



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 242**

51 Int. Cl.:
A61K 31/714 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04731472 .9**
96 Fecha de presentación : **06.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1621202**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54 Título: **Preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina y procedimiento de producción de esta preparación.**

30 Prioridad: **07.05.2003 JP 2003-129251**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

73 Titular/es: **EISAI R&D MANAGEMENT Co., Ltd.**
6-10, Koishikawa 4-chome
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es: **Kato, Akira y**
Nomura, Teruko

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 356 242 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

Preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina y procedimiento de producción de esta preparación.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación liofilizada para inyección, a alta concentración, conteniendo metilcobalamina como fármaco terapéutico para la esclerosis lateral amiotrófica, y a un proceso para producir la preparación liofilizada.

10 **Antecedentes de la técnica**

La esclerosis lateral amiotrófica, conocida también como ELA, es una enfermedad caracterizada por lesiones del tronco cerebral, médula espinal y neuronas motoras, que origina un síndrome bulbar progresivo y trastornos de las neuronas motoras superiores e inferiores, y es una enfermedad incurable en la que la degeneración y eliminación de las células nerviosas motoras de la médula espinal y cerebro conduce clínicamente a amiotrofia sistémica y espasticidad, de ese modo produciendo generalmente la muerte debido a la parálisis de los músculos respiratorios en 2 a 3 años.

Son desconocidas las causas de la esclerosis lateral amiotrófica, y actualmente no solamente no existen terapias fundamentales sino tampoco ninguna terapia eficaz para detener o retrasar el progreso de la enfermedad.

En estos últimos años, ha sido observado por el profesor Kaji que, cuando se administran grandes cantidades de metilcobalamina (por ejemplo, 15 a 50 mg de metilcobalamina una vez al día, vía inyección intramuscular), que es eficaz para tratar los trastornos de los nervios periféricos en humanos, a pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, exhiben una mejora, dependiente de la dosis, en la fuerza muscular subjetiva y un aumento significativo en un marcador objetivo, la magnitud del potencial de acción muscular compuesto. Con el descubrimiento de que se obtienen efectos terapéuticos drásticos que no han sido logrados con terapias convencionales, se propuso una inyección acuosa para preparaciones de metilcobalamina a dosis altas como fármaco terapéutico para la esclerosis lateral amiotrófica, las cuales contienen metilcobalamina como principio activo (ver, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Abierta N° H10-218775).

Indicar que la dosis de metilcobalamina para el tratamiento de los trastornos de los nervios periféricos en humanos es, en general, de 0'5 a 1'5 mg/día.

Sin embargo, se ha señalado que, debido a que esta inyección acuosa es una solución de 15 a 50 ml por ampolla de metilcobalamina disuelta en etanol, salino, o tampón, existen los problemas de que es difícil asegurar la fotoestabilidad y la estabilidad de almacenamiento, y difícil garantizar la esterilidad.

Por otra parte, la metilcobalamina es una vitamina, y la mayor parte de las investigaciones en preparaciones liofilizadas para inyección conteniendo metilcobalamina como principio activo ha implicado preparaciones para inyección de multivitaminas conteniendo una diversidad de vitaminas esenciales. En el caso de estas preparaciones de multivitaminas, los problemas incluyen el asegurar la estabilidad durante el almacenamiento cuando la preparación está liofilizada, y mejorar el estado disuelto después de que el fármaco sea redissuelto (ver, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Japonesa N°s S62-38, S63-3137 y H1-132514).

45 **Revelación de la invención**

Problemas para resolver en la invención

En vista de lo anterior, es el primer objeto de la presente invención proporcionar una preparación liofilizada comprendiendo un alto contenido de metilcobalamina, la cual tenga una excelente estabilidad con el tiempo y pueda ser utilizada en terapia de metilcobalamina a alta concentración.

Por otra parte, es el segundo objeto de la presente invención proporcionar un proceso para producir una preparación liofilizada comprendiendo metilcobalamina, en donde la metilcobalamina sea estable en un sólido liofilizado.

Medios para resolver los problemas

Los inventores han llevado a cabo intensamente la investigación pretendida, al lograr los objetos mencionados. Por consiguiente, han descubierto que la metilcobalamina es más estable en un sólido liofilizado amorfo que en un sólido liofilizado cristalino, logrando de ese modo la presente invención.

Esto es, en el primer aspecto de la presente invención se logra el primer propósito mediante una preparación liofilizada comprendiendo metilcobalamina, o una sal farmacológicamente admisible de la misma, y un excipiente, en donde al menos una o más de las especies de excipiente está en estado amorfo.

En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, la metilcobalamina, o la sal farmacológicamente admisible de la misma, está también en estado amorfo.

ES 2 356 242 T3

En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, el excipiente que está en estado amorfo comprende azúcar.

5 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, la preparación liofilizada comprende además un ajustador de pH.

En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, la preparación liofilizada comprende además un antioxidante.

10 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, cuando el excipiente comprende azúcar, el excipiente en estado amorfo está contenido en una cantidad de al menos el 20% en peso, basado en el peso total de excipiente.

15 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, el azúcar consta de sacarosa o lactosa.

Además, en el segundo aspecto de la presente invención, el primer objeto está también logrado mediante una preparación liofilizada comprendiendo metilcobalamina, o una sal farmacológicamente admisible de la misma, y un excipiente, la cual es obtenida mediante un proceso de producción que consta de las etapas de: (a) disolver la metilcobalamina o la sal farmacológicamente admisible de la misma y un excipiente en un disolvente; y (b) liofilizar la solución para producir un estado amorfo de al menos una o más especies de excipiente.

20 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, la liofilización en la etapa (b) se lleva a cabo a fin de producir además un estado amorfo de la metilcobalamina o la sal farmacológicamente admisible de la misma.

30 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, la pre congelación en la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura a la que el excipiente no cristalice, o por debajo de la temperatura. En concreto, durante el proceso de liofilización es preferible la pre congelación a una temperatura o por debajo del punto eutéctico del excipiente.

En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, el excipiente que está en estado amorfo comprende azúcar.

35 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, en la etapa (a) también se disuelve un ajustador de pH.

40 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, en la etapa (a) también se disuelve un antioxidante.

En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, cuando el excipiente comprende azúcar, el excipiente en estado amorfo está contenido en una cantidad de al menos el 20% en peso, basado en el peso total de excipiente.

45 En un aspecto preferido de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, el azúcar consta de sacarosa o lactosa.

50 Además, en el tercer aspecto de la presente invención, el segundo objeto se logra mediante un proceso para producir una preparación liofilizada constando de metilcobalamina, la cual comprende las etapas de: (1) disolver la metilcobalamina, o una sal farmacéuticamente admisible de la misma, y un excipiente en un disolvente; y (2) liofilizar la solución a fin de producir al menos un estado amorfo de al menos una o más especies de excipiente.

55 En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, la liofilización se lleva a cabo con el fin de producir además un estado amorfo de la metilcobalamina o la sal farmacéuticamente admisible de la misma en la etapa (2).

60 En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, en la etapa (2) se realiza una pre congelación a una temperatura a la que el excipiente no cristalice, o por debajo de la temperatura. En concreto, es preferible una pre congelación durante el proceso de liofilización a una temperatura o por debajo del punto eutéctico del excipiente.

En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, el excipiente que está en estado amorfo consta de un azúcar.

65 En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, la preparación liofilizada comprende además un ajustador de pH.

En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, la preparación liofilizada comprende además un antioxidante.

5 En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, cuando el excipiente consta de azúcar, el excipiente en estado amorfo está contenido en una cantidad de al menos el 20% en peso, basado en el peso total de azúcar.

En un aspecto preferido del proceso de producción conforme a la presente invención, el azúcar consta de sacarosa o lactosa.

10

Efectos ventajosos de la invención

Conforme a la presente invención, es posible proporcionar una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina que sea sumamente estable con el tiempo. Por otra parte, según el proceso de producción conforme a la presente invención, es posible proporcionar un proceso de producción para la preparación liofilizada comprendiendo metilcobalamina, que permita que la metilcobalamina sea estable en un sólido liofilizado.

15

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra las proporciones de mezcla de sacarosa y manitol utilizadas para producir una preparación liofilizada de metilcobalamina conforme a una forma de realización de la presente invención.

La Figura 2 muestra las proporciones de mezcla de sacarosa y manitol utilizadas para producir una preparación liofilizada de metilcobalamina conforme a una forma de realización de la presente invención.

25

La Figura 3 muestra las proporciones de mezcla de lactosa y manitol utilizadas para producir una preparación liofilizada de metilcobalamina conforme a una forma de realización de la presente invención.

La Figura 4 muestra las proporciones de mezcla de lactosa y manitol utilizadas para producir una preparación liofilizada de metilcobalamina conforme a una forma de realización de la presente invención.

30

La Figura 5 muestra los resultados de proporciones residuales de metilcobalamina frente a las proporciones de mezcla de sacarosa y manitol como excipientes, en preparaciones liofilizadas conforme a la presente invención. En ambas Figura 5 y Figuras 6 a 8 posteriormente, 1M indica un periodo de almacenamiento de 1 mes.

35

La Figura 6 muestra los resultados de proporciones residuales de metilcobalamina frente a las proporciones de mezcla de sacarosa y manitol como excipientes, en preparaciones liofilizadas conforme a la presente invención.

La Figura 7 muestra los resultados de proporciones residuales de metilcobalamina frente a las proporciones de mezcla de lactosa y manitol como excipientes, en preparaciones liofilizadas conforme a la presente invención.

40

La Figura 8 muestra los resultados de proporciones residuales de metilcobalamina frente a las proporciones de mezcla de lactosa y manitol como excipientes, en preparaciones liofilizadas conforme a la presente invención.

La Figura 9 muestra los resultados de estabilidad de almacenamiento a 40°C de preparaciones liofilizadas, conforme a la presente invención, en los Ejemplos 1 a 5 y Ejemplo Comparativo 1.

45

La Figura 10 muestra los resultados de estabilidad de almacenamiento a 40°C de preparaciones liofilizadas, conforme a la presente invención, en los Ejemplos 6 a 10 y Ejemplo Comparativo 2.

50

La Figura 11 muestra los resultados de estabilidad de almacenamiento a 40°C de preparaciones liofilizadas, conforme a la presente invención, en los Ejemplos 11 y 12 y Ejemplo Comparativo 3.

La Figura 12 muestra los resultados de estabilidad de almacenamiento a 40°C de preparaciones liofilizadas, conforme a la presente invención, en los Ejemplos 13 y 14 y Ejemplo Comparativo 4.

55

La Figura 13 muestra los modelos de difracción de rayos X de preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina, fabricadas conforme a la presente invención. En la Figura 13, se muestran los modelos de difracción de rayos X cuando el excipiente es (a) sólo sacarosa (Ejemplo 1), (b) una mezcla sacarosa/manitol siendo 1/1 (Ejemplo 3), (c) una mezcla sacarosa/manitol siendo 2/3, (d) una mezcla sacarosa/manitol siendo 1/4 (Ejemplo 5), y (e) solo manitol.

60

La Figura 14 muestra una composición utilizada para investigar el efecto del anillamiento durante la etapa de liofilización para una preparación liofilizada utilizando manitol.

La Figura 15 muestra los resultados del efecto, en la estabilidad de la metilcobalamina, de la presencia o ausencia de anillamiento durante el proceso de liofilización para una preparación liofilizada utilizando manitol. En esta Figura 3, 3M indica 3 meses, y los números indican porcentajes de área de metilcobalamina e hidroxicobalamina.

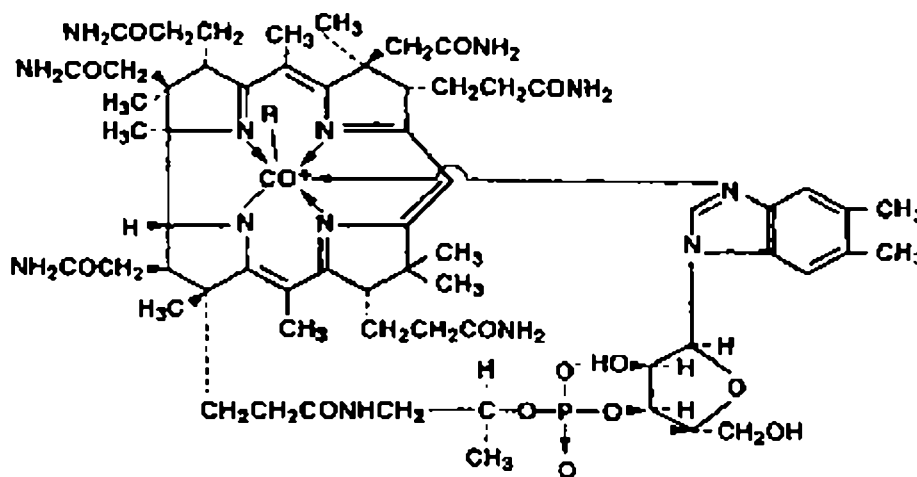
65

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina, la cual puede ser utilizada en terapia de metilcobalamina a alta concentración. A continuación, se explica detalladamente la presente invención.

La metilcobalamina utilizada en la presente invención es tipo vitamina B₁₂ coenzimática, la cual está presente en la sangre y el fluido cerebrospinal. Es más móvil en el tejido nervioso que otros homólogos de la B₁₂. La metilcobalamina ha sido utilizada en la prevención y tratamiento de trastornos neuronales diabéticos, neuritis múltiple y otros trastornos de los nervios periféricos, especialmente para el entumecimiento, dolor y parálisis, así como para la anemia megaloblástica debida a la deficiencia de vitamina B₁₂.

La metilcobalamina es un análogo de la vitamina B₁₂, y es un compuesto en el que el grupo ciano unido al cobalto de la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) ha sido reemplazado con un grupo metilo. Es un polvo rojo con un peso molecular de 1.344'4 y fórmula química C₆₃H₉₁CoN₁₃O₁₄P (ver Fórmula I a continuación)



R = CN: CIANOCOBALAMINA (II)

R = CH₃: METILCOBALAMINA (I)

La metilcobalamina utilizada en la presente invención puede ser producida, por ejemplo, mediante el método descrito en la Publicación de Patente S45-38059, vía una reacción de reducción a partir de cianocobalamina (Fórmula II anterior), seguido por metilación. También se puede utilizar metilcobalamina pura de calidad farmacológica, disponible comercialmente. Esta es vendida, por ejemplo, por Sigma Co., Eisai Co. Ltd. y otros. Por otra parte, en la presente invención también se puede utilizar una sal farmacéuticamente admisible de metilcobalamina. Además, la metilcobalamina también puede ser una forma ópticamente activa o racemato.

Los ejemplos de sal farmacéuticamente admisible de metilcobalamina incluyen comúnmente sales con ácidos tales como sales inorgánicas de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y otros, y sales con ácidos orgánicos tales como ácido trifluoroacético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido toluensulfónico, ácido metanosulfónico y otros.

La preparación liofilizada conforme a la presente invención tiene un alto contenido de metilcobalamina o de una sal farmacéuticamente admisible de la misma como principio activo. El término "alto contenido" utilizado en la presente invención significa, en general, un contenido de 5 a 200 mg, preferiblemente de 10 a 100 mg, más preferiblemente de 25 a 50 mg, por vial, o significa que la concentración, cuando se reconstituye al usar, es generalmente de 5 a 50 mg/ml, preferiblemente de 5 a 25 mg/ml, más preferiblemente de 10 a 15 mg/ml por vial.

La preparación liofilizada conforme a la presente invención consta, al menos, de metilcobalamina y un excipiente, y la proporción de mezcla de los mismos es de 0 a 50 partes, preferiblemente de 2'5 a 25 partes, más preferiblemente de 5 a 10 partes en peso del excipiente, basado en 1 parte en peso de metilcobalamina.

El excipiente utilizado en la presente invención se selecciona de azúcares. Como se describe a continuación, el excipiente puede contener al menos uno o más tipos de azúcar, que producen un estado amorfo cuando se liofilizan. Los ejemplos de azúcar que producen un estado amorfo cuando se liofilizan incluyen monosacáridos tales como glucosa, fructosa y otros, y disacáridos tales como maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa y otros. La lactosa y la sacarosa son particularmente convenientes como excipientes, los cuales producen un estado amorfo cuando se liofilizan.

ES 2 356 242 T3

Cuando el excipiente utilizado en la presente invención está compuesto de un azúcar, es conveniente desde el punto de vista de la estabilidad de almacenamiento de la preparación liofilizada producida mediante el proceso de producción descrito a continuación, que el excipiente en estado amorfo esté contenido en una cantidad de al menos el 20%, preferiblemente el 40%, más preferiblemente el 50% en peso basado en el peso total del azúcar.

La preparación liofilizada conforme a la presente invención también puede contener un ajustador de pH. El ajustador de pH utilizado puede ser cualquiera que se utilice normalmente en las preparaciones de fármacos. Los ejemplos de ajustadores de pH incluyen ácidos inorgánicos, bases inorgánicas, bases orgánicas y tampones. Los ejemplos específicos incluyen el ácido clorhídrico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido cítrico, citrato sódico, bicitrato sódico, ácido fosfórico, bifosfato sódico, fosfato disódico, hidróxido sódico, ácido láctico, lactato sódico, ácido acético, acetato sódico, o meglumina.

Además, la preparación liofilizada conforme a la presente invención también puede comprender un antioxidante. El antioxidante puede ser cualquiera que se utilice normalmente en las preparaciones de fármacos, y los ejemplos específicos incluyen el nitrito sódico, ácido ascórbico, ácido cítrico, tocoferol, acetato de tocoferol, dibutilhidroxitolueno, vitamina E natural, bisulfito sódico, alfa-tioglicerina, clorhidrato de cisteína o tioglicolato sódico.

También se pueden añadir diversos aditivos para incrementar la solubilidad de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, o ajustar su presión osmótica como una inyección. No existen limitaciones concretas a estos aditivos, siempre que estén en las cantidades añadidas de sustancias generalmente utilizadas como aditivos en las preparaciones, y por ejemplo se pueden añadir, si fuese necesario, los aditivos siguientes.

Polietilenglicol y glicerina son ejemplos de solubilizantes para aumentar la solubilidad de la preparación liofilizada conforme a la presente invención, o incrementar la velocidad de disolución, mientras que los ejemplos de surfactantes incluyen el polisorbato, polioxietileno-polioxipropilenglicol, aceite de ricino hidrogenado de polietileno, sesquioleato de sorbitán y otros. Los ajustadores de la presión osmótica, para la preparación liofilizada de la presente invención, incluyen la glucosa, el xilitol y el sorbitol.

Además, se pueden añadir, si fuese necesario, conservantes, estabilizantes y otros aditivos que se puedan utilizar en la preparación farmacéutica conforme a la presente invención. Ejemplos específicos incluyen el ácido benzoico o el ácido ascórbico, y se pueden añadir cantidades de aditivos que puedan ser utilizadas por una persona especializada en la técnica.

Después, se describe el proceso de producción de una preparación liofilizada conforme a la presente invención. Para la preparación liofilizada conforme a la presente invención, por ejemplo, se esteriliza una solución de metilcobalamina, un excipiente y un ajustador de pH, los cuales están disueltos en agua o en un disolvente acuoso apropiado (tal como una mezcla de agua y alcohol) mediante filtración o por medio de un filtro de membrana si se desea. Luego, la solución estéril es vertida en viales o bandejas y solidificada preferentemente mediante liofilización normal. Adoptando la esterilización por filtro es posible prevenir la producción de productos de descomposición que resultan de la esterilización por calor, y obtener una preparación con pocas impurezas.

Con la preparación liofilizada conforme a la presente invención, producida como se describió antes, es posible controlar la descomposición, la degeneración y otras de la metilcobalamina a largo plazo, y mantenerla estable.

Al preparar la solución, la metilcobalamina, el excipiente y el ajustador de pH pueden ser disueltos en agua o en un disolvente acuoso (tal como una mezcla de agua y alcohol) conforme a métodos conocidos. El orden de disolución no depende del tipo de componentes. La concentración de metilcobalamina en el líquido acuoso es, generalmente, de 0.5 mg/ml a 50 mg/ml, preferiblemente de 1 mg/ml a 10 mg/ml, más preferiblemente de 2.5 mg/ml a 7.5 mg/ml. La concentración de excipiente es, generalmente, de 0 mg/ml a 200 mg/ml, preferiblemente de 12.5 mg/ml a 100 mg/ml, más preferiblemente de 25 mg/ml a 50 mg/ml.

El pH del líquido acuoso es, generalmente, de 4 a 8, preferiblemente de 6 a 8, más preferiblemente de 6.5 a 7.5. El pH deseado puede ser logrado mediante la adición adecuada del ajustador de pH.

El líquido acuoso preparado de esta manera es, en primer lugar, precongelado preferiblemente en, o por debajo de, el punto eutéctico, mantenido después a vacío en una cámara de desecación a medida que se eleva gradualmente la temperatura desde la temperatura de bandeja hasta la temperatura de desecación primaria, y la desecación primaria es llevada a cabo a esta temperatura. Después de la desecación primaria, se aumenta la temperatura de bandeja hasta la temperatura de desecación secundaria, y la desecación secundaria es llevada a cabo a esa temperatura. Las desecaciones primaria y secundaria también se pueden realizar a la misma temperatura.

En un proceso específico para producir la preparación liofilizada, en primer lugar se esteriliza una solución conteniendo una concentración predeterminada de metilcobalamina y excipiente. Luego se vierten en viales cantidades predeterminadas de la solución, se congelan bajo condiciones de aproximadamente -60°C a -20°C, y se liofilizan mediante una desecación primaria a presión reducida, a aproximadamente -20° a 10°C, y una desecación secundaria a presión reducida, desde aproximadamente 15 hasta 40°C. Generalmente, se reemplaza con gas nitrógeno en los viales, los cuales son taponados para obtener la preparación liofilizada.

ES 2 356 242 T3

El punto eutéctico varía dependiendo de la proporción de mezcla de los componentes que constituyen el excipiente pero, cuando se incluyen azúcares generalmente, la pre congelación debería ser realizada bajo condiciones de temperatura de -40°C , o menos, cuando estén presentes ambos 1) sacarosa y/o lactosa y 2) manitol.

5 Cuando al menos el excipiente esté presente en estado amorfo en la preparación liofilizada conforme a la presente invención, obtenida de esta manera, se puede mantener establemente la metilcobalamina a largo plazo.

La preparación liofilizada conforme a la presente invención puede ser redisuelta con gran facilidad, añadiéndola a cualquier diluyente apropiado (líquido para redisolución) para reconstituir la solución antes de liofilizar. Los ejemplos
10 de tales diluyentes incluyen el agua destilada para inyección, salino y otras infusiones corrientes (tales como infusión de glucosa, de aminoácidos y otras).

Una solución reconstituida de la preparación liofilizada conforme a la presente invención puede ser administrada
15 parenteralmente como inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección por goteo u otra inyección o como gotas para los ojos. Este líquido disuelto en agua destilada inyectable o infusión es suficientemente estable. En este caso, la concentración de metilcobalamina en la solución es, en general, de aproximadamente 5 mg/ml hasta 50 mg/ml, preferiblemente desde 5 mg/ml hasta 25 mg/ml, más preferiblemente desde 10 mg/ml hasta 15 mg/ml. La concentración de excipiente es, generalmente, de 0 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 12.5 mg/ml a 75 mg/ml, más preferiblemente de 25 mg/ml a 50 mg/ml.
20

Descritas están las características de la preparación liofilizada conforme a la presente invención. El término “estabilidad” utilizado en la presente invención se refiere a estabilidad química y física. Disminuirá una proporción residual de metilcobalamina como principio activo, debido a la degradación con el tiempo cuando se almacene bajo condiciones de calor, y la apariencia de la preparación liofilizada como preparación se descolorará notablemente. No es deseable utilizar una preparación que exhiba una coloración y degradación acusadas debido a la alta probabilidad de
25 que sucedan turbidez y precipitación durante la disolución. En vista de esto, la proporción residual es generalmente el indicador para estabilidad.

En la presente invención, la proporción residual se define como sigue: La preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina es encerrada herméticamente en un vial, y almacenada bajo condiciones de temperatura elegidas a partir del intervalo de 5°C hasta 40°C . Después de almacenamiento durante un tiempo constante a una temperatura constante, se calcula la concentración de metilcobalamina, que es el principio activo, a partir del área del pico correspondiente a metilcobalamina en cromatografía líquida de alta resolución (de ahora en adelante “HPLC”). La proporción residual puede ser luego estimada utilizando la fórmula definida en el ejemplo dado a continuación, a partir del área del pico
35 HPLC para metilcobalamina en el inicio del almacenamiento, y del área del pico HPLC para metilcobalamina después de un periodo de almacenamiento predeterminado.

En la preparación liofilizada conforme a la presente invención, la proporción residual debería ser el 95%, o más, después de no menos de 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente. La proporción residual debería ser también el 95, o más, después de 6 meses de almacenamiento a 40°C .
40

La presente invención será explicada con más detalle, utilizando los ejemplos siguientes.

Ejemplos

45 Ejemplo de Producción 1

Como una forma de realización del proceso de producción para una preparación liofilizada conforme a la presente invención, se prepararon líquidos madre a partir de metilcobalamina junto con excipientes conteniendo una mezcla de sacarosa y manitol basada en las proporciones de mezcla descritas abajo, y después se liofilizaron mediante los métodos siguientes.
50

Se prepararon los líquidos madre, los cuales eran una mezcla de metilcobalamina (nombre comercial Methylcobal, Eisai, 0.5% p/v) y mezclas de excipientes (2.5% p/v), después se esterilizaron por filtración y envasaron en cantidades precisas en viales, bajo condiciones estériles, y se liofilizaron. Después de la liofilización, se taponaron completamente los viales para producir preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina conforme a la presente invención.
55

Específicamente, en vasos de precipitados de 100 ml se pusieron cantidades de sacarosa y manitol que se corresponden con las proporciones de mezcla mostradas en la Figura 1, y a ellos se añadió 80 ml de agua destilada para
60 inyección, seguido por agitación para disolver el excipiente mediante un agitador magnético. Después de que se confirmase que el excipiente se disolvió adecuadamente, a eso se añadió 500 mg de metilcobalamina, seguido por agitación. Después de que se confirmase que la metilcobalamina se disolvió adecuadamente, se añadió agua destilada en matraces aforados de 100 ml a fin de que el volumen de la solución fuese 100 ml.

Luego, se llenaron viales de 18 ml con 5 ml de cada una de las soluciones, y se ejecutó la liofilización mediante pre congelación a -55°C durante 3 horas, desecación primaria a -10°C durante 24 horas (0.1 mbar) y desecación secundaria a 25°C durante 36 horas (0.02 mbar), para obtener preparaciones liofilizadas conforme a la presente invención, como los Ejemplos 1 a 5 siguientes.
65

ES 2 356 242 T3

Indicar que se preparó una preparación liofilizada conteniendo solamente manitol como excipiente, mostrada en la Figura 1, mediante los mismos métodos que el Ejemplo Comparativo 1.

5 Ejemplo de Producción 2

Se mezcló 0'5% p/v de metilcobalamina (nombre comercial Methylcobal, Eisai K. K.) con 5'0% p/v de mezclas de excipientes para preparar líquidos madre que fueron después esterilizados por filtración, envasados en cantidades precisas en viales independientes, bajo condiciones estériles, y liofilizados después. Después de la liofilización, se taponaron completamente los viales para producir preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina conforme a la presente invención.

Específicamente, en vasos de precipitados de 100 ml se pusieron cantidades de sacarosa y manitol que se corresponden con las proporciones de mezcla mostradas en la Figura 2, y a ellos se añadió 80 ml de agua destilada para inyección, seguido por agitación para disolver el excipiente mediante un agitador magnético. Después de que se confirmase que el excipiente se disolvió adecuadamente, a eso se añadió 500 mg de metilcobalamina, seguido por agitación. Después de que se confirmase que la metilcobalamina se disolvió adecuadamente, se añadió agua destilada en matraces aforados de 100 ml a fin de que el volumen de la solución fuese 100 ml.

Luego, se llenaron viales de 18 ml con 5 ml de cada una de las soluciones, y se ejecutó la liofilización mediante pre congelación a -55°C durante 3 horas, desecación primaria a -10°C durante 24 horas (0'1 mbar) y desecación secundaria a 25°C durante 36 horas (0'02 mbar), para obtener preparaciones liofilizadas conforme a la presente invención, como los Ejemplos 6 a 10 siguientes.

Se preparó una preparación liofilizada conteniendo solamente manitol como excipiente, mostrada en la Figura 2, mediante los mismos métodos que el Ejemplo Comparativo 2.

30 Ejemplo de Producción 3

Después, se prepararon líquidos madre utilizando metilcobalamina junto con mezclas de lactosa y manitol como excipientes, basadas en las proporciones de mezcla mostradas en la Figura 3, conforme a los métodos descritos en el Ejemplo de Producción 1 (utilizando lactosa y manitol en lugar de sacarosa y manitol), y se produjeron preparaciones liofilizadas bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo de Producción 1 (Ejemplos 11 y 12).

Se preparó una preparación liofilizada conteniendo solamente manitol como excipiente, mostrada en la Figura 3, mediante los mismos métodos que el Ejemplo Comparativo 3.

40 Ejemplo de Producción 4

Después, se prepararon líquidos madre mediante el empleo de metilcobalamina junto con mezclas de lactosa y manitol como excipientes, basadas en las proporciones de mezcla mostradas en la Figura 4, conforme a los métodos descritos en el Ejemplo de Producción 1 (utilizando lactosa y manitol en lugar de sacarosa y manitol), y se produjeron preparaciones liofilizadas bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo de Producción 1 (Ejemplos 13 y 14).

Se preparó una preparación liofilizada conteniendo solamente manitol como excipiente, mostrada en la Figura 4, mediante los mismos métodos que el Ejemplo Comparativo 4.

50 Ejemplo de Producción 5

Se pesó 12'5 mg de sacarosa en un vaso de precipitados de 100 ml, y se disolvieron en 80 ml de tampón de ácido fosfórico 0'1 mM, pH 7'0, preparado anteriormente. Después de que se confirmó que la sacarosa se disolvió adecuadamente, se añadió 0'5 g de metilcobalamina a la solución tampón. Después de que se confirmase su disolución, se preparó la solución tampón hasta 100 ml con agua destilada en un matraz aforado de 100 ml. Se llenaron viales de 15 ml con 5 ml cada uno de la solución preparada de esta forma, la cual fue luego liofilizada bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo de Producción 1, para obtener una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina (Ejemplo 15).

60 Ejemplo de Producción 6

Se pesó 25 g de lactosa en un vaso de precipitados de 1.000 ml, y se disolvieron en 800 ml de agua para inyección. Luego se añadió 0'69 g de bifosfato sódico monohidrato a eso, y se agitó a fondo. Después de que se confirmó que la lactosa y el bifosfato sódico se disolvieron adecuadamente, se añadió 5 g de metilcobalamina a eso, y la metilcobalamina restante en el recipiente pesado fue lavada con agua para inyección de metilcobalamina. Después de que se confirmó su disolución, se ajustó el pH a 7'0 mediante la adición de una cantidad apropiada de solución de hidróxido sódico acuoso 0'1M preparada anteriormente. La solución fue ajustada hasta 1.000 ml con agua destilada,

ES 2 356 242 T3

en una probeta graduada de 1.000 ml. Se llenaron viales de 15 ml con 5 ml cada uno de la solución preparada de esta forma, la cual fue luego liofilizada bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo de Producción 1, para obtener una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina (Ejemplo 16).

5 Ejemplo de Producción 7

Se pesó 12.5 g de lactosa en un vaso de precipitados de 100 ml, y se añadieron 1 g de ácido cítrico monohidrato y 80 ml de agua para inyección y se agitó. Después de que se confirmó que la lactosa y el ácido cítrico estaban disueltos, a eso se añadió 0.5 g de metilcobalamina. Después de que se confirmó su disolución, se ajustó el pH a 7.0 mediante la adición de una cantidad apropiada de solución de hidróxido sódico acuoso 0.1M preparada anteriormente, y la solución fue ajustada hasta 100 ml con agua destilada, en un matraz aforado de 100 ml. Se llenaron viales de 15 ml con 5 ml cada uno de la solución preparada de esta forma, la cual fue luego liofilizada bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo de Producción 1, para obtener una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina (Ejemplo 17).

15 Ejemplo de Producción 8

Se pesaron 12.5 g de cada una de sacarosa y lactosa en vasos de precipitados de 100 ml independientes, y se disolvieron en 80 ml de tampón de ácido fosfórico 0.1mM, pH 7.0, preparado anteriormente. Después de la confirmación de su disolución, a cada solución se añadió 0.5 g de metilcobalamina y se disolvió mediante agitación. Después de la confirmación de su disolución, se ajustaron las soluciones hasta 100 ml con agua destilada, en matraces aforados de 100 ml. Se llenaron viales de 15 ml con 5 ml cada uno de las soluciones preparadas de esta forma, las cuales fueron luego liofilizadas bajo las condiciones de producción de 3 horas de pre congelación a -55°C, 24 horas de desecación primaria a -10°C (0.1 mbar), y 36 horas de desecación secundaria a 25°C (0.002 mbar), para obtener preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina (Ejemplos 18 y 19).

30 *Evaluación de la Estabilidad de Almacenamiento*

Se evaluó la estabilidad de almacenamiento como sigue, basada en la proporción residual de metilcobalamina.

Esto es, las preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina, que habían sido preparadas bajo condiciones estériles conforme a los ejemplos de producción, fueron almacenadas durante 1 mes en una cámara termostática a 5°C, 25°C y 40°C. Las preparaciones liofilizadas fueron disueltas en una fase móvil durante la medición por HPLC, y se prepararon soluciones de muestra utilizando matraces aforados de 25 ml. Utilizando estas muestras, se midió el contenido de metilcobalamina (la proporción residual) mediante los siguientes métodos de ensayo, para evaluar la estabilidad de almacenamiento de la metilcobalamina.

Se midió el contenido de metilcobalamina mediante análisis HPLC, bajo las condiciones siguientes.

Condiciones HPLC

45 Columna: Hidrosphere C18, S-5 μ m, 250x4.6 mm I.D. Fase móvil: acetonitrilo/tampón de ácido fosfórico de 0.02 mol/l (pH 3.5)/1-hexasulfonato sódico (2/8/3.8, v/v/p).

Condiciones del análisis HPLC

- 50 1) temperatura de la columna: 40°C;
- 2) temperatura de las muestras: 8°C;
- 55 3) velocidad de flujo: 1 ml/min;
- 4) detector: espectroscopia ultravioleta (longitud de onda de las mediciones: 266 nm).

60 La proporción residual de metilcobalamina se calculó a partir del área del pico correspondiente a metilcobalamina, mediante HPLC. La proporción residual se obtuvo como sigue, a partir de la relación del área del pico de metilcobalamina antes del inicio del almacenamiento y el área del pico de metilcobalamina después del almacenamiento:

65
$$\text{Proporción residual (\%)} = \frac{[(\text{área del pico de metilcobalamina después del almacenamiento})/(\text{área total de los picos después del almacenamiento})]}{[(\text{área del pico de metilcobalamina antes del almacenamiento})/(\text{área total de los picos antes del almacenamiento})]} \times 100.$$

ES 2 356 242 T3

Aquí, el área total de los picos significa el área total de todos los picos medidos por HPLC. En las Figuras 5 a 8, respectivamente, se muestran los resultados de la proporción residual de los Ejemplos de Producción 1 a 4 obtenida mediante estos métodos.

5 Por otra parte, en las Figuras 9 a 12 se muestran los resultados de la proporción residual (%) de metilcobalamina cuando cada ejemplo y ejemplo comparativo fueron almacenados durante 1 mes y/o 3 meses en una cámara termostática a 40°C.

10 *Difracción de rayos X de polvo*

Las preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina, obtenidas en el Ejemplo de Producción 1, fueron sometidas a difracción de rayos X de polvo. Se observaron las condiciones cristalinas de las preparaciones, antes del almacenamiento y después de un almacenamiento de 1 mes, en una cámara termostática a 5°C, 25°C y 40°C, bajo las condiciones siguientes.

Las condiciones de medición para difracción de rayos X de polvo fueron como sigue.

Rayos X: Cu K-alfa 1/30 kV/40 mA

Goniómetro: goniómetro vertical RINT2000

Filtro: filtro $K\beta$

Rendija de divergencia: 1/2 grado

Rendija de dispersión: 1/2 grado

Rendija de recepción: 0'15 mm

Velocidad de barrido: continua

Velocidad del escáner: 2°/min

Ancho de barrido: 0'02°

Eje de barrido: 2 θ / θ

Intervalo de barrido: 5-40°

Offset: 0°

Ángulo fijo: 0°

45 En la Figura 13 se muestran los modelos típicos de difracción de rayos X de las preparaciones del Ejemplo de Producción 1 antes del almacenamiento. En la Figura 13, (a), (b), (c), (d) y (e) indican los modelos de difracción de rayos X para el Ejemplo 1, Ejemplos 3 a 5, y Ejemplo Comparativo 1 en el Ejemplo de Producción 1, respectivamente. No se observaron diferencias, bajo ninguna de las condiciones de almacenamiento, en los modelos de difracción de rayos X antes y después del análisis.

55 Como se puede ver a partir de los resultados en las Figuras 5 y 6, se demostró que, independientemente de la cantidad de excipiente mezclado con la metilcobalamina, cuando la proporción de sacarosa en la mezcla de excipientes sacarosa/manitol es el 20% o más, la proporción residual de metilcobalamina en las composiciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina es sumamente alta, y la estabilidad de almacenamiento de metilcobalamina es excelente.

60 Por otra parte, como se puede ver a partir de los modelos de difracción de rayos x en la Figura 13, casi no había pico de difracción de rayos X para (a) del Ejemplo 1, el cual contenía metilcobalamina y sacarosa. Considerando el contenido de metilcobalamina en la preparación liofilizada, esto significa que la sacarosa estaba en estado amorfo. Sin embargo, a medida que la proporción de manitol en la mezcla de excipientes aumenta, aparece un pico de difracción derivado del manitol.

65 Por consiguiente, a partir de los resultados de la proporción residual y del modelo de difracción de rayos X, se demostró que, cuando la sacarosa constituye el 20% o más del excipiente o, en otras palabras, cuando al menos uno de los excipientes es amorfo, una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina tiene excelente estabilidad de almacenamiento.

ES 2 356 242 T3

Indicar que la estabilidad de almacenamiento de las muestras de los Ejemplos 15 al 19 fue evaluada bajo las condiciones de 60°C durante un mes, y todas las muestras fueron sumamente estables, sin disminución observada en la proporción residual de metilcobalamina.

5 Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados de la proporción residual de metilcobalamina basados en las proporciones de mezcla de lactosa y manitol en la mezcla de excipientes. Fue evidente, a partir de los resultados en las Figuras 7 y 8, que la proporción residual de metilcobalamina es muy alta cuando la proporción de lactosa en estado amorfo, en una mezcla de excipientes lactosa/manitol, es el 50% o más independientemente de cuánta mezcla de excipientes es añadida a la metilcobalamina.

10 Por otra parte, a partir de los resultados mostrados en las Figuras 9 y 10, de la proporción residual de metilcobalamina después de 3 meses de almacenamiento a 40°C, fue evidente que, cuando la proporción de sacarosa en una mezcla de excipientes sacarosa/manitol para metilcobalamina es el 20% o más, la proporción residual de metilcobalamina en una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina es sumamente alta.

15 Más aun, a partir de los resultados mostrados en la Figura 11 de la proporción residual de metilcobalamina después de un almacenamiento de 1 mes a 40°C, y de los resultados mostrados en la Figura 12 de la proporción residual de metilcobalamina después de un almacenamiento de 3 meses a 40°C, se demostró que, cuando la proporción de lactosa en una mezcla de excipientes lactosa/manitol para metilcobalamina es el 50% o más, la proporción residual de metilcobalamina en una preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina es sumamente alta, y la estabilidad de almacenamiento es excelente.

20 En vista de lo anterior, de este modo se demostró que, con la preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina de la presente invención, la estabilidad de la metilcobalamina es mayor cuando uno o más de los excipientes está en estado amorfo. Mediante la inclusión de ajustadores de pH y antioxidantes, también se mejora la estabilidad de almacenamiento de la preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina.

25 Sin embargo, se sabe que la cristalización del manitol está favorecida por el tratamiento térmico (también llamado anillamiento) durante la pre congelación en el proceso de liofilización para preparaciones a las que se añade manitol como excipiente. Ver, por ejemplo, Izutsu, K., Yoshioka, S. y Terao, T., *Pharma. Res.* 10, 1.232-1.237; Pikal, M. J., Dellerman, K. M., Roy, M. L. y Riggan, R. M., *Pharma. Res.* 8 (1991) 427-436; Izutsu, K., Ocheda, S., Aoyagi, N. y Kojima, S., *Int. J. Pharm.* 273 (2004) 85-93; Wu, S., Leung, D., Tretyakov, L., Hu, J., Guzzetta, A. y Wang, J., *Int. J. Pharm.* 200 (200) 1-16; y Yoshinari, T., Forbes, R., York, R. y Kawashima, Y., *Int. J. Pharm.* 258 (2003) 109-120. Esto ha sido estudiado principalmente para evaluar el efecto de las condiciones de liofilización en la calidad de las preparaciones proteínicas. Según el informe de Izutsu y col., puesto que el pico exotérmico para la cristalización del manitol ocurre a alrededor de -23°C en una medición DSC, se puede favorecer la cristalización del manitol realizando un tratamiento térmico por encima de esta temperatura, en el proceso de prelio filización.

30 Por lo tanto, como se muestra a continuación, la estabilidad de las preparaciones liofilizadas conteniendo metilcobalamina, conforme a la presente invención, fue estudiada con y sin anillamiento para favorecer la cristalización del manitol.

35 La Figura 14 muestra una composición que fue utilizada para investigar los efectos del tratamiento térmico en una preparación liofilizada utilizando manitol. Las condiciones de liofilización, con y sin etapa de anillamiento, fueron como sigue.

Con Etapa de Anillamiento

40 (1) pre congelación durante 2'5 horas a -55°C, (2) temperatura mantenida durante 3 horas, (3) anillamiento durante 3 horas a -10°C, (4) temperatura disminuida durante 3 horas a -55°C, (5) desecación primaria durante 2'5 horas [-10°C, 24 horas (0'1 mbar)].

Sin Etapa de Anillamiento

55 (A) pre congelación durante 2'5 horas a -55°C, seguido por (B) desecación primaria [-10°C, 24 horas (0'1 mbar)].

Evaluación de la Estabilidad de Almacenamiento

60 Se evaluó la estabilidad de almacenamiento como en los ejemplos anteriores, basada en los cambios en el contenido de metilcobalamina según HPLC, después de 3 meses de almacenamiento en una cámara termostática a diversas temperaturas.

65 La Figura 15 muestra los resultados de estabilidad de la metilcobalamina en la preparación liofilizada que utiliza manitol, con y sin tratamiento térmico en el proceso de liofilización. Las figuras para metilcobalamina (B12-CH3) e hidroxicobalamina (B12-OH) en la Figura 15 fueron calculadas a partir de las mediciones HPLC como (área del pico de B12-CH3 o B12-OH)/total de todas las áreas de los picos)x100.

ES 2 356 242 T3

Los resultados mostrados en la Figura 15 indican que, cuando la liofilización incluye una etapa de anillamiento que favorezca la cristalización del manitol, no solamente es menor la estabilidad de la metilcobalamina que si no hubiera anillamiento, sino que aumenta la producción de hidroxicobalamina, un producto de degradación de la metilcobalamina. Esto es evidencia de que la metilcobalamina es más inestable en un entorno cristalino que en un entorno no cristalino.

Con la preparación liofilizada conteniendo metilcobalamina conforme a la presente invención se mejora la estabilidad de almacenamiento de la metilcobalamina suprimiendo el estado cristalino del excipiente, y es posible proporcionar una preparación liofilizada, en su reconstitución al utilizar, que es apropiada para disolver en solución para preparar inyecciones.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 356 242 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Una preparación liofilizada constando de metilcobalamina, o una sal farmacéuticamente admisible de la misma, y un excipiente,

10 en donde dicho excipiente comprende al menos un azúcar, dicho azúcar siendo seleccionado del grupo que se compone de glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, sacarosa y trehalosa, en donde dicho azúcar en dicho excipiente está en estado amorfo.

15 2. La preparación liofilizada según la reivindicación 1, en donde dicho azúcar, que está presente en dicho estado amorfo, está presente en dicho excipiente en una cantidad que es al menos el 20% en peso, basado en el peso total de dicho excipiente.

20 3. La preparación liofilizada según la reivindicación 1, en donde la metilcobalamina, o sal farmacéuticamente admisible de la misma, está también en estado amorfo.

25 4. La preparación liofilizada según cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicación 2, constando adicionalmente de un ajustador de pH.

30 5. La preparación liofilizada según cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicación 2, constando adicionalmente de un antioxidante.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

MUESTRA	SACAROSA	MANITOL
EJEMPLO 1	2'5 g	0 g
EJEMPLO 2	1'5 g	1'0 g
EJEMPLO 3	1'25 g	1'25 g
EJEMPLO 4	1'0 g	1'5 g
EJEMPLO 5	0'5 g	2'0 g
EJEMPLO COMPARATIVO 1	0 g	2'5 g

FIG. 2

MUESTRA	SACAROSA	MANITOL
EJEMPLO 6	5'0 g	0 g
EJEMPLO 7	3'0 g	2'0 g
EJEMPLO 8	2'5 g	2'5 g
EJEMPLO 9	2'0 g	3'0 g
EJEMPLO 10	1'0 g	4'0 g
EJEMPLO COMPARATIVO 2	0 g	5'0 g

FIG. 3

MUESTRA	SACAROSA	MANITOL
EJEMPLO 11	2'5 g	0 g
EJEMPLO 12	1'25 g	1'25 g
EJEMPLO COMPARATIVO 3	0 g	2'5 g

FIG. 4

MUESTRA	SACAROSA	MANITOL
EJEMPLO 13	5'0 g	0 g
EJEMPLO 14	2'5 g	2'5 g
EJEMPLO COMPARATIVO 4	0 g	5'0 g

FIG. 5

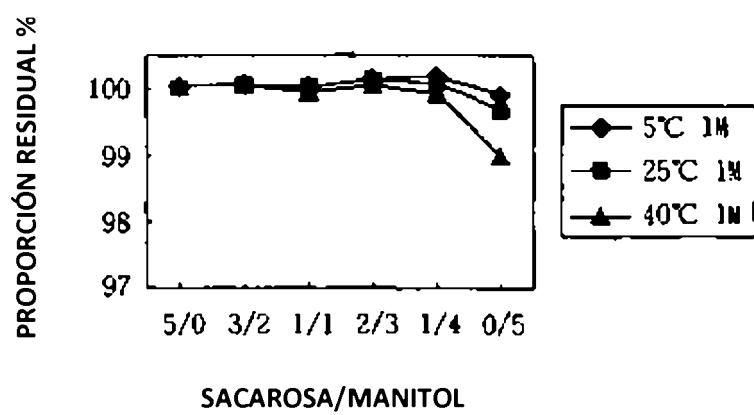


FIG. 6

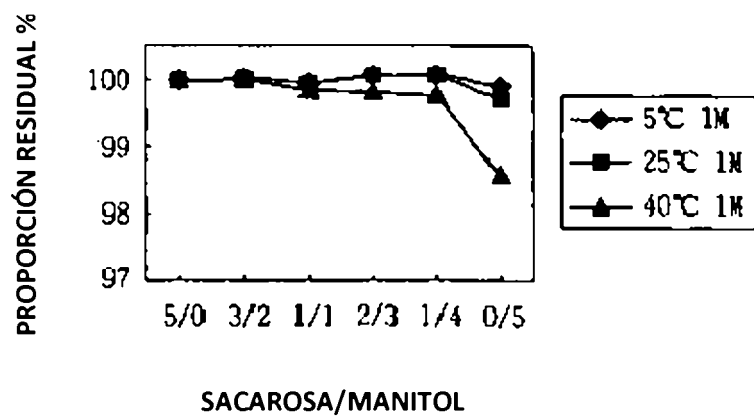


FIG. 7

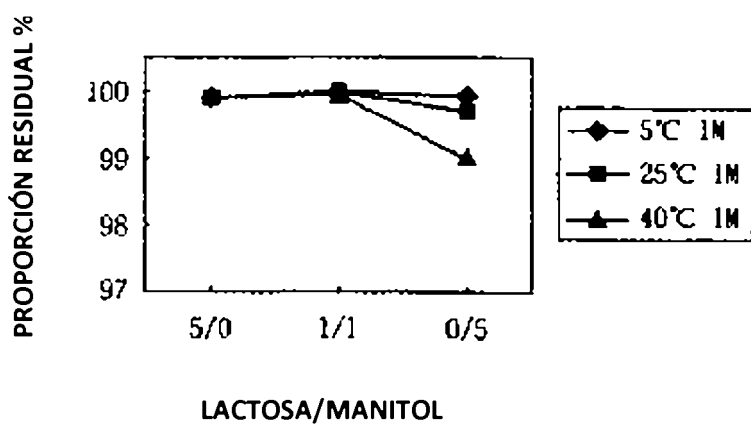


FIG. 8

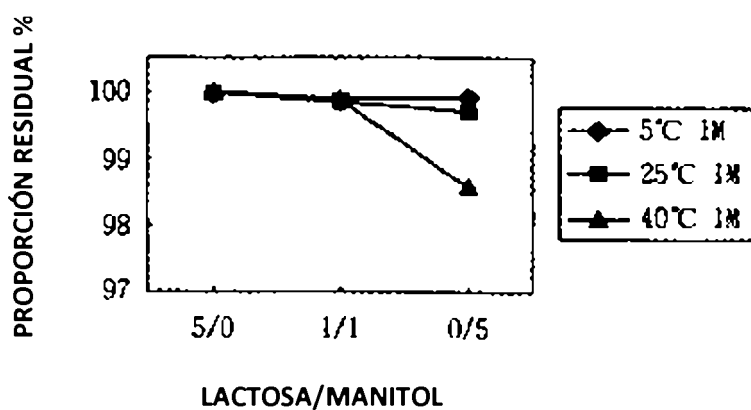


FIG.9

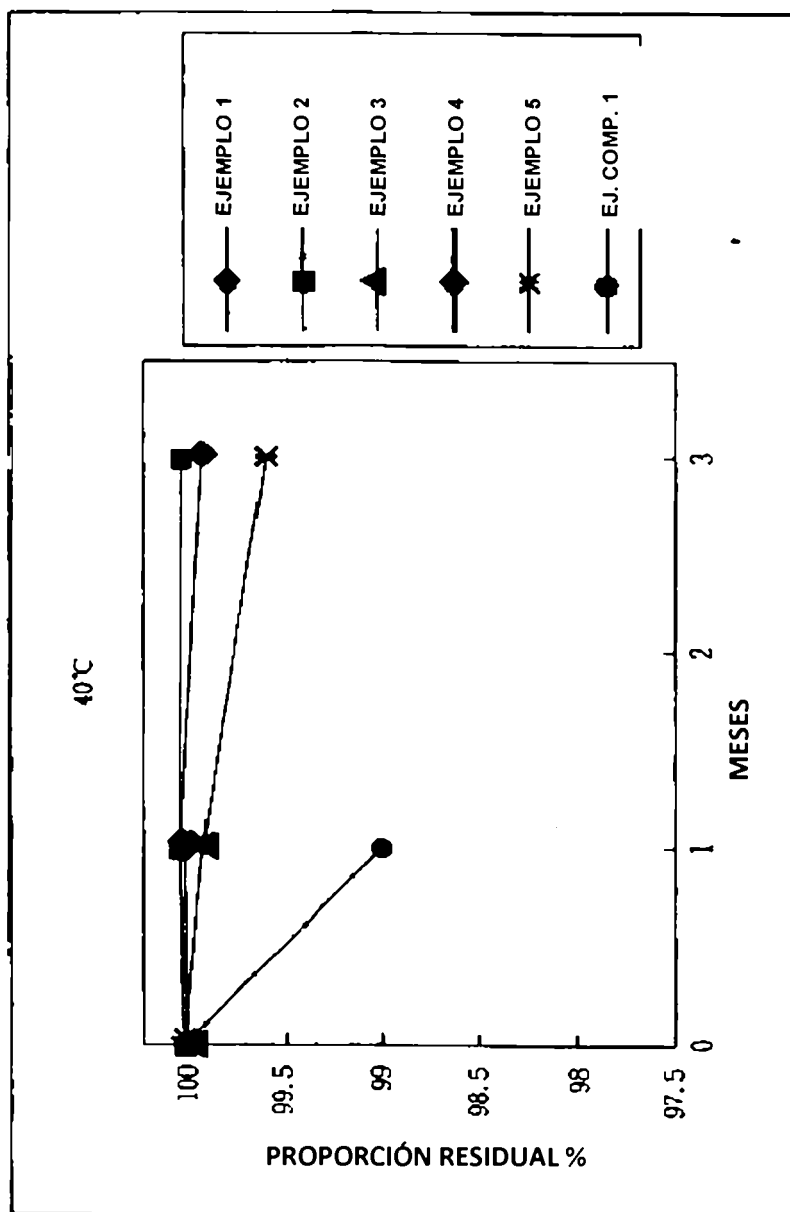


FIG.10

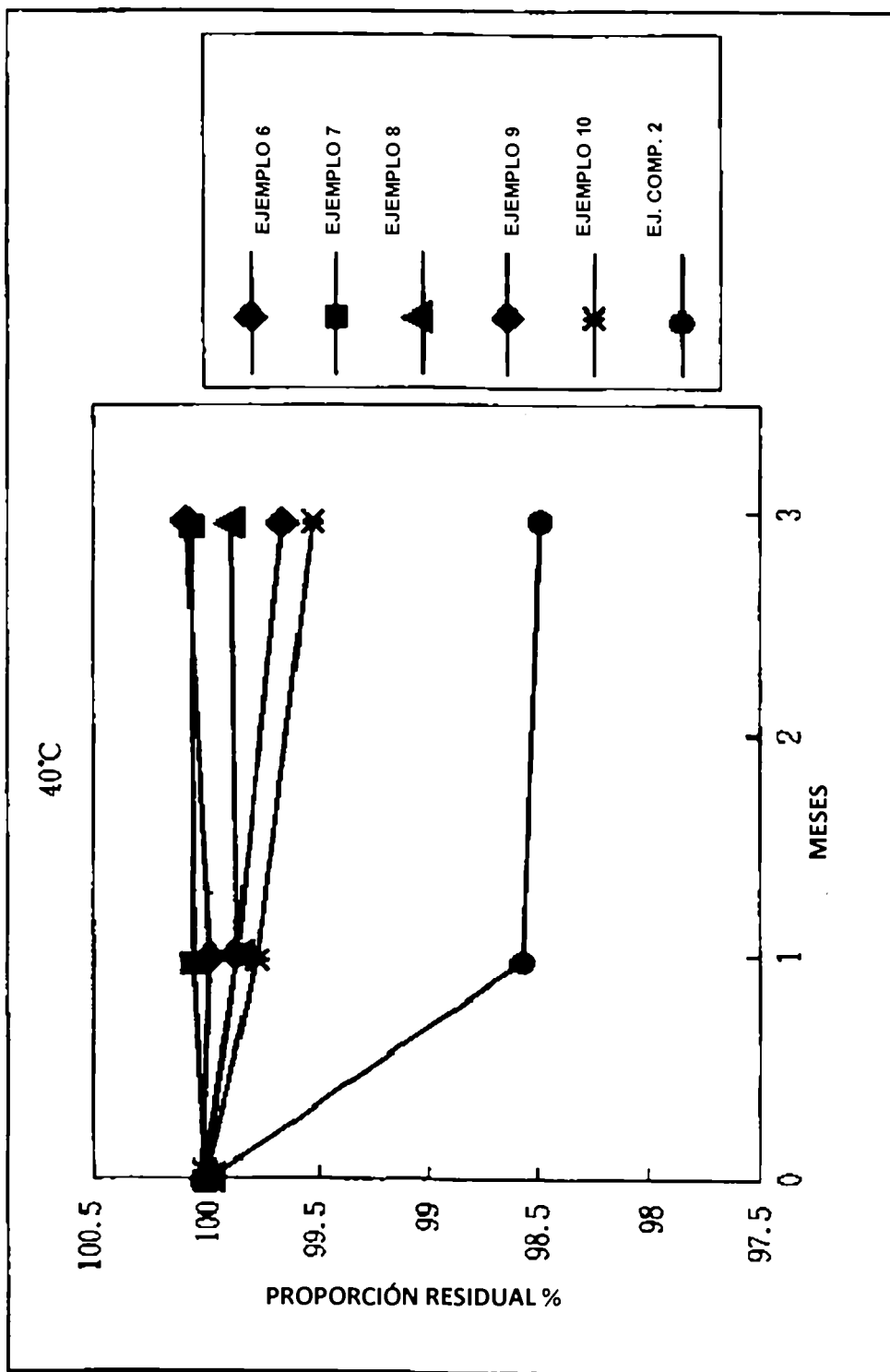


FIG.11

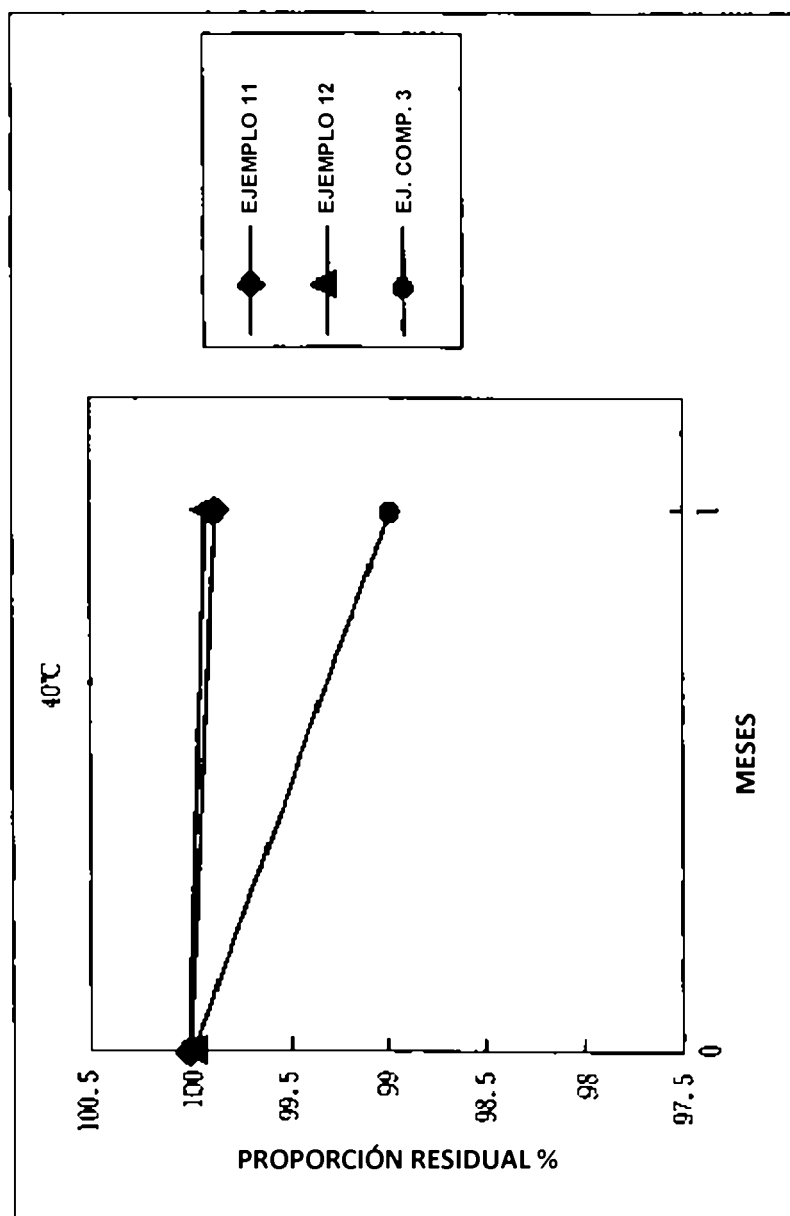


FIG.12

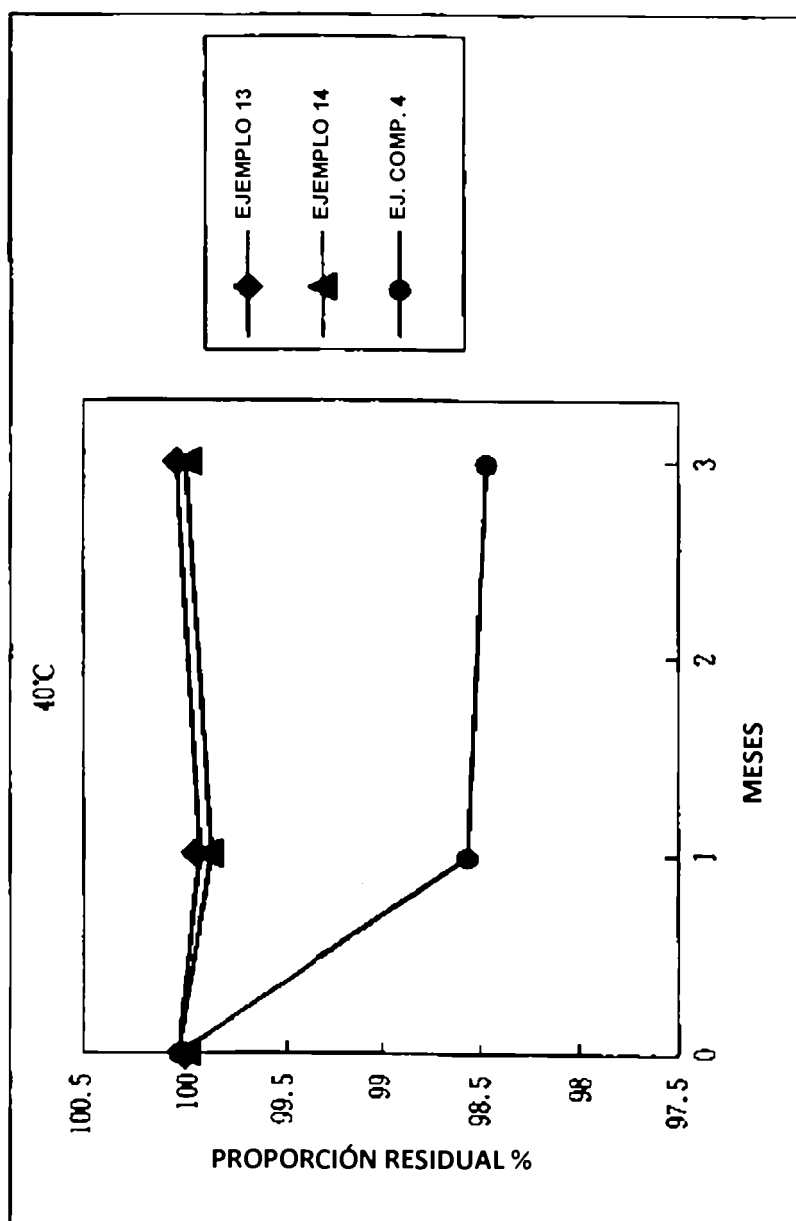


FIG.13

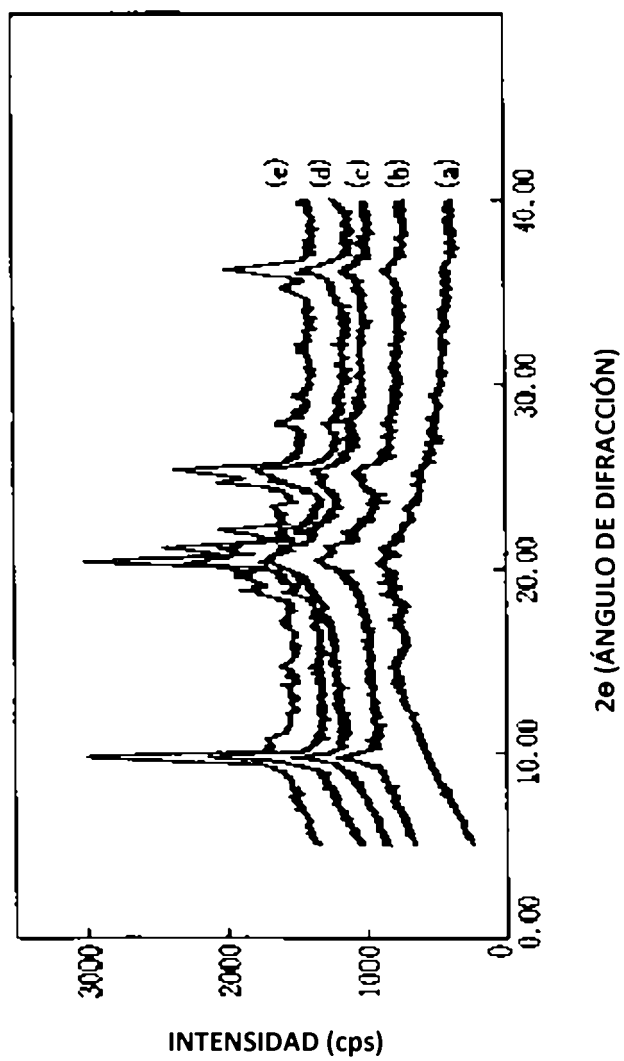


FIG. 14

	CANTIDAD
METILCOBALAMINA	25 mg
MANITOL	125 mg
AGUA PURIFICADA PARA INYECCIÓN	HASTA UN TOTAL DE 5 ML

FIG. 15

	INICIAL			5°C 3M			25°C 3M			40°C 3M		
	B12-CH3	B12-OH	B12-CH3	B12-CH3	B12-OH	B12-CH3	B12-CH3	B12-OH	B12-CH3	B12-CH3	B12-OH	B12-OH
CON ANILLAMIENTO	99'80	0'15	99'71	99'33	0'23	99'33	98'17	0'57	98'17	1'39		
SIN ANILLAMIENTO	99'74	0'21	99'82	99'59	0'18	99'59	99'21	0'34	99'21	0'63		

B12-CH3: **METILCOBALAMINA**
 B12-OH: **HIDROXICOBALAMINA**