

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6617104号
(P6617104)

(45) 発行日 令和1年12月4日 (2019. 12. 4)

(24) 登録日 令和1年11月15日 (2019. 11. 15)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 475/04	(2006. 01)	C O 7 D 475/04	C S P
A 6 1 K 9/02	(2006. 01)	A 6 1 K 9/02	
A 6 1 K 9/08	(2006. 01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/10	(2006. 01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 9/14	(2006. 01)	A 6 1 K 9/14	

請求項の数 14 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-533926 (P2016-533926)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)
 (65) 公表番号 特表2016-528242 (P2016-528242A)
 (43) 公表日 平成28年9月15日 (2016. 9. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/067447
 (87) 国際公開番号 W02015/022407
 (87) 国際公開日 平成27年2月19日 (2015. 2. 19)
 審査請求日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)
 審判番号 不服2019-4220 (P2019-4220/J1)
 審判請求日 平成31年4月2日 (2019. 4. 2)
 (31) 優先権主張番号 13004050.4
 (32) 優先日 平成25年8月14日 (2013. 8. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 511089837
 メルク・アンド・コンパニー
 スイス国、8200 シャッフハウゼン、
 イム・ラテルネンアッカー、5
 (74) 代理人 100069556
 弁理士 江崎 光史
 (74) 代理人 100111486
 弁理士 鍛冶澤 實
 (74) 代理人 100139527
 弁理士 上西 克礼
 (74) 代理人 100164781
 弁理士 虎山 一郎
 (72) 発明者 モーザー・ルードルフ
 スイス連邦、8200 シャッフハウゼン、
 ラーンハルデ、11

早期審理対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5, 10-メチレン- (6R) -テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5, 10-メチレン- (6R) -テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のヘミ硫酸塩を、ヘミ硫酸塩含有率に関して少なくとも 80 % の化学的純度で有する組成物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のヘミ硫酸塩を、ヘミ硫酸塩含有率に関して 90 % 以上の化学的純度で有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のヘミ硫酸塩を、ヘミ硫酸塩含有率に関して 95 % 以上の化学的純度で有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のヘミ硫酸塩を、ヘミ硫酸塩含有率に関して 97 % 以上の化学的純度で有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のヘミ硫酸塩を、ヘミ硫酸塩含有率に関して 99 % 以上の化学的純度で有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

無水形態にある、請求項 1 に記載のヘミ硫酸塩。

10

20

【請求項 8】

請求項 1 もしくは 7 に記載の 5, 10-メチレン- (6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩または請求項 2～6 のいずれか 1 つに記載の組成物と、任意選択的に薬学的に許容可能なキャリアとを含む、医薬組成物。

【請求項 9】

錠剤、カプセル剤、経口用液体調製物、散剤、顆粒、ロゼンジ、または坐剤の形態にある、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

さらに少なくとも 1 種の追加的な治療剤を含む、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 11】

経口、非経口または直腸投与のための医薬組成物である、請求項 8～10 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項 12】

治療に使用するための、請求項 1 もしくは 7 に記載の 5, 10-メチレン- (6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩または請求項 8～10 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項 13】

癌化学療法に使用するための、請求項 1 もしくは 7 に記載の 5, 10-メチレン- (6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩または請求項 8～11 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

20

【請求項 14】

癌の治療のための、請求項 8～11 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、好ましくは実質的に結晶質形態にある、5, 10-メチレン- (6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩、ならびに、医薬組成物およびその治療、好ましくは化学療法における使用に向けられている。

【背景技術】

30

【0002】

還元されたホラートである、5, 10-メチレン-5, 6, 7, 8-テトラヒドロホラート (5, 10-CH₂-THF) は、固形腫瘍の治療において、その細胞増殖抑制剤としての有効性が知られており、好ましくはフッ化ピリミジン、例えば 5-フルオロウラシル (5-FU) と組み合わせて投与されてきた (Seley, K. L. *Drugs* 4 (1), 99, 2001 (非特許文献 1))。5, 10-CH₂-THF は、塩基アナログであり 5-FU 代謝産物である 5-FdUMP と一緒に、酵素チミジル酸シンターゼ (TS) を阻害することによって、その化学療法効果を達成する。TS は、DNA 合成の必須のビルディングブロックであるデオキシチミジレート (dTMP) へのデオキシウリジレート (dUMP) の変換を触媒する。TS の不活性化は、TS、5-FU の代謝産物である前記の塩基アナログ 5-FdUMP および 5, 10-CH₂-THF 間での共有結合三元阻害複合体の形成により起こる。5-FU の細胞障害性効果の強化は、5, 10-CH₂-THF の細胞内濃度を増加させ、その結果前記の三元複合体の安定性が増加することによって達成できる。これが DNA 合成および修復の直接の阻害を引き起こし、最終的に細胞死および腫瘍増殖の遅延をもたらす。

40

【0003】

しかしながら、5, 10-CH₂-THF に付随する望ましくない特性が存在し、このことが現在、その薬学的な使用を制限している。医薬用途に受け入れられるためには、活性物質 (例えば 5, 10-CH₂-THF) は、(i) 活性物質の物理化学的特性に著しい変化を示すことなく、許容可能な期間にわたる有効な保管が達成できるような、活性物

50

質自体およびその医薬組成物の高い（化学的な、異性体の、結晶の）安定性、（i i）活性物質の高い（化学的な、異性体の、結晶の）純度、（i i i）活性物質を適当な製剤等へ移すことが可能なような活性物質の取り扱いおよび加工の容易性、を含むいくつかの要件を満たす必要があることがよく知られている。

【0004】

5, 10-CH₂-THFはテトラヒドロ葉酸（THF）およびホルムアルデヒドの付加生成物であり（例えば、Poe, M. et al. Biochemistry 18 (24), 5527, 1979（非特許文献2）；Kallen, R. G. Methods in Enzymology 18B, 705, 1971参照（非特許文献3））、その空気による酸化への極めて高い感受性ならびに潜在的に化学分解および／または加水分解に至る中性および／または酸性環境における不安定性が知られている（例えばOdin, E. et al., Cancer Investigation 16 (7), 447, 1998（非特許文献4）；Osborn, M. J. et al., J. Am. Chem. Soc. 82, 4921, 1960（非特許文献5）；Hawkes, J., and Villota, R. Food Sci. Nutr. 28, 439, 1989（非特許文献6）参照）。5, 10-CH₂-THFを安定化するための試みには、例えば（i）空気不含環境における固体製剤の再構成および5, 10-CH₂-THFの注入のための特別な技術的デバイスの使用による、大気中酸素の厳密な排除（例えばOdin, E. et al., Cancer Investigation 16 (7), 447, 1998（非特許文献7）；U. S. Pat. No. 4, 564, 054（特許文献1）参照）；（i i）還元剤、例えばL（+）-アスコルビン酸またはその塩、還元型ガンマーグルタチオン、ベーターメルカプトエタノール、チオグリセロール、N-アセチル-L-システイン等の、高い感受性の5, 10-CH₂-THFのための、特にTHFのための酸化防止剤としての添加；（i i i）シクロデキストリン包接化合物による安定化（例えばEP0579996B1（特許文献2）参照）；（i v）pHを塩基性の値に調節しながらのクエン酸塩の添加（例えばEP1641460B1（特許文献3）参照）；または（v）種々の塩、例えば硫酸塩の形成（例えばEP0537492B1（特許文献4）参照）が含まれていた。

【0005】

それにもかかわらず、高い（化学的な、異性体のおよび／または結晶の）純度を示し、および／または化合物としても医薬組成物に製剤化された際も両方とも高い安定性を有し、さらに効率的に製造、精製および単離でき、ならびに／あるいは操作性（例えば薬学的に許容可能な溶媒における許容可能な溶解性、流動性および粒径）および／または無視できるほどの分解または化合物の物理的および化学的特性の変化を伴う製剤化を受け入れることができ、好ましくは高いモルパーセントで製剤化できる（治療的有效用量を生じさせるために製剤化され投与されなければならない物質の量を最小化するために）、安定化された5, 10-CH₂-THF化合物に対する大きな需要がなおも残されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】U. S. Pat. No. 4, 564, 054

【特許文献2】EP0579996B1

【特許文献3】EP1641460B1

【特許文献4】EP0537492B1

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Seley, K. L. IDrugs 4 (1), 99, 2001

【非特許文献2】Poe, M. et al. Biochemistry 18 (24), 5527, 1979

【非特許文献3】Kallen, R. G. Methods in Enzymology

10

20

30

40

50

18B, 705, 1971

【非特許文献4】Odin, E. et al., Cancer Investigation 16(7), 447, 1998

【非特許文献5】Osborn, M. J. et al., J. Am. Chem. Soc. 82, 4921, 1960

【非特許文献6】Hawkes, J., and Villota, R. Food Sci. Nutr. 28, 439, 1989

【非特許文献7】Odin, E. et al., Cancer Investigation 16(7), 447, 1998

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

さらに、これらの適当な特性を有する（公知の）化学化合物の安定な固体（多形）形態の存在は予期できない。このような固体形態の性質がどのようなものであり得るか、すなわち、それが塩、無水、水和または溶媒和形態であるか否かは予測できず、ましてや特定の多形体を単離し得る詳細な条件（例えば、結晶化条件および可変物、例えば溶媒、温度、pH等）も予期できない。そのようなパラメーターの選択および制御は、所望の固体形態を高い純度、安定性および加工可能性で得るために極めて重要である。これらは生成物の特性および性能ならびにそれらのさらなる用途に直接影響を及ぼす重要な因子である。多くの可変物（すなわち、溶液pH、温度、圧力、時間、溶液組成、添加剤のタイプおよび濃度）のどれが決定因子になるかを予測することは不可能である。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

今回驚くべきことに、5, 10-CH₂-THFの(6R)-異性体[(6R)-5, 10-CH₂-THF]のそのヘミ硫酸塩(hemisulfate salt)への変換が、該化合物およびその医薬組成物に優れた安定性を付与し、それにより前述の欠点が克服されることが見出された。(6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩の有利な安定性特性は、この化合物の医薬用途における有効な使用を可能にする。

【0010】

本発明は、第1の態様において、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩（以後、本発明のヘミ硫酸塩または本発明の化合物とも呼ぶ）を対象とする。

30

【0011】

好ましくは、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩は、化学的におよび／または異性体的におよび／または結晶的に純粋な形態にあり、より好ましくは、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩は、実質的に結晶質形態にある。

【0012】

特定の実施態様において、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩は無水形態にあり、従って、好ましい実施態様において、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩は、結晶質の無水形態にある。

【0013】

40

好ましくは、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩は、2θ±0.2°2θ(CuKα線)で表される4.7°、17.9°および23.3°の回折角2シータ(2θ)における1つまたは複数のX線パターンピーク位置を特徴とする結晶質形態にある。

【0014】

特定の実施態様において、(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩は、1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624および363cm⁻¹の波数(±2cm⁻¹で表される)におけるピークを含むFT-ラマンスペクトルを付与することを特徴とする。

【0015】

50

さらなる態様において、本発明は、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含み、任意選択的に少なくとも1種の追加的な治療剤（殺菌剤、抗生物質、抗ウイルス剤、防腐剤、抗腫瘍剤、抗癌性化合物、例えば化学療法薬、抗真菌薬、および／または抗炎症薬、またはヒトの使用に適した他の生物活性剤もしくは治療剤、特に抗癌性化合物、例えば化学療法薬、例えば5-FUおよび誘導体、および抗葉酸薬、例えばメトトレキサート、ペメトレキセドを含むがこれらに限定はされない）をさらに含む、医薬組成物に向けられる。

【0016】

さらなる態様において、本発明は、治療における、好ましくは癌化学療法における $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（またはその医薬組成物）の使用に向けられている。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1：300mWの名目上のレーザー出力レベルおよび64スキャンを用いて記録した、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（タイプ1）のラマンスペクトル

【図2a】図2（a）：反射モードで記録した $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（タイプ1）のX線粉末ディフラクトグラム；

【図2b】図2（b）：透過モードで記録した $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（タイプ1）のX線粉末ディフラクトグラム；

【図2c】図2（c）：透過モードで記録した $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（タイプ1）のX線回折パターン（上の曲線A）と、反射モードで記録した同一化合物の記録（下の曲線B）との比較；

【図2d】図2（d）：透過モードで記録した $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（タイプ1）のX線回折パターン（上の曲線A）と、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ の硫酸塩のX線回折パターン（下の曲線B）との比較。

【図3】図3： $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（タイプ1）のTG-FITIRサーモグラム。「A」は、（水の損失による）-0.5%の質量変化を示し、「B」は、（分解による）-14.53%の質量変化を示す

【図4】図4： $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩のDSCサーモグラム（タイプ1；ファーストスキャン：実線；セカンドスキャン（クエンチクーリング後）：点線）。

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の詳細な説明

本発明は、第一の態様において、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩（本発明の化合物または本発明のヘミ硫酸塩とも呼ぶ）に向けられる。1つの実施態様において、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ のヘミ硫酸塩は、実質的に結晶質形態に、より詳細には、結晶質の無水形態にある。

【0019】

ここで使用される場合に、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ は、その天然に存在する異性体形態（5, 10-メチレン- $(6R)$ -テトラヒドロ葉酸、N-[4-[(6aR)-3-アミノ-1, 2, 5, 6, 6a, 7-ヘキサヒドロ-1-オキソイミダゾ[1, 5-f] プテリジン-8(9H)-イル] ベンゾイル]-L-グルタミン酸）にある5, 10- CH_2-THF （プテリジン環のC6およびグルタミン酸部分の α -炭素におけるキラル中心が、それらの天然に存在する配置にある）を指す。従って、ここで使用する場合に、「異性体純度」、「立体異性体純度」という語句はそれぞれ、同一化合物の1種または複数の他の異性体を含み得る試料における、 $(6R)-5, 10-CH_2-THF$ の量を指す。ここで使用する場合に、「異性体的に純粋な」、「立体異性体的に純粋な」という語句はそれぞれ、約80%より大きい、好ましくは約90%より大きい、好ましく

は約95%より大きい、より好ましくは約97%より大きい、さらに一層好ましくは約99%またはそれ以上より大きい、最も好ましくは最大100%の、所望の(6R)-5, 10-CH₂-THF異性体の異性体過剰を有する本発明化合物を意味し、ここで、残りは1種または複数種の他の異性体であってもよい。

【0020】

ここで使用される場合に、「結晶質形態 (crystalline form)」(または「多形 (polymorph)」または「結晶形 (crystal form)」) という語句は、構造単位の特定の規則正しい三次元配列からなる固体状態の形態を表す。従って、同一の化合物の異なる結晶質形態は、固体状態における分子の異なるパッキングから生じ、これは、異なる結晶対称性および/または単位胞パラメーターをもたらす。通常、異なる固体または結晶形は、1種または2種以上の異なる物理的および/または化学的特性、例えば異なる溶解プロファイル、異なる熱力学的および化学的安定性、異なる融点温度および/または異なるX線回折パターンを有し、従って、X線回折、赤外線 (IR) 分光法、示差走査熱量測定 (DSC)、ラマン分光法、固体NMR、ならびに融点、密度、硬度、光学および電気的特性、安定性および/または溶解プロファイル等により区別することができる。ほとんど規則正しくないかまたは規則正しくない三次元配列は通常、「非晶質」という語句によって記載される。

10

【0021】

(本発明の)「結晶質化合物」という語句は、認識可能な量の本発明の化合物の結晶形(複数可)または多形(複数可)、好ましくは50%、60%、70%、80%、90%または95%を超える量の本発明化合物の1種(または複数種)の結晶形(複数可)または多形(複数可)を含む、本発明の化合物の固体形態を表す。本発明の結晶質化合物の結晶性の量、程度および性質は、光学顕微鏡法、電子顕微鏡法、X線粉末回折、固体NMR分光法または偏光顕微鏡法を含む1つまたは複数の技術手段により測定することができる。

20

【0022】

本明細書で使用される場合に、(本発明の)「ヘミ硫酸塩」という表現は、その全ての具体的な態様を含み、好ましくは、化学的におよび/または(立体)異性体的におよび/または結晶性の純粋な形態で提供される。1つの特定の実施態様において、それは、実質的に結晶質形態、より具体的には、結晶質の無水形態(以後、結晶質形態タイプ1とも呼ぶ)である。

30

【0023】

本明細書で使用される場合に、「結晶純度」という語句は、試料中の化合物の特定の結晶質形態のパーセンテージを意味し、当該形態は、化合物の非晶質形態、化合物の1種または複数種の他の結晶質形態(化合物の上記特定の結晶質形態以外)またはそれらの混合物を含んでいてもよい。本明細書で使用される場合に、「実質的に結晶質形態」という語句は、少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%の結晶純度、好ましくは約97%の結晶純度、より好ましくは約99%またはそれ以上の結晶純度、最も好ましくは約100%の結晶純度を表す。結晶純度は、X線粉末回折(XRPD)、赤外ラマン分光法および他のソリッドステート法により測定される。

40

【0024】

本明細書で使用される場合に、「化学的純度」という語句は、試料中における特定の化合物のパーセンテージを意味する。本明細書で使用される場合に、「実質的な化学的純度」は、HPLCにより測定した場合に、約80%の化学的純度、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、より好ましくは約97%、より好ましくは約98%の化学的純度、最も好ましくは99%または99%より高いまたは最大100%の化学的純度にある、本発明化合物を表す。化学的不純物には、未反応の出発物質(溶媒を含む)、(6R)-5, 10-CH₂-THFの分解生成物(例えばTHF)等が含まれ得る。

【0025】

上記のように、本発明のヘミ硫酸塩の結晶質形態(およびその純度)は、ここで提供す

50

るデータによって示されるような、例えばX線粉末回折（XRPD）、赤外線ラマン分光法および他のソリッドステート法に関する、固有の固体状態の特徴により、同定でき、特徴付けることができ、そして他の塩の形態、例えば他の硫酸塩形態から区別することができる。

【0026】

従って、特定の実施態様において、本発明は、以下を提供することを特徴とする、(6R)−5, 10−CH₂−THFの無水ヘミ硫酸塩の結晶質形態（以下、結晶質形態タイプ1とも呼ぶ）を提供する：

(i) 4.7°、17.9°および23.3°、好ましくは4.7°、16.6°、17.9°、18.4°、18.9°、20.2°、23.3°、23.5°、24.3°および24.7°に算出された格子間隔（2θ±0.2° 2θ（CuKα線）で表される）を与えるX線粉末回折（XRPD）パターン；および／または

(ii) 1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624および363の波数（±2 cm^{−1}で表される）におけるピークを含むFT−ラマンスペクトル、および／または

(iii) 表3に従う1つまたは複数の吸収帯を有するIRスペクトル。

【0027】

好ましい実施態様において、本発明のヘミ硫酸塩（タイプ1）は、4.7°、16.6°、17.9°、18.4°、18.9°、20.2°、23.3°、23.5°、24.3°および24.7°、好ましくは4.7°、17.9°および23.3°における以下の10個のXRPDピーク（2θ±0.2° 2θ（CuKα線）で表される）のうちの少なくとも2つ、ならびに1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624および363の以下の9個のFT−ラマンピーク（±2 cm^{−1}で表される）のうちの少なくとも2つを特徴とする。

【0028】

他の実施態様において、本発明の(6R)−5, 10−CH₂−THFのヘミ硫酸塩（タイプ1）は、図1に実質的に従うFT−ラマンスペクトルおよび／または表1に報告されるピークおよび／または図2（a）に実質的に従うX線粉末回折（XRPD）パターンおよび／または表2に報告されるピークを与える。

【0029】

10

20

30

【表 1】

表 1：ラマンピーク表

(v s =非常に強い、s =強い、m =中程度の、w =弱い、v w =非常に弱い強度)。

波数 [cm^{-1}]	強度 (定性的)
3 0 1 9	w
2 9 3 3	m
2 8 8 0	m
1 6 7 2	s
1 6 5 6	s
1 6 0 3	v s
1 5 5 3	m
1 4 7 4	m
1 3 7 3	m
1 3 3 7	m
1 3 0 1	s
1 2 0 7	m
1 1 2 7	w
9 7 5	m
8 8 4	m
8 1 5	w
7 0 0	w
6 6 5	w
6 3 7	s
6 2 4	s
3 6 3	m

【0 0 3 0】

10

20

【表 2】

表 2 : $2\theta \pm 0.2^\circ$ ($\text{CuK}\alpha$ 線) で表される粉末 X 線回折ピークの表
($v s$ = 非常に強い、 s = 強い、 m = 中程度の、 w = 弱い、 $v w$ = 非常に弱い強度)。

$2\theta^\circ$ 角	d-間隔 (Å)	強度 (定性的)
4.7	18.8	$v s$
9.4	9.4	$v w$
11.6	7.6	w
11.8	7.5	w
12.5	7.1	$v w$
13.6	6.5	$v w$
14.2	6.2	m
16.6	5.35	s
16.8	5.28	m
17.9	4.96	$v s$
18.4	4.83	s
18.9	4.68	s
20.2	4.38	s
21.0	4.23	w
21.7	4.09	w
23.3	3.82	$v s$
23.5	3.78	s
24.0	3.70	m
24.3	3.66	s
24.7	3.60	m
25.1	3.54	m
26.2	3.40	m
26.5	3.36	m
27.0	3.30	m
28.0	3.18	w
29.2	3.05	m
30.4	2.94	w
31.0	2.88	w
31.7	2.82	w
35.5	2.53	w

10

20

30

【0031】

【表 3】

表 3 : (6R)-5, 10- CH_2 -THF のヘミ硫酸塩 (タイプ 1) の IR スペクトル
(吸収帯 (cm^{-1}) およびそれらの帰属とともに)

吸収帯 (cm^{-1})	帰属
3346	OH および NH 伸縮
3168	分子内水素ブリッジの OH、 CH_2 伸縮
1709, 1654	一置換アミドの C=O 伸縮振動
1612	COO^- の対称および逆対称伸縮振動
1560, 1504	アリールおよびピリミジン環伸縮
1397, 1300	COO^- の対称および逆対称伸縮振動
824	パラ置換芳香族のアリール隣接水素 wag

40

【0032】

本発明の化合物は、本技術分野で公知の手順に従って測定されるような、X 線粉末回折パターンにより、最も効率的に特徴付けされ、関連化合物から区別される (例えば J. Haleblian, J. Pharm. Sci. 64:1269, 1975; J. Hale

50

blain and W. McCrone, J. Pharm. Sci. 58:911, 1969 参照)。例において調製した (6R)-5, 10-CH₂-THF のヘミ硫酸塩の X 線回折パターンを、(6R)-5, 10-CH₂-THF の硫酸塩の X 線回折パターンと比較して示す図 2 (d) は、これらの 2 つの塩の示差的なパターンを明確に実証している。

【0033】

ピークの相対強度は、試料調製技術、試料装填手順および特に使用される装置に応じて変わり得るが、本発明の化合物は、特定の多形に特徴的な示差的なピークおよびピーク位置によって (約 ±0.5° 2 シータ (2θ)、好ましくは ±0.2° 2 シータ (2θ) (CuKα 線) のピーク帰属における小さな変動で) 同定することができる。

10

【0034】

本発明の化合物は、非溶媒和の無水形態であり、これは、水を全く含有しない化合物および微量の水を含み得る化合物を含む。このような潜在的な残存の (非化学量論的な) 含水量は、任意の水量であることができるが、通常、0 重量% H₂O ~ 3 重量% H₂O、好ましくは 0 重量% H₂O ~ 1 重量% H₂O の範囲である。

【0035】

本発明のヘミ硫酸塩化合物は、固体形態、例えば粉末、凍結乾燥物の形態で、または液体として保管することができる。

【0036】

特定の実施態様において、本発明の化合物は、好ましくは、(6S)-THF のホルムアルデヒド水溶液を硫酸の水溶液 (または酢酸および硫酸の水溶液) に添加し、(6R)-5, 10-CH₂-THF のヘミ硫酸塩の結晶化を起こさせることにより、製造される。この結晶化反応は、上昇させた温度で、例えば 35℃ を超える温度で行われる。特に、(6R)-5, 10-CH₂-THF の結晶質ヘミ硫酸塩の製造の方法は、(i) (6S)-テトラヒドロ葉酸の溶液をホルムアルデヒド水溶液と反応させて溶液中の (6R)-5, 10-CH₂-THF を得る (公知の手順により) ステップ、(ii) 得られた溶液中の (6R)-5, 10-CH₂-THF を、硫酸の水溶液に (または代替的に、酢酸および硫酸の水溶液に)、35℃ 超、好ましくは 35℃ ~ 70℃、より好ましくは 40℃ ~ 60℃、最も好ましくは 40℃ ~ 50℃ の温度で添加し、(6R)-5, 10-CH₂-THF のヘミ硫酸塩の結晶化を生じさせるステップ、および (iii) 得られた (6R)-5, 10-CH₂-THF の結晶質ヘミ硫酸塩を、例えばろ過により、単離するステップを含む。

20

30

【0037】

ステップ (i) は、例に記載されるように公知の手順に従って実施することができる。

【0038】

ステップ (ii) において、得られた透明な溶液を約 40 ~ 50℃ の温度で硫酸溶液 (または酢酸および硫酸の水溶液) に添加することができ、所望の生成物の選択的な結晶化が可能となる。任意選択的に、添加が完了後、得られた反応混合物を約 40 ~ 50℃ の温度で最大 5 時間攪拌してもよく、引き続き、結晶化生成物をその後同一温度でろ過するか、または遠心分離し、任意選択的に水で洗浄し、乾燥する。

40

【0039】

さらなる態様において、本発明は、患者に投与するための、本発明の (6R)-5, 10-CH₂-THF のヘミ硫酸塩 (の治療的有効量) および薬学的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物 (本発明の医薬組成物とも呼ぶ) に向けられている。本明細書において使用される場合に、「薬学的に許容可能な」という語句は、キャリアが動物、より特にヒトにおける使用のために承認または許可されること、すなわち、宿主または患者にとって毒性ではないことを表す。さらに、好ましいキャリアは、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げない。「キャリア」という語句は、好ましい投与の特定のモードに必要な任意の補助材料を表し、例えば、溶媒 (希釈剤)、添加剤または他の賦形剤 (これらとともに本発明の化合物は投与される) を含む。通常使用される希釈剤薬学的キャリアには、滅菌

50

液体、例えば水溶液および油（例えば、石油、動物、植物もしくは合成源）、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等が含まれる。通常使用される水性液体には、水、生理食塩水溶液、水性デキストロースおよびグリセロール溶液などが含まれる。適当な薬学的添加剤には、クエン酸、アスコルビン酸、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。任意選択的に、前記組成物は、賦形剤、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤または結合剤を含むことができる。適当な薬学的キャリアの例は、当技術分野において公知であり、例えば「Remington's Pharmaceutical Sciences」 by E. W. Martin (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990))に記載されている。

10

【0040】

任意選択的に、本発明の医薬組成物はさらに、少なくとも1種の追加的な治療剤を含むことができる。特定の実施態様において、前記の少なくとも1種の追加的な治療剤は、殺菌剤、抗生物質、抗ウイルス剤、防腐剤、抗腫瘍剤、抗癌性化合物、例えば化学療法薬、抗真菌薬、および／または抗炎症薬、またはヒトの使用に適した他の生物活性剤もしくは治療剤、特に抗癌性化合物、例えば化学療法薬から選択することができる。抗がん剤、例えば化学療法剤には、特異的結合メンバー、タンパク質、核酸または核酸アナログ（例えば、限定はされないが、アンチセンス分子、リボザイムおよびsiRNA）、脂質、ステロイド、巨大分子、小分子または金属が含まれ得るがこれらに限定はされない。1種または複数の抗がん剤は、例えば以下の（これらに限定されない）1種または複数種の化学療法剤を含むことができる：核酸、特にフッ素化核酸（例えば、5-フルオロウラシルまたはそのアナログもしくはプロドラッグ、抗葉酸剤（例えば、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、ロメトレキソール）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン）、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、ゲムシタビン、テザシタビン）、5-FUモジュレーター、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、カルムスチン）、核酸生合成阻害剤（例えば、マイトマイシン、アントラサイクリン（例えば、エピルビシン、ドキソルビシン）、白金誘導体（シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン）、微小管破壊剤（例えば、パクリタキセル、デセタキセル、ビノレルビン、ビンクリスチン）、ホルモン遮断剤（例えば、タモキシフェン）、受容体型もしくは非受容体型チロシンキナーゼを含むがこれらに限定されないキナーゼの阻害剤（例えば、イレッサ、タルセバ、SU5416、PTK787、グリベック）、プロテオソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）、免疫調節剤（例えば、レバミゾール）、抗炎症薬、血管新生阻害剤、サイトカイン（例えば、インターロイキン、腫瘍壊死因子）、ならびにサイトカイン、ホルモン、またはサイトカインもしくはホルモンに関する受容体の活性を阻害する薬剤（例えば、抗VEGF抗体ベバシズマブまたは「アバスチン」）。抗癌剤はまた、モノクローナル抗体、例えばサイトカイン、ホルモンまたはホルモン受容体に結合するモノクローナル抗体（これらに限定はされない）（例えば、EGFもしくはVEGF成長因子の活性化を遮断する抗体、例えば、アバスチン、エルピタックス、ハーセプチン）等を含み得る。

20

30

40

【0041】

本発明の化合物またはその医薬組成物は、治療のために、特に癌化学療法において、すなわち、癌の治療のための方法において使用することができ、これは、治療の有効量の本発明のヘミ硫酸塩またはその医薬組成物を、そのような治療が必要な対象に投与することを含む。

【0042】

従って、さらなる態様において、本発明はさらに、治療における、好ましくは化学療法における、すなわち、癌の治療における本発明のヘミ硫酸塩（またはその医薬組成物）の使用に向けられる。本発明により治療されるべき癌の例には、乳癌、食道癌、胃癌、胆嚢癌、胆管癌、大腸癌、直腸癌、肝臓癌、膵臓癌、卵巣癌、頭頸部癌および中皮腫瘍が含ま

50

れるが、これらに限定はされない。

【0043】

本発明の適当な医薬組成物は、経口、非経口または直腸投与のために適合させることができ、それ自身、錠剤、カプセル剤、経口用液体調製物、散剤、凍結乾燥物、顆粒、ロゼンジ、再構成可能な粉末、注射可能なもしくは注入可能な液剤もしくは懸濁剤、または坐剤の形態にあることができる。好ましくは、前記医薬組成物は、静脈内または筋肉内、皮下、動脈内のような非経口投与に適した形態にある。

【0044】

非経口投与のために、液体の単位剤形は通常、水をベースとする液剤または油をベースとする懸濁剤（またはそれらの凍結乾燥物）を形成するために、本発明の化合物、任意選択でさらなる治療剤、および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む。化合物は、他の治療剤の存在、キャリアおよび使用濃度に応じて、キャリアに懸濁するかまたは溶解してもよい。非経口液剤のために、前記化合物を注射用に溶解し、ろ過滅菌した後に、適切なバイアルもしくはアンプルに充填して密閉することができる。任意選択的に、佐剤、例えば局所麻酔薬、保存剤および緩衝剤をベヒクルに溶解する。所望の場合、得られた溶液を、凍結乾燥に付すことができる（すなわち、前記組成物は、バイアルに充填し、水を真空下で除去した後に凍結することができる）。非経口懸濁剤のために、前記化合物をベヒクルに懸濁し（溶解するかわりに）、そして、好ましい滅菌は、滅菌ベヒクル（例えばバイアルまたはアンプル）における懸濁の前のエチレンオキシドへの曝露を含む。任意選択的に、化合物の均一な分布を促進するために、界面活性剤または湿潤剤を、前記組成物に含ませることができる。

10

20

【0045】

経口投与のための錠剤およびカプセル剤は、単位投薬形態にあることができ、慣用の添加剤、例えば結合剤、増量剤、錠剤化滑剤、崩壊剤および許容可能な湿潤剤を含むことができる。錠剤は、通常の薬学的慣行においてよく知られた方法に従ってコーティングされている。

【0046】

経口用液体調製物は、例えば水性もしくは油性懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤またはエリキシル剤の形態であることができ、あるいは、使用前に水または他の適当なベヒクルを用いて再構成するための乾燥生成物の形態であることができる。このような液体調製物は、慣用の賦形剤、例えば懸濁剤、乳化剤、非水性ベヒクル（食用油を含むことができる）、保存剤および所望により慣用の香味料または着色剤を含むことができる。

30

【0047】

本発明の医薬組成物が本発明の化合物および少なくとも1種のさらなる治療剤を含む併用療法の場合、活性な剤を、同一の医薬組成物の一部として投与することができ、または前記の少なくとも1種のさらなる治療剤を別々に、すなわち、別個の（およびおそらく異なる）医薬組成物として、任意選択的に異なる投与経路によって、同時にまたは順次に投与することができる。

【0048】

本明細書において記載されるような治療において使用される活性薬剤、すなわち、本発明の化合物（および任意選択的に少なくとも1種のさらなる治療剤）の用量は、治療される対象の年齢および健康状態、治療される疾患の種類および重症度、投与の経路および頻度等を含む種々の因子に依存する。癌治療および化学療法の専門家は、単独でのまたは上記に定義されるような少なくとも1種のさらなる治療薬と組み合わせた本発明の化合物に関する治療的に有効な量および投薬計画を、毒性および有効性を評価するための公知のプロトコールに基づいて決定することができるであろう。

40

【0049】

本明細書で使用される場合に「治療的に有効な量」という語句は、（i）疾患の予防；および／または（ii）疾患の抑制（例えば病状および／または症候のさらなる進行の阻止）；および／または（iii）疾患の改善（例えば病状および／または症候からの回復

50

）を含む、当業者によって求められている組織、系、動物、個体またはヒトにおける生物応答もしくは薬物応答を引き起こす活性化合物の量を指す。同様に、本明細書で使用される場合に「治療」という語句は、（i）疾患の予防；および／または（ii）疾患の抑制（例えば病状および／または症候のさらなる進行の阻止）；および／または（iii）疾患の改善（例えば病状および／または症候からの回復）を指す。

【0050】

医薬組成物は、好ましくは、投与方法に応じて、0.1%～99重量%、好ましくは10～60重量%の活性薬剤（すなわち、任意選択で少なくとも1種のさらなる治療剤と組み合わされた本発明の化合物）を含むことができる。

【0051】

癌治療において使用されるべき本発明化合物の典型的な用量範囲は、それぞれ10mg/m²～1g/m²、好ましくは50mg/m²～500mg/m²（結腸直腸癌治療に関して）、10mg/m²～200mg/m²（メトトレキサート療法に関して）、より好ましくは約100mg/m²～250mg/m²（結腸直腸癌治療に関して）、それぞれ50mg/m²～150mg/m²（メトトレキサート療法に関して）の範囲であることができる。

【0052】

なお、本願は、特許請求の範囲に記載の発明に関するものであるが、他の態様として以下も包含し得る。

1. 5, 10-メチレン-（6R）-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩。
2. 実質的に結晶質形態にある、上記1に記載のヘミ硫酸塩。
3. 少なくとも80%、好ましくは90%、好ましくは95%、より好ましくは97%、最も好ましくは99%またはそれ以上の結晶純度を有する、上記1または2に記載のヘミ硫酸塩。
4. 少なくとも80%、好ましくは90%、好ましくは95%、より好ましくは97%、最も好ましくは99%またはそれ以上の化学的純度を有する、上記1～3のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
5. 無水形態にある、上記1～4のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
6. 2θ±0.2° 2θ（CuKα線、反射）で表される4.7°、17.9°および23.3°の回折角2θに1つまたは複数のX線パターンピーク位置を有する、上記1～5のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
7. 2θ±0.2° 2θ（CuKα線、反射）で表される4.7°、16.6°、17.9°、18.4°、18.9°、20.2°、23.3°、23.5°、24.3°および24.7°の回折角2θに1つまたは複数のX線パターンピーク位置を有する、上記1～6のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
8. 1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624および363の波数（±2cm⁻¹で表される）に1つまたは複数のピークを含むFT-ラマンスペクトルを有する、上記1～7のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
9. 図1に実質的に従うFT-ラマンスペクトルを有するおよび／または図2（a）もしくは2（b）に実質的に従うX線粉末回折（XRPD）パターンを有する、上記1～8のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
10. 以下の4.7°、16.6°、17.9°、18.4°、18.9°、20.2°、23.3°、23.5°、24.3°および24.7°における10個のXRPDピーク（2θ±0.2° 2θ（CuKα線）で表される）のうちの少なくとも2つ、ならびに以下の1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624および363の9個のFT-ラマンピーク（±2cm⁻¹で表される）のうちの少なくとも2つを有する、上記1～9のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。
11. 4.7°、17.9°および23.3°における以下の3個のXRPDピーク（2θ±0.2° 2θ（CuKα線）で表される）のうちの少なくとも2つ、ならびに1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624および363

10

20

30

40

50

の以下の5個のFT-ラマンピーク ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ で表される) のうちの少なくとも2つを有する、上記1～10のいずれか1つに記載のヘミ硫酸塩。

12. 上記1～11のいずれか1つに記載の5, 10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩および任意選択的に薬学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

13. 錠剤、カプセル剤、経口用液体調製物、散剤、凍結乾燥物、顆粒、ロゼンジ、再構成可能な粉末、注射可能なもしくは注入可能な液剤もしくは懸濁剤、または坐剤、好ましくは凍結乾燥物の形態にある、上記12に記載の医薬組成物。

14. さらに少なくとも1種の追加的な治療剤を含む、上記12または13に記載の医薬組成物。

15. 経口、非経口または直腸投与のための医薬組成物である、上記12～14のいずれか1つに記載の医薬組成物。

16. 治療、好ましくは癌化学療法に使用するための、上記1～11のいずれか1つに記載の5, 10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩または上記12～15のいずれか1つに記載の医薬組成物。

17. 癌の治療のための方法であって、上記1～11のいずれか1つに記載の5, 10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸のヘミ硫酸塩または上記12～15のいずれか1つに記載の医薬組成物を、そのような治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。

以下の例は、本発明の説明としての役割を果たすが、その範囲の限定を意図するものではない。

【実施例】

【0053】

示差走査熱量測定 (Thermal Analysis Q2000) : 閉じた (密封した) 金のるつぼ; 周囲条件下または N_2 環境における3分の平衡化後に充填された試料; $10 \text{ K} \text{ 分}^{-1}$ の加熱速度; $-50^\circ\text{C} \sim 254^\circ\text{C}$ 領域。2回の加熱スキャンを実施した際、スキャンの間に試料を -50°C に急速に冷却した。リストに挙げた転移温度は、ピーク極大および極小に対応し、開始温度には相当しない。

【0054】

FT-ラマン分光法 (Bruker RFS100; OPUS 6.5 ソフトウェアを用いる; OPUS 7.0 ソフトウェアで実施したオフラインデータ分析) : Nd:YAG 1064-nm 励起; 300 mW 名目上レーザーパワー; Ge 検出器; $64\text{-}256$ スキャン; $3500\text{-}100 \text{ cm}^{-1}$ の分析に使用したスペクトル領域; 2 cm^{-1} 分解能。

【0055】

^1H -NMR (Bruker DPX300) : 300.13 MHz のプロトン周波数、 30° 励起パルスおよび 1 s の繰り返し時間 (recycle delay) を使用して、 ^1H -NMR スペクトルを記録した。16回または256回のいずれかスキャンを積算し、重水素化DMSOを溶媒として使用した。溶媒ピークを参照のために使用し、化学シフトをTMS尺度で報告する。

【0056】

^{13}C NMR (Bruker AMX 300) : ^{13}C NMR スペクトルを、 5 mm TXO プローブヘッドを備えた Bruker AMX 300 spectrometer を用いて得た。ヘミ硫酸塩を 0.1 N NaOD に溶解した。スペクトルを、 303 K において 4000 スキャンおよび 32768 データポイントのデジタル分解能で測定した。化学シフトを内部 TSP ((3-トリメチルシリル)-2, 2', 3, 3'-テトラジュウテロプロピオン酸、ナトリウム塩) 標準に対して ppm で付与する。

【0057】

粉末X線回折 (Bruker D8 Advance) : 銅K α 線、 $40 \text{ kV} / 40 \text{ mA}$ 、Lynx Eye 検出器、Bragg-Brentano 反射型ジオメトリー、 0.0

10

20

30

40

50

2° 2θ ステップサイズ、37 s のステップ時間、2.5–50° の 2θ 範囲。粉末試料を、0.1–mm または 0.5–mm の深さのケイ素単結晶試料ホルダーで測定した。平坦な表面を得るためにわずかな圧力を施す以外、試料を調製するのに特別な処理は用いなかった。全ての測定に周囲空気雰囲気を使用し、測定の間、試料を回転させた。反対の X 線回折データに関する情報の不在は反射データとして示す。

【0058】

粉末 X 線回折 (Stoe Stadi P.) : 銅 Kα1 線、40 kV / 40 mA、Mythen 1 K 検出器、透過モード、湾曲 Ge モノクロメータ、0.02° 2θ ステップサイズ、60 s のステップ時間、ステップスキャンモードで 1° 2θ の検出ステップで、1.5–50.5° 2θ のスキャン範囲。試料 (10–20 mg の粉末) を 2 つのアセテート薄膜間で測定した。試料を調製するのに特別な処理は用いなかった。全ての測定に周囲空気雰囲気を使用し、測定の間、各試料を回転させた。

10

【0059】

TG-FTIR (Bruker FT-IR Spectrometer IFS 28 を備えた Netzsch Thermo-Microbalance TG 209) : Al りつば (微細孔を有する) ; N₂ 雰囲気 ; 10 K 分⁻¹ 加熱速度 ; 25 °C ~ 300 °C 範囲。

【0060】

IR (FT-IR Paragon 1000) : ブロミドディスクにおいてプレスしたヘミ硫酸塩試料から、Perkin Elmer Fourier Transform Infrared System において、赤外線スペクトルを 100 スキャンで記録した。

20

【0061】

例 1 : (6R)–5, 10–CH₂–THF ヘミ硫酸塩の製造

78.0 g の蒸留水における (6S)–テトラヒドロ葉酸 (16 mmol, 7.93 g) の溶液を、N₂ 下、室温で、丸底フラスコに供給した。32% NaOH 溶液を (ゆっくりと) 添加することにより、この溶液の pH を pH 11 に調節した。溶液が透明になったらすぐに、1.00 M HCl 溶液を添加して、溶液の pH を 25 °C で 8.3 に調節した。得られた透明溶液を約 0 °C に冷却し、当該温度においてそれは 8.8 の pH を示した。1 M HCl の添加により、pH を pH = 8.6 に調節し、1.44 g の 36.8% HCHO 溶液 (110 mol %) を一度に添加した。添加の完了後に溶液を 0 °C (氷浴) で 1 時間攪拌した。活性炭 (0.2 g, Norit C Extra) を添加し、反応混合物を 0 °C で 30 分間攪拌し、その後、吸引ろ過において冷間ろ過 (cold filtered) することにより透明溶液を得、これをさらなる精製なしでステップ (b) に使用した。

30

【0062】

(b) 55 ml 1 M H₂SO₄ (0.055 mol ; 344 mol %) の混合物を、N₂ 下 60 °C で丸底フラスコに供給した。この溶液に、ステップ (a) において得られたような溶液を 15 分間にわたって滴加し、得られた反応混合物を 50 °C で 2 時間攪拌した。その後、吸引ろ過において 50 °C で反応混合物をろ過し、室温で 25 ml の蒸留水を用いて 2 度洗浄し、30 °C かつ 10 mbar で 12 時間 (一晚) 乾燥して、淡いグレーの結晶の形態の (6R)–5, 10–CH₂–THF ヘミ硫酸塩 (7.36 g, 86% 収率) を得た。得られた生成物は、HPLC により測定した場合に 98.4% の純度、97.6% の異性体純度 (6R–異性体) を有していた。XRPD による分析は、結晶形タイプ 1 を示した (完全な特性評価に関しては、例 2 および 3 を参照)。

40

【0063】

例 2 : 特性評価

(a) 300 mW の名目上レーザーパワーレベルおよび 64 スキャンを用いて記録した (6R)–5, 10–CH₂–THF ヘミ硫酸塩の FT ラマンスペクトルを図 1 に示す。

【0064】

50

(b) 透過モードで記録した対応の粉末X線ディフラクトグラムを図2に示す。

【0065】

(c) (6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩のTG-FTIRサーモグラムを図3に示す。それは、N₂流下で実施した(酸化分解を防ぐため)。該試料は、約40℃から210℃までに0.5重量% H₂Oの損失を示し、これは、(吸湿性または不完全な乾燥のいずれかによる)残留水である。分解は210℃超でのみ生じる。

【0066】

(d) (6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩のDSCサーモグラムを図4に示す。最初の加熱スキャン前に試料を窒素ガス流下で3分間平衡化し、その時間の間にその質量の0.6重量%が失われた。これは、TG-FTIRサーモグラム(図3参照)で観察された含水量と一致し、この水が緩く結合していることが確認される。該試料を続いて閉じた金のるつぼ中で、10 K 分⁻¹で254℃に加熱し、-50℃にクエンチクーリングし、10 K 分⁻¹で二度目の加熱を行った。最初の加熱スキャンにおける熱事象のみが約247.4℃で吸熱性であり(ΔH 約60.9 J g⁻¹)、これは溶融に起因する。この吸熱事象は、場合により発熱分解の開始と重複する。第2の加熱スキャンにおいて、Tg 約104℃でガラス転移が観察され($\Delta C_p = 0.38$ J g⁻¹ K⁻¹)、これにより溶融が第1スキャンにおいて生じたことが確認される。250℃まで他の熱的事象は観察されなかった。

【0067】

(e) IRスペクトルをプレスしたKBrペレットで記録し、特徴的な吸収帯を表3に示す。

【0068】

(f) (6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩の¹H NMRスペクトルをDM SO-d₆で記録し、化学シフト(d)(ppm)を表8に示す。

【0069】

【表4】

表8: 化学シフト(d)(ppm)とともに(6R)-5, 10-CH₂-THFのヘミ硫酸塩の¹H-NMR (d=ダブルット、m=マルチプレット、t=トリプレット; 0 ppmにTSPおよび4.85 ppmにD₂O/NaOD)

δ (1H)	多重度	強度
7.75	d	2H
6.62	d	2H
4.99	m	1H
4.33	m	1H
3.74	m	2H
3.52	m	1H
3.28	m	2H
2.91	m	1H
2.33	t	2H
2.17	m	1H
2.05	m	1H

【0070】

(g) ¹³C NMRを0.1N NaODにおいて記録し、TSPに対する化学シフト(d)(ppm)を表9に示す。

【0071】

【表 5】

表 9：化学シフト (d) (ppm) とともに (6R) - 5, 10-CH₂-THF のヘミ硫酸塩の ¹³C-NMR (d=ダブルレット、m=マルチプレット、t=トリプレット)

δ (13C)	多重度	δ (13C)	多重度
185.12	s	114.19	d
182.05	s	103.99	s
173.12	s	70.67	t
172.41	s	58.61	d
162.26	s	56.94	d
156.78	s	51.6	t
151.78	s	41.71	t
131.18	d	37.07	t
123.27	s	31.41	t

10

【0072】

(h) 光学顕微鏡法による (6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の分析により、その結晶性を確認した。当該試料は、小さな複屈折粒子の集合体からなっていた。

【0073】

例 3：(6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の安定性試験

(a) 種々の溶媒および混合物における室温以外の温度での出発物質としての (6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の懸濁液平衡を表 10 にまとめる：

20

【0074】

【表 6】

表 10：(6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の懸濁液平衡安定性

溶媒	温度 (°C)	期間 (h : 時間 ; d : 日)	観測
MeOH / ギ酸 1 : 1	50	2 h	変化なし
L-アスコルビン酸で飽和した AcOH	50	1 d	変化なし
約 2 mM L-アスコルビン酸を有する THF	40	3 d	変化なし
約 2 mM L-アスコルビン酸を有する 2-PrOH	40	3 d	変化なし
L-アスコルビン酸で飽和した PEG 4500 / EtOH 1 : 9	50	7 d	変化なし
H ₂ O	5	6 d	変化なし
ギ酸 / THF 1 : 3	10 - 20	6 d	変化なし
L-アスコルビン酸で飽和した AcOH	50	5 d	変化なし
L-アスコルビン酸で飽和した MeCN	50	5 d	変化なし

30

【0075】

(b) 室温での 85% エタノールにおける安定性

(6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩 (3.0 g) を、室温で 100 ml の 85% EtOH に分散させ、5 時間攪拌し、その後ろ過し、30°C および 8 mbar で 12 時間 (一晚) 乾燥した。XRPD による分析により、結晶形タイプ 1 に特徴的な X 線パターンを変わらずに維持したことが示された。

40

【0076】

(c) 高温 / 低圧での安定性

(6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩 (2.17 g) を 65°C および 8 mbar で 21 時間、乾燥チャンバー内に置いた。XRPD による分析により、結晶形タイプ 1 に特徴的な X 線パターンを変わらずに維持したことが示された。

【0077】

(d) (6R) - 5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩およびその医薬組成物の長期安

50

定性

(6R)－5, 10－CH₂－THFヘミ硫酸塩の長期安定性を測定するために、本発明の化合物を、空気中において25℃で、そして60%の相対湿度で保管した。残留している(6R)－5, 10－CH₂－THFヘミ硫酸塩の含量を定期的な間隔でHPLCにより測定し、初期値と比較して求めた(%rel.)。結果を表11に示す。

【0078】

【表7】

表11：(6R)－5, 10－CH₂－THFヘミ硫酸塩の3つの異なる生産バッチの長期安定性

	(6R)－5, 10－CH ₂ －THFヘミ硫酸塩(%rel.)							
	0月	3月	6月	9月	12月	18月	24月	36月
(6R)－5, 10－CH ₂ －THFヘミ硫酸塩(バッチ1)	100.0	99.7	99.5	99.6	99.2	99.2	99.4	98.5
(6R)－5, 10－CH ₂ －THFヘミ硫酸塩(バッチ2)	100.0	99.9	99.9	100.0	99.7	99.4	99.4	99.0
(6R)－5, 10－CH ₂ －THFヘミ硫酸塩(バッチ3)	100.0	99.5	99.5	99.4	99.1	99.0	99.0	

【0079】

医薬組成物としての、より具体的には凍結乾燥物(例えば例5に従って製造されるような)としての(6R)－5, 10－CH₂－THFヘミ硫酸塩の長期安定性を測定するために、凍結乾燥物を空気中において25℃および60%相対湿度で保管した。残留している(6R)－5, 10－CH₂－THFヘミ硫酸塩の含量を定期的な間隔でHPLCにより測定し、初期値との比較により求めた(%rel.)。結果を表12に示す。

【0080】

10

20

30

【表 8】

表 12：凍結乾燥物としての (6R) - 5, 10 - CH₂ - THF ヘミ硫酸塩の 5 つの異なる生産バッチの長期安定性

	(6R) - 5, 10 - CH ₂ - THF ヘミ硫酸塩 (% r e l .)							
	0 月	3 月	6 月	9 月	1 2 月	1 8 月	2 4 月	3 6 月
(6R) - 5, 10 - C H ₂ - THF ヘミ硫酸塩 (バッチ A)	100. 0	100. 1	100. 2	99. 9	100. 0	99. 7	100. 0	
(6R) - 5, 10 - C H ₂ - THF ヘミ硫酸塩 (バッチ B)	100. 0	100. 1	99. 9	100. 0	99. 8	99. 7	100. 1	
(6R) - 5, 10 - C H ₂ - THF ヘミ硫酸塩 (バッチ C)	100. 0	99. 6	99. 7	99. 8	99. 5	99. 6	99. 2	98. 6
(6R) - 5, 10 - C H ₂ - THF ヘミ硫酸塩 (バッチ D)	100. 0	100. 0	99. 8	99. 4	99. 4	99. 3	99. 2	99. 4 ¹⁾
(6R) - 5, 10 - C H ₂ - THF ヘミ硫酸塩 (バッチ E)	100. 0	100. 1			99. 7		99. 4	98. 9

【0081】

表 11 および 12 は、(6R) - 5, 10 - CH₂ - THF ヘミ硫酸塩が、純粋な化合物として、および医薬組成物、例えば凍結乾燥物の形態で、室温でさえ長期間にわたって高度に安定であることを明確に示している。

【0082】

例 4：(6R) - 5, 10 - CH₂ - THF 硫酸塩の比較安定性

本発明の化合物 (6R) - 5, 10 - CH₂ - THF ヘミ硫酸塩の長期安定性を、EP 0 537 492 B1 に従って製造した (6R) - 5, 10 - CH₂ - THF の硫酸塩の長期安定性と比較するために、(6R) - 5, 10 - CH₂ - THF 硫酸塩の安定性データを、種々の温度および湿度において作成した。

【0083】

(a) (6R) - 5, 10 - CH₂ - THF 硫酸塩の安定性

(6R) - 5, 10 - CH₂ - THF 硫酸塩を文献の手順 (EP 0 537 492 B1) に従って製造し、-20℃で15か月保管した。その後、生成物の試料を5℃、それぞれ25℃および60%相対湿度、それぞれ40℃および75%相対湿度で保管した。試料に残留している (6R) - 5, 10 - CH₂ - THF 硫酸塩の含量を定期的な間隔で HPLC により測定した。(6R) - 5, 10 - CH₂ - THF 硫酸塩の含量を、製造の時点での初期値と比較した (% r e l .)。結果を表 13 および 14 に示す。

【0084】

【表 9】

表 13：-20℃における (6R)-5, 10-CH₂-THF 硫酸塩の長期安定性

温度／相対湿度	(6R)-5, 10-CH ₂ -THF 硫酸塩 (% r e l.)	
	0 月	1 5 月
-20℃	100. 0	98. 7

【0085】

【表 10】

表 14：それぞれ 5℃、25℃／60% r h、40℃／75% r h での (6R)-5, 10-CH₂-THF 硫酸塩のその後の長期安定性

温度／相対湿度	(6R)-5, 10-CH ₂ -THF 硫酸塩 (% r e l.)	
	0 月	6 月
5℃	98. 7	97. 3
25℃／60% r h	98. 7	95. 5
40℃／75% r h	98. 7	95. 0

10

【0086】

表 13 および 14 におけるデータと、例 3 に開示される (6R)-5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の安定性データとの比較は、明確に以下を示している：

- i) (6R)-5, 10-CH₂-THF 硫酸塩と比較した、(6R)-5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の安定性には顕著な差異がある、および
 ii) (6R)-5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩は、(6R)-5, 10-CH₂-THF 硫酸塩よりも、長い期間にわたって極めて安定であった。

20

【0087】

(b) 分解生成物 10-ホルミル- (6R)-テトラヒドロ葉酸の含有量

(6R)-5, 10-CH₂-THF 硫酸塩を文献の手順 (E P 0 537 492 B1) に従って製造し、-20℃で15か月保管した。その後、生成物の試料を5℃、それぞれ25℃および60%相対湿度、それぞれ40℃および75%相対湿度で保管した。10-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (主要な分解生成物) を、定期的な間隔で H P C L によって測定し、絶対値 (% w / w) として開示した。結果を表 15～16 に示す。

【0088】

【表 11】

表 15：-20℃で保管した場合の分解生成物 10-ホルミルテトラヒドロ葉酸の含有量

温度／相対湿度	10-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (% w / w)	
	0 月	1 5 月
-20℃	0. 53	1. 37

30

【0089】

【表 12】

表 16：それぞれ 5℃、25℃／60% r h、40℃／75% r h で保管した場合の分解生成物 10-ホルミルテトラヒドロ葉酸のその後の含有量

温度／相対湿度	10-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (% w / w)	
	0 月	6 月
5℃	1. 37	1. 47
25℃／60% r h	1. 37	1. 89
40℃／75% r h	1. 37	2. 36

40

【0090】

例 5：(6R)-5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩の医薬剤形

(a) 静脈内適用に使用される再構成用凍結乾燥物

18. 480 k g の水に、4℃で、アルゴンを1時間にわたってスパージし、1. 386 k g の Na O H 2 M および 968. 9 g のクエン酸ナトリウム三水和物を添加した。混合物を4℃でアルゴン下において、完全に溶解するまで攪拌した (p H 13. 0)。その後、473. 9 g の (6R)-5, 10-CH₂-THF ヘミ硫酸塩を、210 g のア

50

ルゴンを用いて飽和した4℃の洗浄水下で添加した(ゆっくり溶解、pH 6.5)。その後、pHをNaOH 2Mで9.3±0.1(121.8g)に合わせた。4℃の203.6gアルゴン飽和水を添加した(溶液合計21.844kg)。

【0091】

その後、溶液を滅菌フィルターを通してろ過した。10mlの各バイアルに滅菌ろ過した5.201g(5ml)の溶液を添加し、その後、-45℃で凍結乾燥した。

【0092】

注射前に、10mlの水(WFI)を各バイアルに添加した(293mosmol/kg)。

【0093】

(b) 実質的に中性のpHでの(6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩の凍結乾燥組成物の調製

以下の材料(mg/100ml)および手順を、凍結乾燥組成物を得るために使用した：

材料(mg/100ml)：

5.530g (6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩(5.000g (6R)-5, 10-CH₂-THFと当量)

6.000g クエン酸、無水、粉末、USP

4.000g アスコルビン酸、粒状、USP

pHを調節するためのNaOH/HCl

100mg 注射用水(WFI)、USP 適量まで

(i) 手順：フィルターを通した窒素ガスNFをWFIに30分間スパージ。

(ii) 100mlプラスチック容器の風袋重量を記録。

(iii) クエン酸、アスコルビン酸および約90gのN₂をスパージした水を計量。

(iv) 混合して溶解。

(v) 1N NaOHまたはHClでpHを7.0±0.1に調節。

(vi) 該溶液を10℃に冷却。

(vii) (6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩を添加、混合して溶解。

(viii) pH(7.0±0.2)を記録。

(ix) 110gの最終重量(または100ml)までさらに水を添加。重量を記録。

(x) 該溶液をできるだけ冷却しながら、0.2ミクロンフィルターを通す。

(xi) 該溶液をできるだけ冷却しながら、バイアルへ充填(バイアルあたり、2mlまたは100mgの5, 10-CH₂-THF)。

(xii) 凍結乾燥。

(xiii) ヘッドスペースにおける窒素とともにわずかに減圧下でバイアルを密封。

(xiv) バイアルをクリンプ。

【0094】

例6：前臨床／臨床結果

(a) ICH S9ガイドンスに従って実施した動物モデルにおける前臨床研究からの結果は、(6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩が、ラット(100mg/kg/日)およびイヌ(50mg/kg/日)へ最も高い用量レベルで投与された際に安全であることを示す。さらに、臨床データは、最大200mg/m²の用量で投与された(6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩が患者にとって安全であることを示す。

【0095】

(b) 大腸癌と診断された32人の患者において実施された、無作為化単盲検第I/I相試験(ISO-CC-002)において、レボロイコボリンと比較した、腫瘍組織、隣接する粘膜および血漿における(6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩の薬物動態および薬力学的特性を調べた。試験は、スウェーデンのエーテボリにおけるSahlgrenska大学病院において実施した。試験完了後のデータの解析により、(6R)-5, 10-CH₂-THFヘミ硫酸塩の投与が、レボロイコボリンの投与後に得られる

10

20

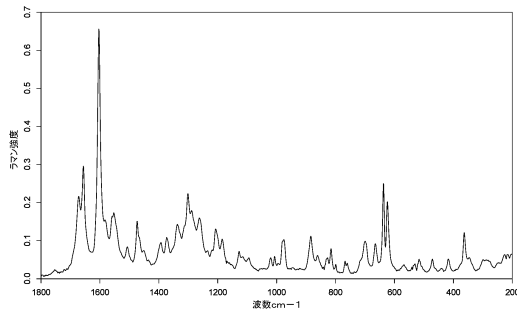
30

40

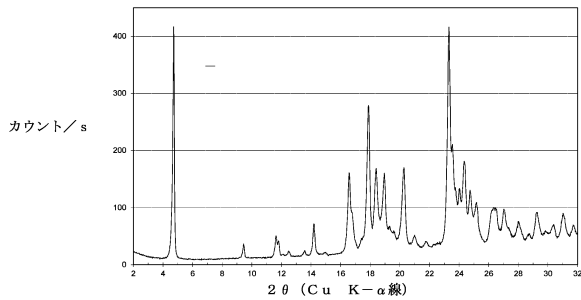
50

よりも、大幅に大きい曝露およびピーク血漿濃度を与えることが示された。腫瘍および隣接の粘膜の両方において、メチレンテトラヒドロホラートおよびテトラヒドロホラートの濃度もまた、(6R)-5,10-CH₂-THFヘミ硫酸塩の投与後に、レボロイコボリンの投与後に得られるよりも非常に高かった。

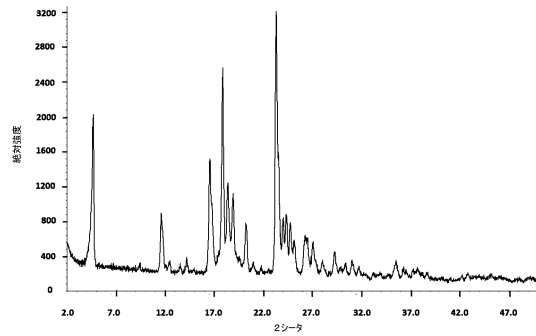
【図 1】



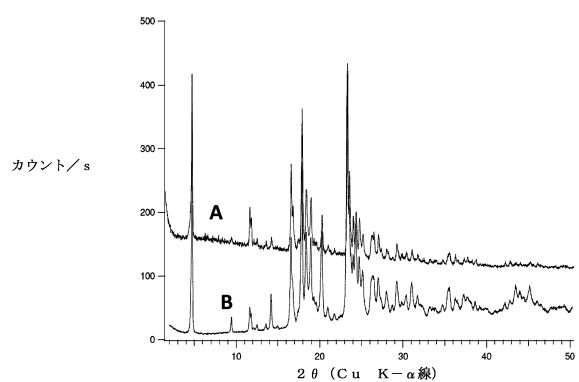
【図 2 a】



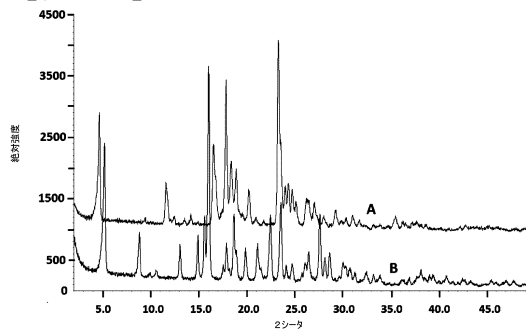
【図 2 b】



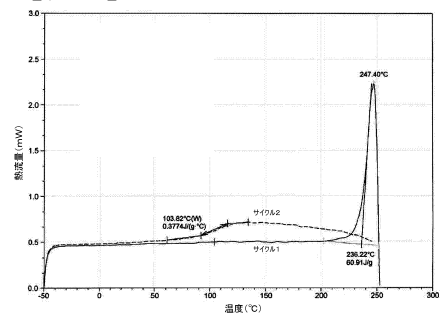
【図 2 c】



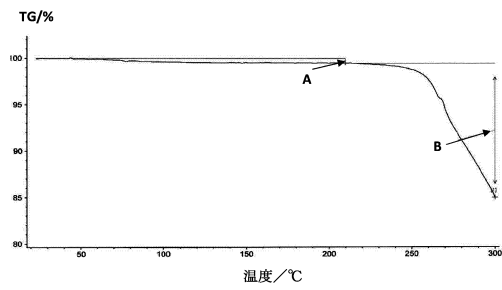
【図 2 d】



【図 4】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 K	9/16	(2006.01)	A 6 1 K	9/16
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/19
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	A 6 1 K	31/519
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00

- (72)発明者 グレーン・ヴィオーラ
 スイス連邦、8 4 4 7 ダクゼン、ヴァイアーリストラーセ、3
- (72)発明者 エッガー・トーマス
 スイス連邦、9 5 4 5 ヴェンギ、アードルファーストラーセ、5 6
- (72)発明者 アマン・トーマス
 スイス連邦、8 4 6 0 マルトハーレン、ゼーベストラーセ、1

合議体

審判長 瀬良 聡機

審判官 天野 宏樹

審判官 中島 芳人

- (56)参考文献 特開2019-131579 (JP, A)
 特開平5-294968 (JP, A)
 特表2010-513378 (JP, A)
 特表2004-514675 (JP, A)
 国際公開第2013/059735 (WO, A1)
 Patric Stahly, “医薬品の塩選択, 結晶多形のスクリーニングの重要性について”, 薬剤学, 2006年, vol. 66, No. 6, p. 435-439
 Richard J. Bastin, et al., “Salt Selection and Optimisation Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities”, Organic Processes Research & Development, 2000年7月19日, vol. 4, No. 5, p. 427-435
 C. G. WERMUTH編, “最新 創薬化学 下巻”, 株式会社 テクノミック, 1999年9月25日, p. 347-365

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D

CAPLUS/REGISTRY (STN)