

20 AGO 1960

316673

P.- 29.980

8077



316673

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

e n

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de A/S DUMEX (DUMEX LTD); entidad danesa, establecida en 37, Prags Boulevard, Copenhague, Dinamarca, por:
"UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UNA PREPARACION QUE TENGA UN EFECTO PROLONGADO DE VITAMINA B12".

Esta invención se relaciona con un método para la producción de una preparación para ser inyectada, que tenga un efecto prolongado de vitamina B12.

Es sabido que la cianocobalamina y otras cobalaminas, por ejemplo, hidroxicobalamina, tiene un efecto favorable sobre varias condiciones de enfermedades, por ejemplo, la anemia perniciosa, cuando se aplica parenteralmente. Por medio de inyecciones intramusculares de las citadas sustancias, que en lo que sigue quedan comprendidas por el término genérico "vitamina B12 ó B12" solamente, se puede conseguir un aumento del contenido de B12 en donde el suero

10

316673



de la sangre de la persona de que se trata después de la inyección disminuyen sin embargo, los citados contenidos, después de unos días al nivel presente antes de la inyección. Una razón para esta disminución consiste en que en una inyección es solamente posible inyectar alrededor de 30 mg. sin que tenga lugar una excreción urinaria substancial, mientras que la excreción urinaria aumenta proporcionalmente al aumentar la dosis, de tal manera que la excreción aumenta alrededor de 80 % de la dosis inyectada por una inyección de 300 mg. en una sola dosis.

Con la dosis diaria de B₁₂ para los pacientes que sufren de anemia perniciosa se evalúa al presente en tanto como de 5 a 10 mg. es evidente por lo tanto que son necesarias inyecciones comparativas frecuentes, y que, de acuerdo con lo anterior, es conveniente llegar a preparaciones que tengan un efecto prolongado tras de la inyección, o sea que son llamadas preparaciones de "depot".

Para este fin, se han usado suspensiones de B₁₂ en un aceite vegetal en lugar de soluciones acuosas. Sin embargo la prolongación del efecto que se puede así obtener, llega solamente a unos cuantos días.

Es sabido además, que la vitamina B₁₂ forma un compuesto complejo con el tanino que es ligeramente soluble en agua, pero al probar las suspensiones inyectables del citado compuesto, se ha encontrado que no se obtiene efecto de prolongación de consecuencias. Si se encuentran presentes además iones de cinc al precipitarse el complejo de B₁₂-tanino los iones mencionados forman también parte del complejo, y se obtiene un producto insoluble en agua, dando como resultado que se inyecta una suspensión acuosa con un nivel más



bajo en el suero de la sangre de lo que es el caso de la solución acuosa de B₁₂, y en efecto prolongado que puede durar hasta 3 semanas. La excreción urinaria es correspondientemente más baja.

5 Sin embargo, la inyección de la citada preparación produce dolores graves en el sitio de la inyección probablemente debido a que el tanino actúa sobre la proteína de los tejidos, y aún si este inconveniente se reduce hasta cierto grado por la adición de un anestésico local, no puede removerse por completo. Además, es deseable una prolon-

10 gación aún mayor.

De acuerdo con la presente invención, se puede obtener una preparación, que no produce inconvenientes por rechazo, y por medio de una sola inyección queda un nivel satisfactorio en el suero de la sangre y que mantiene durante un

15 periodo considerable más largo de lo que hasta ahora ha sido posible, suspendiendo un compuesto complejo, que consiste de sustancias activas de vitamina B₁₂ y tanino, y, si se desea, con un metal fisiológicamente inocuo, en un aceite vegetal o en un éster de ácido graso de carácter oleoso,

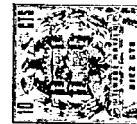
20 en donde se ha disuelto previamente estearato de aluminio, o se disuelve subsecuentemente.

Se ha encontrado que una suspensión de la clase citada se puede inyectar intramuscularmente sin inconveniencia

25 para el enfermo, y se han hecho pruebas que señalan que aún después de 10 semanas de una sola inyección la concentración de B₁₂ en el suero de la sangre puede ser substancialmente superior a la concentración antes de la inyección. De acuerdo con lo anterior, la excreción con la orina es en realidad

30 mínima.

316673



5 Como se hace evidente por las pruebas aquí descritas no cabe duda que el efecto mencionado se debe al caracter de suspensión del medio y probablemente en especial al carácter gelatinoso de la suspensión que se produce por el monoestearato de aluminio.

10 Es sabido con certeza, que cuando se suspende penicilina procaina en un aceite vegetal, en que se haya disuelto estearato de aluminio, se obtiene un efecto prolongado que dura de 3 a 4 días, mientras que una solución acuosa simular a ella da un nivel efectivo terapéuticamente en la sangre de solamente alrededor de un día, pero aún así, si se llega a la conclusión de que puede obtenerse cierta prolongación por medio de una preparación correspondiente del completo B₁₂ y tanino, es sorprendente e inesperado que puede obtenerse una prolongación, que puede durar varias se-
15 manas, y que puedan inyectarse grandes dosis sin mas que una excreción mínima de la orina.

20 Como ejemplos de aceites que se pueden usar como medio de suspensión se puede mencionar el aceite de oliva, el aceite de sésamo, y el aceite de cacahuate, Como ejemplo de un éster utilizado de ácido graso se puede mencionar el miristato de isopropolo. En general, se puede añadir un antioxidante tal como la cisteina al aceite. De los metales que pueden formar parte del complejo de vitamina B₁₂-tanino, se puede mencionar el bismuto y el cinc, Sobre los linea-
25 mientos de los resultados obtenidos se ha encontrado que el usar suspensiones acuosas, las suspensiones presentes de aceite muestran también resultados particularmente buenos cuando el cinc forma parte del complejo, y en una forma preferente del método presente, por el tanto, se obtiene com-
30 prendido dentro de la invención un compuesto de vitamina B₁₂



cinc y tanino.

Se ha encontrado además que fraccionando el tanino que constituye artículo de comercio, se puede aislar una fracción que, cuando se usa en una cantidad menor por peso, dá una precipitación igual o mejor del complejo de B₁₂-cinc-
5 -tanino especialmente en relación con lo que hace el producto de comercio de tal manera que es posible reducir el contenido de tanino. De acuerdo con la invención, por lo tanto, se usa de preferencia un compuesto complejo en que el
10 componente de tanino es una fracción de la citada clase producida del tanino, que forma artículo de comercio.

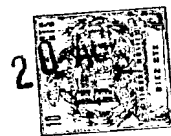
De acuerdo con la invención, un método particularmente sencillo para producir la presente preparación consiste en producir el complejo compuesto mezclando soluciones acuosas de los componente, por lo cual el compuesto complejo
15 forma un precipitado que se filtra, se seca y se muele en un medio de suspensión.

De acuerdo con la invención, sin embargo, es posible también proceder de manera que se produzca primero un gel disolvente de monoestearato de aluminio en un solvente orgánico, agitándose el complejo de vitamina B₁₂ en el citado
20 gel, posteriormente se evapora el solvente orgánico, y el residuo se mezcla con un aceite vegetal. Esto da una incorporación mas íntima del compuesto complejo en el monoestearato de aluminio debido a que las partículas sencillas se
25 revisten con una capa de este último, antes de suspenderse en el aceite vegetal.

En lo siguiente, se ilustra la producción de las preparaciones por medio de algunos ejemplos.

30

316673



Ejemplo 1

Suspensión de B₁₂-tanato

5

Bajo condiciones asepticas y usando matraces estériles, se disuelven 500 mg. de B₁₂ en 100 ml. de agua estéril y la solución se filtra estéril en un metraz de succión. El filtro se lava con 3 x 5 ml. de agua estéril tras de lo cual se filtra también esterilmente una solución de 2.000 mg. de tanino y 200 mg. de cisteina en 50 ml. de agua esteril. al matraz. El filtro se lava con 2 x 10 ml. de solución acuosa al 1 % esteril de NaCl. Después de reposar en un refrigerador durante 30 minutos . El precipitado se remueve por filtración, y se seca al vacio sobre P₂O₅. De acuerdo con una determinación espectrofotométrica, el polvo resultante contiene 0,40 mg. de B₁₂ por. mg.

10

15

20

Se muelen 500 mg. del citado polvo y 100 mg. de cisteina con 400 ml. de un gel de monoestearato de aluminio al 2 % en aceite de sésamo en un mortero esteril. La suspensión resultante tiene un tamaño de particula de menos de 10 mcg.

Ejemplo 2

25

Suspensión de B₁₂-cinc-tanato

30

Bajo condiciones asépticas, se disuelven 300 mg. de vitamina B₁₂ en 40 ml. de agua estéril en un matraz estéril.



La solución se absorbe a través de un foltro de vidrio estéril hasta otro matraz esteril, lavándose el filtro, con 10 ml. de agua estéril. A través del mismo, filtro, se añade una solución de 1.200 mg. de tanino y 600 mg. de cistei-
5 na en 15 ml. de agua estéril. Después de lavar con 10 ml. de agua estéril, se añade una solución a través del filtro que consiste en 1.200 mg. de acetato de cinc en 15 ml. de agua estéril, tras de lo cual el filtro se lava con 10 ml. de agua estéril. El matraz se deja durante 45 minutos a 52
10 C, tras de lo cual el precipitado se remueve por centrifugación. El precipitado removido se seca al vacío sobre P₂O₅. Una determinación espectrofotométrica muestra un contenido de 0,15 mg. de B₁₂ por mg.

500 mg. del complejo así obtenido y 100 mg. de cistei-
15 na se muelen en un mortero estéril con 150 ml. de una solución al 2 % de monoestearato de aluminio en aceite de sésamo. Se produce de esta manera una suspensión, que contiene 0,5 mcg. de B₁₂ por un ml, que tienen un tamaño de particula de menos de 10 / μ .

20

Ejemplo 3

25 Suspensión de B₁₂-bismuto-tanato.

De la manera descrita en el ejemplo 2, se introducen en el orden citados, soluciones de 30 mg. de B₁₂ en 5 ml. de agua 80 mg. de tanino y 60 mg. de cisteina en 5 ml. de
30 agua y 10 mg. de tertrato de bismuto-sodio en 5ml. de agua,

316673



5 respectivamente, a un matraz a través de un filtro de vidrio y se lavan con 5 ml. de agua después de añadir cada una de las soluciones. El precipitado resultante se aíslada por centrifugación. La determinación espectrofotométrica muestra que el líquido, que se centrifuga, contiene 0,08 mg. de B₁₂ por ml. o en total, 8 % de la cantidad inicial de B₁₂.

10 Después de secar al vacío sobre P₂O₅, el precipitado se muele con 10 mg. de cisteína en 55 ml. de una solución al 2 % de monoestearato de aluminio en aceite de sésamo para formar la suspensión final.

Ejemplo 4

15

Suspensión de B₁₂-tanato con o sin metal como parte del complejo.

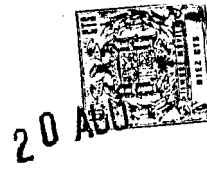
20

1 g. de monoestearato de aluminio se calienta en 50 ml. de benceno en un baño de agua, a 50°. Hasta que se forma un gel límpido. En este último, se agitan 250 mg. de complejo de vitamina B₁₂-compuesto, producido de acuerdo con uno de los ejemplos del 1 al 3, junto con 50 mg. de cisteína, moliéndose sucesivamente ambos compuestos hasta formar un polvo fino en un mortero. Después de evaporar el benceno, el polvo remanente se muele en 200 ml. de aceite de sésamo estéril. Todo el procedimiento se lleva al cabo bajo condiciones asépticas, obteniéndose una suspensión estéril que es fácil de agitar, si se precipita.

25

30

316673



Para determinar el efecto de "depot", se han hecho pruebas comparativas con inyecciones de las preparaciones antes mencionadas de B₁₂ que se marcan con el isótopo de Co⁶⁰.

5 Conejos machos con un peso de cuerpos de 2.7-3 kg. recibieron inyecciones intramusculares de las varias preparaciones en un músculo de la pierna bajo narcosis, y la radioactividad en el sitio de la inyección se tuvo bajo observación por medio de un detector de cintilación. Se usaron las siguientes preparaciones:

10 A.- Vitamina B₁₂ en solución acuosa a 0,9 % de NaCl con un contenido de 500 mcg. de B₁₂ por ml. y 0,18 microcurie de B₁₂ -Co⁶⁰ por ml.

15 B.- Vitamina B₁₂-cinc-tanato en suspensión acuosa. Contenido de B₁₂ y contenido de Co⁶⁰ como en A.

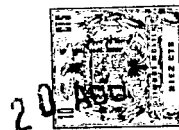
20 C.- Vitamina B₁₂-tanato de cinc suspendido en una solución al 2 % de estearato de aluminio en aceite de sésamo con 500 mcg. de B₁₂ y 0,5 microcurie de B₁₂-Co⁶⁰ por ml.

25 D.- Vitamina B₁₂-tanato suspendido en el mismo medio en que se prepara C., y con el mismo contenido de B₁₂ y B₁₂ -Co⁶⁰ por ml. como en C.

E.- Tanato de vitamina B₁₂ suspendido en aceite sésamo sin monoestearato de aluminio, contenido de B₁₂ y Co⁶⁰ como en C.

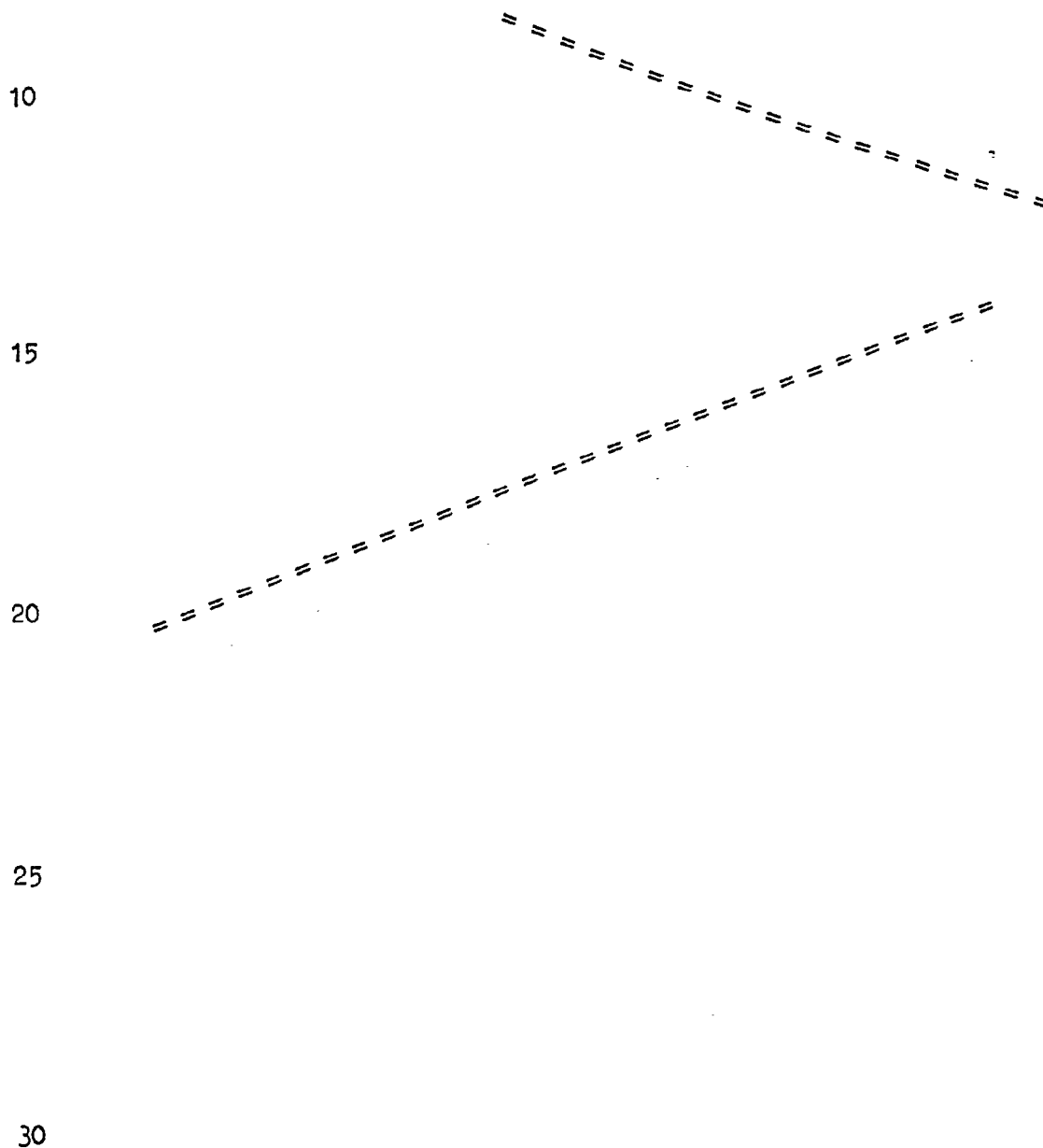
30 De las preparaciones A y B se usaron 0,30 ml. y de

316673



C y D y E se usaron 0,25 ml. para cada inyección.

En la tabla siguiente 1, la cantidad remanente en el sitio de la inyección en tiempos diferentes después de la inyección se da en porcentaje de la cantidad inyectada. La
5 tabla 2 muestra la cantidad por ciento que se excretó con la orina después de 1', 2' y 3' días después de la inyección, respectivamente.



316673



Tabla 1.

Preparación	Intervalo después de la inyección				
	1 hora	1 día	4 días	10 días	25 días
A	46	< 1	< 1	-	-
B	90	15	4	-	-
C	-	85	67	56	27
D	-	-	61	49	33
E	-	47	15	-	-

Tabla 2.

Preparación	Porcentaje de dosis excretada con la orina		
	1' días	2' días	3' días
A	60	< 5	< 2
B	10-15	< 5	< 2
C	< 0.3	< 0.3	< 0.3
D	< 0.5	< 0.5	< 0.5
E	19	11	2

316673



20-ABG

Las tablas muestran que la vitamina B₁₂ es eliminada a un régimen mucho más bajo que en las suspensiones de aceite (preparaciones C y D) que en los medios acuosos (preparaciones A y C), y que la excreción con la orina es mínima. Una comparación entre los valores encontrados para las preparaciones D y E muestran que el monoestearato de aluminio tiene una responsabilidad substancial en el efecto prolongado obtenido.

La inyección intramuscular de las preparaciones FmG, H y J que se especifican adelante se hizo además sobre seres saludables y se siguió el contenido de B₁₂ en el suero de la sangre y en la orina por medio de determinaciones microbiológicas con *Lactobacillus leichmannii*. Las inyecciones, cada una de las cuales contenía 300 mcg. de vitamina B₁₂ se hicieron de manera tal que cada persona probada recibiera todas las 4 preparaciones sucesivamente con intervalos adecuados, y las inyecciones se hicieron en el orden G, F, H y J y los resultados de la determinación microbiológica para una persona probada elegida al azar en las siguientes tablas 3 y 4, en que el nivel en el suero de la sangre de B₁₂ se da en proporción por ml. y la excreción con la orina se da en mcg. de B₁₂ por día.

25

20



316673

Tabla 3

Preparación	Nivel de suero en la sangre en % por ml.		Intervalos después de la inyección												
	Antes de la inyección	1 hr.	Intervalos después de la inyección									72 d.			
			1 día	3 d.	6 d.	9 d.	12 d.	24 d.	48 d.						
G	320	2940	1150	450	375	320									
F	320	10550	775	350	320	-									
H	320	1525	1250	800	450	390	360								
J	320	580	730	750	520	430	430	520	520	560					

Tabla 3

Preparación	Nivel de suero en la sangre en						% por	
	Antes de la inyección	Intervalos después de				la in		
		1 hr.	1 día	3 d.	6 d.	9d.	1	
G	320	2940	1150	450	375	320		
F	320	10550	775	350	320	-		
H	320	1525	1250	800	450	390		
J	320	580	730	750	520	430		

316673



% por ml.						
la inyección						
5 d.	9 d.	12 d.	24 d.	48 d.	72 d.	
375	320					
320	-					
450	390	360				
520	430	430	520	520	560	

316673



- F.- Vitamina B₁₂ en solución acuosa
- G.- Vitamina B₁₂ en suspensión oleosa con monoestearato de aluminio.
- H.- B₁₂-tanato de cinc en suspensión acuosa
- J.- B₁₂otanato de cinc en suspensión de aceite con monoestearato de aluminio.

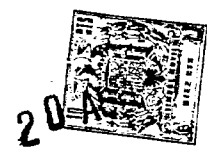


316673

Intervalos de tiempo después de la inyección de la preparación	F	G	H	J
1' día	250	195	16.8	0.3
2' días	0.01	0.02	2.7	0.01
3' días	0.01	0.02	9.7	0.005

B12 excretada con la orina en el día en cuestión (en mcg.)

Intervalos de tiempo después, de la inyección de la preparación	B ₁₂ excretada con la orina cuestión (en mcg.)		
	F	G	H
1' día	250	195	16.8
2' días	0.01	0.02	2.7
3' días	0.01	0.02	9.7



316673

orina en el día en	
H	J
16.8	0.3
2.7	0.01
9.7	0.005

316673



La excreción normal sin administración de B₁₂ es de menos de 0,02 mcg. por día.

5 Parece ser por la Tabla 3 que en la suspensión en aceite con monoestearato de aluminio añadido del compuesto complejo que consiste de B₁₂, cinc y tanino, se produce un efecto de prolongación de B₁₂ que dura cuando menos 6 veces más que la prolongación que se obtiene con la suspensión acuosa conocida del mismo compuesto complejo.

10 Por la Tabla 4 se desprende que prácticamente no tiene lugar excreción de la orina con B₁₂ después de la inyección de la invención la preparación producida de acuerdo con la invención.

Se hicieron otras pruebas comparativas con 3 pacientes con anemia perniciosa típica no tratada.

15 El paciente No. 1 recibió una inyección intramuscular de 540 mcg. vitamina B₁₂ en solución acuosa, de los cuales 400 mcg. ó 77 % fueron excretados con la orina durante el primer día.

20 El paciente No. 2 recibió una inyección de 1 ml. que correspondía a 1.000 mcg. de vitamina B₁₂, de manera que una suspensión de B₁₂-tanato de cinc en acetato con monoestearato de aluminio. Durante el primer día después de la inyección se excretaron 0,4 mcg. con la orina, que correspondía a 0,4 % de la dosis inyectada.

25 El paciente No. 3 recibió un ml. de una suspensión de B₁₂-tanato de cinc en aceite con monoestearato de aluminio que correspondieron a 500 mg. de vitamina B₁₂. La excreción con la orina durante el primer día, fué de 0,12 mcg. de B₁₂ que correspondió a 0,2 por mil.

30 Las determinaciones de B₁₂ en la orina se han hecho

316673



microbiológicamente con *Lactobactillus leichmannii*, y de la misma manera se determinaron los niveles en el suero de la sangre de B₁₂. Los valores de los últimos, que se han determinado hasta ahora, se dan en la Tabla 5 que sigue en porcentaje por ml. Para fines comparativos, el nivel de suero de la sangre en personas saludables es de entre 150 a 800 en porcentaje por ml.

5

10

15

20

25

30



Tabla 5

316673

Paciente No.	Nivel de suero de la sangre de B ₁₂ en % por ml.													
	1 hora después de la inyección	Después de la inyección, días												
	1	2	3	4	6	8	12	15	19	21	25	34	43	54
1	850	420	260	170	220	210	170	160	-	130	-	-	-	-
2	675	740	460	1260	520	-	580	-	630	-	-	-	-	-
3	500	420	-	450	500	520	-	-	920	-	740	500	450	30

Tabla 5

Paciente No.	1 hora después de la in- yección	Nivel de suero de la sang					
		1	2	3	4	6	8
1	14800	850	420	260	170	220	210
2	2710	675	740	460	1260	520	- 5
3	500	385	420	-	450	500	520

316673



la sangre de B ₁₂ en % por ml.									
Después de la inyección, días									
6	8	,12	15	19	21	25	34	43	54
220	210	170	160	-	130	-	-		
520	-	580	-	630	-	-	-		
500	520	-	-	920	-	740	550	450	30

316673



5 Parece ser por la tabla que el nivel de suero en la
sangre para el, paciente No. 1 que tenía un valor muy alto
inmediatamente después de la inyección, disminuyó hasta me-
nos de el nivel permisible en el curso de 16 días, mientras
10 que el paciente No. 2 después de 19 días y el paciente No.
3 después de 34 días mostraban aún niveles de sangre por
encima del valor prometido de más de 400 % por ml. para per-
sonas normales. El paciente No. 3 cuyo nivel de suero en
la sangre al presente ha sido seguido durante 54 días tie-
10 ne aún un nivel en el suero de la sangre dos veces el valor
minimo para los seres humanos saludables.

N O T A

15

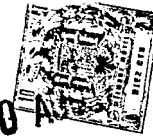
Los puntos de invención propia. no nueva, pero no es-
tablecida, practicada ni divulgada en España, que se pre-
sentan para que sean objeto de la presente solicitud de Pa-
20 tente de Introducción, por DIEZ años, son los siguientes:

1º.- Un método para la producción de una preparación
que tenga un efecto prolongado de vitamina B₁₂, caracteri-
zado en que un compuesto complejo de una vitamina B₁₂ de
una substancia activa y tanino y si se desea, un metal fisio-
25 lógicamente inocuo, se suspendan en un aceite vegetal o en
un éster de ácido de caracter oleoso, en donde se disuelva
monoestearato de aluminio antes o después de la suspensión.

2º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1,
caracterizado porque se use un compuesto complejo de vita-
30 mina B₁₂, cinc y tanino.

316673

20 A



3º.- El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque se use un compuesto complejo, en que el tanino sea una fracción del tanino comercial.

5 4º.- El método de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto complejo sea producido mezclando soluciones acuosas filtradas estériles de los componentes, por lo cual el compuesto complejo sea precipitado, y el precipitado sea filtrado, secado y sea molido en un medio de suspensión.

10 5º.- El método de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se produzca un gel que consista de monoestearato de aluminio en un solvente orgánico, agitándose el compuesto complejo de vitamina B₁₂ en el mencionado gel, tras de lo cual se evapora el solvente orgánico, y el residuo se muele en un aceite vegetal.

15 6º.- Un método para la producción de una preparación que tenga un efecto prolongado de vitamina B₁₂.

Tal y como se ha descrito en la Presente Memoria, y para los fines que se han especificado.

20 La presente Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

20 AGO.

P.A.

[Handwritten signature]
Ministerio de Hacienda
Por Madrid

25

mvg/- *[Handwritten initials]*