

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 940**

51 Int. Cl.:

A61P 7/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07C 229/08 (2006.01)
C07D 475/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2019** **PCT/EP2019/067698**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2020** **WO20007839**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2019** **E 19737496 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023** **EP 3817813**

54 Título: **Sales cristalinas de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina**

30 Prioridad:

06.07.2018 EP 18182279

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2024

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

MOSER, RUDOLF;
GROEHN, VIOLA;
BOEHNI STAMM, RUTH;
BLATTER, FRITZ y
SZELAGIEWICZ, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 966 940 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

Sales cristalinas de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina

La presente invención se refiere a una sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,3 a 1:3,0 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.

Los tetrahidrofolatos se utilizan predominantemente como la sal de calcio del ácido 5-formiltetrahidrofólico (leucovorina y levoleucovorina), como la sal de calcio del ácido 5-metiltetrahidrofólico (Metafolin®) o como la sal sulfato del ácido 5,10-metilentetrahidrofólico (Modufolin®). Los campos más prominentes de uso son el tratamiento de la anemia megaloblástica por ácido fólico, como antídoto para aumentar la compatibilidad de los antagonistas del ácido fólico, especialmente de aminopterina y metotrexato, en la terapia antineoplásica («rescate antifolato»), para aumentar el efecto terapéutico de las pirimidinas fluoradas y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la psoriasis y la artritis reumatoide, para aumentar la compatibilidad de determinados fármacos antiparasitarios para mutaciones, por ejemplo trimetoprim-sulfametoxazol, así como para disminuir la toxicidad de los dideazatetrahidrofolatos en la quimioterapia.

La sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico se utiliza en particular como fármaco y como aditivo alimentario, como un preparado vitamínico, para la prevención de los defectos del tubo neural, para el tratamiento de las enfermedades depresivas y para influir en los niveles de homocisteína.

Es sabido que el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y sus sales son extremadamente inestables. En particular, estas son muy sensibles a la oxidación (véase también A.L. Fitzhugh, Pteridines 4 (4), 187-191 (1993) a este respecto) y, por tanto, difícil de producir a un nivel de pureza aceptable para un principio activo farmacéutico o un aditivo alimentario.

Se han empleado diversos métodos, como la exclusión de oxígeno al nivel más completo posible o la adición de antioxidantes como ácido ascórbico o L-glutatión reducido, para solucionar la inestabilidad del ácido 5-metiltetrahidrofólico y sus sales.

En el documento US 6 441 168 B1 se describen sales de metales alcalinotérreos del ácido 5-metiltetrahidrofólico, especialmente la sal de calcio, su cristalización y su uso. El inconveniente de esta sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es que existe en su forma cristalina hasta en cuatro modificaciones polimórficas. Por lo tanto, el proceso de fabricación de la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico tiene que estar controlado de forma muy precisa. Adicionalmente, la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico del documento US 6 441 168 B1 típicamente contiene una red cristalina de todas sus formas polimórficas con al menos uno, pero hasta un máximo de cuatro equivalentes de agua por equivalente de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

En el documento US 2016207925 A1 se reivindican composiciones liofilizadas, secadas por atomización o hervidas que comprenden L-asparagina o L-arginina junto con ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico. No obstante, las composiciones descritas son mezclas no estequiométricas sencillas que existen en un estado amorfo.

Las nuevas formas cristalinas de un compuesto farmacéuticamente útil ofrecen una oportunidad para mejorar el perfil de rendimiento de un medicamento y/o vitamina/alimentos medicinales. Esto amplía la reserva de materiales que un científico de formulación tiene disponible para diseñar nuevas formas farmacéuticas con características mejoradas.

El problema técnico que subyace a la presente invención es el suministro de una forma cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico que supere los inconvenientes de la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico conocida en la técnica.

Adicionalmente, las nuevas formas cristalinas a menudo muestran diferentes características físicas y/o biológicas deseables, que pueden ayudar en la fabricación o formulación del compuesto activo, a los niveles de pureza y uniformidad requeridos para su autorización reglamentaria.

En beneficio de la estabilidad de los tetrahidrofolatos, el objetivo siempre es proporcionar un compuesto que tenga una baja absorción de agua durante su almacenamiento y que pueda secarse suficientemente durante la fabricación. Además, son muy deseables fármacos que no absorban grandes cantidades de agua en condiciones ambientales. Son especialmente deseables las sustancias que no cambian su contenido de agua cuando cambia la humedad ambiental relativa, ya que grandes cambios en el contenido de agua debido a cambios en la humedad ambiental relativa dificultan la obtención de una mayor precisión con respecto a la forma farmacéutica.

El problema técnico se resuelve mediante una sal cristalina formada por ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,3 a 1:3,0 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.

- La forma sólida de la presente invención posee características farmacológicas mejoradas, por lo que ofrece posibilidades potenciadas para modular y diseñar fármacos mejorados. En comparación con las formas polimórficas cristalinas de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico conocida en la técnica, la adsorción de agua de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina es significativamente menor, lo que lleva a un control considerablemente mejorado sobre el nivel de la forma farmacéutica objetivo en el fármaco debido a que el cambio de las cantidades de agua adsorbidas en condiciones cambiantes de humedad relativa es significativamente menos pronunciado.
- Otro aspecto ventajoso de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina es que puede lograrse una alta pureza química y óptica del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en una única etapa de cristalización.
- Supone una ventaja que un fármaco tenga una alta solubilidad cinética cuando se administra por vía oral, ya que esto lleva a una biodisponibilidad mejorada y más rápida. Por consiguiente, el medicamento puede llevar a cabo su función con mayor facilidad.
- El ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es poco hidrosoluble. Es sabido que la forma termodinámicamente estable de la sal de calcio (forma III) muestra una hidrosolubilidad de aproximadamente 2,5 mg/ml y la solubilidad de la forma I metaestable es de aproximadamente 10 mg/ml a temperatura ambiente. En determinadas condiciones de pH, en particular cuando el pH del entorno es más bajo que el pH de equilibrio de una sal en concreto, las sales pueden potencialmente desproporcionarse en un ácido libre y, en consecuencia, su solubilidad disminuye considerablemente. Por lo tanto, las solubilidades termodinámicas de las sales reivindicadas a valores de pH desde aproximadamente neutros hasta valores más bajos son inaccesibles debido a la lenta desproporción de las sales (formación de ácido libre poco soluble). No obstante, la biodisponibilidad está dominada por los efectos cinéticos. La administración de una forma sólida de un fármaco va seguida de su disolución y, tras el primer paso de disolución, los fluidos corporales diluyen y distribuyen el fármaco. Por tanto, la solubilidad cinética es un parámetro fundamental que influye en la biodisponibilidad, ya que el fármaco inicialmente disuelto se diluye y transporta con facilidad. En el caso de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y L-leucina se encontró, sorprendentemente, que la solubilidad cinética mejora en un factor de aproximadamente dos en comparación con la sal de calcio conocida (forma I metaestable). Presumiblemente, la diferencia en la solubilidad cinética de la sal de la presente invención con respecto a la forma termodinámicamente estable de la sal de calcio (forma III) podría ser incluso mayor. Por lo tanto, de manera temporal, puede alcanzarse una concentración de fármaco mucho mayor.
- Adicionalmente, la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina existe en su forma cristalina en una modificación polimórfica claramente definida. Por consiguiente, el proceso de fabricación de la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina no requiere un control muy preciso de las condiciones de cristalización.
- Preferiblemente, la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,5 a 1:2,5 (en mol/mol).
- Incluso más preferiblemente, la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,75 a 1:1,25 (en mol/mol).
- Preferiblemente, la relación entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de aproximadamente 1:1 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.
- Preferiblemente, la sal de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 14,1; 17,5; 19,1; 21,2; 21,4 y 23,7.
- Más preferiblemente, la sal de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con al menos tres picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) seleccionados a partir de los siguientes picos localizados en 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 14,1; 17,5; 19,1; 21,2; 21,4 y 23,7, e incluso más preferiblemente, la sal de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 14,1; 17,5; 19,1; 21,2; 21,4 y 23,7.
- Preferiblemente, la sal de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 13,8; 14,1; 15,0; 17,5; 18,2; 19,1; 19,7; 21,2; 21,4; 23,7; 26,1 y 27,6.
- Más preferiblemente, la sal de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD sustancialmente como se muestra en la figura 1.

Incluso más preferiblemente, las sales cristalinas mencionadas anteriormente tienen al menos el 99 % en peso o más de pureza química y/o estereoisomérica.

Un aspecto adicional de la presente invención es un proceso para obtener la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina que comprende las etapas de:

- 5 i) proporcionar una mezcla de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuados;
- ii) añadir una base, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuado, para disolver los compuestos;
- iii) calentar la composición hasta al menos 60 °C y, opcionalmente, llevar a cabo una filtración para aclarar la solución;
- 10 iv) cristalizar y enfriar la mezcla a una temperatura de entre 1 y 30 °C, añadir opcionalmente más solvente o mezcla de solventes; y
- v) aislar el material sólido obtenido y, opcionalmente, secar el producto.

Preferiblemente, la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina de la etapa ii) está en el rango de 1:1 a 1:3.

Más preferiblemente, el solvente es agua.

- 15 En las etapas iii) y/o iv) pueden añadirse cristales semilla.

Preferiblemente el éster etílico de L-leucina se utiliza como clorhidrato de éster etílico de L-leucina.

También forma parte de la presente invención una composición farmacéutica, aditivo alimentario y/o preparado que comprende la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y, opcionalmente, uno o más excipientes aceptables.

- 20 La composición farmacéutica puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparados líquidos orales, polvos, liofilizados, gránulos, pastillas, polvos para reconstitución, suspensiones para inyección o infusión, o supositorios.

La composición farmacéutica puede además comprender al menos un fármaco adicional y, preferiblemente, es una composición farmacéutica para administración por vía oral, parenteral, intramuscular, intraespinal, intratecal, periodontal, tópica o rectal.

- 25 También está protegido por la presente invención el uso de la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina como constituyente para la producción de fármacos y/o como aditivo alimentario.

La sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina puede usarse en el tratamiento de reducción de homocisteína, anemia, defectos del tubo neural, enfermedades cardiovasculares, depresión, deterioro cognitivo, enfermedad de Alzheimer y osteoporosis y/o tratamiento dietético de niveles bajos de folato en plasma y/o en eritrocitos y/o en líquido cefalorraquídeo y/o en el sistema nervioso central o periférico.

30

En resumen, el perfil de propiedades ofrecido por la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina de la presente invención es ventajoso para su uso en medicamentos o como aditivo alimentario. Especialmente, un experto no podría prever el bajo cambio en el contenido de agua en un ambiente con una humedad relativa del 20 al 75 %.

Además, la solubilidad cinética es mayor, lo que tampoco podría haber previsto un experto.

35 Ejemplos

Difracción de rayos X en polvo

Difractómetro Stoe Stadi P equipado con un detector Mythen1K; radiación Cu-K α 1; condiciones de medición estándar: transmisión; potencia del tubo 40 kV y 40 mA; monocromador curvo de Ge; tamaño de paso 0,02°2 θ , tiempo de paso de 48 s, rango de barrido de 1,5-50,5°2 θ ; modo del detector: barrido por pasos; paso del detector de 1°2 θ ; preparación de muestra estándar: se colocaron de 10 a 20 mg de muestra entre dos hojas de acetato; soporte de muestra: soporte de muestra de transmisión Stoe; la muestra estaba en rotación durante la medición. Todas las preparaciones de las muestras y las mediciones se realizaron en una atmósfera de aire ambiente.

40

TG-FTIR

Las medidas termogravimétricas se realizaron con una microbalanza térmica Netzsch TG-209 acoplada a un espectrómetro FTIR modelo Vector 22 de Bruker (platillos de muestras con un orificio, atmósfera de N₂, velocidad de calentamiento 10 K/min).

45

DVS

Las medidas de adsorción dinámica de vapor (DVS, por sus siglas en inglés) se llevan a cabo típicamente con un sistema SPS11-100n «Sorptions Prüfsystem» de ProUmid (anteriormente «Projekt Messtechnik»), August-Nagel-Str. 23, 89079 Ulm (Alemania).

Ejemplo 1: Preparación de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina sin semillas

- 5 Una mezcla de 5,0 gramos de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidrato (diastereoisómero [6S]: 98,4 %) y 13 ml de agua se calentó hasta aproximadamente 80 °C bajo atmósfera de argón y se añadieron 1,98 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico (concentración del 30 % p/p) para formar una solución. La solución se calentó hasta aproximadamente 80 °C y se añadió una solución de 4,20 gramos de clorhidrato de éster etílico de L-leucina en 13 ml de agua. Se retiró el baño calefactado para permitir que la solución se enfriará hasta aproximadamente 25 °C en aproximadamente dos horas.
- 10 Durante el enfriamiento, la solución cambió gradualmente a una suspensión concentrada. La suspensión se diluyó con 15 ml de agua y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El reactor con la suspensión se enfrió adicionalmente en un baño de agua con hielo hasta aproximadamente 1 °C en aproximadamente media hora. A continuación, la suspensión se filtró con un filtro de vidrio sinterizado y el producto sólido se lavó con cinco ml de agua fría. El producto sólido se secó en un secador al vacío a aproximadamente 35 °C/10 mbar durante toda la noche y se examinó mediante RMN-¹H identificándose como la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina 1:1. Se llevó a cabo una difracción de rayos X en polvo y se obtuvo el patrón de PXRD de la sal del éster etílico de L-leucina, sustancialmente como se muestra en la figura 1. El análisis por HPLC mostró que la pureza era del 98,7 % del área y la pureza óptica había aumentado al 99,7 % de diastereoisómero [6S].

Ejemplo 2: Preparación de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina con semillas

- 20 Una mezcla de 5,0 gramos de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidrato (diastereoisómero [6S]: 98,4 %) y 20 ml de agua se calentó hasta aproximadamente 80 °C bajo atmósfera de nitrógeno y se añadieron 1,9 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico (concentración del 32 % p/p) para formar una solución. La solución se calentó hasta aproximadamente 61 °C y se añadió una solución de 4,20 gramos de clorhidrato de éster etílico de L-leucina en 20 ml de agua. Se retiró el baño calefactado para permitir que la solución se enfriará hasta aproximadamente 32 °C en aproximadamente media hora.
- 25 Durante el enfriamiento, la solución se sembró a aproximadamente 60 °C con una pequeña cantidad de sal cristalina del éster etílico de L-leucina que se preparó según el ejemplo 1 y la solución cambió gradualmente a una suspensión concentrada. A aproximadamente 49 °C, la suspensión se diluyó con 12 ml de agua. A aproximadamente 32 °C, el reactor con la suspensión se enfrió adicionalmente en un baño de agua con hielo y se formó una solución transparente. Tras agitar a temperatura ambiente durante toda la noche, se añadieron 0,15 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico concentrada al 37 % (p/p), seguido de 0,5 ml de ácido clorhídrico en forma de solución acuosa 2,00 molar. A temperatura ambiente, la solución se sembró con una pequeña cantidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina que se preparó según el ejemplo 1 y se formó una suspensión débil. La suspensión se agitó a temperatura ambiente y se añadieron 0,35 ml más de ácido clorhídrico en forma de una solución acuosa 2 molar. La suspensión se enfrió a aproximadamente 2 °C y se añadieron 0,30 ml más de ácido clorhídrico en forma de solución acuosa 2 molar.
- 30 Se siguió agitando la suspensión a aproximadamente 2 °C durante aproximadamente 15 minutos y la suspensión se filtró con un filtro de vidrio sinterizado. El producto sólido se secó en un secador al vacío a aproximadamente 40 °C/10 mbar y se examinó mediante RMN ¹H identificándose como la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina. Se llevó a cabo una difracción de rayos X en polvo y se obtuvo un patrón de PXRD de la sal del éster etílico de L-leucina sustancialmente como se muestra en la figura 1; no obstante, el patrón de PXRD mostró que la muestra contenía una cantidad pequeña de NaCl. El análisis por HPLC mostró que la pureza era del 98,39 % y la pureza óptica había aumentado al 99,7 % de diastereoisómero [6S].
- 40

Ejemplo 3: Lavado de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina

- Se pesaron aproximadamente 420 mg de material sólido obtenido en el ejemplo 2 en un dispositivo de centrifugación con filtro y se añadieron 2,0 ml de agua seguido de centrifugación en condiciones ambientales. Esta etapa de lavado se repitió
- 45 dos veces más utilizando 0,5 ml de agua. A continuación, la torta de filtración húmeda se transfirió a un filtro de vidrio sinterizado y se secó al aire mediante secado al aire ambiente (aproximadamente 22 °C/aproximadamente 21 % de h.r.) a través del filtro de vidrio durante aproximadamente 10 minutos. El material seco se examinó mediante RMN-¹H y se identificó como una sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina 1:1. El análisis mediante TG-FTIR mostró que la muestra contenía solo aproximadamente el 0,7 % de agua. Se llevó a cabo una difracción de rayos X en polvo y se obtuvo el patrón de PXRD de la sal del éster etílico de L-leucina, como se muestra en la figura 1 donde se observaban picos en los ángulos 2-zeta según se enumera en la tabla 1.
- 50

Tabla 1: Ángulos 2-zeta, distancias interplanares e intensidades cualitativas de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según el ejemplo 3. Intensidad mf = muy fuerte, f = fuerte, m = media, d = débil y md = muy débil. Téngase en cuenta que los valores de intensidad pueden variar sustancialmente debido a efectos de orientación preferidos.

Ángulo °2θ	Distancia interplanar [Å]	Intensidad cualitativa
2,8	31,7	m
5,6	15,7	f
6,9	12,9	mf
8,4	10,5	f
10,6	8,4	d
11,3	7,8	d
12,9	6,9	f
13,8	6,4	m
14,1	6,3	f
14,5	6,1	m
15,0	5,90	m
15,5	5,70	d
15,8	5,61	m
16,4	5,41	m
17,0	5,22	m
17,5	5,07	f
18,2	4,88	f
18,6	4,78	m
19,1	4,64	f
19,7	4,50	m
20,2	4,40	d
20,6	4,32	d
20,9	4,25	d
21,2	4,18	f
21,4	4,15	f
22,3	3,98	m
22,6	3,93	m
23,0	3,86	d
23,4	3,80	d
23,7	3,75	f
24,3	3,65	d
24,7	3,61	d
25,0	3,56	d
25,2	3,53	d
25,5	3,49	d
26,1	3,41	m
26,7	3,34	d
27,1	3,29	d
27,6	3,23	m
28,0	3,18	d
28,3	3,15	d
28,6	3,12	d

Ejemplo 4: Higroscopicidad y contenido de agua (experimentos de DVS)

5 El contenido de agua de una muestra de sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico se determinó y se encontró que era del 12,4 %. El análisis mediante TG-FTIR de una muestra de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según el ejemplo 3 mostró que la muestra contenía solo aproximadamente el 0,7 % de agua. Una muestra de sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y otra muestra de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según el ejemplo 3 (aproximadamente 20 mg de cada una) se examinaron mediante análisis de adsorción dinámica de vapor de agua (DVS) dentro del intervalo de humedad relativa del 0 al 75 % de h.r. Las medidas de DVS se llevaron a cabo del siguiente modo: la muestra se colocó en un soporte de aluminio sobre una microbalanza y se dejó equilibrar a una h.r. del 50 % antes de iniciar el programa de humedad predefinido:

- (1) mantener dos horas con una humedad relativa (h.r.) constante del 50 %; a continuación
- (2) reducir la h.r. al 0 % a una velocidad del 5 % por hora;
- (3) mantener la h.r. al 0 % durante cinco horas;
- (4) elevar la h.r. al 75 % a una velocidad del 5 % por hora;
- 15 (5) mantener la h.r. al 75 % durante cinco horas;
- (6) reducir la h.r. al 0 % a una velocidad del 5 % por hora;

- (7) mantener la h.r. al 0 % durante cinco horas;
- (8) elevar la h.r. al 75 % a una velocidad del 5 % por hora;
- (9) reducir la h.r. al 50 % a una velocidad del 5 % por hora;
- (10) mantener la h.r. al 50 % durante una hora.

5 Comparando el resultado de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina con el resultado de la sal de calcio se observó que el contenido de agua de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina varía menos del 2,6 % dentro del intervalo probado mientras que el contenido de agua de la sal de calcio era de aproximadamente el 7,4 %. Los resultados se ilustran en la figura 2.

Ejemplo 5: Solubilidad cinética de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina

10 Se pesaron 43,1 mg de la forma anhidro de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según el ejemplo 3 en un vial de vidrio de 7 ml con tapón de rosca. Se añadieron 2,00 ml de agua purificada/desionizada (por ejemplo, agua para cromatografía) al sólido utilizando una pipeta volumétrica regulable. La mezcla se agitó enérgicamente a temperatura ambiente durante un minuto. Pasado el minuto se observó una solución turbia, lo que sugería que se había disuelto la mayor parte de la muestra. La solución se filtró mediante filtración por centrifugación y se transfirieron 1,50 ml de la solución acuosa a un vial de vidrio tarado (aproximadamente 10 ml de volumen). El agua se evaporó en un secador de aire a 40 °C durante aproximadamente 15 horas, después a 50 °C durante aproximadamente ocho horas y, posteriormente, el secado se completó a 50 °C al vacío (10 a 20 mbar) durante aproximadamente 13 horas. La solubilidad se determinó mediante evaluación gravimétrica del residuo sólido. La solubilidad fue de 15,1 mg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico por ml.

20 Ejemplo de referencia 1: Solubilidad cinética de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

25 Se pesaron 42,5 mg de la forma anhidro de la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en un vial de vidrio de 7 ml con tapón de rosca. Se añadieron 2,00 ml de agua purificada/desionizada (por ejemplo, agua para cromatografía) al sólido utilizando una pipeta volumétrica regulable. La mezcla se agitó enérgicamente a temperatura ambiente durante un minuto. Pasado el minuto se observó la formación de una suspensión. La suspensión se filtró mediante filtración por centrifugación y se transfirieron 1,50 ml de la solución acuosa a un vial de vidrio tarado (aproximadamente 10 ml de volumen). El agua se evaporó en un secador de aire a 40 °C durante aproximadamente 15 horas, después a 50 °C durante aproximadamente ocho horas y, posteriormente, el secado se completó a 50 °C al vacío (10 a 20 mbar) durante aproximadamente 13 horas. La solubilidad se determinó mediante evaluación gravimétrica del residuo sólido. La solubilidad fue de 9,0 mg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico por ml.

REIVINDICACIONES

1. Una sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,3 a 1:3,0 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.
- 5 2. La sal cristalina de la reivindicación 1, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,5 a 1:2,5 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.
3. La sal cristalina de la reivindicación 1 o 2, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de 1:0,75 a 1:1,25 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.
- 10 4. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina es de aproximadamente 1:1 (en mol/mol) y/o sus hidratos y/o solvatos.
- 15 5. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 14,1; 17,5; 19,1; 21,2; 21,4 y 23,7.
6. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con al menos tres picos característicos (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 14,1; 17,5; 19,1; 21,2; 21,4 y 23,7.
- 20 7. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 13,8; 14,1; 15,0; 17,5; 18,2; 19,1; 19,7; 21,2; 21,4; 23,7; 26,1 y 27,6.
- 25 8. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina y tiene un patrón de PXRD con picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) a 5,6; 6,9; 8,4; 12,9; 14,1; 17,5; 19,1; 21,2; 21,4 y 23,7.
9. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes que tiene al menos el 99 % en peso o más de pureza química y/o estereoisomérica.
- 30 10. Un proceso para obtener la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 que comprenden las etapas de:
 - i) proporcionar una mezcla de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuados;
 - 35 ii) añadir una base, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuados, para disolver los compuestos;
 - iii) calentar la composición hasta al menos 60 °C y, opcionalmente, llevar a cabo una filtración para aclarar la solución;
 - iv) cristalizar y enfriar la mezcla a una temperatura de entre 1 y 30 °C, añadir opcionalmente más solvente o mezcla de solventes; y
 - v) aislar el material sólido obtenido y, opcionalmente, secar el producto.
- 40 11. El proceso de la reivindicación 10, caracterizado porque la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-leucina de la etapa ii) está en el rango de 1:1 a 1:3.
12. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque el solvente es agua.
13. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque en las etapas iii) y/o iv) se añaden cristales semilla.
- 45 14. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque el éster etílico de L-leucina se usa como clorhidrato de éster etílico de L-leucina.
15. Una composición farmacéutica, aditivo alimentario y/o preparado que comprende la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 y, opcionalmente, uno o más excipientes aceptables.

16. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 en forma de comprimidos, cápsulas, preparados líquidos orales, polvos, liofilizados, gránulos, pastillas, polvos para reconstitución, suspensiones para inyección o infusión, o supositorios.
- 5 17. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 o 16 que además comprende al menos un agente terapéutico adicional.
18. La composición farmacéutica según al menos una de las reivindicaciones 15 a 17, que es una composición farmacéutica para administración por vía oral, parenteral, intramuscular, intraespinal, intratecal, periodontal, tópica o rectal.
- 10 19. Uso de la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 como constituyente para la producción de fármacos y/o como aditivo alimentario.
20. La sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico L-leucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de reducción de homocisteína, anemia, defectos del tubo neural, enfermedades cardiovasculares, depresión, deterioro cognitivo, enfermedad de Alzheimer y osteoporosis y/o tratamiento dietético de niveles bajos de folato en plasma y/o en eritrocitos y/o en líquido cefalorraquídeo y/o en el sistema nervioso central o periférico.
- 15

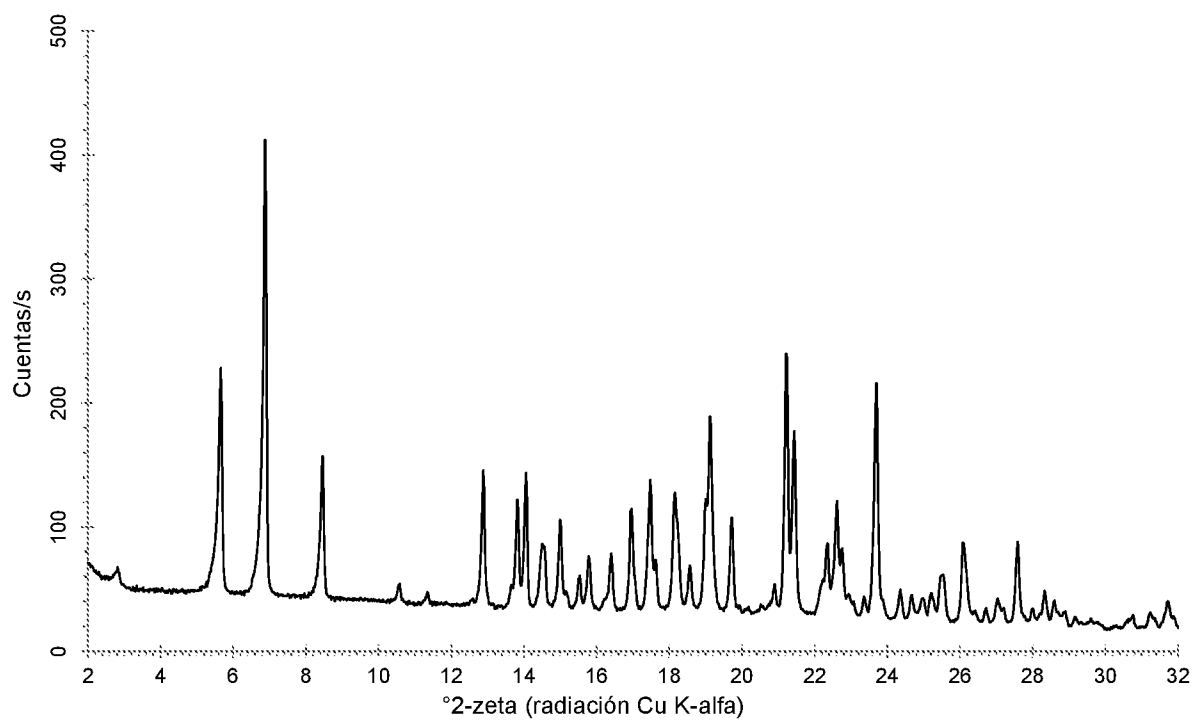


Figura 1: Patrón de difracción de rayos X en polvo de la sal cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-leucina 1:1.

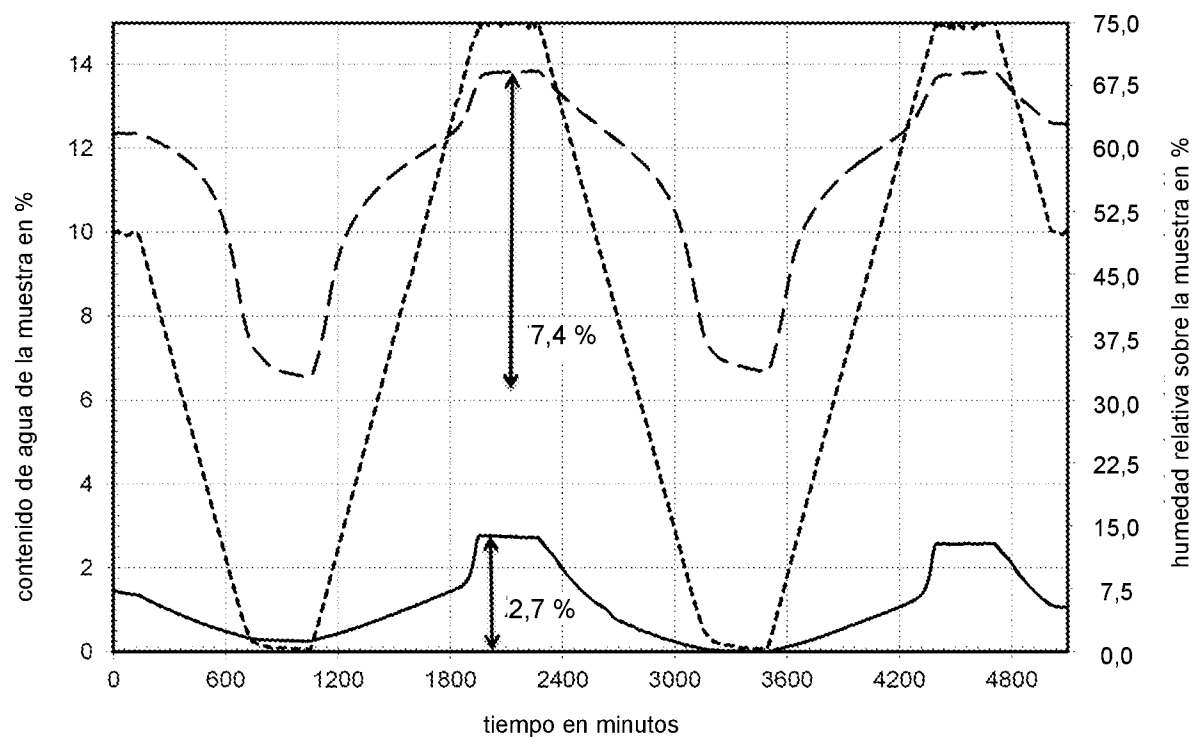


Figura 2: Medidas de DVS de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (línea discontinua, superior), y de la sal del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con éster etílico de L-leucina 1:1 (línea continua, inferior). En el eje y de la izquierda se muestra el contenido de agua de las muestras. La línea de puntos refleja el programa de medición según se describe en el ejemplo 4. Las flechas verticales muestran la variación máxima del contenido de agua en el intervalo del 0 al 75 % de humedad relativa.