



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 989 869**

⑮ Int. Cl.:

C07D 475/04 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2018** PCT/EP2018/057900

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018** WO18178141

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2018** E 18715594 (0)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** EP 3609894

④ Título: **Sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico**

⑩ Prioridad:

31.03.2017 EP 17164349

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.11.2024

⑦ Titular/es:

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

⑦ Inventor/es:

MOSER, RUDOLF;
GROEHN, VIOLA;
BLATTER, FRITZ;
SZELAGIEWICZ, MARTIN;
BOEHN STAMM, RUTH;
RUETTIMANN, MARKUS y
LAPADULA, GIUSEPPE

⑦ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 989 869 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 sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

- 5 La presente invención se refiere a una sal sódica 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, abreviado en la presente como MTHF, y un proceso para obtener la misma.
- 10 Los tetrahidrofolatos se usan predominantemente como ácido 5-formiltetrahidrofólico y las sales del mismo (leucovorina y levoleucovorina), como ácido 5-metiltetrahidrofólico y las sales del mismo (Metafolin®), o como ácido 5,10-metilentetrahidrofólico y las sales del mismo (Modufolin®) para el tratamiento de anemia por ácido fólico megaloblástico, como un antídoto para incrementar la compatibilidad de antagonistas de ácido fólico, particularmente de aminopterina y metotrexato en terapia contra cáncer ("rescate de antifolato"), para incrementar el efecto terapéutico de pirimidinas fluoradas y para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tal como psoriasis y artritis reumatoide, para incrementar la compatibilidad de ciertos antiparasíticos para mutaciones, por ejemplo trimetoprim-sulfametoxazol, y para reducir la toxicidad de dideazatotrahidrofolatos en quimioterapia.
- 15
- 20 El ácido 5-metiltetrahidrofólico se usa en particular como fármaco y como aditivo alimentario, como una preparación de vitaminas, para la prevención de defectos de tubo neural, para el tratamiento de enfermedades depresivas y para influir en el nivel de homocisteína.
- 25 El ácido 5-metiltetrahidrofólico y sales del mismo son extremadamente inestables y en particular, son altamente susceptibles a la oxidación [ver también A.L. Fitzhugh, Pteridines 4 (4), 187-191 (1993) a este respecto] y por lo tanto, son difíciles de producir a un nivel de pureza que sea aceptable para un ingrediente activo farmacéutico o un aditivo alimentario.
- 30 Se han empleado diferentes métodos, tal como excluir el oxígeno lo más completamente posible o la adición de antioxidantes tal como ácido ascórbico o L-glutatión reducida, a fin de superar la inestabilidad del ácido 5-metiltetrahidrofólico.
- 35 US 6,441,168 B1 divulga sales alcalinotérreas de ácido 5-metiltetrahidrofólico, en particular la sal de calcio, su cristalización y su uso. La sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico existe en cuatro modificaciones cristalinas diferentes.
- 40 40 El inconveniente de la sal de calcio del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es que existe en cuatro modificaciones, puesto que el proceso de fabricación de cada una de las cuales se tiene controlar con mucha precisión. Adicionalmente, la solubilidad de la sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua es relativamente deficiente, lo que posiblemente conduce a una biodisponibilidad reducida y una limitación a su forma de uso aplicable. También una baja solubilidad da por resultado bajos rendimientos de tiempo-volumen cuando se necesita disolver el compuesto para procesamiento adicional, por ejemplo, una purificación por recristalización. Adicionalmente, las sales cristalinas de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de US 6,441,168 B1 también tienen un agua de cristalización de al menos un equivalente por equivalente de ácido 5-metiltetrahidrofólico.
- 45 Las nuevas formas cristalinas de un compuesto farmacéuticamente útil ofrecen una oportunidad para mejorar el perfil de rendimiento de un producto alimenticio farmacéutico y/o vitamínico/médico. Amplía el reservorio de materiales que un científico de formulación tiene disponibles para diseñar nuevas formas de dosis con características mejoradas.
- 50 El problema técnico que subyace a la presente invención es la provisión de una forma cristalina que comprende ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico que supera los inconvenientes de la sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico conocida en la técnica.
- 55 Además, las nuevas formas cristalinas frecuentemente muestran diferentes características físicas y/o biológicas deseadas, que pueden ayudar en la fabricación o formulación del compuesto activo, a los niveles de pureza y uniformidad requeridos para la aprobación regulatoria.
- 60 Para el propósito de estabilidad de los folatos reducidos, siempre es el objetivo proporcionar un compuesto que tenga una baja absorción de agua durante el almacenamiento y que se pueda secar suficientemente durante la fabricación.
- 65 El problema técnico se resuelve por una sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en donde la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a sodio es de 1:0,5 a 1:1,5 (en mol/mol) y/o hidratos y/o solvatos del mismo.
- 65 La forma sólida de la presente invención posee características farmacológicas mejoradas, por ejemplo, biodisponibilidad mejorada, ofreciendo de este modo posibilidades mejoradas para modular y diseñar productos

farmacéuticos mejorados.

Adicionalmente, solo existe una modificación cristalina de la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, lo que conduce a un proceso mejorado para obtener la misma.

Aún más, la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención muestra una estabilidad a largo plazo inesperadamente superior en comparación con la sal de calcio cristalina previamente conocida de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico. La estabilidad mejorada de la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención puede conducir a una vida útil incrementada, condiciones de almacenamiento menos estrictas y/o requisitos previos más convenientes/costosos a lo largo de la cadena de suministro.

Adicionalmente, la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención muestra una solubilidad incrementada y especialmente una solubilidad cinética incrementada contra ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y sales respectivas del mismo conocidas en el estado de la técnica. La solubilidad incrementada y especialmente una solubilidad cinética incrementada de la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención puede conducir a diferentes parámetros de procesamiento tal como, por ejemplo, tiempos de disolución más cortos y por lo tanto, menos estrés oxidativo para el producto y/o finalmente incluso otras formas de aplicación tal como polvos rápidamente solubles.

Preferentemente, la sal cristalina tiene una relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a sodio de 1:0,75 a 1:1,25 (en mol/mol).

En una realización preferida adicional, la sal cristalina tiene una relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a sodio de 1:1 (en mol/mol)

Preferentemente, la sal cristalina de la presente invención es la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación de CuKa)) a 6,5, 10,2, 13,1, 15,3, 17,9, 20,5 y 22,0.

Incluso más preferido, la sal cristalina de la presente invención es la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y tiene un patrón de PXRD con al menos dos, incluso más preferido al menos tres, más preferido al menos cuatro, preferentemente al menos cinco, más preferido al menos seis y más preferido todos los picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación CuKa)) a 6,5, 10,2, 13,1, 15,3, 17,9, 20,5 y 22,0.

Incluso más preferido, la sal cristalina de la presente invención es la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación de CuKa)) a 6,5, 10,2, 12,5, 13,1, 14,8, 15,1, 15,3, 16,1, 17,2, 17,9, 20,4, 20,5, 21,2, 22,0, 22,5 y 27,2.

Preferentemente, la sal cristalina de la presente invención es la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y tiene un patrón de PXRD con al menos dos, incluso más preferido al menos tres, más preferido al menos cuatro, preferentemente al menos cinco, más preferido al menos seis y más preferido todos los picos característicos (expresados en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación CuKa)) a 6,5, 10,2, 12,5, 13,1, 14,8, 15,1, 15,3, 16,1, 17,2, 17,9, 20,4, 20,5, 21,2, 22,0, 22,5 y 27,2 y más preferido tiene un patrón de PXRD sustancialmente como se muestra en la figura 1.

Preferentemente, la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es una sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

Incluso más preferido, el contenido de agua de la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es menor que 5 % en peso, preferentemente menor que 3 % en peso, más preferentemente menor que 1 % en peso. Se prefiere especialmente la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, una sal sódica cristalina anhidra de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y lo más preferido una sal monosódica cristalina anhidra de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

Un aspecto adicional de la invención es la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico que tiene un espectro Raman con al menos un pico característico (expresado en números de onda, cm^{-1} , con una incertidumbre experimental de $\pm 1-2 \text{ cm}^{-1}$) a: 3079, 3036, 2991, 2962, 2941, 2927, 2902, 2852, 1674, 1608, 1570, 1527, 1483, 1466, 1446, 1415, 1321, 1302, 1274, 1243, 1224, 1193, 1168, 1059, 1019, 947, 898, 854, 810, 775, 648, 637, 510, 479, 415, 378, 284, 260 y 196 cm^{-1} .

Aún un aspecto adicional de la invención es la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico que exhibe un espectro Raman sustancialmente como se representa en la figura 6.

Un aspecto adicional de la presente invención es un proceso para obtener la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con la presente invención que comprende los pasos de:

- 5 a) proporcionar ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, opcionalmente en un solvente adecuado o una mezcla de solventes;
 b) adicionar hidróxido de sodio a la composición del paso a);
 c) adicionar un formador de co-sal y opcionalmente un solvente, o una mezcla de solventes a la composición del paso b), o adicionar la composición del paso b) a un formador de co-sal y un solvente o una mezcla de solventes;
 d) cristalizar;
 e) opcionalmente adicionar más solvente o mezcla de solventes; y
 f) aislar el sólido obtenido.
- 10 Preferentemente, la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico e hidróxido de sodio en el paso b) está en el intervalo de 1:0,5 a 1:1,5 e incluso más preferentemente de 0,9 a 1,5.
- 15 En una realización preferida adicional, la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el formador de co-sal en el paso c) está en el intervalo de 1:0,5 a 1:3, preferentemente en el intervalo de 1:0,9 a 1:2,5, incluso más preferentemente aproximadamente 1:2.
- 20 Preferentemente, el solvente y/o mezclas de solventes de acuerdo con el paso a), c) y/o e) se selecciona del grupo que consiste en agua, alcoholes solubles en agua, metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetona, metil etil cetona, metil isobutil cetona, alcohol bencílico y mezclas de los mismos.
- 25 Preferentemente, la relación de agua al solvente y/o mezclas de solventes en el paso d) y/o e) es 1:5 v/v o menor. Más preferida es la relación de agua al solvente y/o mezclas de solventes en el paso d) y/o e) 1:6 v/v o menor e incluso más preferida 1:7 v/v o menor. Un mayor contenido de agua en el solvente y/o mezclas de solventes en el paso d) y/o e) da por resultado menores rendimientos de cristalización.
- 30 Un formador de co-sal como se usa en la presente es una sustancia química que facilita la formación de la sal sódica cristalina de acuerdo con la presente invención. Los formadores de co-sal de acuerdo con la presente invención son habitualmente bases orgánicas que son suficientemente solubles en los solventes de proceso de tal fomar que se remueven en el paso de filtración o se pueden eliminar fácilmente por lavado después de la filtración.
- 35 Preferentemente, el formador de co-sal en el paso c) es una base orgánica con un valor de pKa de 6 a 11 e incluso más preferentemente con un valor de pKa de 7 a 10.
- 40 En una realización preferida adicional, el formador de co-sal del paso c) se selecciona del grupo que consiste de 4-(2-hidroxietil)-morfolina, 1-(2-hidroxietil)-pirrolidina, imidazol, 2-dimetilaminoetanol, terc-butilamina y mezclas de los mismos.
- 45 En una realización preferida, en el paso d) la temperatura es al menos 30 °C, preferentemente al menos 40 °C, incluso más preferido al menos 50 °C, más preferido al menos 60 °C, más preferido al menos 70 °C y más preferido al menos 75 °C.
- 50 Preferentemente, en el paso a), b), c) y/o d) se adicionan cristales de siembra. Incluso más preferidos, los cristales de siembra son la sal sódica deseada de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.
- 55 Un aspecto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica, aditivo alimentario, vitamina y/u otra preparación que comprende la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con la presente invención y opcionalmente uno o más excipientes aceptables y el uso de la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con la presente invención como constituyente para la producción de fármacos y/o aditivos alimentarios.
- 60 La sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención para uso en la reducción de homocisteína, el tratamiento de anemia, defectos de tubo neural, enfermedades cardiovasculares, depresión, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo y osteoporosis y/o manejo dietético de folato bajo en plasma y/o folato bajo en glóbulos rojos y/o folato bajo en líquido cefalorraquídeo y/o folato bajo en el sistema nervioso periférico o central también es parte de la presente invención.
- 65 Sorprendentemente, la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención tiene una solubilidad cinética mejorada en comparación con la sal de calcio cristalina divulgada en US 6,441,168 B1. La medición de la solubilidad cinética se llevó a cabo como se describe en la parte experimental.
- 70 La solubilidad de la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención en agua (temperatura ambiente) es mayor que 25 mg por 1 ml de agua, en tanto que la sal de calcio exhibe una solubilidad que es considerablemente menor que 10 mg por 1 ml de agua.
- 75 Debido a la mayor solubilidad de la sal sódica de la presente invención, la biodisponibilidad es mejor. Esto da por resultado formas de dosis oral, en las cuales se puede reducir la cantidad del principio activo, sin disminuir la

efectividad del medicamento o aditivo alimentario.

Además, el análisis por sorción dinámica de vapor (DVS) es un método adecuado para investigar las propiedades higroscópicas y propiedades de secado de una sustancia sólida.

La sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención se puede secar suficientemente, de tal forma que después de diez horas de purga de nitrógeno, el agua se puede remover esencialmente (ejemplo 8, figura 2). Contrariamente a esto, la sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico todavía tiene un contenido de agua de 6 a 7 % (ejemplo 9, figura 3). La sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención se puede secar más fácilmente.

Además, el cambio del contenido de agua dentro del intervalo más relevante de humedad relativa entre 20 % y 75 % es aproximadamente 1,7 % para la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención (ejemplo 10, figura 4). La sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico tiene un cambio de contenido de agua de aproximadamente 3,5 % (ejemplo 11, figura 5). Por lo tanto, la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención es menos higroscópica, lo que es deseable.

Adicionalmente, el peso molecular de la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención es significativamente menor en comparación con la sal de calcio de ácido 5-metiltetrahidrofólico divulgada en US 6,441,168 B1. Una forma de dosis que comprende la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención tiene un peso menor en comparación con una que comprende la sal de calcio de ácido 5-metiltetrahidrofólico que contiene una cantidad equivalente de la sustancia activa. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden fabricar tabletas más ligeras y más pequeñas, lo que es ventajoso para pacientes como niños, puesto que estas tabletas se pueden tragar más fácilmente.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar para todos los modos de administración, preferentemente para administración oral, parenteral, intramuscular, intraespinal, intratecal, peridental, tópica o rectal.

En resumen, el perfil de propiedades ofrecido por la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de la presente invención es ventajoso para uso en medicamentos o como aditivo alimentario.

Parte experimental

Difracción de rayos X en polvo

Stoe Stadi P equipado con un detector Mythen1K; radiación Cu-K α 1; condiciones de medición estándar: transmisión; potencia de tubo de 40 kV y 40 mA; monocromador Ge curvo; tamaño de paso de 0,02° θ , tiempo de paso de 48 s, intervalo de escaneo de 1,5-50,5° θ ; modo de detector: escaneo de paso; paso de detector de 1° θ ; preparación de muestra estándar: Se colocó una muestra de 10 a 20 mg entre dos láminas de acetato; portamuestras: Portamuestras de transmisión Stoe; la muestra se giró durante la medición. Toda la preparación y medición de la muestra se realizó en una atmósfera de aire ambiente.

TG-FTIR

Las mediciones termogravimétricas se llevaron a cabo con un Netzsch Thermo-Microbalance TG 209 acoplado a un espectrómetro Bruker FTIR Vector 22 (bandejas de muestra con un agujero de alfiler, atmósfera de N₂, velocidad de calentamiento 10 K/min).

DVS

Las mediciones de DVS se realizan habitualmente a 25 °C con un SPS11-100n "Sorptions PrüfSystem" de ProUmid (anteriormente "Projekt Messtechnik"), August-Nagel-Str. 23, 89079 Ulm (Alemania). Se colocan aproximadamente 20 mg de muestra en una bandeja de muestras de aluminio. Se usaron velocidades de cambio de humedad de 5 % por hora. El programa de medición aplicado se visualiza en la figura (trazo discontinuo) y se describe más adelante.

La muestra se colocó en un soporte de aluminio en la parte superior de una microbalanza y se dejó equilibrar a 50 % hr antes de comenzar el programa de humedad predefinido de la siguiente manera:

(1) 2 horas a 50 % de humedad relativa

(2) 50 --+ 0 % de humedad relativa (5 %/ hora); 10 horas a 0 % de humedad relativa

(3) 0 --+ 75 % de humedad relativa (5 %/ hora); 5 horas a 75 % de humedad relativa

(4) 75 → 0 % de humedad relativa (5 %/ hora); 10 horas a 0 % de humedad relativa

(5) 0 → 50 % de humedad relativa (5 %/ horas); 2 horas a 50 % de humedad relativa

5 Espectroscopia Raman:

Los espectros de FT-Raman se registraron en un sistema Bruker MultiRAM FT-Raman o Bruker RFS 100 FT-Raman con un láser Nd:YAG de infrarrojo cercano que opera a 1064 nm y un detector de germanio enfriado con nitrógeno líquido. Se acumularon 64 escaneos con una resolución de 2 cm^{-1} en el intervalo de 3500 a -50 cm^{-1} ; sin embargo, solo se evalúan los datos superiores a 100 cm^{-1} debido a los efectos de corte de filtro. Las potencias nominales del láser son habitualmente 100 o 300 mW.

10 Ejemplo 1: Preparación de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con imidazol como formador de co-sal sin siembra. Se pesaron 467 mg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidratado (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,65 % p/p) en un vial de vidrio equipado con una barra agitadora magnética. Se adicionó 1,0 ml de solución estándar de hidróxido de sodio 1,00 mol/L y 76 mg de imidazol. A temperatura ambiente, se obtuvo una solución esencialmente clara a la que se adicionaron 7,0 ml de etanol. La adición de etanol condujo a una suspensión espesa a temperatura ambiente. La suspensión se calentó a 80 °C y se agitó durante dos horas antes de que el sólido se separara por filtración en caliente usando un filtro de vidrio poroso (porosidad P4) y se secó al aire a temperatura ambiente. La torta de filtro se lavó con 10 ml de etanol y se dejó secar al aire durante aproximadamente 30 minutos. Se obtuvieron 320 mg (63 % de rendimiento, ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 89,38 % p/p) de un polvo fino ligeramente amarillo como producto y se caracterizó por difracción de rayos X en polvo (figura 1, tabla 1) y espectroscopía Raman (figura 6, tabla 2). El contenido de sodio encontrado por ICP-OES fue 4,49 %, lo que está en buena concordancia con una sal monosódica. El análisis por HPLC mostró una pureza de 97,4 en % de área y por lo tanto, confirmó la identidad de la sal.

15 Tabla 1: Los datos de difracción de rayos X en polvo para la sal monosódica cristalina del ejemplo 1 con ángulos 2-theta, valores de espaciamiento d en Angstrom y valores de intensidad cualitativa de la siguiente manera: vs = muy fuerte, s = fuerte, m = medio, w = débil y vw = muy débil.

20

° 2-teta	d-espaciamientos [Å]	intensidad (cualitativa)
6,5	13,5	m
10,2	8,6	vs
12,5	7,1	vw
13,1	6,8	s
14,8	5,99	s
15,1	5,87	s
15,3	5,79	vs
15,8	5,61	w
16,1	5,50	s
17,2	5,15	s
17,9	4,94	vs
19,7	4,51	vw
20,0	4,44	w
20,4	4,35	s
20,5	4,32	vs
21,0	4,22	w
21,2	4,18	s
21,5	4,13	w
22,0	4,03	vs
22,5	3,95	vs
24,7	3,61	w

ES 2 989 869 T3

° 2-teta	d-espaciamientos [Å]	intensidad (cualitativa)
25,3	3,51	m
25,5	3,48	w
25,9	3,44	w
26,4	3,38	w
26,9	3,31	m
27,2	3,27	s
27,6	3,23	w
27,9	3,20	w
28,4	3,14	m
28,6	3,12	m
28,8	3,09	vw
29,3	3,04	vw
29,7	3,01	m
30,2	2,96	w
30,4	2,94	vw
30,9	2,89	w
31,2	2,86	w
31,9	2,81	m

Tabla 2: Los datos de Raman para la sal monosódica cristalina del ejemplo 1 con número de onda en cm^{-1} y valores de intensidad. Se debe señalar que las intensidades varían con la potencia del láser, cantidad de muestra y otros factores.

5

Número de onda (cm^{-1})	intensidad (unidades arbitrarias)
3079	0,43
3036	0,49
2991	0,51
2962	0,82
2941	1,20
2927	0,90
2902	0,87
2852	0,62
1674	0,51
1608	7,98
1570	2,87
1527	1,06
1483	0,93
1466	0,99
1446	0,80
1415	0,81
1321	6,43
1302	2,22

Número de onda (cm ⁻¹)	intensidad (unidades arbitrarias)
1274	0,96
1243	0,55
1224	0,51
1193	0,97
1168	1,33
1059	0,35
1019	0,51
947	0,57
898	2,03
854	0,60
810	0,61
775	0,54
648	1,60
637	1,62
510	0,39
479	0,64
415	0,51
378	0,52
284	0,57
260	0,62
196	0,83

Ejemplo 2: Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en isopropanol con 4-(2-hidroxietil)-morfolina como formador de co-sal y siembra.

- 5 Se pesaron 467 mg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidratado (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,65 % p/p) en un vial de vidrio equipado con una barra agitadora magnética. Se adicionó 1,0 ml de solución estándar de hidróxido de sodio 1,00 mol/L y 140 µl de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. A temperatura ambiente, se obtuvo una solución esencialmente clara a la que se adicionaron 7,0 ml de isopropanol. La adición de isopropanol condujo a una suspensión espesa a temperatura ambiente. La suspensión se calentó a 80 °C y se agitó durante una hora, entonces se adicionaron cristales de siembra de la sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con el ejemplo 1 y la agitación a 80 °C se continuó durante una hora antes de que el sólido se separara por filtración en caliente usando un filtro de vidrio poroso (porosidad P4) y se secó al aire a temperatura ambiente. La torta de filtro se lavó con 10 ml de isopropanol y se dejó secar a aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se obtuvieron 413 mg de un polvo fino ligeramente amarillo como producto. La difracción de rayos X en polvo confirmó la identidad de la sal monosódica.

Ejemplo 3: Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con 4-(2-hidroxietil)-morfolina como formador de co-sal y siembra.

- 20 Se pesaron 4,694 g de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidratado (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,65 % p/p) en un matraz de vidrio de 100 ml equipado con una barra agitadora magnética. Se adicionaron 10,00 ml de solución estándar de hidróxido de sodio 1,00 mol/L y 1,470 ml de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se formó una solución clara marrón. En tanto que se agitaba la solución a temperatura ambiente, se adicionaron 50 ml de etanol. Una solución turbia estaba presente después de agitar durante 6 minutos. La mezcla se sembró con 56 mg de sal monosódica de MTHF cristalina de acuerdo con el ejemplo 1 y después de agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente se formó una suspensión espesa, que ya no se puede agitar usando una barra agitadora magnética. Por lo tanto, la mezcla se calentó a 80 °C en aproximadamente 6 minutos y se formó una suspensión marrón claro que era fácil de agitar. La muestra se sembró de nuevo con 36 mg de sal de mono-Na de MTHF cristalina. Después de agitar durante 6 minutos a 80 °C, estaba presente una suspensión amarilla con algo de material sólido blanquecino que se adhirió a la pared de vidrio. Después de agitar la suspensión a 80 °C durante 75 minutos, se adicionaron 20 ml de etanol a la suspensión

amarilla y la agitación se continuó durante 70 minutos antes de que el producto sólido se retirara por filtración en caliente usando un filtro de vidrio poroso (porosidad P4, Ø 5 cm) y la torta de filtro se secó al aire durante aproximadamente 2 minutos. Se adicionaron 16 ml de una mezcla de etanol - agua 7:1 (v/v) a la torta de filtro y la solución de lavado se extrajo a través del filtro por succión al vacío. El paso de lavado se repitió con otros 16 ml de la misma mezcla de etanol - agua. La torta de filtro se secó al aire durante 20 minutos (se aspiró aire a través del filtro de vidrio poroso; 24 °C, 41 % de humedad relativa). Después de aproximadamente 10 minutos, la torta de filtro se rompió en trozos más pequeños y los grumos se trituraron ligeramente usando una espátula. Después de 20 minutos, el material sólido se transfirió a una botella de vidrio de 40 ml. Se obtuvieron 4,36 gramos (aproximadamente 86 % de rendimiento, ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 89,94 % p/p) de un polvo fino ligeramente amarillo como producto sólido y se caracterizó por difracción de rayos X en polvo, espectroscopía H-RMN y TG-FTIR. La microscopía óptica y PXRD confirmaron la naturaleza cristalina de la muestra y la espectroscopía H-RMN estuvo de acuerdo con la integridad química del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y no mostró una cantidad significativa de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. Una investigación adicional realizada por TG-FTIR reveló una pérdida de masa de aproximadamente 1,6 %, atribuible al agua. El contenido de sodio encontrado por ICP-OES fue 4,59 %, lo que está en buena concordancia con una sal monosódica. HPLC mostró una pureza de 97,4 %.

Ejemplo 4: Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con 4-(2-hidroxietil)-morfolina como formador de co-sal y siembra.

El primer paso del experimento se llevó a cabo en un vial separado a fin de prevenir semillas de ácido libre de MTHF cristalino en el reactor de vidrio más grande.

Se pesaron 9,3888 gramos de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidratado (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,65 % p/p) en un recipiente de vidrio de 60 ml equipado con una barra agitadora magnética. Se adicionaron 20,00 ml de solución estándar de hidróxido de sodio 1,00 mol/L y 2,940 ml de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. Después de agitar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, se formó una solución clara marrón con un pH de aproximadamente 6,9. Esta solución se transfirió a un reactor de vidrio de 350 ml y se agitó con un agitador de paletas. La fase gaseosa se purgó usando un flujo de nitrógeno seco y la mezcla se calentó a 80 °C en aproximadamente 20 minutos. A 80 °C, todavía estaba presente una solución y se adicionaron 20 ml de etanol dentro de aproximadamente 6 minutos antes de adicionar 7 mg de sal monosódica de MTHF cristalina de acuerdo con el ejemplo 1 como cristales de siembra. En aproximadamente 13 minutos, se adicionaron 50 ml adicionales de etanol en tanto que se agitaba (aproximadamente 340 rpm). Durante la adición de etanol, la solución se sembró varias veces usando de 5 mg a 7 mg de los mismos cristales de siembra, pero se observó una solución turbia en lugar de una suspensión. En aproximadamente 85 minutos, se adicionaron 80 ml adicionales de etanol (en total 150 ml) en tanto que se agitaba. Durante la adición de etanol, la siembra se realizó varias veces cada vez usando 3 mg a 9 mg de los mismos cristales de siembra. Sin embargo, por observación visual, el sistema se juzgó como una emulsión con material ligeramente marrón adherido a la pared de vidrio del reactor. La mezcla entonces se agitó a 80 °C durante 10 minutos y una pequeña cantidad del material marrón claro se raspó de la pared de vidrio usando una espátula. Con el paso del tiempo, se formó una suspensión débil. En tanto que se agitaba, algo de material que se adhirió a la pared de vidrio se redispersó raspándolo de la pared de vidrio usando una espátula. Después de agitar a 500 rpm a 80 °C durante aproximadamente 2,5 horas, se había formado una suspensión amarilla que era fácil de agitar pero aún contenía grumos marrones relativamente pequeños. La filtración en caliente se llevó a cabo usando un filtro de vidrio poroso (porosidad P4, Ø 5 cm) y la torta de filtro se secó al aire durante aproximadamente 2 minutos. El reactor de vidrio se lavó dos veces con 30 ml de una mezcla de etanol - agua 7:1 (v/v) que se adicionó a la torta de filtro y la solución de lavado se extrajo a través del filtro por succión al vacío. La torta de filtro entonces se lavó una tercera vez usando 30 ml usando la misma mezcla de etanol - agua. La torta de filtro se secó al aire durante 30 minutos (se aspiró aire a través del filtro de vidrio poroso; 23 °C, 59 % de humedad relativa). Después de aproximadamente 7 minutos, la torta de filtro se rompió en trozos más pequeños y los grumos se trituraron ligeramente usando una espátula. Después de 30 minutos, el producto sólido (8,28 gramos) se transfirió a un recipiente de vidrio de 60 ml y se extrajo una muestra para el análisis por PXRD, lo que confirmó la presencia de sal de mono-Na de MTHF cristalina. El material sólido restante se secó al vacío a 80 °C / aproximadamente 1000 mPa (10 mbar) durante 0,5 horas. El producto sólido fue 8,05 g (rendimiento de aproximadamente 78 %, ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 89,12 % p/p) de un polvo fino ligeramente amarillo. La caracterización por PXRD mostró que el secado no condujo a un cambio de la forma cristalina. La espectroscopía H-RMN confirmó la integridad química del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y no mostró una cantidad significativa de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. La muestra se investigó adicionalmente por TG-FTIR y HPLC. HPLC mostró una pureza de 96,5 %.

Ejemplo 5: Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en etanol con 2-dietilaminoetanol como formador de co-sal y siembra.

Se pesaron 467 mg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico monohidratado (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,65 % p/p) en un vial de vidrio equipado con una barra agitadora magnética. Se adicionaron 1,0 ml de solución estándar de hidróxido de sodio 1,00 M, 5,0 ml de etanol y 100 µl de 2-dietilaminoetanol. La mezcla se calentó a 80 °C y bajo agitación y entonces se adicionaron cristales de siembra de la sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-

5 tetrahidrofólico de acuerdo con el ejemplo 1 y la agitación a 80 °C se continuó durante una hora antes de que el sólido se separara por filtración en caliente usando un filtro de vidrio poroso (porosidad P4) y se secó al aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 370 mg (55 % de rendimiento, ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 68,2 % p/p) de producto sólido y se caracterizó por difracción de rayos X en polvo y HPLC. HPLC mostró una pureza de 93,7 %.

Ejemplo 6: Solubilidad cinética de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

10 Paso 1: Se pesan 23,8 mg de sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico cristalina en un vial de vidrio de 7 ml con tapón de rosca. Se adicionan 2,38 ml de agua purificada/desionizada (por ejemplo, agua para cromatografía) al sólido usando una pipeta volumétrica ajustable. La mezcla se agita vigorosamente a temperatura ambiente y se trata con ultrasonido brevemente y se obtiene fácilmente una solución clara ligeramente amarilla. Por lo tanto, la solubilidad es mayor que 10 mg por 1 ml de agua. La solución permanece clara durante más de 20 horas a temperatura ambiente

15 Paso 2: Se pesan 62,3 mg de sal monosódica cristalina en un vial de vidrio de 7 ml con tapón de rosca. Se adicionan 4,15 ml de agua purificada/desionizada (por ejemplo, agua para cromatografía) al sólido usando una pipeta volumétrica ajustable. La mezcla se agita vigorosamente a temperatura ambiente y se trata con ultrasonido brevemente y se obtiene fácilmente una solución clara ligeramente amarilla. Por lo tanto, la solubilidad es mayor que 15 mg por 1 ml de agua. La solución permanece clara durante varias horas a temperatura ambiente

20 Paso 3: Se pesan 72,6 mg de sal monosódica de MTHF cristalina en un vial de vidrio de 7 ml con tapón de rosca. Se adicionan 2,9 ml de agua purificada/desionizada (por ejemplo, agua para cromatografía) al sólido usando una pipeta volumétrica ajustable. La mezcla se agita vigorosamente a temperatura ambiente y se trata con ultrasonido brevemente y se obtiene fácilmente una solución clara ligeramente amarilla. Por lo tanto, la solubilidad es mayor que 25 mg por 1 ml de agua. La solución permanece clara durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente

25 **Ejemplo de referencia 7:** Solubilidad cinética de la sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

30 Se pesan 27,9 mg de sal de calcio cristalina de MTHF (que contiene aproximadamente 11 % de agua, lo que corresponde a un peso seco de aproximadamente 25 mg) en un vial de vidrio de 4 ml con tapón de rosca. Se adicionan 2,535 ml de agua purificada/desionizada (por ejemplo, agua para cromatografía) al sólido usando una pipeta volumétrica ajustable. La mezcla se agita vigorosamente a temperatura ambiente y se trata con ultrasonido brevemente. No se puede obtener una solución clara y persiste una suspensión bastante concentrada; por lo tanto, la solubilidad es considerablemente menor que 10 mg por 1 ml de agua.

35 **Ejemplo 8:** Propiedades en secado de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

40 Una muestra de sal monosódica cristalina de acuerdo con al menos uno de los ejemplos anteriores se investiga por termogravimetría acoplada con espectroscopía infrarroja (TG-FTIR). Las mediciones termogravimétricas se realizaron con una masa de muestra de aproximadamente 6 mg. La pérdida de masa a 200 °C es aproximadamente 1,3 %, que corresponde esencialmente al contenido de agua de la sal monosódica cristalina después de secarse al aire a temperatura ambiente. La misma muestra se examina ahora por análisis por sorción dinámica de vapor (DVS). Se colocan aproximadamente 20 mg de muestra en una bandeja de muestras de aluminio. Se usaron velocidades de cambio de humedad de 5 % por hora. El programa de medición aplicado se visualiza en la figura (trazo discontinuo) y se describe más adelante. La presentación muestra el contenido efectivo de agua con una corrección basada en el resultado de TG-FTIR. La muestra se colocó en un soporte de aluminio en la parte superior de una microbalanza y se dejó equilibrar a 50 % hr antes de comenzar el programa de humedad predefinido de la siguiente manera:

- 45 (1) 2 horas a 50 % de humedad relativa
 (2) 50 --+ 0 % de humedad relativa (5 %/ hora); 10 horas a 0 % de humedad relativa
 (3) 0 --+ 75 % de humedad relativa (5 %/ hora); 5 horas a 75 % de humedad relativa
 (4) 75 --+ 0 % de humedad relativa (5 %/ hora); 10 horas a 0 % de humedad relativa
 (5) 0 --+ 50 % de humedad relativa (5 %/ hora); 2 horas a 50 % de humedad relativa

50 El resultado como se muestra en la figura 2 muestra que toda el agua de la muestra se remueve esencialmente después de diez horas de purga de nitrógeno a temperatura ambiente.

55 **Ejemplo de referencia 9:** Secado de la sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

60 Se examina una muestra de sal de calcio cristalina de MTHF por titulación de Karl Fischer para evaluar el contenido de agua. El contenido de agua encontrado es 12,4 %. A partir de entonces, la misma muestra se investiga por DVS de acuerdo con el mismo programa de medición que para la sal monosódica del ejemplo anterior. Los resultados como se muestran en la figura 3 que después de 10 horas de secado bajo nitrógeno a temperatura ambiente, el

contenido de agua sigue siendo del orden de 6 a 7 %, lo que significa que menos de la mitad del agua se puede remover bajo condiciones idénticas.

5 **Ejemplo 10:** Contenido de agua de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico bajo condiciones de humedad relativa cambiantes.

10 Una muestra de sal monosódica cristalina de MTHF de acuerdo con al menos uno de los ejemplos anteriores se investiga por termogravimetría acoplada con espectroscopía infrarroja (TG-FTIR). Las mediciones termogravimétricas se realizaron con una masa de muestra de aproximadamente 6 mg. La pérdida de masa a 200 °C es aproximadamente 1,3 %, que corresponde esencialmente al contenido de agua de la sal monosódica cristalina después de secarse al aire a temperatura ambiente. La misma muestra se examina ahora por análisis por sorción dinámica de vapor (DVS). Se colocan aproximadamente 20 mg de muestra en una bandeja de muestras de aluminio. Se usaron velocidades de cambio de humedad de 5 % por hora. Cuando corresponda, el programa de medición aplicado se visualiza en la figura (trazo discontinuo) y se describe más adelante.

15 La presentación muestra el contenido efectivo de agua con una corrección basada en el resultado de TG-FTIR. La muestra se colocó en un soporte de aluminio o platino en la parte superior de una microbalanza y se dejó equilibrar a 50 % hr antes de comenzar el programa de humedad predefinido de la siguiente manera:

20 (1) 2 horas a 50 % de humedad relativa

(2) 50 --+ 0 % de humedad relativa (5 %/ hora); 10 horas a 0 % de humedad relativa

25 (3) 0 --+ 75 % de humedad relativa (5 %/ hora); 5 horas a 75 % de humedad relativa

(4) 75 --+ 0 % de humedad relativa (5 %/ hora); 10 horas a 0 % de humedad relativa

(5) 0 --+ 50 % de humedad relativa (5 %/ hora); 2 horas a 50 % de humedad relativa

30 El resultado como se muestra en la figura 4 muestra que el cambio del contenido de agua dentro del intervalo más relevante de humedad relativa entre 20 % y 7 5% es aproximadamente 1,7 %.

35 **Ejemplo de referencia 11:** Contenido de agua de la sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico bajo condiciones de humedad relativa cambiantes.

40 Se somete una muestra de sal de calcio cristalina de MTHF al mismo programa de humedad relativa en un instrumento de DVS. Los resultados como se representan en la figura 5 muestran que el cambio del contenido de agua dentro del intervalo más relevante de humedad relativa entre 20 % y 7 5% es aproximadamente 3,5 %.

45 **Ejemplo 12:** Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con 2 equivalentes de 4-(2-hidroxietil)-morfolina como formador de co-sal.

50 A una mezcla de 40 g de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 95,4 % p/p) y 86 g de agua, se adicionaron 3,46 g de hidróxido de sodio sólido y 21,79 g de 4-(2-hidroxietil) morfolina a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno en tanto que se agitaba. La mezcla se adicionó en 5,5 horas a una mezcla de 472 g de etanol con 2-propanol al 5 % v/v y 0,4 g de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 75-78 °C bajo una atmósfera de nitrógeno en tanto que se agitaba. Se adicionaron 3 g de agua y la mezcla se agitó durante una hora adicional a 76 °C. Los sólidos se separaron por filtración, se lavaron tres veces con cada 133 ml de etanol 5 % 2-propanol/agua 7:1 v/v y se secaron al vacío a 40 °C durante 16,5 horas para dar 42,0 g de un polvo blanquecino que corresponde a 102 % de rendimiento (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 92,45 % p/p). PXRD confirmó la naturaleza cristalina de la muestra y la espectroscopía H-RMN estuvo de acuerdo con la integridad química del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y no mostró una cantidad significativa de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. Una investigación adicional realizada por TGA (análisis termogravimétrico) reveló una pérdida de masa de aproximadamente 0,86 %. El contenido de sodio encontrado por IC (cromatografía iónica) fue 4,94 %, lo que está en buena concordancia con una sal monosódica. HPLC mostró una pureza de 98,2 %.

55 **Ejemplo 13:** Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico con una pureza de 98,6 % por recristalización de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en la presencia de 1 equivalente de 4-(2-hidroxietil)-morfolina.

60 Se adicionaron 2 g de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 92,63 % p/p) a una mezcla de 10 g de agua y 0,51 g de 4-(2-hidroxietil) morfolina bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 10 minutos a 25 °C, la mezcla se adicionó a una mezcla de 70 ml de etanol con 2-propanol al 5 % v/v y 0,05 g de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 72 °C en 2,5 horas bajo una atmósfera de nitrógeno en tanto que se agitaba. La mezcla se agitó durante 2,5

5 horas adicionales a 72 °C. Los sólidos se separaron por filtración, se lavaron con 20 ml de etanol 5 % 2-propanol/agua 7:1 v/v y se secaron al vacío a 33 °C durante 18 horas para dar 1,75 g de un polvo blanquecino que corresponde a 87 % de rendimiento (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 92,5 % p/p). PXRD confirmó la naturaleza cristalina de la muestra y la espectroscopía H-RMN estuvo de acuerdo con la integridad química del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y no mostró una cantidad significativa de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. Una investigación adicional realizada por TGA (análisis termogravimétrico) reveló una pérdida de masa de aproximadamente 1,48 %. El contenido de sodio encontrado por IC (cromatografía iónica) fue 4,83 %, lo que está en buena concordancia con una sal monosódica. HPLC mostró una pureza de 98,6 %.

10 **Ejemplo 14:** Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a partir de una sal 1:1:1 cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, sodio y 4-(2-hidroxietil)-morfolina.

15 Se suspendieron 5 g de una sal 1:1:1 de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, sodio y 4-(2-hidroxietil)-morfolina (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 70,60 % p/p) en una mezcla de 49,4 g de etanol 5 % v/v 2-propanol y 12,5 g de agua bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 3 horas a 74 °C. Los sólidos se separaron por filtración y se lavaron con 17 ml de una mezcla de etanol /agua 7:1 v/v. Los sólidos se secaron a 40 °C al vacío para dar 2,93 g de un polvo blanquecino que corresponde a 78 % de rendimiento (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 93,65 % p/p). PXRD confirmó la naturaleza cristalina de la muestra y la espectroscopía H-RMN estuvo de acuerdo con la integridad química del ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y no mostró una cantidad significativa de 4-(2-hidroxietil)-morfolina. Una investigación adicional realizada por TGA (análisis termogravimétrico) reveló una pérdida de masa de aproximadamente 0,30 %. El contenido de sodio encontrado por IC (cromatografía iónica) fue 4,56 %, lo que está en buena concordancia con una sal monosódica. HPLC mostró una pureza de 99,02 %.

20 **Ejemplo 15:** Preparación de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a mayor escala

25 Todas las operaciones se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno si no se menciona nada más. Los solventes en el recipiente de reacción y cristalización se condensaron durante el calentamiento.

30 Se adicionaron 9,6 kg de 4-(2-hidroxietil) morfolina a 101,7 kg de una mezcla de agua/etanol (2-propanol al 5 %) 1:1 v/v en un recipiente de reacción a temperatura ambiente en tanto que se agitaba. Se adicionaron 1,0 kg adicionales de agua/etanol (2-propanol al 5 %) 1:1 v/v seguido de 28,8 kg de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,17 % p/p) en tanto que se agitaba. Se adicionaron 2 kg adicionales de una mezcla de agua/etanol (2-propanol al 5 %) 1:1 v/v. Entonces se adicionaron 8,7 kg de una solución acuosa de hidróxido de sodio (ensayo de hidróxido de sodio 29,22 % p/p) al recipiente de reacción seguido de 1 kg de una mezcla de agua/etanol (2-propanol al 5 %) 1:1 v/v. La mezcla se calentó a 38 °C y el pH de la solución resultante fue 7,56. La solución se transfirió del recipiente de reacción sobre un filtro a un recipiente de cristalización. Las tuberías de transferencia y el filtro se lavaron con 9,8 kg de una mezcla de agua/etanol (2-propanol al 5 %) 1:1 v/v. Los lavados se adicionaron al filtrado. El filtrado se calentó a 75,1 °C en tanto que se agitaba y en 59 minutos se adicionaron 53,8 kg de etanol (2-propanol al 5 %) en tanto que se mantenía la temperatura entre 75,1 y 80,4 °C. La mezcla se enfrió a 64,8 °C y se adicionaron 0,29 kg de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico para la siembra. La mezcla se calentó nuevamente a 74,5 °C y se adicionaron 286,2 kg de etanol (2-propanol al 5 %) en 3 horas en tanto que se mantenía la temperatura entre 70 y 80 °C. La mezcla se enfrió a 71 °C y se agitó durante 13 horas y 37 minutos en tanto que se mantenía la temperatura entre 65 y 75 °C. Entonces, 35 la mezcla se enfrió a 59,9 °C y los cristales se separaron por centrifugación. Los cristales en la centrífuga se lavaron con una mezcla de 38,0 kg de etanol (2-propanol al 5 %) y 6,9 kg de agua mediante el recipiente de cristalización y directamente mediante una tubería CIP (limpieza en el lugar) con una mezcla de 38,1 kg de etanol (2-propanol al 5 %) y 6,9 kg de agua seguido de 43,8 kg de etanol (2-propanol al 5 %). Después de la separación de los líquidos de lavado por centrifugación, los cristales se transfirieron a un secador y se secaron durante 12 horas y 7 min a 50 °C al vacío (10100 mkPa (101 mbar)) usando un flujo de nitrógeno de 500 L/min. Se tomó una muestra para medir el contenido de solventes residuales. El contenido de agua de la muestra fue 0,49 % p/p y el contenido de etanol fue 0,04 % p/p. No se detectó 2-propanol. Se removieron 22,98 kg de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (ensayo de ácido 5-metiltetrahidrofólico 97,9 % p/p) del secador, que corresponde a un rendimiento corregido en ensayo de 75,9 %.

40 **Ejemplo 16:** Solubilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

45 La solubilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua se midió al determinar la concentración de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en el líquido sobrenadante después de haber agitado una suspensión de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua durante 30 minutos, manteniendo siempre un exceso de material sólido en el fondo del matraz. La solubilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua a temperatura ambiente fue 9,3 mg/ml (equivalente a 9,6 mg/ml de la sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico).

50 **Ejemplo 17:** Solubilidad de la sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en agua medida bajo las mismas condiciones fue 7,1 mg/ml.

Ejemplo de referencia 17: Preparación de la sal monosódica amorfica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

5 Se adicionaron 6,0 g de sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico cristalina a temperatura ambiente a 600 g de agua. Los sólidos se removieron por filtración por succión. El filtrado se congeló en un baño con nitrógeno líquido y se liofilizó al vacío a 7 mPa (0,07 mbar). Después de 2 días, el vacío se reemplazó por gas nitrógeno. Se obtuvieron 6,0 g de sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico amorfica con una pureza de 95,2 % de área, contenido de agua 8,8 % p/p, ensayo de sodio 4,5 % p/p.

Ejemplo 18: Estabilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

10 A de comparar las estabilidades a largo plazo de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, el compuesto de la invención, con la estabilidad a largo plazo de la sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico preparada de acuerdo con US 6,441,168 B1, se han generado datos de estabilidad respectivos a 15 diferentes temperaturas y humedades.

(a) Estabilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 25 °C/60%hr

20 La sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, preparada de acuerdo con los procedimientos de la literatura (US 6,441,168 B1) y la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, preparada como se divulga en el ejemplo 15, se almacenaron a 25 °C/60 %hr. Se midió el contenido de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico restante en las muestras por HPLC a intervalos periódicos (% p/p). Los resultados se muestran en la tabla 3a y figura 7. 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 las tablas 3b. Además, se midió el contenido del derivado de pirazino-s-triazina de 4a-hidroxi-5-metil-THF (MeFox), un producto de degradación principal, por HPLC a intervalos periódicos y se divulgó como valores absolutos (% p/p). Los resultados se muestran en la tabla 4 y figura 8.

30 Tabla 3a: Estabilidad a largo plazo de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 25 °C/60% hr (% p/p)

	Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% p/p)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	94,7	93,0	94,2	95,6	94,1
sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	80,7	79,0	77,7	78,5	77,9

35 Tabla 3b: Estabilidad a largo plazo de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 25 °C/60% hr (% rel.)

	Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% rel.)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	100,0	98,3	99,5	101,0	99,4
sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	100,0	97,9	96,3	97,3	96,5

40 Tabla 4: Estabilidad a largo plazo de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 25 °C/60%hr (producto de degradación principal [MeFox])

	Derivado de pirazino-s-triazina de 4a-hidroxi-5-metil-THF (MeFox) (% p/p)				
	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	0,06	0,04	0,09	0,11	0,05
sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico	0,20	0,84	0,90	0,85	0,86

40 (b) Estabilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 40 °C/75%hr

5 La sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, preparada de acuerdo con los procedimientos de la literatura (US 6,441,168 B1) y la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, preparada como se divulga en el ejemplo 15, se almacenaron a 40 °C/75 %hr. Se midió el contenido de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico restante en la muestra por HPLC a intervalos periódicos (% p/p). Los resultados se muestran en la tabla 5a y figura 9. 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 las tablas 5b. Además, se midió el contenido del derivado de pirazino-s-triazina de 4α-hidroxi-5-metil-THF (MeFox), un producto de degradación principal, por HPLC a intervalos periódicos y se divulgó como valores absolutos (% p/p). Los resultados se muestran en la tabla 6 y figura 10.

10

Tabla 5a: Estabilidad a largo plazo de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 40 °C/75% hr (% p/p)

		Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% p/p)				
		0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico		94,7	92,7	(81,8) ¹	94,8	92,9
sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico		80,7	78,5	78,0	78,8	77,8

¹Error de laboratorio más probable

15 Tabla 5b: Estabilidad a largo plazo de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 40 °C/75% hr (% rel.)

		Ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (% rel.)				
		0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico		100,0	98,0	(86,4) ¹	100,1	98,2
sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico		100,0	97,2	96,6	97,6	96,3

¹Error de laboratorio más probable

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

		Derivado de pirazino-s-triazina de 4α-hidroxi-5-metil-THF (MeFox) (% p/p)				
		0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico		0,06	0,05	0,08	0,13	0,05
sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico		0,20	1,01	0,96	0,93	0,95

25 Las tablas 3 a 6 con los datos de estabilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico como se divulga en la presente invención muestran claramente que

i) hay una diferencia notable en la estabilidad de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico en comparación con la sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y

30 ii) la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es mucho más estable durante un largo período de tiempo que la sal de calcio cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.

REIVINDICACIONES

1. Una sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico donde la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a sodio es de 1:0,5 a 1:1,5 o hidratos o solvatos del mismo.
- 5 2. La sal cristalina de la reivindicación 1, donde la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a sodio es de 1:0,75 a 1:1,25.
- 10 3. La sal cristalina de la reivindicación 1 o 2, donde la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a sodio es 1:1.
- 15 4. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la sal es la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación de CuK α) a 6,5, 10,2, 13,1, 15,3, 17,9, 20,5 y 22,0.
- 5 5. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la sal es la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y tiene un patrón de PXRD con al menos un pico característico (expresado en $2\theta \pm 0,2^\circ$ 2θ (radiación de CuK α) a 6,5, 10,2, 12,5, 13,1, 14,8, 15,1, 15,3, 16,1, 17,2, 17,9, 20,4, 20,5, 21,2, 22,0, 22,5 y 27,2.
- 20 6. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico tiene un patrón de PXRD como se muestra en la figura 1.
- 25 7. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la sal sódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico es una sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico.
- 30 8. La sal cristalina de al menos una de las reivindicaciones anteriores que tiene al menos 99 % o más de pureza química.
9. Un proceso para obtener la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende los pasos de:
 - a) proporcionar ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, opcionalmente en un solvente adecuado o una mezcla de solventes;
 - 35 b) adicionar hidróxido de sodio a la composición del paso a);
 - c) adicionar un formador de co-sal y opcionalmente un solvente, o una mezcla de solventes a la composición del paso b), o adicionar la composición del paso b) a un formador de co-sal y un solvente o una mezcla de solventes;
 - d) cristalizar;
 - e) opcionalmente adicionar más solvente o mezcla de solventes; y
 - 40 f) aislar el sólido obtenido.
10. El proceso de la reivindicación 9, caracterizado porque la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico e hidróxido de sodio en el paso b) está en el intervalo de 1:0,5 a 1:1,5.
- 45 11. El proceso de la reivindicación 9 o 10, caracterizado porque la relación molar de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico y el formador de co-sal en el paso c) está en el intervalo de 1:0,5 a 1:3.
- 50 12. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que el solvente y/o mezclas de solventes de acuerdo con el paso a), c) y/o e) se selecciona del grupo que consiste en agua, alcoholes solubles en agua, metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetona, metil etil cetona, metil isobutil cetona, alcohol bencílico y mezclas de los mismos.
- 55 13. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque el formador de co-sal del paso c) es una base orgánica con un valor de pKa de 6 a 11.
14. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado porque el formador de co-sal del paso c) es una base orgánica con un valor de pKa de 7 a 10.
- 60 15. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizado porque un formador de co-sal del paso c) se selecciona del grupo que consiste en 4-(2-hidroxietil)-morfolina, 1-(2-hidroxietil)-pirrolidina, imidazol, 2-dimetilaminoetanol y terc-butilamina; y mezclas de los mismos.
- 65 16. El proceso de al menos una de la reivindicación 15, caracterizado porque un formador de co-sal del paso c) es 4-(2-hidroxietil)-morfolina.
17. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 9 a 16, caracterizado porque en el paso d) la temperatura

es al menos 30 °C.

18. El proceso de al menos una de las reivindicaciones 9 a 17, caracterizado porque en el paso a), b), c) y/o d) se adicionan cristales de siembra.

5 19. Una composición farmacéutica, aditivo alimentario o preparación vitamínica que comprende la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7 y opcionalmente uno o más excipientes aceptables.

10 20. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 en forma de tabletas, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, liofilizados, gránulos, pastillas, polvos reconstituyentes, soluciones o suspensiones inyectables o infundibles o supositorios.

15 21. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 19 o 20, caracterizada porque comprende además al menos un agente terapéutico adicional.

22. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 21, que es una composición farmacéutica para uso en administración oral, parenteral, intramuscular, intraespinal, intratecal, peridontal, tópica o rectal.

20 23. Uso de la sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7 como constituyente para la producción de fármacos y/o aditivos alimentarios.

25 24. La sal sódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento en la reducción de homocisteína, de anemia, defectos de tubo neural, enfermedades cardiovasculares, depresión, deterioro cognitivo, enfermedad de Alzheimer y osteoporosis y/o uso en el manejo dietético de folato bajo en plasma y/o folato bajo en glóbulos rojos y/o folato bajo en líquido cefalorraquídeo y/o folato bajo en el sistema nervioso periférico o central.

DIBUJOS

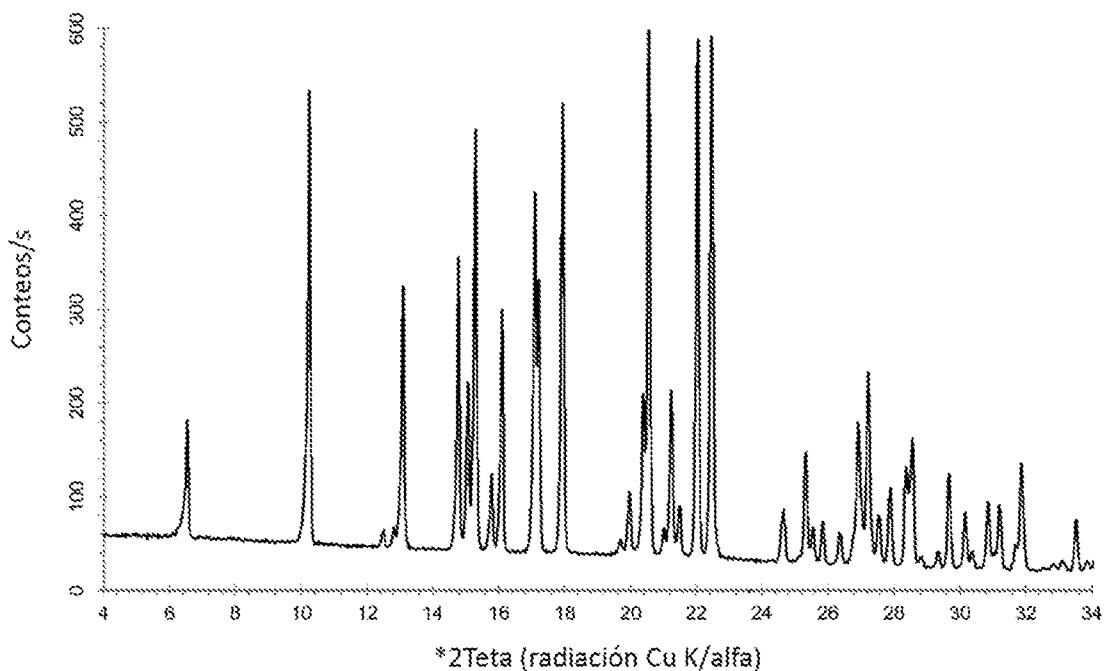


Figura 1: PXRD de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con el Ejemplo 1

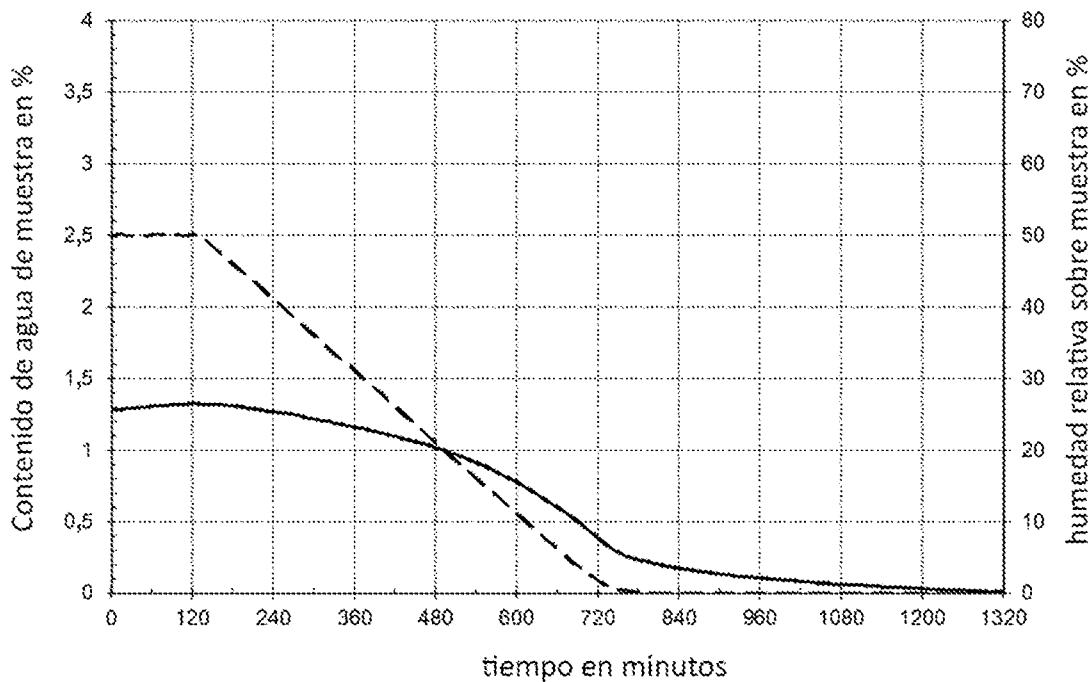


Figura 2: Propiedades en secado de sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

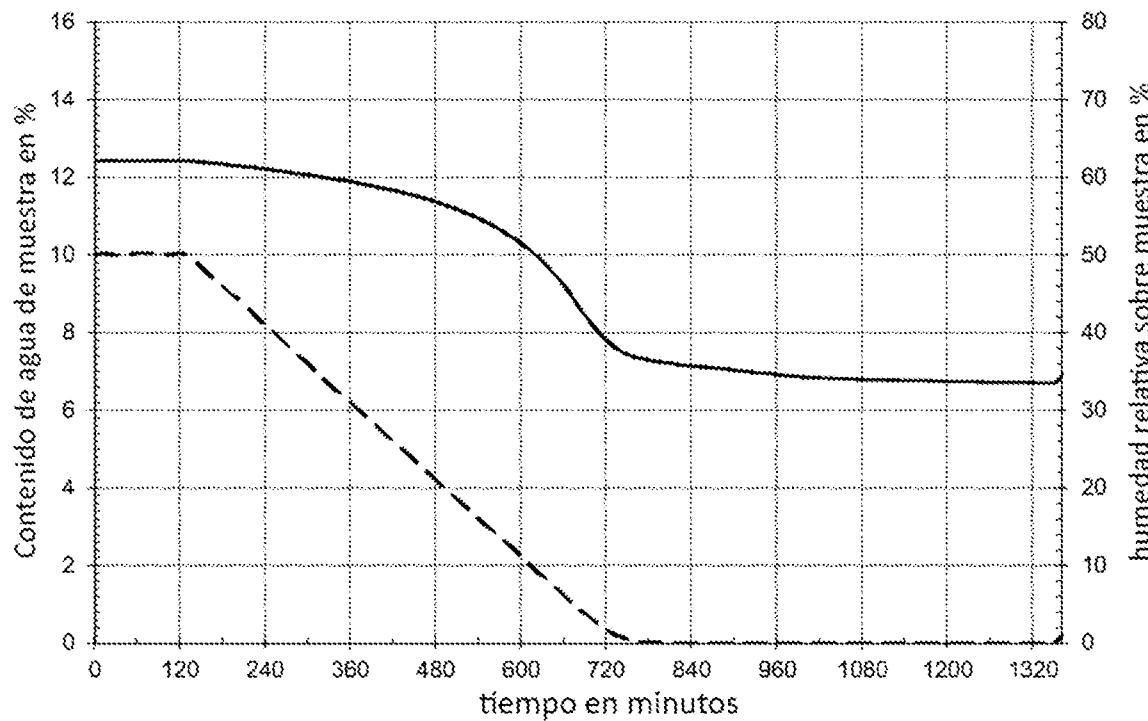


Figura 3: Propiedades de sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (referencia)

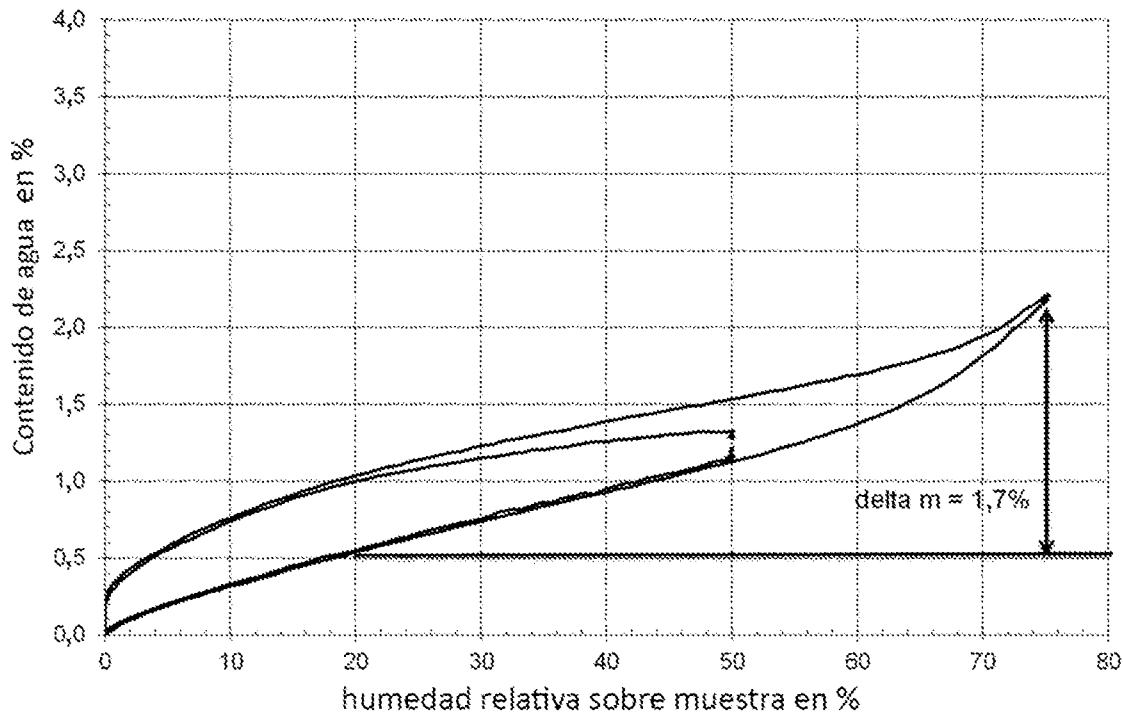


Figura 4: Contenido de agua variable bajo condiciones de humedad relativa cambiantes de sal monosódica de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico

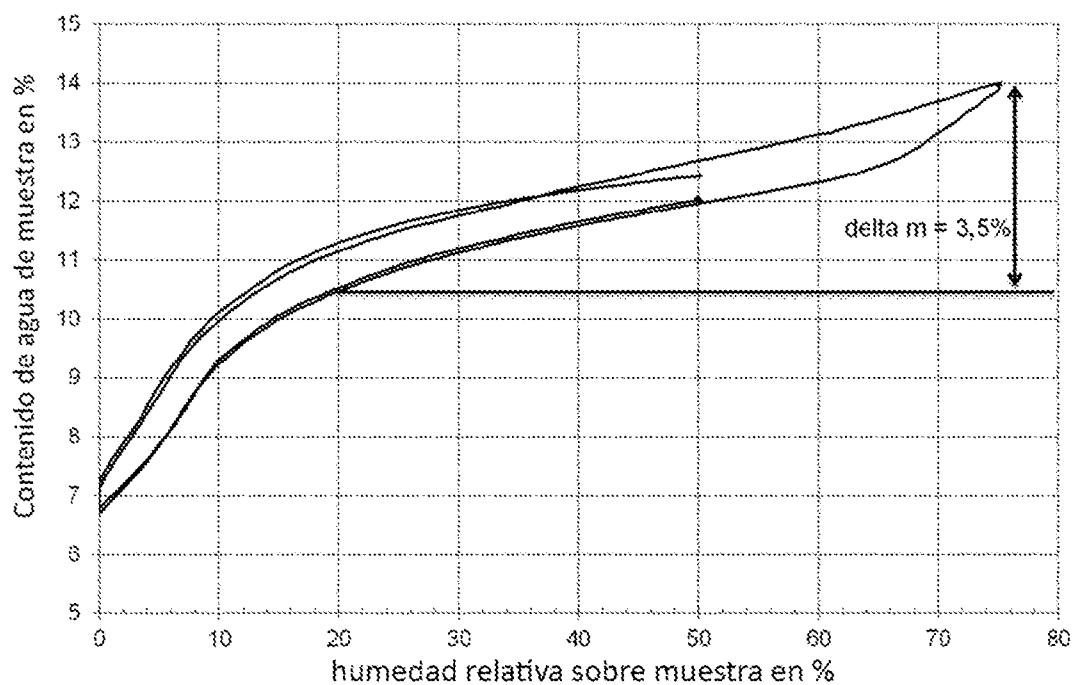


Figura 5: Propiedades de sal de calcio de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico (referencia)

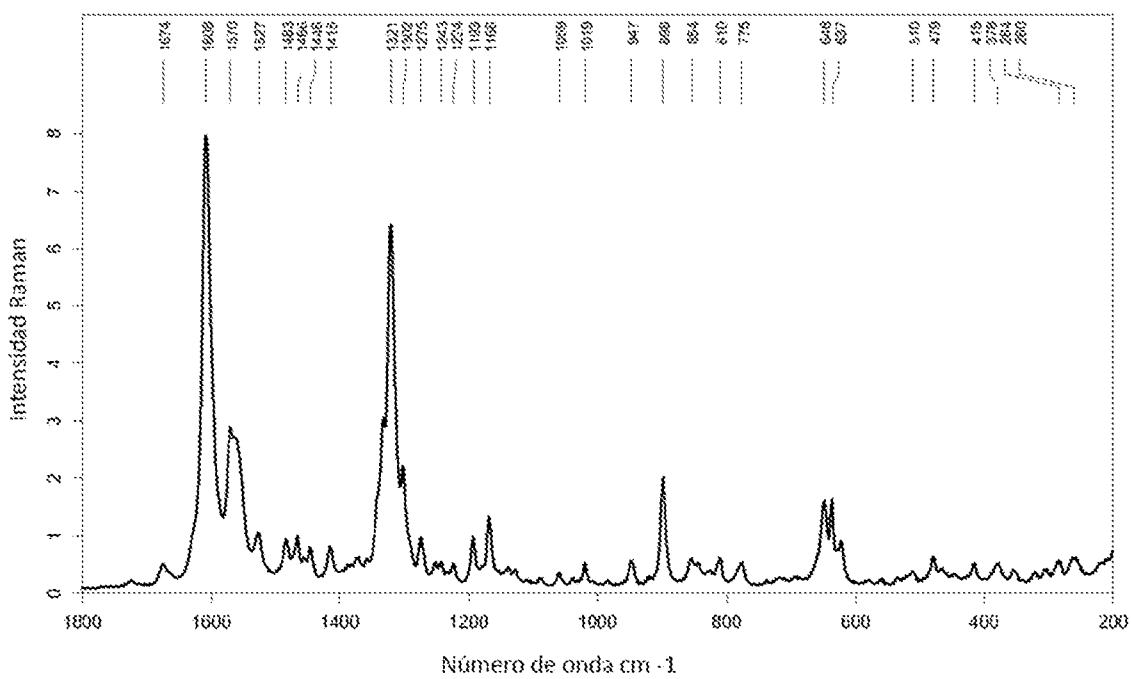


Figura 6: Región de huella de espectro FT-Raman de la sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico de acuerdo con el ejemplo 1 en el intervalo de número de onda de 200 a 1800 cm⁻¹

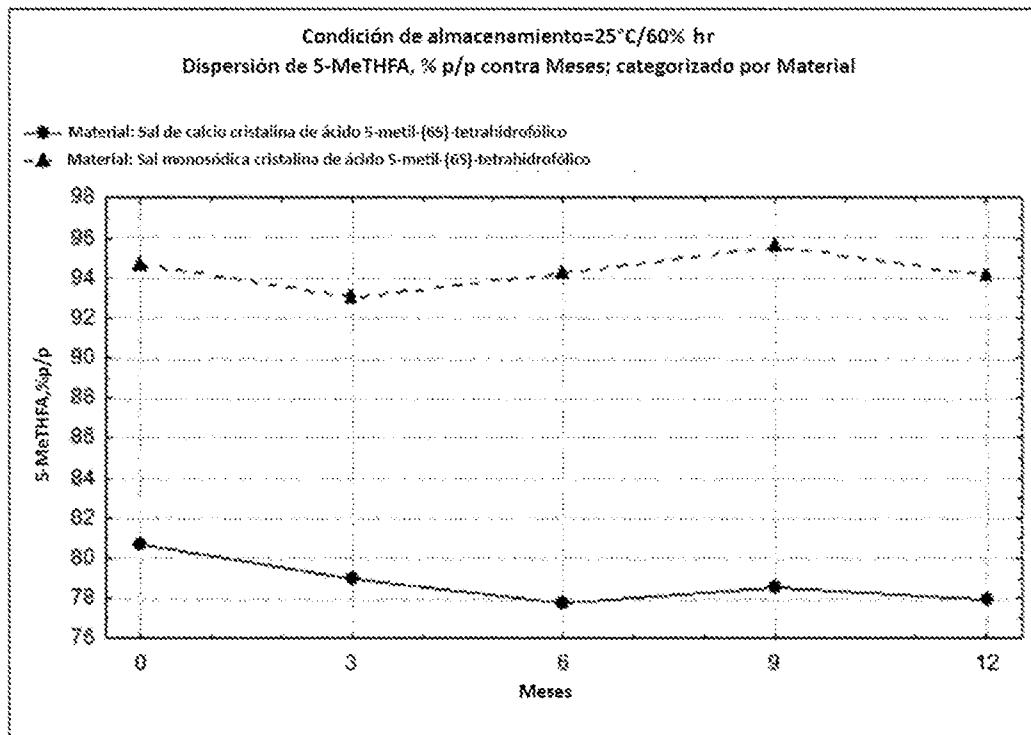


Figura 7: Estabilidad a largo plazo de la sal de monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 25°C/60%rh(% p/p)

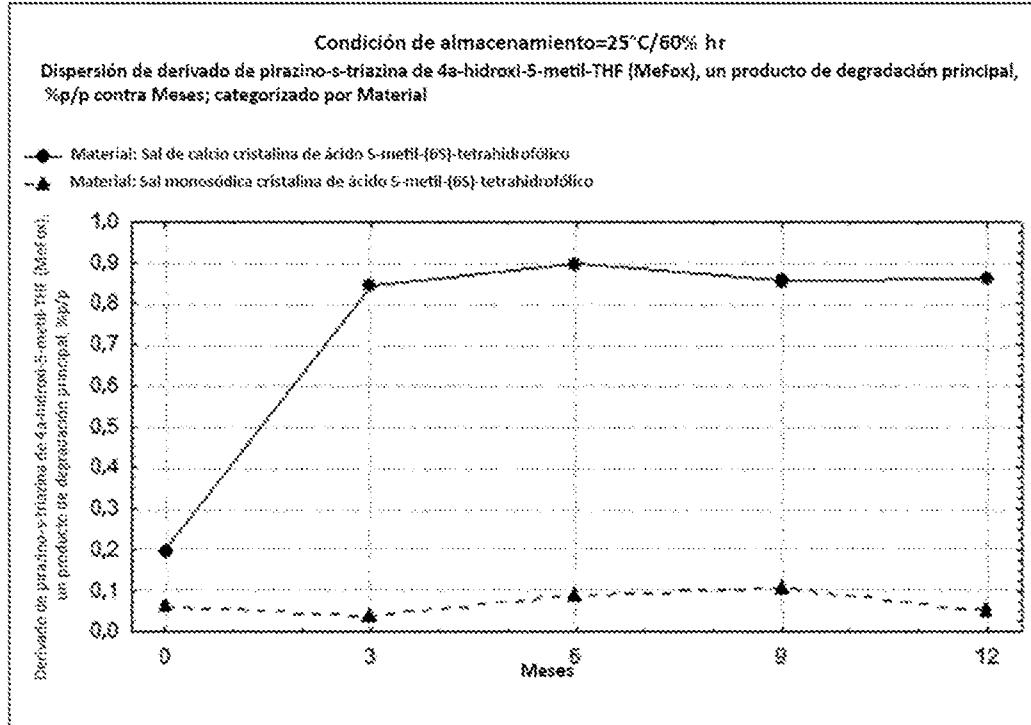


Figura 8: Estabilidad a largo plazo de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 25°C/60%rh (producto de degradación principal [MeFox]) (% p/p)

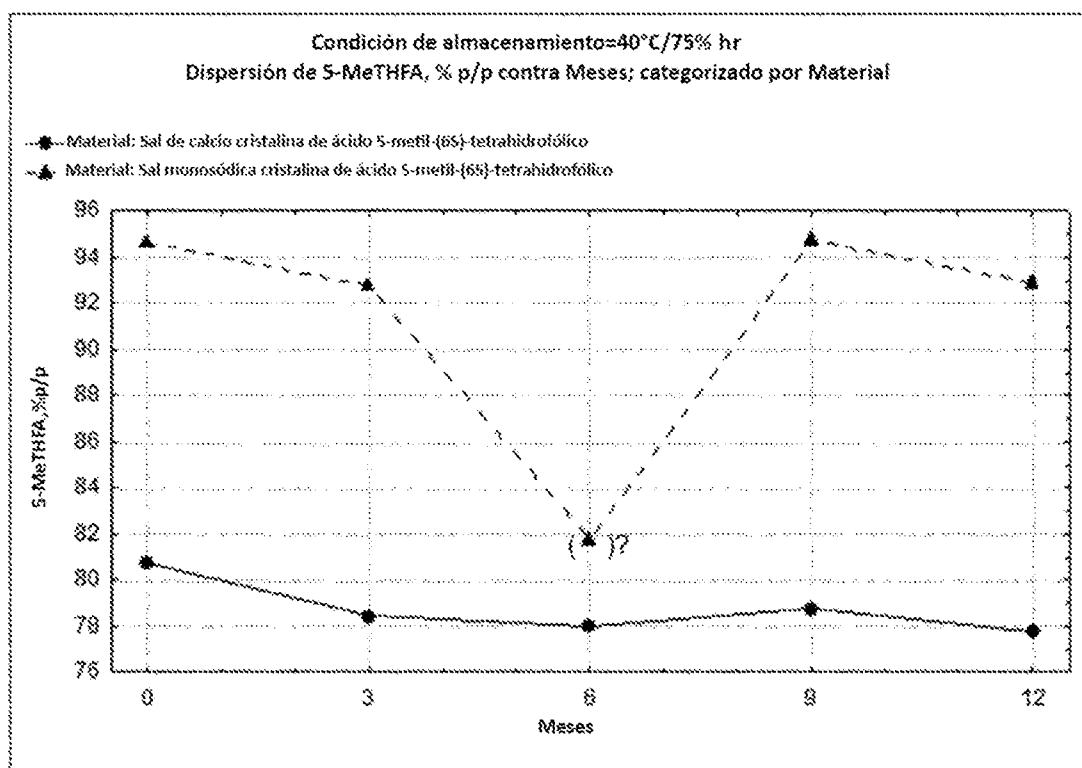


Figura 9: Estabilidad a largo plazo de la sal de monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 40°C/75%rh(% p/p)

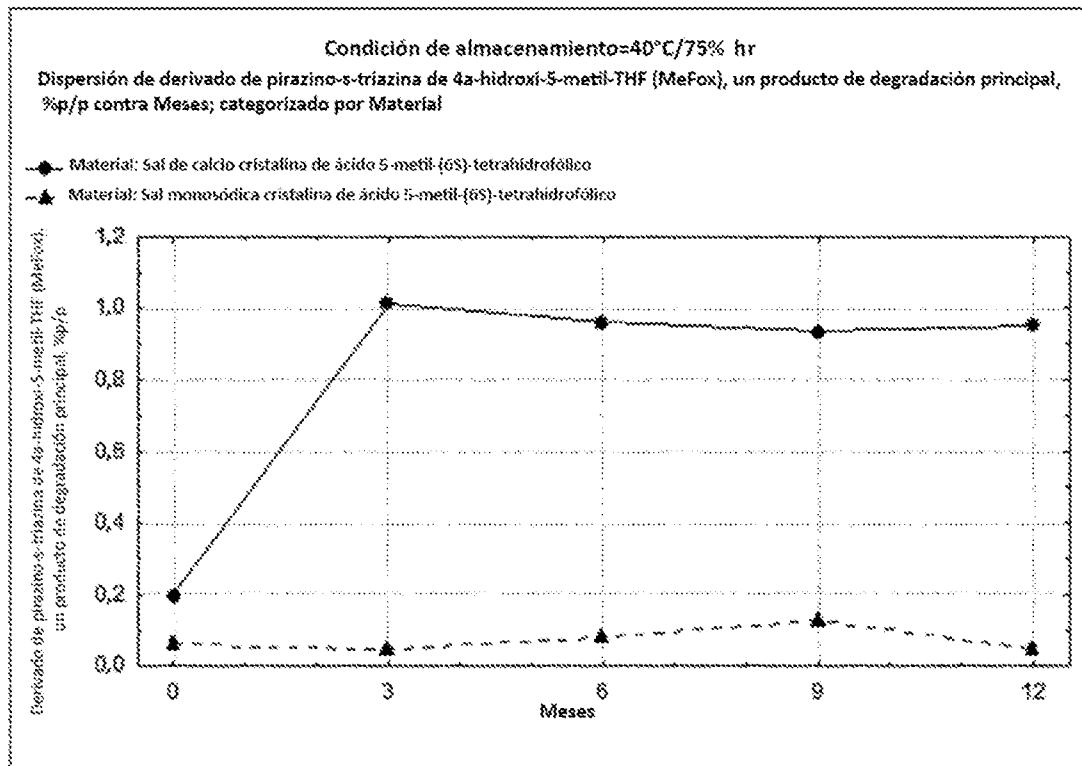


Figura 10: Estabilidad a largo plazo de sal monosódica cristalina de ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico a 40°C/75%rh (producto de degradación principal [MeFox]) (% p/p)