

np/

257320

Caso 7078



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

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - domi-  
ciliada en RAHWAY, New Jersey (EE.UU), 126, East Lincoln  
Avenue,

por:

"Procedimiento de preparación de aminoácido-cobalaminas"

====:oOo:====

M e m o r i a   d e s c r i p t i v a

El presente invento se refiere a la preparación de  
cobalamina, y más concretamente a un procedimiento para la  
preparación de aminoácido-cobalaminas.

257



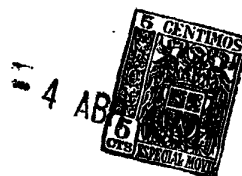
5 La vitamina B<sub>12</sub>, también llamada cianocobalamina, se considera esencial para la maduración de eritrocitos, y el tratamiento con cianocobalamina está indicado en anemias resultantes de su inadecuada absorción y utilización. Así, en el tratamiento de la anemia perniciosa, la cianocobalamina se administra por vía parentérica en inyecciones subcutáneas o intramusculares. Con este fin, se emplean soluciones acuosas de vitamina B<sub>12</sub> en vehículos apropiados. Sin embargo, se han buscado formas mejores de cobalamina que proporcionen  
10 índices más altos de esta substancia en el suero.

Un objeto del presente invento es la obtención de productos perfeccionados de cobalamina que den índices más altos de ella en el suero al administrarlos. Otro objeto consiste en proporcionar métodos para preparar estos productos  
15 mejores de cobalamina. Otro objeto, la obtención de nuevos compuestos farmacéuticos que contengan esos productos perfeccionados de cobalamina. Otros objetos se apreciarán en la siguiente descripción detallada del invento.

De conformidad con la presente invención, se ha comprobado ahora que las aminoácido-cobalaminas son fuentes valiosas de actividad de cobalamina, y poseen la inesperada  
20 ventaja de ser absorbidas en proporción mayor que la cianocobalamina. Ensayos clínicos revelan que estas cobalaminas dan índices más altos de la substancia en el suero, al administrarlas, y según parece, más prolongados.  
25

Las aminoácido-cobalaminas se preparan convenientemente poniendo en íntimo contacto hidroxocobalamina y un aminoácido en una solución acuosa. En general, el compuesto aminoácido-cobalamina se recupera fácilmente de la mezcla de  
30 reacción resultante añadiendo un disolvente miscible adecuado,

2573



5 como acetona, con lo que la cobalamina precipita de la solución en forma cristalina y se puede recuperar sin dificultad, por ejemplo, mediante filtración. De modo alternativo, la aminoácido-cobalamina se recupera evaporando la solución acuosa que contiene los equivalentes molares de hidroxocobalamina y de aminoácido, por ejemplo, desecando a temperatura muy baja.

10 Los siguientes ejemplos ilustran la manera de ejecutar el procedimiento de esta patente para preparar estos compuestos de aminoácido-cobalamina.

EJEMPLO 1º. Glicincobalamina.

15 Se disolvieron 200 mg. de peso anhidro de hidrocobalamina en 40 ml. de agua, y a esta solución se añadieron 12,5 mgl de glicina. Se agregaron luego 375 ml. de acetona, y se hizo cristalizar el producto. Los cristales se aislaron por filtración, y se desecaron en vacío a temperatura ambiente. El producto, 125 mg., contenían 7,5% de sustancias volátiles, y dio 86,5% de vitamina B<sub>12</sub> (base anhidra) al valorar con disolución isotópica. Teniendo en cuenta la relación  
20 de los pesos moleculares de cianocobalamina y de glicincobalamina, la pureza es de un 90%.

De manera análoga se prepara ácido aspartico-cobalamina combinando ácido aspártico e hidroxocobalamina en solución acuosa, y añadiendo acetona.

25 EJEMPLO 2º. Lisincobalamina.

30 Se disolvieron 150 mg. de peso anhidro de hidroxocobalamina en 15 ml. de agua, se añadió 1,0 ml. de L-lisina, que contenía 16,2 mg. de esta sustancia, y se liofilizó la solución resultante. El producto contenía 4,0% de humedad, y dio 73% de vitamina B<sub>12</sub> (base anhidra). La pureza calculada,

25 73 90



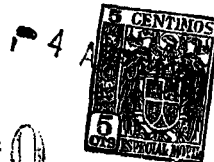
a base de los pesos moleculares, es de 81,5%.

Del mismo modo se preparan otras aminoácido-cobalaminas, combinando otros aminoácidos con hidroxocobalamina del modo expuesto en los ejemplos precedentes. Entre esos aminoácidos pueden mencionarse, por ejemplo, ácido aspártico, alanina, serina, cisteína, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina, valina, leucina, arginina, ácido glutámico, prolina y sus análogos; el método comprende en general la reacción de un equivalente molecular del aminoácido. Alternativamente, es posible someter mezclas de aminoácidos a reacción hidroxocobalamina para producir una mezcla de las aminoácido-cobalaminas correspondientes.

De conformidad con este invento, se proporcionan composiciones terapéuticas de aminoácido-cobalaminas que comprenden tales cobalaminas y vehículos farmacéuticos adecuados substancialmente atóxicos. Estas nuevas composiciones son agentes hemopoyéticos activos, adecuados para empleo en el tratamiento de anemias, esprúe y otros estados morbosos en los que está indicada la medicación con vitamina B<sub>12</sub>. Las composiciones que contienen aminoácido-cobalaminas se utilizan con ventaja porque dan índices hemáticos más elevados que los preparados de vitamina B<sub>12</sub> disponibles hasta ahora, y además parecen proporcionarlos más persistentes. Por tanto, de conformidad con este invento, se obtienen nuevas composiciones que pueden ser, en forma sólida o líquida, apropiadas para administración peroral o parentérica.

Estas composiciones se pueden preparar en forma sólida, con los ingredientes activos sustentados o suspendidos en un vehículo farmacéutico sólido substancialmente atóxico, como lactosa, almidón, azúcar o sus análogos, en unión de

257320



5 excipientes tales como ácido esteárico, estearato de magnesio, gelatina y otros similares. Alternativamente, se preparan de manera análoga unidades posológicas adecuadas en cápsulas, combinando vehículos adecuados con la aminoácido-cobalamina conforme a métodos muy conocidos en la especialidad. Las composiciones que contienen aminoácido-cobalaminas para medicación peroral son formas especialmente útiles del presente invento, pues la actividad de cobalamina se absorbe mejor que la de composiciones similares que contienen

10 cianocobalamina.

De manera similar, para aplicación en inyecciones, las aminoácido-cobalaminas se pueden incorporar a vehículos farmacéuticos líquidos, como agua y mezclas acuosas de disolventes, que pueden contener además estabilizadores o sustancias análogas. Además, la aminoácido-cobalamina se puede

15 combinar con otros ingredientes terapéuticamente activos en formas adecuadas de uso peroral o parentérico, según métodos muy conocidos en el ramo.

Las unidades posológicas originales de las aminoácido-cobalaminas pueden contener una cantidad de los ingredientes activos comprendida entre 1 y 2500 microg. de actividad de cobalamina. Por ejemplo, es posible emplear soluciones de estas cobalaminas con unos 5 a 1500 microg. de actividad de cianocobalamina por mililitro, como unidades posológicas

20 adecuadas para inyección.

Se ha preparado una solución parentérica de glicincobalamina del modo siguiente:

Una cantidad de glicincobalamina equivalente a unos 26,25 mg. de actividad de vitamina B<sub>12</sub> se disolvió en unos

30 15 ml. de agua destilada desionizada reciente, que contenía

25 73 20



0,9% de alcohol bencílico. La solución resultante se esterilizó pasándola por un filtro Selas O3. El filtro se lavó luego con agua destilada desionizada, que contenía 0,9% de alcohol bencílico, en cantidad suficiente para elevar a 25 ml el volumen total del producto final. La solución estéril resultante, que contenía 1 mg. de actividad de vitamina B<sub>12</sub>, se distribuyó en ampolletas estériles, y se obturaron éstas con tapones de caucho esterilizados.

Los índices mayores en el suero que se obtienen administrando los preparados de aminoácido-cobalaminas se demostraron mediante ensayos de aplicación de glicincobalamina a perros. En esta prueba, se inyectó 0,5 ml. de una solución acuosa de glicincobalamina, que contenía el equivalente de 500 microg. de actividad de vitamina B<sub>12</sub>, en el músculo glúteo de cada uno de dos perros. Como contraste, se inyectó a otros dos perros 0,5 ml. de una solución de cianocobalamina que contenía igualmente 500 microg. de actividad de vitamina B<sub>12</sub>. Se extrajeron muestras de sangre venosa, justamente antes de administrar las soluciones de cobalamina, y a las 5, 24 y 48 horas de hacerlo, y se valoraron microbiológicamente con L.leichmanni. Los resultados que se consignan en la siguiente tabla son los índices medios en el suero de los dos perros, en  $\mu\text{g/ml}$ . de vitamina B<sub>12</sub>, a base de muestras de sangre tomadas a los intervalos referidos.

<u>Horas desde la administración</u>	<u>Índices de vitamina B<sub>12</sub> en el suero, milimicrog/ml.</u>	
	<u>Cianocobalamina</u>	<u>Glicincobalamina</u>
0	0,331	0,230
5	7,27	16,5
24	1,87	5,75
48	1,31	2,10

25 78 20

4 AB



En una prueba similar, se comparó lisincobalamina con cianocobalamina, administrándolas a cada uno de dos perros del mismo modo antes descrito. Los niveles medios de vitamina B<sub>12</sub> en el suero eran los siguientes:

5	<u>Horas desde la administración</u>	<u>Cianocobalamina</u>	<u>Lisincobalamina</u>
	0	1,57	2,29
	5	4,36	7,28
	24	0,95	2,02
10	48	0,589	1,15

Los elevados índices de vitamina B<sub>12</sub> en el suero que se pueden obtener con glicincobalamina, comparados con los que proporciona la cianocobalamina, se han demostrado asimismo en ensayos clínicos. Se aplicó a un grupo de 3 pa-  
 15 cientes una inyección intramuscular de 1 ml. de una solución de glicincobalamina en agua que contenía 1 mg. de actividad de vitamina B<sub>12</sub>, y a un segundo grupo de 3 pacientes, una inyección intramuscular de 1 mg. de cianocobalamina en 1 ml. de agua. Se tomaron muestras de sangre de los pacientes antes  
 20 de la inyección y 3, 5, 24, 48 y 168 horas después de aplicarla. En la siguiente tabla se indica la media geométrica de actividad de vitamina B<sub>12</sub> hallada en el suero:

25	Horas	<u>Media geométrica de actividad de vitamina B<sub>12</sub> en el suero (mpg/ml.)</u>					
		<u>0</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>168</u>
	Cianocobalamina en agua (contraste)	417	16.600	14800	2.880	871	575
	Glicincobalamina en agua	479	25.100	17000	4.370	1700	832

Por tanto, los resultados precedentes indican los  
 30 índices superiores de cobalamina en el suero que se obtienen administrando aminoacido-cobalaminas, y la mayor persistencia de los mismos.

25 73 20



-----: N O T A :-----

Se reivindica como objeto de esta patente:

5 1.- Procedimiento de preparación de aminoácido-cobalaminas, el cual comprende poner en íntimo contacto hidroxocobalamina y un aminoácido en solución acuosa, y recuperar de la mezcla de reacción la aminoácido-cobalamina.

10 2.- Procedimiento de preparación de aminoácido-cobalaminas según la reivindicación 1, en el que la aminoácido-cobalamina se recupera de la mezcla de reacción añadiendo un disolvente miscible que hace precipitar el compuesto de cobalamina, y el precipitado sólido se recupera por filtración.

15 3.- Procedimiento de preparación de aminoácido-cobalaminas según la reivindicación 1, en el que la aminoácido-cobalamina se recupera de la mezcla de reacción evaporando el agua de la misma.

4.- Procedimiento de preparación de aminoácido-cobalaminas.

Esta memoria consta de ocho páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA, 4 ABR 1960

P. A.