



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108096200 A

(43)申请公布日 2018.06.01

(21)申请号 201810160334.3

A61K 9/08(2006.01)

(22)申请日 2014.08.14

A61K 31/519(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

13004050.4 2013.08.14 EP

(62)分案原申请数据

201480044477.8 2014.08.14

(71)申请人 默克及其合伙人公司

地址 瑞士沙夫豪森

(72)发明人 R·莫瑟 V·戈罗恩 T·艾格

T·阿曼

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

(51)Int.Cl.

A61K 9/19(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图7页

(54)发明名称

5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的半硫酸盐

(57)摘要

本发明涉及5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的半硫酸盐、优选基本上为晶型的形式,及其药物组合物和在治疗、优选化疗中的用途。

1. 一种冻干物, 可以通过下述方法获得:
  - i) 将5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的半硫酸盐溶于水中;
  - ii) 将水冷冻; 并且
  - iii) 然后真空下除去冷冻水。
2. 根据权利要求1的冻干物, 其中在步骤i) 的水中加入至少一种缓冲剂。
3. 根据权利要求1或2的冻干物, 其中在步骤i) 的水中加入至少一种辅料。
4. 根据权利要求1-3任一项的冻干物, 其中在步骤i) 的水中加入至少一种另外的治疗剂。
5. 根据权利要求1-4任一项的冻干物, 其中在步骤i) 的水中加入至少一种表面活性剂。
6. 根据权利要求1-5任一项的冻干物, 其中在步骤i) 的水中加入至少一种湿润剂。
7. 根据权利要求1-6任一项的冻干物, 其中在步骤i) 和步骤ii) 之间进行无菌过滤的步骤。
8. 根据权利要求1-7任一项的冻干物, 其中5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸与硫酸的摩尔比为2:1。
9. 根据权利要求1-8任一项的冻干物, 其中在步骤i) 中加入NaOH。
10. 根据权利要求1-9任一项的冻干物, 其中在步骤i) 中加入柠檬酸钠。
11. 根据权利要求1-10任一项的冻干物, 其所具有的稳定性使得其组成在+25℃下至少12个月保持5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的纯度大于或等于99%。
12. 一种重制产品, 是可以通过将权利要求1-11任一项的冻干物溶解于水中获得的。
13. 根据权利要求12的重制产品, 其中所述水是注射用水。

## 5, 10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的半硫酸盐

[0001] 本申请是申请日为2014年8月14日、申请号为201480044477.8 (PCT/EP2014/067447)、发明名称为“5, 10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的半硫酸盐”的中国专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及5, 10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的半硫酸盐、优选基本上为晶型的形式，及其药物组合物和在治疗、优选化疗中的用途。

### 背景技术

[0003] 已知还原型叶酸5, 10-亚甲基-5, 6, 7, 8-四氢叶酸 (5, 10-CH<sub>2</sub>-THF) 作为细胞生长抑制剂的效能且优选将其与氟化嘧啶类例如5-氟尿嘧啶 (5-FU) 组合施用以治疗实体瘤 (Seley, K.L. *Drugs* 4 (1), 99, 2001)。5, 10-CH<sub>2</sub>-THF与碱类似物和5-FU代谢物5-FdUMP一起通过抑制胸苷酸合酶 (TS) 实现其化疗作用。TS催化脱氧尿苷酸 (dUMP) 转化成脱氧胸苷酸 (dTTP)，其为DNA合成的必需结构单元。通过在TS (即为5-FU代谢物的碱性类似物5-FdUMP) 与5, 10-CH<sub>2</sub>-THF之间形成三元抑制复合物使TS失活。可以通过增加5, 10-CH<sub>2</sub>-THF胞内浓度增强5-FU的细胞毒性作用，此时增加所述三元复合物的稳定性。这导致直接抑制DNA合成和修复，最终导致细胞死亡和肿瘤生长延迟。

[0004] 然而，存在与5, 10-CH<sub>2</sub>-THF相关的不期望的特性，迄今为止限制了其药物应用。众所周知，对于制药应用倾向于使用满足几种需求的活性剂 (例如5, 10-CH<sub>2</sub>-THF) 要求，包括：(i) 活性剂自身及其药物组合物的高 (化学、异构体、结晶) 稳定性，使得可以在可接受的时间期限内达到有效的储存，而不会表现出活性剂物理化学特征的显著改变；(ii) 活性剂的高 (化学、异构体、结晶) 纯度；(iii) 易于操控和加工活性剂以便将该活性剂转化成适合的制剂等。

[0005] 5, 10-CH<sub>2</sub>-THF是四氢叶酸 (THF) 和甲醛的加成产物 (参见，例如Poe, M. 等人 *Biochemistry* 18 (24), 5527, 1979; Kallen, R.G. *Methods in Enzymology* 18B, 705, 1971)，并且已知其对空气氧化的极端高的敏感性以及在中性和/或酸性环境中的不稳定性，可能导致化学降解和/或水解 (参见，例如Odin, E. 等人, *Cancer Investigation* 16 (7), 447, 1998; Osborn, M.J. 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 4921, 1960; Hawkes, J., 和 Villota, R. *Food Sci. Nutr.* 28, 439, 1989)。稳定5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的尝试包括，例如：(i) 通过使用专用技术装置溶解固体制剂并且在无空气的环境中注射5, 10-CH<sub>2</sub>-THF严格排除空气氧 (参见，例如Odin, E. 等人, *Cancer Investigation* 16 (7), 447, 1998; 美国专利US4, 564, 054)；(ii) 添加还原剂，例如L (+)-抗坏血酸或其盐、还原的  $\gamma$ -谷胱甘肽、 $\beta$ -巯基乙醇、硫代甘油、N-乙酰-L-半胱氨酸等，作为用于高度敏感性5, 10-CH<sub>2</sub>-THF且特别是THF的抗氧化剂；(iii) 借助于环糊精包合物稳定 (参见，例如EP 0 579 996B1)；(iv) 添加柠檬酸盐，同时将pH调节至碱性值 (参见，例如EP 1 641 460B1)；或(v) 形成各种盐，例如硫酸盐 (参见，例如EP 0 537 492B1)。

[0006] 尽管如此,但是对于稳定的5,10-CH<sub>2</sub>-THF化合物仍然存在需求,这些化合物显示高(化学、异构体和/或结晶)纯度和/或具有作为化合物以及在配制成药物组合物时的高稳定性,可以有效地制备、纯化和分离和/或易于操作(例如在药学上可接受的溶剂中可接受的溶解度、流动性和粒度)和/或具有可忽略不计的化合物的分解或者物理和化学特征改变,优选以高摩尔百分比配制(以便将为生产治疗有效剂量所必须配制和施用的物质质量降至最低)。

[0007] 然而,不可以预期存在具有这些适合的特性的(已知)化学化合物的稳定的固体(多晶型)形式。这类固体形式的性质并非可预期的,即无论是盐、无水、水化还是溶剂化形式,更不用说可以在具体条件下分离具体的多晶型物(例如结晶条件和变量,例如溶剂、温度、pH等)。这类参数的选择和控制对于得到高纯度、稳定性和可加工性的期望的固体形式而言是关键。这些是重要的因素,它们直接影响产品的特性和性能及其进一步的应用。不可能预测许多变量的哪些(即溶液pH、温度、压力、时间、溶液组成、添加剂类型和浓度)是决定因素。

[0008] 目前令人惊奇地发现,将5,10-CH<sub>2</sub>-THF的(6R)-异构体[(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF]转化成其半硫酸盐给该化合物及其药物组合物提供了极佳的稳定性,且由此克服了上述讨论的已知缺陷。(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的有利稳定性特征能够将该化合物有效地利用于药物应用。

## 发明内容

[0009] 本发明在第一个方面涉及(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(下文也称作本发明或本发明化合物的半硫酸盐)。

[0010] 优选地,(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐是化学和/或异构体和/或结晶纯形式,更优选(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐是基本上结晶形式。

[0011] 在具体的实施方案中,(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐是无水形式,因此,在一个优选的实施方案中,(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐是结晶无水形式。

[0012] 优选地,(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐是结晶形式,其特征是在以 $2\theta \pm 0.2^\circ$  (CuK $\alpha$ 射线)表示的 $4.7^\circ$ 、 $17.9^\circ$ 和 $23.3^\circ$ 的衍射角 $2\theta$ 处的一个或多个X-射线图案峰位。

[0013] 在具体的实施方案中,(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐的特征在于它提供包含在1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624和363cm<sup>-1</sup>的波数(以 $\pm 2\text{cm}^{-1}$ 表示)处的峰的FT-拉曼光谱。

[0014] 在另一个方面,本发明涉及药物组合物,其包含(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐和药学上可接受的载体或稀释剂,任选地还包含至少另一种治疗剂,包括、但不限于杀菌剂、抗生素、抗病毒药、抗菌药、抗肿瘤药、抗癌化合物例如化疗剂、抗真菌药和/或抗炎药或其它适合于人体应用的生物活性剂或治疗剂,特别是抗癌化合物,例如化疗剂,例如5-FU和衍生物,以及抗叶酸剂,例如甲氨蝶呤、培美曲塞。

[0015] 在另一个方面,本发明涉及(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(或其药物组合物)在治疗、优选在癌症化疗中的用途。

## 附图说明

[0016] 图1:使用300mW的标称激光能量水平和64次扫描记录的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(1型)的拉曼光谱。

[0017] 图2(a):使用反射模式记录的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(1型)的X-射线衍射图;2(b):使用传输模式记录的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(1型)的X-射线粉末衍射图;2(c):使用传输模式记录的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(1型)的X-射线衍射图案(上部曲线A)与以反射模式记录的同一化合物的记录(下部曲线B)的比较;2(d):使用传输模式记录的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(1型)的X-射线衍射图案(上部曲线A)与(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的硫酸盐的X-射线衍射图案(下部曲线B)的比较。

[0018] 图3:(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(1型)的TG-FTIR热分析图。“A”表示-0.5%的质量改变(归因于失水),且“B”表示-14.53%的质量改变(归因于分解)。

[0019] 图4:(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐的DSC热分析图(1型;首次扫描:实线;二次扫描(猝灭冷却后):虚线)。

[0020] 详细描述

[0021] 本发明在第一个方面涉及(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐(也称作本发明的化合物或本发明的半硫酸盐)。在一个实施方案中,(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐是基本上结晶形式,更具体地,为结晶无水形式。

[0022] 本文所用的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF是指5,10-CH<sub>2</sub>-THF,为其天然存在的异构体形式(5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸,N-[4-[(6aR)-3-氨基-1,2,5,6,6a,7-六氢-1-氧代咪唑并[1,5-f]蝶啶-8(9H)-基]苯甲酰基]-L-谷氨酸),其中蝶啶环的C6上的手性中心和谷氨酸部分的 $\alpha$ -碳为其天然存在的构型形式。因此,本文分别使用的术语“异构体纯度”、“立体异构体纯度”是指样品中(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的量,其可以包含同一化合物的一种或多种异构体。本文分别使用的术语“异构体纯”、“立体异构体纯”是指具有大于约80%、优选大于约90%、优选大于约95%、更优选大于约97%、甚至更优选大于约99%或以上且最优选多至100%异构体过量的期望的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF异构体的本发明化合物,其中其余的可以是另外的异构体的一种或多种。

[0023] 本文所用的术语“结晶形式”(或“多晶型物”或“晶型”)是指由特别有序的三维排列的结构单元组成的固态形式。因此,同一化合物的不同结晶形式来源于固态形式的不同填充的分子,产生不同的结晶对称性和/或单胞参数。典型地,不同固体或晶型具有一种或多种不同的物理和/或化学特性,例如不同的溶解性、不同的热力学和化学稳定性、不同的熔点温度和/或不同的X-射线衍射图案,且由此可以通过X-射线衍射、红外(IR)光谱、示差扫描量热法(DSC)、拉曼光谱、固态NMR和熔点、密度、硬度、光学和电学特性、稳定性和/或溶解性等区分。几乎没有或无规则3-维排列典型地被描述为术语“无定形”。

[0024] 本文所用的术语(本发明的)“结晶化合物”是指本发明化合物的固体形式,其包含可辨别用量的本发明化合物的晶型或多晶型物,优选大于50%、60%、70%、80%、90%或95%的用量的本发明化合物的一种(或多种)晶型或多晶型物。本发明结晶化合物的用量、结晶度和结晶性可以通过一种或多种技术方式测定,包括光学显微镜、电子显微镜、X-射线粉末衍射、固态NMR波谱法或偏光显微术。

[0025] 本文所用的措词(本发明的)“半硫酸盐”包括所有的其具体的实施方案且优选以化学和/或(立体)异构体和/或结晶的纯形式提供。在一个具体的实施方案中,其为基本上结晶形式,更具体地,为结晶无水形式(下文也称作1型结晶形式)。

[0026] 本文所用的术语“结晶纯度”是指样品中化合物的具体结晶形式的百分比,其可以包含化合物的无定形形式、一种或多种该化合物的其它结晶形式(除了该化合物的具体结晶形式)或其混合物。本文所用的术语“基本上结晶形式”是指至少约80%、优选至少约90%、优选至少约95%的结晶纯度,优选约97%的结晶纯度,更优选约99%或以上的结晶纯度,且最优选约100%的结晶纯度。结晶纯度通过X-射线粉末衍射(XRPD)、红外拉曼光谱法和其它固态方法测定。

[0027] 本文所用的术语“化学纯度”是指样品中具体化合物的百分比。本文所用的术语“基本上化学纯度”是指约80%化学纯度、优选约90%、更优选约95%、更优选约97%,更优选约98%化学纯度且最优选99%或高于99%或至多100%化学纯度的本发明化合物,正如通过HPLC所测得的。化学杂质可以包括未反应的原料(包括溶剂)、(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF(例如THF)的降解产物等。

[0028] 如上所述,可以根据例如在X-射线粉末衍射(XRPD)、红外拉曼光谱和其它固态方法方面的独特的固态特征鉴定、表征本发明半硫酸盐的结晶形式(及其纯度),并且将其与其它盐形式区分,例如其它硫酸盐形式,如本文提供的数据所示。

[0029] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明提供(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的无水半硫酸盐的结晶形式(下文也称作1型结晶形式),其特征在于它提供:

[0030] (i) 在4.7°、17.9°和23.3°优选4.7°、16.6°、17.9°、18.4°、18.9°、20.2°、23.3°、23.5°、24.3°和24.7°(以 $2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$  (CuK $\alpha$ 射线)表示)的得到计算的晶格间距的X-射线粉末衍射(XRPD)图案;和/或

[0031] (ii) 包含在1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624和363的波数(以 $\pm 2\text{cm}^{-1}$ 表示)处的峰的FT-拉曼光谱;和/或

[0032] (iii) 具有根据表3的一个或多个吸收谱带的IR-光谱。

[0033] 在优选的实施方案中,本发明的半硫酸盐(1型)的特征在于如下在4.7°、16.6°、17.9°、18.4°、18.9°、20.2°、23.3°、23.5°、24.3°和24.7°优选4.7°、17.9°和23.3°处的10个XRPD峰(以 $2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$  (CuK $\alpha$ 射线)表示)中的至少2个和如下1672、1656、1603、1553、1474、1301、637、624和363的9个FT-拉曼峰(以 $\pm 2\text{cm}^{-1}$ 表示)中的至少2个。

[0034] 在其它优选的实施方案中,本发明的半硫酸盐(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF(1型)提供基本上根据图1的FT-拉曼光谱和/或在表1中报道的峰和/或基本上根据图2(a)的X-射线粉末衍射(XRPD)图案和/或在表2中报道的峰。

[0035] 表1:拉曼峰表(vs=极强,s=强,m=中等,w=弱,vw=极弱强度)。

[0036]

波数[cm <sup>-1</sup> ]	强度(定性)
3019	w
2933	m
2880	m
1672	s
1656	s
1603	vs
1553	m
1474	m
1373	m
1337	m
1301	s
1207	m
1127	w
975	m
884	m
815	w
700	w

[0037]

665	w
637	s
624	s
363	m

[0038] 表2:以 $2\theta \pm 0, 2^\circ 2\theta$  (CuK $\alpha$ 射线)表示的粉末X-射线衍射峰表(vs=极强,s=强,m=中等,w=弱,vw=极弱强度)。

[0039]

以 $2\theta^\circ$ 计的角	以 Å 计的 d-间距	强度(定性)
4.7	18.8	vs
9.4	9.4	vw
11.6	7.6	w
11.8	7.5	w
12.5	7.1	vw
13.6	6.5	vw
14.2	6.2	m
16.6	5.35	s
16.8	5.28	m
17.9	4.96	vs
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	vs
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

[0040]

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

[0041] 表3:具有以 $\text{cm}^{-1}$ 计的吸收谱带的(6R)-5,10- $\text{CH}_2$ -THF (1型)的半硫酸盐的IR-光谱及其排布



[0042]

吸收谱带 ( $\text{cm}^{-1}$ )	排布
3346	OH和NH拉长
3168	分子内氢桥的OH, CH <sub>2</sub> 拉长
1709, 1654	单取代的酰胺的C=O-拉长振动
1612	COO <sup>-</sup> 的对称和不对称伸展振动
1560, 1504	芳基和嘧啶环拉长
1397, 1300	COO <sup>-</sup> 的对称和不对称伸展振动
824	对位取代的芳香化合物的芳基相邻氢摆动

[0043] 根据如本领域已知方法测定的X-射线粉末衍射图案最有效地表征本发明的化合物并且将其与相关化合物区分(参见,例如J.Haleblain, J.Pharm.Sci.64:1269, 1975; J.Haleblain和W.McCrone, J.Pharm.Sci.58:911, 1969)。显示如实施例制备的(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐的X-射线衍射图案与(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的硫酸盐的X-射线衍射图案比较的图2(d)清楚地示例这两种盐的特征性图案。

[0044] 尽管已知峰的相对强度可以根据样品制备技术、样品封固方法和所用特定仪器的不同而改变,但是可以根据对于具体多晶型物的不同的峰和峰位鉴定本发明的化合物(其中峰的排布具有约 $\pm 0.5^\circ$  2 $\theta$ , 优选 $\pm 0.2^\circ$  2 $\theta$ 的微小变化(CuK $\alpha$ 射线)。

[0045] 本发明的化合物是非溶剂化的无水形式,其包括完全不含水的化合物和可以包含微量水的化合物。这种可能的残留(非化学计算量的)含水量可以是任意的水量,但典型地为0wt.-%H<sub>2</sub>O至3wt.-%H<sub>2</sub>O,优选0wt.-%H<sub>2</sub>O至1wt.-%H<sub>2</sub>O。

[0046] 可以将本发明的半硫酸盐化合物以固体形式(例如粉末、冻干物形式)或作为液体储存。

[0047] 在一个具体的实施方案中,可以通过将(6S)-THF的甲醛水溶液加入到硫酸水溶液(或乙酸和硫酸的水溶液)中并且使(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐发生结晶制备本发明的化合物。在升温下进行这种结晶反应,例如在35℃以上的温度下。具体地,制备结晶(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐的方法包含下列步骤:(i)使(6S)-四氢叶酸溶液与甲醛水溶液反应,得到溶液形式的(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF(根据已知方法);(ii)在35℃以上的温度下将得到的(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF溶液加入到硫酸水溶液(或加入到乙酸和硫酸的水溶液)中,优选35℃-70℃,更优选40℃-60℃,最优选40℃-50℃,以使(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐发生结晶;和(iii)例如,通过过滤分离得到的(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐结晶。

[0048] 步骤(i)可以根据如实施例所述的已知方法进行。

[0049] 在步骤(ii)中,在约40-50℃的温度下可以将得到的澄清溶液加入到硫酸溶液(或乙酸和硫酸水溶液)中,使得期望的产物选择性结晶。任选地,在添加完成后,可以将得到的反应混合物在约40-50℃的温度下搅拌至多5小时,随后过滤出结晶产物或在相同温度下离心,任选地用水洗涤,并且干燥。

[0050] 在另一个方面,本发明涉及包含(治疗有效量的)本发明的(6R)-5, 10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐和药学上可接受的载体的药物组合物(也称作本发明的药物组合物),用于对患者施用。本文所用的术语“药学上可接受的”表示经批准的或公认可用于动物且更具体地是用于人的载体,即它对于宿主或患者无毒性。此外,载体的选择不干扰活性成分的生物有效

性。本文所用的术语“载体”是指对于所选择的特定施用模式必不可少的任意辅助材料,且包括,例如溶剂(稀释剂)、赋形剂或其它与本发明化合物一起施用的添加剂。典型地,使用的药用载体稀释剂包括无菌液体,例如水溶液和油(例如石油、动物、植物或合成来源的油),例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。典型地,使用的水性液体包括水、盐水溶液、葡萄糖水溶液和甘油溶液等。适合的药用赋形剂包括柠檬酸、抗坏血酸、淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇(propylene glycol)、水、乙醇等。任选地,所述组合物可以包含添加剂,例如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂或粘合剂。适合的药用载体的实例是本领域众所周知的且描述在例如E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”(第18版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990)中。

[0051] 任选地,本发明的药物组合物还可以包含至少另一种治疗剂。在具体的实施方案中,所述至少另一种治疗剂可以选自杀菌剂、抗生素、抗病毒药、抗菌药、抗肿瘤药、抗癌化合物例如化疗剂、抗真菌药和/或抗炎药或其它适合于人体应用的生物活性或治疗剂。特别是抗癌化合物,例如化疗剂。抗癌药例如化疗剂可以包括、但不限于包含特异性结合成员、蛋白质、核酸或核酸类似物(例如、但不限于反义分子、核酶和siRNAs)、脂质、类固醇、大分子、小分子或金属的化疗剂。一种或多种抗癌药可以包含一种或多种化疗剂,例如、但不限于:核酸,特别是氟化核酸(例如5-氟尿嘧啶或其类似物或前药)、抗叶酸剂(例如培美曲塞、雷替曲塞、洛美曲素)、拓扑异构酶抑制剂(例如伊立替康、托泊替康)、抗代谢药(例如甲氨蝶呤、吉西他滨、替扎他滨)、5-FU调节剂、烷化剂(例如环磷酰胺、卡莫司汀)、核酸生物合成抑制剂(例如丝裂霉素、蒽环类(例如表柔比星、多柔比星)、铂衍生物(例如顺铂、奥沙利铂、卡铂)、微管破裂的药物(例如紫杉醇、多西他赛、长春瑞滨(vinorelbine)、长春新碱)、激素阻断药物(例如他莫昔芬)、激酶包括、但不限于受体和非受体酪氨酸激酶抑制剂(例如易瑞沙、特罗凯、SU5416、PTK787、格列卫)、蛋白体抑制剂(例如硼替佐米)、免疫抑制剂(例如左旋咪唑)、抗炎药、血管化抑制剂、细胞因子(例如白细胞介素类、肿瘤坏死因子类)和抑制细胞因子、激素或受体或激素的受体的活性的药物(例如抗-VEGF抗体贝伐珠单抗或“阿瓦斯丁”)。抗癌药还可以包括单克隆抗体,例如、但不限于结合细胞因子、激素或激素受体的单克隆抗体(例如阻断EGF或VEGF生长因子活化的抗体,例如阿瓦斯丁、爱必妥、赫赛汀)等。

[0052] 本发明的化合物或其药物组合物可以用于治疗,特别是用于癌症化疗,即用于治疗癌症的方法中,该方法包含对有这种治疗需要的受试者施用治疗有效量的本发明的半硫酸盐或其药物组合物。

[0053] 因此,在另一个方面,本发明还涉及本发明的半硫酸盐(或其药物组合物)在疗法、优选在化疗中的用途,即在治疗癌症中的用途。根据本发明治疗的癌症的实例包括、但不限于乳腺癌、食管肿瘤、胃癌、胆囊肿瘤、胆管癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌和间皮瘤(mesothelioma)癌。

[0054] 本发明适合的药物组合物可以适用于口服、胃肠外或直肠施用,照此,其可以为片剂、胶囊、口服液体制剂、粉末、冻干物、颗粒、锭剂、溶解粉末、可注射或可输注溶液或混悬液或栓剂的形式。优选地,所述药物组合物是适合于胃肠外施用的形式,例如静脉内或肌肉内、皮下、动脉内。

[0055] 为了胃肠外施用,流体单位剂型典型地包含本发明的化合物、任选的另一种治疗

剂和药学上可接受的载体或稀释剂,以形成例如基于水的溶液或基于油的混悬液(或其冻干物)。根据存在的另外的治疗剂、载体和所用浓度的不同,可以将所述化合物混悬于或溶于载体。对于胃肠外溶液,溶解所述化合物,用于注射,并且进行无菌过滤,然后填充入适合的小瓶或安瓿并且密封。任选地,将辅料例如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂溶于媒介物。如果期望,则可以将得到的溶液进行冻干(即可以在填充入小瓶后冷冻干燥所述组合物并且真空除去水)。对于胃肠外混悬液,将所述化合物混悬于媒介物(而不是溶解),且优选的灭菌包括暴露于环氧乙烷,然后混悬于无菌媒介物(例如小瓶或安瓿)。任选地,组合物中可以包括表面活性剂或湿润剂,以有利于使所述化合物均匀分布。

[0056] 用于口服施用的片剂和胶囊可以是单位剂型,且可以包含常用的赋形剂,例如粘合剂、填充剂、压片润滑剂、崩解剂和可接受的湿润剂。可以根据标准制药实践中众所周知的方法给片剂包衣。

[0057] 口服液体制剂可以是例如水性或油性混悬液、溶液、乳剂、糖浆剂或酏剂的形式,或可以是在使用前用水或其它适合的媒介物溶解的干燥产品。这类液体制剂可以包含常用添加剂,例如混悬剂、乳化剂、非水媒介物(可以包括可食用油)、防腐剂和(如果需要)常用的矫味剂或着色剂。

[0058] 在联合疗法的情况中,其中本发明的药物组合物包含本发明的化合物和至少另一种治疗剂,活性剂可以作为同一药物组合物的组成部分施用,或可以单独地施用至少另一种治疗剂,即作为单独的(且可能是不同的)药物组合物施用,任选地通过不同施用途同时或依次施用。

[0059] 作为本文所述的治疗中使用的活性剂即本发明的化合物(和任选的至少另一种治疗剂)的剂量将根据各种因素的不同而改变,包括待治疗的受试者的年龄和健康状况、待治疗的疾病的类型和严重性、施用途和频率等。癌症治疗和化疗领域普通技术人员能够基于用于评价毒性和效能的已知方案确定用于单独的本发明化合物或其与至少另一种如上述所定义的治疗剂的组合的治疗有效量和方案。

[0060] 术语“治疗有效量”是指引起组织、动物、个体或人体中本领域技术人员(例如研究人员、兽医、医生或其他临床医师或医疗护理提供者)所寻求的生物或医学响应的活性化合物用量,所述生物或医学应答包括(i)预防疾病;和/或(ii)抑制疾病(例如阻止病理学和/或症状学情况进一步发展);和/或(iii)改善疾病(例如逆转病理学和/或症状学情况);同样,本文所用的术语“治疗”是指:(i)预防疾病;和/或(ii)抑制疾病(例如阻止病理学和/或症状学情况进一步发展);和/或(iii)改善疾病(例如逆转病理学和/或症状学情况)。

[0061] 所选择的药物组合物可以包含0.1%–99wt%、优选10–60wt%的活性剂(即本发明的化合物任选地与至少另一种治疗剂的组合),视施用方法的不同而定。

[0062] 用于癌症治疗的本发明化合物的典型剂量范围可以分别为 $10\text{mg}/\text{m}^2$ – $1\text{g}/\text{m}^2$ ,优选 $50\text{mg}/\text{m}^2$ – $500\text{mg}/\text{m}^2$ (用于结肠直肠癌治疗) $10\text{mg}/\text{m}^2$ – $200\text{mg}/\text{m}^2$ (用于甲氨蝶呤疗法),且更优选约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ –约 $250\text{mg}/\text{m}^2$ (用于结肠直肠癌治疗) $50\text{mg}/\text{m}^2$ – $150\text{mg}/\text{m}^2$ (用于甲氨蝶呤疗法)。

[0063] 下列实施例用作对本发明的示例,而不欲限定其范围。

## 具体实施方案

[0064] 示差扫描量热法(热分析Q2000):封闭的(密封)金坩埚;在环境条件下或在 $\text{N}_2$ 环境

气氛中平衡3分钟后填充的样品;加热速率 $10\text{K min}^{-1}$ ;  $-50^{\circ}\text{C}$ 至 $254^{\circ}\text{C}$ 范围。当进行两次加热扫描时,在两次扫描之间快速地将样品冷却至 $-50^{\circ}\text{C}$ 。列出的转变温度相当于最大峰值和最小峰值,并非相当于起始温度。

[0065] FT-拉曼光谱法(Bruker RFS100;使用OPUS 6.5软件;使用OPUS 7.0软件进行的脱机数据分析):Nd:YAG 1064-nm激发;300mW标称激光功率;Ge检测器;64-256扫描;用于分析的 $3500\text{--}100\text{cm}^{-1}$ 光谱范围; $2\text{cm}^{-1}$ 分辨率。

[0066]  $^1\text{H}$ -NMR(Bruker DPX300):使用300.13MHz质子频率、 $30^{\circ}$ 激发脉冲和1s的循环延迟记录 $^1\text{H}$ -NMR光谱。累积16或256扫描次数并且将氘代DMSO用作溶剂。溶剂峰用于参比且用TMS刻度报道化学位移。

[0067]  $^{13}\text{C}$  NMR(Bruker AMX 300):使用安装5mm TXO探头的Bruker AMX 300分光计得到 $^{13}\text{C}$  NMR光谱。将半硫酸盐溶于0.1N NaOD。在303K测定光谱,其中使用4000次扫描和32768个数据点的数字分辨率。以ppm给出相对于内标TSP(((3-三甲基甲硅烷基)-2,2',3,3'-四氘代丙酸钠盐))的化学位移。

[0068] 粉末X-射线衍射(Bruker D8Advance):铜K $\alpha$ 射线,40kV/40mA,LynxEye检测器,Bragg-Brentano反射几何位置, $0.02^{\circ}2\theta$ 步长,37s阶梯时间, $2.5\text{--}50^{\circ}2\theta$ 范围。用0.1-mm或0.5-mm深硅单-晶试样架测定粉末样品。对样品的制备未采用特殊处理,除了施加轻压得到平坦表面。全部测定采用环境空气气氛,且在测定过程中旋转样品。不存在有关相反的X-射线衍射数据的任何信息显示为反射数据。

[0069] 粉末X-射线衍射(Stoe Stadi P.):铜K $\alpha$ 1射线,40kV/40mA,Mythen1K检测器,传输模式,弯曲的Ge单色器, $0.02^{\circ}2\theta$ 步长,60s阶梯时间, $1.5\text{--}50.5^{\circ}2\theta$ 扫描范围与 $1^{\circ}2\theta$ 检测器,阶梯扫描-扫描模式。在两次乙酸盐箔之间测定样品(10-20mg粉末)。无特别处理用于制备样品。环境空气气氛用于全部测定,且在测定过程中旋转每种样品。

[0070] TG-FTIR(Netzsch Thermo-Microbalance TG 209与Bruker FT-IR分光计IFS 28):Al坩埚(带有微孔); $\text{N}_2$ 气氛; $10\text{K min}^{-1}$ 加热速率; $25^{\circ}\text{C}$ – $300^{\circ}\text{C}$ 范围。

[0071] IR(FT-IR Paragon 1000):使用Perkin Elmer傅里叶变换红外系统用100次扫描记录来自压制成溴化物片的半硫酸盐样品的红外光谱。

[0072] 实施例1: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的制备

[0073] 在室温下在 $\text{N}_2$ 气氛中在圆底烧瓶中提供(6S)-四氢叶酸(16mmol,7.93g)在78.0g蒸馏水中的溶液。通过添加(缓慢地)32%NaOH溶液将该溶液的pH调整至pH 11。一旦溶液变澄清,则在 $25^{\circ}\text{C}$ 加入1.00M HCl溶液以便将该溶液的pH调整至8.3。将得到的澄清溶液冷却至约 $0^{\circ}\text{C}$ ,在此温度下,它显示pH为8.8。通过添加1M HCl,将pH调整至pH=8.6,且一次性地加入1.44g 36.8% $\text{HCHO}$ 溶液(110mol%)。添加完成时,将该溶液在 $0^{\circ}\text{C}$ (冰浴)搅拌1小时。加入活性炭(0.2g,Norit C Extra),将该反应混合物在 $0^{\circ}\text{C}$ 搅拌30分钟,然后用吸滤器冷过滤,得到澄清溶液,将其不经进一步纯化用于步骤(b)。

[0074] (b)在 $60^{\circ}\text{C}$ 下在 $\text{N}_2$ 气氛中在圆底烧瓶中提供55ml 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (0.055mol;344mol%)的混合物。在15分钟时间期限内向该溶液中滴加作为步骤(a)中得到的溶液,将得到的反应混合物在 $50^{\circ}\text{C}$ 搅拌2小时。然后用吸滤器在 $50^{\circ}\text{C}$ 过滤该反应混合物,用25ml蒸馏水在室温洗涤2次,在 $30^{\circ}\text{C}$ 和10mbar下干燥12小时(过夜),得到(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐,为浅灰色结晶形式(7.36g,86%收率)。正如通过HPLC测定的,得到的产物具有98.4%纯度,97.6%的

异构体纯度(6R-异构体)。通过XRPD分析显示1型晶型(对于完整表征,参见,实施例2和3)。

[0075] 实施例2:表征

[0076] (a) 使用300mW的标称激光功率水平和64次扫描记录的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的FT拉曼光谱如图1中所示。

[0077] (b) 以传输模式记录的相应的粉末X-射线衍射图如图2中所示。

[0078] (c) (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的TG-FTIR热分析图如图3中所示。在N<sub>2</sub>气流中进行(以避免氧化降解)。样品显示从约40℃至210℃0.5wt%H<sub>2</sub>O的损耗,其为残留水(归因于吸湿性或不完全干燥)。分解仅在高于210℃发生。

[0079] (d) (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的DSC热分析图如图4中所示。在第一次加热扫描前,将样品在气态氮气流中平衡3分钟,且在此过程中失去0.6wt.-%的其质量。这与在TG-FTIR热分析图中观察到的含水量一致(参见,图3),并且证实这种水结合不紧密。随后将样品在封闭的金坩锅中以10K min<sup>-1</sup>加热至254℃,骤冷至-50℃并且以10K min<sup>-1</sup>二次加热。在第一次加热扫描中唯一热事件是在约247.4℃( $\Delta H \approx 60.9 \text{ J g}^{-1}$ )吸热,这可归因于熔化。这种吸热事件可能与放热降解启动重叠。在第二次加热扫描中,在T<sub>g</sub>≈104℃( $\Delta C_p = 0.38 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )观察到玻璃转变,这证实在第一次扫描中发生熔化。至到250℃未观察到其它热事件。

[0080] (e) 以压制的KBr片记录IR光谱且特征吸收带如表3中所示。

[0081] (f) 用DMSO-d<sub>6</sub>记录(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的<sup>1</sup>H NMR光谱,且以ppm计的化学位移(d)如表8中所示。

[0082] 表8:具有以ppm计的化学位移(d)的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐的<sup>1</sup>H-NMR (d=双峰,m=多重峰,t=三重峰;在0ppm的TSP和溶剂D<sub>2</sub>O/NaOD 4.85ppm)

[0083]

$\delta$ (1H)	多样性	强度
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

[0084] (g) 用0.1N NaOD记录<sup>13</sup>C NMR,且以ppm计的相对于TSP的化学位移(d)如表9中所示。

[0085] 表9:具有以ppm计的化学位移(d)的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF的半硫酸盐的<sup>13</sup>C-NMR (d=双峰,m=多重峰,t=三重峰)

[0086]

$\delta$ (13C)	多样性	$\delta$ (13C)	多样性
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

[0087] (h) 通过光学显微镜分析 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐证实其结晶度。样品由小的双折射颗粒的聚集物组成。

[0088] 实施例3: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐的稳定性测试

[0089] (a) 将在非室温的温度下作为原料的 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐在不同溶剂和混合物中的混悬液平衡概述在表10中:

[0090] 表10: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐的混悬液平衡稳定性

[0091]

溶剂	温度(°C)	期限(h:小时;d:天)	观察结果
MeOH/甲酸 1:1	50	2h	无改变
用 L-抗坏血酸饱和的 AcOH	50	1d	无改变
具有~2 mM L-抗坏血酸的 THF	40	3d	无改变
具有 ~2 mM L-抗坏血酸的 2-PrOH	40	3d	无改变
用 L-抗坏血酸饱和的 PEG4500/EtOH 1:9	50	7d	无改变
H <sub>2</sub> O	5	6d	无改变

[0092]

甲酸/THF 1:3	10-20	6d	无改变
用 L-抗坏血酸饱和的 AcOH	50	5d	无改变
用 L-抗坏血酸饱和的 MeCN	50	5d	无改变

[0093] (b) 在室温在85%乙醇中的稳定性

[0094] 在室温将 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐 (3.01g) 分散于100ml 85%EtOH中,并且搅拌5h,然后过滤,且在30°C和8mbar下干燥12小时(过夜)。通过XRPD分析显示1型晶型的X-射线图案特征保持不变。

[0095] (c) 在高温/低压时的稳定性

[0096] 将 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐 (2.17g) 在65°C和8mbar下置于干燥室内21h。通过

XRPD分析显示1型晶型的X-射线图案特征保持不变。

[0097] (d) (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐及其药物组合物的长期稳定性

[0098] 为了测定(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的长期稳定性,将本发明的化合物储存在空气中在25℃和60%相对湿度下。通过HPLC在定期间隔测定剩余的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐含量并且通过与起始值比较得到(%相对)。结果如表11中所示。

[0099] 表11:3个不同生产批次的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的长期稳定性

[0100]

	(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐 (%相对)							
	0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 1)	100.0	99.7	99.5	99.6	99.2	99.2	99.4	98.5
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 2)	100.0	99.9	99.9	100.0	99.7	99.4	99.4	99.0
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 3)	100.0	99.5	99.5	99.4	99.1	99.0	99.0	

[0101] 为了测定(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐作为药物组合物、更具体地作为冻干物(如根据例如实施例5制备)的长期稳定性,将冻干物储存在空气中在25℃和60%相对湿度下。通过HPLC在定期间隔测定剩余的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐含量并且通过与起始值比较得到(%相对)。结果如表12中所示。

[0102] 表12:作为冻干物的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的5个不同生产批次的长期稳定性

[0103]

	(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(%相对)							
	0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 A)	100.0	100.1	100.2	99.9	100.0	99.7	100.0	
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 B)	100.0	100.1	99.9	100.0	99.8	99.7	100.1	
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 C)	100.0	99.6	99.7	99.8	99.5	99.6	99.2	98.6
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 D)	100.0	100.0	99.8	99.4	99.4	99.3	99.2	99.4 <sup>1)</sup>
(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 半硫酸盐(批号 E)	100.0	100.1			99.7		99.4	98.9

[0104] <sup>1)</sup> 45个月的值

[0105] 表11和表12清楚地显示 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐即使在室温下作为纯化合物以及药物组合物形式例如冻干物在长时间期限内也是高度稳定的。

[0106] 实施例4: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐的对比稳定性

[0107] 为了比较本发明的化合物 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 半硫酸盐的长期稳定性与根据EP 0537492B1的 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐的长期稳定性,在不同温度和湿度下生成 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐的稳定性数据。

[0108] (a) (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐的稳定性

[0109] 根据文献方法 (EP 0 537 492B1) 制备 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐并且储存在-20℃下15个月。随后将产物的样品分别储存在5℃、25℃和60%相对湿度、在40℃和75%相对湿度下。通过HPLC在定期间隔测定样品中剩余的 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐的含量。将 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐的含量与制备时的起始值比较 (% 相对)。结果如表13和14中所示。

[0110] 表13: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐在-20℃的长期稳定性

温度/相对湿度	(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 硫酸盐(%相对)	
	0 个月	15 个月
-20℃	100.0	98.7

[0112] 表14: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF 硫酸盐分别在5℃、25℃/60%rh、40℃/75%rh下的随后长期稳定性



	温度/相对湿度	(6R)-5,10-CH <sub>2</sub> -THF 硫酸盐(%相对)	
		0 个月	6 个月
[0113]	5℃	98.7	97.3
	25℃/60%rh	98.7	95.5
	40℃/75%rh	98.7	95.0

[0114] 表13和14中的数据与如实施例3中所公开的(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的稳定性数据对比清楚地显示:

[0115] i) (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐与(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF硫酸盐相比在稳定性方面存在显著性差异;和

[0116] ii) (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐在长时间期限内的稳定性远高于(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF硫酸盐。

[0117] (b) 降解产物10-甲酰基-(6R)-四氢叶酸的含量

[0118] 根据文献方法制备(6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF硫酸盐(EP 0537492B1)并且储存在-20℃下15个月。随后将产物的样品储分别存在5℃、25℃和60%相对湿度、在40℃和75%相对湿度下。通过HPLC在定期间隔测定主要降解产物10-甲酰基四氢叶酸的含量并且公开为绝对值(%w/w)。结果如表15至16中所示。

[0119] 表15:降解产物10-甲酰基四氢叶酸在储存在-20℃时的含量

	温度/相对湿度	10-甲酰基四氢叶酸 (% w/w)	
		0 个月	15 个月
[0120]	-20℃	0.53	1.37

[0121] 表16:分别在5℃、25℃/60%rh、40℃/75%rh下降解产物10-甲酰基四氢叶酸的随后含量

	温度/相对湿度	10-甲酰基四氢叶酸 (% w/w)	
		0 个月	6 个月
[0122]	5℃	1.37	1.47
	25℃/60%rh	1.37	1.89
	40℃/75%rh	1.37	2.36

[0123] 实施例5: (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的药物剂型

[0124] (a) 用于静脉内施用的溶解用冻干物

[0125] 在4℃在喷射氩气通过1小时的气氛中向18.480kg水中加入1.386kg NaOH 2M和968.9g柠檬酸钠三水合物。将该混合物在4℃在氩气气氛中搅拌至完全溶解(pH 13.0)。然后在使用210g 4℃的氩气饱和的冲洗水的情况下加入473.9g (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐(缓慢溶解,pH 6.5)。然后用NaOH 2M(121.8g)将pH设定在9.3±0.1。加入203.6g氩气饱和

的4℃的水(总溶液21.844kg)。

[0126] 然后使该溶液通过无菌滤器过滤。向每支10ml小瓶中加入5.201g (5ml) 无菌过滤的溶液且然后在-45℃冻干。

[0127] 在注射前,向每支小瓶中加入10ml水(WFI) (293mosmol/kg)。

[0128] (b) 在基本上中性的pH下 (6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐的冻干组合物制剂

[0129] 如下材料(mg/100ml) 和方法用于得到冻干组合物:

[0130] 材料(mg/100ml):

[0131] 5.530g (6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐(相当于5.000g (6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF)

[0132] 6.000g柠檬酸,无水,粉末,USP

[0133] 4.000g抗坏血酸,颗粒,USP

[0134] NaOH/HCl用于调整pH

[0135] 100mg注射用水(WFI),USP至适量

[0136] (i) 方法:向WFI喷射过滤的氮气NF 30min。

[0137] (ii) 记录皮重100ml塑料瓶。

[0138] (iii) 称出柠檬酸、抗坏血酸和约90g N<sub>2</sub>喷射的水。

[0139] (iv) 混合至溶解。

[0140] (v) 用1N NaOH或HCl调整pH至7.0±0.1。

[0141] (vi) 将该溶液冷却至10℃。

[0142] (vii) 加入(6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐,混合至溶解。

[0143] (viii) 记录pH(7.0±0.2)。

[0144] (ix) 加入水至110g最终重量(或100ml)。记录wt。

[0145] (x) 通过0.2-微米滤膜,同时保持该溶液尽可能冷却。

[0146] (xi) 填充入小瓶(2ml或100mg 5,10-CH<sub>2</sub>-THF/小瓶),同时保持该溶液尽可能冷却。

[0147] (xii) 冷冻干燥。

[0148] (xiii) 在适度真空下与顶空氮气气氛中密封小瓶。

[0149] (xiv) 固定小瓶。

[0150] 实施例6:前期临床/临床结果

[0151] (a) 来自根据ICH S9指导原则进行的动物模型中的前期临床研究结果显示,(6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐在给大鼠(100mg/kg/天)和狗(50mg/kg/天)施用的最高剂量水平下是安全的。临床数据也表明在至多200mg/m<sup>2</sup>剂量下施用的(6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐对于患者是安全的。

[0152] (b) 在对32位诊断为结肠癌的患者进行的单盲、随机I/II期研究(ISO-CC-002)中,研究(6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐与左亚叶酸(Levoleucovorin)对比在肿瘤组织、相邻粘膜层和血浆中的药代动力学和药效学特性。本研究在**Göteborg, Sweden**的Sahlgrenska University Hospital进行。完整的试验数据分析显示,施用(6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐得到了基本上比施用左亚叶酸后得到的那些更多的亚甲基四氢叶酸暴露和峰值血浆浓度。在施用(6R) -5,10-CH<sub>2</sub>-THF半硫酸盐后亚甲基四氢叶酸和四氢叶酸在肿瘤和相邻粘膜层中的浓度也远高于在施用左亚叶酸后得到的那些。

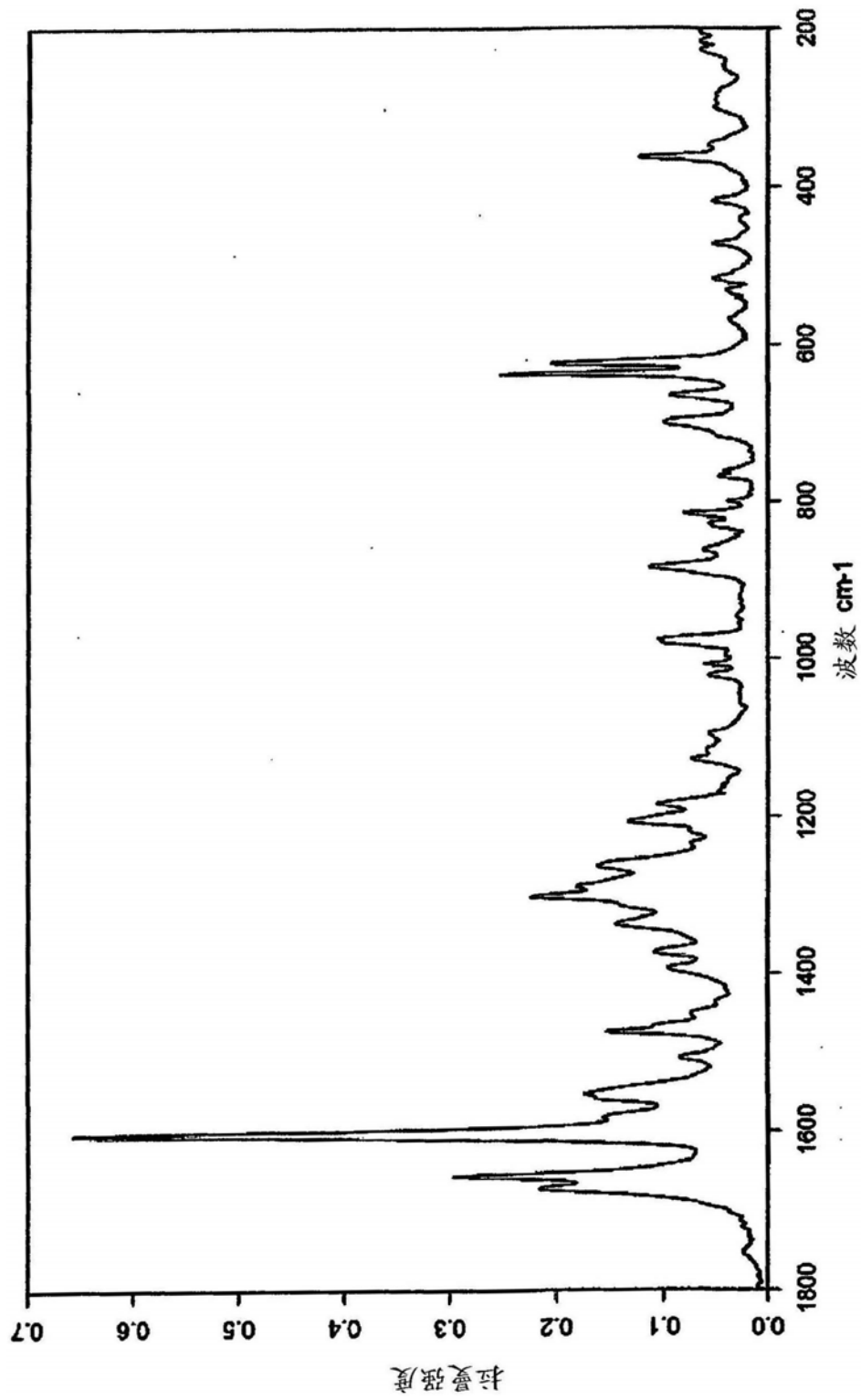


图1

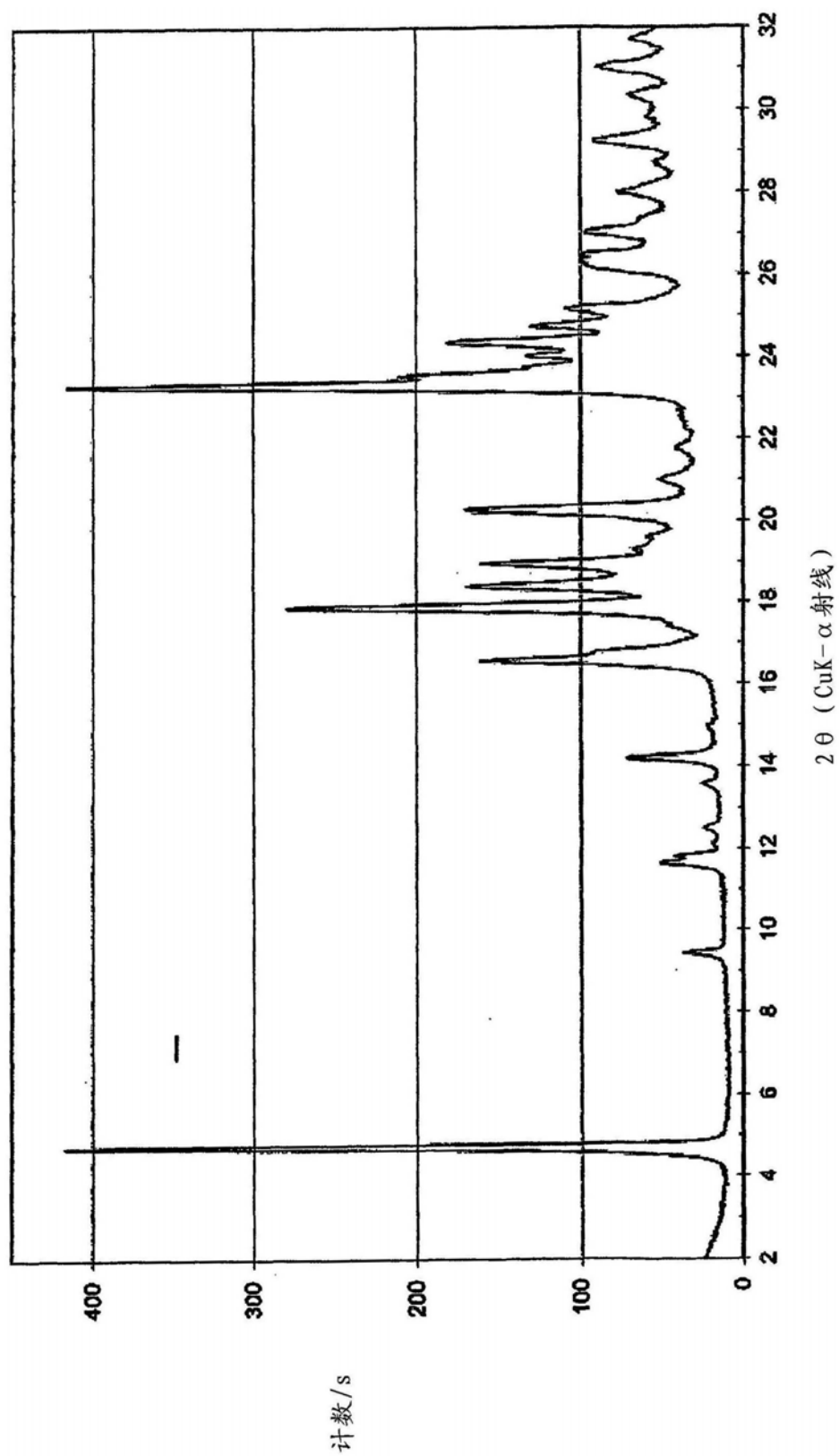


图2(a)

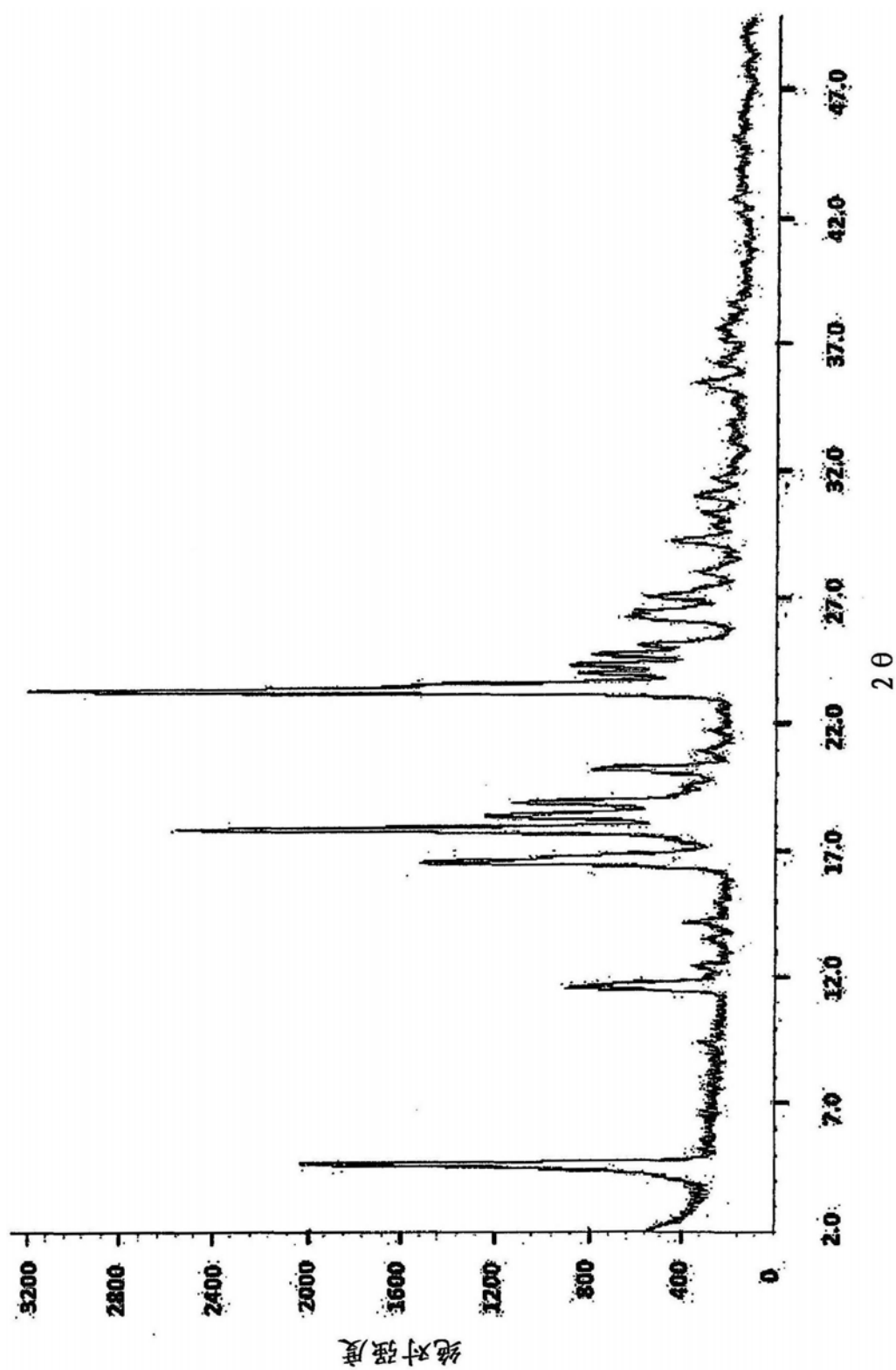


图2 (b)

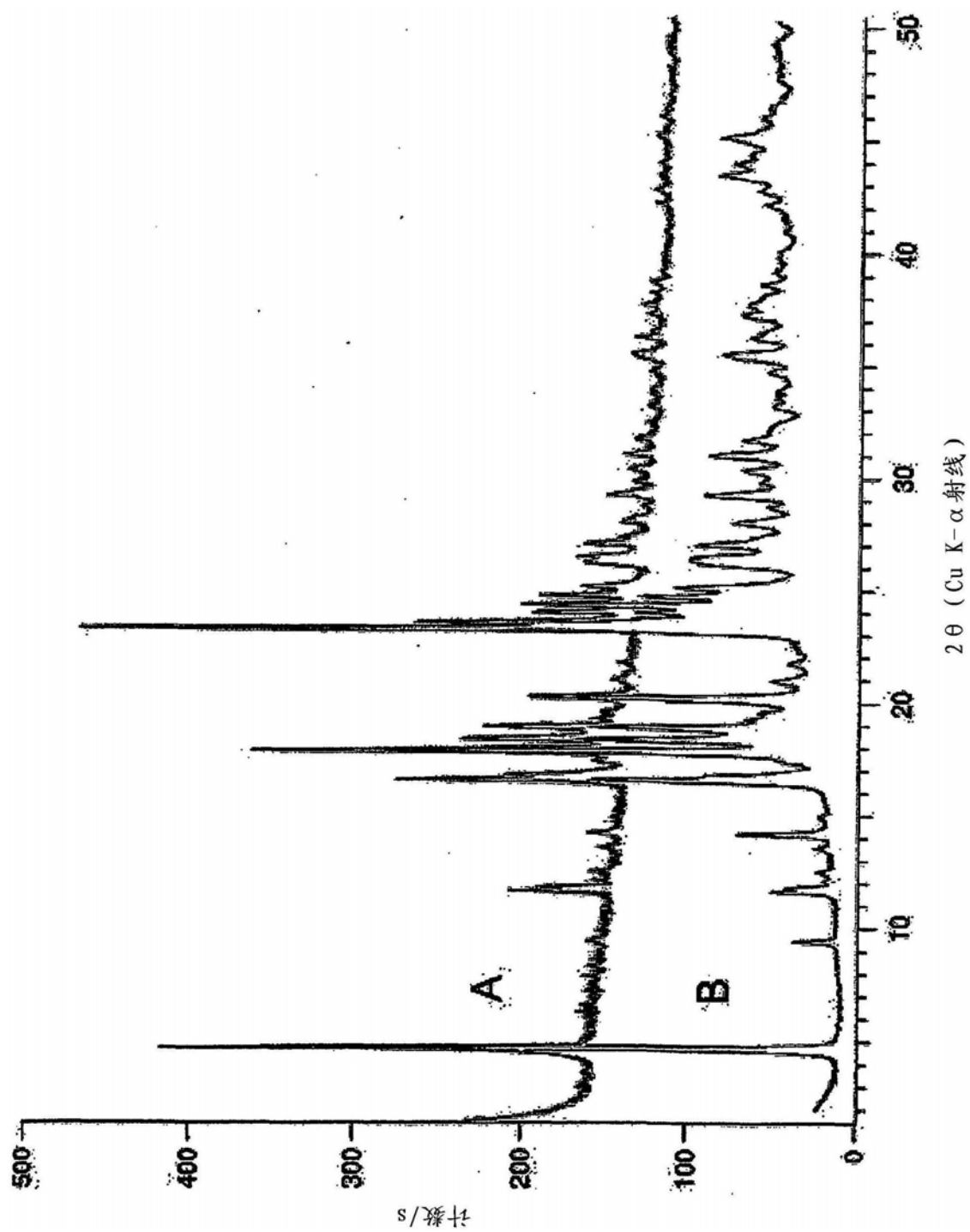


图2(c)

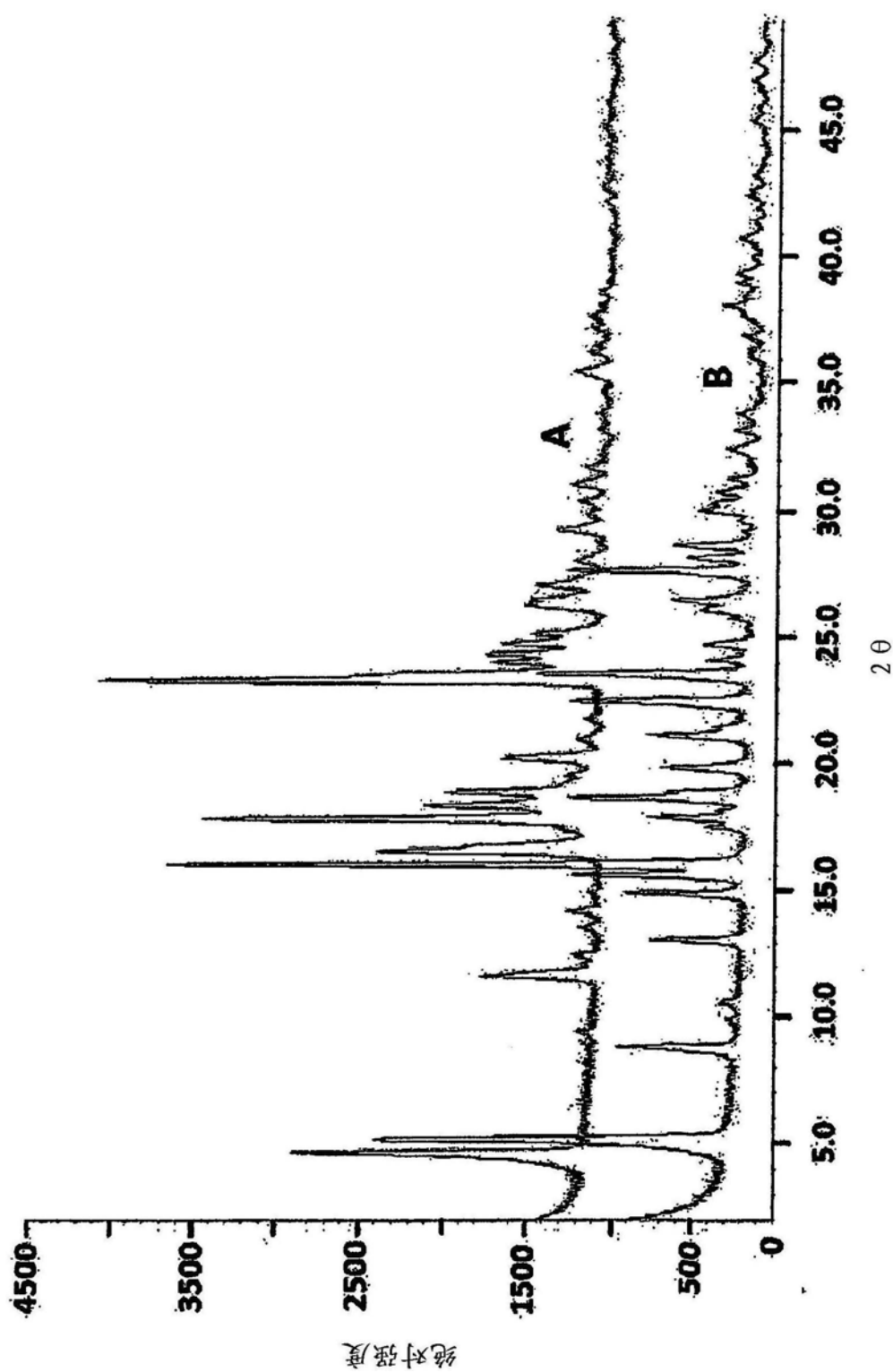


图2 (d)

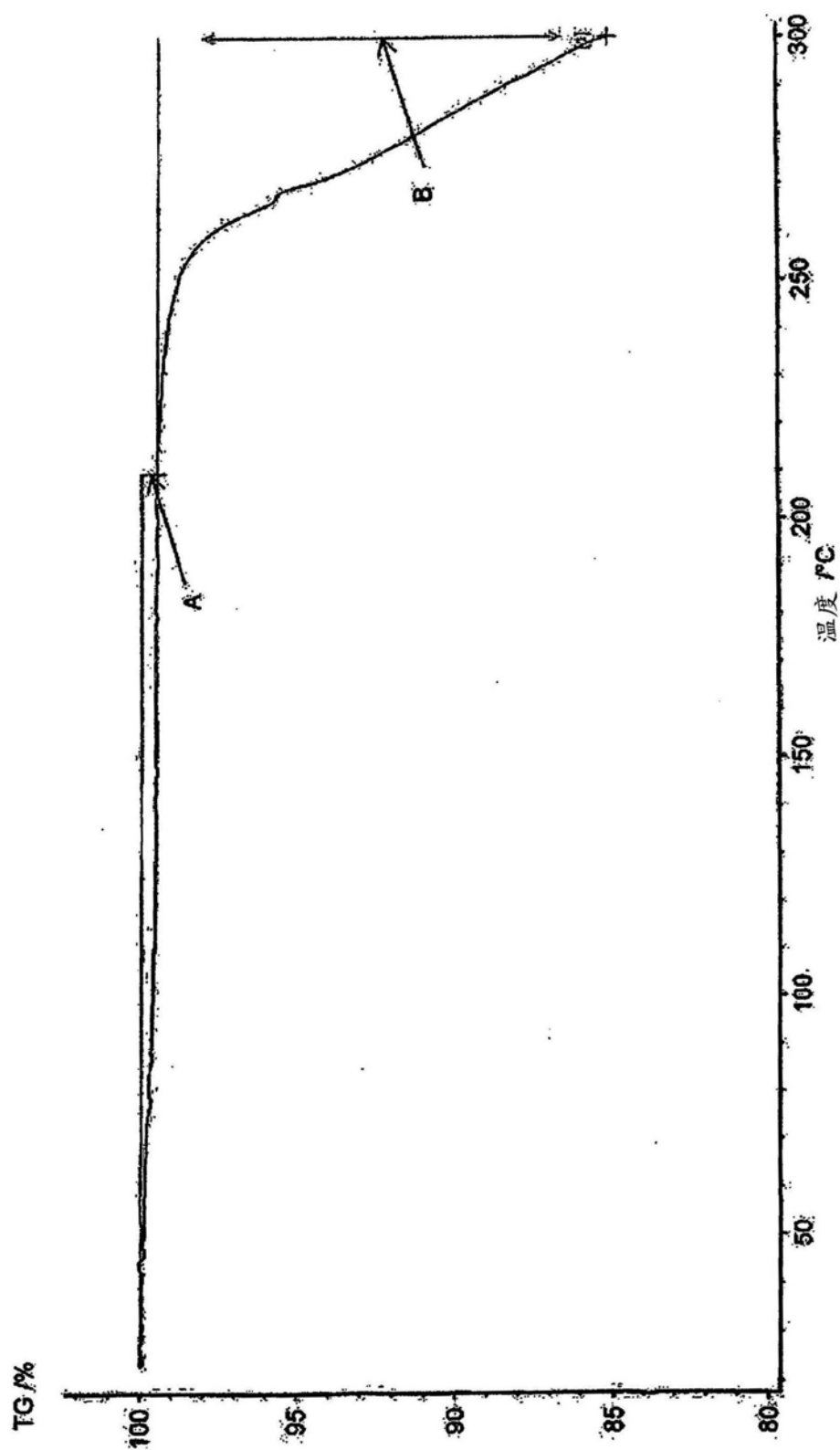


图3



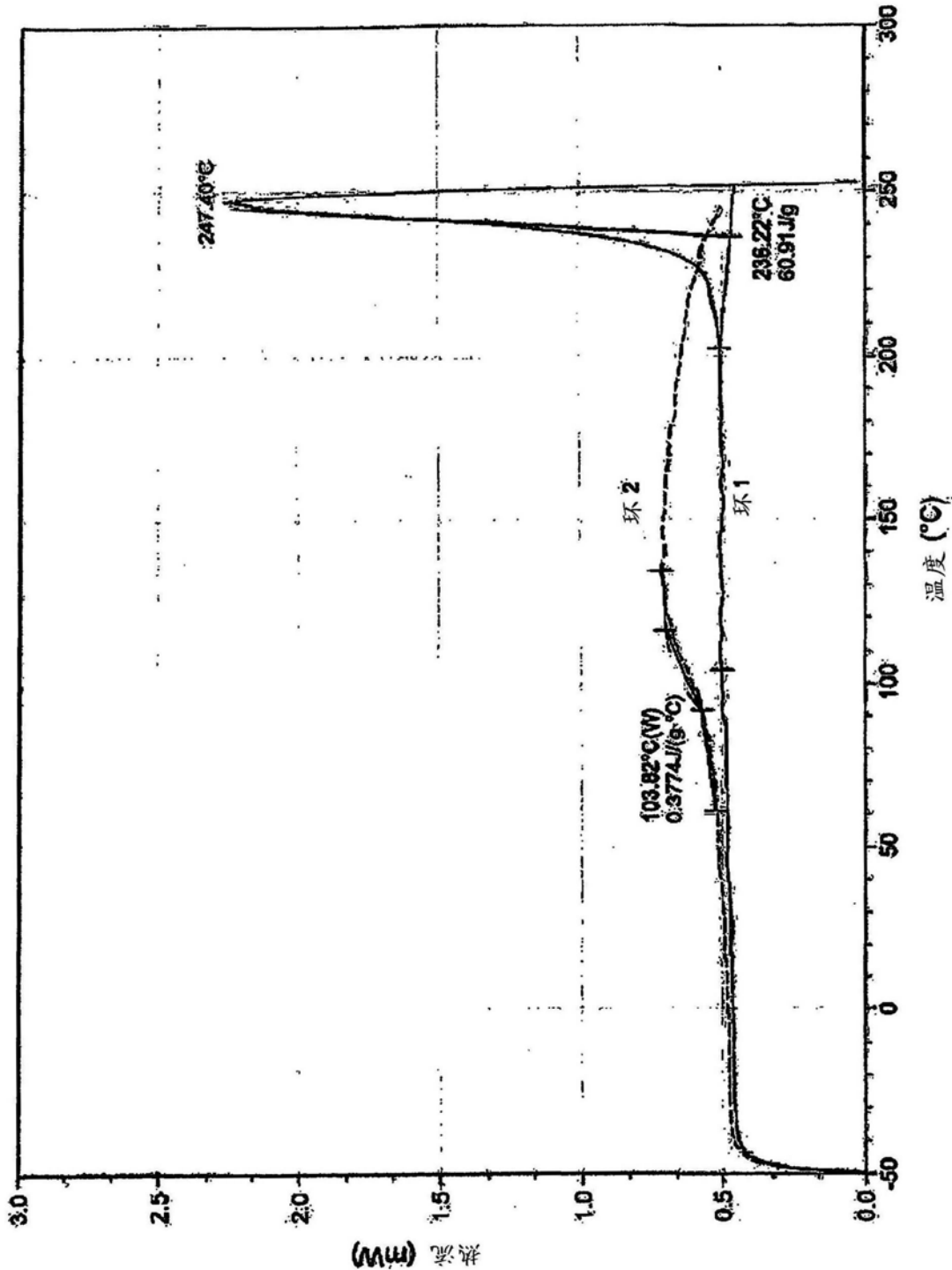


图4

## Abstract

The present invention is directed towards the hemisulfate salt of 5-ulfate salt of 5,10-methylene methylene methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid, tetrahydrofolic acid, preferably in substantially crystalline form preferably in substantially crystalline form preferably in substantially crystalline form, as well as as well as pharmaceutical compositions and uses thereof in therapy, preferably chemotherapy preferably chemotherapy preferably chemotherapy.