

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2025-518274  
(P2025-518274A)

(43)公表日 令和7年6月12日(2025.6.12)

## (51)国際特許分類

A 6 1 K	31/519 (2006.01)	F I	A 6 1 K	31/519
A 6 1 K	9/19 (2006.01)		A 6 1 K	9/19
A 6 1 K	47/12 (2006.01)		A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/02 (2006.01)		A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	9/08 (2006.01)		A 6 1 K	9/08

テーマコード(参考)

4 C 0 7 6  
4 C 0 8 4  
4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全24頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-570947(P2024-570947)
(86)(22)出願日	令和5年6月5日(2023.6.5)
(85)翻訳文提出日	令和6年12月2日(2024.12.2)
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/064972
(87)国際公開番号	WO2023/237484
(87)国際公開日	令和5年12月14日(2023.12.14)
(31)優先権主張番号	22177932.5
(32)優先日	令和4年6月8日(2022.6.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ, ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP( AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く

(71)出願人	591032596 メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング Merck Patent Gesell schaft mit beschräe nkter Haftung ドイツ連邦共和国 デー - 6 4 2 9 3 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーゼ 2 5 0 Frankfurter Str. 2 5 0 , D - 6 4 2 9 3 D armstad t , F ederal R epublic o f G ermany
(74)代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 5 , 1 0 - メチレン - ( 6 R ) - テトラヒドロ葉酸二ナトリウムを含む組成物

## (57)【要約】

本発明は、高含有の5 , 1 0 - メチレン ( 6 R ) - テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、硫酸塩及びケン酸塩を含有する安定な製剤及び凍結乾燥物に関する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む凍結乾燥組成物であって、当該組成物は、さらなる還元剤又は抗酸化剤を含まない組成物。

**【請求項 2】**

5,10-メチレン(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、硫酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、水及び任意の浸透圧補正添加剤からなる、請求項1に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項 3】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩と硫酸塩とのモル比が約40~200モル%である、請求項1又は請求項2に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項 4】**

クエン酸塩を200~400mol%含む、請求項1~3の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項 5】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム塩の濃度が、20%w/wを超える5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム塩、例えば25%w/wを超える、例えば30%w/wを超える、例えば35%w/wを超える、又は例えば約40%w/wの5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム塩である安定な凍結乾燥物である、請求項1~4の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項 6】**

純度98%を超える5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩を含む、請求項1~5の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項 7】**

請求項1~6の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物を、水又は液状の薬学的に許容されるビヒクルに溶解することにより得られる、再構成製品。

**【請求項 8】**

水が、注射用滅菌水である、請求項7に記載の再構成製品。

**【請求項 9】**

さらに薬学的に許容される担体を含む、請求項7又は8の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項 10】**

さらに追加の薬学的に許容される有効成分を含む、請求項7~9の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項 11】**

さらに緩衝剤及び/又は1つ若しくは複数の浸透圧補正賦形剤を含む、請求項7~10の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項 12】**

癌の治療又は癌療法に使用するための、請求項7~11の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項 13】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む、請求項1~6の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物を調製する方法であって、この方法は、以下のステップを含み：

v i i i . (6S) - テトラヒドロ葉酸を約pH11の水に溶解するステップ、

i i . 透明溶液のpHを8.6±0.5に調整するステップ、

i i i . 110~120mol%のホルムアルデヒドを添加するステップ、

i v . 反応が完了するまで反応混合物を攪拌するステップ、

10

20

30

40

50

v . 約 4 0 ~ 2 0 0 m o l % のアルカリ金属硫酸塩及び 1 0 0 ~ 4 0 0 m o l % のクエン酸塩を添加するステップ、

v i . 反応混合物を濾過して透明溶液を得るステップ。

i x . 得られた透明溶液を凍結乾燥するステップ、

この方法は、さらなる還元剤又は酸化防止剤の添加するステップを含まない。

#### 【請求項 1 4】

アルカリ金属硫酸塩が、硫酸ナトリウムの形態で添加される、請求項 1 3 に記載の方法。

#### 【請求項 1 5】

クエン酸塩が、クエン酸又はクエン酸ナトリウムとして添加される、請求項 1 3 又は 1 10 4 に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0 0 0 1】

本発明は、5 , 1 0 - メチレン - ( 6 R ) - テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩 ( 5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F \* N a<sub>2</sub> ) 、硫酸塩及びクエン酸塩を高濃度に含む安定な製剤及び凍結乾燥物に関する。

##### 【背景技術】

##### 【0 0 0 2】

##### 発明の背景 :

5 , 1 0 - メチレンテトラヒドロ葉酸は、固体腫瘍の治療において、5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) と併用される医薬品として知られている ( 非特許文献 1 : S e l e y , K . L . D r u g s 4 ( 1 ) , 9 9 , 2 0 0 1 ) 。活性異性体である 5 , 1 0 - メチレン - ( 6 R ) - テトラヒドロ葉酸 ( 以下、5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F と略記する ) は、酵素チミジル酸合成酵素 ( T S ) を阻害することにより、塩基類似体及び 5 - F U 代謝物である 5 - F d U M P と共に化学療法効果を発揮する。 T S は、デオキシリジル酸 ( d U M P ) から、DNA 合成に不可欠な構成要素であるデオキシチミジル酸 ( d T M P ) への変換を触媒する。 T S の不活性化は、 T S 、 5 - F U の代謝産物である塩基類似体 5 - F d U M P 及び 5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F の間で共有結合の三元阻害複合体を形成することによって起こる。

##### 【0 0 0 3】

5 - F U の細胞毒性効果は、5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F の細胞内濃度を高めることで増強でき、その結果、三元阻害複合体の安定性が高まる。これにより、DNA 合成及び修復が直接阻害され、最終的には、細胞死と腫瘍の成長遅延につながる。 5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F の細胞内濃度を高めるには、それぞれ安定した高含有量の製品の使用が望まれている。

##### 【0 0 0 4】

しかしながら、5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F には、その医薬用途を制限する好ましくない性質がある。例えば、5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F は、酸化及び化学分解を非常に受けやすく、その結果、不純物レベルが好ましくないほど高くなる。

##### 【0 0 0 5】

5 , 1 0 - C H<sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F の酸化及び化学的分解に対する感受性は、水溶液中、又は、化合物が大きな表面積を持つ非晶質形態 ( 例えば、凍結乾燥物としての医薬用途の形態 ) で存在する場合、又は、注射用溶液等の再溶解形態で存在する場合に特に高くなる。医薬用途に適するためには、それぞれの組成物が、組成物の物理化学的特性、取り扱い及び処理の容易さ等に著しい変化を示さずに、許容できる期間にわたって効果的に保管できるような、高い化学的安定性及び異性体安定性を含むいくつかの要件を満たす必要があることはよく知られている。

##### 【0 0 0 6】

5 , 1 0 - メチレンテトラヒドロ葉酸は、テトラヒドロ葉酸とホルムアルデヒドの付加

20

30

40

50

生成物であり（例えば、非特許文献2：Poe, M. et al. Biochemistry 18(24), 5527, 1979、非特許文献3：Kallen, R. G. Methods in Enzymology 18B, 705, 1971を参照されたい）、空気による酸化に対して極めて高い感受性と、中性及び／又は酸性環境での不安定性により、化学的劣化及び／又は加水分解を引き起こす可能性があることで知られている（例えば、非特許文献4：Odin, E. et al., Cancer Investigation 16(7), 447, 1998、非特許文献5：Osborn, M. J. et al., J. Am. Chem. Soc. 82, 4921, 1960、非特許文献6：Hawkes, J., and Villota, R. Food Sci. Nutr. 28, 439, 1989を参照されたい）。

10

#### 【0007】

5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の組成物を安定化する試みとしては、例えば、(i) 固形製剤の再構成用の特別な技術的装置の使用による大気中の酸素の厳格な排除、及び空気のない環境での5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の注入（例えば、非特許文献4：Odin, E. et al., Cancer Investigation 16(7), 447, 1998、特許文献1：米国特許第4,564,054号を参照されたい）、(ii) 非常に敏感な5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸、特にテトラヒドロ葉酸に対する抗酸化剤としてのL(+)-アスコルビン酸又はその塩、還元型グルタチオン、ベータメルカプトエタノール、チオグリセロール、N-アセチル-L-システイン等の還元剤の添加等が挙げられる。

20

#### 【0008】

5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸分子の酸化防止における還元剤（抗酸化剤）の有効性の一例として、Adventrx Pharmaceuticals社は、自社の候補薬CoFactor（登録商標）、すなわちジアステレオマー混合物5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸のカルシウム塩の安定性研究を実施し、これらの研究は、特許文献2：国際公開第2007/064968号等で公開されている。ジアステレオマー混合物5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸の化学的安定性は、本発明の純粋なジアステレオマー5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THFと同様であると想定される。

30

#### 【0009】

Adventrxの研究では、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸をそのまま（非配合）、クエン酸三ナトリウムのみと、あるいはクエン酸三ナトリウム及びアスコルビン酸の両方と配合した場合の安定性を比較した（図1参照）。

#### 【0010】

単離した凍結乾燥物の安定性プロファイルの線形回帰分析により、5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸の分解は、時間の経過に伴って線形であることが示された（図2を参照されたい）。各配合（再構成した凍結乾燥物）の分解速度（最も適合した直線の傾き）は、最も速いものから最も遅いものの順に、非配合 > クエン酸三ナトリウムのみと配合 > クエン酸三ナトリウム及び還元剤アスコルビン酸の両方と配合の順であった（図2）。非配合の5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸は、1時間当たり2.2%の純度が低下し、7時間後には純度が84%になったが、250%w/wクエン酸三ナトリウムを含む配合では、1時間当た1.4%の純度が低下し、7時間後には純度が89%になった。250%w/wクエン酸三ナトリウム及び175%w/wアスコルビン酸の両方を含む製剤は、はるかに高い安定性を示し、1時間あたりの純度の低下はわずか0.5%であり、7時間後には約96%の純度になった。

40

#### 【0011】

この研究は、還元剤の添加が、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の製剤に大きな安定化効果をもたらすことを明らかにした。しかし、その結果、凍結乾燥製剤中の有効成分含有量は、20%w/w未満に減少する（図3）。特許文献2：国際公開第2007/064968号に開示されている、凍結乾燥物を調製するための溶液には、最大で約4%の

50

5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - T H F が含まれている。

#### 【 0 0 1 2 】

5 , 1 0 - メチレンテトラヒドロ葉酸の安定化は、硫酸塩（例えば、特許文献3：欧洲特許第0537492号を参照されたい）又は半硫酸塩（例えば、特許文献4：欧洲特許第2837631号を参照されたい）等の様々な結晶形態の形成によっても達成されている。しかし、5 , 1 0 - メチレンテトラヒドロ葉酸のこのような塩形態は、水溶性が低いため、医薬目的には容易には役立たない。

#### 【 0 0 1 3 】

ジカルボン酸及び／又はクエン酸等のトリカルボン酸及び／又は他の安定剤を含む5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F の凍結乾燥物も、例えば、特許文献5：国際公開第2019 / 034673号、特許文献6：米国特許公開第2007 / 0099866号及び特許文献7：米国特許第10059710号に開示されている。凍結乾燥物を調製する目的でそれらに開示されている溶液には、最大で2～3重量%の5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F が含まれている。10

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【 0 0 1 4 】

【特許文献1】米国特許第4 , 5 6 4 , 0 5 4 号

【特許文献2】国際公開第2007 / 064968号

【特許文献3】欧洲特許第0537492号20

【特許文献4】欧洲特許第2837631号

【特許文献5】国際公開第2019 / 034673号

【特許文献6】米国特許公開第2007 / 0099866号

【特許文献7】米国特許第10059710号

#### 【非特許文献】

#### 【 0 0 1 5 】

【非特許文献1】S e l e y , K . L . D r u g s 4 ( 1 ) , 9 9 , 2 0 0 1

【非特許文献2】P o e , M . e t a l . B i o c h e m i s t r y 1 8 ( 2 4 ) , 5 5 2 7 , 1 9 7 9

【非特許文献3】K a l l e n , R . G . M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 1 8 B , 7 0 5 , 1 9 7 130

【非特許文献4】O d i n , E . e t a l . , C a n c e r I n v e s t i g a t i o n 1 6 ( 7 ) , 4 4 7 , 1 9 9 8

【非特許文献5】O s b o r n , M . J . e t a l . , J . A m . C h e m . S o c . 8 2 , 4 9 2 1 , 1 9 6 0

【非特許文献6】H a w k e s , J . , a n d V i l l o t a , R . F o o d S c i . N u t r . 2 8 , 4 3 9 , 1 9 8 9

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【 0 0 1 6 】

臨床的観点から、当技術分野で知られている5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F の製剤は、水溶性、有効成分の高含有量及び高い安定性の満足できる組み合わせを備えていない。したがって、5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F を高含有量で含む、安定かつ可溶性の医薬組成物に対する大きなニーズが依然として残っている。40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【 0 0 1 7 】

#### 発明の概要：

現在、驚くべきことに、5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - ( 6 R ) - メチレンテトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩（以下、5 , 1 0 - C H <sub>2</sub> - ( 6 R ) - T H F \* N a <sub>2</sub> と記す）をクエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩と組み合わせてなる凍結乾燥組成物は、5 , 1 0 - メチレンテ50

トラヒドロ葉酸、クエン酸塩及びL-(+)-アスコルビン酸のような還元剤を含む組成物に匹敵するか、さらに高い安定性を有することが見出されている。

#### 【0018】

従って、L-(+)-アスコルビン酸のような還元剤（抗酸化剤）を添加しなくても、また大気中の酸素を排除しなくても、5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>、アルカリ金属硫酸塩及びクエン酸塩の溶液は、数時間にわたって非常に安定なままであり、本発明に係るこれらの溶液は、次に同様に良好な安定性を有する凍結乾燥物に変換される。これらの凍結乾燥物は、5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>、アルカリ金属硫酸塩及びクエン酸塩を含み、他の安定化剤を含まないので、先に議論した既知の欠点を克服し、高純度で、酸化生成物又は他の化学分解生成物の何れかの含有量が低い固体状態の医薬組成物の調製を可能にする。

10

#### 【0019】

したがって、第1の態様において、本発明は、5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸(5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>)の二ナトリウム塩、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む凍結乾燥組成物に関する。

#### 【0020】

本発明の第2の態様は、第1の態様に係る凍結乾燥組成物の製造方法に向けられており、この方法は、以下のステップを含み：

- i . (6S) - テトラヒドロ葉酸をNaOHで水に溶解するステップ、
  - i i . 溶液のpHを8.6±0.5に調整するステップ、
  - i i i . 110~120モル%のホルムアルデヒドを添加するステップ、
  - i v . 反応が完了するまで反応混合物を攪拌するステップ、
  - v . 約40~200モル%のアルカリ金属硫酸塩及び約200~400モル%のクエン酸塩を添加するステップ、
  - v i . 反応混合物を濾過して透明溶液を得るステップ、及び
  - v i i . 得られた透明溶液を凍結乾燥するステップ、
- この方法は、さらなる還元剤又は抗酸化剤を添加するステップを含まない。

20

#### 【0021】

本発明の第3の態様は、ヒト患者の癌の治療又は癌療法に使用するため、第1の態様に係る凍結乾燥組成物に関する。

30

#### 【0022】

第4の態様において、本発明は、さらに、第1の態様に係る凍結乾燥組成物を、それを必要とするヒト患者に投与することを含む、ヒト患者における癌の治療方法又は癌療法に関する。

#### 【0023】

第5の態様において、本発明は、さらに、第1の態様に係る凍結乾燥組成物をヒト患者の癌の治療用の薬剤の製造に使用することに関する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0024】

【図1】図1は、特許文献2：国際公開第2007/064968号から引用した表であり、55,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸の非配合及び各種配合製剤(non-formulated and various formulated forms)の経時安定性を示している(正規化純度(normalized purity %)。非配合製剤の5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸は、1時間あたり2.2%純度が低下し、24時間後の正規化純度は45%であった。250%w/wのクエン酸三ナトリウムを含む参照製剤は、1時間あたり1.4%の純度を失い、24時間後の正規化純度は65%であった。250%w/wのクエン酸三ナトリウム及び175%w/wのアスコルビン酸の両方を含む製剤#1と#2は、安定性がはるかに高く、1時間あたり0.5%しか純度が低下せず、24時間後の正規化純度は約90%であった。

40

50

## 【0025】

【図2】図2は、特許文献2：国際公開第2007/064968号の図1から引用したものであり、本明細書における図1の集計結果をグラフで示したものである。

## 【0026】

【図3】図3は、特許文献2：国際公開第2007/064968号の実施例1から引用した表であり、本明細書の図1及び図2に示した5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸の非配合製剤及び配合製剤の組成物を示す。見られるように、最も安定な組成物（製剤#1及び#2）は、有効成分5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸の含有量が20%未満である。

## 【0027】

【図4】図4は、75mg/mLの5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及び硫酸ナトリウムを含む3種類の溶液を3つの異なる条件でテストした純度分析結果である：25、5及び酸化防止剤として1mg/mLのアスコルビン酸ナトリウムを添加し、5でテスト。合計7時間の結果を示す。グラフからわかるように、溶液は保存条件下で非常に安定している。5では純度に実質的な変化はなく、約97%（面積%）で維持されている。見られるように、アスコルビン酸塩の影響は最小であることもわかる。25では、7時間にわたる純度は、初期の純度約96%から約95.5%（面積%）に変化した。

10

## 【0028】

【図5】図5は、本明細書の図4に示したのと同じ5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸のナトリウム塩の3つの溶液の分析を示す。図5では、溶液中の主要不純物である10-ホルミル-(6R)-テトラヒドロ葉酸(10-FTHFA)の7時間にわたる推移を示している。見てわかるように、この不純物のレベルは時間とともに実質的に一定である。

20

## 【0029】

【図6】図6は、5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸ナトリウムを含む凍結乾燥組成物の5、25、40における安定性を示している。グラフからわかるように、凍結乾燥組成物は保存条件下で非常に安定である。室温で24ヶ月間保存した場合でも、純度に実質的な変化はない（相対純度99.8%w/w）。

30

## 【0030】

【図7】図7は、5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸ナトリウムを含む凍結乾燥組成物を5、25、40で保存した場合の主要不純物である10-ホルミル-(6R)-テトラヒドロ葉酸(10-FTHFA)の推移を示している。見られるように、この不純物のレベルは時間の経過と共に実質的に一定である。

## 【0031】

定義：

本明細書において、「安定剤（stabilizers）」又は「安定化剤（stabilizing agents）」という用語は、クエン酸塩（又はクエン酸及びその塩）等の緩衝剤；コハク酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩等のジカルボキシレート；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）；N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸（TES）；3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)；N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BEES)；MES；MOPSO；HEPES；リン酸塩、炭酸塩、アンモニウム；モノ-、ジ-及びトリ-アルキルアンモニウム；モノ-、ジ-及びトリ-ヒドロキシリアルキルアンモニウム；グルタミン酸塩；ホウ酸塩；乳酸塩；及びこれらの組み合わせを指す。「安定剤」又は「安定化剤」という用語はさらに、感受性の5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸、特にテトラヒドロ葉酸に対して抗酸化剤として作用し得る、L-(+)-アスコルビン酸又はその塩、還元型-L-グルタチオン、-メルカプトエタノール、チオグリセ

40

50

ロール、N - アセチル - L - システイン等の還元剤に関する。

【0032】

本明細書において、「緩衝剤（buffer）」という用語は、クエン酸塩（又はクエン酸及びその塩）；コハク酸塩、リンゴ酸塩及びマレイン酸塩等のジカルボキシレート；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）；N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸（TES）；3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸（MOPS）；N, N - ビス（2 - ヒドロキシエチル） - 2 - アミノエタンスルホン酸（BES）；MES；MOPS；HEPES；リン酸塩；炭酸塩；アンモニウム；モノ - 、ジ - 及びトリ - アルキルアンモニウム；モノ - 、ジ - 及びトリ - ヒドロキシリアルキルアンモニウム；グルタミン酸塩；ホウ酸塩；乳酸塩及びこれらの組み合わせを指す。

10

【0033】

本明細書において、「還元剤（reducing agent）」又は「抗酸化剤（antioxidants）」という用語は、L - (+) アスコルビン酸又はその塩、還元型 - グルタチオン、- メルカプトエタノール、チオグリセロール及びN - アセチル - L - システインに関する。

【0034】

本明細書において、「溶媒（solvent）」という用語は、凍結乾燥方法で使用できる溶媒に関する。本明細書で言及される「溶液（Solutions）」には、水溶液及び有機溶媒の溶液が含まれる。典型的には、「水溶液（aqueous solutions）」とは、水中の溶液、生理食塩水、少量の緩衝液を含む水、等張量のNaClを含む水又は水と有機溶媒の混合物等を意味する。典型的な有機溶媒には、DMSO、アセトニトリル、アセトン、メタノール又はエタノールが含まれる。

20

【0035】

本明細書において、「5, 10 - CH<sub>2</sub> - (6R) - THF \* Na<sub>2</sub> を含む組成物」という語句は、溶液及び凍結乾燥物等の固体組成物の両方に関連し、例えば医療用に使用するために再構成された凍結乾燥物も含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0036】

発明の詳細な説明：

30

5, 10 - メチレンテトラヒドロ葉酸が酸化に対して極めて敏感であることは、当該技術分野でよく知られている。さらに、5, 10 - メチレンテトラヒドロ葉酸の溶液は、その固体形態よりも化学的に分解されやすいことが知られている。これまで、この問題は、当該技術分野において、クエン酸をすでに含む5, 10 - メチレンテトラヒドロ葉酸溶液に抗酸化剤、すなわちアスコルビン酸等の還元剤を添加することによって対処してきた。これにより、本明細書の図1及び図2に示すように、溶解した5, 10 - メチレンテトラヒドロ葉酸の安定性が増すことが示されたが、5, 10 - メチレンテトラヒドロ葉酸の相対含有量が減少するという代償があった。

【0037】

驚くべきことに、5, 10 - メチレン - (6R) - テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩（以下、5, 10 - CH<sub>2</sub> - (6R) - THF \* Na<sub>2</sub> と表記）をクエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩と組み合わせた水溶液は、5, 10 - メチレンテトラヒドロ葉酸、クエン酸塩及びL - (+) - アスコルビン酸等の還元剤を含む水溶液と同等又はそれ以上の安定性を有することがわかった。本発明に係る溶液は、次に同様に良好な安定性を有する凍結乾燥物に変換される。アルカリ金属硫酸塩は、それ自体は還元剤ではないため、通常は化学的に不活性であると考えられる。したがって、発見された安定性は驚くべきものである。

40

【0038】

本発明の凍結乾燥物は、20%w / wを超える5, 10 - CH<sub>2</sub> - (6R) - THF \* Na<sub>2</sub>、例えば25%w / wを超える、例えば30%w / wを超える、例えば35%w / wを超える又は例えば約40%w / wの5, 10 - CH<sub>2</sub> - (6R) - THF \* Na<sub>2</sub>を

50

含む。

#### 【0039】

凍結乾燥粉末は、水溶液よりもさらに高い安定性を有し、投与のために希釈剤で設定濃度に再構成することができる。このように再構成された凍結乾燥物は、筋肉内又は静脈内に投与することができる。

#### 【0040】

許容される凍結乾燥ケーキの形成を促進するために、凍結乾燥方法の前にマンニトール等の增量剤 (Bulking agents) を溶液に添加することができる。良好な細孔形成は乾燥サイクル中の乾燥と水分の移動を促進する可能性があるから、凍結乾燥ケーキの構造と多孔性は重要である。

10

#### 【0041】

また、電解質、糖類及び／又はデキストロース、グリセロール、マンニトール等のポリオール及び塩化ナトリウムを添加して、浸透圧を調整することもできる。浸透圧の調整は、凍結乾燥の前又は後に行うことができる。再構成された凍結乾燥溶液は、浸透圧が、250～350 mOsm の範囲であることが好ましい。ただし、200～600 mOsm の浸透圧も許容され、投与量と注射／注入時間によって異なる。

20

#### 【0042】

溶液の pH は典型的には、8.0～9.0 の範囲、好ましくは 8.4～8.8 の範囲であり、例えば、少量の塩酸又は水酸化ナトリウムを用いて医薬品製造中に調整することができる。

20

#### 【0043】

安定性は、医薬製剤研究及び医薬品開発において重要な特性であり、構成要素である。安定性テストは、溶液状態と固体状態の両方で実施される。溶液状態の安定性と固体状態の安定性は、質的にも量的にも異なる可能性があることは、確立された事実である。原薬及びその医薬組成物の安定性については、高温や高湿といった様々なストレス要因にさらすことでの広範な研究が実施されている。これらの研究はまた、分解生成物に関する情報を提供し、医薬組成物の本質的な安定性だけでなく、意味のある仕様の開発に役立つ。薬物分解の最も一般的な経路には、加水分解、酸化、光化学分解等がある。

#### 【0044】

安定性テストの目的は、温度、湿度、光等の様々な環境要因の影響下で製品の品質が時間と共にどのように変化するかについての証拠を提供し、患者の安全を確保するために、医薬品の適切な保存期間と推奨される保管条件を確立することである。

30

#### 【0045】

第1の態様において、本発明は、5,10メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩 (5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>)、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む凍結乾燥組成物に関する。

#### 【0046】

第1の態様の好ましい実施形態では、本発明は、20% w/w を超える、5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>、例えば 25% w/w を超える、例えば 30% w/w を超える、例えば 35% w/w を超える又は例えば約 40% w/w の 5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub> を含む安定した凍結乾燥物に関する。

40

#### 【0047】

本発明の凍結乾燥物は、実質的に非晶質であるが、安定性が向上し、例えば貯蔵安定性が向上する。本発明の凍結乾燥物は、当該技術分野で既知の方法によって、水性医薬製剤に再構成され、それを必要とする患者に投与され得る。

#### 【0048】

本発明は、一実施形態では、アルカリ金属硫酸塩と 5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>とのモル比が約 40 モル%～約 400 モル%、好ましくは約 50 モル%～約 100 モル% である、第1の態様に係る凍結乾燥組成物を開示する。

#### 【0049】

50

別の実施形態では、本発明は、 $5,10-\text{CH}_2-(6\text{R})-\text{THF} * \text{Na}_2$ とクエン酸塩とのモル比が約200~400モル%、好ましくは約350モル%である、第1の態様に係る凍結乾燥組成物を開示する。

#### 【0050】

本発明の第2の態様は、第1の態様に係る凍結乾燥組成物を調製する方法に向けられており、この方法は、以下の工程を含み：

- i . (6S) - テトラヒドロ葉酸を $\text{NaOH}$ で水に溶解するステップ、
  - i i . 溶液のpHを $8.6 \pm 0.5$ に調整するステップ、
  - i i i . 110~120mol%のホルムアルデヒドを添加するステップ、
  - i v . 反応が完了するまで反応混合物を攪拌するステップ、
  - v . 約40~200mol%のアルカリ金属硫酸塩及び約200~400mol%のクエン酸塩を添加するステップ、
  - v i . 反応混合物を濾過して透明溶液を得るステップ、及び
  - v ii . 得られた透明溶液を凍結乾燥するステップ、
- この工程は、さらなる還元剤又は酸化防止剤の添加するステップを含まない。

#### 【0051】

一実施形態では、ステップv . で添加されるアルカリ金属硫酸塩は、硫酸ナトリウムの形態である。

一実施形態では、ステップv . で添加されるクエン酸塩は、クエン酸ナトリウムの形態である。別の実施形態では、クエン酸塩は、クエン酸として添加される。

#### 【0052】

第3の態様において、本発明は、さらに、ヒト患者における癌の治療又は癌療法に使用するための、第1の態様に係る $5,10-\text{CH}_2-(6\text{R})-\text{THF} * \text{Na}_2$ を含む凍結乾燥組成物に関する。

#### 【0053】

好ましい実施形態では、本発明は、ヒト患者における癌の治療又は癌療法に使用するための、第1の態様に係る $5,10-\text{CH}_2-(6\text{R})-\text{THF} * \text{Na}_2$ を含む安定な凍結乾燥物又はその再構成水溶液に関する。

#### 【0054】

第4の態様において、本発明は、さらに、第1の態様に係る凍結乾燥組成物を、それを必要とするヒト患者に投与することを含む、ヒト患者における癌の治療又は癌療法の方法に関する。

#### 【0055】

好ましい実施形態において、本発明は、第1の態様に係る $5,10-\text{CH}_2-(6\text{R})-\text{THF} * \text{Na}_2$ を含む凍結乾燥組成物又はその再構成水溶液を、それを必要とするヒト患者に投与することを含む、ヒト患者における癌の治療方法に関する

#### 【0056】

第5の態様において、本発明はさらに、ヒト患者における癌の治療のための医薬の製造のための、第1の態様に係る $5,10-\text{CH}_2-(6\text{R})-\text{THF} * \text{Na}_2$ を含む凍結乾燥組成物の使用に関する。

#### 【0057】

さらなる態様は、 $5,10-\text{CH}_2-(6\text{R})-\text{THF} * \text{Na}_2$ 及び滅菌水又は液状の薬学的に許容されるビヒクリルのような薬学的に許容される担体又は希釈剤を含み、任意に、殺菌剤、抗生物質、抗ウイルス剤、防腐剤、抗悪性腫瘍剤、化学療法剤のような抗がん化合物、抗真菌剤及び/又は抗炎症剤、又は、ヒトでの使用に適した他の生物活性剤もしくは治療剤、特に化学療法剤のような抗がん化合物、例えば5-FU及び誘導体及び抗葉酸化合物(antifolates)、例えばメトトレキサート、ペメトレキセドを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む、本発明の凍結乾燥物の再構成医薬組成物に向けられる。

#### 【0058】

10

20

30

40

50

本発明の凍結乾燥物は、実質的に未溶解の無水形態であり、これには、完全に水を含まない化合物及び微量の水を含む可能性のある化合物が含まれる。このような残留し得る（化学量論的ではない）水の量は、任意の量であってよいが、典型的には0 wt.-% H<sub>2</sub>O ~ 3 wt.-% H<sub>2</sub>Oの範囲であり、好ましくは0 wt.-% H<sub>2</sub>O ~ 1 wt.-% H<sub>2</sub>Oの範囲であり、例えば0.05 wt.-% H<sub>2</sub>O ~ 1 wt.-% H<sub>2</sub>Oの範囲である。

### 【実施例】

#### 【0059】

##### HPLC:

純度 / 含有量及び分解生成物の測定は、HPLC - UVグラジエント法 (HPLC - U V Gradient Method) を使用した。カラムタイプ: ODS、移動相A: 水性緩衝液、移動相B: 水性緩衝液 / メタノール、実行時間: 30分、サンプル溶媒: 水性緩衝液。

#### 【0060】

##### 水分含有量:

水分含有量の測定は、Ph. Eur. 2.5.32 / USP <921> / Method Ic >に従って行った。

#### 【0061】

##### 浸透圧:

浸透圧の測定は、Ph. Eur. 2.2.35 (浸透圧計) / USP <785> に従って行った。

#### 【0062】

##### 実施例1: 5,10-メチレン(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸ナトリウムを含む水溶液の調製

(a) (6S)-テトラヒドロ葉酸 (16 mmol、7.93 g) を、窒素下、室温で78.0 g の蒸留水に溶解した。溶液のpHは、まず32% NaOH水溶液をゆっくり添加してpH 11まで上げ、次いで1.0 M HClでpH 8.3に調整し、約0に冷却した。ホルムアルデヒド溶液 (1.44 g、110 mol%) を一度に添加し、溶液を0で1時間攪拌した。活性炭 (0.2 g、Norit C Extra) を添加し、反応混合物を0で30分間攪拌し、濾過して5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム (5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF \* Na<sub>2</sub>) の透明溶液を得た。このようにして得られた5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム溶液は、必要に応じて、5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THFの硫酸塩の沈殿、続く水酸化ナトリウムによる再溶解による、以下の工程 (b) 及び (c) により精製することができる。

#### 【0063】

(b) (任意) 55 ml の 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.055 mol、344 mol%) を窒素下で60に加熱し、上記ステップ (a) で得られた溶液を15分かけて滴下した。得られた反応混合物 (スラリー) を50で2時間攪拌した。次に、反応混合物を50で吸引ろ過し、沈殿物を室温で25 ml の蒸留水で2回洗浄し、30°C、10 mbarで12時間 (一晩) 乾燥させて、7.36 g の 5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF 硫酸塩を淡灰色の結晶として得た (収率 86%)。

#### 【0064】

(c) (任意) ステップ (b) の生成物を窒素下で0.1NのNaOH 50 mL に溶解し、1.5のNaOHでpHを8.6 ± 0.50に調整した。

#### 【0065】

(d) ステップ (c) 又はステップ (a) の溶液に20 ml の水に21 g のクエン酸をえたものを添加し、必要に応じて硫酸ナトリウム水溶液で硫酸塩含有量を200 mol%まで調整した。次に、全量を滅菌濾過水で100 mL に調整し、0.22 μm のフィルター、好ましくは親水性 PVDF タイプ、例えば Millipore Durapore (50

登録商標) 0.22 μm を使用して濾過した。溶液をできるだけ冷たく保ちながら、濾液をバイアルに充填した(バイアルあたり 2 mL 又は 160 mg の 5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF \* Na<sub>2</sub>)。

#### 【0066】

#### 実施例 2 : 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸及び硫酸ナトリウムを含む凍結乾燥組成物の調製

実施例 1 のバイアルを凍結し、その後凍結乾燥させた。バイアルを、ヘッドスペースに窒素を入れた状態でわずかに真空下で密封し、圧着した。得られた凍結乾燥物には、30% w/w を超える 5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF \* Na<sub>2</sub> が含まれる。

#### 【0067】

#### 実施例 3 : 安定性テスト

a) 25 における 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸及び硫酸塩を含む溶液の安定性

25 °C における 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸塩を含む滅菌濾過溶液の安定性を測定するために、実施例 1 のステップ(d)で調製した溶液を 25 °C で保存した。5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF の純度を HPLC で定期的に測定した(面積%)。結果を図 4 に示す。テスト中、テスト液の色は黄色から濃い黄色に濃くなかった。室温保存のサンプルには遮光は施さなかった。室温では、7 時間の保存期間中、純度は 96% で安定したままであった。安定性テスト中の分析結果の推移を図 4 にまとめた。25 °C で保存した場合の主な分解生成物である 10-ホルミル-(6R)-テトラヒドロ葉酸(10-FTHFA) の含有量は、定期的に HPLC で測定した。結果を図 5 に示す。

#### 【0068】

b) 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸塩を含む溶液の 5 における安定性

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸ナトリウムを含む滅菌濾過溶液の 5 における安定性を測定するために、実施例 1 のステップ d で調製した溶液を 5 °C で保存した。5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF の純度を HPLC で定期的に測定した(面積%)。結果を図 4 に示す。主な分解産物である 10-ホルミル-(6R)-テトラヒドロ葉酸(10-FTHFA) の含有量を、定期的に HPLC で測定した。結果を図 5 に示す。テスト中、テスト溶液の色は黄色から暗黄色に濃くなかった。安定性テスト溶液は、調査中は冷蔵庫(2 ~ 8 °C) に保管し、分析サンプリング時のみ取り出した。サンプリング中は遮光はしなかった。2 ~ 8 °C では純度に大きな変化は見られず、7 時間の保管期間中も 97% で安定したままであった。安定性テスト中の分析結果の推移を図 4 と図 5 にまとめた。アスコルビン酸ナトリウム(酸化防止剤として 1 mg / mL) を添加し、2 ~ 8 °C で保存した比較テスト液について、5 における安定性テストを繰り返した。アスコルビン酸ナトリウムを添加したテスト溶液は、アスコルビン酸ナトリウムを添加していないテスト溶液と比較して有意差は認められなかった(図 4 及び図 5)。したがって、アスコルビン酸ナトリウムを添加したテスト液と無添加のテスト液は、安定性に関して同等であると考えられる。75 mg / mL の 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸溶液は透明で、2 ~ 8 °C で保存しても常温で保存しても透明なままであり、沈殿は発生しない。溶液はわずかに粘性があり、浸透圧は約 710 mOsmol / kg である。結論として、75 mg / mL の 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸塩を含む無菌濾過溶液は、2 ~ 8 °C で保存した場合、7 時間まで安定であり、室温で保存した場合、4 時間まで安定である。

#### 【0069】

c) 5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸ナトリウムを含む凍結乾燥組成物の 5 °C、25 °C 及び 40 °C での安定性

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸二ナトリウム、クエン酸塩及び硫酸

ナトリウムを含む凍結乾燥組成物の様々な温度での経時的な安定性を決定するために、実例2で調製した凍結乾燥物を5、25及び40で保存した。5, 10 - C H<sub>2</sub> - (6R) - T H F の純度は、一定間隔で H P L C によって測定した（面積%）。開始値に対する結果は、図6に% w / w での相対純度として示す。5、25及び40で保存したときの主な分解産物である10 - ホルミル - (6R) - テトラヒドロ葉酸(10 - F T H F A )の含有量を、一定期間ごとに H P L C で測定した。結果を図7に示す。

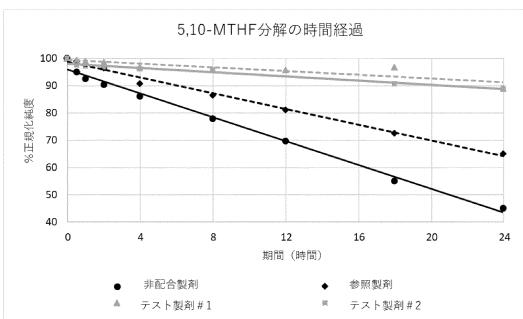
### 【図面】

#### 【図1】

期間 (時間)	非配合製剤	参考製剤 凍結乾燥物	テスト製剤 # 1 凍結乾燥物	テスト製剤 # 2 凍結乾燥物
0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,5	94,9	98,8	99,3	97,3
1	92,4	97,8	99,0	97,0
2	90,3	96,2	98,4	96,6
4	85,9	90,5	96,9	95,9
8	77,8	86,5	95,8	95,7
12	69,6	80,9	95,7	N/A
18	55,1	72,4	96,6	90,8
24	44,9	65,0	88,9	88,8

N/A = データ取得不可

#### 【図2】



10

20

30

40

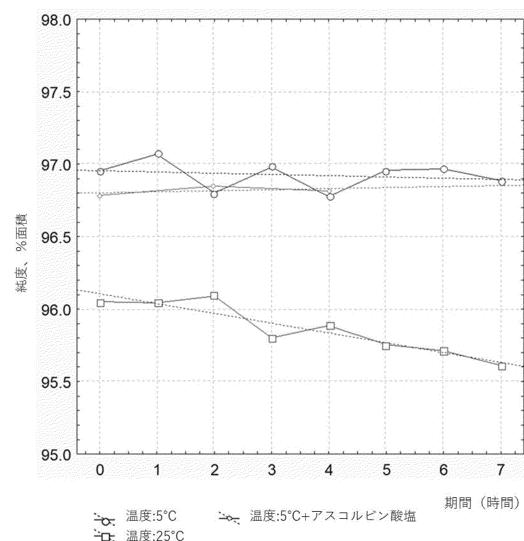
50

#### 【図3】

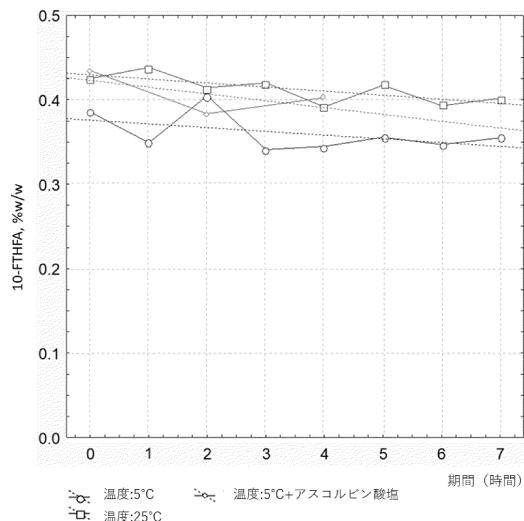
テストサンプル	5,10-MTHF	ニナトリウム塩	アスコルビン酸	%W/W 5,10-MTHF
非配合製剤	100 mg	0	0	100%
参考製剤	100 mg	269 mg	0	27%
テスト製剤 # 1	100 mg	250 mg	176 mg	19%
テスト製剤 # 2	100 mg	250 mg	176 mg	19%

5,10-MTHF = 5,10-メチレン-(6R,S)-テトラヒドロ葉酸

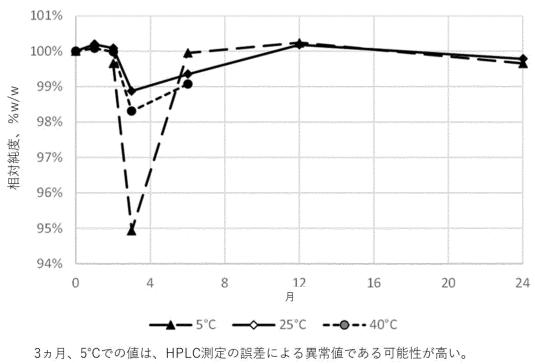
#### 【図4】



【図5】



【図6】



10

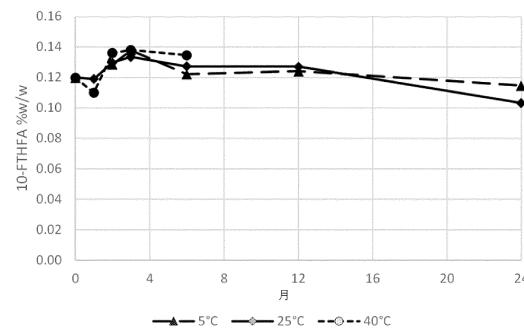
20

30

40

50

【図7】



**【手続補正書】****【提出日】**令和6年2月20日(2024.2.20)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む凍結乾燥組成物であって、当該組成物は、さらなる還元剤又は抗酸化剤を含まず、該5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩の濃度が、30%w/wを超える、凍結乾燥組成物。

**【請求項2】**

5,10-メチレン(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、硫酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、水及び任意の浸透圧補正添加剤からなる、請求項1に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項3】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩と硫酸塩とのモル比が、約40~200モル%である、請求項1又は請求項2に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項4】**

クエン酸塩を、200~400mol%含む、請求項1~3の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項5】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩の濃度が、35%w/wを超える又は例えば約40%w/wの5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩である安定な凍結乾燥物である、請求項1~4の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項6】**

純度98%を超える5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩を含む、請求項1~5の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項7】**

請求項1~6の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物を、水又は液状の薬学的に許容されるビヒクルに溶解することにより得られる、再構成製品。

**【請求項8】**

水が、注射用滅菌水である、請求項7に記載の再構成製品。

**【請求項9】**

さらに薬学的に許容される担体を含む、請求項7又は8の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項10】**

さらに追加の薬学的に許容される有効成分を含む、請求項7~9の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項11】**

さらに緩衝剤及び/又は1つ若しくは複数の浸透圧補正賦形剤を含む、請求項7~10の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項12】**

癌の治療又は癌療法に使用するための、請求項7~11の何れか1項に記載の再構成製品。

**【請求項13】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及び

10

20

30

40

50

アルカリ金属硫酸塩を含む、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の凍結乾燥組成物を調製する方法であって、この方法は、以下のステップを含み：

i . ( 6 S ) - テトラヒドロ葉酸を約 pH 1 1 の水に溶解するステップ、

i i . 透明溶液の pH を 8 . 6 ± 0 . 5 に調整するステップ、

i i i . 1 1 0 ~ 1 2 0 m o l % のホルムアルデヒドを添加するステップ、

i v . 反応が完了するまで反応混合物を攪拌するステップ、

v . 約 4 0 ~ 2 0 0 m o l % のアルカリ金属硫酸塩及び 1 0 0 ~ 4 0 0 m o l % のクエン酸塩を添加するステップ、

v i . 反応混合物を濾過して透明溶液を得るステップ。

i x . 得られた透明溶液を凍結乾燥するステップ、

この方法は、さらなる還元剤又は酸化防止剤の添加するステップを含まず、該 5 , 1 0 - メチレン - ( 6 R ) - テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩の濃度が、3 0 % w / w を超える。

10

【請求項 1 4】

アルカリ金属硫酸塩が、硫酸ナトリウムの形態で添加される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

クエン酸塩が、クエン酸又はクエン酸ナトリウムとして添加される、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

20

30

40

50

**【手続補正書】****【提出日】**令和7年1月10日(2025.1.10)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む凍結乾燥組成物であって、当該組成物は、さらなる還元剤又は抗酸化剤を含まず、該5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩の濃度が、30%w/wを超える、凍結乾燥組成物。 10

**【請求項2】**

5,10-メチレン(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、硫酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、水及び任意の浸透圧補正添加剤からなる、請求項1に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項3】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩と硫酸塩とのモル比が、約40~200モル%である請求項1に記載の凍結乾燥組成物。 20

**【請求項4】**

クエン酸塩を、200~400mol%含む、請求項1に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項5】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩の濃度が、35%w/wを超える又は例えば約40%w/wの5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩である安定な凍結乾燥物である、請求項1に記載の凍結乾燥組成物。

**【請求項6】**

純度98%以上の5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩を含む、請求項1に記載の凍結乾燥組成物。 30

**【請求項7】**

請求項1~6の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物を、水又は液状の薬学的に許容されるビヒクリに溶解することにより得られる再構成製品。

**【請求項8】**

水が、注射用滅菌水である、請求項7に記載の再構成製品。

**【請求項9】**

さらに薬学的に許容される担体を含む、請求項7に記載の再構成製品。

**【請求項10】**

さらに追加の薬学的に許容される有効成分を含む、請求項7に記載の再構成製品。

**【請求項11】**

さらに緩衝剤及び/又は1つ若しくは複数の浸透圧補正賦形剤を含む、請求項7に記載の再構成製品。 40

**【請求項12】**

癌の治療又は癌療法に使用するための、請求項7に記載の再構成製品。

**【請求項13】**

5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩、クエン酸塩及びアルカリ金属硫酸塩を含む、請求項1~6の何れか1項に記載の凍結乾燥組成物を調製する方法であって、この方法は、以下のステップを含み:

i . (6S) - テトラヒドロ葉酸を約pH11の水に溶解するステップ、

i i . 透明溶液のpHを8.6±0.5に調整するステップ、 50

i i i . 1 1 0 ~ 1 2 0 m o l % のホルムアルデヒドを添加するステップ、  
i v . 反応が完了するまで反応混合物を攪拌するステップ、  
v . 約 4 0 ~ 2 0 0 m o l % のアルカリ金属硫酸塩及び 1 0 0 ~ 4 0 0 m o l % のクエン酸塩を添加するステップ、  
v i . 反応混合物を濾過して透明溶液を得るステップ。  
i x . 得られた透明溶液を凍結乾燥するステップ、  
この方法は、さらなる還元剤又は酸化防止剤の添加するステップを含まず、該 5 , 1 0 - メチレン - ( 6 R ) - テトラヒドロ葉酸の二ナトリウム塩の濃度が、3 0 % w / w を超える。

**【請求項 1 4】**

アルカリ金属硫酸塩が、硫酸ナトリウムの形態で添加される、請求項 1 3 に記載の方法。

**【請求項 1 5】**

クエン酸塩が、クエン酸又はクエン酸ナトリウムとして添加される、請求項 1 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2023/064972
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/08 A61K9/19 A61K47/02 A61K31/519 A61P35/00 ADD.
--

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**A61K A61P**

10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPO-Internal**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RU 2 343 923 C2 (MERK EHPROVA AG [CH]) 20 January 2009 (2009-01-20)	1, 2, 7-9, 11, 12
Y	claim 1 and example 3, example 7, [0067], [0006] -----	1-15
X	US 10 570 134 B2 (MERCK & CIE [CH]) 25 February 2020 (2020-02-25)	1
Y	column 26, lines 23-36 and claim 14; column 34, lines 35-58 -----	1-15
Y	US 5 997 915 A (BAILEY STEVEN W [US] ET AL) 7 December 1999 (1999-12-07) Claim 2; column 14-15, lines 64-7; examples 3, 4, 7, 8, 9 -----	1-15
Y	CN 107 892 692 A (UNIV EAST CHINA SCIENCE & TECH) 10 April 2018 (2018-04-10) [0032]-[0035] -----	1-15
		-/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
<b>7 August 2023</b>	<b>16/08/2023</b>

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentielaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

**Erdmann, Mona**

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2023/064972
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2020 531415 A (MERCK PATENT GMBH) 5 November 2020 (2020-11-05) claims 1, 4 and example 2 in [0077] -----	1-15
Y	US 2009/221594 A1 (CHEN ANDREW X [US] ET AL) 3 September 2009 (2009-09-03) claim 6 and [0019]-[0022] -----	1-15
Y	US 5 300 505 A (MUELLER HANS R [CH] ET AL) 5 April 1994 (1994-04-05) claims 1, 4 and example 2 in [0077]); example 1 -----	1-15
Y	US 2022/024940 A1 (MOSER RUDOLF [CH] ET AL) 27 January 2022 (2022-01-27) [0019]-[0022]); paragraph [0062]; claims 1, 6 17 -----	1-15
		10
		20
		30
		40
1		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No PCT/EP2023/064972
---

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>RU 2343923</b>	<b>C2</b>	<b>20-01-2009</b>	AT 439842 T AU 2004248923 A1 CA 2529531 A1 CH 697021 A5 CH 698204 B1 CN 1842337 A EP 1641460 A2 ES 2334030 T3 JP 4755980 B2 JP 2009514776 A KR 20060082035 A MX PA05014232 A PT 1641460 E RU 2343923 C2 US 2007099866 A1 US 2016030573 A1 WO 2004112761 A2 ZA 200510349 B	15-09-2009 29-12-2004 29-12-2004 31-03-2008 15-06-2009 04-10-2006 05-04-2006 04-03-2010 24-08-2011 09-04-2009 14-07-2006 24-02-2006 28-12-2009 20-01-2009 03-05-2007 04-02-2016 29-12-2004 27-12-2007
<b>US 10570134</b>	<b>B2</b>	<b>25-02-2020</b>	US 2017233394 A1 US 2018134711 A1 US 2019270745 A1 US 2020283443 A1 US 2022143027 A1	17-08-2017 17-05-2018 05-09-2019 10-09-2020 12-05-2022
<b>US 5997915</b>	<b>A</b>	<b>07-12-1999</b>	AT 262799 T AU 722050 B2 CA 2243981 A1 CN 1209729 A DE 69728379 T2 DK 0877563 T3 EP 0877563 A1 ES 2218662 T3 JP 3602141 B2 JP 2000505286 A PT 877563 E US 5997915 A US 6254904 B1 US 2001046533 A1 US 2002150653 A1 US 2002176912 A1 US 2004219262 A1 US 2007207136 A1 WO 9727764 A1	15-04-2004 20-07-2000 07-08-1997 03-03-1999 24-02-2005 26-07-2004 18-11-1998 16-11-2004 15-12-2004 09-05-2000 31-08-2004 07-12-1999 03-07-2001 29-11-2001 17-10-2002 28-11-2002 04-11-2004 06-09-2007 07-08-1997
<b>CN 107892692</b>	<b>A</b>	<b>10-04-2018</b>	<b>NONE</b>	
<b>JP 2020531415</b>	<b>A</b>	<b>05-11-2020</b>	AU 2018317789 A1 CA 3073127 A1 CN 110996958 A DK 3668516 T3 EP 3668516 A1 ES 2902051 T3 JP 7232815 B2 JP 2020531415 A KR 20200041354 A PT 3668516 T US 2020368236 A1	02-04-2020 21-02-2019 10-04-2020 13-12-2021 24-06-2020 24-03-2022 03-03-2023 05-11-2020 21-04-2020 23-12-2021 26-11-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

page 1 of 3

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2023/064972
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
		<b>WO 2019034673 A1</b>		<b>21-02-2019</b>
<b>US 2009221594 A1</b>	<b>03-09-2009</b>	AU 2006320388 A1		07-06-2007
		CA 2631755 A1		07-06-2007
		CN 101321518 A		10-12-2008
		EP 1968551 A2		17-09-2008
		JP 2009518305 A		07-05-2009
		KR 20080074201 A		12-08-2008
		TW 200727903 A		01-08-2007
		US 2009221594 A1		03-09-2009
		WO 2007064968 A2		07-06-2007
<b>US 5300505 A</b>	<b>05-04-1994</b>	AT 122675 T		15-06-1995
		CA 2078939 A1		16-04-1993
		CH 682664 A5		29-10-1993
		DK 0537492 T3		17-07-1995
		EP 0537492 A2		21-04-1993
		ES 2073222 T3		01-08-1995
		JP H0742288 B2		10-05-1995
		JP E05294968 A		09-11-1993
		US 5300505 A		05-04-1994
<b>US 2022024940 A1</b>	<b>27-01-2022</b>	AU 2014307872 A1		24-03-2016
		AU 2018278943 A1		17-01-2019
		BR 112016002770 A2		01-08-2017
		BR 122020002802 B1		29-11-2022
		CA 2921178 A1		19-02-2015
		CN 105452250 A		30-03-2016
		CN 108096200 A		01-06-2018
		CY 1119694 T1		04-04-2018
		DK 3033344 T3		18-12-2017
		DK 3287460 T3		03-05-2021
		EA 201600172 A1		29-07-2016
		EA 201892729 A1		30-04-2019
		EA 202091271 A2		30-09-2020
		EP 2837631 A1		18-02-2015
		EP 3033344 A1		22-06-2016
		EP 3287460 A1		28-02-2018
		ES 2654474 T3		13-02-2018
		ES 2871483 T3		29-10-2021
		HK 1217018 A1		16-12-2016
		HK 1256262 A1		20-09-2019
		HR P20171895 T1		26-01-2018
		HR P20210743 T1		25-06-2021
		HU E037615 T2		28-09-2018
		HU E054504 T2		28-09-2021
		IL 269170 A		28-11-2019
		JP 6617104 B2		04-12-2019
		JP 6735321 B2		05-08-2020
		JP 6764501 B2		30-09-2020
		JP 2016528242 A		15-09-2016
		JP 2018203763 A		27-12-2018
		JP 2019131579 A		08-08-2019
		JP 2020128410 A		27-08-2020
		JP 2022024035 A		08-02-2022
		KR 20160043054 A		20-04-2016
		KR 20210038995 A		08-04-2021
		LT 3033344 T		27-12-2017

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/064972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		LT 3287460 T	26-07-2021
		MX 360355 B	30-10-2018
		NO 3033344 T3	24-02-2018
		NZ 717825 A	29-11-2019
		NZ 745811 A	29-05-2020
		PL 3033344 T3	28-02-2018
		PL 3287460 T3	19-07-2021
		PT 3033344 T	03-01-2018
		PT 3287460 T	27-05-2021
		SG 10201801179V A	28-03-2018
		SG 11201601016P A	30-03-2016
		SI 3033344 T1	31-01-2018
		SI 3287460 T1	31-08-2021
		US 2016185787 A1	30-06-2016
		US 2019106431 A1	11-04-2019
		US 2022024940 A1	27-01-2022
		WO 2015022407 A1	19-02-2015
		ZA 201509204 B	26-04-2017

10

20

30

40

## フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード(参考)

A 6 1 K    45/00 (2006.01)	A 6 1 K    45/00
A 6 1 P    35/00 (2006.01)	A 6 1 P    35/00

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,  
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C  
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I  
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW  
,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL  
,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100127454

弁理士 緒方 雅昭

(72)発明者 モーザー、ルドルフ

スイス国 6 4 6 0 アルトドルフ /ウリ ヴァイスハウスマティ (番地なし) メルク アンド シ  
ー カーエムゲー内

(72)発明者 グレーン、ヴィオーラ

スイス国 6 4 6 0 アルトドルフ /ウリ ヴァイスハウスマティ (番地なし) メルク アンド シ  
ー カーエムゲー内

(72)発明者 アムマン、トーマス

スイス国 6 4 6 0 アルトドルフ /ウリ ヴァイスハウスマティ (番地なし) メルク アンド シ  
ー カーエムゲー内

(72)発明者 クナップ、ジーン - ピエール

スイス国 6 4 6 0 アルトドルフ /ウリ ヴァイスハウスマティ (番地なし) メルク アンド シ  
ー カーエムゲー内

(72)発明者 スヴァエルド、マリアン

スウェーデン国 4 1 3 4 6 イエーテボリ アルヴィド ヴァルグレンス バッケ 2 0 ビオテク  
センター イソフォル メディカル アーベー内

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA29 BB11 CC27 DD24 DD43 FF63 GG07

4C084 AA19 MA17 MA66 NA03 NA05 ZB261 ZB262

4C086 AA01 AA02 CB09 MA03 MA05 MA17 MA44 MA66 NA03 ZB26