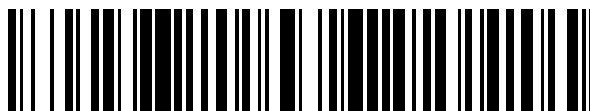


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 685**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 475/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2012 E 15162252 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2946781**

54 Título: **Ácido levofolínico cristalino y proceso para su preparación**

30 Prioridad:

21.03.2011 EP 11158959

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

12.12.2016

73 Titular/es:

GMT FINE CHEMICALS SA (100.0%)

6, rue des Iles

2108 Couvet, CH

72 Inventor/es:

JEQUIER, PASCAL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 593 685 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 levofolínico cristalino y proceso para su preparación

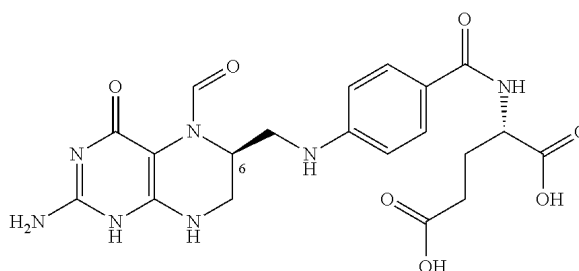
Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al compuesto ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico en forma cristalina estable y a un proceso para su producción.

Antecedentes de la invención

El ácido folínico se usa en la quimioterapia del cáncer para contrarrestar los efectos secundarios de los tratamientos que implican al fármaco metotrexato o en combinación sinérgica con el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo. El ácido folínico generalmente se administra en forma de sus sales de calcio o de sodio.

10 El ácido folínico existe en formas diastereoisoméricas, en función de la configuración R o S en los átomos de carbono identificados como quirales en la fórmula estructural siguiente:



15 El átomo quiral en el resto de ácido glutámico conserva la estructura del aminoácido natural. El otro centro quiral es el átomo de carbono identificado como 6 en la fórmula anterior; al igual que con la mayoría de las moléculas enantioméricas biológicas, solo la forma con la configuración S en este carbono, es decir el compuesto ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico, es biológicamente activa. Esta forma del ácido se suele denominar en el campo ácido levofolínico, y sus sales levofolinatos, términos que se adoptarán en la descripción siguiente y en las reivindicaciones.

20 Las formas diastereoméricamente enriquecidas o puras del ácido levofolínico por lo general se producen directamente en forma de sales farmacéuticamente aceptables mediante cristalización.

Un ejemplo de dichos procesos se facilita en la patente de EE.UU. Nº 5.134.235, en donde se divulga la producción de sales de metales alcalino térreos de ácido levofolínico en forma enriquecida en comparación con la mezcla racémica.

25 La solicitud de patente de EE.UU. 2008/0153849 A1 divulga un método por el cual es posible preparar la mezcla racémica de ácido dextrofolínico y ácido levofolínico en forma cristalina, o ácido levofolínico puro en forma amorfa.

Se hace referencia adicionalmente a los documentos WO2008/144953, WO2005/080395 y EP1640008.

30 En la actualidad, todavía no se conoce un método que de la preparación de ácido levofolínico esencialmente puro en forma cristalina; la producción de este compuesto, en una forma diastereoméricamente pura, es deseable, ya que proporcionaría un modo conveniente de producir sales farmacéuticas del ácido en forma 6S pura y también se podría usar directamente para una nueva formulación farmacéutica sin la necesidad de la preparación previa de una sal.

35 Por tanto, es objeto de la presente invención proporcionar el compuesto ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico en forma cristalina diaestereoisoméricamente pura y estable, así como un proceso para su preparación.

Sumario de la invención

Estos objetos se consiguen mediante la presente invención que, en un aspecto de la misma, proporciona un proceso para la preparación de ácido folínico cristalino en forma 6S esencialmente pura, que comprende las etapas de:

- 40
- preparar una primera disolución acuosa o hidroalcohólica, que tiene un valor de pH superior a 4,5, de una sal levofolinato soluble;
 - proporcionar un lote de agua, o de una mezcla hidroalcohólica que contiene hasta un 60% en v/v de alcohol, precalentada a una temperatura entre 30 y 60°C;

- 5 • formar una segunda disolución añadiendo dicha primera disolución y un segundo ácido a dicho lote de agua o mezcla hidroalcohólica, funcionando de un modo tal que la concentración de la sal de levofolinato en la segunda disolución nunca supera el 4% en peso/volumen, el valor de pH de la segunda disolución siempre permanece en el intervalo entre 3,0 y 4,5. y la temperatura de la segunda disolución siempre permanece en el intervalo entre 30 y 60°C;
- 10 • tras finalizar la adición de dicha primera disolución a dicho lote de agua o mezcla hidroalcohólica, agitar la segunda disolución formada de este modo mientras que se produce la precipitación de ácido levofolínico, mantener la disolución a una temperatura ente 30 y 60°C, supervisar el Ph y añadir de forma continua dicho segundo ácido para mantener el pH estable, hasta que se observa que el valor de pH se estabiliza sin necesidad de seguir añadiendo dicho segundo ácido, lo que indica el fin de la cristalización de ácido levofolínico;
- recuperar el ácido levofolínico cristalino formado de este modo.

Breve descripción de las figuras

- La FIG. 1 muestra el espectro de RMN de ácido levofolínico preparado de acuerdo con la invención;
- 15 - La FIG. 2 muestra un patrón de XRD obtenido con polvos de ácido levofolínico preparado de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de la invención

20 Con la expresión “esencialmente puro” como se usa en la presente invención y en las reivindicaciones adjuntas, se quiere decir ácido levofolínico que tiene una pureza diaestereoisomérica de al menos 98%. Los valores de concentración notificados como los porcentajes en peso/volumen indican los gramos de soluto por 100 cc de disolución.

La primera etapa del proceso de la invención consiste en preparar una primera disolución acuosa o hidroalcohólica de una sal levofolinato soluble y controlar su pH a un valor superior a 4,5. En caso de uso de una disolución hidroalcohólica, los alcoholes preferidos son alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico y sus mezclas.

25 La primera disolución se puede obtener mediante solubilización directa en agua o en una mezcla de agua-alcohol de una sal soluble del ácido. Las sales más solubles son las sales de metales alcalinos y, preferentemente, la sal de sodio; una sal de metal alcalino de ácido levofolínico se puede disolver en agua a temperatura ambiente hasta una concentración de aproximadamente 30% en peso/volumen. La primera disolución también se puede preparar a partir de una sal de metal alcalino térreo, normalmente la sal de calcio; dado que estas sales tienen una solubilidad reducida en agua o mezclas hidroalcohólicas, en este caso es preferible trabajar a temperaturas relativamente altas, de hasta aproximadamente 80°C, en atmósfera protectora (por ejemplo, nitrógeno. Por último, es posible formar una suspensión acuosa o hidroalcohólica de una sal de metal alcalino térreo a una temperatura a la cual la sal es escasamente soluble (por ejemplo, temperatura ambiente); después, la sal se solubiliza mediante intercambio del catión, por ejemplo mediante la adición de carbonato sódico; en estas condiciones, se forma el carbonato del metal alcalino térreo que precipita y se separa mediante, por ejemplo, centrifugación o ultrafiltración fina; el resultado es una disolución de levofolinato sódico.

40 Aparte, se fabrica fácilmente un lote de agua o de una mezcla hidroalcohólica, precalentada a una temperatura de al menos 30°C y no superior a 60°C; preferentemente, la temperatura del lote es de aproximadamente 45°C. En el caso del uso de la mezcla hidroalcohólica, esta puede contener hasta 60% en v/v de alcohol, dependiendo del alcohol (o alcoholes), preferentemente, el contenido en alcohol es 5 - 10%. De nuevo, para la preparación de la mezcla hidroalcohólica se prefieren alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico sus mezclas.

45 Después, la primera disolución se añade lentamente al lote de agua o de la mezcla hidroalcohólica, de modo que se forma una segunda disolución. En esta etapa, el ácido levofolínico cristaliza en la disolución formada. De este modo se constituye la segunda disolución mediante el licor madre en el cual cristaliza el producto. Las características dinámicas de este licor madre son de interés para el control del proceso. La adición de la primera disolución a dicho lote debe realizarse de un modo tal que la concentración de ácido levofolínico en la segunda disolución nunca supera la concentración del 4% en peso/volumen y permanece idealmente entre 1 y 2,5% en peso/volumen mientras el ácido levofolínico cristaliza en la disolución. Esta operación tiene lugar con control de pH de la segunda disolución que debe mantenerse constantemente en el intervalo entre 3,0 y 4,5. Durante esta fase, los aniones de levofolinato se recombinan con los iones de H⁺ presentes en la segunda disolución, formando ácido levofolínico cristalino, que es escasamente soluble en agua o en mezclas hidroalcohólicas en el intervalo de pH propuesto.

55 La recombinación con iones H⁺ da lugar a un incremento del pH que debe compensarse mediante la adición de un segundo ácido adecuado, por ejemplo ácido clorhídrico diluido, con el fin de mantener el pH en el intervalo indicado. Otra forma de controlar esta etapa del proceso es observar la segunda disolución durante la adición de la primera disolución. De hecho, si la concentración de ácido levofolínico supera el límite superior del 4% en peso/volumen, debido a la adición demasiado rápida de la primera disolución, la segunda disolución se enturbia y la forma amorfa

del ácido levofolínico precipita.

Trabajando de un modo tal que la segunda disolución siempre permanezca transparente garantiza que se cumpla la condición de permanecer por debajo de dicho límite de 4%.

5 Esta etapa se puede llevar a cabo añadiendo tanto la primera disolución como el segundo ácido necesario para mantener el valor de pH en el intervalo indicado al lote de agua o hidroalcohólico lenta y continuamente o en pequeñas cantidades posteriores. Los ácidos que se pueden usar son los ácidos no oxidantes y los ácidos que no reaccionan con ácido levofolínico o sus sales; se prefieren los ácidos minerales tales como H_2SO_4 , H_3PO_4 , y particularmente preferido, HCl.

10 En caso de la adición de la primera disolución en cantidades pequeñas al lote de agua o mezcla hidroalcohólica, tras cada adición, el incremento de pH se detiene cuando el anión levofolinato se ha convertido esencialmente por completo en el ácido cristalino y se puede producir la siguiente adición de una cantidad de la primera disolución.

Esta etapa también se puede llevar a cabo y con control de temperatura, que se debe llevar al intervalo de 30 – 60°C o mantener en el mismo.

15 El control de la concentración de levofolinato, el pH y la T es necesario porque el ácido levofolínico es un compuesto inestable, como se trata en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.441.168 B1, y se convierte fácilmente en subproductos si el pH disminuye por debajo de 3,0 o si durante la disminución del pH la temperatura alcanza 60°C o valores incluso más altos.

20 Cuando la primera disolución se ha añadido por completo al lote de agua o hidroalcohólico, continuamente o en pequeñas cantidades adicionales, la segunda disolución obtenida de este modo se mantiene en agitación a la temperatura en el intervalo de 30 - 60 °C, al tiempo que se supervisa la tendencia del pH y se controla mediante la adición del segundo ácido; cuando el valor de pH se estabiliza sin necesidad de la adición posterior del segundo ácido, la formación de ácido levofolínico cristalino es completa.

Por último, el sólido cristalino se puede recuperar por medios conocidos, tales como centrifugación y/o ultrafiltración, seguidos de secado del producto, por ejemplo mediante eliminación de los restos de disolvente a presión reducida.

25 El compuesto ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico en forma cristalina estable es un aspecto adicional de la invención. Este compuesto en forma cristalina estable no se ha notificado en la técnica anterior. La forma cristalina del compuesto se caracteriza por picos en los siguientes valores del ángulo 2θ en el diagrama del XRD (los valores 2θ se proporcionan con una aproximación de $\pm 0,2^\circ$):

14,4
30 17,3
17,7
18,3
19,7
20,0
35 22,1
23,3
27,3

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

40 Producción de ácido levofolínico cristalino

100 kg de levofolinato cálcico pentahidrato (166 mol) se suspenden en 500 litros (l) de agua purificada. La suspensión se calienta a 40 ° y después se descalcifica mediante la adición de 25 kg de carbonato sódico (236 mol); se añade ácido acético para mantener el pH del sistema en un valor de aproximadamente 8,0. El carbonato cálcico formado se elimina mediante centrifugación y la disolución de levofolinato sódico obtenida se aclara mediante
45 filtración fina. La disolución filtrada se diluye con agua hasta un volumen de 850 l y a la misma se añadieron 51 l de isopropanol, de modo que se forma una primera disolución. La primera disolución se añade progresivamente durante 1 hora en agitación a un lote hidroalcohólico formado mediante 350 l de agua y 35 l de isopropanol previamente calentado a 45°C. Durante esta adición, el pH se supervisa y se mantiene en el intervalo entre 3,5 y 4,0 mediante la adición progresiva de 50 l de una disolución al 25% de p.c. de HCl; la temperatura a su vez se reduce lentamente

hasta 35°C. Al final de la fase de adición (es decir la operación de añadir la primera disolución al lote hidroalcohólico), la disolución obtenida se mantiene a 35°C en agitación, al tiempo que controla el pH con adiciones posteriores de la misma disolución de HCl usada antes, hasta alcanzar un valor estable de 4,0; se añade un total de 50 litros de la disolución de HCl en dos fases. El ácido levofolínico cristaliza en la disolución obtenida durante la fase de adición y el posterior periodo de agitación. Después, el ácido levofolínico cristalizado se aísla mediante centrifugación, se lava con agua y se seca a presión reducida. Se obtienen 80 kg del producto.

Una primera muestra del producto obtenido de este modo se somete a un análisis de RMN de $^1\text{H-D}_2\text{O}$ a 400 MHz; una segunda muestra del lote del producto se somete a análisis XRD. Los espectros resultantes se notifican en la FIG. 1 y en la FIG. 2, respectivamente, y la identificación de señales en el espectro de RMN se indica en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Desplazamiento químico (ppm)	Número de protones	Multiplicidad	Atribución
1,8 - 2,1	2	multiplete	-CH- CH ₂ -CH ₂ -COOH
2,3	2	triplete	-CH-CH ₂ - CH ₂ -COOH
2,8 - 3,4	4	multiplete	- CH ₂ -CH*- CH ₂ -
4,3	1	multiplete	- CH -CH ₂ -CH ₂ -COOH
4,8	1	multiplete	-CH ₂ - CH *-CH ₂ -
6,2	2	singlete	-NH ₂
6,4	1	singlete	- NH -CH ₂ -CH-
6,6	2	multiplete	-CH= (anillo aromático)
7,0	1	singlete	-CH-CH ₂ - NH -
7,7	2	multiplete	-CH= (anillo aromático)
8,2	1	singlete	-CO-NH-CH-
8,8	1	singlete	-OH
10,3	1	singlete	-CHO
11,8 - 12,8	2	singlete (ancho)	-COOH (2 x)

Ejemplo 2

Dos muestras del producto obtenido en el ejemplo 1 se someten a pruebas de estabilidad acelerada y pruebas de estabilidad a largo plazo, respectivamente; las pruebas se realizan de acuerdo con las condiciones de la ICH.

Acelerada: 40 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ de humedad relativa

A largo plazo: 25 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ de humedad relativa

Los métodos analíticos usados para los estudios de estabilidad se describen en la monografía del levofolínico de la Farmacopea Europea. Los resultados de la prueba acelerada se indican en la Tabla 2, mientras que los resultados de la prueba a largo plazo se indican en la Tabla 3. Tanto en la Tabla 2 como en la tabla 3, "n.a." quiere decir no analizado; 1) indica que el % del área se ha calculado sobre la base de la absorción de ácido folínico a 280 nm; y 2) indica que el mismo ensayo de ácido levofolínico se ha calculado sobre la base anhidra y sin disolvente.

Tabla 2

Parámetro	Especificación	Tiempo transcurrido (meses)		
		0	3	6
Aspecto	Polvo de color blanco o amarillo claro	Conforme	Conforme	Conforme
Aspecto de una disolución al 1,0% en p/v en disolución de tampón Tris corregida a pH =8,1				
- Claridad	Transparente	< N° 1	< N° 1	< N° 1
- Absorbancia a 420 nm	≤ 0,25	0,06	0,05	0,06
Rotación óptica de una disolución al 1,0% en p/v en disolución de Tris corregida a pH =8,1	-9,5° a -15,5°	-12,8	n.a.	n.a.
Contenido en agua (%)	≤ 2,0	0,8	0,8	1,1
Sustancias relacionadas:				
- PABG (A) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	0,13
- N ⁹ -N ¹⁰ -diformil-THF (B) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Ácido fólico (C) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Ácido N ¹⁰ -CHO-fólico (D) (% m/m)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Ácido 5-CHO-4H-Pterico (E) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	0,36	0,37	0,33
- Ácido N ¹⁰ -CHO-dihidrofólico (F) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	0,16	0,25
- Ácido dihidrofólico (G) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Cualquier impureza individual desconocida	≤ 0,25 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Suma de todas las sustancias relacionadas (% área)	≤ 2,0 ¹⁾	0,57	0,63	0,84
Contenido en ácido dextrofolínico (H)	≤ 0,50%	< 0,10	n.a.	< 0,10
Ensayo de ácido levofolínico (% m/m) ²⁾	98,0 - 102,0%	99,7	99,9	99,0

Tabla 3

Parámetro	Especificación	Tiempo transcurrido (meses)							
		0	3	6	9	12	18	24	36
Aspecto	Polvo de color blanco o amarillo claro	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Aspecto de una disolución al 1,0 % en p/v en disolución de Tris corregida a pH=8,1									
- Claridad	Transparente	< N° 1	< N° 1	< N° 1	< N° 1	< N° 1	< N° 1	< N° 1	< N° 1
- Absorbancia a 420 nm	≤ 0,25	0,06	0,05	0,06	0,04	0,06	0,05	0,06	0,08
Rotación óptica de una disolución al 1,0 % en p/v en disolución de Tris corregida a pH=8,1	-9,5° a -15,5°	-12,8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-13,1°	n.a.	14,9°
Contenido en agua (%)	≤ 2,0	0,8	0,8	0,9	1,0	1,1	0,9	0,7	1,0
Sustancias relacionadas:									
- PABG (A) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	0,10	< 0,10	0,11	0,11	0,13	0,16
- N ⁵ -N ¹⁰ -diformil-THF (B) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Ácido fólico (C) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Ácido N ¹⁰ -CHO-fólico (D) (% m/m)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Ácido 5-CHO-4H-Pterico (E) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	0,36	0,31	0,34	0,35	0,34	0,36	0,31	0,33
- Ácido N ¹⁰ -CHO-dihidrofólico (F) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	0,13	0,15	0,15	0,18	0,17	0,16	0,25
- Ácido dihidrofólico (G) (% área)	≤ 0,80 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Cualquier impureza individual desconocida	≤ 0,25 ¹⁾	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
- Suma de todas las sustancias relacionadas (% área)	≤ 2,0 ¹⁾	0,57	0,49	0,70	0,55	0,63	0,63	0,66	0,73
Contenido en ácido dextrofolínico (H)	≤ 0,50 %	< 0,10	n.a.	< 0,10	n.a.	n.a.	n.a.	< 0,10	< 0,10
Ensayo de ácido levofolínico (% m/m) ²⁾	98,0 - 102,0 %	99,7	100,6	98,8	99,4	99,4	100,2	99,4	99,6

Resumen de los resultados

El espectro de RMN indicado en la FIG. 1 y las atribuciones de las señales del mismo indicadas en la Tabla 1 confirman que el producto obtenido siguiendo el procedimiento del ejemplo 1 es ácido levofolínico.

El diagrama de XRD indicado en la FIG. 2 confirma que el producto es completamente cristalino.

5 Las entradas en la fila "Ensayo de ácido levofolínico" e las Tablas 2 y 3 confirman que el producto obtenido es, de hecho, el deseado, mientras que algunos valores de "Especificaciones" en las mismas tablas confirman que el producto se obtiene esencialmente puro y en forma 6S diastereoisomérica esencialmente pura (el ácido dextrofolínico solo está presente en restos).

10 Por último, los datos de estabilidad de las tablas 2 y 3 indican que, sorprendentemente, el ácido levofolínico cristalino puro obtenido de acuerdo con la invención es estable y puede permanecer inalterado, durante una vida de almacenamiento de hasta tres años; a este respecto, el producto de la invención tiene mejores propiedades que el levofolinato cálcico de la técnica conocida o que el ácido levofolínico amorfo obtenido como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.134.235.

REIVINDICACIONES

1. Ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino, estable en forma diastereoisómera 6S fundamentalmente pura, caracterizado por tener una pureza diastereoisomérica de la forma S de al menos 98%.

5 2. Preparación farmacéutica que comprende ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino, estable en forma diastereoisómera 6S fundamentalmente pura según la reivindicación 1.

10 3. Uso del ácido (6S)-N(5)-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico cristalino, estable en forma diastereoisómera 6S fundamentalmente pura según la reivindicación 1 para la preparación de un complemento dietético o de un medicamento:

- para el tratamiento y/o el control de tumores humanos y/o animales; y/o
- para ejercer una influencia sinérgica en un compuesto para controlar el cáncer; y/o
- para la reducción de la toxicidad de un compuesto para controlar el cáncer; y/o
- para la elaboración de una preparación de vitaminas.

15

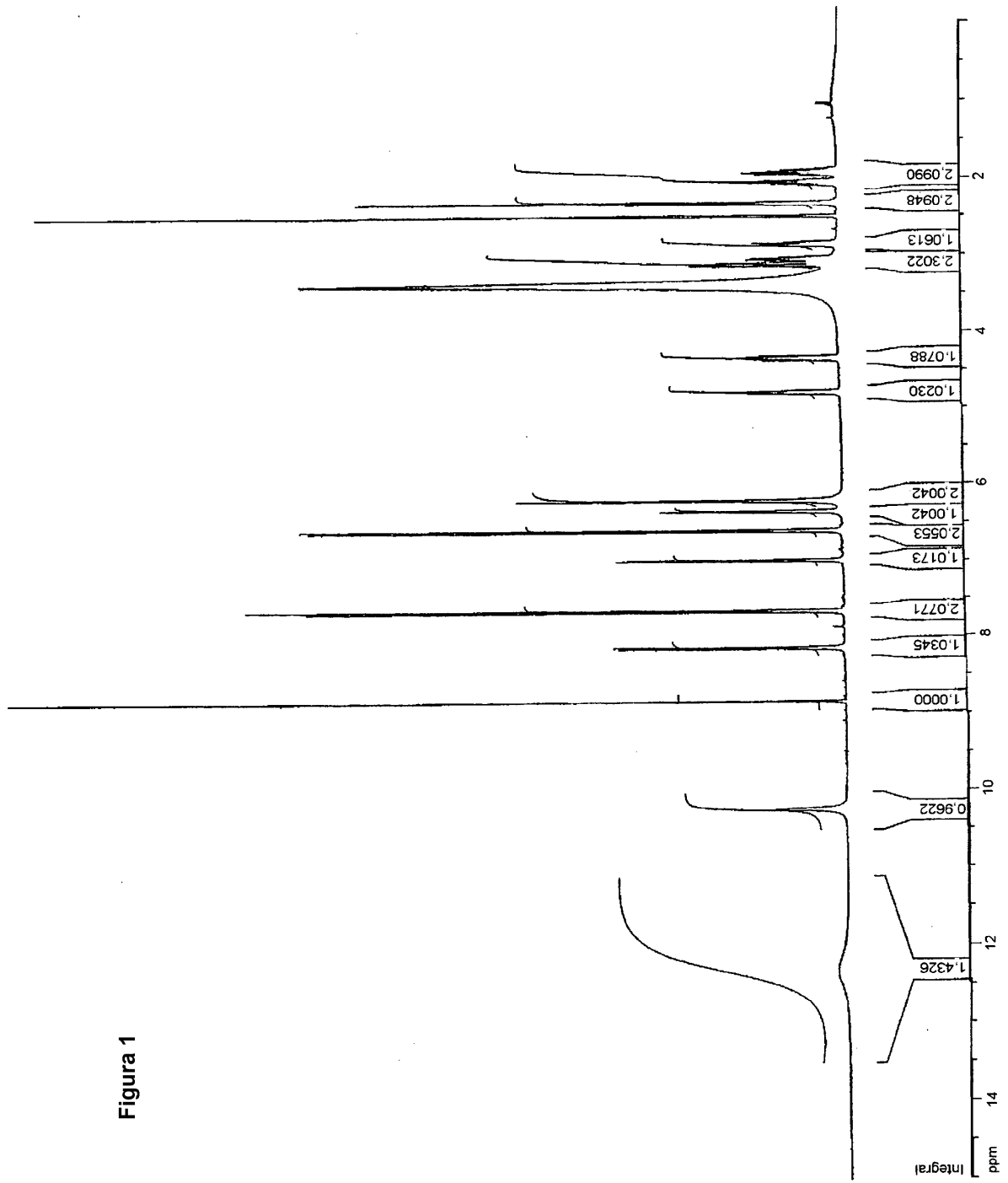


Figura 1

Figura 2

