

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 474**

51 Int. Cl.:

C07D 475/04 (2006.01)

C07D 487/14 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2014 PCT/EP2014/067447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15022407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2014 E 14758102 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 3033344**

54 Título: **Nueva sal estable del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico**

30 Prioridad:

14.08.2013 EP 13004050

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**MERCK & CIE (100.0%)
Im Laternenacker 5
8200 Schaffhausen, CH**

72 Inventor/es:

**MOSER, RUDOLF;
GROEHN, VIOLA;
EGGER, THOMAS y
AMMANN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 654 474 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

Nueva sal estable del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico

Campo de la tecnología

5 La presente invención va dirigida a la sal hemisulfato del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico, preferiblemente en forma sustancialmente cristalina, así como composiciones farmacéuticas y sus usos en terapia, preferiblemente quimioterapia.

Antecedentes de la invención

10 El folato reducido 5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolato (5,10-CH₂-THF) es conocido por su eficacia como agente citostático y se ha administrado preferiblemente en combinación con pirimidinas fluoradas, como 5-fluorouracilo (5-FU), para el tratamiento de tumores sólidos (Seley, K. L. IDrugs 4 (1), 99, 2001). 5,10-CH₂-THF consigue su efecto quimioterapéutico junto con el análogo de base y el metabolito de 5-FU 5-FdUMP inhibiendo la enzima timidilato sintetasa (TS). TS cataliza la conversión de desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato (dTMP), que es un componente esencial para la síntesis de ADN. La desactivación de la TS se produce mediante la formación de un complejo ternario covalente de inhibición entre la TS, el análogo de base 5-FdUMP, que es un metabolito de 5-FU, y 5,10-CH₂-THF. Se puede lograr una mejora del efecto citotóxico de 5-FU aumentando la concentración intracelular de 5,10-CH₂-THF, tras lo cual aumenta la estabilidad del complejo ternario. Esto causa la inhibición directa de la síntesis y reparación del ADN, lo que finalmente tiene como consecuencia la muerte celular y el retraso del crecimiento tumoral.

20 No obstante, existen propiedades no deseadas asociadas con 5,10-CH₂-THF, lo que, hasta la fecha, limita su uso farmacéutico. Es bien conocido que para ser apropiado para su uso farmacéutico, un principio activo (como 5,10-CH₂-THF) necesita cumplir varios requisitos que incluyen (i) alta estabilidad (química, isomérica, cristalina) del propio principio activo, así como de las composiciones farmacéuticas del mismo, de modo que sea posible una conservación efectiva durante un periodo aceptable de tiempo, sin que muestre un cambio significativo en las características fisicoquímicas del principio activo, (ii) alta pureza (química, isomérica, cristalina) del principio activo, (iii) fácil manipulación y procesamiento del principio activo para permitir transferir el principio activo a formulaciones adecuadas, etc.

30 5,10-CH₂-THF es un producto de adición de ácido tetrahidrofólico (THF) y formaldehído (véase, p. ej., Poe, M. y col. Biochemistry 18 (24), 5527, 1979; Kallen, R. G. Methods in Enzymology 18B, 705, 1971) y es conocido por su sensibilidad extremadamente alta a la oxidación por el aire, así como por su inestabilidad en entornos neutros y/o ácidos causantes potencialmente de degradación química y/o hidrólisis (véase, p. ej., Odin, E. y col., Cancer Investigation 16 (7), 447, 1998; Osborn, M. J. y col., J. Am. Chem. Soc. 82, 4921, 1960; Hawkes, J. y Villota, R. Food Sci. Nutr. 28, 439, 1989). Entre los intentos por estabilizar 5,10-CH₂-THF se incluyeron, por ejemplo. (i) exclusión rigurosa del oxígeno atmosférico mediante el uso de dispositivos técnicos especiales para la reconstitución de formulaciones sólidas y la inyección de 5,10-CH₂-THF en un entorno sin aire (véase, p. ej., Odin, E. y col., Cancer Investigation 16 (7), 447, 1998; patente de EE. UU. N.º 4 564 054); (ii) adición de un agente reductor como el ácido L(+)-ascórbico o sus sales, gamma-glutatión reducido, beta-mercaptoetanol, tioglicerol, N-acetil-L-cisteína, etc. como antioxidante para 5,10-CH₂-THF altamente sensible y para THF en particular; (iii) estabilización por medio de compuestos de inclusión de ciclodextrina (véase, p. ej., el documento EP 0 579 996 B1); (iv) adición de citrato mientras se ajusta el pH a un valor básico (véase, p. ej., el documento EP 1 641 460 B1); o (v) formación de varias sales como la sal sulfato (véase, p. ej., el documento EP 0 537 492 B1).

40 No obstante, sigue existiendo una gran necesidad de compuestos de 5,10-CH₂-THF estabilizados que muestren una alta pureza (química, isomérica y/o cristalina) y/o posean una alta estabilidad tanto como compuestos como cuando se formulan en composiciones farmacéuticas, y que aún se puedan preparar, purificar y aislar de forma eficiente y/o sean susceptibles de manipulación (p. ej., solubilidad aceptable en solventes farmacéuticamente aceptables, fluidez y tamaño de partícula) y/o formulación con descomposición o cambio despreciable de las características físicas y químicas del compuesto, preferiblemente formulado a un elevado porcentaje molar (para minimizar la cantidad de material que debe formularse y administrarse para obtener una dosis terapéuticamente eficaz).

50 Aún, no se puede prever la existencia de una forma sólida estable (polimórfica) de un compuesto químico (conocido) con estas propiedades adecuadas. Tampoco es predecible cuál puede ser la naturaleza de una forma tan sólida, es decir, si es una forma salina, anhidro, hidratada o solvatada, y mucho menos las condiciones específicas bajo las cuales se puede aislar un polimorfo específico (p. ej., condiciones de cristalización y variables, tales como solvente, temperatura, pH, etc.). La elección y el control de dichos parámetros son cruciales para la obtención de la forma sólida deseada en alta pureza, estabilidad y procesabilidad. Estos son factores importantes, que afectan directamente a las propiedades y rendimiento de los productos y su futuro uso. Es imposible predecir cuál de las muchas variables (es

decir, pH de la solución, temperatura, presión, tiempo, composición de la solución, tipo y concentración de aditivos) será el factor determinante.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que la transformación del isómero (6R) de 5,10-CH₂-THF [(6R)-5,10-CH₂-THF] a su sal hemisulfato proporciona una excelente estabilidad al compuesto, así como a sus composiciones farmacéuticas y, de este modo, supera las conocidas desventajas discutidas previamente. Las ventajosas características de estabilidad de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF permitirá el uso eficaz de este compuesto en aplicaciones médicas.

Resumen de la invención

10 La presente invención va dirigida a un primer aspecto de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (en adelante denominada también sal hemisulfato de la invención o compuesto de la invención).

Preferiblemente, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF está en forma químicamente y/o isoméricamente y/o cristalina pura, más preferiblemente, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF está en forma sustancialmente cristalina.

15 En realizaciones específicas, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF está en forma anhidro, por tanto, en una realización preferida la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF está en forma anhidro cristalina.

Preferiblemente, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF está en forma cristalina caracterizada por una o más posiciones de los picos del patrón de rayos X en un ángulo de difracción 2θ de 4,7°; 17,9° y 23,3° expresado en 2θ ± 0,2° 2θ (radiación Kα de Cu).

20 En realizaciones específicas, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se caracteriza porque proporciona un espectro FT-Raman que contiene picos en números de onda (expresados en ±2 cm⁻¹) de 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 y 363 cm⁻¹.

25 En un aspecto adicional, la presente invención va dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden una sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, que comprende además opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional que incluye, pero sin limitaciones, bactericidas, antibióticos, antivirales, antisépticos, antineoplásicos, compuestos anticancerosos tales como agentes quimioterapéuticos, antifúngicos y/o agentes antiinflamatorios y otros agentes bioactivos o terapéuticos que son adecuados para uso humano, en particular compuestos anticancerosos tales como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo 5-FU y derivados, y antifolatos, por ejemplo, metotrexato, pemetrexed.

30 En un aspecto adicional, la presente invención va dirigida al uso de una sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (o sus composiciones farmacéuticas) en terapia, preferiblemente en quimioterapia contra el cáncer.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Espectro Raman de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1), registrado usando un nivel de potencia láser nominal de 300 mW y 64 barridos.

35 Figura 2 (a): Difractograma de rayos X de polvo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1) registrado en el modo de reflexión; 2 (b): Difractograma de rayos X de polvo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1) registrado en el modo transmisión; 2 (c): comparación del patrón de difracción de rayos X de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1) registrado en modo transmisión (curva superior A) con un registro del mismo compuesto registrado en modo reflexión (curva inferior B); 2 (d): Comparación del patrón de difracción de rayos X de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1) (curva superior A) con un patrón de difracción de rayos X de la sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (curva inferior B) registrada en el modo transmisión.

Figura 3: Termograma de TG-FTIR de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1). «A» indica un cambio de masa del -0,5 % (debido a la pérdida de agua) y «B» indica un cambio de masa del -14,53 % (debido a la descomposición).

Figura 4: Termograma de DSC de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1; primer barrido: línea continua; segundo barrido [después del enfriamiento rápido]: línea discontinua).

Descripción detallada

La presente invención va dirigida en un primer aspecto a una sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (también denominada compuesto de la invención o sal hemisulfato de la invención). En una realización, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF está en forma sustancialmente cristalina, más específicamente en forma anhidra cristalina.

5 Según se usa en este documento, (6R)-5,10-CH₂-THF se refiere a 5,10-CH₂-THF en su forma isomérica natural (ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico, ácido N-[4-[(6aR)-3-amino-1,2,5,6,6a,7-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-f]pteridin-8(9H)-il]benzoil]-L-glutámico), en donde los centros quirales en C6 del anillo pteridina y el carbono □ del resto ácido glutámico están en su configuración natural. Así, los términos «pureza isomérica» o «pureza estereoisomérica», como se usan en este documento, se refieren a la cantidad de (6R)-5,10-CH₂-THF en una muestra, que puede contener uno
10 o más isómeros distintos del mismo compuesto. Los términos «isoméricamente puro» o «estereoisoméricamente puro», como se usan en este documento, significan que el compuesto de la invención tiene un exceso isomérico del isómero de (6R)-5,10-CH₂-THF deseado superior a aproximadamente el 80 %, preferiblemente superior a aproximadamente el 90 %, preferiblemente superior a aproximadamente el 95 %, más preferiblemente superior a aproximadamente el 97 %, más preferiblemente superior a aproximadamente el 99 % o más, y lo más preferiblemente
15 hasta el 100 %, en donde el resto puede ser uno o más de los otros isómeros.

El término «forma cristalina» (o «polimorfo» o «forma de cristal») según se usa en este documento se refiere a una forma de estado sólido que consiste en un ordenamiento tridimensional específico de unidades estructurales. De este modo, las diferentes formas cristalinas del mismo compuesto surgen a partir del diferente empaquetamiento de las moléculas en el estado sólido, lo que tiene como resultado diferentes simetrías cristalinas y/o parámetro de celda
20 unitaria. Típicamente, diferentes formas sólidas o cristalinas tienen una o más propiedades físicas y/o químicas diferentes, tales como perfiles de solubilidad diferentes, estabilidades termodinámicas y químicas diferentes, temperaturas de punto de fusión diferentes y/o patrones de difracción de rayos X diferentes, y de este modo se pueden distinguir mediante difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja (IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectrometría Raman, RMN en estado sólido, así como puntos de fusión, densidad, dureza, propiedades ópticas y
25 eléctricas, perfil de estabilidad y/o solubilidad, etc. La ausencia o el escaso ordenamiento tridimensional regular se describe típicamente mediante el término «amorfo».

El término «compuesto cristalino» (de la invención) se refiere a una forma sólida del compuesto de la invención que comprende cantidades discernibles de formas de cristal o polimorfos del compuesto de la invención, preferiblemente superiores al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de una (o más) formas de cristal o polimorfos del compuesto de la invención. La cantidad, grado y naturaleza de la cristalinidad del compuesto cristalino de la invención se puede
30 determinar mediante uno o más medios técnicos que incluyen microscopía óptica, microscopía electrónica, difracción de rayos X por el método de polvo, espectroscopía de RMN en estado sólido o microscopía de luz polarizada.

Según se usa en este documento, la expresión «sal hemisulfato» (de la invención) incluye todas sus realizaciones específicas y se proporciona preferiblemente en forma químicamente y/o (estereo)isoméricamente y/o cristalina pura.
35 En una realización específica, está en forma sustancialmente cristalina, más específicamente en forma anhidra cristalina (en adelante denominada forma cristalina de tipo 1).

El término «pureza cristalina», según se usa en este documento, se refiere al porcentaje de una forma cristalina en particular de un compuesto en una muestra, que puede contener la forma amorfa del compuesto, una o más formas cristalinas del compuesto (distintas de la forma cristalina particular del compuesto), o una mezcla de las mismas. El
40 término «forma sustancialmente cristalina», según se usa en este documento, se refiere a al menos aproximadamente el 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 90 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % de pureza cristalina, preferiblemente aproximadamente el 97 % de pureza cristalina, más preferiblemente aproximadamente el 99 % o más de pureza cristalina y lo más preferiblemente aproximadamente el 100 % de pureza cristalina. La pureza cristalina se determina mediante difracción de rayos X por el método de polvo (DRXP),
45 espectroscopía Raman y otros métodos de estado sólido.

El término «pureza química», según se usa en este documento, se refiere al porcentaje en una muestra de un compuesto en particular. El término «pureza química sustancial», según se usa en este documento, se refiere a un compuesto de la invención en aproximadamente el 80 % de pureza química, preferiblemente aproximadamente el
50 90 %, más preferiblemente aproximadamente el 95 %, más preferiblemente aproximadamente el 97 %, más preferiblemente aproximadamente el 98 % de pureza química, y lo más preferiblemente el 99 % o más del 99 % o hasta el 100 % de pureza química, determinada mediante HPLC. Las impurezas químicas pueden incluir material de partida sin reaccionar (incluidos solventes), productos de degradación de (6R)-5,10-CH₂-THF (como THF), etc.

Como se indica anteriormente, la forma cristalina de la sal hemisulfato de la invención (y su pureza) se pueden identificar, caracterizar y distinguir de otras formas salinas, tales como otras formas de sal sulfato, mediante firmas
55 únicas en estado sólido con respecto a, por ejemplo, la difracción de rayos X por el método de polvo (DRXP),

espectroscopia Raman infrarroja y otros métodos en estado sólido, como demuestran los datos proporcionados en este documento.

Por tanto, en una realización específica, la presente invención proporciona una forma cristalina de la sal hemisulfato anhidro de (6R)-5,10-CH₂-THF (en adelante denominada también forma cristalina de tipo 1), caracterizada porque proporciona:

(i) un patrón de difracción de rayos X por el método de polvo (DRXP) que proporciona espaciados reticulares calculados (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación K α de Cu]) en 4,7°; 17,9° y 23,3°, preferiblemente 4,7°; 16,6°; 17,9°; 18,4°; 18,9°; 20,2°; 23,3°; 23,5°; 24,3° y 24,7°; y/o

(ii) un espectro FT-Raman que contiene picos en números de onda (expresados en $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) de 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 y 363 y/o

(iii) un espectro IR que tiene una o más bandas de absorción según la tabla 3.

En realizaciones preferidas, la sal hemisulfato (tipo 1) de la presente invención se caracteriza porque al menos 2 de los siguientes 10 picos de DRXP (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación K α de Cu]) en 4,7°; 16,6°; 17,9°; 18,4°; 18,9°; 20,2°; 23,3°; 23,5°; 24,3° y 24,7°; preferiblemente 4,7°; 17,9° y 23,3° y al menos 2 de los siguientes 9 picos de FT-Raman (expresados en $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) de 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 y 363.

En otras realizaciones preferidas, la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1) de la presente invención proporciona un espectro FT-Raman sustancialmente de acuerdo con la figura 1 y/o picos como se recoge en la tabla 1 y/o un patrón de difracción de rayos X por el método de polvo (DRXP) sustancialmente de acuerdo con la figura 2(a) y/o picos como se recoge en la tabla 2.

Tabla 1:

Tabla de picos Raman (intensidad mf = muy fuerte, f = fuerte, m = media, d = débil, md = muy débil).

Número de onda [cm^{-1}]	Intensidad (cualitativa)
3019	d
2933	m
2880	m
1672	f
1656	f
1603	mf
1553	m
1474	m
1373	m
1337	m
1301	f

ES 2 654 474 T3

1207	m
1127	d
975	m
884	m
815	d
700	d
665	d
637	f
624	f
363	m

Tabla 2: Tabla de picos de difracción de rayos X por el método de polvo expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ (radiación $K\alpha$ de Cu) (intensidad mf = muy fuerte, f = fuerte, m = media, d = débil, md = muy débil).

Ángulo en $2\theta^\circ$	Espaciados d en Å	Intensidad (cualitativa)
4,7	18,8	mf
9,4	9,4	md
11,6	7,6	d
11,8	7,5	d
12,5	7,1	md
13,6	6,5	md
14,2	6,2	m
16,6	5,35	f
16,8	5,28	m
17,9	4,96	mf

ES 2 654 474 T3

18,4	4,83	f
18,9	4,68	f
20,2	4,38	f
21,0	4,23	d
21,7	4,09	d
23,3	3,82	mf
23,5	3,78	f
24,0	3,70	m
24,3	3,66	f
24,7	3,60	m
25,1	3,54	m
26,2	3,40	m
26,5	3,36	m
27,0	3,30	m
28,0	3,18	d
29,2	3,05	m
30,4	2,94	d
31,0	2,88	d
31,7	2,82	d
35,5	2,53	d

Tabla 3: Espectro IR de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (tipo 1) con bandas de absorción en cm⁻¹ y su asignación.

Banda de absorción (cm ⁻¹)	Asignación
3346	Tensión de OH y NH
3168	OH de puentes de hidrógeno intramoleculares, tensión de CH ₂
1709, 1654	Vibración de tensión de CO de amida monosustituida
1612	Vibración de tensión simétrica y asimétrica de COO ⁻
1560, 1504	Tensión de anillo arilo y pirimidina
1397, 1300	Vibración de tensión simétrica y asimétrica de COO ⁻
824	Cabeceo del hidrógeno adyacente de arilo de anillo aromático sustituido en para

- 5 El compuesto de esta invención se caracteriza de forma más eficiente y se distingue de los compuestos relacionados mediante el patrón de difracción de rayos X por el método de polvo, como se determina según procedimientos que son conocidos en la técnica (véase, p. ej., J. Haleblain, J. Pharm. Sci. 64:1269, 1975; J. Haleblain y W. McCrone, J. Pharm. Sci. 58:911, 1969). La figura 2(d), que muestra un patrón de difracción de rayos X de una sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF como se prepara en los ejemplos en comparación con un patrón de difracción de rayos X de la sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF, ilustra claramente el patrón distintivo de estas dos sales.
- 10 Aunque se sabe que las intensidades relativas de los picos pueden variar, dependiendo de la técnica de preparación de la muestra, del procedimiento de montaje de la muestra y del instrumento empleado en particular, el compuesto de la invención se puede identificar mediante picos distintivos y localizaciones del pico características del polimorfo específico (con una variación menor en las asignaciones de picos de aproximadamente ±0,5 grados 2theta (2θ), preferiblemente ±0,2 grados 2theta (2θ) (radiación Kα de Cu).
- 15 Los compuestos de la invención están en forma anhidra no solvatada, lo que incluye compuestos que están completamente libres de agua y compuestos que pueden contener trazas de agua. Este posible contenido de agua (no estequiométrica) residual puede ser cualquier cantidad de agua, aunque normalmente oscila del 0 % en peso de H₂O al 3 % en peso de H₂O, preferiblemente entre el 0 % en peso de H₂O y el 1 % en peso de H₂O.
- 20 El compuesto hemisulfato de la invención se puede conservar en forma sólida, como por ejemplo en forma de polvo o liofilizado, o como un líquido.
- 25 En una realización específica, los compuestos de la invención se preparan mediante la adición de una solución acuosa de formaldehído de (6S)-THF a una solución acuosa de ácido sulfúrico (o una solución acuosa de ácido acético y ácido sulfúrico) y permitiendo que se produzca la cristalización de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF. Esta reacción de cristalización se realiza a temperaturas elevadas, por ejemplo, a una temperatura de más de 35 °C. En particular, los métodos de preparación de la sal hemisulfato cristalina de (6R)-5,10-CH₂-THF comprenden los pasos de (i) hacer reaccionar una solución de ácido (6S)-tetrahidrofólico con una solución acuosa de formaldehído para obtener (6R)-5,10-CH₂-THF en solución (según procedimientos conocidos), (ii) añadir el (6R)-5,10-CH₂-THF en solución obtenido a una solución acuosa de ácido sulfúrico (o alternativamente a una solución acuosa de ácido acético y ácido sulfúrico) a una temperatura de más de 35 °C, preferiblemente entre 35 °C y 70 °C, más preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, lo más preferiblemente 40 °C y 50 °C para permitir que se produzca la cristalización del hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF, y (iii) aislar, por ejemplo mediante filtración, la sal hemisulfato cristalina de (6R)-5,10-CH₂-THF obtenida.
- 30

El paso (i) se puede realizar según procedimientos conocidos como se describe en los ejemplos.

En el paso (ii), la solución transparente obtenida se puede añadir a una solución de ácido sulfúrico (o a una solución acuosa de ácido acético y ácido sulfúrico) a una temperatura de aproximadamente 40 a 50 °C, permitiendo la cristalización selectiva del producto deseado. Opcionalmente, una vez completada la adición, la mezcla de reacción obtenida se puede agitar a una temperatura de aproximadamente 40 a 50 °C, durante un máximo de 5 horas, posteriormente, el producto cristalizado se filtra o se centrifuga a la misma temperatura, opcionalmente se lava con agua y se seca.

En un aspecto adicional, la presente invención va dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden (una cantidad terapéuticamente eficaz de) la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable (también denominada composición farmacéutica de la invención) para la administración a un paciente. El término «farmacéuticamente aceptable» según se usa en este documento indica que el vehículo está aprobado o reconocido para uso en animales, y más en particular en humanos, es decir, no es tóxico para el huésped o el paciente. Además, un vehículo de elección no interferirá con la eficacia de la actividad biológica del principio activo. El término «vehículo» se refiere a cualquier material auxiliar necesario para el modo en particular de administración de elección e incluye, por ejemplo, solventes (diluyentes), excipientes u otros aditivos con los que el compuesto de la invención se administra. Normalmente, entre los vehículos farmacéuticos diluyentes utilizados se incluyen líquidos estériles, tales como soluciones acuosas y aceites (p. ej., de origen sintético, vegetal, animal o de petróleo), por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Normalmente, entre los líquidos acuosos utilizados se incluyen agua, soluciones salinas, soluciones acuosas de dextrosa y glicerol y similares. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen ácido cítrico, ácido ascórbico, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Opcionalmente, la composición puede contener aditivos, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH o aglutinantes. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en «Remington's Pharmaceutical Sciences» de E.W. Martin (18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

Opcionalmente, una composición farmacéutica de la invención puede comprender además al menos un agente terapéutico adicional. En realizaciones específicas, el al menos un agente terapéutico adicional se puede seleccionar entre compuestos bactericidas, antibióticos, antivirales, antisépticos, antineoplásicos, anticancerosos tales como agentes quimioterapéuticos, antifúngicos y/o agentes antiinflamatorios u otros agentes bioactivos o terapéuticos que son adecuados para uso humano, en particular compuestos anticancerosos tales como agentes quimioterapéuticos. Un fármaco anticanceroso, tal como un agente quimioterapéutico, puede incluir, pero sin limitaciones, agentes quimioterapéuticos que comprenden miembros de unión específica, proteínas, ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos (como por ejemplo, pero sin limitaciones, moléculas complementarias, ribozimas y ARNip), lípidos, esteroides, moléculas grandes, moléculas pequeñas o metales. El uno o más fármacos anticancerosos pueden comprender uno o más agentes quimioterapéuticos, como por ejemplo, pero sin limitaciones: ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos fluorados (p. ej., 5-fluorouracilo o un análogo o profármaco del mismo), antifolatos (p. ej., pemetrexed, raltitrexed, lometrexol), inhibidores de topoisomerasas (p. ej., irinotecán, topotecán), fármacos antimetabolitos (p. ej., metotrexato, gemcitabina, tezacitabina), moduladores de 5-FU, agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, carmustina), inhibidores de la biosíntesis de ácidos nucleicos (tales como mitomicina), antraciclina (p. ej., epirubicina, doxorubicina), derivados de platino (p. ej., cisplatino, oxaliplatino, carboplatino), fármacos que alteran los microtúbulos (p. ej., paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, vincristina), fármacos bloqueantes de hormonas (p. ej., tamoxifeno), inhibidores de quinasas, como por ejemplo, pero sin limitaciones, receptores y no receptores tirosina quinasas (p. ej., Iressa, Tarceva, SU5416, PTK787, Gleevec), inhibidores de proteosomas (p. ej., bortezomib), moduladores inmunológicos (p. ej., levamisol), fármacos antiinflamatorios, inhibidores de la vascularización, citoquinas (p. ej., interleuquinas, factores de necrosis tumoral) y fármacos que inhiben la actividad de citoquinas, hormonas, o receptores de citoquinas u hormonas (p. ej., el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab o «Avastin»). Entre los fármacos anticancerosos también se pueden incluir anticuerpos monoclonales, como por ejemplo, pero sin limitaciones, anticuerpos monoclonales que se unen a citoquinas, hormonas o receptores de hormonas (p. ej., anticuerpos que bloquean la activación de los factores de crecimiento EGF o VEGF, como Avastin, Erbitux, Herceptin), etc.

Los compuestos de la invención o sus composiciones farmacéuticas se pueden usar para terapia, específicamente en quimioterapia contra el cáncer, es decir, en un método de tratamiento del cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal hemisulfato de la invención o sus composiciones farmacéuticas a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención va dirigida además a una sal hemisulfato de la invención (o sus composiciones farmacéuticas) para su uso en terapia, preferiblemente en quimioterapia, es decir, en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de cánceres que se pueden tratar según la invención se incluyen, pero sin limitaciones, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y mesotelioma.

Una composición farmacéutica adecuada de la invención se puede adaptar a la administración oral, parenteral o rectal y, de este modo, puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, liofilizados, gránulos, pastillas, polvos para reconstituir, soluciones o suspensiones para inyección o infusión, o supositorios. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas están en una forma adecuada para administración parenteral, tales como por vía intravenosa o intramuscular, subcutánea, intraarterial.

Para administración parenteral, las formas de dosis unitarias líquidas típicamente comprenden un compuesto de la invención, opcionalmente un agente terapéutico adicional, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para formar, por ejemplo, soluciones a base de agua o suspensiones a base de aceite (o sus liofilizados). El compuesto, dependiendo de la presencia de otros agentes terapéuticos, el vehículo y la concentración usada, puede resuspenderse o disolverse en un vehículo. Para soluciones parenterales, el compuesto se puede disolver para inyección y esterilizar mediante filtración antes de cargarlo en una ampolla o vial adecuado y sellarlo. Opcionalmente, se disuelven en el vehículo adyuvantes como un anestésico local, conservantes y agentes tamponadores. Si se desea, las soluciones obtenidas se pueden someter a liofilización (es decir, la composición se puede congelar después de cargarla en el vial y eliminar el agua al vacío). Para soluciones parenterales, el compuesto se resuspende en el vehículo (en lugar de disolverse) y la esterilización preferida incluye la exposición a óxido de etileno antes de la resuspensión en un vehículo estéril (como un vial o ampolla). Opcionalmente, se puede incluir un agente tensioactivo o humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del compuesto.

Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de dosis unitaria y pueden contener excipientes convencionales, como agentes de unión, cargas, lubricantes para comprimidos, disgregantes y agentes humectantes aceptables. Los comprimidos pueden estar recubiertos según los métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensión acuosa u oleosa, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden estar en forma de producto liofilizado para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de resuspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), conservantes y, si se desea, saborizantes o colorantes convencionales.

En caso de terapia combinada, en la que una composición farmacéutica de la invención comprende un compuesto de la invención y al menos un agente terapéutico adicional, los principios activos pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica o el al menos un agente terapéutico adicional puede administrarse por separado, es decir, como una composición farmacéutica independiente (y posiblemente diferente), opcionalmente por medio de vías de administración diferentes, ya sea simultánea o secuencialmente.

La dosis de los principios activos, es decir, del compuesto de la invención (y opcionalmente del al menos un agente terapéutico adicional), usado en un tratamiento como se describe en este documento, dependerá de diversos factores, que incluyen la edad y estado de salud del sujeto que va a ser tratado, el tipo y gravedad de la enfermedad que se va a tratar, la vía y frecuencia de administración y similares. Los expertos en el tratamiento del cáncer y en quimioterapia podrán determinar las pautas y cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto de la invención en monoterapia o en combinación con al menos un agente terapéutico adicional como se define anteriormente, en función de protocolos conocidos para evaluar la toxicidad y la eficacia.

El término «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a la cantidad del compuesto activo que provoca la respuesta biológica o al medicamento en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano que busca un profesional experto (p. ej., investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico o cuidador), que incluye (i) la prevención de la enfermedad y/o (ii) la inhibición de la enfermedad (p. ej., deteniendo el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología) y/o (iii) la mejora de la enfermedad (p. ej., revirtiendo la patología y/o sintomatología). Asimismo, el término «tratamiento» según se usa en este documento se refiere a (i) la prevención de la enfermedad y/o (ii) la inhibición de la enfermedad (p. ej., deteniendo el desarrollo de la patología y/o sintomatología) y/o (iii) la mejora de la enfermedad (p. ej., revirtiendo la patología y/o sintomatología).

Una composición farmacéutica de elección puede contener desde el 0,1 % al 99 % en peso, preferiblemente desde el 10 al 60 % en peso, del principio activo (es decir, el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con al menos un agente terapéutico adicional), dependiendo del método de administración.

Los intervalos de dosis típicos del compuesto de la invención que se van a usar en el tratamiento del cáncer pueden oscilar de 10 mg/m² a 1 g/m², preferiblemente de 50 mg/m² a 500 mg/m² (para el tratamiento del cáncer colorrectal) o también de 10 mg/m² a 200 mg/m² (para el tratamiento con metotrexato), y más preferiblemente de aproximadamente 100 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² (para el tratamiento del cáncer colorrectal) o también 50 mg/m² a 150 mg/m² (para el tratamiento con metotrexato).

Los siguientes ejemplos sirven como ilustración de la presente invención.

Ejemplos

5 *Calorimetría diferencial de barrido* (Thermal Analysis Q2000): crisoles de oro cerrados (herméticamente sellados); muestra cargada en condiciones ambientales o después de 3 minutos de equilibrio en un entorno de N₂; velocidad de calentamiento de 10 K min⁻¹; intervalo de -50 °C a 254 °C. Cuando se realizaron dos barridos con calentamiento, la muestra se enfrió rápidamente a -50 °C entre los barridos. Las temperaturas de transición enumeradas corresponden a las máximas y mínimas del pico, no a las temperaturas iniciales.

10 *Espectroscopía FT-Raman* (Bruker RFS100; con el software OPUS 6.5; análisis de los datos fuera de línea realizado con el software OPUS 7.0): excitación con Nd:YAG 1064 nm; 300 mW de potencia nominal del láser; detector de Ge; 64-256 barridos; intervalo espectral e 3500-100 cm⁻¹ usado para el análisis; resolución de 2 cm⁻¹.

RMN ¹H (Bruker DPX300): el espectro de RMN ¹H se registró usando una frecuencia de protones de 300,13 MHz, un pulso de excitación de 30° y un tiempo de reciclado de 1 s. Se acumularon 16 o 256 barridos y se usó DMSO deuterado como solvente. El pico de solvente se usó como referencia y los desplazamientos químicos se notificaron en la escala de TMS.

15 *RMN ¹³C* (Bruker AMX 300): el espectro de RMN ¹³C se obtuvo usando un espectrómetro Bruker AMX 300 equipado con una sonda TXO 5 mm. El hemisulfato se disolvió en NaOD 0,1 N. El espectro se midió a 303 K, con 4000 barridos y una resolución digital de 32 768 puntos de datos. Los desplazamientos químicos se dan en ppm con respecto al patrón interno de TSP (ácido (3-trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetrauteropropiónico, sal sódica).

20 *Difracción de rayos X por el método de polvo* (Bruker D8 Advance): radiación K α de cobre, 40 kV/40 mA, detector LynxEye, geometría de reflexión Bragg-Brentano, tamaño de paso 0,02° 2 θ , tiempo de paso 37 s, intervalo 2,5-50° 2 θ . Las muestras de polvo se midieron en soportes para muestra de silicio monocristalino de 0,1 mm o 0,5 mm de profundidad. No se utilizó ningún tratamiento especial en la preparación de las muestras aparte de la aplicación de una ligera presión para conseguir una superficie plana. Se usó una atmósfera de aire ambiente para todas las mediciones, y las muestras se rotaron durante la medición. En ausencia de cualquier información que indique lo contrario, los datos de difracción de rayos X se muestran como datos de reflexión.

25 *Difracción de rayos X por el método de polvo* (Stoe Stadi P.): radiación K α 1 de cobre, 40 kV/40 mA, detector Mythen1K, modo transmisión, monocromador de Ge curvado, tamaño de paso de 0,02° 2 θ , tiempo de paso 60 s, intervalo de barrido de 1,5-50,5° 2 θ con paso del detector de 1° 2 θ en modo barrido por pasos. Las muestras (10-20 mg de polvo) se midieron entre dos láminas de acetato. No se utilizó ningún tratamiento especial en la preparación de las muestras. Se usó una atmósfera de aire ambiente para todas las mediciones, y cada muestra se rotó durante la medición.

30 *TG-FTIR* (Netzsch Thermo-Microbalance TG 209 con espectrómetro FT-IR Bruker IFS 28): crisol de Al (con microorificio); atmósfera de N₂; velocidad de calentamiento 10 K min⁻¹; intervalo de 25 °C a 300 °C.

IR (FT-IR Paragon 1000): se registró el espectro infrarrojo en 100 barridos en un sistema de infrarrojo con transformada de Fourier de Perkin Elmer a partir de una muestra de hemisulfato prensada en un disco de bromuro.

35 **Ejemplo 1: Preparación de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF**

Se proporcionó una solución de ácido (6S)-tetrahidrofólico (16 mmol; 7,93 g) en 78,0 g de agua destilada en un matraz de fondo redondo a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. El pH de esta solución se ajustó a pH 11 mediante la adición (lentamente) de una solución de NaOH al 32 %. Tan pronto como la solución se hizo transparente, se añadió una solución de HCl 1,00 M hasta ajustar el pH de la solución a 8,3 a 25 °C. La solución transparente obtenida se enfrió a aproximadamente 0 °C, a cuya temperatura mostró un pH de 8,8. Mediante la adición de HCl 1 M se ajustó el pH a 8,6 y se añadieron 1,44 g de una solución de HCHO al 36,8 % (110 mol%) en una única porción. Tras completar la adición, la solución se agitó a 0 °C (baño de hielo) durante 1 hora. Se añadió carbón activado (0,2 g, Norit C Extra) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0 °C y a continuación se filtró en frío sobre un filtro de succión para obtener una solución transparente que se usó en el paso (b) sin purificación adicional.

45 (b) Se proporcionó una mezcla de 55 ml de H₂SO₄ 1 M (0,055 mol; 344 mol%) en un matraz de fondo redondo a 60 °C bajo atmósfera de N₂. Esta solución se añadió gota a gota durante un periodo de 15 minutos a la solución tal y como se obtuvo en el paso (a) y la mezcla de reacción obtenida se agitó a 50 °C durante 2 horas. A continuación, la mezcla de reacción se filtró a 50 °C sobre un filtro de succión, se lavó dos veces con 25 ml de agua destilada a temperatura ambiente y se secó a 30 °C y 10 mbar durante 12 horas (toda la noche) para obtener la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF en forma de cristales de color gris claro (7,36 g; rendimiento del 86 %). El producto obtenido tenía una pureza del 98,4 % determinada mediante HPLC, una pureza isomérica del 97,6 %

50

(isómero 6R). El análisis mediante DRXP mostró la forma cristalina de tipo 1 (para la caracterización completa véanse los ejemplos 2 y 3).

Ejemplo 2: Caracterización

- 5 (a) El espectro FT Raman de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF, registrado usando un nivel de potencia láser nominal de 300 mW y 64 barridos, se muestra en la figura 1.
- (b) El correspondiente difractograma de rayos X de polvo, registrado en el modo transmisión, se muestra en la figura 2.
- 10 (c) El termograma de TG-FTIR de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se muestra en la figura 3. Se realizó bajo flujo de N₂ (para evitar la degradación oxidativa). La muestra presenta una pérdida del 0,5 % en peso de H₂O de aproximadamente 40 °C a 210 °C, que es el agua residual (debido a la higroscopicidad o al secado incompleto). La descomposición se produce solo por encima de 210 °C.
- 15 (d) El termograma de DSC de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se muestra en la figura 4. Antes del primer barrido con calentamiento, la muestra se equilibró durante tres minutos bajo flujo de nitrógeno gaseoso y perdió el 0,6 % en peso de su masa durante este tiempo. Esto concuerda con el contenido en agua observado en el termograma de TG-FTIR (véase la figura 3) y confirma que esta agua está unida débilmente. La muestra se calentó posteriormente en un crisol de oro cerrado a 254 °C a 10 K min⁻¹, se enfrió rápidamente a -50 °C, y se calentó una segunda vez a 10 K min⁻¹. El único evento térmico en el primer barrido con calentamiento es un evento endotérmico a aproximadamente 247,4 °C ($\Delta H \approx 60,9 \text{ J g}^{-1}$), que es atribuible a la fusión. Este evento endotérmico posiblemente se solapa con el inicio de una degradación exotérmica. En el segundo barrido con calentamiento, se puede observar una transición vítrea a T_g $\approx 104 \text{ °C}$ ($\Delta C_p = 0,38 \text{ J g}^{-1}\text{K}^{-1}$), lo que confirma que la fusión se produjo en el primer barrido. No se observó ningún otro evento hasta 250 °C.
- 20 (e) El espectro IR se registró en una pastilla de KBr prensada y las bandas de absorción características se muestran en la tabla 3.
- (f) El espectro de RMN ¹H de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se registró en DMSO-d₆ y los desplazamientos químicos (d) en ppm se muestran en la tabla 8.

25 Tabla 8: RMN ¹H de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF con los desplazamientos químicos (d) en ppm (d = doblete, m = multiplete, t = triplete; con TSP a 0 ppm y solvente D₂O/NaOD 4,85 ppm)

δ (1H)	Multiplicidad	Intensidad
7,75	d	2H
6,62	d	2H
4,99	m	1H
4,33	m	1H
3,74	m	2H
3,52	m	1H
3,28	m	2H
2,91	m	1H
2,33	t	2H

2,17	m	1H
2,05	m	1H

(g) La RMN ^{13}C se registró en NaOD 0,1 N y los desplazamientos químicos (δ) en ppm respecto a TSP se muestran en la tabla 9.

5

Tabla 9: RMN ^{13}C de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF con los desplazamientos químicos (δ) en ppm (d = doblete, m = multiplete, t = triplete)

δ (13C)	Multiplicidad	δ (13C)	Multiplicidad
185,12	s	114,19	d
182,05	s	103,99	s
173,12	s	70,67	t
172,41	s	58,61	d
162,26	s	56,94	d
156,78	s	51,6	t
151,78	s	41,71	t
131,18	d	37,07	t
123,27	s	31,41	t

(h) El análisis de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF mediante microscopía óptica confirmó su cristalinidad. La muestra consistía en aglomerados de pequeñas partículas birrefringentes.

Ejemplo 3: Análisis de la estabilidad de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF

10

(a) El equilibrio de la suspensión de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF como material de partida a temperaturas distintas a la temperatura ambiente en diversos solventes y mezclas se resumen en la tabla 10:

Tabla 10: Estabilidad del equilibrio de la suspensión de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF

Solvente(s)	Temperatura (°C)	Duración (h: horas; d: días)	Observación
MeOH/ácido fórmico 1:1	50	2 h	Sin cambios
AcOH saturado con ácido L-ascórbico	50	1 d	Sin cambios

THF con ~2 mM de ácido L-ascórbico	40	3 d	Sin cambios
2-PrOH con ~2 mM de ácido L-ascórbico	40	3 d	Sin cambios
PEG4500/EtOH 1:9 saturado con ácido L-ascórbico	50	7 d	Sin cambios
H ₂ O	5	6 d	Sin cambios
ácido fórmico/THF 1:3	10-20	6 d	Sin cambios
AcOH saturado con ácido L-ascórbico	50	5 d	Sin cambios
MeCN saturado con ácido L-ascórbico	50	5 d	Sin cambios

(b) Estabilidad en etanol al 85 % a temperatura ambiente

5 La sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (3,01 g) se dispersó en 100 ml de EtOH al 85 % a temperatura ambiente y se agitó durante 5 h, a continuación se filtró y se secó a 30 °C y 8 mbar durante 12 horas (toda la noche). El análisis mediante DRXP mostró que el patrón de rayos X distintivo para la forma cristalina de tipo 1 permanecía invariable.

(c) Estabilidad a alta temperatura/baja presión

Se colocó la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (2,17 g) en una cámara de secado a 65 °C y 8 mbar durante 21 h. El análisis mediante DRXP mostró que el patrón de rayos X distintivo para la forma cristalina de tipo 1 permanecía invariable.

10 (d) Estabilidad a largo plazo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF y su composición farmacéutica

Para determinar las estabildades a largo plazo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF, los compuestos de la invención se conservaron al aire a 25 °C y al 60 % de humedad relativa. El contenido de sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF_restante se midió mediante HPLC a intervalos periódicos y se proporciona como comparación con el valor inicial (% rel.). Los resultados se muestran en la tabla 11.

15 Tabla 11: Estabilidad a largo plazo de tres lotes de producción diferentes de sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF

	Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (% rel.)							
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote 1)	100,0	99,7	99,5	99,6	99,2	99,2	99,4	98,5
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote 2)	100,0	99,9	99,9	100,0	99,7	99,4	99,4	99,0
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote 3)	100,0	99,5	99,5	99,4	99,1	99,0	99,0	

Para determinar las estabildades a largo plazo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF como composiciones farmacéuticas, más específicamente como liofilizados (preparado según el ejemplo 5), los liofilizados se conservaron en aire a 25 °C y al 60 % de humedad relativa. El contenido de sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF restante se

midió mediante HPLC a intervalos periódicos y se da como comparación con el valor inicial (% rel.). Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Estabilidad a largo plazo de cinco lotes de producción diferentes de sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF como liofilizado

	Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (% rel.)							
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote A)	100,0	100,1	100,2	99,9	100,0	99,7	100,0	
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote B)	100,0	100,1	99,9	100,0	99,8	99,7	100,1	
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote C)	100,0	99,6	99,7	99,8	99,5	99,6	99,2	98,6
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote D)	100,0	100,0	99,8	99,4	99,4	99,3	99,2	99,4 ¹⁾
Hemisulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (lote E)	100,0	100,1			99,7		99,4	98,9
¹⁾ Valor para 45 meses								

5

La tabla 11 y la tabla 12 muestran claramente que el hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF es muy estable durante un periodo largo de tiempo incluso a temperatura ambiente como compuesto puro, así como en forma de composición farmacéutica, como por ejemplo un liofilizado.

Ejemplo 4: Estabilidad comparativa de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF

10 Para comparar las estabildades a largo plazo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF, los compuestos de la invención, con las estabildades a largo plazo de la sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF preparada según el documento EP 0 537 492 B1, se han generado los datos de estabilidad para la sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF a diferentes temperaturas y humedades.

(a) Estabilidad del sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF

15 La sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se preparó según los procedimientos de la literatura (documento EP 0 537 492 B1) y se conservó durante 15 meses a -20 °C. Posteriormente, las muestras del producto se conservaron a 5 °C o también a 25 °C y el 60 % de humedad relativa o también a 40 °C y el 75 % de humedad relativa. El contenido de sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF restante en la muestra se midió mediante HPLC a intervalos periódicos. El contenido de sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se comparó con el valor inicial en el momento de la preparación (% rel.). Los resultados se muestran en las tablas 13 y 14.

20

Tabla 13: Estabilidad a largo plazo de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF a -20 °C

Temperatura/humedad relativa	Sulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (% rel.)	
	0 meses	15 meses
-20 °C	100,0	98,7

Tabla 14: Estabilidad a largo plazo posterior de la sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF a 5 °C, 25 °C/60 % hr, o también 40 °C/75 % hr

Temperatura/humedad relativa	Sulfato de (6R)-5,10-CH ₂ -THF (% rel.)	
	0 meses	6 meses
5 °C	98,7	97,3
25 °C/60 % hr	98,7	95,5
40 °C/75 % hr	98,7	95,0

5

Una comparación de los datos de las tablas 13 y 14 con los datos de estabilidad del hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF como se describe en el ejemplo 3 muestra claramente que

i) existe una importante diferencia en la estabilidad del hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF en comparación con el sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF y

10 ii) el hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF es mucho más estable durante un periodo largo de tiempo que el sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF.

(b) Contenido del producto de degradación ácido 10-formil-(6R)-tetrahidrofólico

15 La sal sulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF se preparó según los procedimientos de la literatura (documento EP 0 537 492 B1) y se conservó durante 15 meses a -20 °C. Posteriormente, las muestras del producto se conservaron a 5 °C o también a 25 °C y el 60 % de humedad relativa o también a 40 °C y el 75 % de humedad relativa. El contenido de ácido 10-formiltetrahidrofólico, un producto principal de la degradación, se midió mediante HPLC a intervalos periódicos y se presentaron como valores absolutos (% p/p). Los resultados se muestran en las tablas 15 y 16.

Tabla 15: Contenido del producto de degradación ácido 10-formiltetrahidrofólico cuando se conserva a -20 °C

Temperatura/humedad relativa	Ácido 10-formiltetrahidrofólico (% p/p)	
	0 meses	15 meses
-20 °C	0,53	1,37

20

Tabla 16: Contenido posterior del producto de degradación ácido 10-formiltetrahidrofólico cuando se conserva a 5 °C, 25 °C/60 % hr, o también 40 °C/75 % hr

Temperatura/humedad relativa	Ácido 10-formiltetrahidrofólico (% p/p)	
	0 meses	6 meses
5 °C	1,37	1,47
25 °C/60 % hr	1,37	1,89
40 °C/75 % hr	1,37	2,36

Ejemplo 5: Presentaciones farmacéuticas de la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF

- 5 (a) Liofilizado para reconstitución para su uso mediante aplicación intravenosa

A 18,480 kg de agua a 4 °C a la que se roció argón durante 1 hora, se añadieron 1,386 kg de NaOH 2 M y 968,9 g de citrato sódico trihidratado. La mezcla se agitó bajo atmósfera de argón a 4 °C hasta su completa disolución (pH 13,0). A continuación se añadieron 473,9 g de hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF usando 210 g de agua de aclarado a 4 °C saturada con argón (disolución lenta, pH 6,5). A continuación, se ajustó el pH con NaOH 2 M a $9,3 \pm 0,1$ (121,8 g). Se añadieron 203,6 g de agua a 4 °C saturada con argón (solución total 21,844 kg).

10

La solución se filtró después a través de un filtro estéril. A cada vial de 10 ml se añadieron 5,201 g (5 ml) de la solución filtrada estéril y después se liofilizaron a -45 °C.

Antes se añadieron 10 ml de agua para inyección (API) a cada vial (293 mosmol/kg).

- (b) Formulación de una composición liofilizada de hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF a un pH esencialmente neutro

- 15 Se utilizaron los siguientes materiales (mg/100 ml) y procedimiento para obtener la composición liofilizada:

Materiales (mg/100 ml):

5,530 g de sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF (equivalente a 5,000 g de (6R)-5,10-CH₂-THF)

6,000 g de ácido cítrico, anhidro, polvo, USP

4,000 g de ácido ascórbico, granular, USP

- 20 NaOH/HCl para ajustar el pH

100 mg de agua para inyección (API), USP hasta c.s.

- 25 (i) Procedimiento: Rocíar API con gas nitrógeno filtrado, NF durante 30 min.
(ii) Registrar el peso de tara de un frasco de plástico de 100 ml.
(iii) Pesar el ácido cítrico, el ácido ascórbico y aproximadamente 90 g de agua rociada con N₂.
25 (iv) Mezclar hasta disolver.
(v) Ajustar el pH hasta $7,0 \pm 0,1$ con NaOH o HCl 1 N.
(vi) Enfriar la solución hasta 10 °C.
(vii) Añadir la sal hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF, mezclar hasta disolver.
(viii) Registrar el pH ($7,0 \pm 0,2$).
30 (ix) Añadir más agua hasta un peso final de 110 g (o 100 ml). Registrar el peso.
(x) Pasar a través de un filtro de 0,2 micras manteniendo a la vez la solución fría en lo posible.
(xi) Rellenar los viales (2 ml o 100 mg de 5,10-CH₂-THF por vial) mientras se mantiene la solución fría en lo posible.
35 (xii) Liofilizar.
(xiii) Sellar los viales con nitrógeno en el espacio de cabeza bajo un leve vacío.
(xiv) Cerrar los viales con encapsulador.

Ejemplo 6: Resultados preclínicos y clínicos

5 (a) Los resultados de investigaciones preclínicas en modelos animales, realizados conforme a la directriz S9 de la ICH, demuestran que el hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF es segura a los niveles de dosis más altos administrados a ratas (100 mg/kg/día) y perros (50 mg/kg/día). Los datos clínicos además muestran que el hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF administrado en dosis de hasta 200 mg/m² es seguro para los pacientes.

10 (b) En un estudio simple ciego, aleatorizado en fase I/II (ISO-CC-002) realizado en 32 pacientes diagnosticados de cáncer de colon, se investigaron las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF en comparación con levoleucovorina en el tejido tumoral, la mucosa adyacente y el plasma sanguíneo. El estudio se realizó en el Hospital Universitario Sahlgrenska en Göteborg, Suecia. El análisis de los datos del ensayo clínico completado mostró que la administración de hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF proporcionaba una exposición y concentraciones plasmáticas máximas de metilentetrahidrofolato considerablemente superiores a las obtenidas después de la administración de levoleucovorina. Las concentraciones de metilentetrahidrofolato y tetrahidrofolato tanto en el tumor como en la mucosa adyacente también fueron mucho más altas tras la administración de hemisulfato de (6R)-5,10-CH₂-THF que las obtenidas tras la administración de levoleucovorina.

15

REIVINDICACIONES

1. Sal hemisulfato del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico.
2. Sal hemisulfato según la reivindicación 1 en forma sustancialmente cristalina.
3. Sal hemisulfato según la reivindicación 1 o 2 con una pureza cristalina de al menos el 80 %, preferiblemente el 90 %, preferiblemente el 95 %, más preferiblemente el 97 %, lo más preferiblemente el 99 % o más.
4. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con una pureza química de al menos el 80 %, preferiblemente el 90 %, preferiblemente el 95 %, más preferiblemente el 97 %, lo más preferiblemente el 99 % o más.
5. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en forma anhidra.
6. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con una o más posiciones de los picos del patrón de rayos X en un ángulo de difracción 2θ de $4,7^\circ$; $17,9^\circ$ y $23,3^\circ$ expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación $K\alpha$ de Cu, reflexión).
7. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con una o más posiciones de los picos del patrón de rayos X en un ángulo de difracción 2θ de $4,7^\circ$; $16,6^\circ$; $17,9^\circ$; $18,4^\circ$; $18,9^\circ$; $20,2^\circ$; $23,3^\circ$; $23,5^\circ$; $24,3^\circ$ y $24,7^\circ$ expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación $K\alpha$ de Cu, reflexión).
8. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con un espectro FT-Raman que contiene uno o más picos en números de onda (expresados en ± 2 cm^{-1}) de 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 y 363.
9. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con un espectro FT-Raman conforme sustancialmente a la figura 1 y/o con un patrón de difracción de rayos X por el método de polvo (DRXP) conforme sustancialmente a la figura 2(a) o 2(b).
10. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con al menos 2 de los 10 picos de DRXP siguientes (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación $K\alpha$ de Cu]) a $4,7^\circ$; $16,6^\circ$; $17,9^\circ$; $18,4^\circ$; $18,9^\circ$; $20,2^\circ$; $23,3^\circ$; $23,5^\circ$; $24,3^\circ$ y $24,7^\circ$ y al menos 2 de los 9 picos de FT-Raman siguientes (expresados en ± 2 cm^{-1}) de 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 y 363.
11. Sal hemisulfato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con al menos 2 de los 3 picos de DRXP siguientes (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación $K\alpha$ de CU]) a $4,7^\circ$; $17,9^\circ$ y $23,3^\circ$ y al menos 2 de los 5 picos de FT-Raman siguientes (expresados en ± 2 cm^{-1}) de 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 y 363.
12. Una composición farmacéutica que comprende una sal hemisulfato del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica según la reivindicación 12 en forma de comprimidos, cápsulas, presentaciones líquidas orales, polvos, liofilizados, gránulos, pastillas, polvos para reconstituir, soluciones o suspensiones para inyección o infusión, o supositorios, preferiblemente liofilizados.
14. La composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13 que además comprende al menos un agente terapéutico adicional.
15. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 que es una composición farmacéutica para administración oral, parenteral o rectal.
16. Sal hemisulfato del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para su uso en terapia, preferiblemente quimioterapia contra el cáncer.
17. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración de una sal hemisulfato del ácido 5,10-metilen-(6R)-tetrahidrofólico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Figura 1

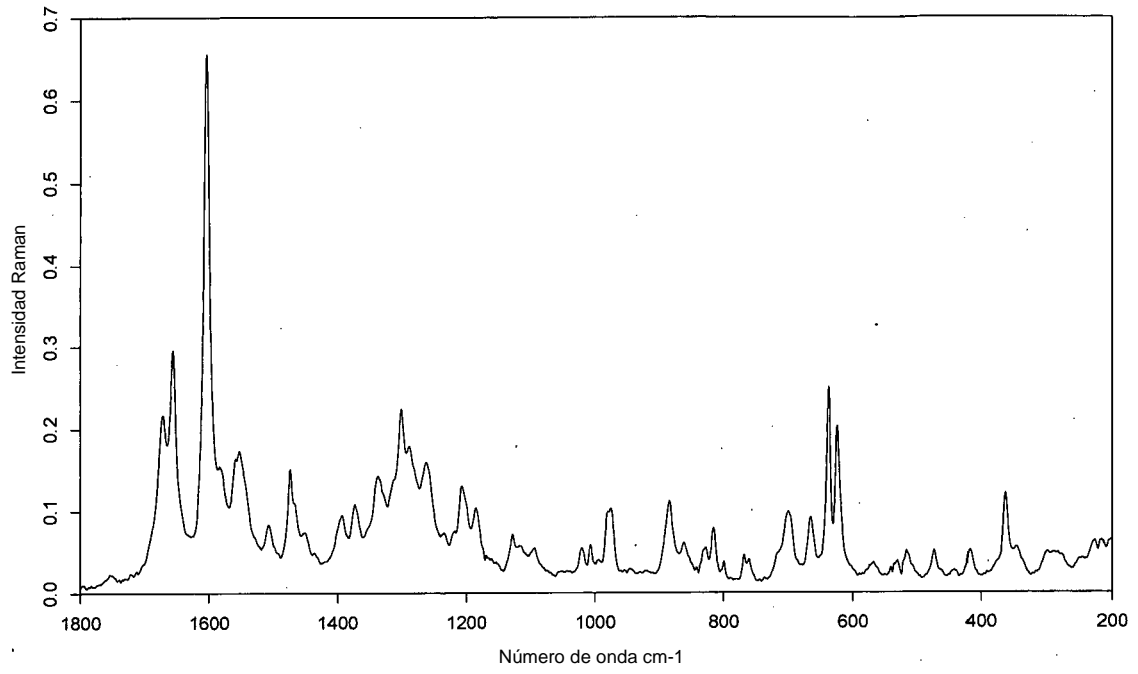


Figura 2 (a)

Cuentas/s

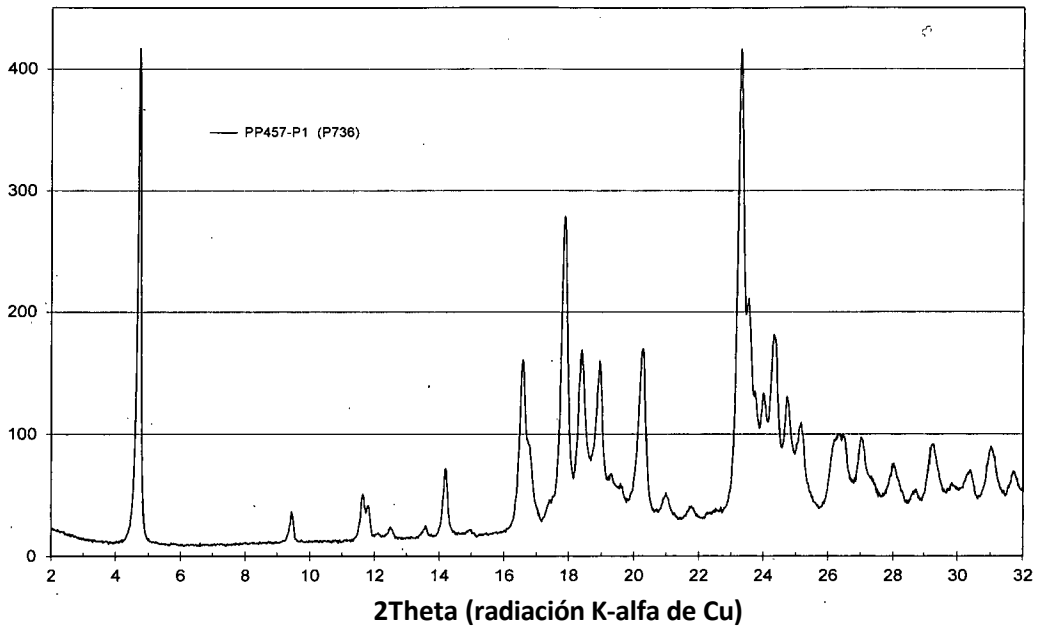


Figura 2 (b)

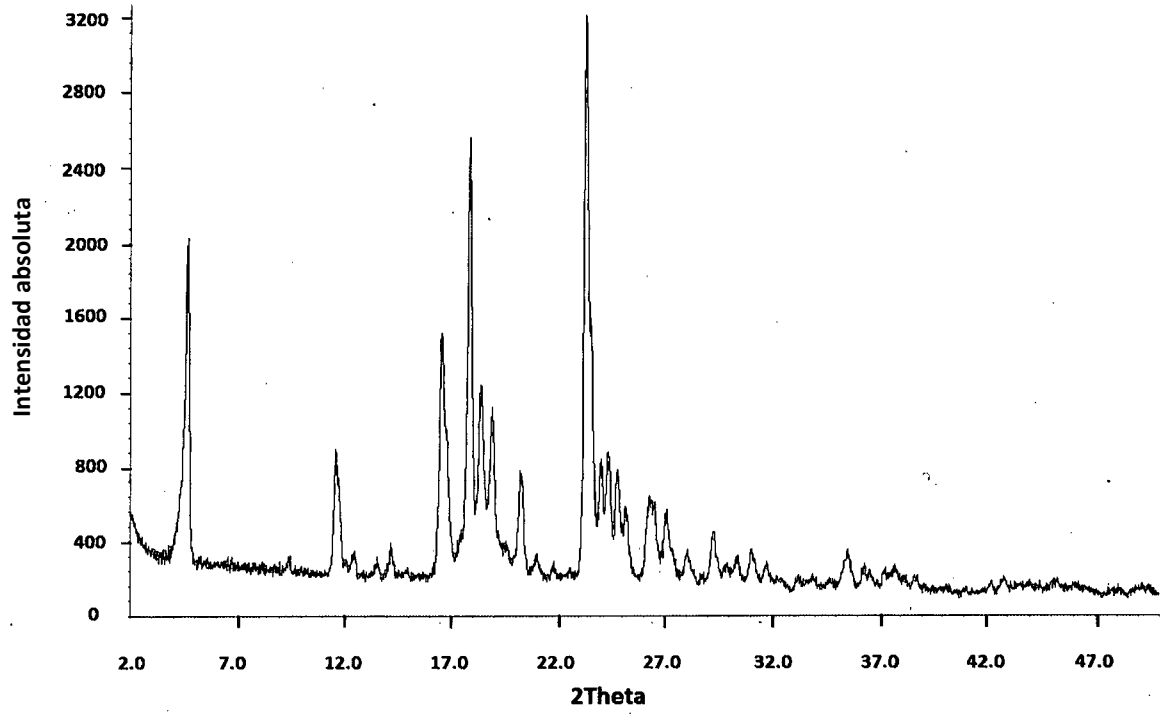


Figura 2 (c)

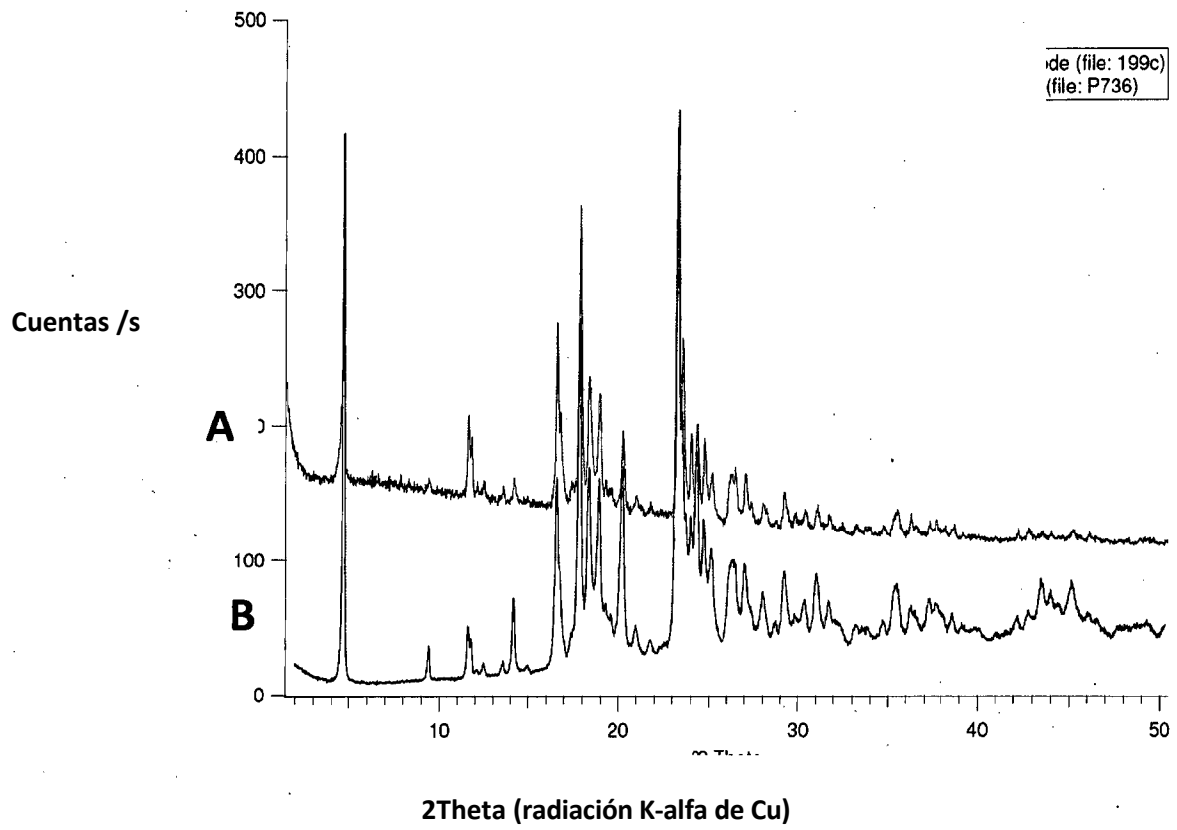


Figura 2 (d)

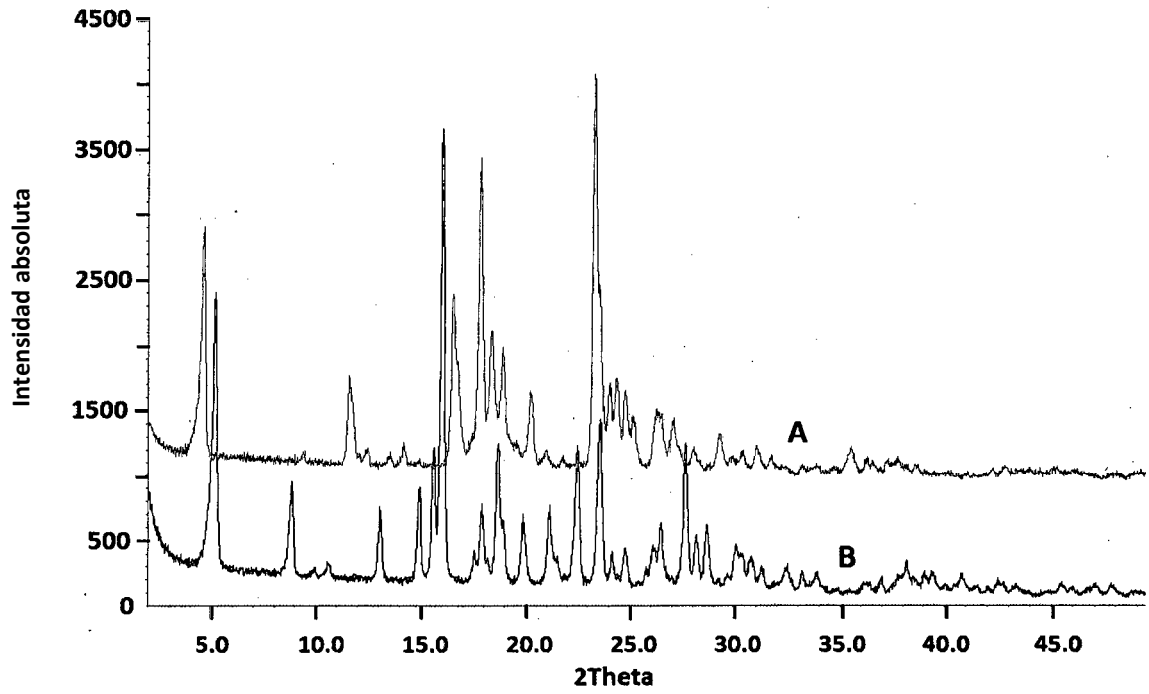


Figura 3

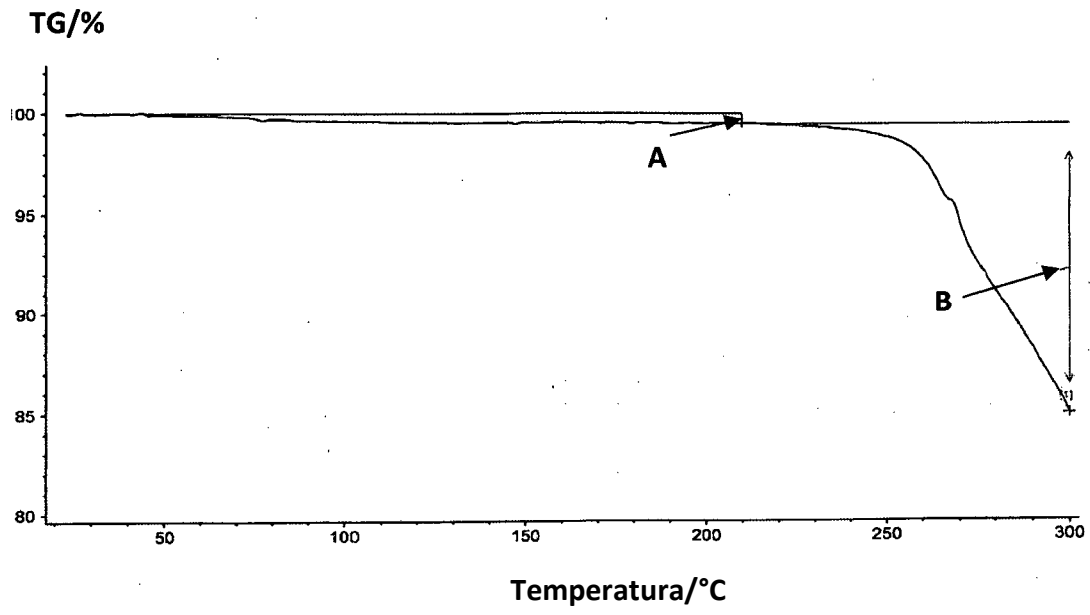


Figura 4

