Se dejó reposar la mezcla unos 30 minutos, tiempo durante el cual se observó que el pH de la mezcla de reacción caía a 1,7. Se añadió solución de carbonato de sodio adicional (solución acuosa al 30% p/v) y el pH de la mezcla fue monitorizado. Un precipitado gelatinoso apareció a un pH de aproximadamente 3,0. Se continuó añadiendo solución de carbonato de sodio hasta que el pH de la mezcla alcanzó 4,0, produciendo una suspensión de hidróxido férrico. Después de la adición de la solución de carbonato de sodio, se dejó reposar la mezcla de reacción unos 10 minutos para permitir que el precipitado se depositara. El hidróxido férrico precipitado fue recogido por filtración y lavado con agua (25 ml). La torta de filtro mojada (aproximadamente 15 g) se hizo una papilla con agua (unos 20 ml).

#### Etapa 2 - Preparación del complejo de hierro sacarosa

45 A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 100 ml, equipado con montaje de agitador y condensador de reflujo, se agregó agua para inyectables (5 ml) y sacarosa (15,2 g). La mezcla resultante se calentó en un baño de aceite mantenido a 120° C durante alrededor de 10 minutos. Se alcanzó la temperatura de alrededor de 100-105° C en la mezcla. Se añadió hidróxido de sodio (aproximadamente 2 ml, 20% p/v hecho con agua para inyectables) a la mezcla de reacción caliente. Luego la mezcla de hidróxido férrico preparada en la etapa 1 se añadió a la mezcla de sacarosa durante alrededor de 15 minutos. La mezcla de reacción formó una solución marrón oscura transparente después de que se completara la adición de la suspensión de hidróxido férrico. Tras la adición de la papilla de hidróxido férrico, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a alrededor de 100 a 105° C durante alrededor de 2 horas. La mezcla de reacción fue posteriormente enfriada a temperatura ambiente (20 a 25° C). Se tomó una alícuota (1 ml) de la mezcla de reacción para análisis por GPC para confirmar el peso molecular promedio en peso del producto de complejo de hierro sacarosa (unos 50.000 daltons). La mezcla de reacción se concentró por destilación al vacío a 35° C. El concentrado obtenido se diluyó con agua para dar una solución que contenía 20 mg/ml de hierro férrico adecuada para inyectables.

**Ejemplo 30: preparación del complejo de hierro sacarosa y aislamiento por liofilización**

El complejo de hierro sacarosa fue preparado por el procedimiento descrito en las etapas 1 y 2 del ejemplo 1.

Tras la finalización de la preparación del complejo de hierro sacarosa como en la etapa 2 del ejemplo 1, la mezcla de reacción fue transferida a un matraz de fondo redondo y enfriada a unos -75° C para congelar la mezcla de reacción.

5 La mezcla de reacción congelada entonces fue liofilizada usando un aparato liofilizador modelo I2 EL de VIRTIS a una presión de aproximadamente 25 millitorr durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 12 horas.

**Ejemplo: 31: preparación (escala de 1,8 moles) del complejo de hierro sacarosa y aislamiento por centrifugación**Etapa 1 - Preparación del hidróxido férrico

10 Hexahidrato de cloruro férrico (500 g) fue disuelto en agua desionizada (2000 ml) a una temperatura de alrededor de 20° C. A la solución de cloruro férrico agitada se le añadió carbonato de sodio (330 ml de solución acuosa al 30% p/v). El pH de la mezcla fue monitorizado usando un medidor de pH. La temperatura de la mezcla se mantuvo a alrededor de 20° C. Después de la adición de carbonato de sodio, la mezcla resultante era marrón oscuro a marrón rojizo. Se dejó reposar la mezcla unos 30 minutos, tiempo durante el cual se observó que el pH de la mezcla de

15 reacción caía a 1,7. Se añadió solución de carbonato de sodio adicional y el pH de la mezcla fue monitorizado. Un precipitado gelatinoso apareció a un pH de aproximadamente 3,0. Se añadió solución de carbonato de sodio adicional hasta que el pH de la mezcla alcanzó 4,0, produciendo una suspensión de hidróxido férrico. Después de la adición de la solución de carbonato de sodio, se dejó reposar la mezcla de reacción unos 10 minutos para permitir que el precipitado se depositara. El hidróxido férrico precipitado fue recogido por filtración y lavado con agua (2500

20 ml). La torta de filtro mojada (aproximadamente 1500 g) se hizo una papilla con agua (unos 2000 ml).

Etapa 2 - Preparación del complejo de hierro sacarosa

A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 10 l, equipado con montaje de agitador y condensador de reflujo, se agregó agua (500 ml) y sacarosa (3000 g). La mezcla resultante se calentó en un baño de aceite mantenido a

25 120° C durante alrededor de 20 minutos. Se alcanzó la temperatura de alrededor de 100-105° C en la mezcla. Se añadió hidróxido de sodio (aproximadamente 200 ml, 20% p/v) a la mezcla de reacción caliente. Luego se añadió la papilla de hidróxido férrico preparada en la etapa 1 durante alrededor de 25 minutos. La mezcla de reacción formó una solución marrón oscura transparente un minuto después de que se completara la adición de la suspensión de hidróxido férrico. Tras la adición, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a alrededor de 100 a 105° C durante alrededor de 2 horas. La mezcla de reacción fue posteriormente enfriada a temperatura ambiente (20 a 25°

30 C). Se tomó una alícuota (1 ml) de la mezcla de reacción para análisis por GPC para confirmar el peso molecular promedio en peso del producto de complejo de hierro sacarosa (unos 49.000 daltons). Este pico se corresponde con el pico de hierro sacarosa obtenido en el análisis del hierro sacarosa en sacarosa comercializado (VENOFER®), que se muestra en la figura 3.

Etapa 3 - Aislamiento del complejo de hierro sacarosa

35 Se añadió etanol (unos 5000 ml) a la mezcla de reacción que se formó en la etapa 2, a 25° C con agitación. Se formó un precipitado de color marrón oscuro. El precipitado fue recogido por centrifugación a 1500 rpm utilizando una centrífuga Rousselet-Robatel modelo RC-30. La mezcla que contenía el complejo de hierro sacarosa precipitado fue alimentada a la centrifugadora durante unos 30 minutos, y la centrifugación se continuó durante unos 30 minutos después de que la alimentación se completara.

40 El precipitado recogido fue adicionalmente purificado por disolución en agua (1000 ml) y posteriormente adición de etanol (5000 ml) al producto disuelto para precipitar el producto purificado. El precipitado se recogió por centrifugación como se describió anteriormente. El producto purificado recogido se lavó con etanol, y se secó al vacío a aproximadamente 50° C. El producto purificado fue identificado como un complejo de hierro sacarosa. Análisis por GPC proporcionó un peso molecular promedio en peso de unos 49.000 daltons para el pico principal,

45 que estaba presente en más del 95% de pureza.

La presente invención puede realizarse de otras formas específicas sin apartarse de los atributos esenciales de la misma, y, en consecuencia, debe hacerse referencia a las reivindicaciones anexadas, más que a la especificación anterior, como indicación del alcance de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un complejo de hierro sacarosa que contiene no más del 15% (peso/peso) de excipientes, que comprende las etapas de:
- (a) preparar el hidróxido férrico por un proceso que comprende las etapas de:
- 5 (i) proporcionar una mezcla de reacción que comprende una sal férrica disuelta en un medio acuoso;
- (ii) añadir a la mezcla de reacción de 1 a 2 equivalentes de una primera base basado en la cantidad de sal férrica en la mezcla de reacción;
- (iii) permitir que la mezcla de reacción se equilibre durante un intervalo de tiempo superior a 10 minutos;
- 10 (iv) agregar una segunda base a la mezcla de reacción equilibrada, en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la mezcla de reacción a un pH seleccionado; y
- (v) recoger el hidróxido férrico de la mezcla de reacción;
- (b) hacer reaccionar el hidróxido férrico y sacarosa en una mezcla de reacción acuosa que comprende iones de sodio, en una proporción molar de sacarosa a hidróxido férrico de 2:1 a 50:1, durante un intervalo de tiempo seleccionado, a una temperatura seleccionada, y a un pH en el rango de 6,5 a 13; y
- 15 (c) aislar el complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción acuosa.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde la temperatura seleccionada de la etapa (b) está en el intervalo de 75° C a 120° C.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde el intervalo de tiempo seleccionado de la etapa (b) está en el intervalo de 2 minutos a 40 horas.
- 20 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el complejo de hierro sacarosa aislado comprende un complejo de hierro sacarosa cristalino.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el complejo de hierro sacarosa aislado comprende un complejo de hierro sacarosa amorfo libre de sacarosa cristalina como se determina por difracción de rayos X en polvo.
- 25 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el complejo de hierro sacarosa aislado contiene de 1 a 60% de hierro férrico en peso.
7. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción de la etapa (b) comprende hierro férrico en una cantidad de 0,2% p/p a 8% p/p basado en el peso de la mezcla de reacción.
- 30 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sal férrica es el cloruro férrico, nitrato férrico o una mezcla de los mismos.
9. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde la primera y segunda base se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en carbonatos de metales alcalinos, bicarbonatos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos y aminas solubles en agua.
- 35 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en donde la primera y segunda bases se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio y tris-hidroximetilaminoetano.
11. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde uno o dos equivalentes de la primera base se añaden a la mezcla de reacción en la etapa (a).
- 40 12. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde se agrega la primera base a la mezcla de reacción en la etapa (a) continuamente a una tasa de adición constante de 0,02 a 0,2 equivalentes de la base por minuto, basado en la cantidad de sal férrica, hasta que el pH de la mezcla resultante es de 2,0 a 2,5.
13. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde el pH seleccionado en la etapa (a)(iv) está en el intervalo de 3,5 a 9.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, en donde el pH seleccionado es 4,0, 7,0 o 8,3.
- 45 15. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde el hidróxido férrico se recoge de la mezcla de reacción en la etapa (a)(v) por filtración.

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, que comprende además la etapa de formar una papilla del hidróxido férrico recogido en un disolvente acuoso.
17. Un procedimiento según la reivindicación 16, en donde el disolvente acuoso comprende agua, o una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible con agua.
- 5 18. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de aislamiento del complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción comprende
- (a) formar una mezcla mediante la adición a la mezcla de reacción de la reivindicación 1 ajustada de temperatura de por lo menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa; y
- 10 (b) recoger el complejo de hierro sacarosa precipitado, de la mezcla formada en la etapa (a).
19. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de aislamiento del complejo de hierro sacarosa de la mezcla de reacción acuosa comprende la liofilización de la mezcla de reacción acuosa; centrifugación de la mezcla de reacción acuosa; o concentración de la mezcla de reacción para formar un residuo que comprenda el complejo de hierro sacarosa.
- 15 20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además purificar el complejo de hierro sacarosa aislado, dicha purificación comprende las etapas de:
- (a) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso;
- (b) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (a) de por lo menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;
- 20 y
- (c) recoger el complejo de hierro sacarosa purificado de la mezcla formada en la etapa (b).
21. Un procedimiento para preparar un co-precipitado que comprende un complejo de hierro sacarosa y sacarosa, que comprende las etapas de:
- (a) preparar un complejo de hierro sacarosa aislado según el proceso de la reivindicación 1;
- 25 (b) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso para formar una solución;
- (c) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (b) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;
- (d) recoger el complejo de hierro sacarosa purificado de la mezcla formada en la etapa (c);
- (e) disolver el complejo de hierro sacarosa purificado formado en la etapa (d) en una solución acuosa de sacarosa;
- 30 (f) formar una mezcla mediante la adición a la solución del complejo de hierro sacarosa purificado formado en la etapa (e) de por lo menos un disolvente orgánico miscible con agua en cantidad suficiente para co-precipitar el complejo de hierro sacarosa y la sacarosa; y
- (g) recoger el co-precipitado formado en la etapa (f).
22. Un procedimiento según la reivindicación 21, en donde la proporción de complejo de hierro sacarosa purificado a solución acuosa de sacarosa se encuentra en el intervalo de 1:0,5 a 1:10 por peso.
- 35 23. Un procedimiento según la reivindicación 21, en donde la solución acuosa de sacarosa tiene una concentración en el intervalo de 10% a 50% peso/volumen.
24. Un procedimiento para preparar una solución acuosa de sacarosa y un complejo de hierro sacarosa, que comprende las etapas de:
- 40 (a) preparar un complejo de hierro sacarosa aislado según el proceso de la reivindicación 1;
- (b) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso para formar una solución;
- (c) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (b) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;
- 45 (d) recoger el complejo de hierro sacarosa purificado de la mezcla formada en la etapa (c); y

(e) disolver el complejo de hierro sacarosa purificado producido según la etapa (d) en una solución de sacarosa en agua;

25. Un procedimiento para preparar una solución acuosa de sacarosa y un complejo de hierro sacarosa, que comprende las etapas de:

- 5 (a) preparar un complejo de hierro sacarosa aislado según el proceso de la reivindicación 1;
- (b) disolver el complejo de hierro sacarosa aislado en un disolvente acuoso para formar una solución;
- (c) formar una mezcla mediante la adición a la solución formada en la etapa (b) de al menos un disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad suficiente para precipitar el complejo de hierro sacarosa de la solución;
- (d) recoger el complejo de hierro sacarosa purificado de la mezcla formado en la etapa (c);
- 10 (e) disolver el complejo de hierro sacarosa purificado formado en la etapa (d) en una solución acuosa de sacarosa;
- (f) formar una mezcla mediante la adición a la solución del complejo de hierro sacarosa formado en la etapa (e) de por lo menos un disolvente orgánico miscible con agua en cantidad suficiente para co-precipitar el complejo de hierro sacarosa y la sacarosa;
- (g) recoger el co-precipitado formado en la etapa (f); y
- 15 (h) disolver el co-precipitado recogido en agua.

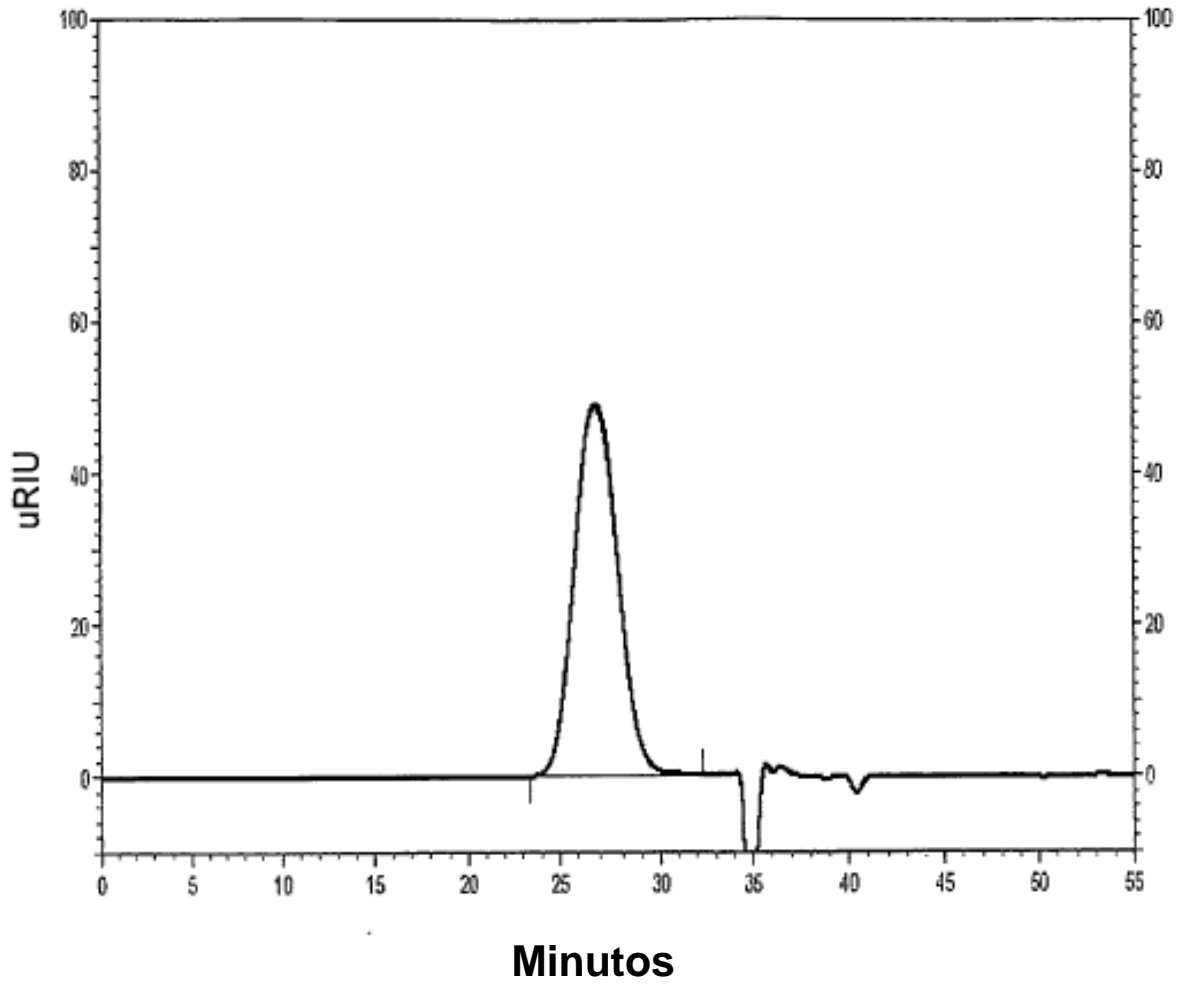


Fig. 1

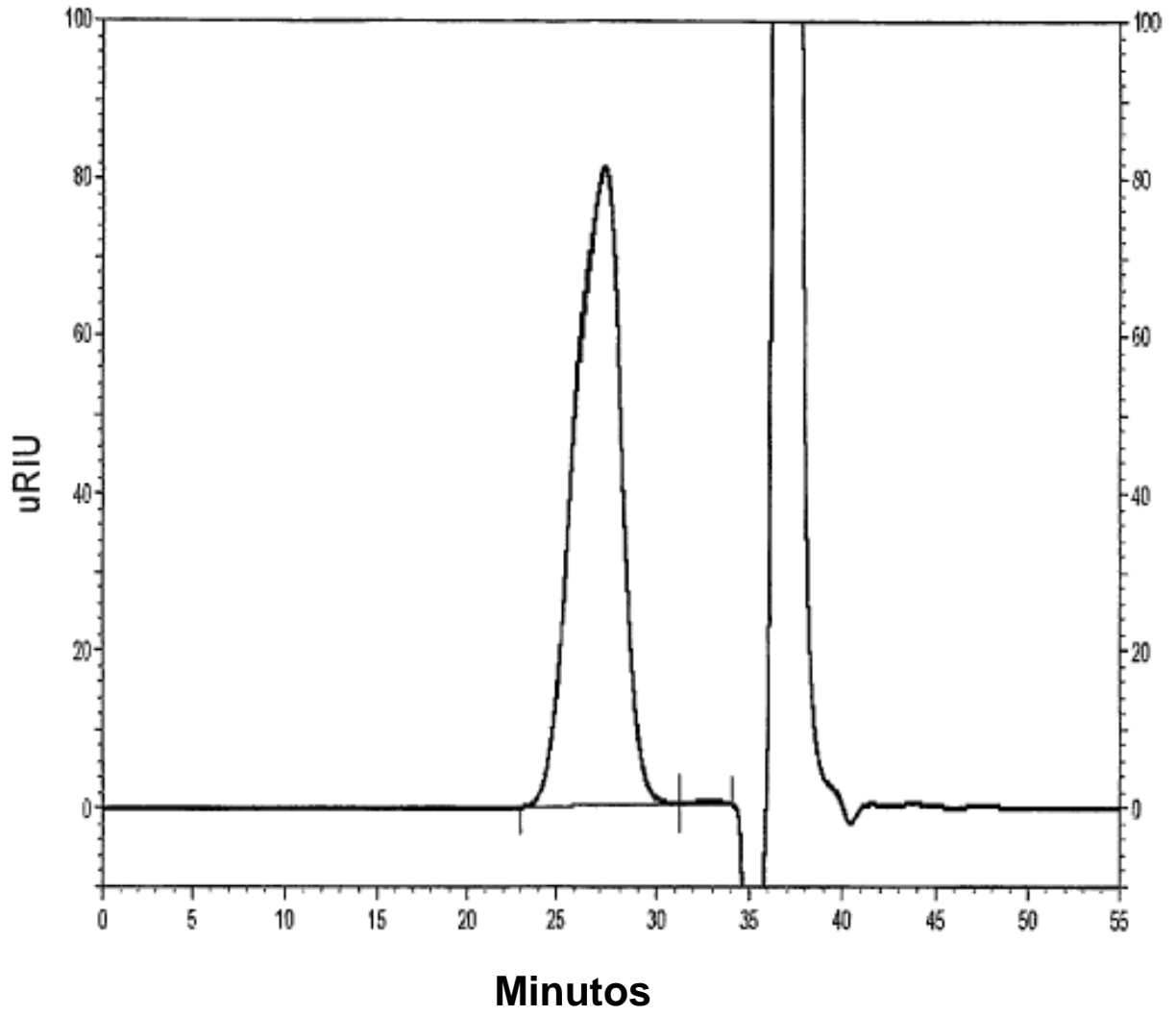


Fig. 2



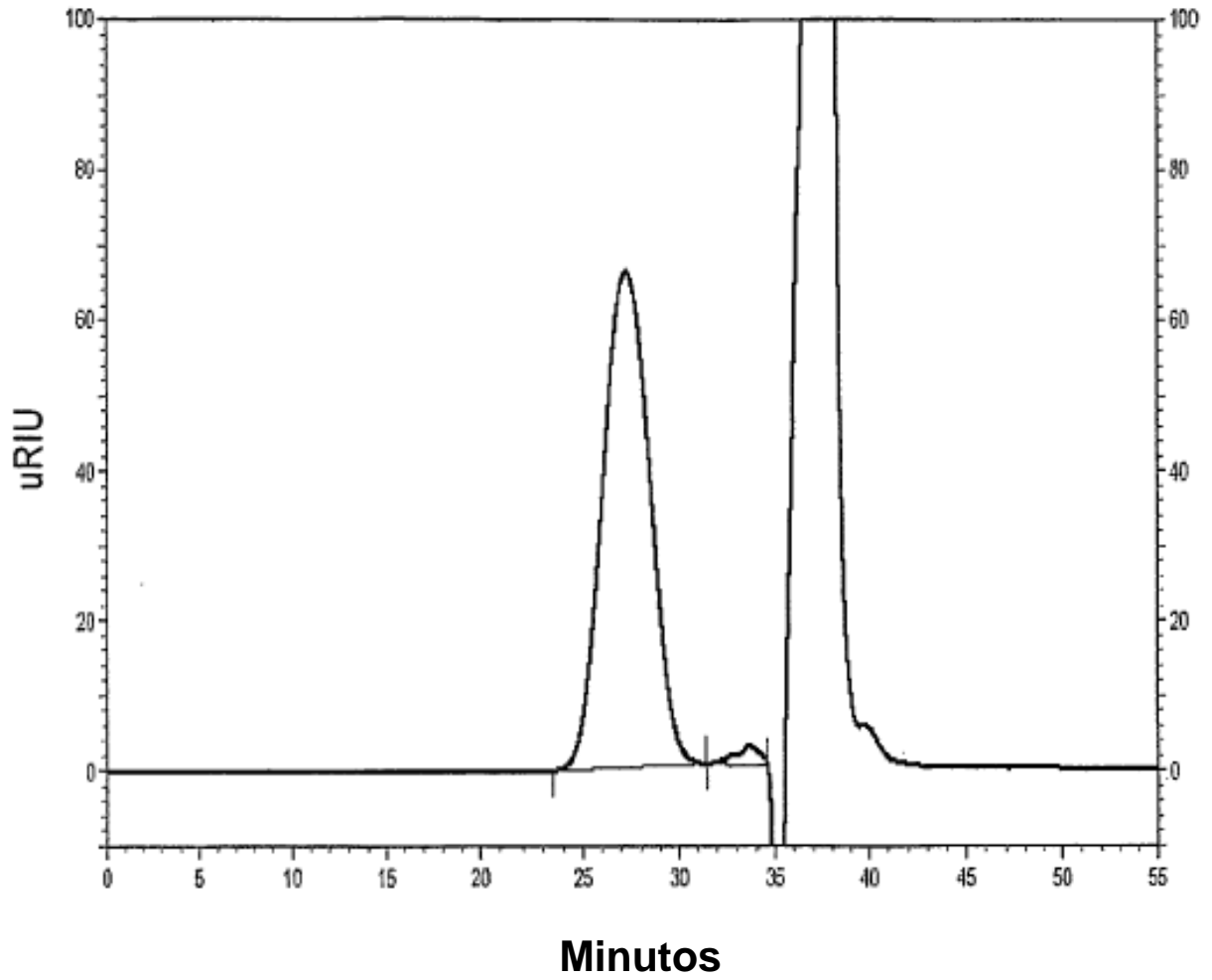


Fig. 3

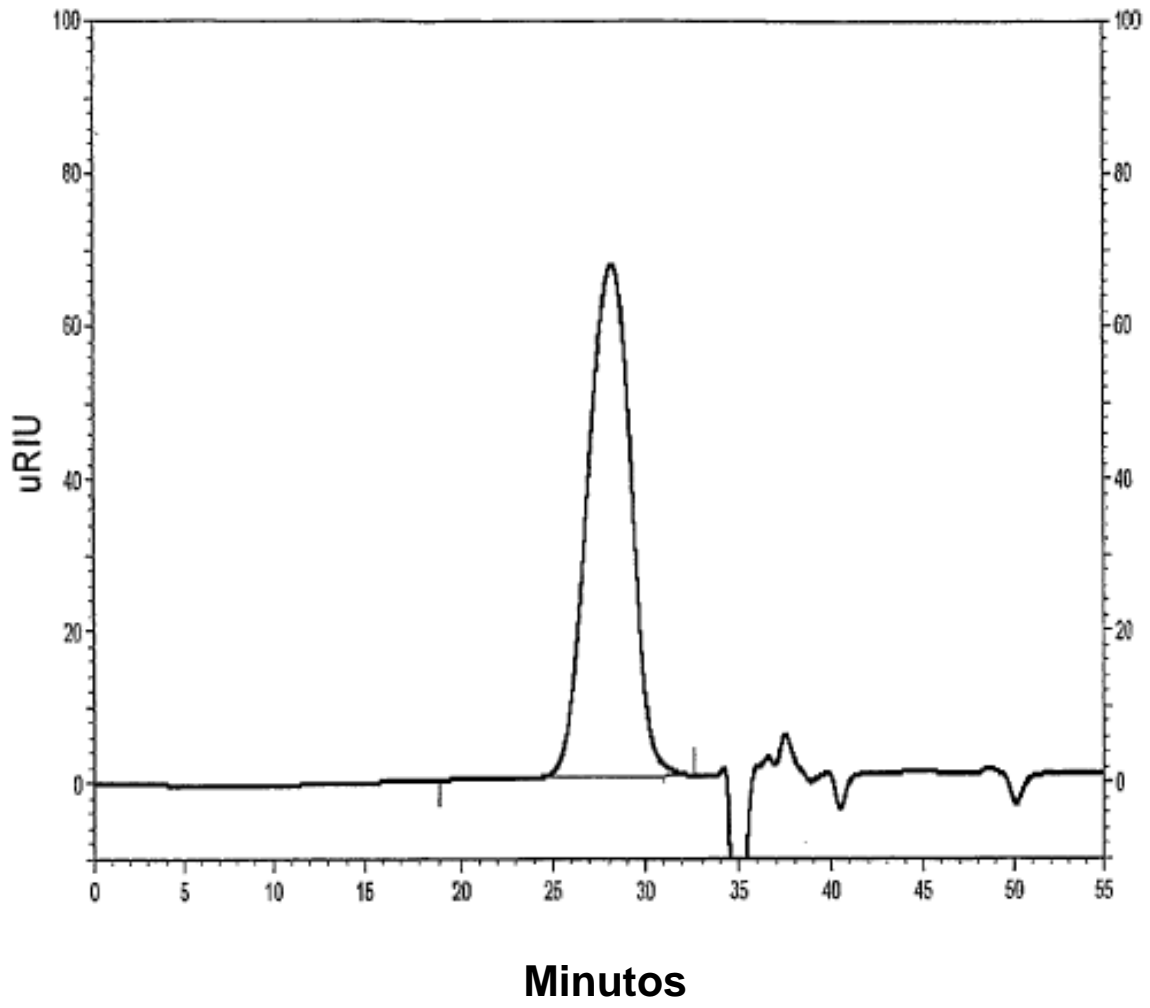


Fig 4

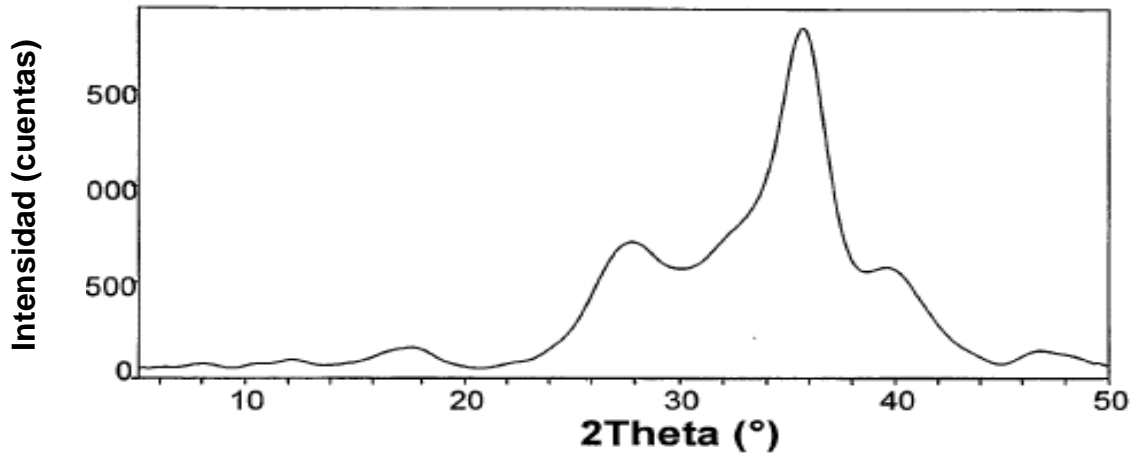


Fig. 5

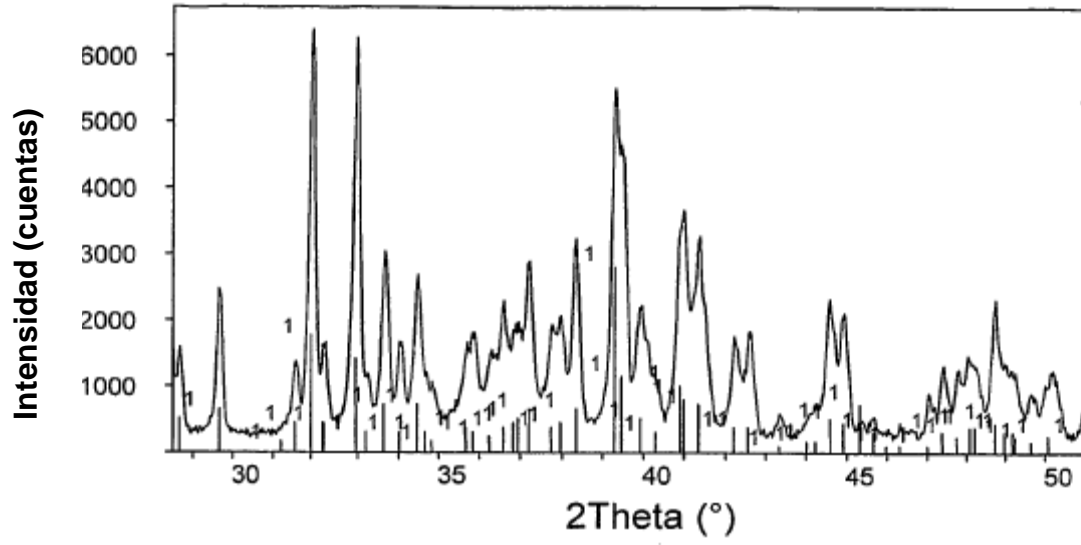


Fig. 6