NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **313673** (13) B1

(51) Int Cl[7] C 07 D 475/04, A 61 K 31/495

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19951796	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1995.05.08		
(24) Løpedag	1995.05.08	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	1995.11.10	(30) Prioritet	1994.05.09, CH. 1442/94
(45) Meddelt dato	2002.11.11		

(71) Patenthaver Eprova AG, Im Laternenacker 5, CH-8200 Schaffhausen, CH
(72) Oppfinner Hans-Rudolf Müller, Schaffhausen, CH
Martin Ulmann, Dachsen, CH
Rudolf Moser, Neuhausen, CH
Thomas Ammann, Marthalen, CH
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse **Stabil krystallinsk (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre, fremgangsmåte for fremstilling derav og farmasøytisk preparat**

(56) Anførte publikasjoner EP B1 600460, EP B1 495204, GB B 1379532

(57) Sammendrag

Stabile krystallinske (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyrer, deres anvendelse og en fremgangsmåte for deres fremstilling. Krystallinske (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyrer oppviser høy renhet og overordentlig høy stabilitet. Også i luft og ved forhøyet temperatur viser de ellers meget oksidasjonsømfintlige substanser seg å være absolutt inerte, uten tilsetning av stabilisatorer. Den beskrevne fremgangsmåte for fremstilling av krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre ved krystallisasjon ved pH-verdi ≥ 3,5 og for fremstilling av krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre ved krystallisasjon ved pH-verdi ≥ 2 er blitt utført og gir meget godt utbytte.

Oppfinnelsen angår krystallinsk N-[4-[[(2-amino-1,4,5,6,7,8-heksahydro-4-okso-(6S)- og -(6R)-pteridinyl)-metyl]-amino]-benzoyl]-L-glutaminsyre (i det følgende benevnt (6S)- henholdsvis (6R)-tetrahydrofolsyre), deres anvendelse og en fremgangsmåte for deres fremstilling.

Tetrahydrofolsyrederivater inneholder to asymmetriske sentere. Som følge av syntesen av disse derivater fra folsyre, nemlig N-(pteroyl)-L-glutaminsyre, foreligger det i glutaminsyreresten inneholdte optisk aktive C-atom i L-formen, mens det vanligvis gjennom hydrering av dobbeltbindingen i 5,6-stillingen i pteroylresten frembragte optisk aktive C-atom i 6-stillingen foreligger i den racemiske (6R,S)-form. Syntetiske derivater av tetrahydrofolsyre består derfor av en 1:1 blanding av to diastereomerer.

Som legemiddel anvendes tetrahydrofolat i overveiende grad i form av kalsiumsaltet av 5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre (Leucovorin) eller 5-metyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre, for behandling av megaloblastiske folsyre-anemier, som motgift for å forsterke holdbarheten av folsyre-antagonister, spesielt av aminopterin og metotreksat ved Krebst-terapi ("Antifolate rescue"), for å forsterke den terapeutiske virkning av fluorerte pyrimidiner og for behandling av autoimmunsykdommer som psoriasis og reumatisk artritis, for å forsterke holdbarheten av bestemte antiparasittika såsom trimetoprim-sulfametoksazol, samt for å nedsette toksisiteten av dideazatetrahydrofolater ved kjemoterapi. Likeledes anvendes tetrahydrofolsyre som basismateriale for fremstilling av diverse tetrahydrofolsyrederivater.

Den direkte anvendelse av tetrahydrofolsyre som legemiddel og som basismateriale for fremstilling av diverse tetrahydrofolsyrederivater har hittil strandet på vanskelighetene med å fremstille tetrahydrofolsyre med en for et farmasøytisk virkestoff akseptabel renhet og på den ekstreme ustabilitet av tetrahydrofolsyre, idet spesielt den store oksidasjonsfølsomhet er påfallende (se i den forbindelse A.L. Fitzhugh, Pteridines 4(4), 187-191 (1993)). For å overvinne denne ustabilitet er det blitt utviklet forskjellige metoder,

av hvilke den ifølge DE-OS-2.323.124 spesielt skal nevnes i sammenheng med den foreliggende oppfinnelse. På området fremstilling av tetrahydrofolsyre og i sammenheng med den foreliggende oppfinnelse skal også EP-600.460 nevnes spesielt. Hittil har man imidlertid ikke funnet frem til noen teknisk akseptabel fremgangsmåte egnet for fremstilling av tetrahydrofolsyre med høy renhet og en tilstrekkelig stabilitet som dermed ville muliggjøre farmasøytisk anvendelse av tetrahydrofolsyre.

Det har nå overraskende vist seg at (6S)- eller (6R)-tetrahydrofolsyre med høy kjemisk og optisk renhet og en utmerket stabilitet lar seg fremstille ved krystallisering av en optisk ren (6S)- eller optisk ren (6R)-, anriket (6S)- eller anriket (6R)-, eller også (6R,S)-tetrahydrofolsyre. Den derved oppnådde krystallinske (6S)- og/eller (6R)-tetrahydrofolsyre muliggjør for første gang deres anvendelse som legemiddel eller som utgangsmateriale for teknisk fremstilling av andre tetrahydrofolsyrederivater med høy renhet.

Oppfinnelsen angår således stabile, krystallinske forbindelser som er kjennetegnet ved at disse er N-[4-[[(2-amino-1,4,5,6,7,8-heksahydro-4-okso-(6S)- og -(6R)-pteridinyl)metyl]amino]benzoyl]-L-glutaminsyre {(6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre}. Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for fremstilling av krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre, hvilken fremgangsmåte er kjennetegnet ved at (6S)- eller (6R,S)-tetrahydrofolsyre krystalliseres i et polart medium ved en pH-verdi ≥ 3,5. Enn videre angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre, som er kjennetegnet ved at (6R)- eller (6R,S)-tetrahydrofolsyre krystalliseres i et polart medium ved en pH-verdi ≥ 2.

Egnet som polart medium er spesielt vann eller en blanding av vann og et med vann blandbart organisk oppløsningsmiddel, som f.eks. vannoppløselige alkoholer, f.eks. metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, etylenglykol, en lavere alifatisk vannoppløselig karboksylsyre, som f.eks. maursyre, eddiksyre, melkesyre eller vannoppløselige amider, f.eks. formamid, dimetylformamid, dimetylacetamid, 1-metylpyrrolidon, 2-metylpyrrolidon og 2-piperidinon. Det pålegges ingen spesielle begrensninger hva angår arten av det benyttede

oppløsningsmiddel og blandingsforholdet, da krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre og krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre generelt oppviser større oppløselighet enn de tilsvarende amorfe former.

For innledning av krystallisasjonen av (6S)-tetrahydrofolsyre er spesielt en pH-verdi på mellom 3,5 og 6,5 velegnet. For innledning av krystallisasjonen av (6R)-tetrahydrofolsyre er en pH-verdi på mellom 2 og 5,5 spesielt egnet. Den optimale pH-verdi for innledning av krystallisasjonen avhenger av de anvendte materialer og den ønskede sluttforbindelse og kan bestemmes ved hjelp av enkle forsøk. Vanligvis gjelder det at jo høyere saltinnholdet i utgangsoppløsningen er, jo lavere må pH-verdien være ved innledningen av krystallisasjonen, men det gjelder også at jo lavere pH-verdien for innledning av krystallisasjon er, jo langsommere må krystallisasjonen foregå, da ellers amorf tetrahydrofolsyre utfelles ved pH-verdier omkring 3. For direkte krystallisasjon av (6S)-tetrahydrofolsyre fra en ved borhydridreduksjon av folsyre oppnådd reaksjonsoppløsning er det f.eks. tvingende nødvendig med en pH-verdi ≤ 4,8 ved kyrtsallisasjonens innledning. Etter at krystallisasjonen har startet kan pH-verdien endres.
Under krystallisasjonen av (6S)-tetrahydrofolsyren og under krystallisasjonen av (6R)-tetrahydrofolsyren øker pH-verdien, eller den kan holdes konstant gjennom tilsetning av en syre eller en buffer. For krystallisasjon av (6S)-tetrahydrofolsyre gjelder at dersom en optisk anriking av (6S)-tetrahydrofolsyre er målet for krystallisasjonen, foretrekkes en pH-verdi på mellom 4,5 og 5,5 under krystallisasjonen. Dersom fremstillingen av stabil, krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre er målet for krystallisasjonen, foretrekkes en pH-verdi på mellom 3,5 og 4,5. For krystallisasjon av (6R)-tetrahydrofolsyre foretrekkes det, uavhengig av det tilstrebede mål, en pH-verdi på mellom 3,5 og 4,5 under krystallisasjonen. Krystallisasjonen kan utføres enten ved romtemperatur, ved forhøyet temperatur eller også ved senket temperatur.
Krystallisasjonen varer vanligvis mellom noen få minutter og flere dager. Lengre krystallisasjonstid gir som regel høyere renhet og mer stabile produkter.

Krystallisasjonen av (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre skjer spontant gjennom langsom innstilling av pH-verdien, enten fra en pH-verdi som er lavere enn den pH-verdi som egner seg for innledning av krystallisasjonen av den tilsvarende isomer, eller fortrinnsvis fra en høyere pH-verdi. Krystallisasjonen kan utløses gjennom poding med en tilsvarende krystallinsk tetrahydrofolsyre i det egnede pH-område for oppstarting av krystallisasjonen av den tilsvarende isomer.

Som utgangsmateriale ved krystallisasjonen kan det anvendes såvel racemisk (6R,S)-tetrahydrofolsyre som anriket (6S)- eller (6R)-tetrahydrofolsyre eller også amorf eller krystallinsk (6S)- eller (6R)-tetrahydrofolsyre. Egnet som utgangsmateriale er både isolerte faste stoffer som f.eks. (6R,S)-tetrahydrofolsyre, (6S)-tetrahydrofolsyre-svovelsyre og sulfonsyre-addisjonssalter fremstilt i henhold til EP-495 204 og tetrahydrofolsyre fremstilt in situ ved katalytisk hydrering eller ved reduksjon av folsyre med borhydrid. Krystallisasjonen av (6R)-tetrahydrofolsyren kan foretas direkte fra moderluten for (6S)-tetrahydrofolsyrekrystallisasjonen. Krystallisasjonen av de to isomerer kan foretas såvel fra en oppløsning, som fås f.eks. ved innstilling av en pH-verdi > 7 eller < 2, som fra en suspensjon.

Ved bruk av amorf eller delvis krystallinsk optisk ren tetrahydrofolsyre eller dens salter som utgangsmateriale for krystallisasjonen fås ved den beskrevne fremgangsmåte krystallinsk tetrahydrofolsyre av en renhet som hittil aldri er blitt oppnådd (>98%) og med en stabilitet som hittil heller ikke tidligere er blitt oppnådd.

Oppfinnelsen angår også en anvendelse av krystallinsk (6S)- og/eller (6R)-tetrahydrofolsyre som bestanddel ved fremstilling av legemidler eller for fremstilling av andre tetrahydrofolsyrederivater, da krystallinsk (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre på grunn av deres utmerkede stabilitet i fast form bibeholder en meget god og uforandret kvalitet i praktisk talt ubegrenset tid. Likeledes angår oppfinnelsen farmasøytiske preparater inneholdende krystallinsk (6S)- og/eller (6R)-tetrahydrofolsyre. Fremstillingen av det farmasøytiske preparat foretas etter i og for seg kjente fremgangsmåter, som f.eks.

frysetørring. Anvendelsen foretas analogt med anvendelsen av kjente subtanser på tetrahydrofolatområdet, som f.eks. 5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre.

En fremgangsmåte for å separere (6R,S)-tetrahydrofolsyre i de to diastereomerer (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre skjer ved fraksjonert krystallisasjon. Denne fremgangsmåte er meget enkel og gir godt utbytte. Det fås allerede ved den første krystallisasjon av et urent racemat (6R,S)-tetrahydrofolsyre krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med en (6S)-andel på mer enn 75% i utbytter på over 70% og krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre med en (6R)-andel på mer enn 80% i utbytter på over 50%. Ved ytterligere krystallisasjoner under analoge betingelser kan krystallinsk (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre fås med en isomerrenhet på mer enn 95%.

(6R)- eller (6S)-tetrahydrofolsyre kan også anvendes direkte, uten isolering, for fremstilling av andre tetrahydrofolsyrederivater. Således kan man f.eks. gjennom tilsetning av formaldehyd til en oppløsning av (6R)-tetrahydrofolsyre fremstille en meget lett anrikbar 5,10-metylen-(6S)-tetrahydrofolsyre.

Eksempler for illustrering av oppfinnelsen

De i eksemplene angitte innhold av tetrahydrofolsyre og isomerandelene ble bestemt ved HPLC. Alle tetrahydrofolsyreinnhold er regnet på vannfri basis.

Eksempel 1 (Stabilitet)

For bestemmelse av stabiliteten av den krystallinske (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre ble substansene sammen med sammenligningssubstanser lagret under stressbetingelser ved 60 °C. Med visse mellomrom ble det gjenværende innhold av tetrahydrofolsyre målt og angitt i sammenligning med utgangsverdien.

	Belastningstid i døgn ved 60 °C i luft							
	0	2	6	13	21	28	57	360
krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre	100,0%	100,1%	102,5%	98,7%	103,6%	103,1%	101,2%	93,3%
krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre	100,0%	98,4%	96,1%	93,3%	92,7%		82,0%	
"krystallinsk (6R,S)-tetrahydrofolsyre etter Yamanouchi"	100,0%	83,6%		48,6%	31,0%		13,4%	
amorf (6S)-tetra-hydrofolsyre	100,0%	60,4%		13,7%	7,9%			
amorf (6R)-tetra-hydrofolsyre	100,0%	70,5%		29,1%	21,6%		9,9%	
amorf (6R,S)-tetra-hydrofolsyre	100,0%	53,4%		17,4%	13,2%			

Krystallinsk (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre er også etter lengre belastningstid ved 60 °C i luft fortsatt meget lys, nesten hvit. I motsetning hertil misfarges sterkt og meget raskt de øvrige produkter som er tatt med i sammenligningsøyeømed.

De for stabilitetsforsøkene benyttede substanser ble fremstilt som følger:

- Krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre
  etter eksempel 6 i den foreliggende patentsøknad.
- Krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre
  etter eksempel 9 i den foreliggende patentsøknad.
- "Krystallinsk (6R,S)-tetrahydrofolsyre etter Yamanouchi"
  i henhold til DE-OS 2.323.124, eksempel 3.
- Amorf (6S)-tetrahydrofolsyre
  (6S)-tetrahydrofolsyre oppløses i eddiksyre og utfelles med dietyleter.
- Amorf (6R)-tetrahydrofolsyre
  (6R)-tetrahydrofolsyre oppløses i eddiksyre og utfelles med dietyleter.
- Amorf (6R,S)-tetrahydrofolsyre
  (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppløses i eddiksyre og utfelles med dietyleter.

Eksempel 2 (Pulverrøntgendiagrammer)

For karakterisering av de strukturelle egenskaper (krystallinitet) av de krystallinske (6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyrer ble det tatt opp pulverrøntgendiagrammer (bøyningsspektere) av disse substanser sammen med sammenligningssubstanser under de samme betingelser.

Krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre og krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre gir begge godt oppløste og innbyrdes ulike spektere med skarpe bånd og lav undergrunn. Spektrene oppviser store krystallinske andeler. I motsetning hertil gir "krystallinsk (6R,S)-tetrahydrofolsyre etter Yamanouchi" et dårlig oppløst spektrum med uskarpe bånd (diffuse maksima) og høy undergrunn. Dette spektrum viser at det overveiende foreligger amorf (6R,S)-tetrahydrofolsyre med bare en liten krystallinsk andel.

For måling av pulverrøntgendiagrammene ble de benyttede substanser fremstilt som følger:

- Krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre
  etter eksempel 6 i den foreliggende patentsøknad.
- Krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre
  etter eksempel 9 i den foreliggende patentsøknad.
- "Krystallinsk (6R,S)-tetrahydrofolsyre etter Yamanouchi"
  i henhold til DE-OS 2.323.124, eksempel 3.

Eksempel 3

a) 4 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 16 ml vann og innstilles på pH 9 med 25% ammoniakk. Den oppnådde oppløsning innstilles på pH 5 med saltsyre ved 50 °C og innstilles deretter på den ønskede pH-verdi med natronlut. Ved den angitte pH-verdi tas det ut 2 ml's prøver, som avsuges og vaskes med litt vann.

pH	Mengde	(6S)-andel
pH 5,5	0,03 g	87,8%
pH 5,0	0,06 g	87,8%
pH 6,4	0,02 g	88,6%

b) 4 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 16 ml vann og innstilles på pH 9 med 25% ammoniakk. Den oppnådde oppløsning innstilles på pH 5 med saltsyre ved 50 °C og innstilles deretter på den ønskede pH-verdi med natronlut. Ved den angitte pH-verdi tas det ut 2 ml's prøver, som avsuges og vaskes med litt vann.

pH	Mengde	(6S)-andel
pH 4,8	0,09 g	72,7%
pH 4,5	0,15 g	57,9%
pH 4,2	0,27 g	51,8%

c) 4 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 16 ml vann og innstilles på pH 9 med 25% ammoniakk. Den oppnådde oppløsning innstilles på pH 5 med saltsyre ved 50 °C og innstilles deretter på den ønskede pH-verdi med

natronlut. Ved den angitte pH-verdi tas det ut 2 ml's prøver, som avsuges og vaskes med litt vann.

pH	Mengde	(6S)-andel
pH 4,1	0,16 g	56,2%
pH 3,8	0,10 g	52,2%
pH 3,5	0,22 g	51,8%
pH 3,0	0,12 g	51,6%

d) 10 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 80 ml vann og innstilles på pH 1,3 med 1 N saltsyre. Den oppnådde oppløsning innstilles langsomt ved romtemperatur på den ønskede pH-verdi med 1,8 N ammoniakk. Ved den angitte pH-verdi tas det ut 2 ml's prøver, som avsuges og vaskes med litt vann.

pH	Mengde	(6S)-andel
pH 2,0	0,03 g	50,3%
pH 2,3	0,13 g	50,5%
pH 2,5	0,12 g	49,3%
pH 2,8	0,22 g	50,8%
pH 3,1	0,17 g	49,5%
pH 3,5	0,21 g	51,5%
pH 4,0	0,14 g	59,1%
pH 4,5	0,16 g	56,1%
pH 5,1	0,22 g	72,7%
pH 5,5	0,20 g	70,9%

De i tabellene a) - d) oppførte verdier svarer ikke til de optimale fremgangsmåteparametere, da samtlige forsøk ble utført likt for å oppnå bedre sammenlignbarhet.

Eksempel 4

Ved hver kjøring blir 5 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmet i 50 ml vann og blandingen tillatt å stå i 5 døgn ved romtemperatur eller 40 °C. Etter avsuging (filtreringstemperatur = krystallisasjonstemperatur) og ettervasking fås:

	Romtemperatur		40 °C	
	Mengde	(6S)-andel	Mengde	(6S)-andel
pH 3,1[1)]	4,2 g	52,5%	4,5 g	52,2%
pH 4,2[2)]	3,5 g	58,9%	3,9 g	59,3%
pH 5,1[2)]	1,8 g	82,1%	1,5 g	81,0%

[1)] pH-verdi ved oppslemning av (6R,S)-tetrahydrofolsyren uten korrektiv, analogt med DE-OS 2.323.124, eksempel 3.

[2)] innstilt på ønsket pH-verdi med natronlut.

De i tabellene oppførte verdier svarer ikke til de optimale fremgangsmåteparametere, da samtlige forsøk ble utført likt for å oppnå bedre sammenlignbarhet.

Eksempel 5

40 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 160 ml vann og innstilles på pH 9,3 med 25% ammoniakk. Den dannede oppløsning innstilles langsomt på pH 5,1 med saltsyre ved 50 °C og holdes under den påfølgende krystallisasjon på en pH mellom 5,1 og 5,2. Etter utført krystallisasjon foretas avkjøling til 0-5 °C, trykkfiltrering og vaskning med vann.

Det oppnås 19 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 95,9% og en (6S)-andel på 80,5%.

Fra den ene halvpart av moderluten fås ved utfelning med etanol 1,1 g anriket, amorf (6R)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 63,3% og en (6R)-andel på 75,9%, og fra den andre halvdel av moderluten fås etter hurtig innstilling av pH-verdien på 3,5 med saltsyre 6,3 g anriket, amorf (6R)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 84,8% og en (6R)-andel på 75,9%.

Eksempel 6

60 g (6S)-tetrahydrofolsyre-benzensulfonsyre-addisjonssalt med en (6S)-andel på 99,9%, fremstilt i henhold til EP 495.204, oppslemmes i 240 ml vann og innstilles på pH 5,5 med 63 ml 1,8 N ammoniakk eller 55,2 ml 2 N natronlut. pH-ver-

dien holdes ved 5,5. Den hvite, tykke suspensjon innstilles deretter på pH 9,3 med 30% natronlut, og den dannede klare oppløsning oppvarmes til 50 °C.

Etter derpå følgende langsom innstilling av pH-verdien på 5,2 med saltsyre fås etter poding med krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre 43,0 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 96,8% og en (6S)-andel på 99,9%.

Ved oppløsning av 40 g av den oppnådde krystallinske (6S)-tetrahydrofolsyre i 160 ml vann ved pH 9 og derpå følgende langsom innstilling av pH-verdien på 4,2 med saltsyre fås, etter poding med krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre, 32,5 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 98,5% og en (6S)-andel på 100,0%.

Ved ytterligere omkrystalliseringer ved pH 4,2 fås krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold som er høyere enn 99%, og en (6S)-andel på 100,0%.

Oppløseligheten av den således oppnådde krystallinske (6S)-tetrahydrofolsyre i vann ved romtemperatur er 0,0022%.

Eksempel 7

40 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 160 ml vann og 40 ml metanol, og blandingen innstilles på pH 9,1 med 25% ammoniakk. Den dannede oppløsning innstilles langsomt på pH 5,1 med saltsyre ved 50 °C og holdes under den påfølgende krystallisasjon ved pH mellom 5,1 og 5,2. Etter utført krystallisasjon blir en prøve på 20 ml avsuget ved 50 °C og vasket med vann/metanol. Det fås 1,3 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 96,1% og en (6S)-andel på 83,0%.

Hovedmengden avkjøles til 0-5 °C, filtreres under trykk og vaskes med vann/metanol. Det oppnås ytterligere 18,6 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 90,9% og en (6S)-andel på 67,1%.

Eksempel 8

60 g folsyre oppslemmes i 240 ml vann, og det foretas innstilling av pH-verdien på 11,5 med 30% natronlut. Den opp-

nådde oppløsning reduseres ved 70 °C med 30 g natriumborhydrid i 120 ml vann og 12 g 30% natronlut. Etter ca. 5 timers reaksjonstid fortynnes reaksjonsblandingen med 180 ml vann, og pH-verdien innstilles langsomt på 4,5 med saltsyre. Under den påfølgende krystallisasjon øker pH-verdien til ca. 5,5. Suspensjonen trykkfiltreres ved 0-5 °C og det foretas vaskning med litt vann.

Det oppnås 25,5 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 94,4% og en (6S)-andel på 82,7%. Vanninnholdet etter tørking er 4,0%.

Ved oppløsning av 20 g av den oppnådde krystallinske (6S)-tetrahydrofolsyre i 80 ml vann ved pH 9 og påfølgende langsom innstilling av pH-verdien på 5,1 med saltsyre fås etter poding med krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre 4,5 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 94,0% og en (6S)-andel på 94,7%. Vanninnholdet etter tørking er 1,8%.

Eksempel 9

50 g amorf (6R)-tetrahydrofolsyre med en (6R)-andel på 99,4% oppslemmes i 600 ml vann, og pH-verdien innstilles på 9,0 ved 25% ammoniakk. Den oppnådde klare oppløsning oppvarmes til 50 °C.

Etter påfølgende langsom innstilling av pH-verdien på 4,4 med saltsyre og opprettholdelse av denne verdi fås 42,0 g krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 96,2% og en (6R)-andel på 99,5%. Oppløseligheten av den derved oppnådde krystallinske (6R)-tetrahydrofolsyre i vann ved romtemperatur er 0,014%.

Gjennom ytterligere omkrystallisasjoner ved pH 4,4 fås krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold som er høyere enn 98%, og en (6R)-andel som er høyere enn 99,5%.

Eksempel 10

40 g (6R,S)-tetrahydrofolsyre oppslemmes i 160 ml vann, og pH-verdien innstilles på 9,3 med 25% ammoniakk. Den dannede oppløsning innstilles langsomt på pH 5,1 med saltsyre,

og under den påfølgende krystallisasjon holdes pH-verdien mellom 5,1 og 5,2. Etter utført krystallisasjon foretas avkjøling til romtemperatur, trykkfiltrering og vaskning med vann.

Det oppnås 18,2 g krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 94,0% og en (6S)-andel på 77,8%.

Moderluten fra (6S)-tetrahydrofolsyrekrystallisasjonen oppvarmes på ny til 50 °C, og pH-verdien innstilles langsomt på 4,4 med saltsyre og holdes mellom 4,0 og 4,5 under den påfølgende krystallisasjon av (6R)-tetrahydrofolsyren. Etter utført krystallisasjon foretas av kjøling til romtemperatur, trykkfiltrering og vaskning med vann.

Det fås 12 g krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre med et kjemisk innhold på 78,0% og en (6R)-andel på 74,8%.

Eksempel 11

Ved anvendelse av de i EP 600.460, eksempel 2, beskrevne betingelser ble den der beskrevne fremgangsmåte gjentatte ganger utført ved pH 5,2 og 45 °C ved bruk av racemisk tetrahydrofolsyre som utgangsmateriale. De derved oppnådde produkter ble undersøkt med hensyn til kjemisk og optisk renhet. Likeledes ble det kjemiske totalutbytte registrert i hvert tilfelle.

	6S-andel	Innhold g/g	Renhet Innhold av (6S)-andel	Total-utbytte
Utgangs-materiale	50%	89,6	44,8%	100%
1. gjennomgang	80,5%	96,9%	78,0%	53,5%
2. gjennomgang	90,0%	97,3%	87,6%	45,4%
3. gjennomgang	94,4%	97,4%	91,9%	42,0%
4. gjennomgang	96,4%	96,7%	93,2%	38,9%
5. gjennomgang	97,7%	96,2%	94,0%	35,2%
6. gjennomgang	98,4%	95,6%	94,1%	32,2%
7. gjennomgang	98,9%	96,0%	94,9%	28,6%

Som det vil ses klart av denne oppstilling kan man

ved anvendelse av denne fremgangsmåte flere ganger riktignok øke (6S)-andelen i fremgangsmåteproduktet, men det må også tas hensyn til den reduksjon i produktinnholdet som følger av at fremgangsmåten utføres flere ganger. Fremstillingen av et produkt med renhet høyere enn 98% er derfor ikke mulig ved anvendelse av denne fremgangsmåte flere ganger.

Patentkrav

1. Stabile, krystallinske forbindelser, karakterisert ved at disse er N-[4-[[(2-amino-1,4,5,6,7,8-heksahydro-4-okso-(6S)- og -(6R)-pteridinyl)metyl]amino]benzoyl]-L-glutaminsyre {(6S)- og (6R)-tetrahydrofolsyre}.

2. Fremgangsmåte for fremstilling av krystallinsk (6S)-tetrahydrofolsyre, karakterisert ved at (6S)- eller (6R,S)-tetrahydrofolsyre krystalliseres i et polart medium ved en pH-verdi ≥ 3,5.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at det som polart medium anvendes vann eller en blanding av vann og et polart, vannløselig, organisk løsningsmiddel, og at krystalliseringen skjer fra en løsning eller fra en suspensjon.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 2 eller 3, karakterisert ved at det for starten av krystalliseringen av (6S)-tetrahydrofolsyren innstilles en pH-verdi på mellom 3,5 og 6,5.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 2, 3 eller 4, karakterisert ved at pH-verdien under krystalliseringen holdes konstant.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 2, 3, 4 eller 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at (6S)-tetrahydrofolsyre separeres ved fraksjonert krystallisering, og at (6R)-tetrahydrofolsyre isoleres fra den gjenværende moderlut.

7. Fremgangsmåte for fremstilling av krystallinsk (6R)-tetrahydrofolsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at (6R)- eller (6R,S)-tetrahydrofolsyre krystalliseres i et polart medium ved en pH-verdi ≥ 2.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som polart medium anvendes vann eller en blanding av vann og et polart, vannløselig, organisk løsningsmiddel, og at krystalliseringen skjer fra en løsning eller fra en suspensjon.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 7 eller 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at det for starten av krystalliseringen av (6R)-tetrahydrofolsyren innstilles en pH-verdi på mellom 2 og 5,5.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 2, 3, 4, 7, 8 eller 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at pH-verdien under krystalliseringen holdes konstant.

11. Anvendelse av krystallinsk (6S)- og/eller (6R)-tetrahydrofolsyre som bestanddel ved fremstilling av legemidler.

12. Anvendelse av krystallinsk (6S)- og/eller (6R)-tetrahydrofolsyre fremstilt ifølge krav 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 som bestanddel for fremstilling av legemidler.

13. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder krystallinsk (6S)- og/eller (6R)-tetrahydrofolsyre.