

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 837**

51 Int. Cl.:

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2017 PCT/EP2017/057506**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018 WO18007035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2017 E 17714232 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3481839**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de metilcobalamina**

30 Prioridad:

08.07.2016 EP 16178560

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.11.2023

73 Titular/es:

**HEALTHTECH BIO ACTIVES, S.L.U. (100.0%)
Avenida Diagonal 567, Planta 4
08029 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**SALLARES ROSELL, JUAN y
MARQUILLAS OLONDRIZ, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 952 837 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de metilcobalamina

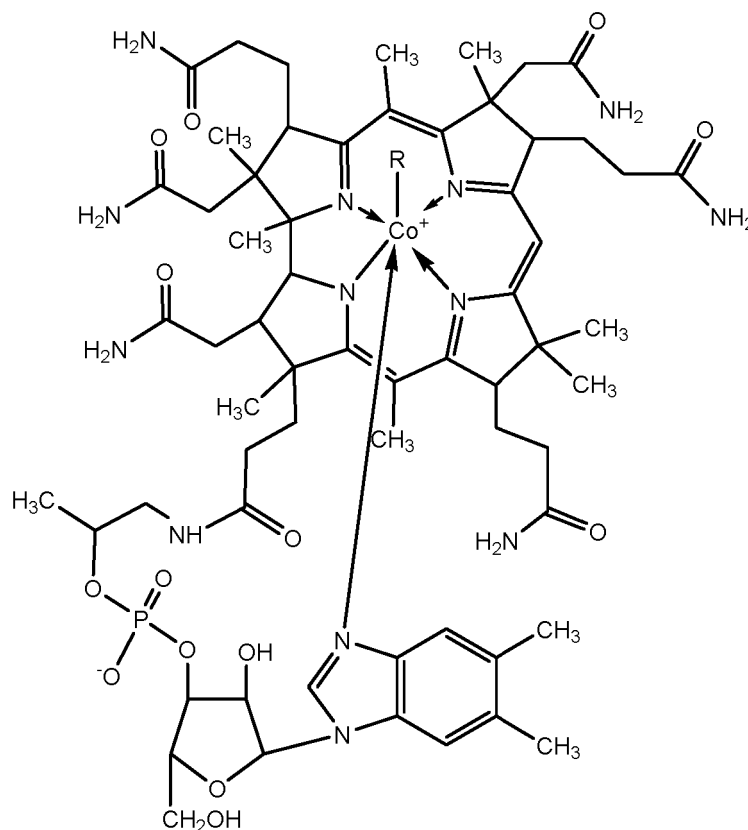
5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de metilcobalamina, que es una de las formas de coenzima de la vitamina B12.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las cobalaminas son un grupo de compuestos de coordinación de cobalto estrechamente relacionados e interconvertibles, que generalmente se conocen colectivamente como vitamina B12.

- 15 Las cobalaminas pertenecen a la familia de los corrinoideos, que comparten un anillo tetrapirrólico plano (anillo corrina) que contiene un átomo central de cobalto, que puede asumir un estado de oxidación de (I), (II) o (III). De manera adicional, las cobalaminas poseen un ligando axial superior (beta) y uno inferior (alfa), como se representa en la siguiente estructura:



20

- El ligando inferior (alfa) es el grupo dimetilbenzimidazol de un nucleótido, que está conectado al anillo de corrina a través de un enlace amida. En las cobalaminas naturales, el ligando beta (R) puede ser un grupo ciano-, hidrox-, metilo- o 5'-desoxiadenosilo, dando lugar, respectivamente, a cianocobalamina, hidroxocobalamina, metilcobalamina y 5'-desoxiadenosilcobalamina. Por lo general, el término vitamina B₁₂ se refiere específicamente a la cianocobalamina, es decir, cuando R es el grupo ciano (CN).

- Entre las cobalaminas, la metilcobalamina y la 5'-desoxiadenosilcobalamina son las formas activas que funcionan como coenzimas para las reacciones metabólicas en el organismo, es decir, en aquellas reacciones catalizadas por las enzimas metionina sintasa y metilmalonil-CoA mutasa, que están relacionadas, por ejemplo, con la formación de glóbulos rojos, la función neurológica y la síntesis de ADN. Por consiguiente, la deficiencia de vitamina B12 está asociada con varias patologías, tales como anemia megaloblástica, fatiga, debilidad, estreñimiento, pérdida de apetito, pérdida de peso y trastornos neurológicos. En tales estados carenciales, está indicada la administración de cobalaminas.

35

La metilcobalamina, en particular, se utiliza con éxito en la terapia para el tratamiento de varios trastornos asociados a la deficiencia de vitamina B12, por ejemplo, para el tratamiento de la neuropatía periférica o la anemia megaloblástica.

- 5 Existe, por lo tanto, una necesidad de métodos industriales para preparar cobalaminas, particularmente metilcobalamina, que son industrialmente eficientes y adecuados para proporcionar un producto de alta pureza, cumpliendo con los requisitos de los organismos reguladores sanitarios.

10 La metilcobalamina se obtiene comúnmente de la cianocobalamina, mediante un procedimiento de metilación reductora, lo que implica el tratamiento de cianocobalamina con un agente reductor y con un agente de metilación. En tal procedimiento, sin embargo, los aniones cianuro, que se liberan de la cianocobalamina durante la reacción de reducción, tienden a unirse de nuevo a la forma reducida de cobalamina, conocida como cob(I)alamina o vitamina B_{12S}, compitiendo con el agente de metilación y, por consiguiente, reduciendo el rendimiento global de la reacción del procedimiento.

15 Para hacer frente a este inconveniente, se ha propuesto en el estado de la técnica que esta reacción se pueda realizar ventajosamente en presencia de un agente capaz de actuar como secuestrante de cianuro, es decir, formando complejos con los aniones cianuro presentes en los medios de reacción y evitando así cualquier interferencia con el procedimiento de metilación. Entre los secuestrantes de cianuro adecuados para este procedimiento, se han divulgado
20 varias sales metálicas, particularmente, sales de hierro (II).

Por consiguiente, en la patente japonesa JP45038059-B1 se divulga la preparación de metilcobalamina mediante el tratamiento de cianocobalamina con borohidruro de sodio como agente reductor, añadiendo sulfato ferroso heptahidrato como secuestrante de cianuro y usando yoduro de metilo como agente de metilación. El producto de
25 reacción obtenido se purifica por sucesivas extracciones con fenol y por cromatografía en columna.

De modo similar, en la patente US3798211 se proponen varias sales metálicas como agentes formadores de complejos de cianuro para la reacción de alquilación reductora de cianocobalamina, particularmente sales de cobre (II) y hierro (II). Por consiguiente, se divulga la preparación de metilcobalamina a partir de cianocobalamina utilizando sulfato
30 ferroso como agente formador de complejos de cianuro y tolueno-p-sulfonato de metilo como agente de metilación. El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna.

El documento GB 1419933 divulga la preparación de metilcobalamina por metilación reductora de cianocobalamina utilizando oxalato de monometilo y zinc como agentes de metilación y utilizando cloruro de cobalto como catalizador.
35 Se disolvió metilcobalamina en una solución acuosa de acetona y se purificó utilizando resinas de intercambio catiónico y aniónico. Después de la purificación, se añadió acetona y la solución se dejó cristalizar para producir metilcobalamina.

En el artículo de Ishiyama *et al.*, *New preparation method of methylcobalamin*, Meiji Seika Kenkyu Nenpo, 1996, 35:
40 51-54, también se divulga la preparación de metilcobalamina a partir de cianocobalamina, en donde la reacción se lleva a cabo en condiciones estrictamente exentas de oxígeno, manteniendo la concentración de oxígeno por debajo de 0,1 ppm, y utilizando borohidruro de sodio y yoduro de metilo como agentes reductores y metilantes, respectivamente, y una mezcla de sales de hierro (II) y hierro (III) como secuestrantes de cianuro, concretamente, sulfato de amonio y hierro (II) (sal de Mohr) y cloruro de hierro (III). La metilcobalamina así obtenida se purifica por
45 cristalizaciones sucesivas, o por cromatografía en columna utilizando un copolímero de divinilbenceno-estireno.

La solicitud de patente europea EP1236737-A1 divulga la preparación de metilcobalamina por metilación reductora de cianocobalamina usando sales haluro de trimetilsulfoxonio o trimetilsulfonio como agentes de metilación y usando
50 sulfato de hierro (II) heptahidrato y/o cloruro de cobalto (II) hexahidrato como agentes secuestrantes de cianuro.

Un inconveniente de la estrategia anterior es que las sales de hierro, que son eficientes para mejorar el rendimiento del procedimiento de metilación reductora, pueden dar lugar a residuos de hierro en la sustancia farmacéutica final y, en consecuencia, en el producto farmacéutico final.

55 Particularmente, la eliminación de aniones cianuro de hierro, formados mediante la formación de complejos de las sales de hierro con los aniones cianuro presentes en los medios de reacción, ha demostrado ser un desafío, dificultando la obtención de metilcobalamina con un contenido en hierro dentro de los límites recomendados por las autoridades reguladoras de residuos metálicos. La Agencia Europea de Medicamentos, por ejemplo, recomienda límites de concentración máximos aceptables de metales derivados del uso de catalizadores metálicos o reactivos
60 metálicos en sustancias farmacéuticas (EMA/CHMP/SWP/4446/2000).

Los procedimientos divulgados hasta ahora en la técnica para preparar metilcobalamina requieren etapas de purificación complicadas, que habitualmente incluyen separaciones cromatográficas líquidas, que generalmente se consideran poco adecuadas.

65

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un método de purificación mejorado que elimine de manera simple y efectiva los aniones cianuro de hierro de las mezclas con metilcobalamina, que sea adecuado para la aplicación industrial, para permitir la producción rentable de metilcobalamina con niveles aceptables de hierro conforme a las autoridades reguladoras.

5

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la purificación de metilcobalamina.

10 Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la purificación de metilcobalamina a partir de mezclas con aniones cianuro de hierro caracterizado por que comprende poner en contacto una solución que comprende metilcobalamina y aniones cianuro de hierro con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica.

15

Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo procedimiento para la purificación de metilcobalamina basado en el tratamiento con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, que, sorprendentemente, permite la eliminación eficiente de trazas de aniones cianuro de hierro presentes en soluciones de metilcobalamina utilizando un procedimiento simple que puede implementarse industrialmente fácilmente para proporcionar metilcobalamina con un contenido de hierro reducido.

20

Este procedimiento puede utilizarse ventajosamente para eliminar las impurezas de cianuro de hierro de la metilcobalamina obtenida por metilación reductora de la cianocobalamina en la que se utilizan sales de hierro (II) como secuestrantes de cianuro, proporcionando así metilcobalamina con un contenido de hierro reducido.

25

Como se usa en la presente descripción, las formas singulares precedidas por "uno/una" o "el/la" también pretenden incluir las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. El término aproximadamente como se usa en la presente descripción indica que se admite una cierta variación del valor declarado, concretamente, de $\pm 10\%$, preferentemente de $\pm 5\%$.

30

Resina de intercambio aniónico fuertemente básica

Una resina de intercambio aniónico, tal como se sabe bien en la técnica, es una matriz polimérica insoluble que contiene aniones que pueden intercambiarse con otros aniones en soluciones que entran en contacto con ellos.

35

Una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, como la utilizada en la presente invención, es un tipo particular de resina de intercambio aniónico en donde el anión que se intercambia es el contraión de un grupo de amonio cuaternario que se une a la matriz polimérica de la resina, normalmente un grupo trialkilamonio tal como trimetilamonio, o un grupo dialquil 2-hidroxietilamonio. Preferentemente, la resina tiene grupos funcionales trialkilamonio, más preferentemente grupos trimetilamonio.

40

El contraión, que se intercambia, es generalmente un anión cloruro o hidróxido. Preferentemente, el contraión es un anión cloruro.

45

La matriz polimérica de la resina puede ser un polímero de poliestireno-divinilbenceno reticulado, es decir, preparado a partir de estireno y divinilbenceno como agente de reticulación; o puede ser un polímero acrílico reticulado, preparado a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, o ésteres de ácido acrílico o metacrílico, por ejemplo, ésteres metílicos, etílicos o propílicos, reticulados con, p. ej. divinilbenceno, dimetacrilato de etilenglicol, éter divinílico de etilenglicol o éter divinílico de dietilenglicol.

50

En una realización de la invención, la resina se selecciona de una resina de poliestireno-divinilbenceno reticulada y una resina de acrílico-divinilbenceno reticulada. En una realización preferida, la resina es una resina de acrílico-divinilbenceno reticulada.

55

Las resinas están generalmente disponibles en forma de perlas. Según su porosidad, la resina puede ser microporosa (tipo gel) o macroporosa (macrorreticular). Preferentemente, la resina tiene estructura macrorreticular.

En una realización preferida, la resina de intercambio aniónico fuertemente básica es una resina que tiene grupos funcionales trialkilamonio y aniones cloruro intercambiables. Más preferentemente, la resina es una resina de acrílico-divinilbenceno reticulada que tiene una estructura macrorreticular.

60

Están comercializadas varias resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas adecuadas para usar en el procedimiento de la presente invención, por ejemplo, Amberlite® IRA458 RF Cl, Amberlite® IRA900 Cl, Amberlite® IRA958 Cl; Diaion® SA10A(Cl), Diaion® HPA25(Cl), Dowex® Marathon A, Dowex® Marathon MSA, Lewatit® MonoPlus MP500, Lewatit® MonoPlus MP800, o las resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas de la

65

metilcobalamina en la solución, que podría interactuar con los aniones cianuro de hierro, el intercambio aniónico entre el contraión de la resina y los aniones cianuro de hierro se realiza de manera efectiva y permite obtener una solución de metilcobalamina con un contenido de hierro reducido.

5 Como se muestra en el ejemplo 3, la metilcobalamina obtenida por metilación reductora de cianocobalamina utilizando sales de hierro como secuestrantes de cianuro podría separarse eficazmente de las impurezas de cianuro de hierro utilizando el método de la presente invención, obteniendo así metilcobalamina que tiene menos de 130 ppm de hierro, concretamente, 71 ppm o incluso menos de 30 ppm, mientras que cuando se realizó el mismo procedimiento sin utilizar una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, el nivel de hierro en la metilcobalamina era mucho más alto,
10 494 o 1594 ppm.

Tras el uso, la resina de intercambio aniónico pierde progresivamente su capacidad de intercambio aniónico, a medida que se retienen más aniones cianuro de hierro. La resina agotada se puede regenerar con una solución acuosa de una sal del contraión de la resina, preferentemente una solución acuosa de una sal cloruro, más preferentemente una
15 solución acuosa de cloruro de sodio.

El disolvente utilizado para realizar el procedimiento de purificación, en el que se disuelven la metilcobalamina y los aniones cianuro de hierro, puede ser agua o una mezcla de agua con un codisolvente orgánico miscible con agua. Los codisolventes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol,
20 isopropanol, o *terc*-butanol; cetonas tales como acetona o 2-butanona; éteres, tales como 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, dimetoxietano o diglima; y mezclas de los mismos.

En una realización preferida, el disolvente es una mezcla de agua y un codisolvente orgánico miscible con agua, preferentemente una mezcla de agua y un codisolvente miscible con agua seleccionado de un alcohol, una cetona y
25 mezclas de los mismos; más preferentemente el disolvente es una mezcla de agua y una cetona miscible con agua, y aún más preferentemente es una mezcla de agua y acetona.

La proporción volumétrica agua:disolvente orgánico está generalmente comprendida entre 1,8:1 y 1:1,5, preferentemente comprendida entre 1,5:1 y 1:1,2, más preferentemente comprendida entre 1,1:1 y 1:1,1.
30

En una realización particularmente preferida, el disolvente es una mezcla de agua y acetona en una proporción en volumen de aproximadamente 1:1.

La solución que contiene metilcobalamina y las impurezas de cianuro de hierro que se pone en contacto con la resina de intercambio aniónico comprende metilcobalamina en una concentración generalmente comprendida entre 30-150 g/l, preferentemente entre 40-100 g/l, y más preferentemente comprendida entre 50-75 g/l.
35

Después de realizar el tratamiento con la resina de intercambio aniónico, la metilcobalamina se puede aislar cristalizándola o precipitándola de la solución, generalmente agregando un disolvente de cetona a la solución, preferentemente agregando acetona a la solución.
40

En una realización preferida de la invención, la solución que se somete al procedimiento de purificación se prepara tratando la metilcobalamina bruta que comprende impurezas de cianuro de hierro con el disolvente y calentando a una temperatura comprendida entre 30 °C y 60 °C, preferentemente entre 40 °C y 50 °C, y más preferentemente a
45 aproximadamente 45 °C, durante un periodo de tiempo generalmente comprendido entre 15 y 60 minutos. La suspensión así obtenida se filtra generalmente para eliminar las impurezas insolubles, por ejemplo, sales insolubles de cianuro de hierro, y la solución filtrada, que todavía contiene aniones cianuro de hierro residual, se pone después en contacto con la resina de intercambio aniónico fuertemente básica, de acuerdo con el procedimiento de la invención.

50 Por lo tanto, en una realización particularmente preferida de la invención, la purificación de metilcobalamina comprende las siguientes etapas:

- tratar metilcobalamina, que comprende impurezas de cianuro de hierro, con el disolvente, calentar a una temperatura comprendida entre 30 °C y 60 °C, y filtrar para eliminar las sales de cianuro de hierro insolubles;
 - poner en contacto la solución obtenida en la etapa anterior, que comprende metilcobalamina y aniones cianuro
55 de hierro, con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica; y
 - aislar metilcobalamina por cristalización o precipitación de la solución,
- en donde las condiciones preferidas para cada una de estas etapas son las divulgadas anteriormente.

La metilcobalamina obtenida tras realizar el procedimiento de la invención tiene un contenido en hierro reducido, concretamente, la cantidad de hierro es menos de 130 ppm, preferentemente menos de 90 ppm, aún más preferentemente menos de 80 ppm, y aún más preferentemente menos de 70 ppm de hierro.
60

La determinación de la cantidad de hierro se puede realizar, por ejemplo, mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP/OES).

65

Por lo tanto, es evidente que el método de la invención, que implica el uso de una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, permite la eliminación eficiente de los aniones cianuro de hierro residuales de la metilcobalamina.

Después, otro aspecto de la presente invención es el uso de una resina de intercambio aniónico fuertemente básica para eliminar los aniones cianuro de hierro de la metilcobalamina.

Metilcobalamina

La metilcobalamina que contiene impurezas de cianuro de hierro, que es susceptible de ser purificada con el procedimiento de la invención, es normalmente el resultado de una reacción de metilación reductora de cianocobalamina, realizada en presencia de sales de hierro (II) y, opcionalmente, sales de hierro (III) como secuestrantes de cianuro.

La metilación reductora de la cianocobalamina se lleva a cabo normalmente mediante el tratamiento de la cianocobalamina con un agente reductor y un agente de metilación.

El producto de partida, la cianocobalamina (número CAS 68-19-9) está comercializada por varias fuentes.

El agente reductor puede ser cualquier agente capaz de reducir el cobalto de las cianocobalaminas de Co(III) a Co(I). Los agentes reductores adecuados son, por ejemplo, borohidruros de metales alcalinos. Un agente reductor preferido es borohidruro sódico.

La cantidad de agente reductor no está particularmente limitada, pero generalmente está comprendida entre 5 y 30 equivalentes, preferentemente entre 10 y 20 equivalentes a cianocobalamina.

Se puede emplear cualquier agente de metilación adecuado, por ejemplo, bromuro de trimetilsulfonio, cloruro de trimetilsulfonio, metilsulfato de trimetilsulfonio, cloruro de trimetilsulfoxonio, yoduro de trimetilsulfoxonio, bromuro de trimetilsulfoxonio, carbonato de dimetilo, sulfato de dimetilo, cloruro de tetrametilamonio o yoduro de metilo. Preferentemente, el agente de metilación se selecciona del grupo que consiste en bromuro de trimetilsulfonio, cloruro de trimetilsulfonio, cloruro de trimetilsulfoxonio, yoduro de trimetilsulfoxonio, bromuro de trimetilsulfoxonio y carbonato de dimetilo.

La cantidad de agente de metilación empleado está generalmente comprendida entre 1 y 10 equivalentes, preferentemente entre 2 y 5 equivalentes a cianocobalamina.

La reacción de metilación reductora se realiza en medio acuoso, opcionalmente en combinación con un codisolvente orgánico miscible con agua. Los codisolventes adecuados son, por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, o *tert*-butanol; cetonas tales como acetona o 2-butanona; éteres, tales como 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, dimetoxietano o diglima; amidas tales como dimetilformamida o dimetilacetamida; y mezclas de los mismos. Como codisolventes, preferentemente se usan alcoholes o cetonas.

La reacción se lleva a cabo preferentemente a pH ligeramente básico, p. ej., 7,5-8,5, y a una temperatura en el intervalo de 5-60 °C, preferentemente en el intervalo de 20-40 °C.

Se agrega una sal de hierro (II) a la reacción como secuestrante de cianuro, por ejemplo, sulfato de hierro (II), cloruro de hierro (II) o sulfato de amonio y hierro (II) (sal de Mohr). Los iones cianuro liberados en la reacción de reducción forman complejos con el catión de hierro (II) para formar complejos aniónicos de cianuro de hierro (II), por ejemplo, el complejo de ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, evitando así que interfieran en el procedimiento de metilación.

La sal de hierro (II) se emplea en una cantidad generalmente comprendida entre 0,5 y 1,5 equivalentes a cianocobalamina, y preferentemente se emplea aproximadamente 1 equivalente de sal de hierro (II) a cianocobalamina.

Preferentemente, también se añade una sal de hierro (III), normalmente para formar sales insolubles con el anión ferrocianuro, permitiendo así su fácil eliminación por filtración.

La reacción generalmente se realiza disolviendo cianocobalamina, una sal de hierro (II), y opcionalmente una sal de hierro (III), y añadiendo, secuencialmente o simultáneamente, el agente reductor y el agente de metilación.

Se sabe que las soluciones de cianocobalamina y metilcobalamina son susceptibles de fotooxidación, por lo tanto, el procedimiento de metilación reductora se realiza preferentemente en atmósfera inerte, por ejemplo, bajo el flujo de un gas inerte como el nitrógeno, y en ausencia de luz, bajo iluminación de luz roja.

Después de la reacción de metilación reductora, la metilcobalamina generalmente se precipita de la mezcla de reacción, enfriando los medios de reacción, normalmente también se añade más disolvente orgánico y se filtra la

metilcobalamina bruta.

La metilcobalamina bruta así obtenida, contiene sales que contienen aniones cianuro de hierro, y luego se pueden purificar usando el procedimiento de la presente invención, por lo que se convierte en una solución, tratándolo con un disolvente adecuado, como se ha divulgado anteriormente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimiento de purificación de acuerdo con la invención

a) *Metilación reductora de cianocobalamina*

15

A una mezcla agitada de 20 kg de cianocobalamina, 0,68 kg de sulfato de hierro (II) heptahidrato y 1,77 kg de solución acuosa al 30 % de cloruro de hierro (III) en 10 l de metiletilcetona y 260 l de agua desionizada, a 30-40 °C, en atmósfera inerte y luz roja, se añadieron simultáneamente durante un periodo de 3 h una solución de 8 kg de borohidruro de sodio y 0,16 kg de solución acuosa de hidróxido de sodio en 40 l de agua desionizada, y 14 l de metiletilcetona.

20

Después de agitar 30 min a la misma temperatura, se añadió una solución de 7,5 kg de bromuro de trimetilsulfoxonio en 40 l de agua desionizada durante un periodo de 1 h. Después de agitar durante 3 h a la misma temperatura, la mezcla se enfrió a 10 °C y se añadieron 15 l de metiletilcetona, la mezcla de reacción se agitó durante 12 h a la misma temperatura. El producto precipitado se filtró y se lavó con 100 l de metiletilcetona y 100 l de acetona.

25 b) *Purificación de metilcobalamina*

La metilcobalamina bruta obtenida de acuerdo con el procedimiento a) se trató con 300 l de solución acuosa de acetona al 50 %, se calentó a 45 °C durante 30 min y se filtró. A continuación, la solución se pasó a través de 10 kg de resina Amberlite® IRA 958 CI en un sistema de reflujo durante un periodo de 4 h. A continuación, la columna se lavó a contracorriente con 100 l de solución acuosa de acetona al 50 %. La solución recogida se ajustó a pH 6,5 con ácido clorhídrico diluido. A continuación, se agregaron gota a gota 950 l de acetona y se agitó durante 12 h. El producto cristalizado se filtró y se secó para dar 18,0 kg (rendimiento 83,5 %, HPLC = 87,9 %).

30

El contenido de impurezas de hierro en la metilcobalamina fue de menos de 30 ppm, determinado por espectrometría de emisión óptica/plasma acoplado inductivamente (ICP/OES). (Lote A)

35

Se prepararon un segundo lote (lote B) y un tercer lote (lote C) de metilcobalamina de acuerdo con los mismos procedimientos a) y b) divulgados anteriormente. Se obtuvo metilcobalamina con un rendimiento de 84,4 % y 87,9 %, respectivamente, y el contenido de hierro fue de 71 ppm y menos de 30 ppm, respectivamente.

40

Ejemplo 2: Ejemplo comparativo

A una mezcla agitada de 20 kg de cianocobalamina, 0,68 kg de sulfato de hierro (II) heptahidrato y 1,77 kg de solución acuosa al 30 % de cloruro de hierro (III) en 10 l de metiletilcetona y 260 l de agua desionizada, a 30-40 °C, en atmósfera inerte y luz roja, se añadieron simultáneamente durante un periodo de 3 h una solución de 8 kg de borohidruro de sodio y 0,16 kg de solución acuosa de hidróxido de sodio en 40 l de agua desionizada, y 14 l de metiletilcetona. Después de agitar 30 min a la misma temperatura, se añadió una solución de 7,5 kg de bromuro de trimetilsulfoxonio en 40 l de agua desionizada durante un periodo de 1 h. Después de agitar durante 3 h a la misma temperatura, la mezcla se enfrió a 10 °C y se añadieron 15 l de metiletilcetona, la mezcla de reacción se agitó durante 12 h a la misma temperatura. El producto precipitado se filtró y se lavó con 100 l de metiletilcetona y 100 l de acetona. El sólido se trató con 260 l de solución acuosa de acetona al 50 %, se calentó a 45 °C durante 30 min y se filtró. La solución se enfrió a 20 °C y el pH se ajustó a 6,5 con ácido clorhídrico diluido. Se añadieron gota a gota 950 l de acetona y se agitó durante 12 h. El producto cristalizado se filtró y se secó para dar 17,8 kg (rendimiento 84,3 %, HPLC = 98,9 %).

45

50

El contenido de impurezas de hierro en la metilcobalamina fue de 494 ppm, determinado por espectrometría de emisión óptica/plasma acoplado inductivamente (ICP/OES). (Lote 1)

55

Se preparó un segundo lote (lote 2) de metilcobalamina de acuerdo con el mismo procedimiento divulgado anteriormente. Se obtuvo metilcobalamina con un rendimiento del 86,7 % y el contenido de hierro fue de 1594 ppm.

60

Ejemplo 3: Comparación del contenido de hierro

La siguiente tabla muestra la comparación del contenido de hierro de la metilcobalamina obtenida usando el método de la presente invención para purificar la metilcobalamina obtenida después de la metilación reductora en presencia de hierro (II) (Ejemplo 1, lotes A, B y C), y el contenido de hierro de la metilcobalamina preparada por un método

65

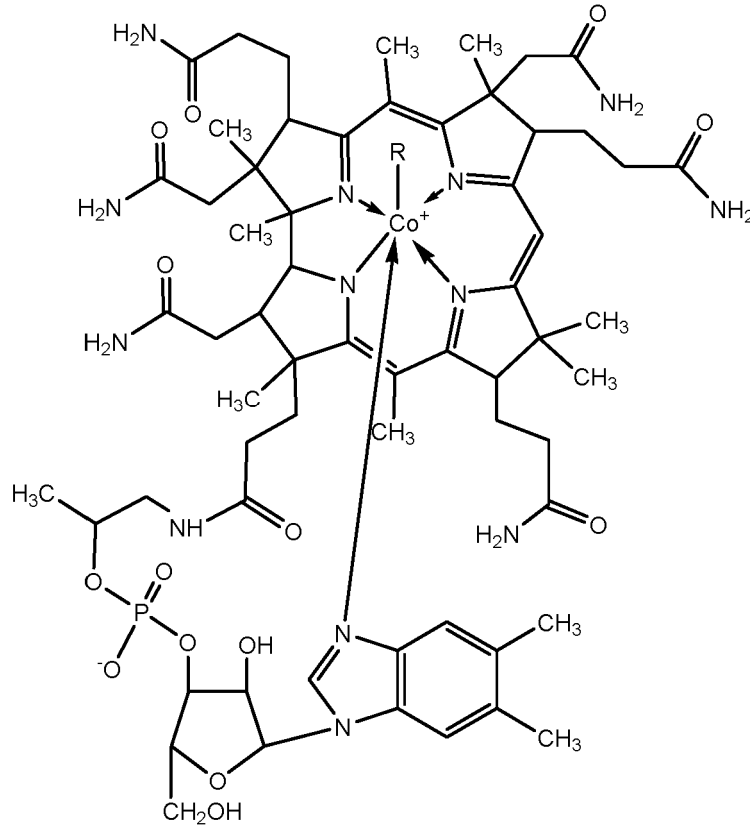
ES 2 952 837 T3

análogo, pero sin el método de purificación de la presente invención (Ejemplo comparativo, lotes 1 y 2):

<i>Ejemplo</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Fe (ppm)</i>
Ejemplo 1 (lote A)	83,5	< 30
Ejemplo 1 (lote B)	84,4	71
Ejemplo 1 (lote C)	87,9	< 30
Ejemplo comparativo (lote 1)	84,3	494
Ejemplo comparativo (lote 2)	86,7	1594

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de metilcobalamina (I)



5

a partir de mezclas con aniones cianuro de hierro, que son complejos aniónicos de hierro (II) o hierro (III) con cianuro, caracterizado por que comprende poner en contacto una solución que comprende metilcobalamina y aniones cianuro de hierro con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, caracterizado por que la metilcobalamina que se purifica se obtiene por metilación reductora de cianocobalamina en presencia de sales de hierro (II) y opcionalmente sales de hierro (III) como secuestrantes de cianuro.

10

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la resina de intercambio aniónico fuertemente básica tiene grupos funcionales trialkilamonio e intercambia aniones cloruro.

15

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la resina se selecciona de una resina de poliestireno-divinilbenceno reticulada y una resina de acrílico-divinilbenceno reticulada.

4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la resina es una resina de acrílico-divinilbenceno reticulada que tiene una estructura macrorreticular.

20

5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el procedimiento de contacto de la solución que comprende metilcobalamina y aniones cianuro de hierro con la resina de intercambio aniónico fuertemente básica se realiza pasando la solución a través de una cantidad efectiva de la resina durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 6 horas.

25

6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la relación en peso resina: metilcobalamina está comprendida entre 0,1:1 y 2:1.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que la relación en peso resina: metilcobalamina es de aproximadamente 0,5:1.

30

8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el disolvente utilizado en la solución se selecciona de agua y una mezcla de agua con un codisolvente orgánico miscible en agua.

35

ES 2 952 837 T3

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el disolvente es una mezcla de agua y un codisolvente orgánico miscible en agua.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que el disolvente es una mezcla de agua y acetona.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, caracterizado por que la proporción volumétrica agua: codisolvente orgánico está comprendida entre 1,8:1 y 1:1,5.
- 10 12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que la metilcobalamina se cristaliza a partir de la solución recogida tras el tratamiento con la resina.
13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que la solución que se somete al procedimiento de purificación se prepara tratando metilcobalamina que comprende impurezas de cianuro de hierro con el disolvente, calentando a una temperatura comprendida entre 30 °C y 60 °C, y filtrando para eliminar las impurezas insolubles.
- 15 14. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que la metilcobalamina obtenida tiene un contenido en hierro de menos de 130 ppm.