

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091271** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.09.30

(51) Int. Cl. *C07D 475/04* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.08.14

(54) **ГЕМИСУЛЬФАТНАЯ СОЛЬ 5,10-МЕТИЛЕН-(6R)-ТЕТРАГИДРОФОЛИЕВОЙ
КИСЛОТЫ**

(31) **13004050.4**

(32) **2013.08.14**

(33) **EP**

(62) **201892729; 2014.08.14**

(71) Заявитель:
МЕРК Э СИЕ (CH)

(72) Изобретатель:

**Мозер Рудольф, Грэн Виола, Эггер
Томас, Амманн Томас (CH)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к гемисульфатной соли 5,10-метилен-(6R)-тетрагидрофолиевой кислоты, предпочтительно в кристаллической форме, а также к фармацевтическим композициям и к их применению в терапии, предпочтительно химиотерапии.

A2

202091271

202091271

A2

ГЕМИСУЛЬФАТНАЯ СОЛЬ 5,10-МЕТИЛЕН-(6R)-ТЕТРАГИДРОФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

5

Область изобретения

Настоящее изобретение касается гемисульфатной соли 5,10-метилена-(6R)-тетрагидрофолиевой кислоты, предпочтительно в по сути кристаллической форме, а также фармацевтических композиций и их применения в терапии, предпочтительно химиотерапии.

10

Уровень техники

Восстановленный фолат 5,10-метилена-5,6,7,8-тетрагидрофолат (5,10-CH₂-ТНФ) известен как эффективное цитостатическое средство и предпочтительно вводится в комбинации с фторированными пиримидинами, такими, как 5-фторурацил (5-FU), в лечении солидных опухолей (Seley, K. L. IDrugs 4 (1), 99, 2001). 5,10-CH₂-ТНФ достигает своего химиотерапевтического эффекта вместе с аналогом основания и метаболит 5-FU 5-FdUMP путем ингибирования фермента тимидилатсинтазы (TS). TS катализирует преобразование дезоксиуридилата (dUMP) в дезокситимидилат (dTMP), который является основной структурной единицей для синтеза ДНК. Дезактивация TS происходит путем образования ковалентного, тройного ингибирующего комплекса между TS, аналогом основания 5-FdUMP, который является метаболитом 5-FU, и 5,10-CH₂-ТНФ. Усиление цитотоксического эффекта 5-FU может достигаться путем повышения внутриклеточной концентрации 5,10-CH₂-ТНФ, после чего повышается устойчивость тройного комплекса. Это вызывает прямое ингибирование синтеза и репарации ДНК, которое в конечном итоге приводит к гибели клеток и задержке роста опухоли.

20

25

30

Однако существуют нежелательные свойства, связанные с 5,10-CH₂-ТНФ, которые до настоящего времени ограничивали его фармацевтическое применение. Общеизвестно, что для соответствия фармацевтическому применению действующее вещество (такое, как 5,10-CH₂-ТНФ) должно отвечать нескольким требованиям, включая (i) высокую (химическую, изомерную, кристаллическую) устойчивость самого действующего вещества, а также его фармацевтических композиций, таким образом, чтобы достигалось эффективное

хранение в течение приемлемого периода времени без проявления значительных изменений в физико-химических характеристиках действующего вещества, (ii) высокую (химическую, изомерную, кристаллическую) чистоту действующего вещества, (iii) легкость в обращении и обработке действующего вещества, позволяющая преобразовывать действующее вещество в подходящие композиции, и т.п.

5,10-СН₂-ТНФ является продуктом присоединения тетрагидрофолиевой кислоты (ТНФ) и формальдегида (см., например, Pое, M. et al. *Biochemistry* 18 (24), 5527, 1979; Kallen, R. G. *Methods in Enzymology* 18B, 705, 1971) и известен своей чрезвычайно высокой чувствительностью к окислению под воздействием воздуха, а также неустойчивостью в нейтральных и/или кислых средах, что может вести к химическому распаду и/или гидролизу (см., например, Odin, E. et al., *Cancer Investigation* 16 (7), 447, 1998; Osborn, M. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 82, 4921, 1960; Hawkes, J., и Villota, R. *Food Sci. Nutr.* 28, 439, 1989). Попытки стабилизации 5,10-СН₂-ТНФ включали, например, (i) полное исключение атмосферного кислорода путем применения специальных технических средств для восстановления твердых композиций и нагнетание 5,10-СН₂-ТНФ в безвоздушной среде (см., например, Odin, E. et al., *Cancer Investigation* 16 (7), 447, 1998; Патент США № 4,564,054); (ii) добавление восстановителя, такого, как L(+)-аскорбиновая кислота или ее соли, восстановленный гамма-глутатион, бета-меркаптоэтанол, тиоглицерин, N-ацетил-L-цистеин и т.п. в качестве антиоксиданта для высокочувствительного 5,10-СН₂-ТНФ, в частности, для ТНФ; (iii) стабилизацию при помощи соединений включения циклодекстрина (см., например, документ EP 0 579 996 B1); (iv) добавление цитрата при доведении уровня pH до основного значения (см., например, документ EP 1 641 460 B1); или (v) образование разных солей, таких, как сульфатная соль (см., например, документ EP 0 537 492 B1).

Несмотря на это, сохраняется значительная потребность в стабилизированных соединениях 5,10-СН₂-ТНФ, которые демонстрируют высокую (химическую, изомерную и/или кристаллическую) чистоту и/или обладают высокой устойчивостью как в качестве соединений, так и при рецептировании в фармацевтические композиции, и при этом могут быть эффективно приготовлены, очищены и выделены и/или поддаются манипуляциям (например, для обеспечения соответствующей растворимости в

фармацевтически приемлемых растворителях, текучести и размера частиц), и/или композиция с пренебрежимым распадом или изменением физических и химических характеристик соединения, предпочтительно рецептированная при высокой молярной концентрации (с целью минимизации количества материала, который должен быть рецептирован и введен для обеспечения терапевтически эффективной дозы).

Тем не менее, существование устойчивой твердой (полиморфной) формы химического соединения (известного) с этими подходящими свойствами невозможно рассчитать. Так же невозможно спрогнозировать, каким может быть характер этой твердой формы, т.е. является ли она солью, безводной, гидратированной или сольватированной формой, не говоря уже о специфических условиях, в которых может быть выделена конкретный полиморф (например, условия кристаллизации и переменные параметры, такие, как растворители, температура, рН и т.п.). Выбор и контроль таких параметров являются ключевыми факторами для получения нужной твердой формы с высокой чистотой, стойкостью и технологичностью. Эти характеристики являются важными факторами, непосредственно влияющими на свойства и эффективность продуктов и их последующее применение. Невозможно спрогнозировать, какие из многих переменных (т.е. рН раствора, температура, давление, время, состав раствора, тип и концентрация примесей) будут определяющим фактором.

Неожиданно было обнаружено, что преобразование (6R)-изомера 5,10-CH₂-ТНФ [(6R)-5,10-CH₂-ТНФ] в его гемисульфатную соль обеспечивает отличную стойкость соединения, а также его фармацевтических композиций и, таким образом, позволяет преодолевать вышеупомянутые недостатки. Благоприятные характеристики стойкости гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ обеспечивают возможность эффективного применения этого соединения в медицине.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение в первом аспекте касается гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ (в дальнейшем также именуемой гемисульфатной солью согласно изобретению или соединением согласно изобретению).

Предпочтительно гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-ТНФ является химически и/или изомерно и/или кристаллически чистой формой, более

предпочтительно - гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF пребывает в по сути кристаллической форме.

В конкретных вариантах осуществления гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF пребывает в безводной форме, поэтому в предпочтительном варианте осуществления гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF пребывает в кристаллической безводной форме.

Предпочтительно гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF пребывает в кристаллической форме, характеризующейся одной или несколькими пиковыми позициями рентгенограммы под углом дифракции 2 тета (2θ) 4,7°, 17,9° и 23,3°, выраженном в 2θ ±0,2° 2θ (CuKα-излучение).

В конкретных вариантах осуществления гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF характеризуется тем, что обеспечивает Фурье-Раман-спектр, содержащий пики при волновых числах (выраженных в ±2 см⁻¹) 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 и 363 см⁻¹.

В еще одном аспекте настоящее изобретение касается фармацевтических композиций, содержащих гемисульфатную соль (6R)-5,10-CH₂-THF и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель, необязательно также включающий как минимум одно дополнительное терапевтическое средство, включая, помимо прочего, бактерициды, антибиотики, противовирусные средства, антисептики, противоопухолевые средства, противораковые соединения, такие, как химиотерапевтические средства, противогрибковые средства и/или противовоспалительные средства или другие биологически активные или терапевтические средства, подходящие для применения для человека, в частности, противораковые соединения, такие, как химиотерапевтические средства, например 5-FU и производные, и антифолаты, например, метотрексат, пеметрексед.

В еще одном аспекте настоящее изобретение касается применения гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (или ее фармацевтических композиций) в терапии, предпочтительно, в противораковой химиотерапии.

Краткое описание фигур

Фигура 1: Рамановский спектр гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1), записанный с использованием номинального уровня мощности лазерного излучения 300 мВт и 64 сканограмм.

Фигура 2 (а): рентгеновская порошковая дифрактограмма гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1), записанная в режиме отражения; Фигура 2 (b): рентгеновская порошковая дифрактограмма гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1), записанная в режиме передачи; Фигура 2 (c): сравнение
5 рентгеновской дифрактограммы гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1), записанной в режиме передачи (верхняя кривая А) с записью для того же соединения в режиме отражения (нижняя кривая В); Фигура 2 (d): сравнение рентгеновской дифрактограммы гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1) (верхняя кривая А) с рентгеновской дифрактограммой сульфатной соли (6R)-
10 5,10-CH₂-THF (нижняя кривая В), записанной в режиме передачи.

Фигура 3: TG-FTIR-термограмма гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1). "А" означает изменение массы -0,5% (из-за потери воды), и "В" означает изменение массы -14,53% (из-за распада).

Фигура 4: DSC-термограмма гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип
15 1; первая сканограмма: сплошная линия; вторая сканограмма (после быстрого охлаждения): штриховая линия).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение в первом аспекте касается гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (также указывается как соединение согласно изобретению
20 или гемисульфатная соль согласно изобретению). В одном варианте осуществления гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF пребывает в по сути кристаллической форме, более конкретно – в кристаллической безводной форме.

В контексте данного описания (6R)-5,10-CH₂-THF означает 5,10-CH₂-THF в его природной изомерной форме (5,10-метилен-(6R)-тетрагидрофолиевой
25 кислоты, N-[4-[(6aR)-3-амино-1,2,5,6,6a,7-гексагидро-1-оксоимидазо[1,5-f]птеридин-8(9H)-ил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты), в которой хиральные центры в С6 птеридинового кольца и α-углерод глутаминовой кислоты пребывают в их природной конфигурации. Таким образом, термины "изомерная чистота" и, соответственно, "стереоизомерная чистота" в контексте данного
30 описания касаются количества (6R)-5,10-CH₂-THF в образце, который может содержать один или несколько других изомеров одного соединения. Термины "изомерно чист" и, соответственно, "стереоизомерно чистый" в контексте данного описания означают соединение согласно изобретению, имеющее изомерный избыток нужного изомера (6R)-5,10-CH₂-THF, превышающий

приблизительно 80%, предпочтительно превышающий приблизительно 90%, предпочтительно превышающий приблизительно 95%, более предпочтительно – превышающий приблизительно 97%, еще более предпочтительно – превышающий приблизительно 99% или более, наиболее предпочтительно – до 100%, причем остальную часть могут составлять один или несколько других изомеров.

Термин "кристаллическая форма" (или "полиморф" или "форма кристалла") в контексте данного описания означает форму твердого состояния, которая состоит в специально упорядоченном трехмерном расположении структурных единиц. Таким образом, различные кристаллические формы одного соединения возникают в результате различной укладки молекул в твердом состоянии, что ведет к различным вариантам симметрии кристаллов и/или параметров кристаллической ячейки. Как правило, различные твердые или кристаллические формы обладают одним или несколькими различными физическими и/или химическими свойствами, такими, как различные профили растворимости, различные показатели термодинамической и химической устойчивости, различные температуры точки плавления и/или различные рентгеновские дифрактограммы, и, таким образом, поддаются различению при помощи рентгеновской дифракции, инфракрасной (IR) спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), рамановской спектроскопии, ЯМР твердого тела, а также точки плавления, плотности, твердости, оптических и электрических свойств, профиля стойкости и/или растворимости и т.п. Отсутствие или незначительное наличие правильного трехмерного порядка обычно описывается термином "аморфный".

Термин "кристаллическое соединение" (согласно изобретению) означает твердую форму соединения согласно изобретению, включающую различное количество форм кристалла или полиморфов соединения согласно изобретению, предпочтительно – количество, превышающее 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% одной (или нескольких) форм кристалла или полиморфов соединения согласно изобретению. Количество, степень и характер кристалличности кристаллического соединения согласно изобретению могут определяться при помощи одного или нескольких технических средств, включая оптическую микроскопию, электронную микроскопию, рентгеновскую порошковую

дифрактометрию, спектроскопию ЯМР твердого тела или поляризующую микроскопию.

В контексте данного описания выражение "гемисульфатная соль" (согласно изобретению) означает все ее конкретные варианты осуществления, предпочтительно обеспечиваемые в химически и/или (стерео)изомерно и/или кристаллически чистой форме. В одном конкретном варианте осуществления она 5 пребывает в по сути кристаллической форме, более конкретно – в кристаллической безводной форме (в дальнейшем также именуемой кристаллической формой Типа 1).

10 Термин "кристаллическая чистота" в контексте данного описания означает процент конкретной кристаллической формы соединения в образце, который может содержать аморфную форму соединения, одну или несколько других кристаллических форм соединения (отличных от конкретной кристаллической формы соединения) или их смесь. Термин "по сути кристаллическая форма" в 15 контексте данного описания означает как минимум приблизительно 80%, предпочтительно как минимум приблизительно 90%, предпочтительно как минимум приблизительно 95% кристаллическую чистоту, предпочтительно приблизительно 97% кристаллическую чистоту, более предпочтительно – приблизительно 99% или более кристаллическую чистоту, наиболее 20 предпочтительно – приблизительно 100% кристаллическую чистоту. Кристаллическую чистоту определяют при помощи рентгеновской порошковой дифрактометрии (XRPD), инфракрасной рамановской спектроскопии и других твердофазных способов.

25 Термин "химическая чистота" в контексте данного описания означает процент конкретного соединения в образце. Термин "существенная химическая чистота" в контексте данного описания относится к соединению согласно изобретению, имеющему приблизительно 80% химическую чистоту, предпочтительно приблизительно 90%, более предпочтительно – 30 приблизительно 95%, более предпочтительно – приблизительно 97% , более предпочтительно – приблизительно 98% химическую чистоту, наиболее предпочтительно 99% или выше 99% или до 100% химическую чистоту, определяемую при помощи HPLC. К химическим примесям относятся непрореагировавший исходный материал (включая растворители), продукты распада (6R)-5,10-CH₂-THF (такие, как THF) и т.п.

Как указано выше, кристаллическую форму гемисульфатной соли согласно изобретению (и ее чистоту) определяют, характеризуют и отличают от других солевых форм, таких, как другие формы сульфатной соли, по уникальным сигнатурам в твердом состоянии в отношении, например, рентгеновской
 5 порошковой дифрактометрии (XRPD), инфракрасной рамановской спектроскопии и с применением других твердофазных способов, как указывают представленные авторами данные.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает кристаллическую форму безводной гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF (в дальнейшем также именуемой кристаллической
 10 формой Типа 1), характеризующейся тем, что она обеспечивает:

(i) рентгеновскую порошковую дифрактограмму (XRPD), дающую расчетные периоды решетки (выраженные в $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (CuK α -излучение)) при 4,7°, 17,9° и 23,3°, предпочтительно 4,7°, 16,6°, 17,9°, 18,4°, 18,9°, 20,2°, 23,3°,
 15 23,5°, 24,3° и 24,7°; и/или

(ii) Фурье-Раман-спектр, содержащий пики при волновых числах (выраженных в ± 2 см⁻¹) 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 и 363 и/или

(iii) ИК-спектр, имеющий одну или несколько полос поглощения согласно Таблице 3.

В предпочтительных вариантах осуществления гемисульфатная соль (Тип 1) согласно настоящему изобретению характеризуется как минимум двумя из
 20 следующих 10 пиков XRPD (выраженных в $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (CuK α -излучение)) при 4,7°, 16,6°, 17,9°, 18,4°, 18,9°, 20,2°, 23,3°, 23,5°, 24,3° и 24,7°, предпочтительно 4,7°, 17,9° и 23,3° и как минимум двумя из следующих 9 фурье-рамановских
 25 пиков (выраженных в ± 2 см⁻¹) 1672, 1656, 1603, 1553, 1474, 1301, 637, 624 и 363.

В других предпочтительных вариантах осуществления гемисульфатная соль (6R)-5,10-CH₂-THF (Тип 1) согласно настоящему изобретению обеспечивает Фурье-Раман-спектр по сути в соответствии с Фигурой 1 и/или пики, как указано
 в Таблице 1, и/или рентгеновскую порошковую дифрактограмму (XRPD) по сути
 30 в соответствии с Фигурой 2(a), и/или пики, как указано в Таблице 2.

Таблица 1: Таблица рамановских пиков (vs = очень сильная, s = сильная, m = средняя, w = слабая, vw = очень слабая интенсивность).

Волновое число [см ⁻¹]	Интенсивность (качественная)
3019	w
2933	m
2880	m
1672	s
1656	s
1603	vs
1553	m
1474	m
1373	m
1337	m
1301	s
1207	m
1127	w
975	m
884	m
815	w
700	w
665	w
637	s
624	s
363	m

Таблица 2: Таблица пиков порошковой рентгеновской дифрактограммы, выраженных в $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (CuK α -излучение) (vs = очень сильная, s = сильная, m = средняя, w = слабая, vw = очень слабая интенсивность).

Угол в 2θ °	Межатомное расстояние в Å	Интенсивность (качественная)
4,7	18,8	vs
9,4	9,4	vw
11,6	7,6	w
11,8	7,5	w
12,5	7,1	vw
13,6	6,5	vw
14,2	6,2	m
16,6	5,35	s
16,8	5,28	m
17,9	4,96	vs
18,4	4,83	s
18,9	4,68	s
20,2	4,38	s
21,0	4,23	w
21,7	4,09	w
23,3	3,82	vs
23,5	3,78	s

Угол в 2θ °	Межатомное расстояние в Å	Интенсивность (качественная)
24,0	3,70	m
24,3	3,66	s
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	w
29,2	3,05	m
30,4	2,94	w
31,0	2,88	w
31,7	2,82	w
35,5	2,53	w

Таблица 3: ИК-спектр гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ (Тип 1) с полосами поглощения в см⁻¹ и их распределение

Полоса поглощения (см ⁻¹)	Распределение
3346	ОН и NH колебание
3168	ОН внутримолекулярных водородных мостиков, CH ₂ колебание
1709, 1654	СО-валентное колебание монозамещенного амида
1612	Симметричное и антисимметричное валентное колебание COO ⁻
1560, 1504	Колебание арильного и пиримидинового кольца
1397, 1300	Симметричное и антисимметричное валентное колебание COO ⁻
824	Примыкающий к арилу водород пара-замещенного ароматического соединения

5 Соединение согласно этому изобретению наиболее эффективно характеризуется и отличается от подобных соединений рентгеновской порошковой дифрактограммой, определяемой в соответствии с процедурами, известными специалистам в данной области (см., например, J. Haleblain, J. Pharm. Sci. 64: 1269, 1975; J. Haleblain and W. McCrone, J. Pharm. Sci. 58: 911, 10 1969). Фигура 2(d), показывающая рентгеновскую дифрактограмму гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, приготовленной согласно Примерам, в сравнении с рентгеновской дифрактограммой сульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, четко поясняет отличительную структуру двух этих солей.

15 Хотя известно, что относительная интенсивность пиков может быть разной, в зависимости от способа приготовления образца, процедуры закрепления образца и конкретного применяемого инструмента, соединение согласно изобретению может определяться различимыми пиками и расположением пиков,

характерным для конкретного полиморфа (с небольшими различиями в распределении пиков приблизительно $\pm 0,5$ градуса 2θ), предпочтительно $\pm 0,2$ градуса 2θ) ($\text{CuK}\alpha$ -излучение).

Соединения согласно изобретению пребывают в несольватированной безводной форме, которая включает соединения, которые являются полностью безводными, и соединения, которые могут содержать следовое количество воды. Такое остаточное (нестехиометрическое) содержание воды может быть любым количеством воды, однако, как правило, оно составляет от 0 мас. % H_2O до 3 мас. % H_2O , предпочтительно от 0 мас. % H_2O до 1 мас. % H_2O .

Гемисульфатное соединение согласно изобретению может храниться в твердой форме, например, в форме порошка, лиофилизата или жидкости.

В конкретном варианте осуществления соединения согласно изобретению получают путем добавления водного формальдегидного раствора (6S)-ТНФ к водному раствору серной кислоты (или водного раствора уксусной кислоты и серной кислоты) и обеспечения возможности кристаллизации гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ. Эта реакция кристаллизации происходит при повышенных температурах, например, при температуре более 35°C . В частности, способы получения кристаллической гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ включают этапы (i) реакции раствора (6S)-тетрагидрофолиевой кислоты с водным формальдегидным раствором для получения (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ в растворе (в соответствии с известными процедурами), (ii) добавления полученного (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ в раствор в водный раствор серной кислоты (или, в альтернативном варианте, в водный раствор уксусной кислоты и серной кислоты) при температуре более 35°C , предпочтительно от 35°C до 70°C , более предпочтительно – от 40°C до 60°C , наиболее предпочтительно 40°C и 50°C для обеспечения возможности кристаллизации гемисульфата (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ и (iii) выделение полученной кристаллической гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ, например, путем фильтрации.

Этап (i) может выполняться в соответствии с известными процедурами, как описывается в Примерах.

На этапе (ii) полученный прозрачный раствор может добавляться к раствору серной кислоты (или водному раствору уксусной кислоты и серной кислоты) при температуре приблизительно от 40 до 50°C , что обеспечивает возможность выборочной кристаллизации нужного продукта. Необязательно

после завершения добавления полученную реакционную смесь перемешивают при температуре приблизительно от 40 до 50°C в течение периода до 5 часов, затем кристаллизованный продукт отфильтровывают или центрифугируют при той же температуре, необязательно промывают водой и высушивают.

5 В еще одном аспекте настоящее изобретение касается фармацевтической композиции, включающей (в терапевтически эффективном количестве) гемисульфатную соль (6R)-5,10-CH₂-ТНФ согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель (также называется фармацевтической композицией согласно изобретению) для введения пациенту. Термин

10 "фармацевтически приемлемый" в контексте данного описания означает, что носитель утвержден или признан как приемлемый для применения на животных, в частности, для человека, т.е., не токсичен для организма-хозяина или пациента. Кроме того, носитель не влияет на эффективность биологической активности активного ингредиента. Термин "носитель" относится к любому

15 вспомогательному материалу, необходимому для выбранного режима введения, и охватывает, например, растворитель (растворители) вспомогательные вещества или другие добавки, с которыми вводят соединение согласно изобретению. К традиционно применяемым растворителям и фармацевтическим носителями относятся стерильные жидкости, такие, как водные растворы и масла (например,

20 нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения), например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. К традиционно применяемым водным жидкостям относятся вода, солевые растворы, водный раствор декстрозы и растворы глицерина и т.п. К подходящим фармацевтическим вспомогательным веществам относятся

25 лимонная кислота, аскорбиновая кислота, крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат магния, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, вода, этанол и т.п. Необязательно композиция может включать добавки, такие, как смачивающие агенты или эмульгаторы, рН-

30 буферные агенты или связующие. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и описаны например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

Необязательно, фармацевтическая композиция согласно изобретению также может включать как минимум одно дополнительное терапевтическое средство. В конкретных вариантах осуществления как минимум одно дополнительное терапевтическое средство может быть выбрано из веществ, к которым относятся

5 бактерициды, антибиотики, противовирусные средства, антисептики, противоопухолевые средства, противораковые соединения, такие, как химиотерапевтические средства, противогрибковые средства, и/или противовоспалительные средства или другие биологически активные или терапевтические средства, подходящие для применения для человека, в

10 частности, противораковые соединения, такие, как химиотерапевтические средства. К противораковым лекарствам, таким, как химиотерапевтические средства, относятся, помимо прочих, химиотерапевтические средства, включающие элементы специфического связывания, белки, нуклеиновые кислоты или аналоги нуклеиновых кислот (к которым, помимо прочих,

15 относятся антисмысловые молекулы, рибозимы и миРНК), липиды, стероиды, макромолекулы, малые молекулы или металлы. Одно или несколько противораковых лекарств могут включать одно или несколько химиотерапевтических средств, к которым, помимо прочих, относятся:

20 нуклеиновые кислоты, в частности, фторированные нуклеиновые кислоты (например, 5-фторурацил или его аналог или пролекарство), антифолаты (например, пеметрексед, ралтитрексед, лометрексол), ингибиторы топоизомеразы (например, иринотекан, топотекан), антимиетаболиты (например, метотрексат, гемцитабин, тезацитабин), модуляторы 5-FU, алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, кармустин), ингибиторы биосинтеза

25 нуклеиновых кислот (такие, как митомицин, антрациклины (например, эпирубицин, доксорубицин), производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин), медикаменты, разрушающие микротрубочки (например, паклитаксел, доцетаксел, винорелбин, винкристин), медикаменты, блокирующие гормоны (например, тамоксифен), ингибиторы киназ, включая,

30 помимо прочих, рецепторные и нерцепторные тирозинкиназы (например, Iressa, Tarceva, SU5416, PTK787, Gleevec), ингибиторы протеосом (например, бортезомиб), иммуномодуляторы (например, левамизол), противовоспалительные медикаменты, ингибиторы васкуляризации, цитокины (например, интерлейкины, факторы некроза опухолей) и медикаменты,

ингибирующие активность цитокинов, гормонов или рецепторов для цитокинов или гормонов (например, антитело к ФРЭС бевацизумаб или "Avastin").

Противораковые медикаменты также могут включать моноклональные антитела, к которым, помимо прочих, относятся моноклональные антитела, которые
5 связываются с цитокинами, гормонами или рецепторами гормонов (например, антитела, блокирующие активацию факторов роста ЭФР или ФРЭС, такие, как Avastin, Erbitux, герцептин) и т.п.

Соединения согласно изобретению или их фармацевтические композиции могут применяться для терапии, в частности, противораковой химиотерапии, т.е.
10 в соответствии со способами лечения рака, включающими введение терапевтически эффективного количества гемисульфатной соли согласно изобретению или ее фармацевтических композиций субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

Таким образом, в еще одном аспекте настоящее изобретение также касается
15 применения гемисульфатной соли согласно изобретению (или ее фармацевтических композиций) в терапии, предпочтительно в химиотерапии, т.е. при лечении рака. Примерами видов рака, поддающихся лечению согласно изобретению, могут быть, помимо прочих, рак молочной железы, рак пищевода, рак желудка, рак желчного пузыря, рак желчного протока, рак толстой кишки,
20 рак прямой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак головы и шеи и мезотелиома.

Подходящая фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть приспособлена для перорального, парентерального или ректального введения и в этом качестве может быть предусмотрена в форме таблеток, капсул,
25 жидких препаратов для перорального приема, порошков, лиофилизатов, гранул, пастилок, порошков с восстанавливаемым влагосодержанием, подходящих для инъекций или инфузий растворов или суспензий или суппозиториев. Предпочтительно фармацевтические композиции пребывают в форме, подходящей для парентерального введения, такого, как внутривенное или
30 внутримышечное, подкожное, внутриартериальное.

Для парентерального введения жидкие лекарственные формы, как правило, включают соединение согласно изобретению, необязательно другое терапевтическое средство и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель для образования, например, растворов на водной основе или

суспензий на масляной основе (или их лиофилизатов). Соединения, в зависимости от присутствия других терапевтических средств, носителя и применяемой концентрации, могут быть суспендированы или растворены в носителе. Для парентеральных растворов соединение может быть растворено для инъекций и стерилизовано путем фильтрации перед помещением в соответствующий флакон или ампулу и запечатыванием. Не обязательно, в индифферентном носителе растворяют адъюванты, такие, как местный анестетик, консерванты и буферные вещества. В случае необходимости полученные растворы могут поддаваться лиофилизации (т.е., композиция может быть заморожена после помещения в флакон, с удалением воды в вакууме). Для парентеральных суспензий соединение суспендируют в индифферентном носителе (вместо растворения), и предпочтительный способ стерилизации включает подвергание воздействию этиленоксида перед помещением суспензии в стерильную тару (такую, как флакон или ампула). Не обязательно в композицию может быть включено поверхностно-активное вещество или смачивающий агент, которые способствуют равномерному распределению соединения.

Таблетки и капсулы для перорального введения могут быть предусмотрены в форме дозированных единиц и могут содержать традиционные вспомогательные вещества, такие, как связующие агенты, наполнители, скользящие вещества для таблеток, разрыхлители и приемлемые смачивающие агенты. На таблетки может наноситься покрытие в соответствии со способами, общеизвестными среди фармацевтов.

Жидкие препараты для перорального приема могут быть предусмотрены в форме, например, водной или масляной суспензии, растворов, эмульсий, сиропов или эликсиров или могут быть предусмотрены в форме сухого продукта для восстановления влагосодержания водой или другой подходящей основой перед применением. Такие жидкие композиции могут содержать традиционные добавки, такие, как суспендирующие агенты, эмульгаторы, неводные основы (которые могут включать пищевые масла), консерванты и, в случае надобности, традиционные ароматизаторы или красители.

В случае комбинированной терапии, при которой фармацевтическая композиция согласно изобретению включает соединение согласно изобретению и как минимум еще одно терапевтическое средство, действующие вещества

могут вводиться как часть одной фармацевтической композиции, или как минимум еще одно терапевтическое средство может вводиться отдельно, т.е., как отдельные (и, возможно, другие) фармацевтические композиции, необязательно другими путями введения, одновременно или последовательно.

5 Доза действующего(их) вещества (веществ), т.е., соединения согласно изобретению (и, необязательно как минимум еще одного терапевтического средства), для применения в лечении, как описывается авторами, зависит от различных факторов, включая возраст и состояние здоровья подлежащего

10 лечению субъекта, типа и тяжести болезни, пути и частоты введения и т.п. Специалисты в области лечения рака и химиотерапии смогут определить терапевтически эффективное количество и режимы для соединения согласно изобретению, отдельно или в комбинации с как минимум еще одним терапевтическим средством, как определено выше, на основе известных протоколов оценки токсичности и эффективности.

15 Термин "терапевтически эффективное количество" касается количества активного соединения, обеспечивающего биологическую или лечебную реакцию в ткани, системе, организме животного, субъекта или человека, которой добивается специалист-практик (например, исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист или специалист по уходу), включая (i) профилактику

20 заболевания; и/или (ii) подавление заболевания (например, задержку дальнейшего развития патологии и/или симптоматологии); и/или (iii) облегчение болезни (например, реверсию патологии и/или симптоматологии). Подобным образом термин "лечение" в контексте данного описания касается (i)

25 профилактики заболевания; и/или (ii) подавления заболевания (например, задержки дальнейшего развития патологии и/или симптоматологии); и/или (iii) облегчения болезни (например, реверсии патологии и/или симптоматологии).

Выбранная фармацевтическая композиция может содержать от 0,1% до 99 мас. %, предпочтительно от 10 до 60 мас. % действующего вещества (т.е., соединения согласно изобретению, необязательно в комбинации с как минимум

30 еще одним терапевтическим средством), в зависимости от способа введения.

Типичный диапазон доз соединения согласно изобретению, применяемого для лечения рака, может охватывать от 10 мг/м² до 1 г/м², предпочтительно от 50 мг/м² до 500 мг/м² (для лечения рака толстой и прямой кишки), соответственно, от 10 мг/м² до 200 мг/м² (для терапии с применением метотрексата), более

предпочтительно – от приблизительно 100 мг/м² до приблизительно 250 мг/м² (для лечения рака толстой и прямой кишки), соответственно, от 50 мг/м² до 150 мг/м² (для терапии с применением метотрексата).

5 Следующие Примеры служат для пояснения настоящего изобретения, не ограничивая его объема.

Примеры

10 Дифференциальная сканирующая калориметрия (термический анализ Q2000): закрытые (герметично запечатанные) золотые тигли; образец помещали в окружающих условиях или после 3 минут уравнивания в атмосфере N₂; скорость нагрева 10 К мин⁻¹; диапазон от -50°C до 254°C. При осуществлении двух приемов нагрева образец быстро охлаждали до -50°C между приемами. Перечисленные переходные температуры соответствуют пиковым максимумам и минимумам, а не начальным температурам.

15 Спектроскопия КР с Фурье-преобразованием (Bruker RFS100; с программой OPUS 6.5; оффлайновый анализ данных осуществляли с применением программы OPUS 7.0): Возбуждение излучением Nd:YAG-лазера (1064 нм); номинальная мощность лазерного излучения 300 мВт; Ge детектор; 64-256 сканограмм; спектральный диапазон 3500-100 см⁻¹, применяемый для анализа; разрешение 2 см⁻¹.

20 ¹H-ЯМР (Bruker DPX300): ¹H-ЯМР-спектры записывали с использованием частоты протона 300,13 МГц, импульс возбуждения 30°, и задержка повторного цикла 1 с. Накапливали 16 или 256 сканограмм, и дейтерированный DMSO использовали в качестве растворителя. Пик растворителя использовали в качестве эталона, и химические сдвиги сообщаются в масштабе TMS.

25 ¹³C ЯМР (Bruker AMX 300): спектр ¹³C ЯМР получали с применением спектрометра Bruker AMX 300, оснащенного 5 мм измерительной головкой ТХО. Гемисульфат растворяли в 0,1N NaOD. Спектр измеряли при 303 К, с 4000 сканограммами и цифровым разрешением 32768 точек данных. Химические сдвиги указаны в ppm относительно внутреннего стандарта TSP (((3-
30 триметилсилил)-2,2',3,3'-тетрадейтеропропионовой кислоты, натриевой соли)).

Порошковая рентгеновская дифракция (Bruker D8 Advance): К α -излучение меди, 40 кВ/40 мА, детектор LynxEye, отражательная геометрия Брегга-Брентано, размер шага 0,02° 2 θ , время шага 37 с, диапазон 2,5-50° 2 θ . Образцы порошка измеряли в держателях образцов кремниевых монокристаллов глубиной

0,1 мм или 0,5 мм. При приготовлении образцов не применяли специальной обработки, кроме применения небольшого давления для получения плоской поверхности. Использовали окружающую воздушную атмосферу для всех измерений, и образцы вращали во время измерений. При отсутствии информации об обратном Данные рентгеновской дифракции показываются как данные отражения.

Порошковая рентгеновская дифракция (Stoe Stadi P.): $K\alpha_1$ -излучение меди, 40 кВ/40 мА, детектор Mythen1K, режим передачи, германиевый монохроматор, размер шага $0,02^\circ 2\theta$, время шага 60 с, диапазон сканирования $1,5-50,5^\circ 2\theta$ с шагом детектора $1^\circ 2\theta$ в режиме пошагового сканирования. Образцы (10-20 мг порошка) измеряли между листами ацетатной пленки. При приготовлении образцов не применяли специальной обработки. Использовали окружающую воздушную атмосферу для всех измерений, и каждый образец вращали во время измерений.

TG-FTIR (термомикроаналитические весы Netzsch TG 209 со спектрометром Bruker FT-IR IFS 28): алюминиевый тигель (с микроотверстием); атмосфера N_2 ; скорость нагрева 10 K мин^{-1} ; диапазон от 25°C до 300°C .

IR (FT-IR Paragon 1000): инфракрасный спектр записывали в 100 сканограммах на системе для инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием Perkin Elmer для образца гемисульфата на фоне бромидного диска.

Пример 1: приготовление гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ

Раствор (6S)-тетрагидрофолиевой кислоты (16 ммоль, 7,93 г) в 78,0 г дистиллированной воды обеспечивали в колбе с круглым дном при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Уровень pH этого раствора довели до pH 11 путем добавления (медленного) 32% раствора NaOH. Как только раствор становился прозрачным, а добавляли 1,00М раствора HCl для доведения уровня pH раствора до 8,3 при 25°C . Полученный прозрачный раствор охлаждали до температуры приблизительно 0°C , при которой он демонстрировал уровень pH 8,8. Путем добавления 1М HCl уровень pH довели до pH = 8,6 и одной порцией добавляли 1,44 г 36,8% раствора HCHO (110 мол. %). По завершении добавления раствор перемешивали при 0°C (ледяная баня) в течение 1 часа. Добавляли активированный уголь (0,2 г, Norit C Extra) и реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при 0°C , а затем подвергали холодному

фильтрованию на вакуум-филт্রে для получения прозрачного раствора, который использовали на этапе (b) без дальнейшей очистки.

(b) Смесь 55 мл 1М H_2SO_4 (0,055 моль; 344 мол. %) обеспечивали в колбе с круглым дном при 60°C в атмосфере N_2 . К этому раствору в течение 15-минутного периода времени по капле добавляли раствор, полученный на этапе (a), и полученную реакцию смесь перемешивали при 50°C в течение 2 часов. Реакционную смесь затем фильтровали при 50°C на вакуум-филт্রে, дважды промывали 25 мл дистиллированной воды при комнатной температуре и высушивали при 30°C и 10 мбар в течение 12 часов (до следующего дня) для получения гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ в форме светло-серых кристаллов (7,36 г, выход 86%). Полученный продукт обладал чистотой 98,4 %, которую определяли при помощи HPLC, изомерной чистотой 97,6% (6R-изомер). Анализ путем XRPD продемонстрировал форму кристалла Типа 1 (полная характеристика представлена в Примерах 2 и 3).

15 Пример 2: Характеризация

(a) Фурье-Раман-спектр гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ, записанный с использованием номинального уровня мощности лазерного излучения 300 мВт и 64 сканограмм показан на Фигуре 1.

(b) Соответствующая порошковая рентгеновская дифрактограмма, записанная в режиме передачи, показана на Фигуре 2.

(c) TG-FTIR-термограмма гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ показана на Фигуре 3. Ее производили в потоке N_2 (во избежание окислительной деструкции). Образец демонстрирует потерю 0,5 мас. % H_2O приблизительно с 40°C по 210°C , которая представляет собой остаточную воду (из-за гигроскопичности или неполного высушивания). Распад происходит лишь при температуре свыше 210°C .

(d) DSC-термограмма гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -ТНФ показана на Фигуре 4. Перед первым нагревом образец уравнивали в течение трех минут в потоке газообразного азота, и в течение этого времени он терял 0,6 мас. % своей массы. Это соответствует содержанию воды, наблюдаемому в TG-FTIR-термограмме (см. Фигуру 3) и подтверждает, что эта вода является свободносвязанной. Затем образец нагревали в закрытом золотом тигле до 254°C при 10 K min^{-1} , быстро охлаждали до -50°C и нагревали во второй раз при 10 K min^{-1} . Единственным термическим явлением при первом

нагреве является эндотермическим при приблизительно $247,4^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H \approx 60,9 \text{ Дж г}^{-1}$) и обусловлено плавлением. Это эндотермическое явление, возможно, частично совпадает с началом экзотермического распада. При втором нагреве наблюдается стеклование при $T_g \approx 104^{\circ}\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,38 \text{ Дж г}^{-1}\text{K}^{-1}$), что

5 подтверждает, что плавление произошло при первом нагреве. Никаких других явлений не наблюдалось до температуры 250°C .

(e) ИК-спектр записывали в сжатой пластинке КВг и характеристические полосы поглощения показаны в Таблице 3.

(f) ^1H ЯМР-спектр гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -THF

10 записывали в DMSO-d_6 , и химические сдвиги (d) в ppm показаны в Таблице 8.

Таблица 8: ^1H -ЯМР гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -THF с химическими сдвигами (d) в ppm (d = дублет, m = мультиплет, t = триплет; с TSP при 0 ppm и растворителем $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ при 4,85 ppm)

δ (1H)	Кратность	Интенсивность
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

15 (g) ^{13}C ЯМР записывали в 0,1N NaOD, и химические сдвиги (d) в ppm относительно TSP показаны в Таблице 9.

Таблица 9: ^{13}C -ЯМР гемисульфатной соли (6R)-5,10- CH_2 -THF с химическими сдвигами (d) в ppm (d = дублет, m = мультиплет, t = триплет)

δ (13C)	Кратность	δ (13C)	Кратность
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) Анализ гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF путем оптической микроскопии подтвердил ее кристалличность. Образец состоял из агломератов малых двоякопреломляющих частиц.

5 Пример 3: Испытание устойчивости гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF

(a) Уравновешивание суспензии гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF в качестве исходного материала при температурах, отличных от комнатной температуры, в разных растворителях и смеси показано в Таблице 10:

10 Таблица 10: Стойкость уравновешенной суспензии гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF

Растворитель (растворители)	Температура (°C)	Длительность (часы, дни)	Наблюдение
MeOH/муравьиная кислота 1:1	50	2 ч	Без изменений
AcOH насыщенный L-аскорбиновой кислотой	50	1 д	Без изменений
THF с ~2 mM L-аскорбиновой кислоты	40	3 д	Без изменений
2-PrOH с ~2 mM L-аскорбиновой кислоты	40	3 д	Без изменений
PEG4500/EtOH 1:9, насыщенный L-аскорбиновой кислотой	50	7 д	Без изменений
H ₂ O	5	6 д	Без изменений
муравьиная кислота/THF 1:3	10 - 20	6 д	Без изменений
AcOH, насыщенный L-аскорбиновой кислотой	50	5 д	Без изменений
MeCN, насыщенный L-аскорбиновой кислотой	50	5 д	Без изменений

(b) Стойкость в 85% этаноле при комнатной температуре гемисульфатную соль (6R)-5,10-CH₂-THF (3,01 г) диспергировали в 100 мл 85% EtOH при комнатной температура и перемешивали в течение 5 ч, затем фильтровали и высушивали при 30°C и 8 мбар в течение 12 часов (до следующего дня). Анализ путем XRPD продемонстрировал, что рентгенограмма, отличающая форму кристалла Типа 1, осталась неизменной.

(c) Стойкость при высокой температуре / низком давлении

Гемисульфатную соль (6R)-5,10-CH₂-THF (2,17 г) помещали в сушильную камеру при 65°C и 8 мбар на 21 ч. Анализ путем XRPD продемонстрировал, что рентгенограмма, отличающая форму кристалла Типа 1, осталась неизменной.

(d) Долгосрочная стойкость гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF и ее фармацевтической композиции

Для определения показателей долгосрочной стойкости гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF соединения согласно изобретению хранили на открытом воздухе при 25°C и при 60% относительной влажности. Содержание оставшейся гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF измеряли путем ВЭЖХ с периодическими интервалами и представляли путем сравнения с первоначальным значением (% отн.). Результаты показаны в Таблице 11.

Таблица 11: Долгосрочная стойкость трех разных партий продукции гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF

	Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (% отн.)							
	0 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.	36 мес.
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (партия 1)	100,0	99,7	99,5	99,6	99,2	99,2	99,4	98,5
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (партия 2)	100,0	99,9	99,9	100,0	99,7	99,4	99,4	99,0
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (партия 3)	100,0	99,5	99,5	99,4	99,1	99,0	99,0	

Для определения показателей долгосрочной стойкости гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF в качестве фармацевтических композиций, более конкретно - в форме лиофилизатов (приготовленных, например, согласно Примеру 5), лиофилизаты хранили на открытом воздухе при 25°C и при 60% относительной влажности. Содержание оставшейся гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF измеряли путем ВЭЖХ с периодическими интервалами и представляли путем сравнения с первоначальным значением (% отн.). Результаты показаны в Таблице 12.

Таблица 12: Долгосрочная стойкость пяти разных партий продукции гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF в форме лиофилизата

	Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (% отн.)							
	0 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.	36 мес.
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (партия А)	100,0	100,1	100,2	99,9	100,0	99,7	100,0	
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -THF (партия В)	100,0	100,1	99,9	100,0	99,8	99,7	100,1	

Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -ТНФ (партия С)	100,0	99,6	99,7	99,8	99,5	99,6	99,2	98,6
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -ТНФ (партия D)	100,0	100,0	99,8	99,4	99,4	99,3	99,2	99,4 ¹⁾
Гемисульфат (6R)-5,10-CH ₂ -ТНФ (партия E)	100,0	100,1			99,7		99,4	98,9

¹⁾ Показатель за 45 месяцев

В Таблице 11 и Таблице 12 четко показано, что гемисульфат (6R)-5,10-CH₂-ТНФ обладает высокой стойкостью в течение длительного периода времени даже при комнатной температуре в форме чистого соединения, а также в форме фармацевтической композиции, такой, как лиофилизат.

Пример 4: Сравнительная стойкость сульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ

Для сравнения показателей долгосрочной стойкости гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, соединений согласно изобретению, с показателями долгосрочной стойкости (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, сульфатной соли, полученной в соответствии с документом EP 0 537 492 B1, данные стойкости для сульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ получали при разных температурах и значениях влажности.

(а) Стойкость сульфата (6R)-5,10-CH₂-ТНФ

сульфатную соль (6R)-5,10-CH₂-ТНФ приготавливали в соответствии с описанными в литературе процедурами (документ EP 0 537 492 B1) и хранили в течение 15 месяцев при -20°C. Затем образцы продукта хранили при 5°C, соответственно, при 25°C и 60% относительной влажности и, соответственно, при 40°C и 75% относительной влажности. Содержание сульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, оставшейся в образце, измеряли путем ВЭЖХ с периодическими интервалами. Содержание сульфата (6R)-5,10-CH₂-ТНФ сравнивали с первоначальным значением во время приготовления (% отн.). Результаты показаны в Таблицах 13 и 14.

Таблица 13: Долгосрочная стойкость сульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ при -20°C

Температура / относительная влажность	Сульфат (6R)-5,10-CH ₂ -ТНФ (% отн.)	
	0 мес.	15 мес.
-20°C	100,0	98,7

Таблица 14: Дальнейшая долгосрочная стойкость сульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ при 5°C, 25°C/60% отн. вл. и, соответственно, 40°C/75% отн. вл.

Температура / относительная влажность	Сульфат (6R)-5,10-CH ₂ -ТНФ (% отн.)	
	0 мес.	6 мес.
5°C	98,7	97,3
25°C/60% отн. вл.	98,7	95,5
40°C/75% отн. вл.	98,7	95,0

Сравнение данных в Таблицах 13 и 14 с данными стойкости гемисульфата (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, как описывается в Примере 3, четко показывает, что

- 5 i) существует заметная разница в стойкости гемисульфата (6R)-5,10-CH₂-ТНФ по сравнению с сульфатом (6R)-5,10-CH₂-ТНФ, и
- ii) гемисульфат (6R)-5,10-CH₂-ТНФ является значительно более стойким в течение длительного периода времени по сравнению с сульфатом (6R)-5,10-CH₂-ТНФ.

10 (b) Содержание продукта распада 10-формил-(6R)-тетрагидрофолиевой кислоты

Сульфатную соль (6R)-5,10-CH₂-ТНФ получали в соответствии с описываемыми в литературе процедурами (документ EP 0 537 492 B1) и хранили в течение 15 месяцев при -20°C. Затем образцы продукта хранили при 5°C, соответственно, при 25°C и 60% относительной влажности и, соответственно, при 40°C и 75% относительной влажности. Содержание 10-формилтетрагидрофолиевой кислоты, главного продукта распада, измеряли путем ВЭЖХ с периодическими интервалами и указывали в абсолютных значениях (% масса/масса). Результаты показаны в Таблицах 15 и 16.

20 Таблица 15: Содержание продукта распада 10-формилтетрагидрофолиевой кислоты при хранении при -20°C

Температура / относительная влажность	10-формилтетрагидрофолиевая кислота (% масса/масса)	
	0 мес.	15 мес.
-20°C	0,53	1,37

Таблица 16: Дальнейшее содержание продукта распада 10-формилтетрагидрофолиевой кислоты при хранении при 5°C, 25°C/60% отн. вл., соответственно, 40°C/75% отн. вл.

Температура / относительная влажность	10-формилтетрагидрофолиевая кислота (% масса/масса)	
	0 мес.	6 мес.
5°C	1,37	1,47
25°C/60% отн. вл.	1,37	1,89

40°C/75% отн. вл.	1,37	2,36
-------------------	------	------

Пример 5: Фармацевтические дозированные формы гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ

(а) Лиофилизат для восстановления влагосодержания,
 5 предназначенный для внутривенного применения
 К 18,480 кг воды при 4°C, через которую барботировали аргон в течение 1 часа добавляли 1,386 кг NaOH 2М и 968,9 г тригидрата цитрата натрия. Смесь перемешивали при 4°C в атмосфере аргона до полного растворения (рН 13,0). Затем добавляли 473,9 г гемисульфата (6R)-5,10-CH₂-ТНФ при использовании
 10 210 г насыщенной аргоном промывочной воды при температуре 4°C (медленное растворение, рН 6,5). Затем уровень рН доводили при помощи NaOH 2М до 9,3 ±0,1 (121,8 г). Добавляли 203,6 г насыщенной аргоном воды при температуре 4°C (общее количество раствора 21,844 кг).

Затем раствор фильтруют сквозь стерильный фильтр. В каждый флакон по
 15 10 мл добавляли 5,201 г (5 мл) стерильного фильтрованного раствора, а затем лиофилизировали при -45°C.

Перед инъекцией в каждый флакон добавляли 10 мл воды (WFI) (293 мосмол/кг).

(b) Рецептирование лиофилизированной композиции гемисульфата
 20 (6R)-5,10-CH₂-ТНФ при по сути нейтральном уровне рН

Применяли следующие материалы (мг/100 мл) и процедуру для получения лиофилизированной композиции:

Материалы (мг/100 мл):

5,530 г гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-ТНФ (эквивалент 5,000 г (6R)-
 25 5,10-CH₂-ТНФ)

6,000 г лимонной кислоты, безводная, порошок, USP

4,000 г аскорбиновой кислоты, гранулированной, USP

NaOH/HCl для регулирования рН

100 мл воды для инъекций (WFI), USP qs

30 (i) Процедура: барботирование WFI фильтрованным газообразным азотом, NF в течение 30 мин.

(ii) Запись массы тары - 100 мл пластиковой бутылки.

(iii) Взвешивание лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты и приблизительно 90 г барботированной N₂ воды.

(iv) Перемешивание до растворения.

(v) Доведение pH до $7,0 \pm 0,1$ при помощи 1N NaOH или HCl.

5 (vi) Охлаждение раствора до 10°C.

(vii) Добавление гемисульфатной соли (6R)-5,10-CH₂-THF, перемешивание до растворения.

(viii) Запись pH ($7,0 \pm 0,2$).

10 (ix) Добавление воды до конечной массы 110 г (или 100 мл). Запись массы.

(x) Пропускание сквозь 0,2-микронный фильтр при поддержании раствора в максимально охлажденном состоянии.

(xi) Разливание в флаконы (2 мл или 100 мг 5,10-CH₂-THF на флакон) при поддержании раствора в максимально охлажденном состоянии.

15 (xii) Высушивание замораживанием.

(xiii) Запечатывание флаконов в низком вакууме с азотом в свободном пространстве.

(xiv) Закрывание флаконов обжимными колпачками.

Пример 6: Доклинические / клинические результаты

20 (a) Результаты доклинических исследований на животных моделях, производимых согласно указаниям ICH S9, показывают, что гемисульфат (6R)-5,10-CH₂-THF является безопасным в наивысших дозах, вводимых крысам (100 мг/кг/день) и собакам (50 мг/кг/день). Кроме того, клинические данные показывают, что гемисульфат (6R)-5,10-CH₂-THF, вводимый в дозах до 200 мг/м², является безопасным для пациентов.

25 (b) В одностороннем слепом, рандомизированном исследовании фазы I/II (ISO-CC-002), проводимом на 32 пациентах, у которых был диагностирован рак толстой кишки, изучали фармакокинетические и фармакодинамические свойства гемисульфата (6R)-5,10-CH₂-THF по сравнению с леволейковорином в
30 опухолевой ткани, сопредельной слизистой оболочке и плазме крови. Исследование проводили в университете в Сальгренской больнице Гетеборгского университета, Швеция. Анализ полных данных исследования показал, что введение гемисульфата (6R)-5,10-CH₂-THF обеспечивает значительно большее воздействие и пиковые показатели концентрации

метилентетрагидрофолата в плазме по сравнению с полученными после введения леволейковорин. Концентрация метилентетрагидрофолата и тетрагидрофолата в ткани и сопредельной слизистой оболочке также была выше после введения гемисульфата (6R)-5,10-CH₂-THF по сравнению с показателем, полученным

5 после введения леволейковорина.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиофилизированная композиция пригодная для получения
восстановленного продукта, предназначенного для внутривенного применения,
5 где композиция приготовлена из гемисульфатной соли 5,10-метилен-(6R)-
тетрагидрофолиевой кислоты, NaOH, цитрата и воды.

2. Лиофилизированная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что цитрат
10 включает тригидрат цитрата натрия.

3. Лиофилизированная композиция приготовленная из гемисульфатной
соли 5,10-метилен-(6R)-тетрагидрофолиевой кислоты, где композиция
приготовлена лиофилизацией композиции, которая получена смешением
гемисульфатной соли 5,10-метилен-(6R)-тетрагидрофолиевой кислоты,
15 лимонной кислоты,
аскорбиновой кислоты,
NaOH/HCl для регулирования по сути нейтрального уровня pH, и
воды для инъекций.

4. Лиофилизированная композиция по п. 3, отличающаяся тем, что
20 компоненты смешивают в следующих количествах:

5,530 г гемисульфатной соли 5,10-метилен-(6R)-тетрагидрофолиевой
кислоты (эквивалент 5,000 г (6R)-5,10-CH₂-THF),
6,000 г лимонной кислоты,
25 4,000 г аскорбиновой кислоты,
NaOH/HCl для регулирования по сути нейтрального уровня pH, и
до 100 мл воды для инъекций.

30