

31 JUL



P.- 58.104

ET-OBE
14254A1

C.07 F // AB119

MEMORIA DESCRIPTIVA

428798

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de L'OPOCHIMIE

sociedad anónima monegasca

establecida en Immeuble Industriel "L'Hercule", Rue de
l'Industrie, Fontvieille, Principado de
Mónaco

por: "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE LA METILCOBALAMINA
A PARTIR DE LA CIANOCOBALAMINA"

(Clase Internacional C07f)

31 JUL



P - 58.104

ET - OBE
1425 + A1

El presente invento se refiere a un procedimiento que permite fabricar industrialmente metilcobalamina a partir de la cianocobalamina.

5 Ya se conoce la metilcobalamina y se sabe que este producto se deriva de la cianocobalamina por sustitución del grupo ciano (CN) por un grupo metilo (CH_3). La metilcobalamina como la cianocobalamina se utilizan en terapéutica para los tratamientos adecuados de la administración de vitamina B_{12} .

10 El acondicionamiento de la metilcobalamina, en forma de ampollas inyectables sin embargo es más fácil que el de la cianocobalamina, debido a la mayor solubilidad en agua de la metilcobalamina.

15 Por otra parte ya se conoce un procedimiento de fabricación de la metilcobalamina. En este procedimiento conocido, se reduce la cianocobalamina (vitamina B_{12}) para obtener la cobalamina reducida ($\text{B}_{12\text{s}}$). Esta reducción se efectúa con hidruro doble de boro y sodio (NaBH_4) en una atmósfera exenta de oxígeno, haciéndose luego reaccionar con esta
20 cobalamina reducida ($\text{B}_{12\text{s}}$) el oxalato de metilo o el yoduro de metilo para fijar el grupo metilo en el cobalto de la cobalamina reducida ($\text{B}_{12\text{s}}$).

25 Sin embargo, debido a la débil estabilidad de la cobalamina reducida $\text{B}_{12\text{s}}$, esta última tiene tendencia, durante la reacción de reducción y sobre todo antes de la fi

31 JUL



jación del grupo metilo, a transformarse parcialmente en cobalamina B_{12r} que es una cobalamina menos reducida que la cobalamina B_{12s} y que no es más susceptible de fijar un grupo metilo.

5 Para evitar este importante inconveniente que afecta el rendimiento final de metilcobalamina, es necesario utilizar cantidades en exceso de reductores. Se tropieza entonces con otro inconveniente pues se corre el peligro de atacar de manera irreversible la molécula de cobalamina formando productos de degradación perjudiciales para la pureza y el rendimiento de metilcobalamina.

10 Para evitar la transformación de la cobalamina B_{12s} , se ha propuesto igualmente efectuar la reacción en presencia de un gas inerte tal como argón. Sin embargo la utilización de tal gas complica considerablemente las operaciones y aumenta notablemente su coste.

15 El procedimiento según el presente invento tiende a remediar los inconvenientes del procedimiento antes citado, permitiendo realizar la transformación de cianocobalamina en metilcobalamina en condiciones tales que se limita considerablemente el riesgo de formación de cobalaminas reducidas no susceptibles de fijar un grupo metilo o productos de degradación de la cobalamina.

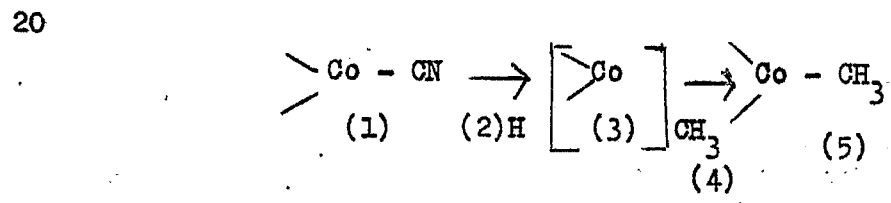
20 Según el invento, el procedimiento de fabricación de metilcobalamina en el cual se realiza la metilación de



una cobalamina reducida se caracteriza porque se prepara una solución que contiene al menos 40 g por litro de ciano-cobal amina en una mezcla de metanol y agua, y porque se añade a esta solución oxalato ácido de metilo y un polvo metálico ca-
 5 paz de liberar hidrógeno por acción sobre el oxalato ácido de metilo con objeto de realizar simultáneamente la reducción de la cianocobalamina y la metilación de la cobalamina reducida en metilcobalamina.

El hecho de que la reducción y la metilación de la
 10 cianocobalamina sean efectuadas simultáneamente por medio del oxalato ácido de metilo limita considerablemente la duración de la existencia de la cobalamina reducida (B_{12s}) obtenida por la acción del hidrógeno naciente producido por reacción entre el oxalato ácido de metilo con el polvo metálico, pues
 15 la cobalamina reducida es metilada a medida que se forma. El procedimiento puede de esta forma realizarse en presencia de aire.

Las reacciones de reducción y metilación pueden re presentarse por el esquema siguiente:



donde (1) representa cianocobalamina, (2) hidrógeno naciente
 25 producido por la acción de la función ácida libre del oxalato



ácido de metilo sobre el polvo metálico, (3) la cobalamina reducida (B_{12s}) que está también metilada por el grupo CH₃ (4) que proviene del oxalato ácido de metilo, para formar la metilcobalamina (5). Al mismo tiempo que las reacciones antes citadas, el grupo CN que proviene de la cianocobalamina (1) se hidrogena en metilamina según la reacción:



Según el esquema de esta reacción se observa, que teóricamente basta con liberar por reacción entre el oxalato ácido de metilo y el polvo metálico cinco átomos-gramos de hidrógeno naciente por molécula-gramo de cianocobalamina. Sin embargo, es preferible utilizar un exceso de oxalato ácido de metilo y polvo metálico.

La metilamina formada durante la reducción queda presente en el medio reaccionante y su grupo metilo no molesta en modo alguno la reacción de metilación.

Se temía por otra parte que el grupo CN liberado durante la reacción de reducción molestará la reacción de metilación.

Entre los polvos metálicos capaces de liberar hidrógeno por acción sobre el oxalato ácido de metilo, es preferible utilizar el polvo de zinc.

Se ha observado que para que la reducción y la metilación de la cianocobalamina se efectuen en buenas condiciones, era necesario que la concentración de la ciano-

31 JUL 1974

cobalamina en el medio reaccionante fuera superior a 40 g/l. Tal concentración es imposible de obtener en metanol y agua pura, siendo solamente la solubilidad de la cianocobalamina en estos dos disolventes igual a 20 g/l y 13 g/l respectivamente. Sin embargo, se ha observado el efecto sorprendente de que la solubilidad de la cianocobalamina aumentaba en una mezcla de metanol y agua y pasaba por un máximo cuando la proporción de agua en metanol era igual al 8% en volumen y alcanzaba 160 g/l para esta proporción.

10 Sin embargo es inútil trabajar con tal concentración de cianocobalamina, cumpliéndose las condiciones favorables de solubilidad, reducción y metilación cuando la mezcla de metanol y agua utilizada contiene entre 7 y 15% de agua.

15 Según una versión preferida del procedimiento, el medio reaccionante se mantiene a una temperatura comprendida entre 28 y 32°C.

20 En efecto es preferible mantener el medio reaccionante entre los dos límites de temperatura antes citados. Si la temperatura del medio es superior a 32°C, la reacción de reducción tiene tendencia a ser demasiado rápida, de forma que se corre el riesgo de degradar la molécula de cobalamina.

25 Por otra parte, si la temperatura es inferior a 28°C, las reacciones de reducción y metilación son más len-

31 JU



tas e incompletas, lo que es perjudicial para el rendimiento del producto final.

Según otra versión preferida del procedimiento, se añaden al medio reaccionante, sales de cobalto.

5 Estas sales de cobalto, pueden ser por ejemplo cloruro de cobalto, nitrato de cobalto u oxalato de cobalto, catalizan la reacción de reducción y regularizan en particular el pH del medio reaccionante.

10 Trabajando en las condiciones antes citadas, se puede transformar casi cuantitativamente la cianocobalamina en metilcobalamina. Se puede seguir visualmente o por medio de un espectrofotómetro, la evolución de la reacción. La solución de cianocobalamina que al principio es roja se vuelve violácea y luego marrón cuando la cianocobalamina
15 está transformada en metilcobalamina.

La coloración azul-verde anunciada en la bibliografía, atribuida a la formación de la cobalamina reducida B_{12s} no aparece, lo que constituye la prueba de que este compuesto tiene en el procedimiento presente, una duración
20 de vida muy corta debido a ser metilado a medida que se forma.

Una vez terminada la reacción, se filtra el medio reaccionante para eliminar el zinc en exceso y las sales de zinc insolubles formadas.

25 A continuación se precipita la metilcobalamina en

31 JUL



el líquido filtrado con cuatro volúmenes de acetona, se filtra, y se redissuelve el precipitado de metilcobalamina en una mezcla de acetona y agua en cantidades iguales.

5 A continuación la solución obtenida puede dejarse cristalizar directamente, pero es preferible purificarla primeramente, por paso sobre columnas cromatográficas apropiadas.

10 Según una variante del procedimiento, se hace pasar la solución de cianocobalamina, agua, metanol y oxalato ácido de metilo por una columna que contiene el polvo metálico y se separa la hidroxocobalamina de la solución recogida a la salida de la columna.

15 La conversión de la cianocobalamina en metilcobalamina se efectúa así en continuo en el seno de la columna por contacto del polvo metálico que libera hidrógeno naciente al reaccionar sobre el oxalato ácido de metilo.

Esta operación en continuo permite aumentar el rendimiento de metilcobalamina y permite sobre todo utilizar mayor cantidad de cianocobalamina en cada operación.

20 Terminada la reacción no es necesario filtrar la solución recogida a la salida de la columna. Esta última es así utilizable directamente para las operaciones de separación y purificación de la metilcobalamina.

25 Como en la primera versión del procedimiento, la mezcla de metanol y agua utilizada contiene preferiblemente

81 JUL 97



entre 7 y 15% de agua, siendo añadidas a la solución de ciano cobalamina sales de cobalto, tales como cloruro de cobalto, nitrato de cobalto u oxalato de cobalto.

5 A continuación se dan dos ejemplos de modos oper-
torios no limitativos, que ilustran el procedimiento de fa-
bricación de la metilcobalamina a partir de cianocobalamina.

Ejemplo 1 :

10 Se disuelven 100 g de cianocobalamina en dos li-
tros de metanol y 200 cm³ de agua. La solución es perfecta-
mente transparente y tiene una coloración roja característi-
ca.

15 A esta solución se añaden 200 g de oxalato ácido
de metilo, 30 g de cloruro de cobalto, la mezcla obtenida
se lleva hasta 28°C y esta última se mantiene a esta tempe-
ratura. Se añaden entonces 300 g de zinc en polvo.

20 Se inician las reacciones de reducción y metila-
ción. Siendo estas reacciones exotérmicas, se enfría el me-
dio reaccionante para mantener este último a una temperatu-
ra inferior a 32°C. Se dejan que prosigan las reacciones
durante una hora, manteniendo en agitación el medio reaccio-
nante. Este medio toma al final de la operación un color
marrón. Se filtra la mezcla resultante para eliminar el
zinc o las sales de zinc formadas, insolubles en el medio
reaccionante. Se añaden al líquido filtrado 4 volúmenes de
25 acetona, para precipitar la metilcobalamina. Se filtra y

31 JUL. 1974



vuelve a disolver el precipitado de metilcobalamina recogido en una mezcla de agua y acetona en cantidades iguales.

5 A continuación la solución resultante se hace pasar por una columna que contiene una resina compuesta de perlas esféricas de polímeros que contienen sitios cambiadores de cationes y aniones, tal como la resina denominada "Retardion AG 11 A8" producida por Bio-Rad para eliminar los iones zinc, cobalto, etc. en solución, y luego por una columna de lechos mixtos constituidos por 3 volúmenes de una resina fuertemente básica $[N-(CH_3)_3^+]$ cambiadora de aniones, tal como la resina IRA 400 de Rohm & Haas, por cada volumen de una resina sulfónica ácida, cambiadora de cationes, tal como la Amberlite IRC 120 de Rohm & Haas, para eliminar la cianocobalamina no transformada, o las cobalaminas demasiado reducidas.

15 Después de purificación, la solución se deja cristalizar después de adición de acetona.

Se obtienen así 65 g de metilcobalamina.

20 El espectro de absorción de una solución diluida que contiene la metilcobalamina así obtenida, presenta máximos a 267, 343 y 520 milimicras, que corresponden a los obtenidos para la metilcobalamina pura.

25 La resistividad de una solución de agua desmineralizada dosificada con 5 microgramos por cm^3 de metilcobalamina obtenida según el ejemplo antes citado es superior a

31 JUL 1974

10.000 ohms/cm, lo que demuestra que la metilcobalamina obtenida no contiene iones que puedan provenir principalmente del zinc o del cobalto que se han introducido en el medio reaccionante.

5 Como muestra el ejemplo antes citado, el procedimiento de fabricación de la metilcobalamina a partir de la cianocobalamina es de realización particularmente fácil.

10 Se obtiene una metilcobalamina perfectamente pura gracias a una reducción controlada de la cianocobalamina por medio de un compuesto, el oxalato ácido de metilo que juega un doble papel, siendo a la vez el ácido capaz de liberar el hidrógeno nascente por reacción con el polvo de zinc y el agente capaz de asegurar la metilación de la cobalamina reducida.

15 Por otra parte el excelente rendimiento en metilcobalamina se explica por el hecho de que la solución contiene al principio, una importante concentración de cianocobalamina lo que ha sido posible gracias a la adecuada elección de un disolvente constituido por una mezcla de metanol y agua.

20 Ejemplo 2 :

25 Se disuelven 200 g de cianocobalamina en cuatro litros de metanol y 400 cm³ de agua destilada. Cuando se ha completado la solución, se añaden 400 g de oxalato ácido de metilo y 100 g de cloruro de cobalto y se agita has-

31 JUL. 1974



ta obtener una solución transparente.

Se rellena una columna, dispuesta verticalmente, que tiene una altura igual a 1 m y un diámetro interior igual a 3 cm, con polvo de zinc hasta una altura igual a
5 80 cm.

Para lavar y preparar la columna se hace primero circular por esta última de abajo a arriba, un litro de una solución de metanol que contiene 10% en volumen de agua. A continuación se hace circular por la columna, de abajo a
10 arriba la solución de cianocobalamina antes citada, con un caudal de aproximadamente 1 litro por hora.

A la salida de la columna, la solución se recoge en un recipiente protegido de la luz.

Pasando la totalidad de la solución preparada por
15 la columna, se puede repetir la operación utilizando una solución idéntica a la precedente.

Los análisis espectrofotométricos efectuados sobre la solución recogida después del paso por la columna, muestran que se obtuvieron 175 g de metilcobalamina a partir de
20 200 g de cianocobalamina, siendo el rendimiento por consiguiente igual al 87,5%.

Para separar la metilcobalamina de la solución recogida y purificar esta última, se procede como sigue:

Se hace pasar la solución por una columna que con
25 tiene una resina denominada "Retardion AG 11 AS" producida



31 JUL. 1974

por la firma Bio-Rad, compuesta de perlas de polímeros que contienen sitios cambiadores de cationes y aniones, para eliminar los iones zinc, cobalto, etc. en solución.

5 A continuación se pasa la solución por una columna de lechos mixtos constituidos por 3 volúmenes de una resina fuertemente básica cambiadora de aniones que contiene grupos $N(CH_3)^{3+}$, tal como la resina IRA 400 de la firma Rohm & Haas, por cada volumen
10 de una resina sulfónica ácida, cambiadora de cationes, tal como la resina "Amberlite IRC 120" de la firma Rohm & Haas, para eliminar la cianocobalamina no transformada, o las cobalaminas demasiado reducidas.

15 Después de purificación, la solución se deja cristalizar después de adición de acetona.

20 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Francia, el día 8 de Agosto de 1973, bajo el número 73 28998 y el 28 de Diciembre de 1973, bajo el número 73 46829, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

25 Los puntos de invención propia y nueva,

26.7.74

31 JUL. 1974
31 JUL.



que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

- 5 1ª.- Procedimiento de fabricación de la metilcobalamina a partir de la cianocobalamina, en el cual se realiza la metilación de una cobalamina reducida, caracterizado porque se prepara una solución que contiene al menos 40 g por litro de cianocobalamina
- 10 en una mezcla de metanol y agua, porque se añade a esta solución oxalato ácido de metilo y un polvo metálico capaz de liberar hidrógeno por acción sobre el oxalato ácido de metilo, con objeto de realizar simultáneamente la reducción de la cianocobalamina y la metilación de la cobalamina reducida en metilcobalamina.
- 15 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la mezcla de metanol y agua utilizada contiene entre 7 y 15% de agua.
- 20 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el medio reaccionante se mantiene a una temperatura comprendida entre 28 y 32°C.
- 25 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se añade al medio reaccionante sales de cobalto elegidas entre oxalato, cloruro y nitrate de cobalto.

26.7.74

- 14 -

m/e

31 JUL.



5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el polvo metálico utilizado es polvo de zinc.

5
10
6ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado porque se hace pasar la solución de cianocobalamina, agua, metanol y oxalato ácido de metilo por una columna que contiene el polvo metálico y porque se separa la metilcobalamina de la solución recogida a la salida de la columna.

7ª.- Procedimiento de fabricación de la metilcobalamina a partir de la cianocobalamina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

15
Esta Memoria consta de quince hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

31 JUL. 1974.

P.A.

Fernando de Elizaburu
Per Poder.

26.7.74

JGA.

176