CH 635 344 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 07 D 475/04
A 61 K 31/505

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

# (12) PATENTSCHRIFT A5

(11) 635 344

(21) Gesuchsnummer: 1936/78

(22) Anmeldungsdatum: 22.02.1978

(30) Priorität(en): 22.02.1977 GB 7290/77

(24) Patent erteilt: 31.03.1983

(45) Patentschrift veröffentlicht: 31.03.1983

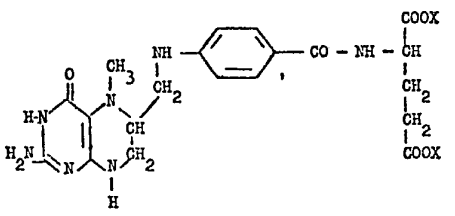
(73) Inhaber:
Bioresearch - Società in Accomandita Semplice del Dott. Livio Camozzi e C., Milano (IT)

(72) Erfinder:
Federico Gennari, Truccazzano (IT)

(74) Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

## (54) Verfahren zur Herstellung von d,1-5-Methyltetrahydrofolsäure und deren Salzen.

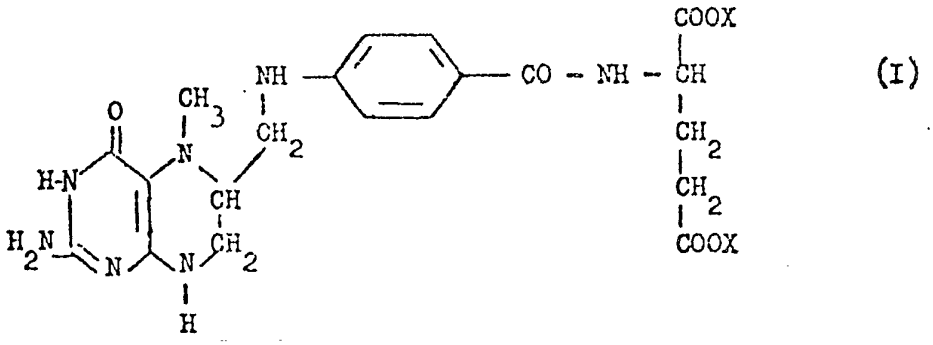
(57) Verfahren zur Herstellung von d,1-5-Methyltetrahydrofolsäure und deren Salzen der Formel 1 worin X Wasserstoff, ein Alkalimetall oder das Äquivalent eines Erdalkalimetalls ist, durch Reduktion von Folsäure mit $NaBH_4$ und Methylierung der erhaltenen Tetrahydrofolsäure mit wässrigen Lösungen von Formaldehyd und Natriumborhydrid in einer inerten Gasatmosphäre. Das Verfahren ist einfach und ohne Abtrennung von Zwischenprodukten unter Ausführung der Verfahrensstufen nacheinander im gleichen Reaktionsgefäss ausführbar. Die Endprodukte werden mit einer Ausbeute von mehr als 80 %, bezogen auf eingesetzte Folsäure, in einer Reinheit von mehr als 99 % erhalten. Die erhaltenen Verbindungen der Formel I sind nicht toxisch, bei physiologischen pH-Werten stabil und zur Herstellung flüssiger oder fester pharmazeutischer Mittel für jede Anwendungsart in der Humantherapie geeignet. Solche Mittel zeigen hämatopoëtische Wirkung, Leberschutz- und antineoplastische Wirkung.



(I)

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von d,l-5-Methyltetrahydrofolsäure und deren Salzen der Formel (I)



(I)

worin
X für Wasserstoff, ein Alkalimetall oder ein Äquivalent eines Erdalkalimetalls steht,
dadurch gekennzeichnet, dass man

a) Folsäure mit $NaBH_4$ in wässrig-alkalischer Lösung und unter Inertgasatmosphäre zu Tetrahydrofolsäure reduziert, wobei man ein $NaBH_4$:Folsäure-Gewichtsverhältnis von 0,5:1 bis 3:1, eine Reaktionstemperatur von 60 bis 80°C und eine Reaktionszeit von 30 Minuten bis 2 Stunden wählt;

b) die Tetrahydrofolsäure mit wässrigen Lösungen von Formaldehyd und Natriumborhydrid unter Inertgasatmosphäre zu 5-Methyltetrahydrofolsäure methyliert, wobei man ein Formaldehyd:Tetrahydrofolsäure-Gewichtsverhältnis von 0,8:1 bis 2,5:1, ein $NaBH_4$:Tetrahydrofolsäure-Gewichtsverhältnis von 0,25:1 bis 1,5:1, eine Temperatur von 25 bis 30°C und einen pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 wählt, wobei man den Formaldehyd in aufeinanderfolgenden Fraktionen zugibt, wovon die letzte mit einem Formaldehyd:Tetrahydrofolsäure-Gewichtsverhältnis 0,15:1 zugegeben wird, wenn die Reaktion beendet ist;

c) das Natrium-5-methyltetrahydrofolat aus der wässrigen Lösung abtrennt, wobei alle diese Stufen in einem einzigen Reaktionsgefäss durchgeführt werden, ohne dass Zwischenprodukte abgetrennt werden.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekenzeichnet, dass man zur Abtrennung in Stufe c) die Reaktionsmischung mit einer Menge Aktivkohle behandelt, welche dem 5 bis 20fachen Gewicht der ursprünglich eingesetzten Folsäure entspricht, und das Natrium-5-methyltetrahydrofolat mittels eines Eluats, bestehend aus einem Alkohol mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder 2-Methoxyäthanol und Wasser in einem Verhältnis von 50/50 bis 95/5 aus dem Kohle-Filterkuchen desorbiert.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Stufe c) die Abtrennung aus der Reaktionsmischung mit einer wässrigen Lösung eines Ca-Salzes und Abkühlen der Lösung auf 0 bis 5°C erfolgt, wobei das Gewichtsverhältnis von Folsäure:Kalziumsalz zwischen 2:1 und 3:1 liegt.

4. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Stufe a) das $NaBH_4$:Folsäure-Gewichtsverhältnis 0,7:1 bis 2:1, die Temperatur 70°C, der pH-Wert 7 bis 8 und die Reaktionszeit 1 Stunde betragen, in Stufe b) die Reaktion bei einem Gesamt-Gewichtsverhältnis von 37%igem Formaldehyd:Tetrahydrofolsäure von 1,4:1, einem $NaBH_4$:Tetrahydrofolsäure-Gewichtsverhältnis zwischen 0,5:1 und 1:1 und bei einer Temperatur von 30°C und einem pH von 6,5 erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man in Stufe c) eine Menge an Aktivkohle verwendet, welche dem 7fachen Gewicht der ursprünglich behandelten Folsäure entspricht, eine Lösungsmittelmischung, bestehend aus Methanol, Äthanol, 2-Methoxyäthanol, 1- oder 2-Propanol, n-Butanol, t-Butanol, sek.-Butanol oder Isobutanol und Wasser in einem Verhältnis von 80/20, bezogen auf das Volumen, und 1 Vol.-% eines Reduktionsmittels, und 0,7% Ammoniak in wässriger Lösung verwendet.

6. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die 5-Methyltetrahydrofolsäure nach Ansäuern der wässrigen Lösung in Form eines ihrer Alkali- oder Erdalkalisalze ausfällt.

7. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die 5-Methyltetrahydrofolsäure in Form des Natriumsalzes isoliert, indem man das Eluat konzentriert und das Konzentrat dann lyophilisiert.

8. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die 5-Methyltetrahydrofolsäure aus dem Eluat abtrennt, indem man sie in Form eines Erdalkalisalzes ausfällt.

9. Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man das Kalzium-5-methyltetrahydrofolat reinigt, indem man das Pentahydratsalz in wenig siedendem Wasser löst und die Lösung auf 0 bis 5°C kühlt.

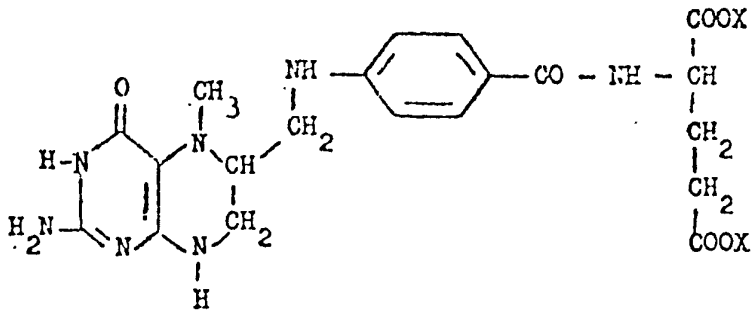
10. Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass Stufe c) in Gegenwart eines Reduktionsmittels durchgeführt wird.

11. Stabiles therapeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, dass es ein nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 hergestelltes Alkali- oder Erdalkalisalz von 5-Methyltetrahydrofolsäure und 5 bis 50% eines Stabilisierungsmittels, ausgewählt unter organischen Verbindungen biologischen Ursprungs, welche mindestens eine aktive -SH-Gruppe aufweisen, enthält.

12. Stabiles therapeutisches Mittel gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilisator ausgewählt ist unter Cystein, Cysteamin, Pantethein, reduziertem Glutathion und Derivaten davon, welche eine aktive -SH-Gruppe aufweisen.

---

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von d,l-N-[p-(2-Amino-3,4,5,6,7,8-hexahydro-5-methyl-4-oxo-6-pteridinyl)-methyl]-aminobenzoyl-glutaminsäure und deren Salzen der Formel I:



(I)

worin
X für Wasserstoff, ein Alkalimetall oder ein Äquivalent eines Erdalkalimetalls steht.

In der nachfolgenden Beschreibung wird die Säure der Formel (I) kurz als 5-Methyl-tetrahydrofolsäure (MTHF) bezeichnet.

Das neue Verfahren ist industriell anwendbar, um ein Produkt hoher Reinheit einfach und wirtschaftlich in grosser Ausbeute zu erhalten.

Insbesondere d,l-5-Methyltetrahydrofolsäure wird im allgemeinen ausgehend von Folsäure nach einem Verfahren hergestellt, das die folgenden wesentlichen Stufen umfasst:

a) Folsäure $\xrightarrow{\text{Reduktion}}$ Tetrahydrofolsäure,

b) Abtrennung und Reinigung der Tetrahydrofolsäure,

c) Tetrahydrofolsäure $\xrightarrow{\text{Methylierung}}$ 5-Methyltetrahydrofolsäure,

und

d) Abtrennung und Reinigung der 5-Methyltetrahydrofolsäure.

Stufe (a) wurde sowohl durch katalytische Hydrierung als auch durch chemische Reduktion, insbesondere unter Verwendung alkalischer Borhydride, durchgeführt. (Y. Hetefi et al. - Biochem. Prep. 7, 89 [1960]; K.G. Serimgeour et al. - Biochemistry 5, 1438 [1966]). In dieser Stufe erhält man, egal welches bekannte Verfahren vewendet wird, eine Mischung von Folsäure, Tetrahydrofolsäure und Dihydrofolsäure, welche im wesentlichen aus den beiden ersteren Bestandteilen besteht und schwer aufzuspalten ist. Die einzig brauchbaren Verfahren bestehen darin, dass man in Stufe (b) mit sehr grossen Chromatographiesäulen arbeitet und eine Reihe von Eluierungsmitteln verwendet (L. Jaenicke et al. - Z. physiol. Chem. 326, 168 (1961); J.C. Keresztesy et al. - Biochem. Biophysic. Res. Commun. 5, 286 [1961]; H. Rüdiger et al. FE/BS/Letters 4, 316 [1969]). Das überschüssige Borhydrid in der zu chromatographierenden Lösung wird zuerst durch eine Säure, vorzugsweise Chlorwasserstoffsäure oder Essigsäure, zersetzt.

Auch die Methylierung der Tetrahydrofolsäure (Stufe c) kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden, am gebräuchlichsten und einfachsten ist die Umsetzung mit Formaldehyd und eine anschliessende Reduktion mit einem chemischen Reduktionsmittel, bevorzugt wiederum mit einem Alkaliborhydrid (W. Sakami et al., Biochem. Prep. 10, 103 [1963]).

Die Abtrennung und endgültige Reinigung der 5-Methyltetrahydrofolsäure (Stufe d) erfolgte bis jetzt immer durch mehr oder weniger komplexe Chromatographieverfahren, je nach der Art der zu reinigenden Mischung.

Bei einem dieser Verfahren (J.A. Blair et al., Analytical Biochemistry 34, 376-381 [1970]), entfällt Stufe (b) und die Reaktionsmischung, in der überschüssiges Borhydrid zerstört wurde, wird direkt mit Formaldehyd und einem anderen Alkaliborhydrid behandelt. Offensichtlich ergibt jedoch eine solche Modifizierung keine wesentliche Verbesserung des Verfahrens. Nachdem in Stufe (a) auf jeden Fall eine Mischung wie oben angegeben erhalten wird, erhält man nach Weglassen von Stufe (b) eine noch komplexere Mischung, die noch schwieriger aufzuspalten ist und somit die Reinigung in Stufe (d) erschwert und in dieser Stufe zu einem Verlust von etwa 60% des Produkts führt.

Darüberhinaus erhält man kein hoch reines Produkt, wie es für pharmazeutische Zwecke notwendig wäre.

Dies war auch der Grund, warum dieses nach dem Stand der Technik beste Verfahren bis jetzt nie über Laborversuche hinausging, welche zur Herstellung kleiner Mengen an Verbindung für Versuchszwecke dienten.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass man Folsäure, welche im Handel zu wirtschaftlichen Preisen leicht erhältlich ist, in grosser Ausbeute in d,l-5-Methyltetrahydrofolsäure von hoher Reinheit überführen kann, ohne dass kostspielige und komplizierte chromatographische Reinigungsverfahren notwendig sind. Wenn man die Folsäure unter kritischen Reaktionsbedingungen reduziert, kann man praktisch selektiv 100% Tetrahydrofolsäure erhalten.

Das erfindungsgemässe Verfahren umfasst im wesentlichen die folgenden Stufen:

1) Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure durch Natriumborhydrid in wässrig-alkalischer Lösung und unter Inertgasatmosphäre bei einer Temperatur zwischen 60 und 80°C.

Das Verhältnis an $NaBH_4$:Folsäure liegt zwischen 0,5:1 und 3:1 und die Reaktionszeit beträgt zwischen 30 Minuten und 2 Stunden.

Bevorzugte Reaktionsbedingungen sind in diesem Fall:

- Verhältnis von $NaBH_4$:Folsäure 0,7:1 bis 2:1,
- Reaktionszeit 1 Stunde,
- pH-Wert 7 bis 8,
- Temperatur 70°C.

2) Methylierung der Tetrahydrofolsäure zu 5-Methyltetrahydrofolsäure durch Behandeln mit einer 37%igen, wässrigen Formaldehydlösung und dann erneut mit Natriumborhydrid. Nach beendeter Reaktion wird erneut 37%iger Formaldehyd zugegeben.

In dieser Stufe sind die kritischen Reaktionsbedingungen wie folgt:

- pH-Wert 6 bis 8,
- Temperatur 25 bis 30°C,
- Verhältnis an 37%igem Formaldehyd:Tetrahydrofolsäure zwischen 0,8:1 und 2,5:1,

- Verhältnis von $NaBH_4$:Tetrahydrofolsäure zwischen 0,25:1 bis 1,5:1,
- Inertgasatmosphäre,
- Anwesenheit eines Reduktionsmittels in der letzten Reaktionsstufe (Cystein, reduziertes Glutathion, Pantethein).

Bevorzugte Reaktionsbedingungen sind in diesem Fall:

- pH-Wert 6,5,
- Temperatur 30°C,
- Verhältnis von 37%igem Formaldehyd:Tetrahydrofolsäure 1,4:1,
- Verhältnis von $NaBH_4$:Tetrahydrofolsäure zwischen 0,5:1 und 1:1,
- in der Reaktionsmischung enthaltenes Reduktionsmittel: Cystein.

3) Abtrennung und Reinigung von Natrium-5-methyltetrahydrofolat.

Dies kann durch zwei gleich vorteilhafte Alternativverfahren erfolgen, da die zu behandelnde Lösung, die in Stufe (2) erhalten wurde, praktisch nur Natrium-5-methyltetrahydrofolat enthält.

A - Abtrennung durch Absorption/Desorption auf Aktivkohle.

Dabei gibt man eine Menge an Aktivkohle, die 5 bis 20mal dem Gewicht der ursprünglich behandelten Folsäure entspricht, aufgeschlämmt in Wasser, bei pH 6,5 bis 6,8 unter Rühren zu der endgültigen Reaktionsmischung. Die abfiltrierte Kohle suspendiert man in einer Mischung von Eluierungsmitteln bestehend aus einem Alkohol (mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen) oder 2-Methoxyäthanol und Wasser in einem Verhältnis zwischen 50/50 und 95/5. Die Mischung der Elutionsmittel enthält auch einen geringen Prozentsatz (0,2 bis 1,5%) eines Reduktionsmittels und einen geringen Prozentsatz (0,5 bis 5%) Ammoniak in wässriger Lösung. Das Natrium-5-methyltetrahydrofolat kann aus der über die Aktivkohle filtrierten Filtratmischung durch Ausfällen mit einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, oder durch Konzentrieren und Lyophilisieren der Lösung oder auch in Form eines Erdalkalisalzes, aus dem die 5-Methyltetrahydrofolsäure freigesetzt werden kann, gewonnen werden.

Bevorzugte Bedingungen für die Abtrennung und Reinigung in Stufe A sind folgende:

- Verhältnis von Aktivkohle:Folsäure 7:1,
- die Filtratmischung besteht aus Äthanol, Methanol oder 2-Methoxyäthanol und Wasser in einem Verhältnis von 80/20 Vol/Vol,
- Reduktionsmittel ist Cystein bis zu 1% der gesamten Eluat mischung,
- 34%ige wässrige ammoniakalische Lösung bis zu 2% der gesamten Eluatmischung (0,7% Ammoniak).

B - Abtrennung durch direkte Ausfällung der 5-Methyltetrahydrofolsäure aus der diese enthaltenden Lösung in Form eines Erdalkalimetallsalzes, insbesondere eines Kalziumsalzes.

Diese Alternative, die noch einfacher ist als die Alternative A ist besonders günstig, wenn die Stufen (1) und (2) in konzentriertem wässrigem Medium durchgeführt wurden und so die 5-Methyltetrahydrofolsäure aus einer konzentrierten wässrigen Lösung aufgefällt werden soll.

Die aus Stufe (2) erhaltene Lösung behandelt man mit einer konzentrierten wässrigen $CaCl_2$ Lösung und lässt sie etwa 12 Stunden bei einer Temperatur zwischen 0° und 5°C in Gegenwart einer geringen Menge Reduktionsmittel stehen.

Das so ausgefällte Kalzium-methyl-tetrahydrofolatpentahydrat wird durch Auflösen in einem geringen Volumen siedenden Wassers und Umkristallisation, indem man die Lösung bei 0° bis 5°C stehenlässt, gereinigt.

Das bevorzugte Verhältnis von Folsäure:$CaCl_2$ liegt zwischen 2:1 und 3:1, und beträgt insbesondere 2,5.

Das Reduktionsmittel wird vorzugsweise ausgewählt unter Cystein, Cysteamin, reduziertem Glutathion, reduziertem Pantethein.

Das mit dem beschriebenen Verfahren erhaltene Produkt hat eine Reinheit von mehr als 99% und wird in Ausbeuten erhalten, die grundsätzlich mehr als 80%, bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Folsäure, betragen.

Die vorstehend beschriebenen Verfahrensstufen werden nacheinander im gleichen Reaktionsgefäss, ohne Abtrennung von Zwischenprodukten durchgeführt. Die angegebenen Verhältniswerte beziehen sich immer auf Gewichtsverhältnisse.

Vergleicht man das erfindungsgemässe Verfahren mit dem nach dem Stand der Technik bekannten besten Verfahren, dessen wesentliche Verfahrensstufen zu Beginn der Beschreibung aufgezeigt wurden, so ist sofort offensichtlich, dass bei dem neuen Verfahren sowohl die Zwischenstufe, wie auch die chromatographische Abtrennung und Reinigung entfällt. Dies führt nicht nur zu einer beträchtlichen Vereinfachung und Wirtschaftlichkeit des Verfahrens, da die bekannten Verfahren lange und kostspielige Chromatographiesäulen und lange Verfahrenszeiten benötigen, sondern führt auch zu einer beträchtlichen Zunahme der Ausbeute, da bei der chromatographischen Abtrennung grosse Verluste an brauchbarem Produkt auftreten.

Weitere Verluste entstehen bei der Gewinnung des Produkts aus stark verdünnten Lösungen, was ebenfalls sehr kostspielig ist.

Die abschliessende Abtrennungs- und Reinigungsstufe wird durch die Absorptions/Desorptions-Stufe über Aktivkohle oder durch die Ausfällung mit Ca-Salzen ersetzt, was äusserst einfach ist und zu einer hohen Ausbeute führt. Diese Stufen sind völlig neu bei der Herstellung von 5-Methyltetrahydrofolsäure und deren Salzen.

Aus der vorstehenden Beschreibung ist auch ersichtlich, dass das gesamte Herstellungsverfahren für die 5-Methyltetrahydrofolsäure in Anwesenheit eines Inertgases und in einigen Stufen in Gegenwart eines Reduktionsmittels erfolgt. Dies ist notwendig, um die Selbstoxydation der Tetrahydrofolsäure oder der 5-Methyltetrahydrofolsäure in die entsprechenden Dihydrofolsäuren und Folsäuren zu verhindern.

Das gleiche Selbst-Oxydationsproblem liegt bei der Konservierung von 5-Methyltetrahydrofolsäure vor. Bis jetzt wurden als Reduktionsmittel zur Konservierung von MTHF-Säure 2-Mercaptoäthanol und Ascorbinsäure verwendet. Offensichtlich wurde dabei nicht daran gedacht, das Produkt in der Pharmazie zu verwenden, sondern es wurde nur für Laborversuche hergestellt.

2-Mercaptoäthanol ist nämlich ein toxisches Produkt mit einem Übelkeit hervorrufenden Geruch, während sich Ascorbinsäure bei den für Injektionslösungen optimalen pH-Werten (7 bis 8) rasch zersetzt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Schaffung stabilisierter Mittel mit Alkali- oder Erdalkali-5-methyltetrahydrofolaten für pharmazeutische Zwecke.

Die neuen stabilen Mittel bestehen im wesentlichen aus 5-Methyltetrahydrofolat (als aktiver Substanz) und 5 bis 50% einer organischen Verbindung biologischen Ursprungs, welche mindestens eine -SH-Gruppe (als Stabilisator) ent-

hält. Charakteristische Verbindungen dieser Klasse sind beispielsweise Cystein, Cysteamin, Pantethein, reduziertes Glutathion und all deren Derivate, welche eine aktive -S-H Funktion aufweisen.

Alle vorgenannten Verbindungen sind nicht toxisch, bei physiologischen pH-Werten stabil und deshalb zur Herstellung flüssiger oder fester pharmazeutischer Mittel für jegliche Anwendungsart in der Humantherapie geeignet.

Die neuen pharmazeutischen Mittel besitzen hämatopoetische Wirkung, Leberschutzwirkung sowie antineoplastische Wirkung.

Die nachstehenden Beispiele sollen das erfindungsgemässe Verfahren näher veranschaulichen.

Diese Beispiele sollen selbstverständlich nicht einschränkend sein und die Reaktionsbedingungen können im Rahmen der Erfindung beliebig variiert werden.

*Beispiel 1*

Man gibt in ein Reaktionsgefäss 80 l entionisiertes Wasser und suspendiert darin 2,4 kg d,l-Folsäure. Unter Umrühren gibt man dann festes $Na_2CO_3$ zu, bis die Folsäure vollständig gelöst ist (pH der endgültigen Lösung 7,8), gibt dann 4,8 kg $NaBH_4$ gelöst in 40 l $H_2O$ zu und erhitzt die Reaktionsmischung auf 70°C. Die Reaktion erfolgt eine Stunde unter Rühren, wobei man ständig Stickstoff durchströmen lässt. Nach beendeter Reaktion kühlt man das Reaktionsgefäss auf 30°C und gibt unter Umrühren 3,5 kg 37%igen wässrigen Formaldehyd und 2,4 kg Natriumborhydrid, gelöst in 20 l Wasser zu. Man lässt eine weitere Stunde unter einem Stickstoffstrom unter Umrühren reagieren und gibt danach 0,15 kg 37%igen Formaldehyd und 1 kg Cystein zu.

Man suspendiert 17 kg Aktivkohle in 100 l entgastem Wasser und gibt die Kohlesuspension unter Umrühren zu der Reaktionsmischung, welche auf einen pH 6,5 gebracht wurde. Nach einigen Minuten filtriert man unter Stickstoff ab und wäscht den Aktivkohlekuchen auf dem Filter mit Wasser, das 1% Cystein enthält, bis alle anorganischen Salze völlig entfernt sind. Dann suspendiert man die Aktivkohle in 100 l einer Lösungsmittelmischung folgender Zusammensetzung, bezogen auf das Volumen:
2-Methoxy-äthanol 80 Teile, Wasser (das 5% Cystein enthält) 20 Teile, Ammoniak (34%ig) 2 Teile.

Man lässt die Suspension unter Umrühren einige Minuten stehen, filtriert dann ab und engt das Filtrat auf ein Volumen von 20 Liter ein. Das konzentrierte Filtrat giesst man dann in eine Lösung, welche 700 g $CaCl_2$ in 100 l Äthanol enthält. Kalzium-5-methyltetrahydrofolat fällt aus und wird unter Stickstoffatmosphäre abfiltriert, mit Äthanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Man erhält 2,3 kg Produkt, was einer Ausbeute von 86%, bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Folsäure, entspricht.

Bei UV-Analyse zeigt das Produkt die folgenden Eigenschaften: ($pH = 7$, $\varepsilon = 32 \cdot 10^3$):

Maximale Absorption bei 290 nm,
minimale Absorption bei 245 nm,
Verhältnis $E_{290}/E_{245} = 3{,}8$.

Analyse an einer Sephadex DEAE A 25 Chromatographiesäule unter Anwendung des Verfahrens nach Nixon und Bertino (P.F. Nixon, J.R. Bertino, Methods in Enzym. 18, 661 [1971]) ergibt nur den 5-Methyltetrahydrofolsäure-Peak.
HPLC Analyse (Partisil-10SAX 4,6×250 mm Säule, Eluant 5%iges Ammoniumcitrat; pH = 6) ergibt nur den 5-Methyltetrahydrofolsäure-Peak.

NMR-Spektrum: Singulett charakteristisch für die $N_5$–$CH_3$-Gruppe bei $\tau = 7{,}5$.

1 kg des so hergestellten Kalzium-5-methyltetrahydrofolats löst man unter einem Stickstoffstrom in 40 l Wasser, das 1 kg Cystein enthält, wobei man erhitzt.

Man stellt den pH mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure auf 6 ein und lässt die Mischung in einem Kühlschrank stehen. 5-Methyltetrahydrofolsäure fällt aus und wird abfiltriert, mit etwas kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Das Produkt hat einen $E_{290}/E_{245}$-Wert von 3,8.

Man wiederholt das gleiche Verfahren, ersetzt dabei jedoch in der Lösungsmittelmischung das 2-Methoxy-äthanol durch Äthanol, Methanol, 1- oder 2-Propanol, n-Butanol, t-Butanol, sek.-Butanol bzw. Isobutanol. In jedem Fall erhält man ein Produkt mit den gleichen Eigenschaften in der gleichen Ausbeute.

*Beispiel 2*

Man stellt 5-Methyltetrahydrofolat wie in Beispiel 1 beschrieben her und eluiert die Aktivkohle mit einer Mischung folgender Zusammensetzung:
Methanol 80 Teile, Wasser (welches 5% reduziertes Glutathion enthält) 20 Teile, Ammoniak (34%ig) 2 Teile.

Nach Abfiltrieren der Aktivkohle löst man 700 g $CaCl_2$ in ein wenig Wasser und gibt es zu dem Eluat.

Kalzium-5-methyltetrahydrofolat fällt aus und wird unter einem Stickstoffstrom abfiltriert, mit Äthanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Man erhält 2,1 kg Produkt, was einer Ausbeute von 80%, bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Folsäure, entspricht.

Das Produkt hat die gleichen Eigenschaften wie das gemäss Beispiel 1.

*Beispiel 3*

Man arbeitet wie in Beispiel 1 beschrieben und behandelt den Aktivkohle-Kuchen mit einer Lösungsmittelmischung, bestehend aus 2-Propanol und Wasser, das einen geringen Prozentsatz Ammoniumhydrat und Cystein enthält und engt das Filtrat dann auf ein Volumen von 20 Liter ein.

Man lyophilisiert die Lösung, wobei man 2,1 kg Natrium-5-methyltetrahydrofolat in einer Ausbeute von 80% erhält.

Das Produkt hat einen $E_{290}/E_{245}$-Wert von 3,8.

*Beispiel 4*

Man arbeitet wie in Beispiel 1 beschrieben und engt das Filtrat ein. Bei diesem Versuch behandelt man das Filtrat mit 1,3 kg $BaCl_2$, gelöst in 100 Liter Äthanol.

Barium-5-methyltetrahydrofolat fällt aus, die Ausbeute beträgt 83%.

$E_{290}/E_{245} = 3{,}79$.

*Beispiel 5*

Man arbeitet wie in Beispiel 1 beschrieben und engt das Filtrat ein. Bei diesem Versuch behandelt man es mit 0,6 kg $MgCl_2$, gelöst in 100 Litern Äthanol.

Magnesium-5-methyltetrahydrofolat fällt aus und die Ausbeute beträgt 82%.

$E_{290}/E_{245} = 3{,}8$.

*Beispiel 6*

Man löst 100 g Kalzium-5-methyltetrahydrofolat, das wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt wurde, in 4 Litern $H_2O$ und gibt dann die stöchiometrische Menge $Na_2SO_4$ zu dieser Lösung. $CaSO_4$ fällt aus und wird durch Filtrieren gesammelt.
Man lyophilisiert die klare Lösung, wobei man Natrium-5-methyltetrahydrofolat erhält.

*Beispiel 7*

Herstellung des Kalziumsalzes der MTHF-Säure.

Man suspendiert 2,50 kg Folsäure in 10 l Wasser und gibt unter Umrühren 1 l 40%ige $Na_2CO_3$ zu.

Den pH stellt man mit $Na_2CO_3$ auf 7,8 ein und gibt nach Kühlen unter Stickstoffatmosphäre 1,700 kg $NaBH_4$ zu.

Man lässt die Mischung 2 Stunden stehen, wobei man auf 70°C erhitzt, um die Reaktion zu vervollständigen; gibt dann 4,00 kg 37%igen wässrigen Formaldehyd und danach 0,80 kg Natriumborhydrid zu.

Das ausgefällte Natriumborat wird abfiltriert und das überschüssige Borhydrid wird entfernt, indem man den pH der Lösung mit HCl auf 6 einstellt. Man gibt 1 kg $CaCl_2$ gelöst in 2 Liter Wasser unter Umrühren zu und lässt die erhaltene Reaktionsmischung bei 3°C über Nacht stehen. Das Kalzium-methyltetrahydrofolat fällt in Form eines amorphen weissen Pulvers aus, welches abfiltriert und mit Wasser gewaschen wird.

Dieses Salz löst man in 10 l siedendem Wasser und lässt die gekühlte Lösung über Nacht stehen.

Das ausgefällte kristalline Salz wird abfiltriert, gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Man erhält 2,40 kg Kalzium-methyl-tetrahydrofolat-pentahydrat in einer Gesamtausbeute von 80%, verglichen mit der eingesetzten Folsäure.

Unter den gleichen Bedingungen kann auch das Mg-Salz erhalten werden, welches jedoch schwierig abzufiltrieren ist.

Wie vorstehend bereits angegeben, kann die 5-Methyltetrahydrofolsäure oder deren Salze, welche erfindungsgemäss hergestellt wurden, therapeutische Mittel ergeben, welche bei Umgebungstemperatur stabil sind, wenn man sie mit 5 bis 50% einer stabilisierenden Verbindung, ausgewählt unter Verbindungen biologischen Ursprungs, welche mindestens eine -SH-Gruppe aufweisen, vermischt.

Typische Verbindungen dieser Art sind Cystein, Cysteamin, Pantethein und reduziertes Glutathion.

Um diese Ausführungsform der Erfindung zu veranschaulichen, wird nachstehend eine typische Formulierung beschrieben, welche mit den vorgenannten Verbindungen hergestellt ist.

*Beispiel 8*

Pharmazeutisches Mittel zur oralen Verabreichung:

Tabletten

Aktive Substanz 25 mg
Stabilisierungsmittel 12,5 mg
Zur Tablettenherstellung erforderliche Trägermaterialien bis zu einem Gewicht von 150 mg.

Pharmazeutisches Präparat, das zur Injektion bestimmt ist

Aktive Verbindung 25 mg/ml
Stabilisierungsmittel 12,5 mg/ml
Lyophilisationsträger 150 mg/ml

Wenn notwendig, bringt man die Lösung mit konz. NaOH auf pH 7,5, füllt sie in eine Ampulle und lyophilisiert.

Unter «aktiver Substanz» versteht man:

- 5-Methyltetrahydrofolsäure,
- Natrium-5-methyltetrahydrofolat,
- Kalzium-5-methyltetrahydrofolat,
- Magnesium-5-methyltetrahydrofolat.

Unter «Stabilisierungsmittel» versteht man:

- Cystein,
- Cysteamin,
- Pantethein,
- reduziertes Glutathion.

Die Bezeichnung «Lyophilisierungsträger» umfasst alle Substanzen, welche nach herkömmlichen Lyophilisierungsverfahren dafür in Frage kommen können, wie Glycin.

In keinem Fall wurde der aktive Bestandteil des Produkts während der Aufbewahrung in der Ampulle oder während der Lyophilisation beeinträchtigt.