



18 M

778

379778

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.T.
CLASE <u>A61</u>
SUBCLASE <u>K</u>

bol g

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: YAMANOUCI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

RESIDENCIA: No. 5-1, 2-chome, Nihombashi-Honcho,
Chuo-ku, TOKYO, Japón.

ENUNCIADO: "UN METODO DE PRODUCCION DE CRISTALES
HIDRATADOS DE ADENOSILCOBALAMINA O
METILCOBALAMINA"

Prioridad: Patente	<u>japonesas</u>	n.º	<u>38994/69</u>	del	<u>19-5-69</u>
	"		<u>39531/69</u>		<u>23-5-69</u>
	"		<u>15928/70</u>		<u>26-2-70</u>



370778

1

Este invento se refiere a un método de producción de un nuevo cristal hidratado de alquilcobalamina, donde alquil significa un grupo 5'-desoxiadenosilo o un grupo metilo.

5

Un objeto de este invento es proporcionar un método industrialmente utilizado para la producción de cristales hidratados de gran pureza de alquilcobalamina.

10

Otro objeto de este invento es proporcionar un método de producción de cristales hidratados de alquilcobalamina, estables frente a la luz y el calor.

15

Una alquilcobalamina es un derivado de la vitamina B₁₂ que posee una estructura que, en lugar de un grupo ciano, contiene un grupo alquilo unido al átomo de cobalto de la molécula de cianocobalamina y el compuesto ejerce un excelente efecto terapéutico sobre la anemia perniciosa y las enfermedades neuróticas.

20

Las alquilcobalaminas se preparan por síntesis pero una alquilcobalamina cruda preparada por un método conocido contiene como impurezas los homólogos de cobalamina como hidroxicobalamina o cianocobalamina que no han reaccionado, así como la cobalamina ácida obtenida como subproducto durante la reacción por sustitución del grupo carboxilo de la molécula de cianocobalamina por un grupo carboxilo.

25

Esta alquilcobalamina que contiene impurezas puede ser utilizada como tal pero cuando se utiliza la alquilcobalamina como medicamento, es conveniente que el compuesto tenga una gran pureza.

30

Para purificar la alquilcobalamina que contiene estas impurezas, se conocen los siguientes métodos:

1) Método de cristalización del producto crudo en



379778

18

1 una mezcla de agua/acetona (patente estadounidense número 3.213.082 y patente alemana nº 1.213.842).

2) Método en el que la alquilcobalamina cruda se trata con una solución fenólica que contiene agua para formar un complejo fenólico y después se descompone el complejo (patente estadounidense nº 3.132.135).

3) Método cromatográfico en columna en el que la alquilcobalamina cruda se introduce en una columna rellena con carboximetilcelulosa (patente estadounidense nº 1.213.842 y "Journal of Chemical Society", 4146-4156 (1963)) o un filtro de gel ("Biochem.", 6, 88 (1967)) tal como Sephadex G-15 (nombre comercial) y se purifica utilizando una ligera diferencia en el poder de adsorción entre la alquilcobalamina y las impurezas.

Sin embargo, mediante los métodos 1) y 2), apenas es posible separar los homólogos de cobalamina de la alquilcobalamina cruda ya que las propiedades físicas y químicas de estas impurezas son similares a las de la alquilcobalamina (véase Tabla I, infra). Por otra parte, aunque las impurezas pueden ser separadas de la alquilcobalamina cruda por el método 3), este método va acompañado de tantos inconvenientes que se requiere una gran instalación para poner en práctica industrialmente el método y también la operación de dicho método es complicada y requiere un largo periodo de tiempo, que hace del mismo un método no rentable económicamente e impracticable.

Por lo tanto, los métodos convencionales de purificación de alquilcobalamina cruda presentan los inconvenientes mencionados y además los cristales de alquilcobalamina obtenidos por los métodos conocidos son muy inestables a la



18 MAY

379778

1 luz y al calor.

Por lo tanto, se ha deseado descubrir un método para obtener provechosamente en la industria los cristales de gran pureza de alquilcobalamina, estables a la luz y al calor.

5 Como resultado de las diversas investigaciones, los inventores han descubierto que cuando se cristaliza en agua una alquilcobalamina cruda que contiene como impurezas homólogos de cobalamina, se obtiene un nuevo tipo de cristal diferente de una estructura cristalina ordinaria y el cristal es un cristal hidratado de alquilcobalamina que no era conocido hasta ahora y que casi no contiene impurezas.

10 Además, se ha encontrado que el cristal obtenido manteniendo la temperatura de cristalización por encima de 17°C (en adelante, el cristal se denomina cristal tipo A) tiene propiedades distintas a las del cristal obtenido manteniendo la temperatura por debajo de 17°C (en adelante, el cristal se denomina cristal tipo B). Es decir, el primero es distinto del último en estructura cristalina y en solubilidad en agua (véanse las figuras 1, 2 y 4 que acompañan a esta memoria). Hablando en términos prácticos, se ha encontrado que el cristal del tipo A tiene mayor estabilidad a la luz y al calor que los cristales obtenidos por los métodos convencionales y en especial la resistencia al calor del mismo es además mayor que la del cristal tipo B.

15 Para realizar el procedimiento de este invento, puede disolverse una alquilcobalamina cruda en agua que no contenga ningún disolvente orgánico, preferiblemente a 50-60°C y la solución acuosa así preparada puede ser enfriada. En este caso, la concentración de la solución acuosa de alquilcobalamina es preferiblemente alrededor de 5-10 %. Asimismo,

30



379778

1 en el caso de la cristalización de alquilocobalamina en la
solución acuosa, cuando esta última se mantiene a tempera-
turas superiores a 17°C, preferiblemente a 20-50°C, se ob-
tiene el cristal tipo A mientras que cuando se mantiene la
5 solución acuosa a temperaturas inferiores a 17°C, se ob-
tiene el cristal tipo B.

Además, cuando el cristal tipo B obtenido por el pro-
cedimiento anterior se disuelve de nuevo en agua y se re-
cristaliza mientras se mantiene la solución acuosa a una
10 temperatura superior a 17°C, el cristal tipo B puede ser
convertido fácilmente en cristal tipo A.

El cristal hidratado de alquilocobalamina obtenido
por el método de este invento contiene el agua de cristali-
zación en una proporción de 10-20 % del peso del cristal,
15 pero como el cristal es estable, puede ser utilizado como
tal para la preparación farmacéutica. Asimismo, si es ne-
cesario, el cristal hidratado puede ser convertido en un
cristal anhidro calentándolo suavemente a presión reducida.

Los méritos de este invento serán descritos a con-
20 tinuación con detalle:

1. Efecto de purificación:

Se purifica adenosilcobalamina cruda y metilcobala-
mina cruda por el método de este invento o por un método
conocido (método de cristalización en un disolvente mixto
25 de agua/acetona en una relación en volumen de 1:6) y las
relaciones de los componentes se miden sobre los materia-
les crudos y sobre los productos purificados, encontrándose
los resultados en la Tabla I.

379778

18 MAY 1958



TABLA I

Compu- esto de- seado	componentes	relaciones de los componentes (%)			
		método de este in- vento		método conocido	
		material crudo	produc- to puri- ficado	material crudo	produc- to puri- ficado
	adenosilco- balamina	88,33	98,80	88,33	88,48
	adeno silco ciana- cobala- mina	5,30	0,65	5,30	5,33
	hidroxocoba- lamina	6,21	0,45	6,21	6,01
	cobalamin- acida	0,16	0,10	0,16	0,18
	metilcobala- mina	89,30	98,10	90,41	90,65
	metil coba- ciana- cobala- mina	5,16	1,10	4,80	4,80
	hidroxocoba- lamina	5,35	0,73	4,51	4,30
	cobalamin- acida	0,19	0,07	0,28	0,25

Las relaciones de componentes en el líquido de ensayo se miden de la siguiente forma.

El líquido de ensayo se fracciona mediante un cambiador de ión Sephadex en cada uno de sus componentes y después de convertir el componente en cobalamina del tipo diciano por un método ordinario, se mide la absorbancia de cada componente a 368 mμ y basándose en los valores así obtenidos, se calculan las relaciones de los componentes.

2. Estabilidad:

Las estabilidades a la luz y al calor del cristal tipo A (muestra (1)) de adenosilcobalamina y del cristal



379778

1 tipo B (muestra (2)) del mismo compuesto, preparados por
 el procedimiento de este invento y un cristal de adenosil-
 cobalamina (muestra (3)) preparado por un método de crista-
 lización convencional en un disolvente mixto de agua/aceto-
 5 na (1:6), son las siguientes:

i) Estabilidad a la luz:

Procedimiento de ensayo: Después de colocar 1 mg
 de cada muestra en una ampolla que después se sella, se
 expone directamente a la luz solar durante 3 horas, se mide
 10 la absorbancia de cada muestra y se calcula el porcentaje
 residual (A) de adenosilcobalamina mediante la siguiente
 ecuación:

$$(A) (\%) = \frac{(B)}{(C)} \times 100$$

15 donde (B) es el valor cuantitativo de adenosilcobalamina
 antes de la exposición a la luz solar y (C) es el valor
 cuantitativo de la misma después de la exposición a la
 luz solar.

20 Los resultados se encuentran en la siguiente tabla.

TABLA II

Porcentaje residual de adenosilcobalamina

<u>Muestra de ensayo</u>	<u>Experimento 1</u>	<u>Experimento 2</u>
Muestra (1)	98,6 %	98,9 %
25 Muestra (2)	71,1 %	70,4 %
Muestra (3)	77,7 %	72,0 %

ii) Estabilidad al calor:

Procedimiento de ensayo: Después de introducir 1 mg
 de cada muestra en una ampolla que después se sella y se
 30

379778

18 MAY 1961



1 deja en reposo durante 1 mes a 85°C en la oscuridad, se
 mide la absorbancia de cada muestra y el porcentaje resi-
 dual (A') de adenosilcobalamina se calcula mediante la si-
 guiente ecuación:

5

$$(A') (\%) = \frac{(B')}{(C')} \times 100$$

donde (B') es el valor cuantitativo de adenosilcobalamina
 después de haber dejado en reposo la mezcla y (C') es el
 valor cuantitativo de la misma antes del ensayo.

10 Los resultados se encuentran en la siguiente tabla.

TABLA III

Porcentaje residual de adenosilcobalamina

<u>Muestra de ensayo</u>	<u>Experimento 1</u>	<u>Experimento 2</u>
Muestra (1)	74,6 %	70,8 %
Muestra (2)	38,4 %	36,1 %
Muestra (3)	19,1 %	28,3 %

15 Además, el valor cuantitativo de la adenosilcobala-
 mina en los experimentos anteriores se obtiene de la forma
 siguiente:

20 1 mg pesado con precisión del cristal seco de adeno-
 silcobalamina se disuelve en una solución reguladora a pH
 7,0 para dar exactamente 20 ml de solución. En esta solu-
 ción se miden las absorbancias E₁ y E₂ a longitudes de onda
 25 de 351 mμ y 525 mμ respectivamente, con una longitud de
 la célula de 10 mm y se calcula el valor cuantitativo de
 adenosilcobalamina mediante la siguiente ecuación:

30 Valor cuantitativo = $\frac{172,2 \times E_2 - 63,86 \times E_1}{20,628 \times a}$

379778

18 MAY 1978



1 donde (a) es la cantidad pesada (mg) de adenosilcobalamina.

5 Los diagramas de difracción con rayos X del cristal tipo A y del cristal tipo B de adenosilcobalamina, secados al aire, obtenidos por el procedimiento de este invento, se encuentran en los ejemplos gráficos A y B, respectivamente. Además, el gráfico C que acompaña a esta memoria muestra el diagrama de difracción de rayos X del cristal secado al aire de adenosilcobalamina obtenido por cristalización con un disolvente mixto de agua/acetona (1:6), siguiendo el método convencional. Estos análisis de difracción de rayos X se realizaron de la siguiente forma:

Radiación: Cu $K\alpha$

15 La característica del gráfico A (cristal tipo A) es que se encuentra un máximo de gran intensidad a $2\theta = 9^\circ$. La característica del gráfico B (cristal tipo B) es que solamente aparecen dos máximos de gran intensidad y los valores 2θ de los dos máximos se encuentran en la relación de 1:2. Es decir, el gráfico A no presenta máximos característicos de el gráfico B, mientras que el gráfico B no presenta el máximo característico del gráfico A. Además, en el gráfico C (cristal convencional), no se encuentra ni el máximo característico del gráfico A ni los máximos característicos del gráfico B.

20 En el gráfico D que acompaña a esta memoria se encuentran las solubilidades de los cristales tipo A y tipo B de adenosilcobalamina obtenidos por el procedimiento de este invento.

25 A continuación el invento será explicado mas practicamente mediante los siguientes ejemplos.

30

379778

18



EJEMPLO 1

1 En 50 ml de agua se disuelven 302 mg de metilcobalamina cruda conteniendo 89,30 % en moles de metilcobalamina, 5,35 % en moles de hidroxocobalamina, 5,16 % en moles de cianocobalamina y 0,19 % en moles de cobalamina ácida y la solución así obtenida se concentra a presión reducida a 40°C hasta 6 ml y se deja en reposo durante la noche a la temperatura ambiente. A continuación, los cristales precipitados se recuperan por filtración, se lavan con una pequeña cantidad de agua y se secan dando 209,8 mg de un cristal hidratado puro de metilcobalamina (metilcobalamina, 98,17 % en moles; hidroxocobalamina, 0,73 % en moles; cianocobalamina, 1,10 % en moles y cobalamina ácida, 0,07 % en moles).

15 Cuando el producto se somete a secado en vacío durante 5 horas a 60°C, la pérdida de peso del mismo es del 15,92 % del peso del producto. Asimismo, se determina el contenido en metilcobalamina, que es del 99,8 %, mediante un método normal utilizando un espectro de absorción en ultravioleta.

EJEMPLO 2

25 En 10 ml de agua se disuelve 1,0 g de adenosilcobalamina (adenosilcobalamina, 87,1 % en moles; cianocobalamina, 6,43 % en moles; oxocobalamina, 5,51 % en moles y cobalamina ácida, 0,53 % en moles) con calefacción suave y después de enfriar la solución gradualmente, se deja en reposo durante la noche en una cámara frigorífica. Los cristales precipitados se recuperan por filtración, se lavan con una

30

379778 18 M



1 pequeña cantidad de agua y se secan al aire dando 0,92 g
de cristal hidratado puro de adenosilcobalamina (adenosil-
cobalamina, 99,0 % en moles; cianocobalamina, 0,49 % en
5 moles; oxocobalamina, 0,35 % en moles y cobalamina ácida,
0,08 % en moles).

Cuando el producto se seca bajo presión reducida a
60°C hasta peso constante, la pérdida de peso es del 17 %.
El contenido de adenosilcobalamina en el producto seco es
del 99,4 %.

EJEMPLO 3

10 En 4000 ml de metanol conteniendo 35 % de agua se
introducen 100 g de cianocobalamina y 170 g de dihidrato de
sulfuro sódico y después de añadir 119 g de 5'-desoxi-5'-
15 yodoadenosina, la mezcla resultante se deja en reposo duran-
te la noche..

El producto de reacción líquido se concentra a pre-
sión reducida y el residuo así obtenido se disuelve en
20 2000 ml de agua y después el producto se extrae tres veces
con 330 ml cada vez de una mezcla líquida de cloroformo y
fenol (1:1) y después de lavar el extracto con una solución
saturada de bicarbonato sódico y agua sucesivamente, el
cloroformo se separa por destilación a presión reducida. El
25 residuo se mezcla con 7 litros de acetato de etilo y se ex-
trae tres veces con 400 ml de agua cada vez. Se reúnen los
extractos y después de lavarlos con acetato de etilo, se
separa este último por destilación a presión reducida.

La solución acuosa obtenida que contiene 93,00 % en



379778

18

1 moles de adenosilcobalamina, 4,00 % en moles de oxocoba-
lamina, 2,32 % en moles de cobalamina ácida y 1,55 % en
moles de materias neutras como cianocobalamina, se deja
en reposo durante la noche. Los cristales así precipitados
5 se recuperan por filtración, se lavan con agua y se secan
dando 110 g de cristal hidratado puro de adenosilcobala-
mina (adenosilcobalamina, 97,7 % en moles; cobalamina áci-
da, 1,4 % en moles; oxocobalamina, 0,35 % en moles y mate-
rias neutras, 0,13 %).

10 EJEMPLO 4

Después de enfriar a 20°C 100 ml de una solución
acuosa al 5 % de adenosilcobalamina preparada a 37°C, la
solución se deja en reposo durante 3 días a dicha tempera-
tura. Los cristales así precipitados se recuperan por fil-
tración mientras se mantiene el sistema a 20°C y se secan
15 para dar 3,5 g del cristal tipo A de adenosilcobalamina.

EJEMPLO 5

20 Los cristales convencionales precipitados de un di-
solvente mixto de agua/acetona se disuelven en agua a 45°C
para formar una solución acuosa al 7 % de los mismos y
100 ml de esta solución acuosa al 7 % de adenosilcobalamina
se enfrían a 25°C y se dejan en reposo durante 3 días. Re-
cuperando por filtración los cristales así precipitados,
25 mientras se mantiene el sistema a 25°C, y secando, se obtie-
nen alrededor de 5 g del cristal tipo A de adenosilcobala-
mina.

EJEMPLO 6

30 En 100 ml de agua se disuelven 7 g del cristal tipo
B de adenosilcobalamina (precipitado de una solución acuosa



379778

18 MA

1 enfriando con hielo) y la solución se enfría a 25° C y se
deja en reposo durante 2 días a esta temperatura. Recupe-
rando por filtración los cristales así precipitados mien-
tras se mantiene el sistema a 25° C y secando, se obtienen
5 alrededor de 4 g del cristal tipo A de adenosilcobalamina.

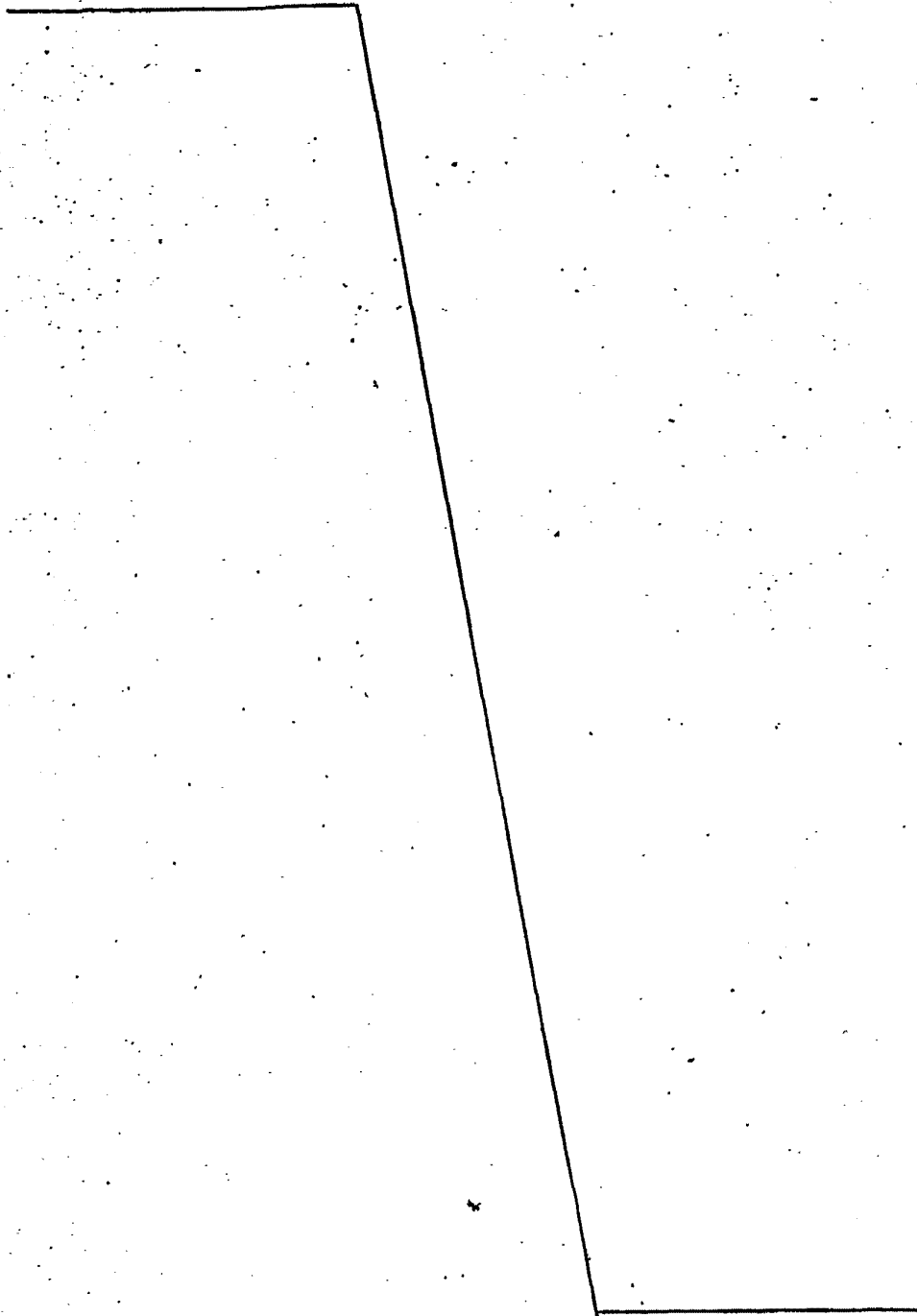
10

15

20

25

30

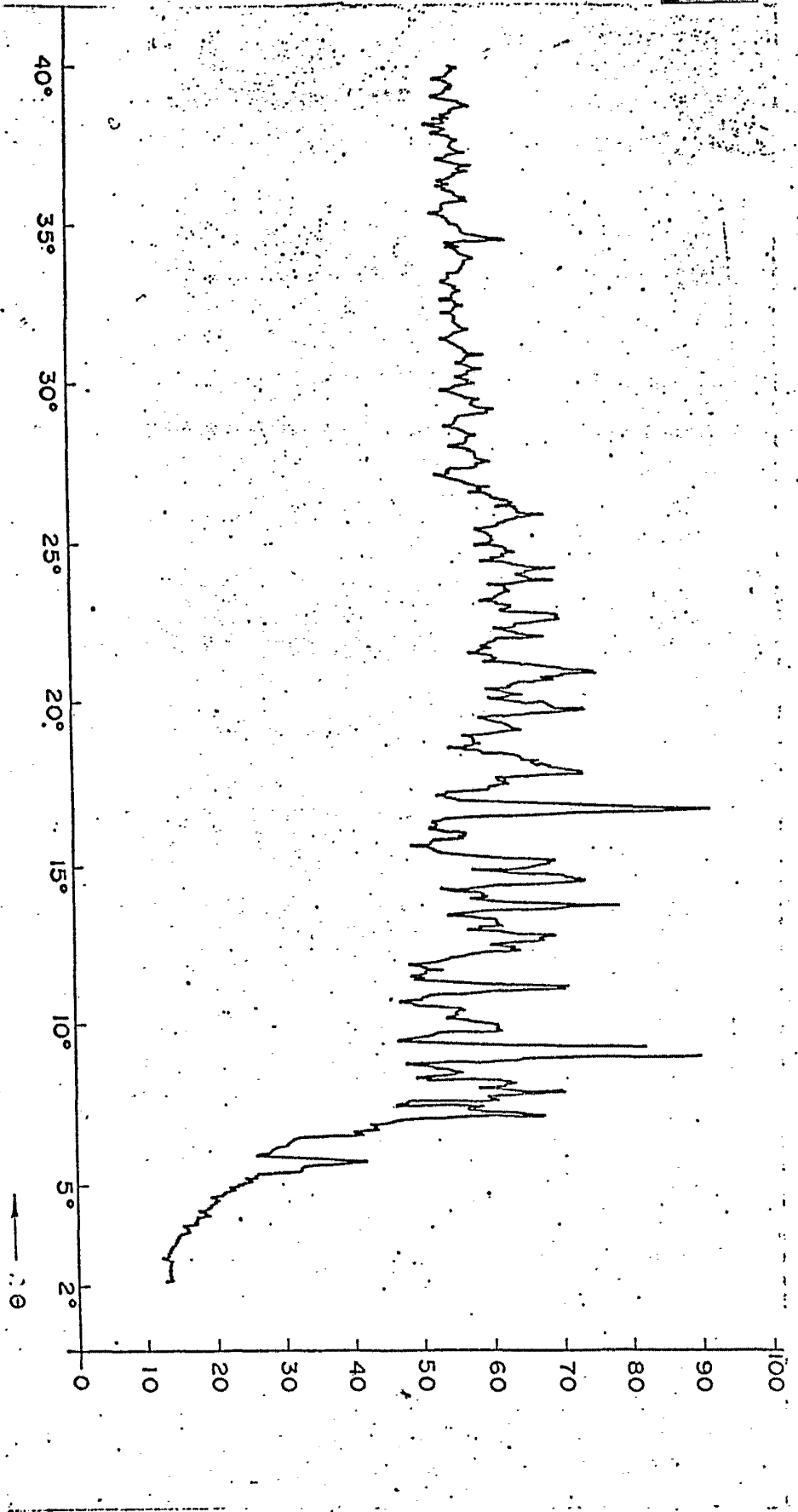


379778



EJEMPLO GRAFICO A

1
5
10
15
20
25
30



POOR
QUALITY

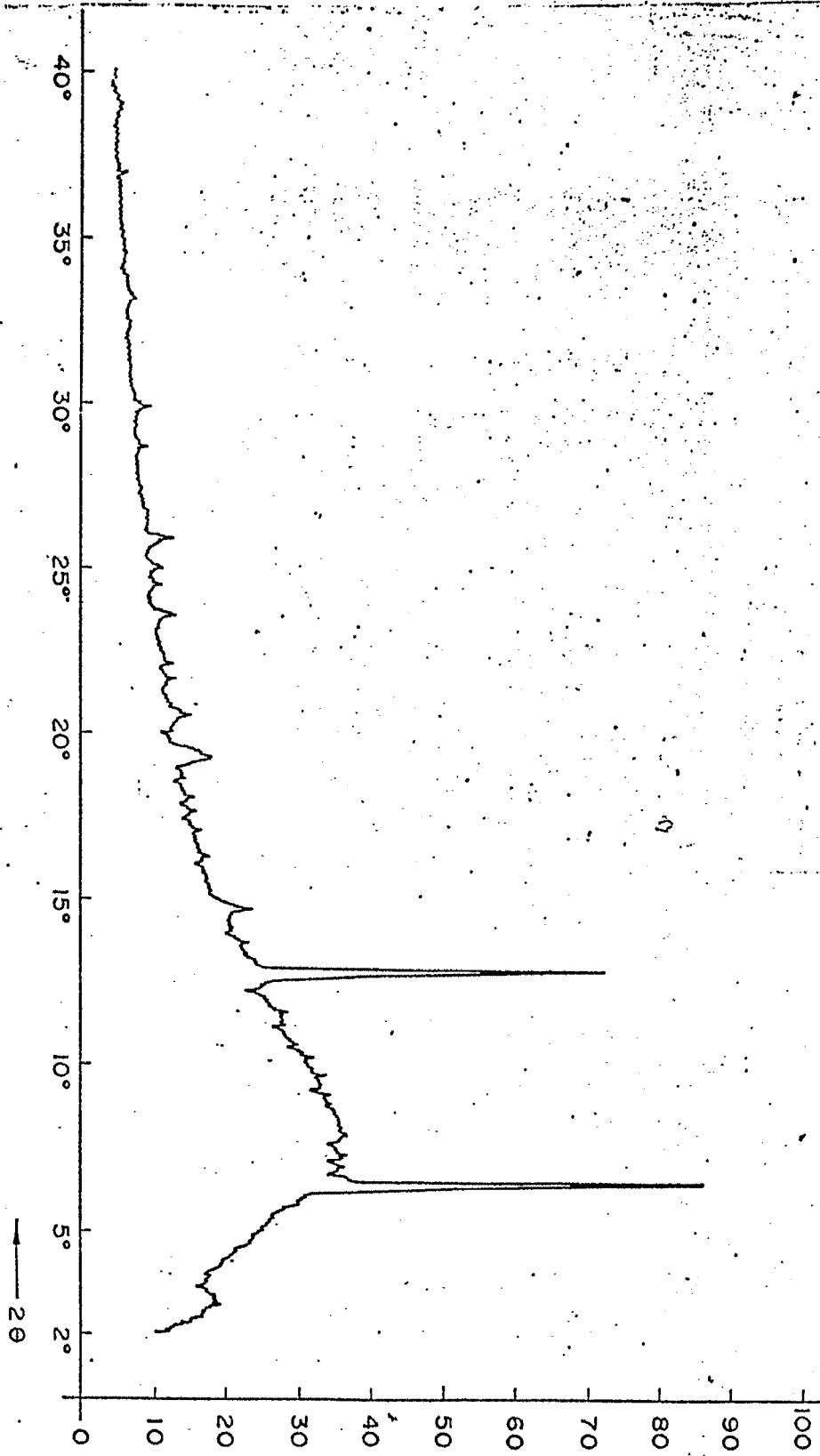
379778



EJEMPLO GRAFICO B

18 M

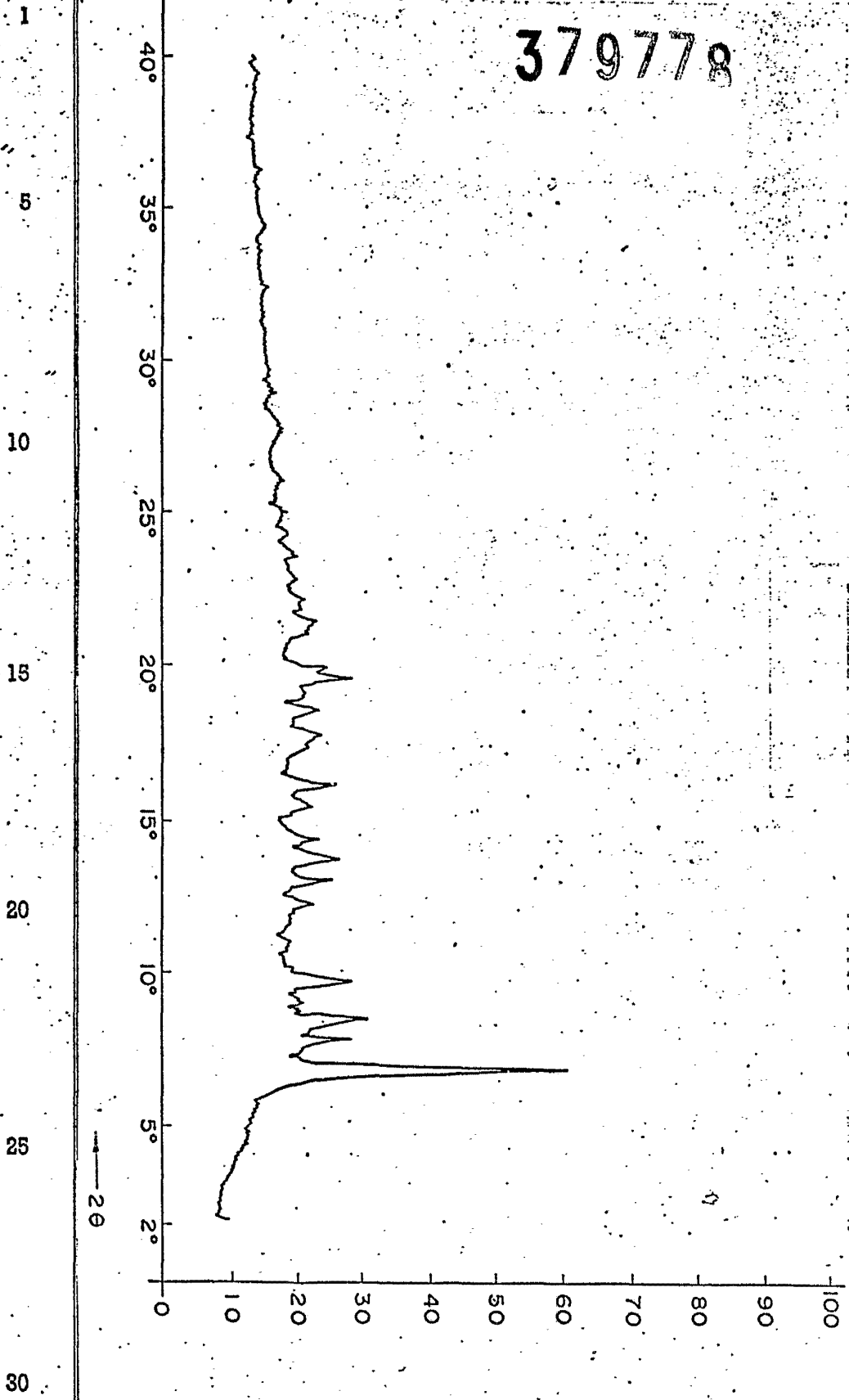
1
5
10
15
20
25
30





EJEMPLO GRAFICO C

379778



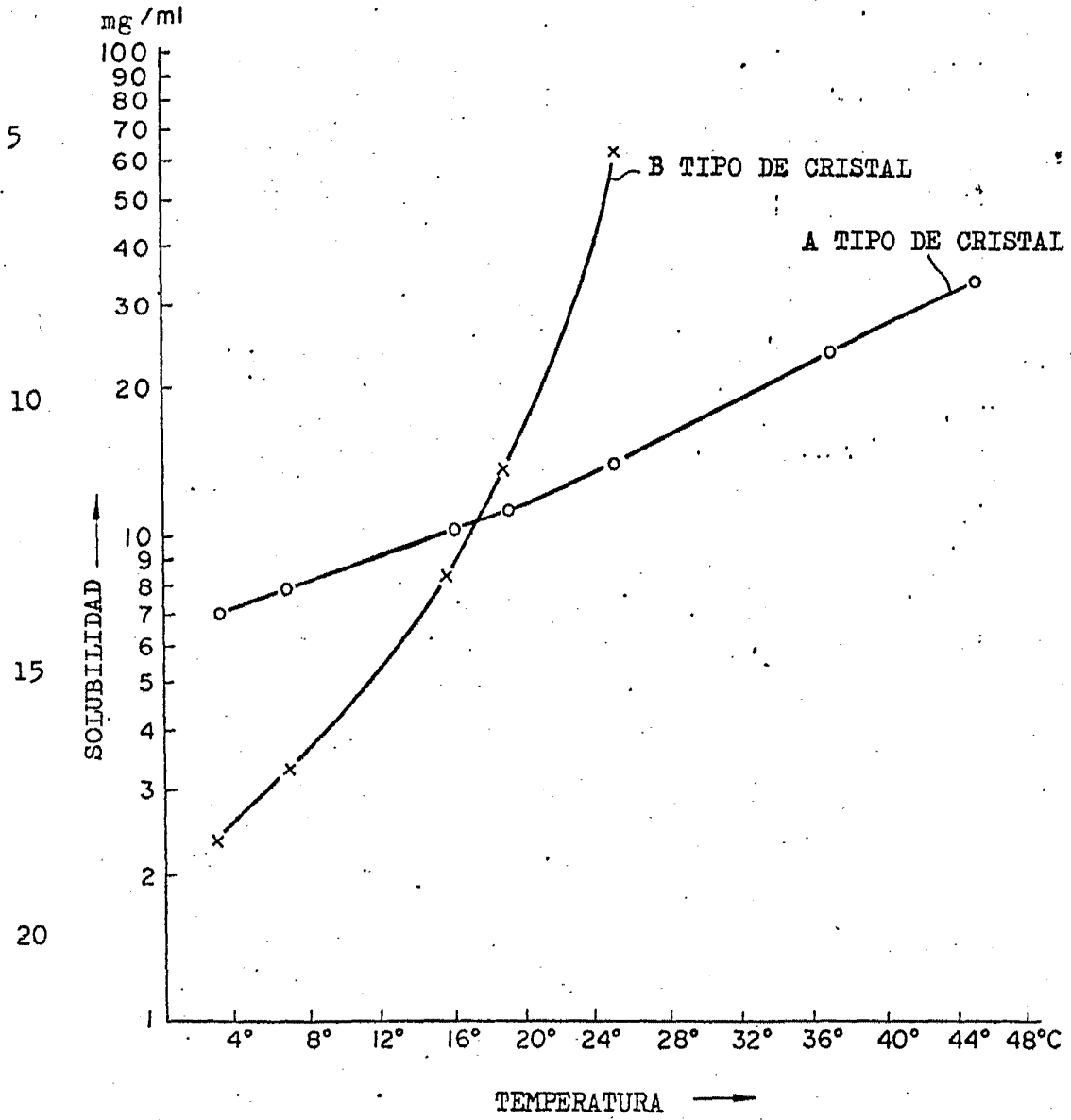
POOR QUALITY



1

EJEMPLO GRAFICO D

310



25

30

379778



1

REIVINDICACIONES

5

1.- Un metodo de produccion de cristales hidratos de adenosilcobalamina o metilcobalamina que consiste en cristalizar adenosilcobalamina o metilcobalamina cruda en un liquido constituido sustancialmente por agua, a una concentracion de más de 24 mg/ml.

10

2.- Un metodo según la reivindicacion 1, en el que dicha cristalización se realiza a una temperatura superior a 17°C, a una concentracion de más de 10 mg/ml.

15

3.- Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invencion que se solicita por: "UN METODO DE PRODUCCION DE CRISTALES HIDRATADOS DE ADENOSILCOBALAMINA O METILCOBALAMINA".

20

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de dieciocho páginas mecanografiadas.

Madrid, 18 de mayo de 1.970

BERNARDO UNGRIA

p.p.

25

30