

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 938**

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/EP2019/067694**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2020** **WO20007836**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2019** **E 19737495 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023** **EP 3817812**

54 Título: **Sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina**

30 Prioridad:

06.07.2018 EP 18182278

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 2 966 938 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

Sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

La presente invención se refiere a una sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ácido N-[4-[[[(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-5-metil-4-oxo-(6S)-pteridinil)metil]amino]benzoil]-L-glutámico) y éster etílico de L-isoleucina y un proceso de obtención de la misma.

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 del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina es de 1:0,3 a 1:2,0 (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-isoleucina 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-isoleucina es que puede lograrse una alta pureza química y óptica del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en una única etapa de cristalización. Por lo tanto, a partir de bencenosulfonato del ácido tetrahidrofólico que muestra una pureza diastereoisomérica del 95 %, se puede terminar con una cristalización única de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina con una pureza diastereoisomérica superior al 99 %. Por otro lado, cuando se cristaliza una sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es necesario utilizar material de partida con una pureza diastereoisomérica de al menos el 97,0 % para terminar con un producto final que muestre una pureza diastereoisomérica superior al 99 %.
- Típicamente, la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina tiene una relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina de 1:0,3 a 1:2,0 (en mol/mol).
- Preferiblemente, la sal cristalina tiene una relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina de 1:0,5 a 1:1,5 (en mol/mol).
- Incluso más preferiblemente, la sal cristalina tiene a relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina de 1:0,75 a 1:1,5 (en mol/mol).
- En una realización preferida adicional, la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina es de 1:0,75 a 1:1,25 (en mol/mol).
- Más preferiblemente, la relación entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina es de aproximadamente 1:1 (en mol/mol).
- Preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,8; 6,9; 14,0; 17,5 y 22,2, denominada a partir de ahora en este documento (forma A).
- Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de PXRD con al menos tres picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación CuK α]) seleccionados a partir de los siguientes picos localizados a 5,8; 6,9; 14,0; 17,5 y 22,2 (forma A). Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de PXRD con picos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación CuK α]) a 5,8; 6,9; 14,0; 17,5 y 22,2 (forma A).
- Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,8; 6,9; 8,5; 12,5; 12,9; 14,0; 14,9; 16,2; 17,5; 17,9; 18,9; 19,2; 22,2; 24,4; 25,4; 25,8; 25,9 y 34,6 (forma A).
- Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de PXRD sustancialmente como se muestra en la figura 1 (forma A).
- La sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina puede caracterizarse alternativamente mediante espectroscopia Raman y, por lo tanto, preferiblemente la sal es una sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un espectro Raman con al menos un pico característico (expresado en números de onda, $\text{cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) seleccionado a partir de los picos siguientes localizados a 1607, 1571, 1506, 1250 y 650 (forma A).
- Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un espectro Raman con al menos tres picos característicos (expresados en números de onda, $\text{cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) seleccionados a partir de los siguientes picos localizados a 1607, 1571, 1506, 1250 y 650 (forma A). Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina con un espectro Raman con picos (expresados en números de onda, $\text{cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) a 1607, 1571, 1506, 1250 y 650 (forma A).
- Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina que tiene un espectro Raman con al menos un pico característico (expresado en números de onda, $\text{cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 2961, 2938, 1607, 1571, 1506, 1468, 1332, 1250, 1153, 922, 860 y 650 (forma A).

Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina y tiene un espectro Raman sustancialmente como se muestra en la figura 4 (forma A).

Un aspecto adicional de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina que 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 5,3; 7,0; 14,0; 17,7 y 24,5, denominada a partir de ahora en este documento forma B.

Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina 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 a 5,3; 7,0; 14,0; 17,7 y 24,5 (forma B). Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina y tiene un patrón de PXRD con picos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) a 5,3; 7,0; 14,0; 17,7 y 24,5 (forma B).

Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina que 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 5,3; 7,0; 8,4; 13,0; 13,2; 14,0; 14,7; 15,9; 17,4; 17,7; 18,1; 18,7; 20,7; 21,2; 22,9; 24,5 y 25,4 (forma B).

Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina y tiene un patrón de PXRD sustancialmente como se muestra en la figura 2 (forma B).

Mientras que la forma A es adecuada para formulaciones de comprimidos, la forma B es estable en entornos acuosos y, por tanto, más adecuada para formulaciones de pomadas, suspensiones o cremas que muestran una alta actividad de agua.

Un aspecto adicional de la presente invención es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina que 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 7,0; 8,8; 14,0; 17,6; 20,2; 23,4 y 26,9, denominada a partir de ahora en este documento forma C.

Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina 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 a 7,0; 8,8; 14,0; 17,6; 20,2; 23,4 y 26,9 (forma C). Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina y tiene un patrón de PXRD con picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) a 7,0; 8,8; 14,0; 17,6; 20,2; 23,4 y 26,9 (forma C).

Incluso más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina que 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 5,3; 7,0; 8,8; 11,2; 13,0; 14,0; 15,1; 15,9; 16,8; 17,4; 17,6; 20,2; 20,5; 20,8; 21,2; 21,4; 23,4; 24,5; 26,9 y 32,2 (forma C).

Más preferiblemente, la sal es la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina y tiene un patrón de PXRD sustancialmente como se muestra en la figura 3 (forma C).

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

Supone también una ventaja contar con una forma que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con un contenido en agua muy bajo y, especialmente, una baja tendencia a la absorción/desorción de agua, por ejemplo, cuando se manipula la sustancia para su formulación en un entorno de temperatura/humedad controlada o en países tropicales, donde generalmente la humedad relativa es muy alta. La sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina muestra, en general, un contenido de agua inferior al 1 % mientras que la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, en general, tiene un contenido de agua superior al 10 %. Los resultados se ilustran visualmente en el ejemplo 9 representado en la figura 5.

Adicionalmente, además del muy bajo contenido de agua de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina, esta sal también muestra sorprendentemente una tendencia especialmente baja a absorber/desorber agua en un amplio rango de humedad. Por tanto, cuando comparamos el contenido de agua de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina (forma A) con el contenido de agua de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a lo largo del rango más relevante de humedad relativa del 20 al 75 % de h.r., el contenido de agua de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina (forma A) cambia menos del 0,8 %. Por el contrario, el contenido de agua de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico según la técnica cambia más del 6 %. Los resultados se ilustran visualmente en el ejemplo 9 representado en la figura 5. Este resultado es muy sorprendente para un experto en la materia y no podría preverse teniendo en cuenta las explicaciones del documento US 6 441 168 B1.

Además, las formas de la presente invención resuelven claramente el problema técnico que subyace a la presente invención.

Adicionalmente, la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina muestra una estabilidad mucho mejor que la sal de calcio conocida previamente. Así, la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina sigue mostrando un contenido relativo de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (medido según el contenido inicial del material de partida) superior al 98 % p/p cuando se conserva durante 12 meses a 25 °C/60 % de h.r., mientras que el contenido relativo de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico disminuye por debajo del 98 % p/p incluso antes de alcanzar los 9 meses. Los resultados se ilustran visualmente en el ejemplo 10 (tabla 4b) representado en la figura 6. En paralelo, el contenido del producto principal de degradación pirazino-s-triazina derivado de 4 α -hidroxi-5-metil-THF [MeFox] está a un nivel por debajo del 0,05 % cuando se conserva más de 12 meses a 25 °C/60 % de h.r., mientras que el contenido de MeFox de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico aumenta a más del 0,6 % incluso antes de alcanzar los 9 meses. Los resultados se ilustran visualmente en el ejemplo 10, (tabla 5) representado en la figura 7.

La sorprendentemente alta estabilidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina se acentúa incluso más específicamente cuando se comparan los valores de estabilidad a 40 °C/75 % de h.r. Incluso en estas condiciones elevadas, la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina sigue mostrando un contenido relativo de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (medido según el contenido inicial del material de partida) superior al 99 % cuando se conserva durante 12 meses, mientras que el contenido relativo de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico disminuye por debajo del 99 % incluso antes de alcanzar los 9 meses cuando se conserva en las mismas condiciones. Los resultados se ilustran visualmente en el ejemplo 10 (tabla 6b) representado en la figura 8. En paralelo, el contenido del producto principal de degradación pirazino-s-triazina derivado de 4 α -hidroxi-5-metil-THF [MeFox] está justo a un nivel del 0,06 % cuando se conserva más de 12 meses a 25 °C/60 % de h.r. mientras que el contenido de MeFox de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico aumenta a más del 0,6 % incluso antes de alcanzar los 9 meses. Los resultados se ilustran visualmente en el ejemplo 10, (tabla 7) representado en la figura 9.

Por tanto, la forma de la presente invención muestra una estabilidad durante el almacenamiento mejorada incluso en estas condiciones. Estas propiedades mejoradas no podían inferirse a partir de las explicaciones del documento US 6 441 168 B1.

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

- i) preparar una mezcla de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua y añadir éster etílico de L-isoleucina, opcionalmente en un solvente adecuado o una mezcla de solventes;
- ii) añadir una base, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuados para conseguir la disolución;
- iii) calentar la composición hasta al menos a 60 °C;
- iv) añadir un ácido adecuado para ajustar el pH al intervalo de 4 a 7;
- v) cristalizar y enfriar la mezcla a una temperatura entre de 1 y 30 °C, agitar opcionalmente la suspensión obtenida a la temperatura final; y
- vi) aislar el material sólido obtenido y, opcionalmente, secar el producto.

La sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina puede obtenerse sorprendentemente según el proceso descrito altamente eficiente y con una alta pureza química, estereoisomérica y cristalina, incluso cuando se prepara a partir del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con una pureza óptica del 95,0 %, que se forma *in situ* a partir de bencenosulfonato de ácido (6S)-tetrahidrofólico con una pureza óptica de tan solo el 95,0 % de ácido (6S)-tetrahidrofólico. Por tanto, cuando se parte de una pureza óptica del bencenosulfonato del ácido (6S)-tetrahidrofólico del 95,0 %, se termina con una pureza óptica de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina superior al 99 %. En general, la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina según el proceso descrito tiene una pureza óptica de más del 99 %, preferiblemente de más del 99,5 %, y una pureza química de más del 98 %, preferiblemente de más del 99 %, incluso más preferiblemente, más del 99,5 %.

Preferiblemente en la etapa i) la mezcla de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua se prepara *in situ* a partir de ácido bencenosulfónico del ácido (6S)-tetrahidrofólico (preparado según el documento EP 0 495 204 B1) que se somete a metilación reductora utilizando formaldehído y borohidruro de sodio en una atmósfera inerte.

Preferiblemente en la etapa i) se añade éster etílico de L-isoleucina en forma de su sal clorhidrato.

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

Preferiblemente, en la etapa ii) la base utilizada para permitir la disolución del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es un hidróxido de metal alcalino. Más preferiblemente, en la etapa ii) la base es NaOH, KOH y/o sus mezclas. Más preferiblemente en la etapa ii) la base es una solución acuosa de hidróxido sódico.

Incluso más preferiblemente, en la etapa ii) o la etapa iii) el pH tras la adición de la base está en el rango de 6,5 a 9,0.

Más preferiblemente, el solvente utilizado en la etapa i) y/o en la etapa ii) es agua.

Opcionalmente, en la etapa iii) se añade carbón y, a continuación, la solución se aclara mediante filtración.

Preferiblemente, en la etapa iv) se usa ácido clorhídrico acuoso como ácido adecuado.

- 5 Más preferiblemente, en la etapa iv) el valor de pH alcanzado mediante la adición del ácido se establece en un rango de 4,4 a 6,4. Más preferiblemente, en la etapa iv) el pH está en el rango de 5,4 a 6 tras la adición del ácido.

En las etapas iii), iv) y/o v) pueden añadirse cristales semilla, siendo incluso más preferibles cristales semilla de la forma deseada.

- 10 Un aspecto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica, aditivo alimentario y/o preparación que comprende la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y, opcionalmente, uno o más excipientes aceptables.

La sal cristalina de 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina puede usarse como constituyente para la producción de fármacos y/o como aditivo alimentario.

- 15 La sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina puede usarse en el tratamiento de la anemia, defectos del tubo neural, enfermedades cardiovasculares, depresión, enfermedad de Alzheimer y osteoporosis y/o tratamiento dietético de niveles bajos de folato en plasma y/o en eritrocitos (alimento medicinal).

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden aplicarse a todos los modos de administración, preferiblemente para administración por vía oral, parenteral, intramuscular, intraespinal, intratecal, periodontal, tópica o rectal.

- 20 En resumen, el perfil de propiedades ofrecido por la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina de la presente invención es ventajoso para su uso en medicamentos o como aditivo alimentario. Especialmente, un experto no podría prever la estabilidad potenciada, el bajo cambio en el contenido de agua en un entorno del 20 al 75 % de humedad relativa y el aumento de la purificación óptica cuando se cristaliza la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina.

25

Ejemplos

Difracción de rayos X en polvo

- 30 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.

TG-FTIR

- 35 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).

DVS

- 40 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).

Espectroscopia Raman

- 45 El espectro FT-Raman se registró en un sistema FT-Raman MultiRAM o RFS 100 de Bruker con láser de Nd:YAG de infrarrojo cercano que funciona a 1064 nm y un detector de germanio enfriado con nitrógeno líquido. Se acumularon 64 barridos con una resolución de 2 cm⁻¹ en el intervalo de 3500 a -50 cm⁻¹; no obstante, solo se evaluaron los datos de

aproximadamente 100 cm⁻¹ debido a los efectos del límite de exclusión del filtro. Normalmente, las potencias de láser nominales son de 100 o 300 mW.

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

- 5 Se calentó una suspensión de 2,00 gramos de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo: 95,6 % p/p) en 20,0 ml de agua a 70 °C y se añadieron 2,13 gramos de clorhidrato del éster etílico de L-isoileucina. La temperatura de la suspensión era de 65 °C y se añadió hidróxido sódico en forma de solución acuosa concentrada al 30 % (p/p). En total, se añadieron 0,95 g de la solución de hidróxido sódico al 30 %. La adición de hidróxido sódico llevó a una solución esencialmente transparente que se convirtió gradualmente en una suspensión concentrada. La suspensión se diluyó con 20,0 ml de agua y se apagó el calefactor para permitir que la mezcla se enfriara hasta temperatura ambiente durante aproximadamente dos horas. El reactor con la suspensión se enfrió adicionalmente en un baño de agua con hielo hasta aproximadamente 10 °C durante media hora y, a continuación, se filtró con un filtro de vidrio sinterizado y se lavó con cinco ml de agua fría. El producto sólido se secó en un secador al vacío a 35 °C durante aproximadamente 20 horas, se examinó mediante difracción de rayos X en polvo y se identificó como la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoileucina. En la figura 1 se muestra el patrón de rayos X en polvo de la forma A que muestra picos a los ángulos 2- θ según se recoge en la tabla 1. El análisis por HPLC mostró que la pureza es del 98,65 % del área.

Tabla 1: Ángulos 2- θ , distancias interplanares e intensidades cualitativas para la forma A. 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
5,8	15,34	m
6,9	12,81	mf
8,5	10,39	d
10,7	8,27	d
11,6	7,64	d
12,5	7,05	m
12,9	6,88	m
14,0	6,34	mf
14,9	5,96	m
15,3	5,80	d
15,8	5,62	d
16,2	5,47	d
17,5	5,07	f
17,9	4,94	m
18,4	4,81	d
18,9	4,69	m
19,2	4,62	m
19,5	4,54	d
19,9	4,45	d
21,0	4,23	d
21,5	4,14	md
22,2	4,01	m
22,5	3,95	d
22,7	3,91	d
23,2	3,83	d
23,9	3,72	d
24,1	3,68	d
24,4	3,65	m
24,7	3,60	d

Ángulo °2θ	Distancia interplanar [Å]	Intensidad cualitativa
25,1	3,55	d
25,4	3,51	m
25,8	3,45	m
26,9	3,31	md
27,7	3,22	d
28,2	3,16	d
28,5	3,13	d
28,9	3,09	md
29,2	3,06	d
29,7	3,01	md
29,9	2,98	d
30,5	2,93	md

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

5 A 15 g de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo: 95,4 % p/p, diastereoisómero 6S: 97,74 %) se añadieron 225 g de agua bajo atmósfera de nitrógeno. El pH se ajustó a 6,5 mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido sódico (30 % p/p). La mezcla se calentó a 66 °C y se añadió más solución acuosa de hidróxido sódico (30 % p/p) para mantener el pH a 6,5. Se añadió una solución de 15,2 g de clorhidrato de éster etílico de L-isoleucina en 75 g de agua a 66 °C. Tras la adición de semillas de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 66 °C, la mezcla se agitó durante 16 horas a 66 °C. La mezcla se enfrió hasta 1 °C al tiempo que el pH se ajustaba a 5,7 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 1 molar. Tras agitar durante 1 hora a 1 °C, el material cristalino se aisló mediante filtración por succión y se lavó con 44 g de agua que se había enfriado previamente a 1 °C. El material se secó a 36 °C al vacío durante 22 horas para obtener 14,6 g de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico L-isoleucina que se correspondía con un rendimiento teórico del 75 % (ensayo corregido). Datos analíticos del producto aislado: pureza: 98,9 % del área, ensayo: 73,95 % p/p de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico que se corresponde con la sal 1:1, pérdida durante el secado (agua residual): 1,2 % p/p, diastereoisómero (6S): 99,8 %. El análisis mediante TG-FTIR mostró que el producto sólido obtenido estaba esencialmente libre de agua ya que la masa perdida a 150 °C no era superior al 0,2 %. El análisis espectroscópico mediante RMN-H muestra que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina es de aproximadamente 1:1. El patrón de difracción de rayos X en polvo según se muestra en la figura 1 se corresponde con la forma A.

20 Ejemplo 3: Preparación de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

Se disolvieron 1,92 g de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (4 mmol) en 8,0 ml de NaOH 1 N. La solución se calentó a 80 °C. Se disolvieron 1,28 g de clorhidrato del éster etílico de L-isoleucina (~6,5 mmol) en 6,0 ml de agua y se añadieron a la solución del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico. La solución se enfrió a 60 °C en aproximadamente 15 minutos y se sembró con aproximadamente 10 a 20 mg de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina obtenida según el ejemplo 1. Una comprobación del pH mostró, típicamente, un pH de 7; a continuación se añadieron gota a gota 2,0 ml de HCl 1 N. Se formó una suspensión y la mezcla se enfrió hasta 5 °C a una velocidad de 15 grados C por hora. Después de aproximadamente 30 minutos de agitación a 5 °C, la suspensión se filtró y el producto sólido se secó durante 24 horas al vacío a 40 °C. La difracción de rayos X en polvo de la muestra mostró que se había obtenido la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina.

30 Ejemplo 4: Preparación de la forma B de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

A una mezcla de 6,0 ml de agua y 452 mg de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina se añadieron 6,0 ml de una solución 0,5 M de clorhidrato del éster etílico de L-isoleucina en agua y 2,0 ml de etanol a TA. El pH se ajustó a un pH de entre 6 y 7 mediante la adición de 0,250 ml de NaOH 1 N y, a continuación, la mezcla se calentó hasta 75 °C. La temperatura de la suspensión ligeramente amarilla se mantuvo a 75 °C durante 30 minutos. A continuación, se dejó que la mezcla se enfriara hasta 25 °C durante aproximadamente tres horas. La agitación a 25 °C se mantuvo durante aproximadamente 4 horas y se recuperó mediante filtración por centrifugación una muestra sólida que se denominó PP555-P40a, la cual se examinó mediante PXRD sin secar. El producto sólido se identificó como la forma B de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina.

Tabla 2: Ángulos 2-zeta, distancias interplanares e intensidades cualitativas para la forma B. 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
5,3	16,6	m
7,0	12,6	mf
8,4	10,5	m
10,3	8,6	d
13,0	6,8	m
13,2	6,7	m
14,0	6,3	mf
14,5	6,1	d
14,7	6,0	f
15,3	5,80	d
15,9	5,56	m
16,5	5,36	d
16,9	5,24	d
17,4	5,09	m
17,7	5,00	f
18,1	4,91	f
18,7	4,75	m
19,9	4,46	d
20,2	4,40	d
20,5	4,34	d
20,7	4,28	m
21,2	4,19	f
21,7	4,09	d
22,3	3,98	m
22,9	3,88	m
23,2	3,84	d
23,3	3,81	d
23,7	3,75	d
24,0	3,70	d
24,5	3,64	f
24,9	3,57	m
25,4	3,51	m
25,8	3,46	m
26,2	3,40	d
26,7	3,34	d
27,2	3,28	d
27,4	3,25	d
27,9	3,20	d
28,1	3,17	d
28,9	3,08	d
29,3	3,04	d
29,7	3,01	d

5

A 81 mg de sal amorfa de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina, obtenida mediante liofilización de una solución en agua-dioxano 4:1, se añadió 1,0 ml de una mezcla de etanol-agua 2:1 (relación de volumen) y la mezcla se agitó a TA durante dos días. A continuación, la suspensión se filtró y el sólido se sometió a difracción de rayos X en polvo. La difracción de rayos X en polvo mostró que se obtenía una forma cristalina que se denominó forma C. El análisis espectroscópico mediante RMN-¹H mostró que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina era de aproximadamente 2,8:1.

Tabla 3: Ángulos 2-zeta, distancias interplanares e intensidades cualitativas para la forma C. 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
5,3	16,6	m
7,0	12,6	mf
8,4	10,5	m
8,8	10,1	f
10,3	8,6	f
10,7	8,3	d
11,2	7,9	f
12,2	7,2	m
13,0	6,8	f
13,3	6,7	m
13,6	6,5	m
14,0	6,3	f
14,7	6,00	m
15,1	5,88	f
15,9	5,57	f
16,8	5,28	f
17,4	5,10	f
17,6	5,02	mf
18,1	4,91	m
18,7	4,75	m
19,0	4,68	d
19,5	4,54	m
20,2	4,39	mf
20,5	4,34	m
20,8	4,27	f
21,2	4,19	m
21,4	4,14	f
22,3	3,98	m
22,6	3,94	m
22,9	3,87	m
23,4	3,80	mf
23,7	3,74	d
24,1	3,69	d
24,5	3,63	f
25,0	3,56	m
25,4	3,51	m
25,8	3,45	m
26,2	3,40	m

Ángulo °2θ	Distancia interplanar [Å]	Intensidad cualitativa
26,7	3,34	m
26,9	3,31	f
27,3	3,26	m
28,0	3,18	d
28,5	3,13	d
29,0	3,08	d
29,2	3,05	m
30,4	2,93	d
30,9	2,90	m

Ejemplo 6: Preparación de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a partir del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico formado *in situ* a partir del bencenosulfonato de ácido (6S)-tetrahidrofólico

5 A una mezcla de 20 g de bencenosulfonato de ácido (6S)-tetrahidrofólico (preparado según el documento EP 0 495 204, ácido tetrahidrofólico del ensayo: 72,2 % p/p, diastereoisómero (6S): 95,9 %) y 50 g de agua, se añadieron 9,9 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico (hidróxido sódico al 30 % p/p) a 20-30 °C en agitación. A continuación, se añadieron 0,83 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico 1 molar y la mezcla se enfrió hasta 0-5 °C. A esa temperatura de 0-5 °C, se añadieron 3,13 ml de una solución acuosa de formaldehído (concentración: 36,9 % p/p) y, tras la agitación durante 1 hora, se añadieron 0,31 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico (hidróxido sódico al 30 % p/p) seguido de una
10 mezcla de 14 g de agua, 1,7 g de una solución acuosa de hidróxido sódico (hidróxido sódico al 30 %) y 3,07 g de borohidruro sódico. La mezcla se calentó a aproximadamente 63 °C y se agitó durante 90 minutos. Tras enfriar hasta temperatura ambiente se añadieron 7,9 ml de ácido clorhídrico acuoso (37 % p/p) seguido de la adición de 4,1 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico (hidróxido sódico al 30 % p/p). Se añadió una pequeña cantidad de tetraborato de sodio y la mezcla se enfrió hasta 0-5 °C y se agitó durante aproximadamente 22 horas. Los sólidos se eliminaron mediante
15 filtración (succión) y se lavaron con 5 g de agua. Al filtrado se añadió una mezcla de 15,86 g de clorhidrato de éster etílico de L-isoleucina y 30 g de agua a temperatura ambiente en agitación. La mezcla se calentó hasta aproximadamente 66 °C y se añadió como semilla una pequeña cantidad de forma A de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina. A aproximadamente 66 °C, se añadieron 27,1 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 molar y se formó una suspensión. Durante aproximadamente 90 minutos, la mezcla se enfrió hasta aproximadamente
20 20 °C mientras se añadían otros 33,2 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 molar. El producto cristalizado se aisló mediante filtración (succión) y se lavó con 84 ml de agua que previamente se había enfriado en un baño con hielo. El producto se secó durante aproximadamente 60 horas a temperatura ambiente y al vacío (10 mbar) para obtener 17,2 gramos de la forma A de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico del ensayo: 74,0 % p/p, pureza: 98,6 % del área, diastereoisómero (6S): 99,5 %) que se
25 corresponde con un rendimiento corregido del ensayo del 88,1 %.

Ejemplo 7: Preparación de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

A 1670 g de agua se añadieron 250 g de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo: 96,2 % p/p) y 256,1 g de clorhidrato del éster etílico de L-isoleucina a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron 500 g de agua y el pH se ajustó a pH = 7,3 mediante la adición de 134,6 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico (30 % p/p de hidróxido sódico). La
30 mezcla se calentó hasta aproximadamente 66 °C con agitación y se añadió como semilla una pequeña cantidad de forma A de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de y L-isoleucina. A 66 °C se añadieron 385 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 molar durante aproximadamente 30 minutos. Durante aproximadamente 90 minutos, la mezcla se enfrió hasta aproximadamente 20 °C mientras se añadían otros 365 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 molar. El producto cristalizado se aisló mediante filtración (succión) y se lavó con 733 g de agua que
35 previamente se había enfriado en un baño con hielo. El producto se secó durante aproximadamente 60 horas a aproximadamente 40 °C al vacío (10 mbar) para obtener 300,8 gramos de la forma A de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico del ensayo: 74,3 % p/p, pureza: 98,7 % del área) que se corresponde con un rendimiento químico corregido del ensayo del 92,9 %.

Ejemplo 8: Preparación de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

40 A 250,5 kg de agua en un recipiente de reacción se añadieron 31,0 kg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo: 96,8 % p/p, diastereoisómero 6S: 98,3 %) y 32,0 kg de clorhidrato del éster etílico de L-isoleucina a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron 16,5 kg de agua y el pH se ajustó a pH = 7,3 mediante la adición de 18,6 kg de una solución acuosa de hidróxido sódico (30 % p/p de hidróxido sódico). La mezcla se calentó hasta aproximadamente 66 °C con agitación y los sólidos se eliminaron mediante filtración. El filtro se lavó con 20,3 kg de agua a través del recipiente de
45 reacción. El filtrado y el lavado se mezclaron en un recipiente de cristalización y se calentaron hasta aproximadamente

65 °C. Se añadieron como semilla 37,5 gramos de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina. Se añadieron 64,5 kg de ácido clorhídrico acuoso 1 M a aproximadamente 65 °C durante 30 minutos. La mezcla se enfrió hasta 20 °C durante 90 minutos y el pH se ajustó a pH = 5,4 mediante la adición de 1,5 kg de ácido clorhídrico acuoso 1 M. La mezcla se agitó durante 1 h a aproximadamente 20 °C y el producto cristalizado se aisló mediante centrifugación. El producto se lavó con 45 kg de agua que previamente se había enfriado hasta aproximadamente 3 °C. A continuación, el producto se secó durante 17 horas a 50 °C al vacío para obtener 23,63 kg de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (ácido 5-metil-tetrahidrofólico del ensayo: 77,2 % p/p, diastereoisómero 6S: 99,5 %) que se corresponde con un rendimiento corregido del ensayo del 60,8 %. El rendimiento de este ejemplo no es representativo, ya que parte del producto cristalizado se perdió durante la centrifugación debido a un defecto técnico.

Ejemplo 9: Higroscopicidad y contenido de agua (experimentos de DVS)

Se determinó el contenido de agua de una muestra de sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y se encontró que era del 12,4 %. El análisis mediante TG-FTIR de una muestra de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina preparada según el ejemplo 1 o 2 mostró que la muestra estaba esencialmente libre de agua.

Una muestra de sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y otra muestra de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina preparada según el ejemplo 1 o 2 (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 con un sistema SPS11-100n «Sorptions Prüfsystem» de ProUmid (anteriormente «Projekt Messtechnik»), August-Nagel-Str. 23, 89079 Ulm (Alemania). Las medidas se realizaron del siguiente modo: la muestra se colocó en un soporte de aluminio o platino sobre una microbalanza y se dejó equilibrar a una h.r. del 50 % antes de iniciar los programas de humedad predefinidos:

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

La comparación del resultado de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico L-isoleucina con el resultado de la sal de calcio muestra que el contenido de agua de la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina cambia menos del 0,8 % dentro del intervalo probado mientras que el contenido de agua de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico cambia más del 6 %. Los resultados se ilustran visualmente en la figura 5.

Ejemplo 10: Estabilidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

Para comparar las estabilidades a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (los compuestos de la invención) con la estabilidad a largo plazo de la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico preparado según el documento EP 1 044 975 B1, se generaron los correspondientes datos de estabilidad a distintas temperaturas y humedades.

(a) Estabilidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 25 °C/60 % de h.r.

La sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, preparada según los procedimientos de la bibliografía (documento EP 1 044 975 B1) y la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina se conservaron a 25 °C/60 % de h.r. El contenido de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico restante en las muestras se midió mediante HPLC a intervalos periódicos. Los resultados se muestran en la tabla 4a y en la figura 6. El contenido de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico restante también se comparó con el valor inicial en el momento de la preparación (% rel.). Los resultados se muestran en la tabla 4b. Adicionalmente, el contenido del derivado pirazino-s-triazina de 4 α -hidroxi-5-metil-THF (MeFox), un producto de degradación principal, se midió mediante HPLC a intervalos periódicos y se presentó como valores absolutos (% p/p). Los resultados se muestran en la tabla 5 y en la figura 7.

Tabla 4a: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 25 °C/60 % de h.r. (% p/p)

	Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% p/p)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y	75,1	72,8	73,8	74,3	74,1

éster etílico de L- isoleucina					
Sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)- tetrahidrofólico	82,4	82,5	80,8	80,6	n/p

Tabla 4b: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 25 °C/60 % de h.r. (% rel.)

	Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% rel.)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina	100,0	97,0	98,3	98,9	98,7
Sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	100,0	100,1	98,1	97,9	n/p

5 Tabla 5: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 25 °C/60 % de h.r. (producto de degradación principal [MeFox])

	Derivado pirazino-s-triazina de 4 α -hidroxi-5-metil-THF (MeFox) (% p/p)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina	0,01	0,03	0,02	0,03	0,03
Sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	0,20	0,59	0,71	0,68	n/p

(b) Estabilidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 40 °C/75 % de h.r.

- 10 La sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, preparada según los procedimientos de la bibliografía (documento EP 1 044 975 B1) y la forma A de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina se conservaron a 40 °C/75 % de h.r. El contenido de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico restante en la muestra se midió mediante HPLC a intervalos periódicos. Los resultados se muestran en la tabla 6a y en la figura 8. El contenido de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico restante también se comparó con el valor inicial en el momento de la preparación (% rel.). Los resultados se muestran en la tabla 6b. Adicionalmente, el contenido del derivado pirazino-s-triazina de 4 α -hidroxi-5-metil-THF (MeFox), un producto de degradación principal, se midió mediante HPLC a intervalos periódicos y se presentó como valores absolutos (% p/p). Los resultados se muestran en la tabla 7 y en la figura 9.
- 15

Tabla 6a: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 40 °C/75 % de h.r. (% p/p)

	Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% p/p)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina	75,1	72,7	73,4	73,0	74,7
Sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	82,4	81,3	80,5	81,2	n/p

Tabla 6b: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 40 °C/75 % de h.r. (% rel.)

	Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% rel.)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina	100,0	96,8	97,8	97,2	99,5
Sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	100,0	98,7	97,6	98,5	n/p

Tabla 7: Estabilidad a largo plazo de la sal monosódica cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 40 °C/75 % de h.r. (producto de degradación principal [MeFox])

	Derivado pirazino-s-triazina de 4 α -hidroxi-5-metil-THF (MeFox) (% abs.)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina	0,01	0,03	0,03	0,04	0,06
Sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	0,20	0,72	0,80	0,68	n/p

En las tablas 4 a 7 que incluyen los datos de estabilidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina según se describe en la presente invención se muestra claramente que

i) existe una diferencia notable en la estabilidad de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina en comparación con la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y

ii) la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina es mucho más estable durante un periodo de tiempo largo que la sal de calcio cristalina del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

Ejemplo 11: Enriquecimiento isomérico de las sales de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina

Cuando se preparan sales de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a partir de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico puede obtenerse el siguiente enriquecimiento isomérico (medido mediante HPLC).

Experimento n.º	Contenido de (6S) del material inicial (ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico) [%]	Contenido de (6S) de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina resultante [%]
1	98,0	99,6
2	98,0	99,7
3	98,0	99,7
4	98,0	99,6
5	98,0	99,6
6	98,0	99,6
7	98,0	99,7

Cuando se preparan sales de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a partir de bencenosulfonato del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico preparado *in situ* puede obtenerse el siguiente enriquecimiento isomérico (medido por HPLC)

ES 2 966 938 T3

Experimento n.º	Contenido de (6S) del material inicial (bencenosulfonato del ácido (6S)- tetrahidrofólico) [%]	Contenido de (6S) de la sal de ácido 5-metil- (6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L- isoleucina resultante [%]
8	95,9	99,5

REIVINDICACIONES

1. Una sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina, en la que la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina es de 1:0,3 a 1:2,0 (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-isoleucina es de 1:0,5 a 1:1,5 (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-isoleucina es de 1:0,75 a 1:1,5 (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-isoleucina 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 precedentes, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina 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 5,8; 6,9; 14,0; 17,5 y 22,2 (forma A).
- 20 6. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de PXRD con al menos tres picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,8; 6,9; 14,0; 17,5, y 22,2 (forma A).
- 25 7. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina 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 5,8; 6,9; 8,5; 12,5; 12,9; 14,0; 14,9; 16,2; 17,5; 17,9; 18,9; 19,2; 22,2; 24,4; 25,4; 25,8; 25,9 y 34,6 (forma A).
8. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un espectro Raman con al menos un pico característico (expresado en números de onda, $\text{cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 1607, 1571, 1506, 1250 y 650 (forma A).
- 30 9. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un espectro Raman con al menos un pico característico (expresado en números de onda, $\text{cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 2961, 2938, 1607, 1571, 1506, 1468, 1332, 1250, 1153, 922, 860 y 650 (forma A).
- 35 10. 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-isoleucina 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 5,3; 7,0; 14,0; 17,7 y 24,5 (forma B).
- 40 11. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 o 10, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina 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 a 5,3; 7,0; 14,0; 17,7 y 24,5 (forma B).
- 45 12. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, 10 u 11, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina 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 5,3; 7,0; 8,4; 13,0; 13,2; 14,0; 14,7; 15,9; 17,4; 17,7; 18,1; 18,7; 20,7; 21,2; 22,9; 24,5 y 25,4 (forma B).
13. 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-isoleucina 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 7,0; 8,8; 14,0; 17,6; 20,2; 23,4 y 26,9 (forma C).
- 50 14. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 o 13, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina 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 a 7,0; 8,8; 14,0; 17,6; 20,2; 23,4 y 26,9 (forma C).

15. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, 13 o 14, caracterizada porque la sal es la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$ [radiación CuK α]) seleccionado a partir de los siguientes picos localizados a 5,3; 7,0; 8,8; 11,2; 13,0; 14,0; 15,1; 15,9; 16,8; 17,4; 17,6; 20,2; 20,5; 20,8; 21,2; 21,4; 23,4; 24,5; 26,9 y 32,2 (forma C).
16. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones precedentes que tiene al menos el 99 % o más de pureza química, estereoisomérica o cristalina.
17. Un proceso para obtener la sal cristalina de 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende las etapas de:
 - i) preparar una mezcla de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua y añadir éster etílico de L-isoleucina, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuados;
 - ii) añadir una base, opcionalmente en un solvente o mezcla de solventes adecuados para conseguir la disolución;
 - iii) calentar la composición hasta al menos 60 °C;
 - iv) añadir un ácido adecuado para ajustar el pH al intervalo de 4 a 7;
 - v) cristalizar y enfriar la mezcla a una temperatura de entre 1 y 30 °C, agitar opcionalmente la suspensión obtenida a la temperatura final; y
 - v) aislar el material sólido obtenido y, opcionalmente, secar el producto.
18. El proceso de la reivindicación 17, caracterizado porque la relación molar entre el ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el éster etílico de L-isoleucina de la etapa i) está en el rango de 1:1 a 1:3.
19. El proceso de la reivindicación 17 y/o 18, caracterizado porque en la etapa i) la mezcla de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua se prepara in situ.
20. El proceso de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque en la etapa i) se añade éster etílico de L-isoleucina en forma de su sal clorhidrato.
21. El proceso de las reivindicaciones 17 a 20, caracterizado porque en la etapa ii) se usa una solución acuosa de hidróxido sódico que permite la disolución de los compuestos y que en la etapa iv) se usa ácido clorhídrico acuoso para el ajuste del pH.
22. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 17 a 21, caracterizado porque en la etapa ii) el pH tras la adición de la base está en el intervalo de 6,5 a 9,0.
23. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 17 a 22, caracterizado porque en la etapa iii) se añade carbón y, a continuación, la solución se aclara mediante filtración.
24. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 17 a 23, caracterizado porque el solvente es agua.
25. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 17 a 24, caracterizado porque en la etapa iv) el valor de pH alcanzado por la adición del ácido se establece en el intervalo de 5,4 a 6,4.
26. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 17 a 25, caracterizado porque en las etapas iii), iv) y/o v) se añaden cristales semilla.
27. Una composición farmacéutica, aditivo alimentario y/o preparado que comprende la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 16 y, opcionalmente, uno o más excipientes aceptables.
28. La composición farmacéutica según la reivindicación 27 en forma de comprimidos, cápsulas, preparados líquidos orales, polvos, liofilizados, gránulos, pastillas, polvos para reconstitución, suspensiones para inyección o infusión, o supositorios.
29. La composición farmacéutica según la reivindicación 27 o 28 que además comprende al menos un agente terapéutico adicional.
30. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 27 a 29, que es una composición farmacéutica adecuada para administración por vía oral, parenteral, intramuscular, intraespinal, intratecal, periodontal, tópica o rectal.
31. Uso de la sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 16 como constituyente para la producción de fármacos y/o como aditivo alimentario.

32. La sal cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico L-isoleucina según al menos una de las reivindicaciones 1 a 16 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.

Figuras

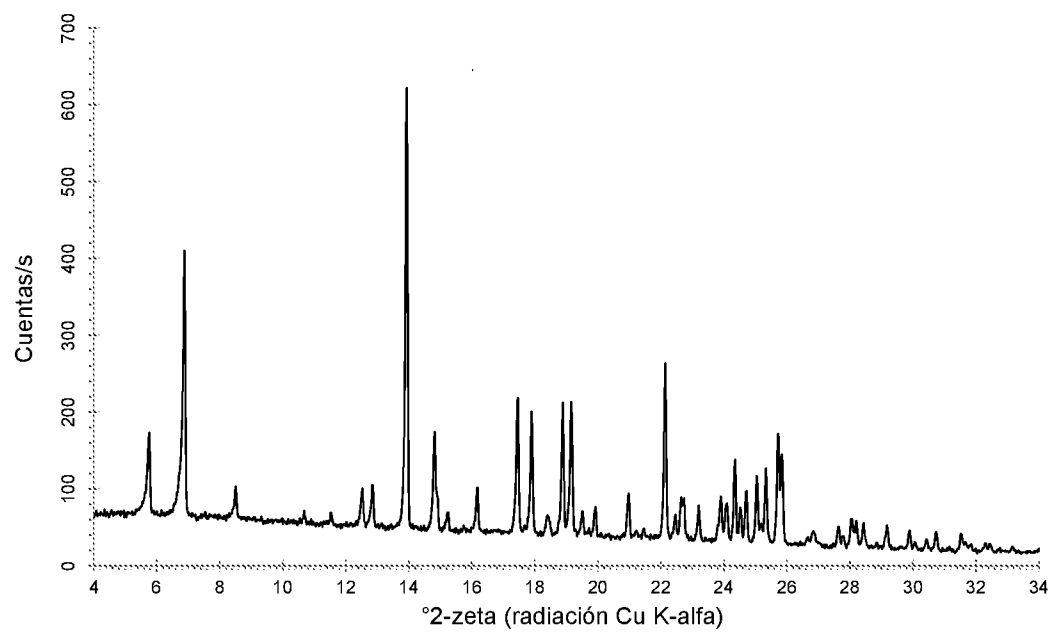


Figura 1: Patrón de PXRD de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (forma A).

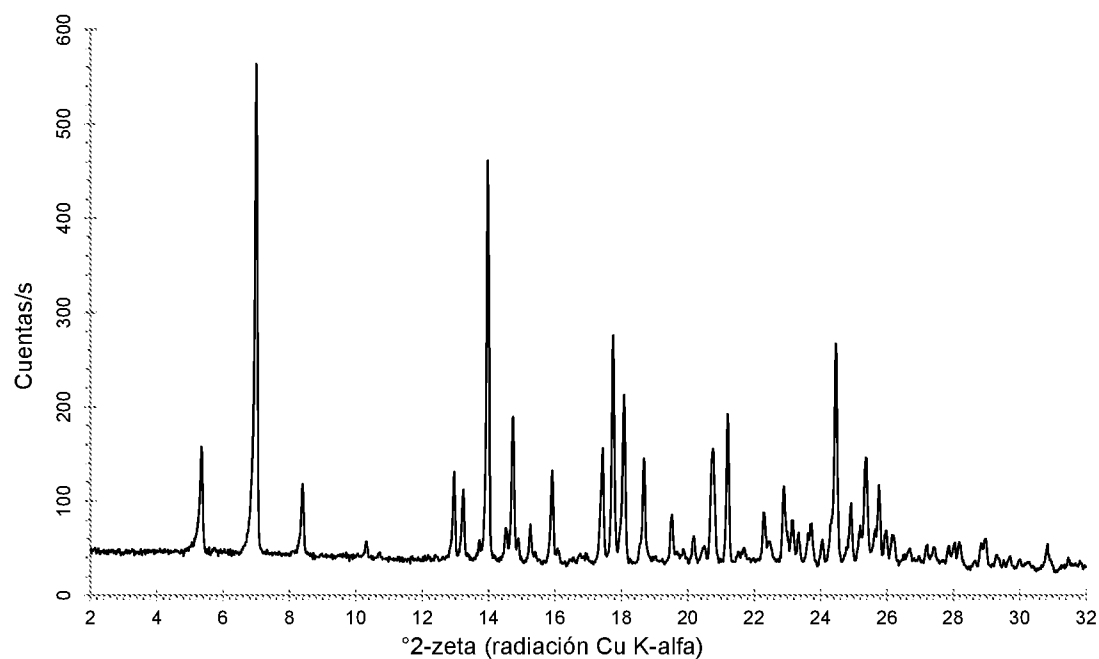


Figura 2: Patrón de PXRD de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (forma B).

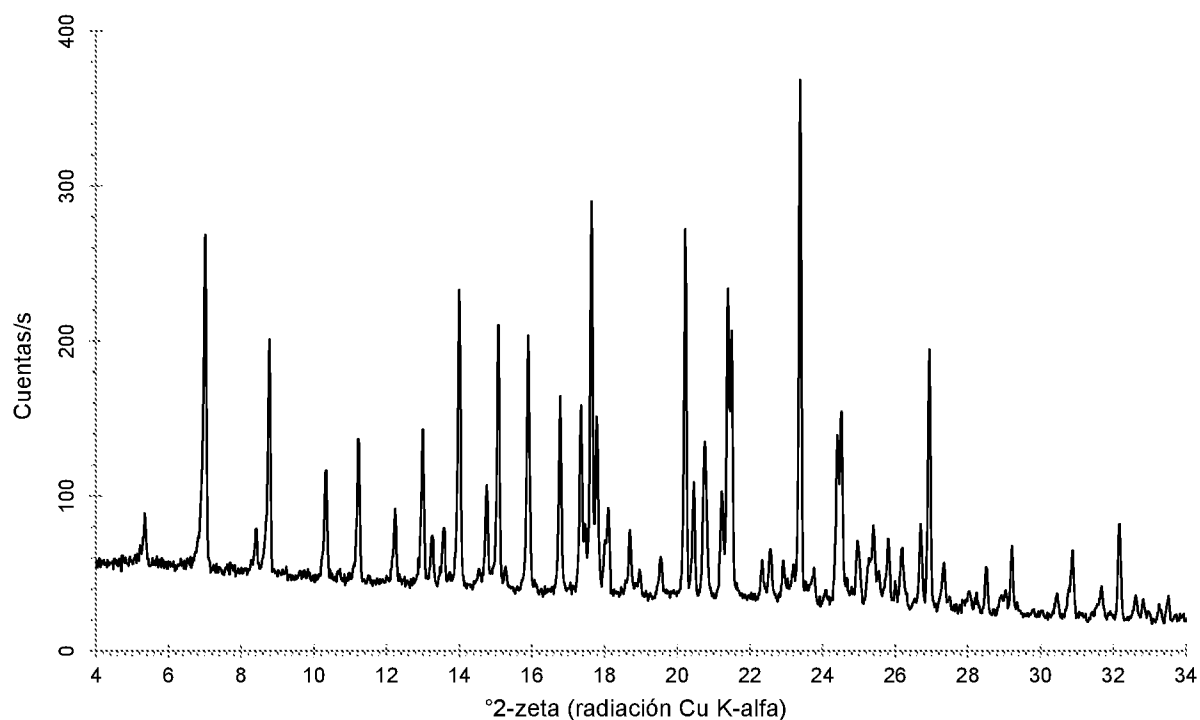


Figura 3: Patrón de PXRD de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (forma C).

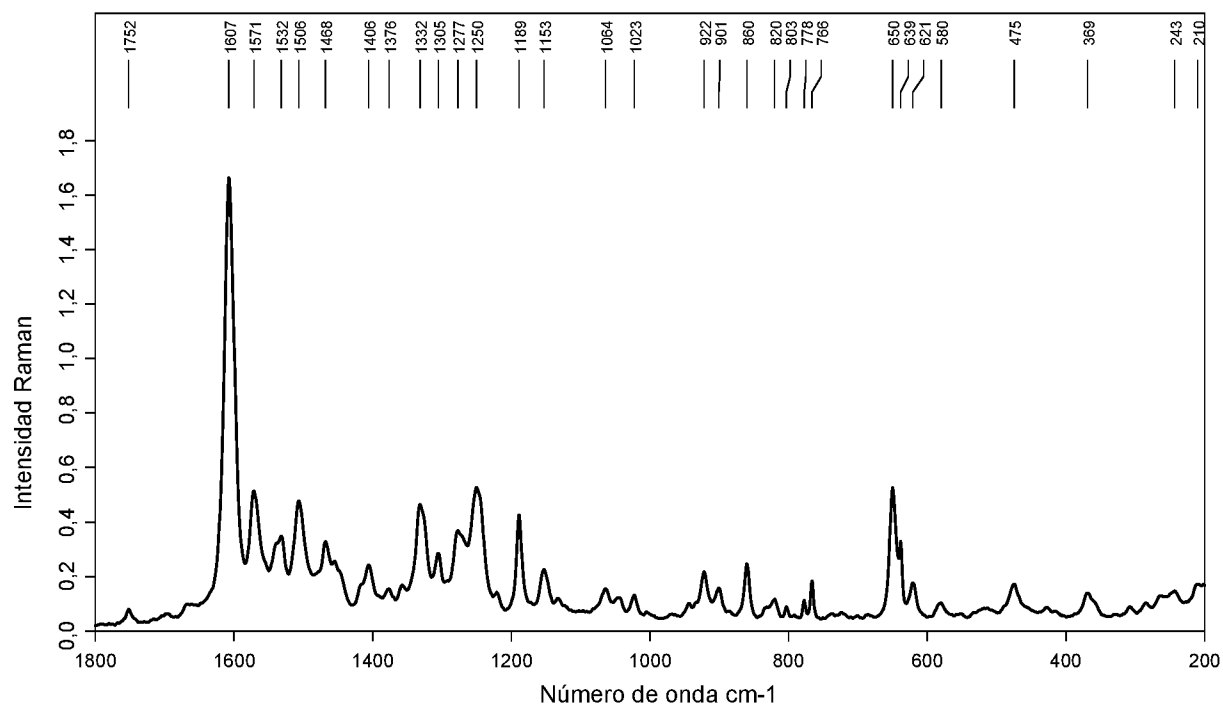


Figura 4: Espectro de FT-Raman de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina (forma A).

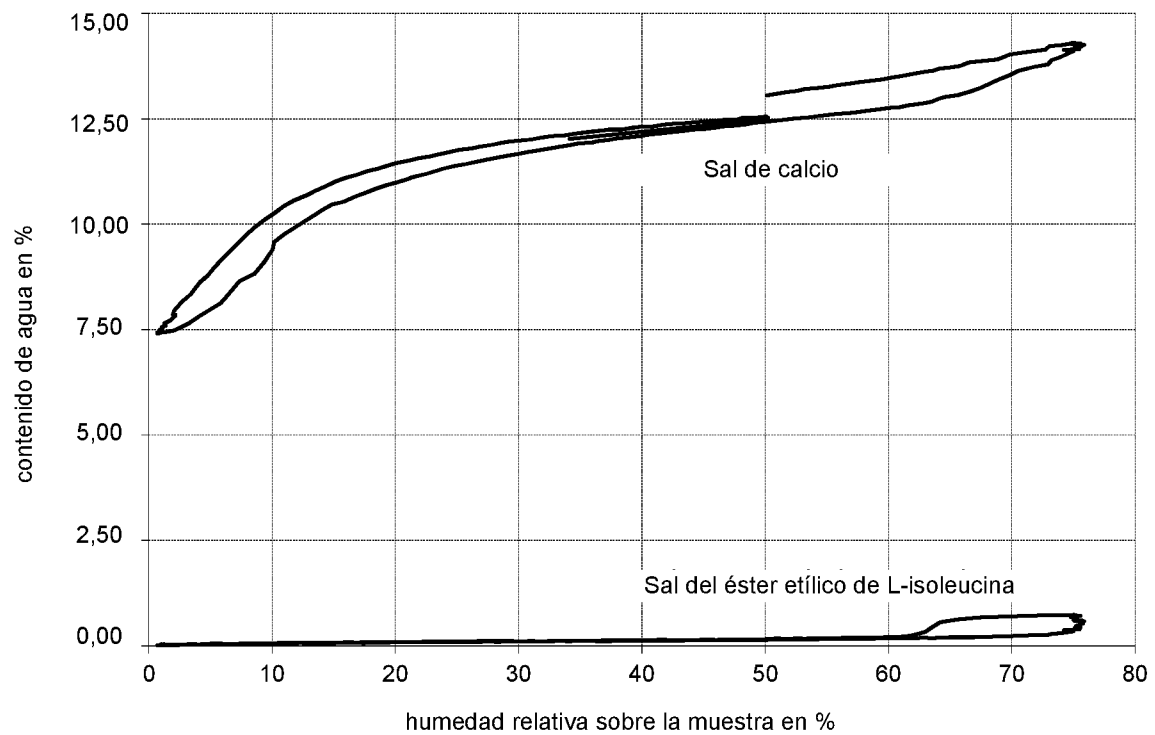


Figura 5: Análisis de adsorción dinámica de vapor de agua de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahydrofólico con respecto a la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahydrofólico y éster etílico de L-isoleucina (forma A).

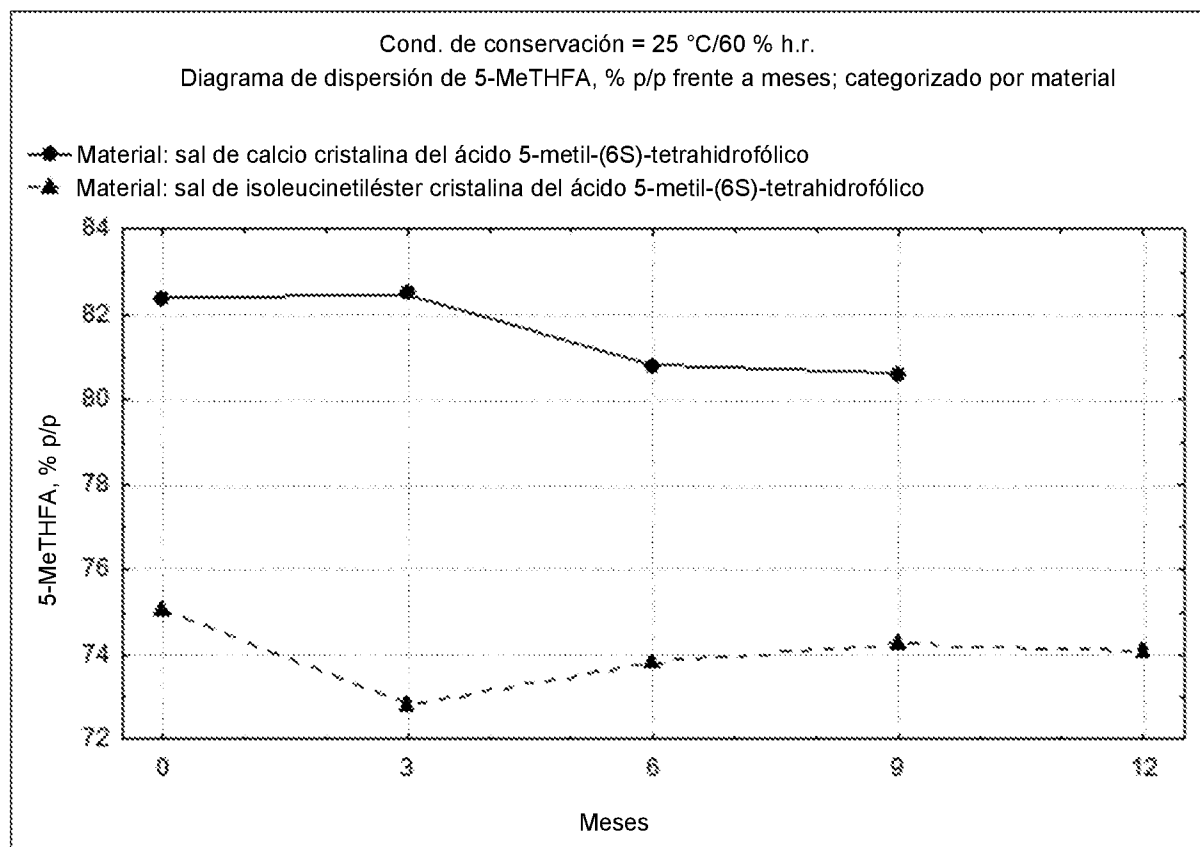


Figura 6: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 25 °C/60 % de h.r.

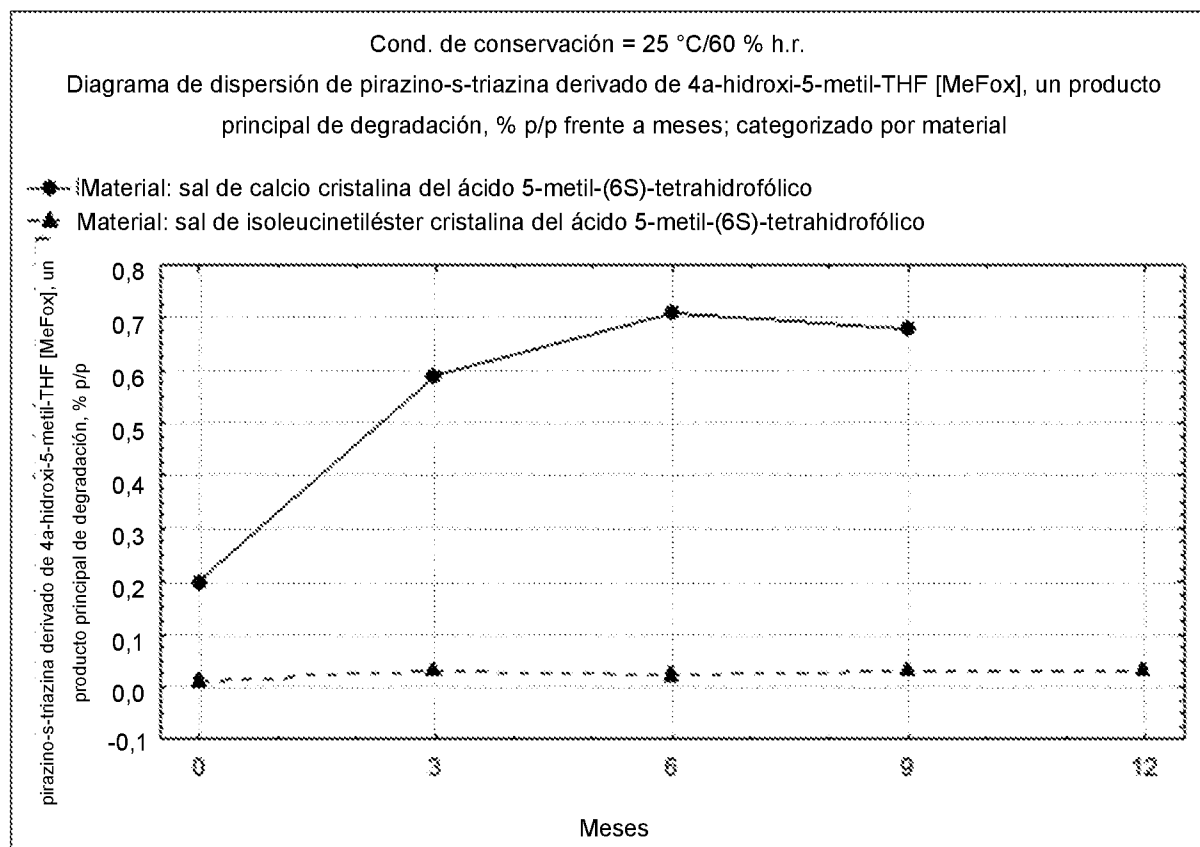


Figura 7: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 25 °C/60 % de h.r. (producto de degradación principal [MeFox])

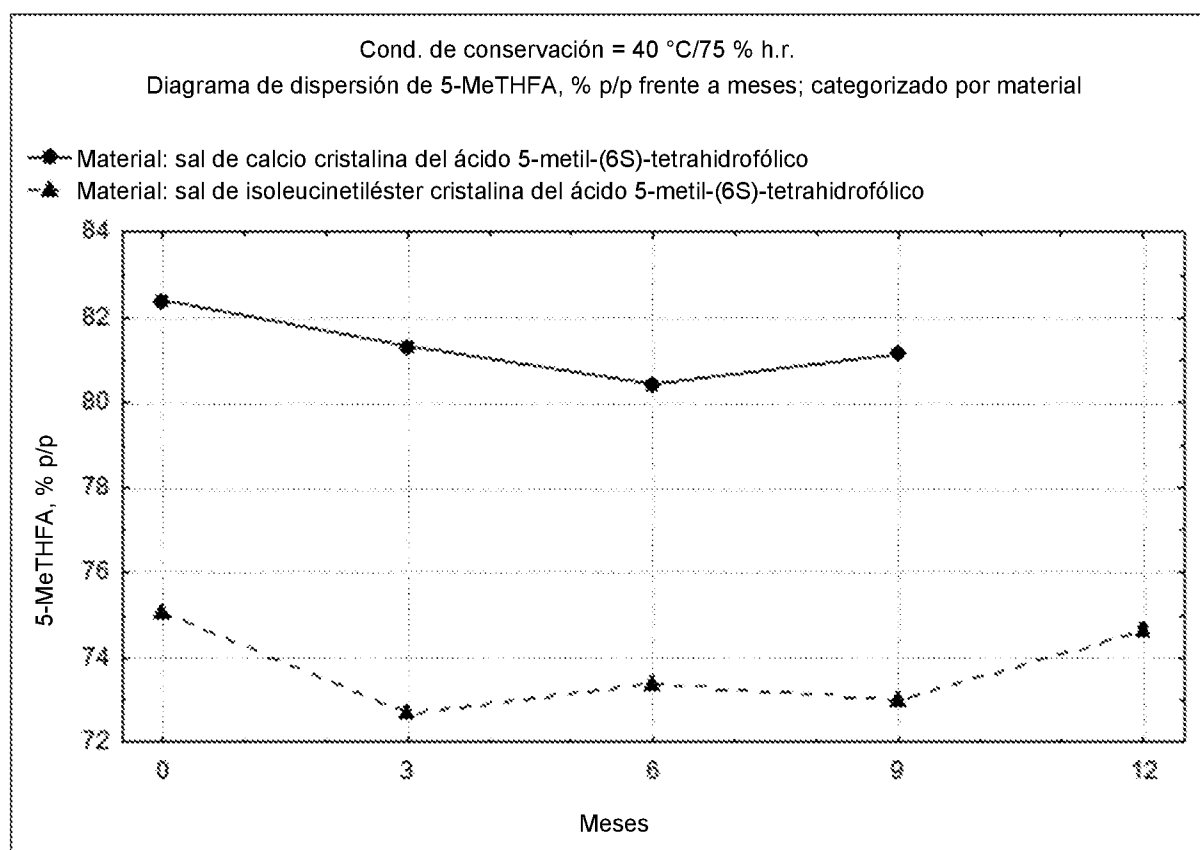


Figura 8: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 40 °C/75 % de h.r.

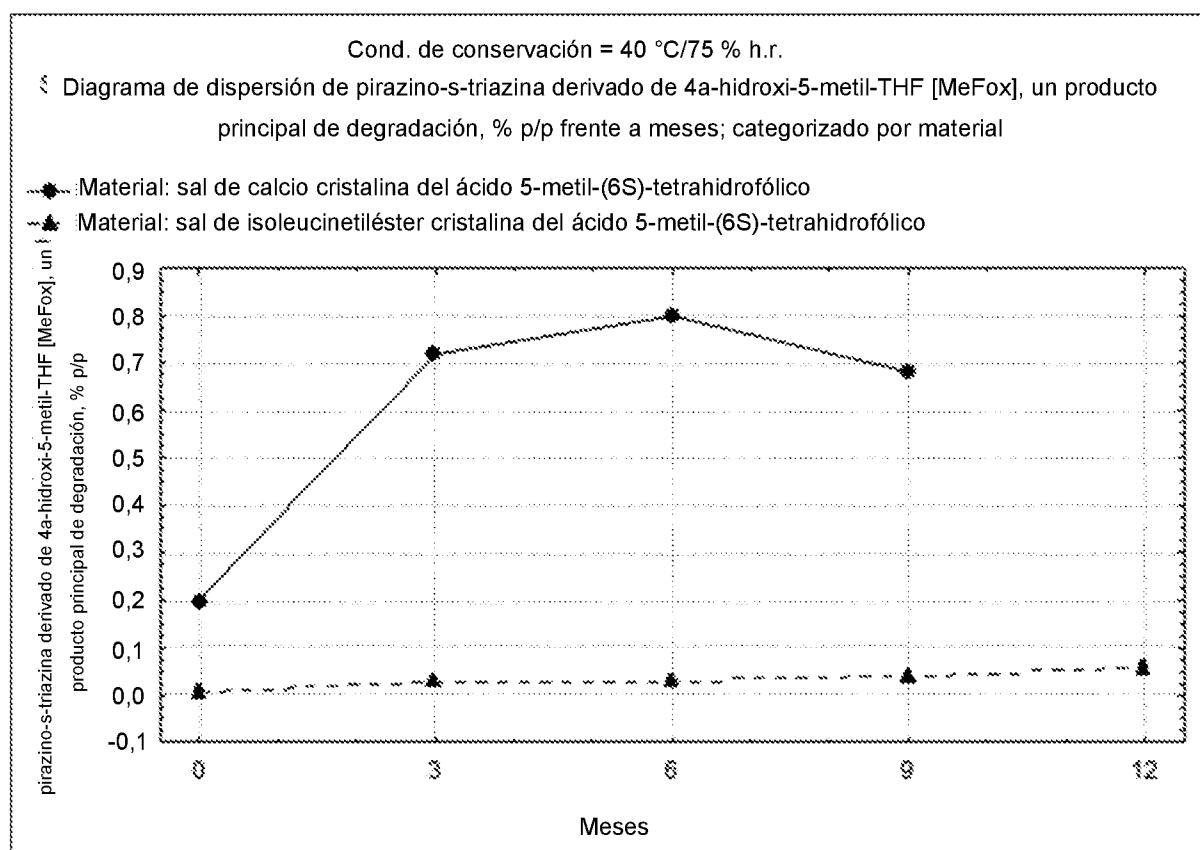


Figura 9: Estabilidad a largo plazo de la sal de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y éster etílico de L-isoleucina a 40 °C/75 % de h.r. (producto principal de degradación [MeFox])