



256560

P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS A BASE DE VITAMINA DEL GRUPO B<sub>12</sub>", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. SOCIETE ANONYME, domiciliada en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento se refiere a adsorbatos con actividad de vitamina B<sub>12</sub> y a métodos para prepararlos. Más particularmente, se refiere a adsorbatos que comprenden hidrox(acuo)cobalamina adsorbida sobre cambiadores de iones
5. polisacáridos dotados de grupos funcionales ácidos. El invento se refiere además a procedimientos para preparar dichos adsorbatos, los cuales comprenden el poner en contacto hidrox(acuo)cobalamina o mezclas que la contengan con cambiadores de iones polisacáridos dotados de grupos funcionales ácidos, en medios amortiguados acuosos, acuososalcó-
  - 10.



licos o alcohólicos.

256560

- Las mezclas que contienen hidroxocobalamina pueden obtenerse de caldos de fermentación extractando los microorganismos con agua y adsorbiendo los materiales con actividad de vitamina B<sub>12</sub> sobre agentes de adsorción adecuados, por ejemplo carbón activado. Eluyendo los materiales adsorbidos, concentrando el eluato en vacío y precipitando sobre kieselgur o tierra de diatomeas con p-clorofenol, según la patente de la República Federal Alemana No. 1,016,898, se obtiene un producto que comprende vitaminas del grupo B<sub>12</sub>, contaminadas primariamente por materiales de carácter proteínico. Las vitaminas pueden extraerse de ellos, por ejemplo con metanol acuoso, y por evaporación del extracto se obtiene un concentrado que comprende vitamina del grupo B<sub>12</sub>, generalmente en cantidad mayor del 10% del concentrado.
- 5.
  - 10.
  - 15.

Además de lo anterior, los expertos en la especialidad disponen de otros métodos para obtener concentrados de hidroxocobalamina.

- 20.
  - 25.
  - 30.
- Los cambiadores de iones polisacáridos que contienen grupos funcionales ácidos, aptos para el uso en la práctica del invento que aquí se expone, pueden obtenerse, por ejemplo, a base de celulosa, especialmente celulosa de madera o celulosa de borra de algodón, por la introducción de grupos ácidos mediante esterificación o eterificación de los grupos hidroxilos de la celulosa, por ejemplo con ácido monocloracético o ácido fosfórico. De la misma manera, pueden emplearse como cambiadores de iones para este invento polisacáridos que contengan ya grupos funcionales ácidos en sus moléculas; por ejemplo el ácido algínico

256560



(ácido poli-d-manurónico). En calidad de cambiadores de iones polisacáridos conocidos y que se hallan en el comercio, que además contienen grupos ácidos funcionales, pueden mencionarse los siguientes:

5. "Celulosa CM", un cambiador de iones celulósicos débilmente ácido que contiene grupos carboximetilo como grupos funcionales y que se hace por reacción de polvo de borra de algodón con ácido monocloracético; lo distribuye la empresa Serva, de Heidelberg (Alemania).
10. "Celulosa P", un cambiador de iones celulósico fuertemente ácido que contiene grupos de ácido fosfórico como grupos funcionales y se prepara haciendo reaccionar polvo de borra de algodón con oxiclóruo fosfórico; lo distribuye la empresa Serva antes mencionada.
15. "Protácido Puro", un cambiador de iones celulósico débilmente ácido que contiene grupos carboxilo como grupos funcionales y comprende primariamente ácido algínico hecho de algas por un procedimiento de purificación; lo distribuye la firma AS Protan, de Drammen (Noruega).
20. Los cambiadores de iones polisacáridos pueden emplearse, por ejemplo, en forma de polvos o escamas. De ordinario muestran su acción cambiadora tanto en medios acuosos como alcohólicos o acuoalcohólicos. En estos medios poseen una capacidad sumamente amplia para adsorber materiales básicos o ácidos de alto peso molecular. Esta característica es atribuible a la estructura alargada, libre de reticulación, que permite incluso a las moléculas grandes el acceso a los grupos activos.
- 25.

30. Por medio de cambiadores de cationes polisacáridos ácidos, se adsorben cobalaminas básicas tales como la hidro-

256560



4  
xo(acuo)cobalamina, mientras que las cobalaminas de reacción ácida, tales como los ácidos cobalamin-carboxílicos, y asimismo las cobalaminas de reacción neutra, tales como la cianocobalamina y el Factor III, no son adsorbidas.

5.

Antes de emplearlos en los procedimientos de este invento, los cambiadores de cationes polisacáridos ácidos se acidifican débilmente con ventaja en suspensión acuosa o acuosoalcohólica, por ejemplo con ácido clorhídrico diluído, y se lavan cuidadosamente para eliminar el exceso de ácido. Los cambiadores de ácido algínico se lavan con agua antes del uso, hasta que ya no cambia el pH, a fin de eliminar el ácido clorhídrico originado de los procedimientos de preparación.

10.

15.

Los procedimientos de este invento pueden llevarse a cabo mezclando por agitación un cambiador de iones polisacárido ácido en una solución acuosa, alcohólica o acuosoalcohólica de hidroxocobalamina, la cual puede contener también todavía otras vitaminas del grupo B<sub>12</sub> y/o materiales de carácter proteínico. La relación ponderal preferida entre el cambiador y las vitaminas B<sub>12</sub> presentes en la solución depende de la capacidad del cambiador específico que se emplee. Los cambiadores de iones de ácido algínico se emplean de la mejor manera en una relación de diez veces por lo menos (por ejemplo, 10 a 20 veces) el peso de la vitamina que ha de adsorberse; los cambiadores de carboximetilcelulosa se emplean ventajosamente en una relación de 50 a 100 veces el peso de vitamina que ha de adsorberse. Una vez que se ha agitado el cambiador durante un período de unos 20 a unos 60 minutos en la solución que contiene

20.

25.

30.

256560



la hidroxocobalamina, se separa el cambiador cargado con hidroxocobalamina, por ejemplo por centrifugación; en ventajoso suspenderlo luego en una pequeña cantidad de alcohol, filtrarlo y sacarlo en vacío a temperatura ambiente.

5.

Los componentes alcohólicos (si los hay) en los medios empleados para los procedimientos de este invento, son para mayor ventaja alcoholes alifáticos monofuncionales inferiores que contienen de 1 a 4 átomos de carbono, especialmente metanol.

10.

Según otra modalidad de realización de los procedimientos de este invento, el medio que contiene la hidroxocobalamina se deja fluir por una columna que comprende un cambiador de iones polisacárido tal como aquí se ha definido, con lo cual la hidroxocobalamina se queda en la columna, mientras que los materiales acompañantes, por ejemplo las cobalaminas de reacción neutra, fluyen por ella sin obstáculo. Por desarrollo, las cobalaminas retenidas en la columna cambiadora pueden luego fragmentarse en sus factores individuales y la columna cambiadora puede separarse en partes aisladas, por ejemplo cortándolas. La porción de la columna que contiene hidroxocobalamina puede luego secarse y el adsorbato emplearse como tal.

15.

20.

25.

La hidroxocobalamina, que es la forma activa natural de la vitamina B<sub>12</sub>, es muy lábil en su forma pura. Se ha descubierto que esta cobalamina, en la forma de complejos de adsorción de acuerdo con el invento que aquí se expone, muestra mayor estabilidad. El adsorbato de ácido algínico es particularmente estable. El invento

30.



256560

por consiguiente, proporciona formas de hidroxocobalamina estable, bien toleradas fisiológicamente, que pueden emplearse en la preparación de productos farmacéuticos, alimentos, piensos y similares.

5. El invento se detalla ulteriormente en los ejemplos que siguen, los cuales tienen finalidad ilustrativa sin imponer limitación ninguna.

E J E M P L O 1.

10. En una solución que contiene 50 mg de hidroxocobalamina en 100 c.c. de agua y que adicionalmente contiene de 7 a 10% de cianocobalamina, se suspenden 1,5 g de "Celulosa P" (Serva). Después de remover durante una hora se filtra con succión el cambiador cargado sobre un filtro de fritada de vidrio, se le lava con un poco de metanol y
15. luego se le seca en vacío a temperatura ambiente. El filtrado, de color rojo, contiene 4,3 mg de cianocobalamina. Se obtienen 1,5 g de adsorbato que contiene 45 mg de hidroxocobalamina.

E J E M P L O 2.

20. Se disuelven en 2 c.c. de metanol acuoso al 80%, 40 mg de hidroxocobalamina que contienen del 7 al 10% de cianocobalamina y se ponen sobre una columna (12 mm de diámetro) hecha de 5 g de "Celulosa CM" (Serva), tratada con metanol acuoso al 80%. Después de desarrollo con metanol acuoso al 80%, la hidroxocobalamina es retenida
25. sobre el cambiador en forma de una banda roja amplia, mientras que la cianocobalamina es arrastrada por el lavado (3,9 mg). Se continúa el lavado hasta que el eluato resulta incoloro. Después de lavar con un poco de metanol, se separa
30. el cambiador cargado y se le seca en vacío a temperatura

256560



ambiente. Se obtienen 4 g de adsorbato que contienen 35,6 mg de hidroxocobalamina.

EJEMPLO 3.

5. Este ejemplo es idéntico al Ejemplo 2, salvo que se emplean 2 g de "Celulosa P" (Serva) en lugar de 5 g de "Celulosa CM" (Serva). Se obtienen 1,2 g de adsorbato que contiene 38,2 mg de hidroxocobalamina.

EJEMPLO 4.

10. Este ejemplo es idéntico al Ejemplo 2, salvo que el cambiador empleado es 1 g de "Protáido Puro" (AS Portan). Se obtienen 0,62 g de adsorbato que contiene 32,4 mg de hidroxocobalamina.

EJEMPLO 5.

15. Una solución que contiene 0,8 mg de cianocobalamina y 0,8 mg de hidroxocobalamina en 0,2 c.c. de agua, se pone sobre una columna (10 mm de diámetro) de 1,5 g de "Celulosa CM" (Serva). Después de lavar con agua, la cianocobalamina sale de la columna muy pronto, mientras que la hidroxocobalamina, por el contrario, permanece en el extremo superior de la columna y puede separarse en forma de adsorbato.

20.

25. La invención, dentro de su esencialidad, podrá desarrollarse en otras formas de realización, que difieren en detalle de la indicada a título de ejemplo en la descripción, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, llevarse a cabo con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido en el espíritu de las reivindicaciones.

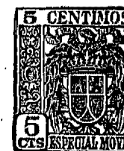


256560

N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declaran nuevas las siguientes reivindicaciones con prioridad suiza No. 70 881 del 17 de marzo de 1.959:

5. 1. Procedimiento para la obtención de compuestos a base de vitamina del grupo B<sub>12</sub>, concretamente para la preparación de adsorbatos de hidroxocobalamina, el cual comprende el poner en contacto hidroxocobalamina o mezclas que la contienen con cambiadores de iones polisacáridos que poseen grupos funcionales ácidos en medios amortiguados acuosos, acuosos alcohólicos o alcohólicos.
10. 2. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 1, en el cual se emplea un alcohol alifático monofuncional que contiene de 1 a 4 átomos de carbono o una solución acuosa de tal alcohol.
15. 3. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 2, en el cual se emplea metanol.
20. 4. Procedimiento en conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, en el cual se emplea un cambiador de cationes polisacáridos.
25. 5. Procedimiento en conformidad con las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la hidroxocobalamina se pone en contacto con ácido algínico.
6. 6. Procedimiento en conformidad con las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la hidroxocobalamina se



256560

pone en contacto con carboximetilcelulosa.

7. Procedimiento en conformidad con las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la hidroxocobalamina se pone en contacto con celulosa fosforilada.

5. 8. Procedimiento en conformidad con las reivindicaciones 1 a 7, en el cual una solución que contiene hidroxocobalamina se deja afluir por una columna que comprende un cambiador de iones polisacáridos.

10. 9. Procedimiento para la obtención de compuestos a base de vitamina del grupo B<sub>12</sub>.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de nueve hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 16 de Marzo de 1.960.

15. F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. SOCIETE ANONYME.

p. a.

DEPENDIENTES