



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 500**

51 Int. Cl.:  
**C07D 475/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08748372 .3**

96 Fecha de presentación : **29.05.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2162456**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54 Título: **Ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable, su preparación y uso.**

30 Prioridad: **30.05.2007 CH 85607/07**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.10.2011**

73 Titular/es: **CERBIOS-PHARMA S.A.**  
**Via Pian Scairolo 6**  
**6917 Barbengo, CH**

72 Inventor/es: **Manzotti, Raffella y**  
**Morosoli, Moreno**

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 366 500 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

Ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable, su preparación y uso

- 5 La presente invención se refiere a ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable de fórmula IV y a un procedimiento para su preparación.

En la presente invención se usa a veces la abreviatura THF para el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico.

- 10 En la introducción de la descripción del documento EP 0455013 A1 se encuentra un breve resumen de la importancia farmacológica del ácido N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico, abreviado en la presente memoria en parte con N(5)-metil-THF, y sus derivados. En el mismo documento se señala también la importancia de los diaestereoisómeros individuales (6S) y (6R) del N(5)-metil-THF. Igualmente se describe el estado de la técnica relativo a la preparación de los diaestereoisómeros (6S) y (6R) puros del N(5)-metil-THF.

- 15 En el documento EP 1044975 A1 se describen sales cristalinas estables del N(5)-metil-THF. Asimismo se describen sales cálcicas cristalinas del (6S)-N(5)-metil-THF, presentando estas sales valores de 2-theta claramente definidos en el correspondiente diagrama de difracción de rayos X de polvo.

- 20 En el procedimiento de preparación de estas sales se usan como materiales de partida o bien la mezcla de diaestereoisómeros (6RS) o bien los diaestereoisómeros (6S) o (6R) ya separados. Este procedimiento incluye un tratamiento térmico a más de 60°C, preferentemente a más de 85°C, mencionándose en los ejemplos de realización temperaturas de 90°C a 100°C.

- 25 Obviamente, un tratamiento térmico de este tipo es poco apropiado para la preparación industrial de estas sales.

En el documento EP 1044975 A1 no se indica cómo se han obtenido los diaestereoisómeros individuales (6S) o (6R) del N(5)-metil-THF.

- 30 Un objetivo de la presente invención es proporcionar ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable de fórmula IV y un procedimiento para la preparación de este compuesto.

Este objetivo se alcanza con la presente invención.

- 35 El procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable de fórmula IV se caracteriza porque  
- a una solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula III con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente  $\leq 2\%$  en peso se añade o bien ácido acético o bien un ácido sulfónico en tal cantidad que se obtenga un valor de pH de 5,5,

- 40 - la solución así obtenida se calienta a una temperatura comprendida en el intervalo de 44°C a 46°C,  
- a esta solución calentada se añade o bien ácido acético o bien un ácido sulfónico en tal cantidad que se obtenga un valor de pH comprendido en el intervalo de 4,3 a 4,4, comenzando la cristalización del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula IV y manteniéndose el valor de pH durante esta cristalización en el intervalo de 4,3 a 4,4 mediante la adición continua de o bien ácido acético o bien un ácido sulfónico, y

- 45 - el sólido cristalino así obtenido se filtra y aísla a una temperatura comprendida en el intervalo de 44°C a 46°C.

En las reivindicaciones dependientes se definen formas de realización preferidas de la presente invención.

En la parte que sigue se describen formas de realización posibles de la presente invención.

- 50 En ellas también se hace referencia a las figuras.

La figura 1 muestra un esquema de reacción que comienza con el compuesto de fórmula I y termina con el compuesto de fórmula IV.

- 55 La figura 2a muestra el perfil de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) del compuesto de fórmula (IV). En la abscisa se representa la temperatura en °C y en la ordenada se representa el flujo de calor endotérmico en mW.

- La figura 2b muestra el perfil termogravimétrico (TGA) del compuesto de fórmula IV. En la abscisa se representa la temperatura en °C. En la ordenada izquierda se representan porcentajes en peso y en la ordenada derecha, la derivada de estos porcentajes en peso frente al tiempo t (minutos). La línea continua se refiere a la ordenada izquierda y la línea discontinua se refiere a la ordenada derecha.

- La figura 3a muestra el diagrama de difracción de rayos X de polvo del compuesto de fórmula IV. En la abscisa se representan los valores de 2-theta y en la ordenada se representa la intensidad (cuentas).

La figura 3b muestra los valores de 2-theta con un error de aproximadamente  $\pm 0,2$  grados del diagrama de difracción de rayos X de polvo mostrado en la figura 3a.

Se preparó ácido (6S)-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula II con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente comprendida en el intervalo de 4% en peso a 8% en peso conforme al documento EP 0600460.

Resultó sorprendente que se pudiera obtener una solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula III con un mayor contenido en el isómero (6S), a saber, por cristalización selectiva de la mezcla 1:1 de las sales diaestereoisoméricas en la solución.

10

De forma rutinaria se pudo aislar una solución que presentaba un contenido del isómero (6S) de al menos 98%.

También fue sorprendente que se obtuviera el ácido libre cristalino estable correspondiente de fórmula IV a partir de la solución antes descrita: durante este paso se logró, además, aumentar adicionalmente la pureza diaestereoisomérica a al menos 99%.

El ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable de fórmula IV se puede aislar con una pureza diaestereoisomérica tal que este ácido se puede usar como al menos un componente activo en un complemento alimenticio o en un medicamento.

20

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

**Ejemplo 1** (preparación de la solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula III)

25

Se suspendieron bajo una atmósfera de nitrógeno 100 g de ácido (6S)-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula II con una pureza diaestereoisomérica de (6S):(6R) de 92:8 (preparado conforme al documento EP 0600460) en agua que presentaba una temperatura de 7°C.

El compuesto de fórmula II se disolvió mediante la adición de 65 ml de una solución acuosa de NaOH al 20% (p/p). El pH ascendió a 9,05.

A esta solución se añadieron bajo agitación 23,7 g de una solución acuosa de formaldehído al 36% (p/p) en un plazo de 5 minutos y a una temperatura de 8°C.

35

Al cabo de 15 minutos se añadió bajo agitación una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub>, preparada por disolución de 21,3 g de NaBH<sub>4</sub> en 50 ml de agua y 1 ml de una solución acuosa de NaOH al 20% (p/p), en un plazo de 1 hora a una temperatura de 8°C.

Esta mezcla se agitó durante 30 minutos a una temperatura de 8°C y a continuación durante 20 minutos a una temperatura de 61°C.

La temperatura de reacción se redujo después a 20°C en un plazo de 2 horas.

A continuación se añadieron gota a gota 79 ml de una solución acuosa de HCl al 18% (p/p). El pH ascendió a 8,03.

La mezcla se enfrió a una temperatura de 4°C para permitir la precipitación de boratos. Después de 2 horas se eliminaron los boratos por filtración.

El pH de la solución resultante se ajustó a un valor de 7,03 mediante la adición de 10 ml de una solución acuosa de HCl al 18% (p/p).

Esta solución se calentó a una temperatura de 20°C, y después se añadieron primero 1,62 g de EDTA disódico y después 0,82 equivalentes (25,44 g) de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.

55

A continuación se ajustó el pH a un valor de 6,9 mediante la adición de 2 ml de una solución acuosa de NaOH al 20% (p/p).

La cristalización selectiva de la sal cálcica del ácido (6RS)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico se llevó a cabo inoculando la solución con 100 mg de cristales previamente preparados de la sal cálcica del ácido (6RS)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico y reduciendo seguidamente la temperatura de temperatura ambiente a una temperatura de 4°C en un plazo de 40 minutos.

60

La suspensión resultante se mantuvo durante 18 horas bajo agitación a una temperatura de 4°C.

65

Los cristales obtenidos se eliminaron por filtración.

La solución acuosa así obtenida de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula III presentaba una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente  $\leq 2\%$  en peso según se determinó mediante HPLC en una columna quirál.

5

**Ejemplo 2** (preparación de ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino de fórmula IV)

A la solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula III con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente  $\leq 2\%$  en peso, preparada según el ejemplo 1 anterior, se añadieron en un plazo de 20 minutos 6 ml de ácido acético al 100% hasta obtener un valor de pH de 5,5.

10

Después se aumentó la temperatura a 45°C.

A esta temperatura se añadieron sucesivamente 1,35 g de ditionito sódico y 1,9 g de EDTA disódico.

15

A esta solución se añadieron 25 ml de ácido acético al 100% en un plazo de 15 minutos.

A un pH de 4,5 comenzó la cristalización del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico de fórmula IV.

20

El pH se mantuvo en el intervalo de 4,3 a 4,4 mediante la adición continua de ácido acético al 100% (10 ml).

Esta suspensión se agitó durante 30 minutos y a continuación se filtró.

El sólido cristalino así obtenido se lavó con agua que presentaba una temperatura de 40°C.

25

Se obtuvieron 106,9 g de sólido cristalino húmedo.

Para determinar la pureza y la relación de los diaestereoisómeros se lavó una muestra del compuesto de fórmula IV con etanol acuoso al 94% (v/v) y después se secó a presión reducida. Se obtuvieron los resultados siguientes:

30

Pureza por HPLC: 96,45%

Relación (6S)/(6R) = 99,1:0,9 (determinada mediante HPLC quirál).

El producto de fórmula IV así obtenido presentaba los siguientes datos de estabilidad (almacenado a una temperatura de 4°C):

35

Tiempo (meses)	Pureza por HPLC (%)
0	96,45
6	96,66

## REIVINDICACIONES

1. Ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable con una pureza diaestereoisomérica de al menos 99%.  
5
2. Ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable según la reivindicación 1, caracterizado porque presenta  
10
- el perfil de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostrado en la figura 2a,
  - el perfil termogravimétrico (TGA) mostrado en la figura 2b,
  - el diagrama de difracción de rayos X de polvo mostrado en la figura 3a y
- 15 - los valores de 2-theta con un error de aproximadamente  $\pm 0,2$  grados mostrados en la figura 3b.
3. Ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el correspondiente diagrama de difracción de rayos X de polvo presenta los siguientes valores de 2-theta característicos:  
20 15,0  
15,6  
17,4  
18,7  
19,9  
25 22,2  
24,3 y  
29,5.
4. Procedimiento para la preparación de ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable,  
30 caracterizado porque
- a una solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente  $\leq 2\%$  en peso se añade o bien ácido acético o bien un ácido sulfónico en tal cantidad que se obtenga un valor de pH de 5,5,  
35
  - la solución así obtenida se calienta a una temperatura comprendida en el intervalo de 44°C a 46°C,
  - a esta solución calentada se añade o bien ácido acético o bien un ácido sulfónico en tal cantidad que se obtenga un valor de pH comprendido en el intervalo de 4,3 a 4,4, comenzando la cristalización del ácido (6S)-N(5)-metil-  
40 5,6,7,8-tetrahidrofólico y manteniéndose el valor de pH durante esta cristalización en el intervalo de 4,3 a 4,4 mediante la adición continua de o bien ácido acético o bien un ácido sulfónico, y
  - el sólido cristalino así obtenido se filtra y aísla a una temperatura comprendida en el intervalo de 44°C a 46°C.
- 45 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el sólido cristalino obtenido se lava con agua que presenta una temperatura de aproximadamente 40°C.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizado porque el ácido sulfónico es ácido p-toluenosulfónico.  
50
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque la solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente  $\leq 2\%$  en peso se prepara según un procedimiento en el que se metila en agua ácido (6S)-5,6,7,8-tetrahidrofólico con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente comprendida en el intervalo de 4%  
55 en peso a 8% en peso, y en el que
- se añaden a la mezcla de reacción metilada obtenida entre 0,70 y 0,82 equivalentes, respecto a la cantidad de THF usada, de cloruro cálcico,
- 60 - se cristaliza selectivamente y se separa la sal cálcica del ácido (6RS)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico a partir de la solución acuosa obtenida y
- se obtiene la solución acuosa de la sal cálcica del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico con una proporción del diaestereoisómero (6R) correspondiente  $\leq 2\%$  en peso.
- 65 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el cloruro cálcico se añade en forma

sólida o en forma de una solución acuosa.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, caracterizado porque la cristalización selectiva de la sal cálcica del ácido (6RS)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico se lleva a cabo inoculando con cristales  
5 previamente preparados de la sal cálcica del ácido (6RS)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico y reduciendo seguidamente la temperatura de temperatura ambiente a una temperatura comprendida en el intervalo de 3°C a 5°C, y porque esta temperatura se mantiene durante 16 a 18 horas.

10. Uso del ácido (6S)-N(5)-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino estable según cualquiera de las  
10 reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un complemento alimenticio o un medicamento

- para tratar y/o combatir tumores humanos y/o animales y/o

- para influir sinérgicamente en un compuesto anticanceroso y/o

15

- para reducir la toxicidad de un compuesto anticanceroso y/o

- para proteger células humanas y/o animales.

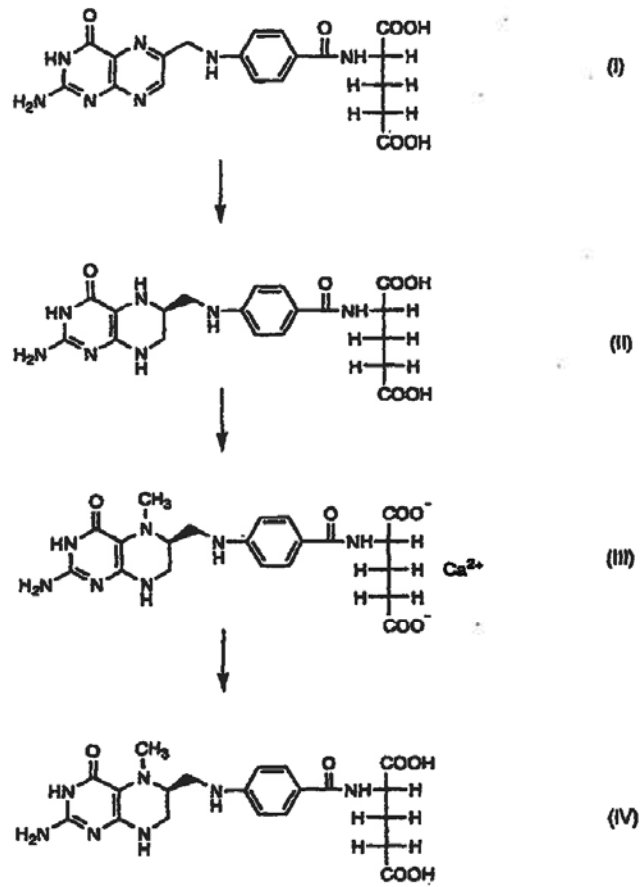


Fig.1

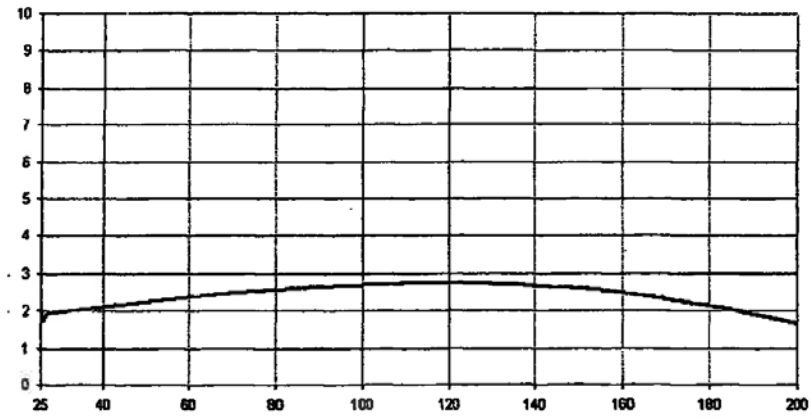


Fig. 2a

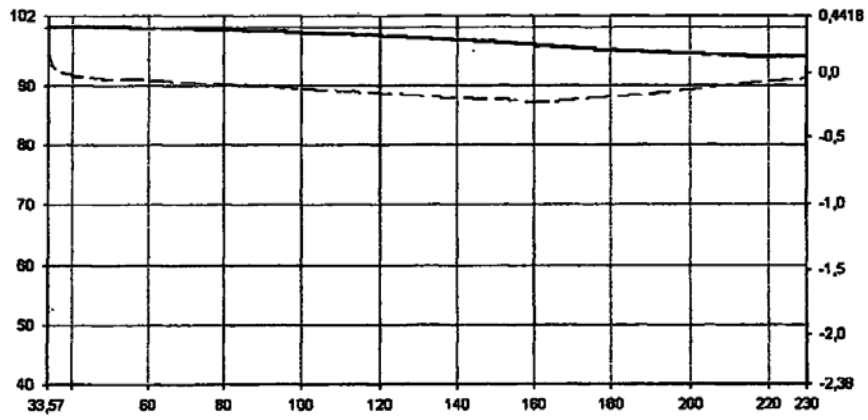


Fig. 2b



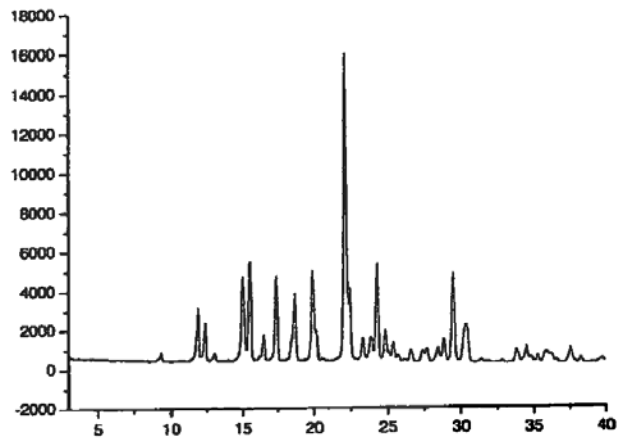


Fig.3a

Pos. [°2theta]	Altura [cuentas]	Ancho total a media altura [°2theta]	Espaciado d [Å]	Intensidad relativa [%]
9,3431	359,62	0,0836	9,46587	2,73
11,8681	2647,01	0,1171	7,45705	20,13
12,3773	1821,97	0,1171	7,15137	13,85
13,0412	401,95	0,1171	6,78879	3,06
15,0256	3901,81	0,1673	5,89638	29,67
15,5983	4007,87	0,1506	5,68114	30,47
16,2341	654,91	0,0669	5,46005	4,98
16,5335	1150,34	0,1338	5,36185	8,75
17,4160	4331,05	0,1506	5,09210	32,93
18,4448	951,34	0,1171	4,81033	7,23
18,7080	3064,94	0,1506	4,74324	23,30
19,9260	4004,29	0,1506	4,45553	30,45
20,1856	1379,90	0,1004	4,39924	10,49
20,5606	181,70	0,1004	4,31984	1,38
22,1764	13152,35	0,1673	4,00862	100,00
22,4365	3415,42	0,1004	3,96273	25,97
23,3256	1040,66	0,1171	3,81365	7,91
23,8520	1007,47	0,1224	3,72759	7,66
23,9477	901,13	0,0816	3,72213	6,85
24,3286	4533,85	0,2040	3,65564	34,47
24,8526	1398,77	0,1632	3,57973	10,64
25,0754	450,57	0,1020	3,54842	3,43
25,3878	821,59	0,2244	3,50547	6,25
25,7370	319,21	0,1224	3,45869	2,43
26,6345	568,65	0,1632	3,34414	4,32
27,4247	511,56	0,0816	3,24956	3,89
27,6955	634,16	0,1224	3,21839	4,82
28,4575	553,70	0,2040	3,13392	4,21
28,8157	980,98	0,1836	3,09577	7,46
29,4988	3680,74	0,2448	3,02563	27,99
30,1602	898,39	0,1224	2,96076	6,83
30,4262	1440,45	0,1632	2,93548	10,95
31,3576	124,72	0,1632	2,85038	0,95
32,8840	117,00	0,1632	2,72147	0,89
33,7872	501,16	0,1632	2,65076	3,81
34,5202	607,26	0,1428	2,59614	4,62
34,8769	250,91	0,1224	2,57039	1,91
35,2871	275,14	0,1632	2,54145	2,09
35,8915	432,75	0,3672	2,50003	3,29
36,2611	305,22	0,2040	2,47539	2,32
36,5806	123,96	0,1224	2,45449	0,94
37,5778	586,47	0,2448	2,39162	4,46
38,2761	209,70	0,1428	2,34958	1,59

Fig 3b