CH 684644 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 684644 A5

(51) Int. Cl.[5]: C 08 B 37/16
C 07 D 487/14
A 61 K 31/505
A 61 K 47/40
// (C 07 D 487/14, 475:00, 233:00)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 2192/92

(22) Anmeldungsdatum: 13.07.1992

(24) Patent erteilt: 15.11.1994

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.11.1994

(73) Inhaber:
Eprova Aktiengesellschaft, Schaffhausen

(72) Erfinder:
Müller, Hans Rudolf, Dr., Schaffhausen
Ulmann, Martin, Dachsen
Conti, Josef, Schaffhausen

(54) 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen.

(57) Die Erfindung betrifft neue Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure. Die überraschend gute Stabilität dieser Verbindungen ermöglicht erstmals deren pharmazeutische Verwendung.

Die Erfindung betrifft ausserdem ein Verfahren zur Herstellung der genannten Substanzen und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft α-, β-, γ-, Hydroxypropyl-β-, Hydroxypropyl-γ-, Dimethyl-β- und Dimethyl-γ-Cyclodextrin Einschlussverbindungen der (6R)-, (6S)- und (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure. Die überraschend gute Stabilität dieser Verbindungen ermöglicht erstmals deren pharmazeutische Verwendung.

Die Erfindung betrifft ausserdem ein Verfahren zur Herstellung der genannten Einschlussverbindungen sowie auch deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln und diese Arzneimittel.

Im folgenden ist unter Hydroxypropyl-Cyclodextrin jeweils Hydroxypropyl-Cyclodextrin (0,6), Hydroxypropyl-Cyclodextrin (0,9), 3-Hydroxypropyl-Cyclodextrin, 2,3-Dihydroxypropyl-Cyclodextrin und vor allem 2-Hydroxypropyl-Cyclodextrin zu verstehen. Ebenfalls sind im folgenden unter 5,10-Methylentetrahydrofolsäure auch 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Salze zu verstehen.

Tetrahydrofolate sind die biologisch aktiven Formen der Folsäure (Folsäure-Co-Faktoren). Als Arzneimittel werden Tetrahydrofolate vorwiegend als Calciumsalz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure [Leucovorin] verwendet, z.B. zur Verstärkung des therapeutischen Effektes von 5-Fluoruracil oder z.B. als Rescue-Substanz beim Einsatz von Methotrexat in der Krebstherapie. Im Organismus wird (6S)-5-Formyltetrahydrofolsäure in (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure umgewandelt, welche als Co-Faktor mit aus 5-Fluoruracil (5-FU) gebildetem 5-Fluor-Desoxyuridinmonophosphat (5-F-dUMP) und Thymidylat-Synthetase (TS) einen cytostatisch wirksamen kovalenten ternären Komplex: 5-F-dUMP/TS/5, 10-Methylentetrahydrofolsäure bildet. Siehe dazu: W. A. Bleyer, Cancer March 15 Supplement 1989: S. 995–1007 sowie E. L. R. Stokstad, Folic Acid Metabolism in Health and Disease 1990 (Wiley-Liss Inc), Seite 9. Es wäre daher von Vorteil, anstelle von Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure) direkt den Co-Faktor 5,10-Methylentetrahydrofolsäure zu verwenden. Siehe dazu WO 91/17660 Seite 5, Zeilen 24 bis 35. Bisher scheiterte dieses Unterfangen an der nicht ausreichenden Reinheit und Stabilität von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure und deren Salzen. Vergleiche dazu EP-A 0 409 125, die darin beschriebenen Gehalte an (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure liegen im allgemeinen zwischen 85 und 90%. Einzig vom Calcium- und Magnesiumsalz der (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure wurden Präparate mit einem Gehalt an 96.5–98.8% erhalten. Die Stabilität der Salzlösungen ist jedoch sehr kritisch. Bei pH 9 sind nach 6 Stunden nur noch etwa 85% der ursprünglichen Menge 5,10-Methylentetrahydrofolsäure vorhanden (EP-A 0 409 125, Tabelle, Seite 14).

5,10-Methylentetrahydrofolsäure steht bei neutralem und saurem pH im Gleichgewicht mit Formaldehyd und Tetrahydrofolsäure (L. J. Machlin, Handbook of Vitamins, 2nd Ed (Marcel Decker Inc., N.Y./Basel), T. Brody Seite 457; M. J. Osbom, et al, J. Am. Chem. Soc. 82, 4921 [1960], R. G. Kallen, et al., J. Biol. Chem., 241, 5851 [1966]). Dieses Gleichgewicht steht der parenteralen Anwendung von 15,10-Methylentetrahydrofolsäure entgegen. Auch in WO 91/17 660, die sich intensiv mit den Vorteilen der Verwendung von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure gegenüber andem Tetrahydrofolsäure-Derivaten auseinandersetzt, wird keine Möglichkeit zur Stabilisierung von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure aufgezeigt. Diese Stabilisierung ist jedoch die Grundlage, die eine pharmazeutische Verwendung von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure erst ermöglicht. Bisher bekannte Technologien wie die zur Stabilisierung von 5-Formyltetrahydrofolsäure verwendete Zugabe von Ascorbinsäure, Parabenen, Merkaptoalkoholen oder Trometamol (EP 0 416 232), oder die Stabilisierung des Calciumsalzes von 5-Formyltetrahydrofolsäure durch Zusatz eines Komplexierungsmittels für das Erdalkaliion (EP 0 401 895), können nicht auf 5,10-Methylentetrahydrofolsäure angewendet werden oder zeigen nur beschränkten Erfolg, z.B. durch Verlangsamung des oxidativen Abbaus der Tetrahydrofolsäure und Tetrahydrofolsäure-Derivate. Keine dieser Methoden beeinflusst jedoch das Gleichgewicht in dem 5,10-Methylentetrahydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure und freiem Formaldehyd steht.

Ebenfalls klar nur auf die Hemmung des oxidativen Abbaus ausgerichtet ist der Einsatz von β-Cyclodextrin zur Stabilisierung von Dihydrofolsäure, die als Substrat in der biochemischen Analytik von Methotrexat gebraucht werden kann (JP 58–48 933 Sho) und der Einsatz von Cyclodextrin zur Stabilisierung von Leucovorin (EP 0 427 078).

Es wurde nun überraschend gefunden, dass Tetrahydrofolsäure auch in Gegenwart von Cyclodextrinen die Kondensationsreaktion mit Formaldehyd eingeht und vor allem, dass sich nach der Reaktion in wässriger Lösung stabile Einschlussverbindungen von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure im entsprechenden Cyclodextrin ergeben und dadurch erstmals die therapeutische Anwendung von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure in wässrigen Lösungen ermöglicht wird.

Die Stabilitätserhöhung ist umso mehr überraschend, als dass bisherige Messungen die Schlussfolgerung zuliessen, es trete praktisch keine Wechselwirkung des Moleküls mit Cyclodextrin ein (D.W. Armstrong, et al, Science, 232, 1132–5, (1986), im speziellen Seite 134, Spalte 2, Zeile 2). Durch eigene Messungen konnte bestätigt werden, dass Cyclodextrin mit 5-Formyltetrahydrofolsäure nicht und mit 5-Methyltetrahydrofolsäure nur sehr schwach in Wechselwirkung tritt. Eine Stabilisierung von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure in bezug auf den chemischen Abbau, aber vor allem auch in bezug auf eine Verschiebung des Gleichgewichts von freiem Formaldehyd und Tetrahydrofolsäure hin zu 5,10-Methylentetrahydrofolsäure war somit nicht zu erwarten.

Die Cyclodextrin-Einschlussverbindungen werden bevorzugt aus dem durch die schweizerische Patentschrift CH 681 303 vom 26.02.1993 leicht zugänglich gewordenen (6S)-, (6R)- und (6R,S)-Tetrahydrofolsäuresulfat oder Sulfonsäuresalz in situ durch Umsetzung mit Formaldehyd in Gegenwart vom

entsprechenden Cyclodextrin hergestellt. Zur quantitativen Umsetzung der Tetrahydrofolsäure sind dabei nur kleine molare Überschüsse an Formaldehyd von 10–20% notwendig. Die Reaktion erfolgt dabei bevorzugt im pH-Bereich zwischen 8 und 9. Die Einschlussverbindung kann jedoch auch durch Eintragen von (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure in eine Cyclodextrin-Lösung oder Cyclodextrin-Aufschlämmung erfolgen. Die erhaltenen Produkte sind in Lösung bei Raumtemperatur praktisch unbeschränkt stabil. Sie sind geeignet als Bestandteile von parenteralen Arzneimittelformen oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung von oralen Arzneimittelformen. Sowohl die oralen als auch die parenteralen Arzneimittelformen sind z.B. zur Krebstherapie, zur Behandlung von bestimmten Anämie-Formen, von Autoimmunkrankheiten und von neuralen Störungen geeignet.

Gegenstand der Erfindung sind neue α-, β-, γ-. Hydroxypropyl-β-, Hydroxypropyl-γ-, Dimethyl-β- und Dimethyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)-, (6S)- und (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure. Diese Produkte sind in wässriger Lösung stabil. Sie eignen sich auch zur Herstellung von parenteralen Arzneimittelformen, z.B. in der Krebstherapie.

Aufgrund der hohen Löslichkeit und physiologisch guten Verträglichkeit eignen sich vor allem Alkali- oder Erdalkalisalze, im speziellen das Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Magnesiumsalz der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure zur Herstellung dieser Verbindungen.

Bevorzugte Verbindungen sind:
Alkali- oder Erdalkalisalze der (6R)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit β-Cyclodextrin
Alkali- oder Erdalkalisalze der (6R)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin
Alkali- oder Erdalkalisalze der (6R)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin
Alkali- oder Erdalkalisalze der (6R)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit γ-Cyclodextrin
Alkali- oder Erdalkalisalze der (6R)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit Dimethyl-β-Cyclodextrin

Wobei jeweils die natürliche (6R)-Form der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure zur Herstellung der Einschlussverbindung zu bevorzugen ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist das Verfahren zur Herstellung von stabilen Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man 5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder ein Derivat der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit α-, β- oder γ-Cyclodextrin einem Derivat von α-, β- oder γ-Cyclodextrin umsetzt oder vorzugsweise Tetrahydrofolsäure oder ein Derivat der Tetrahydrofolsäure mit dem entsprechenden Cyclodextrin umsetzt, falls erwünscht umsalzt und danach in situ durch Zugabe von Formaldehyd die 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen herstellt und falls erwünscht die erhaltene 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Cyclodextrin-Einschlussverbindung isoliert.

Bevorzugte Salzpartner der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure bzw. der Tetrahydrofolsäure sind dabei pharmazeutisch verträgliche Kationen wie Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium oder Anionen wie Sulfate, Sulfonate oder Halogenide.

Bevorzugte Cyclodextrin-Einschlussverbindungen entstehen mit Cyclodextrinen wie β-, Hydroxypropyl-β-, Dimethyl-β-, γ-, Hydroxypropyl-γ- oder Dimethyl-γ-Cyclodextrin. Die Cyclodextrine werden bevorzugt in mindestens molaren Verhältnissen zur 5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 1:1 oder 1:2 eingesetzt. Der Einsatz hochkonzentrierter Cyclodextrin-Lösungen ist dabei von Vorteil.

Die Umsetzung von Tetrahydrofolsäure mit Formaldehyd in Gegenwart von Cyclodextrin erfolgt vorzugsweise in einem Lösungsmittel bestehend aus Wasser oder einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie einer niedrigen aliphatischen Carbonsäure oder einem niedrigen Alkohol.

Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit der Tetrahydrofolsäure empfiehlt sich die Verwendung eines Oxidationsschutzes.

Die Isolierung der Cyclodextrin-Einschlussverbindung erfolgt mittels bekannter Techniken wie Abdampfen des Lösungsmittels bei erhöhter Temperatur im Vakuum, Lyophilisierung oder Fällung durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Derivaten als Einschlussverbindung in α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder deren Derivaten als Bestandteil oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Arzneimitteln.

Beispiele zur Illustrierung der Erfindung

Beispiel 1
Stabilität von Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure und deren Salzen in Lösung

a) Stabilität der Natrium- und Calciumsalz-Lösungen von (6R)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure bei 23C°

Wochen	1	2	4	5	7	14
Na-Salz (6R)-CH_2-THF ohne Cyclodextrin	91.1	64.4	30.5	18.1	16.7	–
Na-Salz (6R)-CH_2-THF β-Cyclodextrin	–	92.3	–	–	–	88.5
Na-Salz (6S)-CH_2-THF β-Cyclodextrin	100.0	84.8	–	75.0	–	–
Na-Salz (6R)-CH_2-THF α- + β-Cyclodextrin (1:1:1)	100.0	95.8	94.3	83.2	78.5	73.0
Ca-Salz (6R)-CH_2-THF α- + β-Cyclodextrin (1:1:1)	–	80.2	57.3	50.2	47.4	44.0

CH_2-THF = 5,10-Methylentetrahydrofolsäure

b) Stabilität der Natriumsalz-Lösungen von (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure bei 60°C/Stresstest

Stunden	3	6	18	24	30	48
ohne Cyclodextrin	77.7	34.4	2.8	–	0.8	–
α-Cyclodextrin	–	94.1	–	–	–	12.6
β-Cyclodextrin	91.2	–	–	75.2	–	–
Dimethyl-β-Cyclodextrin	88.9	–	–	31.5	–	–
Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin	90.4	–	–	70.5	–	–
γ-Cyclodextrin	95.4	–	–	63.3	–	–
Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin	97.4	–	–	73.4	–	–

Die in der Tabelle angegebenen Werte entsprechen jeweils dem Gehalt an 5,10-Methylentetrahydrofolsäure in Prozent des Startwertes (t = 0). Zur Stabilitätsbestimmung eingesetzt wurden wässrige Lösungen mit einer Konzentration von ca. 4% 5,10-Methylentetrahydrofolsäure bei pH 7.

Zur Herstellung der Substanzen in den folgenden Beispielen wurden Cyclodextrine mit folgendem Wassergehalt eingesetzt: α-Cyclodextrin 11.5%, β-Cyclodextrin 15.6%, Dimethyl-β-Cyclodextrin 12.7%, Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin 6.4%, γ-Cyclodextrin 9.8%, Dimethyl-γ-Cyclodextrin 9.2%, Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin 6.0% (alle 25 Werte bestimmt mittels Thermogravimetrie).

Beispiel 2
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

22.7 g β-Cyclodextrin und 4.88 g (6S)-Tetrahydrofolsäure werden unter Stickstoff bei Raumtemperatur in 2000 ml Wasser suspendiert. Danach werden 1.3 ml Formalinlösung (36.2%) zugetropft. Durch leichtes Erwärmen der Suspension auf ca. 40°C erhält man eine praktisch klare Lösung, die nach einer Klarfiltration am Rotationsverdampfer bei 20°C/1 mbar zur Trockene eingeengt wird.

Man erhält 25.8 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 13.3% (bestimmt mittels HPLC).

Beispiel 3
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

22.7 g β-Cyclodextrin werden in 650 ml Wasser suspendiert. Bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 4.8 g (6S)-Tetrahydrofolsäure zugegeben. Dabei wird der pH der Suspension bei 7–9 gehalten (16.3 ml NaOH 1n). Danach werden 0.93 ml Formalinlösung (36.2%) zugetropft. Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und nach ca. 20 Minuten Nachreaktionszeit bei 20°C bei 1 mbar/20°C zur Trokkene eingeengt.

Man erhält 26.3 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 17.9% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure nach 113 Tg/– 25°C 100.0%, nach 63 Tg/+ 23°C 98.2%.

Beispiel 4

β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Calciumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

5.78 g β-Cyclodextrin und 320 mg Calciumhydroxid werden in 30 ml Wasser aufgeschlämmt. Unter Stickstoff werden 1.97 g (6S)-Tetrahydrofolsäure zugegeben. Danach werden 28 ml Wasser und 0.37 ml Formalinlösung (36.2%) zugegeben. Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und die Einschlussverbindung mit 300 ml Ethanol bei 0°C aus dem Filtrat ausgefällt. Das Produkt wird mit Ethanol/Wasser gewaschen und bei 20°C getrocknet.

Man erhält 7.7 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Calciumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 25.6% (bestimmt mittels HPLC).

Chemical-Shift der ^{1}H-Signale im NMR durch die Bildung der Einschlussverbindung (D_2O, pH = 9.3, RT, c = ca 1%): 7-H + 0.2 ppm, dem Pteridinteil zugewandte H's im Aromaten – 0.15 ppm, dem Pteridinteil abgewandten H's im Aromaten + 0.07 ppm, γ-Glutaminsäure-H's – 0.08 ppm.

Beispiel 5

β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Kaliumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Die β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Kaliumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure wird in analoger Weise hergestellt wie in den Beispielen 2–4 beschrieben.

Beispiel 6

β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Magnesiumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Die β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Magnesiumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure wird in analoger Weise hergestellt wie in den Beispielen 2–4 beschrieben.

Beispiel 7

α- und β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Calciumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

10.85 g α-Cyclodextrin, 12.9 g β-Cyclodextrin und 744 mg Calciumhydroxid werden in 100 ml Wasser aufgeschlämmt. Unter Stickstoff werden 4.93 g (6S)-Tetrahydrofolsäure, weitere 31 mg Calciumhydroxid und 0.92 ml Formalinlösung (36.2%) zugegeben. Nach Ablauf einer Nachreaktionszeit von ca. 20 Minuten wird die Lösung klarfiltriert und aus dem Filtrat durch Zusatz von 750 ml Ethanol bei 0°C die Einschlussverbindung ausgefällt, mit Ethanol/Wasser gewaschen und bei 20°C getrocknet.

Man erhält 29.2 g α-/β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 16.5% (bestimmt mittels HPLC).

Beispiel 8

β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

2.27 g β-Cyclodextrin werden in 100 ml Wasser suspendiert. Bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 608 mg (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure zugegeben. Dabei wird der pH der Suspension bei 7–9 gehalten (2.7 ml NaOH 1n). Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und lyophilisiert.

Man erhält 2.75 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 16.0% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt an (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure-THF nach 156 Tg/– 25°C 100.0%.

Beispiel 9

β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

2.27 g β-Cyclodextrin werden in 113 ml Wasser suspendiert. Bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 540 mg (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Sulfat zugegeben. Dabei wird der pH der Suspension bei 7–9 gehalten (3.3 ml NaOH 1n). Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und lyophilisiert.

Man erhält 2.84 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 15.3% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt an Natriumsalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure nach 154 Tg/– 25°C 99.5%.

Beispiel 10
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung der (6R)-5,10 Methylentetrahydrofolsäure aus einer Lösung

2.27 g β-Cyclodextrin werden in 150 ml Wasser bei 25°C gelöst. Unter Stickstoff werden 608 mg (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure zugegeben (pH 3.7). Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und das Filtrat lyophilisiert.

Man erhält 2.7 β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt von (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 15.5% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure nach 158 Tg/– 25°C 100.0%.

Beispiel 11
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Sulfates der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von 540 mg Schwefelsäuresalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure analog zu Beispiel 10 erhält man 2.65 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Schwefelsäuresalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 15.2% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Sulfat nach 157 Tg/– 25°C 99.0%.

Beispiel 12
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Benzolsulfonates der (6R)-5,10-Methylenetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von 603 mg Benzolsulfonsäuresalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure analog zu Beispiel 10 erhält man 2.94 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Benzolsulfonsäuresalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 13.1% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Benzolsulfonat nach 72 Tg/– 25°C 100.0%.

Beispiel 13
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Calciumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von 610 mg Calciumsalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure analog zu Beispiel 10 erhält man 2.65 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Calciumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 15.6% (bestimmt mittels HPLC).

Beispiel 14
β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Magnesiumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von 600 mg Magnesiumsalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure analog zu Beispiel 10 erhält man 2.69 g β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Magnesiumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 13.1% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt an Magnesiumsalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure nach 155 Tg/– 25°C 99.5%.

Beispiel 15
Dimethyl-β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

26.2 g Dimethyl-β-Cyclodextrin werden in 100 ml Wasser gelöst. Bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 5.6 g (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Sulfat zugegeben. Dabei wird der pH der Lösung bei 7–9 gehalten (37 ml NaOH 1n). Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und lyophilisiert.

Man erhält 32.6 g Dimethyl-β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Natriumsalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 14.3% (bestimmt mittels HPLC).

Stabilität Feststoff: Gehalt an Natriumsalz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure nach 56 Tg/– 25°C 100%; nach 56 Tg/+ 25°C 97.5%.

Beispiel 16
Dimethyl-β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Schwefelsäuresalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

2.62 g Dimethyl-β-Cyclodextrin werden in 10 ml Wasser gelöst. Bei Raumtemperatur werden unter

Stickstoff 560 mg (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Sulfat und anschliessend 140 ml Wasser zugegeben. Die entstandene Lösung wird klarfiltriert und lyophilisiert.

Man erhält 3.29 g Dimethyl-β-Cyclodextrin-Einschlussverbindung des Schwefelsäuresalzes der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit einem Gehalt an (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure von 13.6% (bestimmt mittels HPLC).

Beispiel 17
Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin analog zu den Beispielen 2–16 erhält man die Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure und dessen Salzen.

Beispiel 18
Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin analog zu den Beispielen 2–16 erhält man die Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure und deren Salzen.

Beispiel 19
Dimethyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure

Durch die Verwendung von Dimethyl-γ-Cyclodextrin analog zu den Beispielen 2–16 erhält man die Dimethyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindung der (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure und deren Salz.

Patentansprüche

1. Stabile, wässrige Zusammensetzung beinhaltend:
i) (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder ein Salz der (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure und
ii a) α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder ein Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivat von α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder
ii b) ein Gemisch von α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder ein Gemisch von Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivaten von α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder ein Gemisch von α-, β- oder γ-Cyclodextrin mit einem Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivat von α-, β- oder γ-Cyclodextrin.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz der (6R)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure und β- oder γ-Cyclodextrin oder ein pharmazeutisch verträgliches Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivat von β- oder γ-Cyclodextrin eingesetzt wird.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei als pharmazeutisch verträgliches Salz der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure ein Alkali- oder Erdalkalisalz, vorzugsweise das Natrium-, Magnesium- oder Calciumsalz und als pharmazeutisch verträgliches Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivat von Cyclodextrin hydroxyalkyliertes oder alkyliertes β- oder γ-Cyclodextrin, vorzugsweise Hydroxypropyl-β-, Hydroxypropyl-γ- oder Dimethyl-β-Cyclodextrin eingesetzt wird.

4. α-, β- oder γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen von (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen.

5. Hydroxyalkyl-β- oder Hydroxyalkyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindung von (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen.

6. Hydroxypropyl-β- oder Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen von (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen gemäss Anspruch 5.

7. Alkyl-β- oder Alkyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindung von (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen.

8. Dimethyl-β- oder Dimethyl-γ-Cyclodextrin-Einschlussverbindungen von (6R)- oder (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen gemäss Anspruch 7.

9. Verfahren zur Stabilisierung von wässrigen Lösungen von (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure und deren Salzen nach Anspruch 1 durch Zufügen von α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder eines Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivates von α-, β- oder γ-Cyclodextrin.

10. Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrin-Einschlussverbindungen der (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man (6S)-, (6R)- oder (6R,S)-Tetrahydrofolsäure oder ein Salz der entsprechenden Tetrahydrofolsäure in Gegenwart von α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder eines Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivats von α-, β- oder γ-Cyclodextrin mit

Formaldehyd umsetzt, falls erwünscht umsalzt und falls erwünscht, die erhaltene 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Cyclodextrin-Einschlussverbindung isoliert.

11. Verwendung von (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salzen als Einschlussverbindungen in α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder deren Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivaten zur Herstellung von Arzneimitteln.

12. Arzneimittel beinhaltend als Bestandteil (6R)-, (6S)- oder (6R,S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure oder deren Salze als Einschlussverbindung in α-, β- oder γ-Cyclodextrin oder deren Alkyl- oder Hydroxyalkyl-Derivaten.