[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07D475/08
A61K 31/505

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95106005.8

[45]授权公告日 2001 年 3 月 21 日

[11]授权公告号 CN 1063444C

[22]申请日 1995.5.8 [24]颁证日 2001.2.3
[21]申请号 95106005.8
[30]优先权
[32]1994.5.9 [33]CH [31]01442/1994
[73]专利权人 阿泼洛发公司
地址 瑞士沙夫豪森
[72]发明人 H·R·穆勒 M·厄尔曼 R·莫泽
T·安曼
[56]参考文献
495204 1992. 7.22 C01D475/04
审查员 陈 真

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 杜京英

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 稳定的结晶(6S)－和(6R)－四氢叶酸

[57]摘要

本发明涉及稳定的结晶(6S)－和(6R)－四氢叶酸，其用途和其制备方 法。结晶(6S)－和(6R)－四氢叶酸既纯又极稳定。这些物质甚至在较 高温度下不加稳定剂暴露于空气中时也绝对惰性。在 pH≥3.5 制备结晶(6S)－四氢叶酸的结晶方法和在 pH≥2 制备结构(6R)－四氢叶酸的结 晶方法都非常简便易行并且收率高。

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 结晶(6*S*)—四氢叶酸。

2. 结晶(6*R*)—四氢叶酸。

3. 结晶(6*S*)—和/或(6*R*)—四氢叶酸的制备方法，其特征在于结晶(6*S*)—、(6*R*)—或(6*R*,*S*)—四氢叶酸。

4. 结晶(6*S*)—四氢叶酸的制备方法，其特征在于(6*S*)—或(6*R*,*S*)—四氢叶酸在极性介质中 *pH*≥3.5 下结晶。

5. 结晶(6*R*)—四氢叶酸的制备方法，其特征在于(6*R*)—或(6*R*,*S*)—四氢叶酸在极性介质中 *pH*≥2 下结晶。

6. 权利要求 4 或 5 的方法，其中水或水与极性水溶性有机溶剂的混合物用作极性介质，结晶在溶液或悬浮液中进行。

7. 权利要求 4 或 6 的方法，其中为了引发(6*S*)—四氢叶酸结晶，调节 *pH* 至 3.5—6.5 之间。

8. 权利要求 5 或 6 的方法，其中为了引发(6*R*)—四氢叶酸结晶，调节 *pH* 至 2—5.5 之间。

9. 权利要求 4，5,6,7 或 8 的方法，其特征在于在结晶过程中保持 *pH* 恒定。

10. 权利要求 3,4,5,6,7,8 或 9 的方法，其中通过分步结晶分离出(6*S*)—四氢叶酸，并从剩余母液中分离(6*R*)—四氢叶酸。

11. 结晶(6S)—和/或(6R)—四氢叶酸作为制备药物或作为制备其它四氢叶酸衍生物的成分的用途。

12. 根据权利要求 3，4,5,6,7,8,9 或 10 制备的结晶(6S)—和/或(6R)—四氢叶酸作为制备药物或制备其它四氢叶酸衍生物的成分的用途。

13. 含有结晶(6S)和/或(6R)—四氢叶酸的药物制剂。

说　明　书

稳定的结晶(6S)—和(6R)—四氢叶酸

本发明涉及结晶的 *N*—〔4—〔〔(2—氨基—1,4,5,6,7,8-六氢—4—氧代—(6*S*)—和—(6*R*)—蝶啶基)甲基〕氨基〕苯甲酰基—*L*—谷氨酸(下称结晶(6*S*)—或(6*R*)—四氢叶酸)、其用途和制备方法。

四氢叶酸衍生物有两个不对称中心。因为这些衍生物是从叶酸(即 *N*—(蝶酰)—*L*—谷氨酸)合成而来，所以谷氨酸片断中的光学活性碳原子为 *L* 型，而 6—位的光学活性碳原子通常由蝶酰基 5,6—位双键氢化形成，故以外消旋(即(6*R*,*S*))形式存在。因此，形成的四氢叶酸衍生物由两种非对映异物体的 1∶1 混合物组成。

四氢叶酸盐主要以 5—甲酰—5, 6,7,8—四氢叶酸钙(*leucovorin*)或 5—甲基—5,6,7,8—四氢叶酸钙的形式使用，作为药物治疗幼巨红细胞性叶酸贫血，作为解毒剂改善肿瘤治疗中叶酸拮抗剂，特别是氨基喋呤和氨甲蝶呤的耐受性("抗叶酸补救途径")、增强氟代嘧啶的治疗效果及治疗自身免疫疾病如牛皮癣和风湿性关节炎、改善对某些抗寄生物剂如三甲氧苄二氨嘧啶—磺胺甲

基异噁唑的耐受性、及减低化疗中二去氮四氢叶酸盐(*dideazatetrahydrofolates*)的毒性。四氢叶酸还可用作制备各种叶酸衍生物的起始物。

迄今为止，直接使用四氢叶酸作为药物及作为制备各种四氢叶酸衍生物的起始物是不可能的，因为在制备具有作为药物活性物质可以接受的纯度的四氢叶酸时遇到困难，及四氢叶酸极其不稳定，特别是它对氧化高度敏感〔见本文及 *A. L. Fitzhugh*, *Pteridines* 4(4), 187—191(1993)〕。已发展了各种克服此不稳定性的方法，必须特别提及与本发明有关的 *DE—OS* 2323124。关于与本发明有关的制备四氢叶酸的方法，还必须特别提及 *EP*600460。但是迄今还没有发现在工业上可行的制备超纯的、满足四氢叶酸药物应用的足够稳定性的四氢叶酸的方法。

令人惊异地是，现发现通过结晶光学纯(6*S*)—或光学纯(6*R*)—、富集的(6*S*)—或富集的(6*R*)—或(6*R*,*S*)—四氢叶酸，可得到具有优良稳定性的化学及光学超纯的(6*S*)— 或(6*R*)—四氢叶酸。生成的结晶(6*S*)—和/或(6*R*) —四氢叶酸使得该物质第一次可用作药物或作为工业规模制备其它超纯四氢叶酸衍生物的起始物。

(6*S*)—四氢叶酸从 $pH \geqslant 3.5$ 的极性介质中结晶，而(6*R*)—四氢叶酸从 $pH \geqslant 2.0$ 的极性介质中结晶。

适当的 极性介质特别为水或水和与水相混溶的有机溶剂的混合物，如水溶性醇，例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、乙二醇；水溶性

低级脂肪酸，例如甲酸、乙酸、乳酸；或水溶性酰胺，例如甲酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、1—甲基吡咯烷酮、2—甲基吡咯烷酮、2—哌啶酮。对所用溶剂和混合比例没有特别限制，因为结晶(6S)—四氢叶酸和结晶(6R)—四氢叶酸的溶解性特征一般低于相应的无定形形式。

为了引发(6S)—四氢叶酸结晶，*pH* 在 3.5 至 6.5 之间特别适合。为了引发(6R)—四氢叶酸结晶，*pH* 在 2 至 5.5 之间特别适合。引发结晶的最佳 *pH* 取决于所用物质和目的，并可经简单试验测定。一般的原则是：起始溶液中盐含量越高，要求引发结晶的 *pH* 越低，而引发结晶的 *pH* 低则要求结晶过程慢，因为不然的话在 *pH*3 左右沉淀出无定形四氢叶酸。例如，从用硼氢化物还原叶酸所得反应溶液中直接结晶(6S)—四氢叶酸，引发结晶严格要求 $pH \leqslant 4.8$。结晶被引发后，*pH* 可以变化。

在(6S)—四氢叶酸结晶过程中及在(6R)—四氢叶酸结晶过程中，*pH* 升高或通过加入酸或缓冲液保持 *pH* 恒定。对于(6S)—四氢叶酸的结晶，如果想得到光学富集的(6S)—四氢叶酸，优选在结晶过程中 *pH* 为 4.5—5.5；而如果想制备稳定的结晶(6S)—四氢叶酸，则优选结晶过程中 *pH* 为 3.5—4.5。对于(6R)—四氢叶酸的结晶，独立于所预期结果，优选结晶过程中 *pH* 为 3.5—4.5。对于每种情况，可在室温、较高温度或　　较低温度下进行结晶。

一般，结晶时间可为几分钟到数天。结晶时间越长，一般得到的

产品纯度越高也更稳定。

从低于适合引发目标异构体结晶的 *pH* 开始，或优选从更高 *pH* 开始，通过慢慢调节 *pH* 自发地结晶(6*S*)—和(6*R*)—四氢叶酸。可在适于引发目标异构体结晶的 *pH* 范围内通过接种相应的结晶四氢叶酸来引发结晶。

结晶起始物可为外消旋(6*R*,*S*)—四氢叶酸、富集的(6*S*)—或(6*R*)—四氢叶酸以及无定形或结晶的(6*S*)—或(6*R*)—四氢叶酸。适宜的起始物不仅可为已分离的固体物质如(6*R*,*S*)—四氢叶酸、如 *EP*495204 中所述制得的硫酸和磺酸与(6*S*)—四氢叶酸的加成盐，而且还可为叶酸通过催化氢化或用硼氢化物还原现场制备的四氢叶酸。(6*R*)—四氢叶酸可从(6*S*)—四氢叶酸结晶母液中直接结晶。两种异构体都可从如调 *pH* 至>7 或<2 所得溶液、或从悬浮液结晶。

用无定 形或部分结晶的光学纯四氢叶酸或其盐作为结晶的起始物，上述方法制得了具有前所未有的纯度(>98%)及前所未有的稳定性的结晶四氢叶酸。

本发明还涉及结晶(6*S*)—和/或(6*R*)—四氢叶酸作为制备药物的成分或用于制备其它四氢叶酸衍生物的用途，因为其优良稳定，固态结晶(6*S*)—和(6*R*)—四氢叶酸在实际上无限期的时间内保持高质量。本发明还涉及包含结晶(6*S*)—和/或(6*R*)—四氢叶酸的药物制剂。用已知方法如冷冻干燥制备该药物制剂。其施用类

似四氢叶酸领域中的已知物质如5—甲酰—5,6,7,8—四氢叶酸的施用。

本发明还涉及通过分步结晶分离(6*R*,*S*)—四氢叶酸得到两种非对映异构体(6*S*)—和(6*R*)—四氢叶酸的方法。该方法非常简单且收率高。甚至在粗外消旋(6*R*,*S*)—四氢叶酸经第一次结晶后，就可得到收率高于70%，且其(6*S*)组分的量高于75%的结晶(6*S*)—四氢叶酸，得到收率50%以上，且其(6*R*)组分的量在80%以上的结晶(6*R*)—四氢叶酸。在相似条件下进一步结晶，可得到异构体纯度大于95%的结晶(6*S*)—和(6*R*)—四氢叶酸。

(6*R*)—或(6*S*)—四氢叶酸还可以不经分离直接用于制备其它四氢叶酸衍生物。例如，通过向(6*R*)—四氢叶酸溶液中加入甲醛可很容易地制备富集的5,10—亚甲基—(6*S*)—四氢叶酸。

在实施例中所给出的四氢叶酸含量和异构体含量均由*HPLC*测定。所有四氢叶酸含量均基于无水物质。

实施例1(稳定性)

为了测定结晶(6*S*)—和(6*R*)—四氢叶酸的稳定性，这些物质和对比样品一起在60℃空气中压力条件下贮存。在周期性时间间隔内测定剩余的四氢叶酸含量，并与起始值相比示于下表

	在60℃空气中的测试时间（天）							
	0	2	6	13	21	28	57	360
结晶（6S）—四氢叶酸	100.0%	100.1%	102.5%	98.7%	103.6%	103.1%	101.2%	93.3%
结晶（6R）—四氢叶酸	100.0%	96.4%	96.1%	93.3%	92.7%		82.0%	
Yamanollchi's 结晶（6R,S）—四氢叶酸	100.0%	83.6%		48.6%	31.0%		13.4%	
无定形的（6S）—四氢叶酸	100.0%	60.4%		13.7%	7.9%			
无定形的（6R）—四氢叶酸	100.0%	70.5%		29.1%	21.6%		9.8%	
无定形的（6R,S）—四氢叶酸	100.0%	53.4%		17.4%	13.2%			

在60℃空气中甚至在很长测试时间后，结晶(6S)—和(6R)—四氢叶酸还保持很浅的颜色，几乎为白色。相反，为了比较而包括在内的其它产物迅速高度变色。

用于稳定性测试的物质按如下制备：

• 结晶(6S)—四氢叶酸

如本专利申请的实施例6

·结晶(6*R*)—四氢叶酸

如本专利申请的实施例 9

·"*Yamanouchi*'s 结晶(6*R*,*S*)—四氢叶酸"

如 *DE—OS* 2323124,实施例 3

·无定形(6*S*)—四氢叶酸

将(6*S*)—四氢叶酸溶解在乙酸中,用乙醚沉淀

·无定形(6*R*)—四氢叶酸

将(6*R*)—四氢叶酸溶解在乙酸中,用乙醚沉淀

·无定形(6*R*,*S*)—四氢叶酸

将(6*R*,*S*)—四氢叶酸溶解在乙酸中,用乙醚沉淀。

实施例 2(粉末 *X* 射线图)

为了表征结晶(6*S*)—和(6*R*)—四氢叶酸的结构特性(结晶性),在相同条件下测定了这些物质和对比样品的粉末 *X* 射线图(衍射谱)。

结晶(6*S*)—和结晶(6*R*)—四氢叶酸都产生清晰可分辨的衍射图谱,谱带尖、背景度低。该图谱表明结晶物含量高。相反,"*Yamanouchi*'s 结晶(6*R*,*S*)—四氢叶酸"产生分辨度差的图谱,谱带模糊(漫射极大),且背景度高。该图谱说明无定形(6*R*,*S*)—四氢叶酸占优势,仅含低百分数的结晶物。

用于产生粉末 *X*—射线图的物质按如下制备:

·结晶(6*S*)—四氢叶酸

如本专利申请的实施例 6

• 结晶(6*R*)—四氢叶酸

如本专利申请的实施例 9

• "*Yamanouchi's* 结晶(6*R*,*S*)—四氢叶酸"

如 *DE—OS* 2323124 的实施例 3。

实施例 3

a)将 4g(6*R*,*S*)—四氢叶酸悬浮在 16*ml* 水中，用 25%氨调 *pH* 至 9。在 50℃下，所形成的溶液用盐酸调 *pH* 至 5，再用氢氧化钠溶液慢慢调至所期望的 *pH* 值。取每份 2*ml* 在所示 *pH* 下的样品，吸滤过滤，用少量水洗涤。

pH	量	(6S)的百分比
pH 5.5	0.03 g	87.8%
pH 6.0	0.06 g	87.8%
pH 6.4	0.02 g	88.6%

b) 将 4g(6*R*,*S*)—四氢叶酸悬浮在 16*ml* 水中，用 25%氨调 *pH* 至 9。在 50℃下，所形成的溶液用盐酸调 *pH* 至 5，再用盐酸慢慢调至所期望的 *pH* 值。取每份 2*ml* 在所示 *pH* 下的样品，吸滤过滤，用少量水洗。

pH	量	(6S)的百分比
pH 4.8	0.09 g	72.7%
pH 4.5	0.15 g	57.9%
pH 4.2	0.27 g	51.8%

c)将 4g(6R,S)—四氢叶酸悬浮在 16ml 水中，用 25%氨调 pH 至 9。在 50℃下，所形成的溶液用盐酸调 pH 至 5，再用盐酸慢慢调 pH 至期望的 pH 值。取每份 2ml 在所示 pH 下的样品，吸滤过滤，用少量水洗涤。

pH	量	(6S)的百分比
pH 4.1	0.16 g	56.2%
pH 3.8	0.10 g	52.2%
pH 3.5	0.22 g	51.8%
pH 3.0	0.12 g	51.6%

d)将 10g(6R,S)—四氢叶酸悬浮在 80ml 水中，用 1N 盐酸调 pH 至 1.3。在室温下，用 1.8N 氨将形成的溶液调至所期望的 pH 值。取每份 2ml 在所示 pH 下的样品，吸滤过滤，用少量水洗涤。

pH	量	(6S)的百分比
pH 2.0	0.03 g	50.3%
pH 2.3	0.13 g	50.5%
pH 2.5	0.12 g	49.3%
pH 2.8	0.22 g	50.8%
pH 3.1	0.17 g	49.5%
pH 3.5	0.21 g	51.5%
pH 4.0	0.14 g	59.1%
pH 4.5	0.16 g	56.1%
pH 5.1	0.22 g	72.7%
pH 5.5	0.20 g	70.9%

表 a)至 d)中所列数据的方法参数不是最优的，因为按照相同的实验步骤进行了所有的试验，以提高它们的可比性。

实施例 4

将 5g 每份(6R, S)－四氢叶酸悬浮在 50ml 水中，在室温或 40℃静置 5 天。吸滤过滤(过滤温度＝结晶温度)并洗涤后，得到下列结果：

	RT		40℃	
	量	(6S)的百分比	量	(6S)的百分比
pH 3.1[1]	4.2 g	52.5%	4.5 g	52.2%
pH 4.2[2]	3.5 g	58.9%	3.9 g	59.3%
pH 5.1[2]	1.8 g	82.1%	1.5 g	81.0%

1) 悬浮(6R,S)—四氢叶酸而无矫正剂时的 *pH*，类似于 *DE—OS* 2323124 的实施例 3。

2)用氢氧化钠溶液调至所期望 *pH*。

列于该表中的数据的方法参数不是最佳的，因为采用相同的试验步骤进行了所有试验，以提高它们的可比性。

实施例 5

将 40g(6R,S)—四氢叶酸悬浮在 160*ml* 水中，用 25%氨调 *pH* 至 9.3。在 50℃下，用盐酸将形成的溶液调至 *pH*5.1，在接下来的结晶过程中保持 *pH* 在 5.1—5.2 之间。当结晶终止后，将混合物冷却至 0—5℃，减压过滤并用水洗。

这样就得到 19g 结晶(6S)—四氢叶酸，其化学含量为 95.9%，(6S)百分比为 80.5。

一半母液用 1.1g 乙醇沉淀，得到富集的无定形(6R)—四氢叶酸，其化学含量为 63.3%，(6R)百分比为 75.9；而另一半母液用 6.3g 盐酸迅速调 *pH* 至 3.5，生成富集的无定形(6R)—四氢叶酸，

其化学含量为64.8%，(6R)百分比为75.9。

实施例6

将(6S)百分比为99.9的60g(6S)—四氢叶酸与苯磺酸的加成盐(按EP495204中所述方法制备)悬浮在240ml水中，用63ml 1.8N氨或55.2ml 2N氢氧化钠溶液调悬浮液的pH至5.5。保持pH在5.6。然后用30%氢氧化钠溶液将此白色稠悬液的pH调至9.3，将形成的澄清溶液加热至50℃。

然后用盐酸将pH慢慢调至5.2，再接种结晶(6S)—四氢叶酸后，得到43.0g结晶(6S)—四氢叶酸，其化学含量为96.8%，(6S)百分比为99.9。

将生成的结晶(6S)—四氢叶酸溶解在160ml pH9的水中，然后用盐酸慢慢调pH至4.2，再接种结晶(6S)—四氢叶酸后，得到32.5g结晶(6S)—四氢叶酸，其化学含量为98.5%，(6S)百分比为100.0。

在pH4.2下再重结晶，得到化学含量>99%且(6S)百分比为100.0的结晶(6S)—四氢叶酸。

室温下，生成的结晶(6S)—四氢叶酸在水中的溶解度为0.0022%。

实施例7

将40g(6R,S)—四氢叶酸悬浮在160ml水和40ml甲醇中，用25%氨将悬浮液调至pH9.1，在50℃下，形成的溶液用盐酸慢慢

调至 *pH*5.1，在接下来的结晶过程中保持 *pH*5.1—5.2 之间。当结晶结束后，将 20*ml* 样品在 50℃吸滤过滤，用水/甲醇洗涤。得到 1.3g 结晶(6*S*)—四氢叶酸，其化学含量为 96.1%，(6*S*)百分比 83.0。

将剩余部分冷却至 0—5℃，减压过滤，用水/甲醇洗涤。又得到 18.6g 结晶(6*S*)—四氢叶酸，其化学含量为 90.9%，(6*S*)百分比为 67.1。

实施例 8

将 60g 叶酸悬浮在 240*ml* 水中，用 30%氢氧化钠溶液调 *pH* 至 11.5。形成的溶液 在 70℃下用 120*ml* 水中的 30g 硼氢化钠和 12g30%氢氧化钠溶液还原。反应时间约 5 小时后，反应混合物用 180*ml* 水稀释，用盐酸慢慢调 *pH* 至 4.5。在接下来的结晶过程中，*pH* 升至约 5.5。在 0—5℃减压过滤此悬液，用少量水洗涤。

得到 25.5g 结晶(6*S*)—四氢叶酸，其化学含量为 94.4%，(6*S*)百分比为 82.7。干燥后含水量为 4.0%。

将 20g 形成的结晶(6*S*)—四氢叶酸溶解在 *pH*9 的 80*ml* 水中，然后用盐酸慢慢 调 *pH* 至 5.1，再接种结晶(6*S*)-四氢叶酸后，得到 4.5g 结晶(6*S*)—四氢叶酸，其化学含量为 94.0%，(6*S*)百分比为 94.7，干燥后含水量为 1.8%。

实施例 9

将(6*R*)百分比为 99.4 的 50g 无定形(6*R*)—四氢叶酸悬浮在 600*ml* 水中，用 25%氨调悬液 *pH* 到 9.0。加热所形成的澄清溶液

至50℃。

用盐酸慢慢调节 *pH* 为 4.4 后，保持该 *pH* 值，得到 42.0g 结晶(6*R*)—四氢叶酸，化学含量为 96.2%，(6*R*)百分比为 99.5。

形成的结晶(6*R*)—四氢叶酸在室温下水中的溶解度为 0.014%。

在 *pH*4.4 进一步重结晶，得到结晶(6*R*)—四氢叶酸，其化学含量＞98%，(6*R*)百分比＞99.5。

实施例 10

将 40g(6*R*, *S*) —四氢叶酸悬浮在 160*ml* 水中，用 25%氨将悬液调至 *pH*9.3。50℃下，用盐酸慢慢调节所形成溶液的 *pH* 至 5.1，在结晶过程中保持 *pH* 在 5.1—5.2 之间。结晶结束后，将混合物冷却至室温，减压过滤，用水洗涤。

得到 18.2g 化学含量为 94.0%，且(6*R*)百分比为 77.8 的结晶(6*S*)—四氢叶酸。

将(6*S*)—四氢叶酸结晶步骤的母液再加热至 50℃，用盐酸慢慢调 *pH* 至 4.4，在接下来的(6*R*)—四氢叶酸结晶过程中保持 *pH* 在 4.0—4.5 之间。结晶终止后，将混合物冷却至室温，减压过滤，用水洗。

得到 12g 化学含量为 78.0%，(6*R*)百分比为 74.8 的结晶(6*R*)—四氢叶酸。

实施例 11

从外消旋四氢叶酸开始，类似于EP600460的实施例2中所述条件，在pH5.2和45℃下重复所述方法。测定所形成产物的化学和光学纯度。同时记录每步的化学总收率。

	6S的百分比	含量g／g	纯度 6S的百分比	总收率
起始物	50 %	89.6%	44.8%	100%
第1次	80.5%	96.9%	78.0%	53.5%
第2次	90.0%	97.3%	87.6%	45.4%
第3次	94.4%	97.4%	91.9%	42.0%
第4次	96.4%	96.7%	93.2%	38.9%
第5次	97.7%	96.2%	94.0%	35.2%
第6次	98.4%	95.6%	94.1%	32.2%
第7次	98.9%	96.0%	94.9%	28.6%

从这些数据可以清楚地看出，重复施用该方法，使该方法的产物中(6S)的百分比提高而产物含量减低，这是由于重复进行该方法而引起的，必须考虑这一点。这样，即使重复施用该方法也不能制得纯度大于98%的产物。