



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119365186 A

(43) 申请公布日 2025.01.24

(21) 申请号 202380045351.1

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

(22) 申请日 2023.06.05

有限公司 11038

(30) 优先权数据

专利代理人 姜煌

22177932.5 2022.06.08 EP

(51) Int.Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 9/19 (2006.01)

2024.12.06

A61K 47/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/519 (2006.01)

PCT/EP2023/064972 2023.06.05

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/237484 EN 2023.12.14

(71) 申请人 默克专利股份有限公司

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

地址 德国

(72) 发明人 R·莫泽 V·格罗恩 T·阿曼

J-P·克纳普 M·斯瓦尔德

(54) 发明名称

包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠的组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含高含量5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐、硫酸盐和柠檬酸盐的稳定制剂和冷冻干燥物。

1. 冻干组合物, 其包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐、柠檬酸盐和碱金属硫酸盐, 该组合物不含有任何其它还原剂或抗氧化剂。
2. 根据权利要求1所述的冻干组合物, 其由所述5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐、硫酸钠、柠檬酸钠、水和任选的摩尔渗透压质量浓度校正添加剂组成。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的冻干组合物, 其中所述5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐与硫酸盐之间的摩尔比为约40至200mol %。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的冻干组合物, 其包含200-400mol %的柠檬酸盐。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的冻干组合物, 其为稳定的冷冻干燥物, 其中所述5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐的浓度大于20%w/w 5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐, 例如大于25%w/w, 例如大于30%w/w, 例如大于35%w/w, 或例如约40%w/w 5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的冻干组合物, 其含有纯度大于98%的5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐。
7. 通过将权利要求1至6中任一项所述的冻干组合物溶解在水或液体药学上可接受的媒介物中以获得的重构产物。
8. 根据权利要求7所述的重构产物, 其中所述水是注射用无菌水。
9. 根据权利要求7或8中任一项所述的重构产物, 其还包含药学上可接受的载体。
10. 根据权利要求7至9中任一项所述的重构产物, 其还包含额外的药学上可接受的活性成分。
11. 根据权利要求7至10中任一项所述的重构产物, 其还包含缓冲剂和/或一种或多种摩尔渗透压质量浓度校正赋形剂。
12. 根据权利要求7至11中任一项所述的重构产物, 其用于癌症治疗或癌症疗法中。
13. 用于制备根据权利要求1至6中任一项所述的冻干组合物的方法, 所述冻干组合物包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐、柠檬酸盐和碱金属硫酸盐, 所述方法包括以下步骤:
  - viii. 将(6S)-四氢叶酸溶解在pH约为11的水中,
  - ii. 调节澄清溶液的pH至8.6±0.5,
  - iii. 加入110-120mol %的甲醛,
  - iv. 搅拌反应混合物直到反应完成,
  - v. 加入约40-200mol %的碱金属硫酸盐和100-400mol %的柠檬酸盐,
  - vi. 过滤反应混合物以获得澄清溶液, 和
  - ix. 冷冻干燥获得的澄清溶液,所述方法不包括添加任何其他还原剂或抗氧化剂。
14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述碱金属硫酸盐以硫酸钠的形式加入。
15. 根据权利要求13或14所述的方法, 其中所述柠檬酸盐以柠檬酸或柠檬酸钠的形式加入。

## 包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠的组合物

[0001] 本发明涉及包含高含量5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐(5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>)、硫酸盐和柠檬酸盐的稳定制剂和冷冻干燥物。

[0002] 发明背景

[0003] 已知5,10-亚甲基四氢叶酸是与5-氟尿嘧啶(5-FU)组合用于治疗实体瘤的药剂(Seley,K.L.Drugs 4(1),99,2001)。活性异构体形式5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸(在下文中是指5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF)与碱基类似物和5-FU代谢物5-FdUMP共同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)向脱氧胸苷酸(dTMP)的转化,脱氧胸苷酸是DNA合成的基本构建块(building block)。TS的失活通过在TS、碱基类似物5-FdUMP(其是5-FU的代谢物)和5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF之间形成共价的三元抑制复合物发生。

[0004] 通过增加5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF的细胞内浓度可以实现5-FU的细胞毒性作用的增强,由此增加三元抑制复合物的稳定性。这导致DNA合成和修复的直接抑制,其最终导致细胞死亡和肿瘤生长的延迟。为了实现高细胞内浓度的5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF,期望应用相应的稳定、高含量的产物。

[0005] 然而,与5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF相关的不期望特性限制了其药物用途。例如,5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF对导致不利的高杂质水平的氧化和化学降解高度易受影响。

[0006] 5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF在水溶液中、或当该化合物以其具有大表面积的无定形形式(例如以其作为冷冻干燥物的药物形式)、或以再溶解形式(如注射用溶液)存在时,其对于氧化和化学降解的易受影响性尤其高。众所周知,为了适用于药物用途,相应的组合物需要满足一些要求,包括高化学和异构稳定性(使得可以在可接受的时间段内实现有效的储存,而不会在组合物的物理化学特征方面展现出显著的变化)、易于处理和加工等。

[0007] 5,10-亚甲基四氢叶酸是四氢叶酸和甲醛的加成产物(参见例如Poe,M.等人,Biochemistry 18(24),5527,1979;Kallen,R.G.Methods in Enzymology 18B,705,1971),并且因其对于空气氧化的极高敏感性以及在中性和/或酸性环境中的不稳定性(潜在导致化学降解和/或水解)而闻名(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)。

[0008] 稳定化5,10-亚甲基四氢叶酸盐的组合物的尝试已包括例如(i)通过使用特殊的技术设备严格排除大气中的氧气,用于固体制剂的重构和在无空气环境中注射5,10-亚甲基四氢叶酸盐(参见例如Odin,E.等人,Cancer Investigation 16(7),447,1998;美国专利第4,564,054号);(ii)加入还原剂,如L(+) -抗坏血酸或其盐、还原型γ-谷胱甘肽、β-巯基乙醇、硫代甘油、N-乙酰基-L-半胱氨酸等作为用于高度敏感的5,10-亚甲基四氢叶酸、特别是用于四氢叶酸的抗氧化剂。

[0009] 作为还原剂(抗氧化剂)在防止5,10-亚甲基四氢叶酸分子氧化中的有效性的实例,Adventrx Pharmaceuticals公司对其候选药物**CoFactor®**(即非对映异构体混合物5,10-亚甲基-(6R,S)-四氢叶酸的钙盐)进行了稳定性研究,其研究公开于WO 2007/064968中。非对映异构体混合物5,10-亚甲基-(6R,S)-四氢叶酸的化学稳定性被认为与本发明的

纯非对映异构体5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF相似。

[0010] Adventrx研究比较了5,10-亚甲基四氢叶酸本身(未配制)、或单独用柠檬酸三钠配制的5,10-亚甲基四氢叶酸、或用柠檬酸三钠和抗坏血酸两者配制的5,10-亚甲基四氢叶酸的稳定性(参见图1)。

[0011] 对分离的冷冻干燥物的稳定性曲线的线性回归分析表明,5,10-亚甲基- (6R,S) -四氢叶酸的降解随时间是线性的(参见图2)。每种制剂(重构冷冻干燥物)的降解速率(最佳拟合线的斜率)显示以下从最快到最慢的降解速率顺序:未配制>仅用柠檬酸三钠配制>用柠檬酸三钠和还原剂抗坏血酸二者配制(图2)。因此发现未配制的5,10-亚甲基- (6R,S) -四氢叶酸每小时损失2.2%的纯度,导致7小时后纯度为84%,然而含有250% w/w柠檬酸三钠的制剂每小时损失1.4%的纯度,导致7小时后纯度为89%。含有250% w/w柠檬酸三钠和175% w/w抗坏血酸二者的制剂具有高得多的稳定性,每小时仅损失0.5%的纯度,导致7小时后纯度为约96%。

[0012] 因此,该研究显示,加入还原剂对5,10-亚甲基四氢叶酸的制剂具有主要的稳定化作用。然而,其结果是冻干制剂中活性成分的含量减少到低于20% w/w(图3)。出于制备所述冷冻干燥物的目的的WO 2007/064968中公开的溶液含有至多约4重量%的5,10-CH<sub>2</sub>- THF。

[0013] 5,10-亚甲基四氢叶酸的稳定化也通过形成各种结晶形式例如硫酸盐(参见例如EP 0 537 492)或半硫酸盐(参见例如EP 2 837 631)来实现。然而,这种5,10-亚甲基四氢叶酸的盐形式由于其低水溶性而不易用于药物目的。

[0014] 在例如WO 2019/034673、US2007/0099866和US10059710 B2中也已公开了含有二羧酸和/或三羧酸如柠檬酸和/或其他稳定剂的5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF的冷冻干燥物。其中公开的出于制备冷冻干燥物的目的的溶液含有至多2-3重量%的5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF。

[0015] 从临床角度来看,本领域已知的5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF制剂不具有令人满意的水溶性、高含量活性成分和高稳定性的组合。因此,仍然非常需要具有高含量5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF的稳定且可溶的药物组合物。

## 发明内容

[0016] 现已令人惊讶地发现,包含5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -亚甲基四氢叶酸的二钠盐(下文中表示为5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>)与柠檬酸盐和碱金属硫酸盐组合的冻干组合物具有与包含5,10-亚甲基四氢叶酸、柠檬酸盐和还原剂如L- (+) -抗坏血酸的组合物相当或甚至更高的稳定性。

[0017] 因此,即使不加入还原剂(抗氧化剂)例如L- (+) -抗坏血酸并且不排除大气氧气,5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>、碱金属硫酸盐和柠檬酸盐的溶液仍保持高度稳定达数小时,根据本发明的该溶液接着被转化成具有类似良好稳定性的冷冻干燥物。这些冷冻干燥物包含5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>、碱金属硫酸盐和柠檬酸盐,不含其它稳定化试剂,因此克服了前面讨论的已知缺点,并允许制备高纯度和低含量氧化产物或其它化学降解产物的固态药物组合物。

[0018] 因此,在第一方面,本发明涉及冻干组合物,其包含5,10-亚甲基- (6R) -四氢叶酸的二钠盐(5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>)、柠檬酸盐和碱金属硫酸盐。

[0019] 本发明的第二方面涉及用于制备根据第一方面的冻干组合物的方法,该方法包括以下步骤:

- [0020] i. 将(6S)-四氢叶酸溶解在具有NaOH的水中,
- [0021] ii. 将溶液的pH值调节至8.6±0.5,
- [0022] iii. 加入110-120mol-%的甲醛,
- [0023] iv. 搅拌反应混合物直到反应完成,
- [0024] v. 加入约40-200mol-%的碱金属硫酸盐和约200-400mol-%的柠檬酸盐,
- [0025] vi. 过滤反应混合物以获得澄清溶液,和
- [0026] vii. 冷冻干燥所获得的澄清溶液,
- [0027] 该方法不包括加入任何其他还原剂或抗氧化剂。

[0028] 在第三方面,本发明还涉及根据第一方面的冻干组合物,用于在人类患者中的癌症治疗或癌症疗法中。

[0029] 在第四方面,本发明还涉及一种在人类患者中的癌症治疗或癌症疗法的方法,其包括将根据第一个方面的冻干组合物给药至有此需要的人类患者。

[0030] 在第五方面,本发明还涉及根据第一方面的冻干组合物在制备用于治疗人类患者癌症的药剂中的用途。

[0031] 附图简要说明

[0032] 图1是改编自WO 2007/064968的表,其展示了55,10-亚甲基-(6R,S)-四氢叶酸的未配制和各种配制形式随时间的稳定性(归一化纯度%)。发现未配制的5,10-亚甲基-(6R,S)-四氢叶酸每小时损失2.2%的纯度,导致24小时后归一化纯度为45%。发现含有250%w/w柠檬酸三钠的参考配制剂每小时损失1.4%的纯度,导致24小时后归一化纯度为65%。含有250%w/w柠檬酸三钠和175%w/w抗坏血酸二者的制剂#1和#2具有高得多的稳定性,每小时仅损失0.5%的纯度,导致24小时后归一化纯度为约90%。

[0033] 图2改编自WO 2007/064968中的图1,并用图表展示了本文中图1的制表结果。

[0034] 图3是改编自WO 2007/064968的实施例1的表,显示了本文图1和图2中所示的5,10-亚甲基-(6R,S)-四氢叶酸的未配制形式和配制形式的组成。可以看出,最稳定的组合物(制剂#1和#2)含有少于20%的活性成分5,10-亚甲基-(6R,S)-四氢叶酸。

[0035] 图4显示了包含75mg/mL的5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐、柠檬酸盐和硫酸钠的三种溶液的纯度分析,在三种不同的条件下测试:25°C、5°C和5°C下加入1mg/mL抗坏血酸钠作为抗氧化剂。显示了总共7小时时间段的结果。从图表中可以看出,溶液在储存条件下非常稳定。在5°C下,纯度实际上没有变化,保持在约97%(面积%)。也可以看出,抗坏血酸盐的作用极小。在25°C下,在7小时内纯度从最初的约96%变为约95.5%的纯度(面积%)。

[0036] 图5显示了与如本文中图4所示相同的三种5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐溶液的分析。在图5中,显示了溶液中主要杂质10-甲酰基-(6R)-四氢叶酸(10-FTHFA)在7小时内的发展。可以看出,这种杂质的水平随时间实际上是恒定的。

[0037] 图6显示了包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸钠的冻干组合物在5°C、25°C和40°C下的稳定性。从图表中可以看出,冻干组合物在储存条件下非常稳定。甚至在室温下,当储存24个月时,纯度实际上没有变化(99.8%相对纯度%w/w)。

[0038] 图7显示了在包含5,10-亚甲基- (6R) -四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸钠的冻干组合物中在5°C、25°C和40°C下储存时主要杂质10-甲酰基- (6R) -四氢叶酸(10-FTHFA)的发展。可以看出,这种杂质的水平实际上随时间恒定。

[0039] 定义

[0040] 在本文中,术语“稳定剂”或“稳定化试剂”涉及缓冲剂,例如柠檬酸盐(或柠檬酸及其盐);二羧酸盐,例如琥珀酸盐、苹果酸盐和马来酸盐;三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS);N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙-磺酸(TES);3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS);N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES);MES;MOPS;HEPES;磷酸盐;碳酸盐;铵;单-、二-和三-烷基铵;单-、二-和三-羟烷基铵;谷氨酸盐;硼酸盐;乳酸盐及其组合。术语“稳定剂”或“稳定化试剂”还涉及还原剂,例如L-(+)抗坏血酸或其盐、还原型γ-谷胱甘肽、β-巯基乙醇、硫代甘油、N-乙酰基-L-半胱氨酸等,其可以充当用于敏感的5,10-亚甲基四氢叶酸、特别是四氢叶酸的抗氧化剂。

[0041] 在本文中,术语“缓冲剂”涉及柠檬酸盐(或柠檬酸及其盐)、二羧酸盐例如琥珀酸盐、苹果酸盐和马来酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS);N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(TES);3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS);N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙-磺酸(BES);MES;MOPS;HEPES;磷酸盐;碳酸盐;铵;单-、二-和三-烷基铵;单-、二-和三-羟烷基铵;谷氨酸盐;硼酸盐;乳酸盐及这些的组合。

[0042] 在本文中,术语“还原剂”或“抗氧化剂”涉及L-(+)抗坏血酸或其盐、还原型γ-谷胱甘肽、β-巯基乙醇、硫代甘油和N-乙酰基-L-半胱氨酸。

[0043] 在本文中,术语“溶剂”涉及可用于冷冻干燥过程的溶剂。本文中提到的“溶液”包括水溶液以及有机溶剂中的溶液。典型地,“水溶液”意为水中的溶液、盐水溶液、含有少量缓冲剂的水、含有等渗量NaCl的水或水与有机溶剂的混合物等。典型的有机溶剂包括DMSO、乙腈、丙酮、甲醇或乙醇。

[0044] 在本文中,短语“包含5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>的组合物”涉及溶液和固体组合物二者,例如冷冻干燥物,包括已经重构的冷冻干燥物,例如用于医学治疗。

[0045] 发明详细说明

[0046] 本领域众所周知,5,10-亚甲基四氢叶酸对氧化极度敏感。还已知5,10-亚甲基四氢叶酸的溶液比其固体形式更易受化学降解影响。以前,在本领域中已经通过向已经含有柠檬酸的5,10-亚甲基四氢叶酸溶液中加入抗氧化剂(即还原剂如抗坏血酸盐)解决了此问题。如本文的图1和图2所示,这显示出溶解的5,10-亚甲基四氢叶酸的稳定性增加,但代价是降低了5,10-亚甲基四氢叶酸的相对含量。

[0047] 现已令人惊讶地发现,包含5,10-亚甲基- (6R) -四氢叶酸的二钠盐(下文中表示为5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>)与柠檬酸盐和碱金属硫酸盐的水溶液具有与包含5,10-亚甲基四氢叶酸、柠檬酸盐和还原剂如L-(+)-抗坏血酸的水溶液相当或甚至更高的稳定性,其中根据本发明的溶液接下来被转化成具有类似良好稳定性的冷冻干燥物。碱金属硫酸盐本身不是还原剂,因此通常被认为是化学惰性的。因此,所发现的稳定性是令人惊讶的。

[0048] 本发明的冷冻干燥物含有大于20%w/w的5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>,例如大于25%w/w,例如大于30%w/w,例如大于35%w/w,或例如约40%w/w的5,10-CH<sub>2</sub>- (6R) -THF\*Na<sub>2</sub>。

[0049] 冻干粉末比水溶液具有甚至更高的稳定性,并且可以用稀释剂重构至用于给药的

设定浓度。可以将这种重构的冷冻干燥物肌内或静脉内给药。

[0050] 在冷冻干燥过程之前,可以向溶液中加入填充剂如甘露醇,以促进可接受的冻干饼状物(cake)形成。冻干饼状物的结构和多孔性是重要的,因为良好的孔形成可以促进干燥和干燥循环期间水的运输。

[0051] 此外,可以加入电解质、糖和/或多元醇如右旋糖、甘油、甘露醇和氯化钠以调节摩尔渗透压质量浓度。摩尔渗透压质量浓度调节可以在冷冻干燥之前或之后完成。重构的冻干溶液优选具有250-350mOsm范围内的摩尔渗透压质量浓度。然而,200-600mOsm的摩尔渗透压质量浓度也是可以容许的,并且将取决于要给药的体积以及注射/输注时间。

[0052] 溶液的pH典型地在8.0至9.0的范围内,优选在8.4至8.8的范围内,并且可以在药品产物制备期间中用例如少量盐酸或氢氧化钠调节。

[0053] 稳定性是药物制剂研究和药品开发的关键特性和要素。稳定性研究是在溶液和固体状态二者下进行的。公认的事实是,溶液状态和固体状态稳定性在定性和定量上可以是不同的。通过将其暴露于各种应激原(如高温和/或高湿度)对药品物质及其药物组合物的稳定性进行了广泛的研究。这些研究还提供了降解产物的信息,有助于有意义的规格的制定以及药物组合物的内在稳定性。最常见的药品降解途径包括水解、氧化和光化学降解。

[0054] 稳定性测试的目的是提供产品品质在各种环境因素(如温度、湿度和光线)的影响下如何随时间变化的证据,并确定药物产物的储存寿命和建议的储存条件,以确保患者安全。

[0055] 在第一方面,本发明涉及冻干组合物,其包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸的二钠盐(5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>)、柠檬酸盐和碱金属硫酸盐。

[0056] 在第一方面的优选实施方案中,本发明涉及稳定的冷冻干燥物,其含有大于20%w/w的5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>,例如大于25%w/w,例如大于30%w/w,例如大于35%w/w,或例如约40%w/w的5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>。

[0057] 本发明的冷冻干燥物基本上是无定形的,同时具有增强的稳定性,例如增强的储存稳定性。本发明的冷冻干燥物可以通过本领域已知的方法重构为水性药物制剂,以给药至有此需要的患者。

[0058] 在一个实施方案中,本发明公开了根据第一方面的冻干组合物,其中碱金属硫酸盐与5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>的摩尔比为约40mol-%至约400mol-%,优选约50mol-%至约100mol-%。

[0059] 在另一个实施方案中,本发明公开了根据第一方面的冻干组合物,其中5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>和柠檬酸盐之间的摩尔比为约200-400mol%,优选约350mol%。

[0060] 本发明的第二方面涉及用于制备根据第一方面的冻干组合物的方法,该方法包括以下步骤:

[0061] i. 将(6S)-四氢叶酸溶解在具有NaOH的水中,

[0062] ii. 调节溶液的pH至8.6±0.5,

[0063] iii. 加入110-120mol%的甲醛,

[0064] iv. 搅拌反应混合物直到反应完成,

[0065] v. 加入约40-200mol-%的碱金属硫酸盐和约200-400mol-%的柠檬酸盐,

[0066] vi. 过滤反应混合物以获得澄清的溶液,和

- [0067] vii. 冷冻干燥所获得的澄清溶液，
- [0068] 该方法不包括加入任何其他还原剂或抗氧化剂。
- [0069] 在实施方案中，在步骤v. 中加入的碱金属硫酸盐处于硫酸钠的形式。
- [0070] 在实施方案中，在步骤v. 中加入的柠檬酸盐处于柠檬酸钠的形式。在另一个实施方案中，柠檬酸盐作为柠檬酸加入。
- [0071] 在第三方面，本发明还涉及根据第一方面的包含 $5,10\text{-CH}_2\text{-} (6R)\text{-THF*Na}_2$ 的冻干组合物，用于人类患者的癌症治疗或癌症疗法中。
- [0072] 在优选的实施方案中，本发明涉及根据第一方面的包含 $5,10\text{-CH}_2\text{-} (6R)\text{-THF*Na}_2$ 的稳定冷冻干燥物或其重构水溶液，用于人类患者的癌症治疗或癌症疗法中。
- [0073] 在第四方面，本发明还涉及在人类患者中治疗癌症或癌症疗法的方法，包括将根据第一方面的冻干组合物给药于有此需要的人类患者。
- [0074] 在优选的实施方案中，本发明涉及治疗人类患者癌症的方法，该方法包括向有需要的人类患者给药根据第一方面的包含 $5,10\text{-CH}_2\text{-} (6R)\text{-THF*Na}_2$ 的冻干组合物或其重构水溶液。
- [0075] 在第五方面，本发明还涉及根据第一方面的包含 $5,10\text{-CH}_2\text{-} (6R)\text{-THF*Na}_2$ 的冻干组合物在制备用于人类患者中癌症治疗的药剂中的用途。
- [0076] 其他方面涉及本发明冷冻干燥物的重构药物组合物，其包含 $5,10\text{-CH}_2\text{-} (6R)\text{-THF*Na}_2$ 和药学上可接受的载体或稀释剂，例如无菌水或液体药学上可接受的媒介物，任选地还包含至少一种其他治疗剂，包括但不限于杀菌剂、抗生素、抗病毒剂、防腐剂、抗肿瘤药、抗癌化合物如化疗剂、抗真菌剂和/或抗炎剂或其它适于人类使用的生物活性或治疗剂，特别是抗癌化合物如化疗剂，例如5-FU及衍生物，和抗叶酸剂，例如甲氨蝶呤、培美曲塞。
- [0077] 本发明的冷冻干燥物处于基本上未溶剂化的无水形式，包括完全无水的化合物和可能含有痕量水的化合物。这种可能的残余(非化学计量)水量可以是任何水量，但典型范围为0wt.-%H<sub>2</sub>O至3wt.-%H<sub>2</sub>O，优选在0wt.-%H<sub>2</sub>O至1wt.-%H<sub>2</sub>O之间，例如在0.05wt.-%H<sub>2</sub>O至1wt.-%H<sub>2</sub>O之间。

## 实施例

- [0078] HPLC
- [0079] 为了测量纯度/含量和降解产物，使用了HPLC-UV梯度法：柱类型：ODS，流动相：A：水性缓冲剂；流动相：B：水性缓冲剂/甲醇，运行时间：30分钟，样品溶剂：水性缓冲剂。
- [0080] 水含量
- [0081] 根据Ph.Eur.2.5.32/USP<921/Method Ic>进行水含量的测定。
- [0082] 摩尔渗透压质量浓度
- [0083] 根据Ph.Eur.2.2.35(渗压计)/USP<785>进行摩尔渗透压质量浓度的测定。
- [0084] 实施例1：制备包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸钠的水溶液
- [0085] (a) 在室温和氮气下，将(6S)-四氢叶酸(16mmol, 7.93g)溶解在78.0g蒸馏水中。首先通过缓慢加入32% NaOH溶液将溶液的pH升至11，然后用1.0M HCl将其调节至8.3，并冷却至约0°C。一次性加入甲醛溶液(1.44g, 110mol%)，并将溶液在0°C搅拌1小时。加入活性

炭(0.2g,Norit C Extra),将反应混合物在0°C下搅拌30分钟,过滤以获得5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠(5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>)的澄清溶液。

[0086] 如此获得的5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠溶液可以任选地通过以下步骤(b)和(c),通过沉淀5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF的硫酸盐,然后用氢氧化钠再溶解纯化。

[0087] (b) (任选) 将55mL 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.055mol;344mol%)在氮气下加热至60°C,并经15分钟滴加上述步骤(a)中获得的溶液。将获得的反应混合物(浆料)在50°C下搅拌2小时。然后在50°C下抽滤反应混合物,在室温下用25mL蒸馏水洗涤沉淀物两次,并在30°C和10毫巴下干燥12小时(过夜)以获得7.36g浅灰色晶体形式的5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF硫酸盐(86%产率)。

[0088] (c) (任选) 在氮气下,将步骤(b)的产物溶解在50mL 0.1N NaOH中,并用1.5N NaOH将pH调节至8.6±0.50。

[0089] (d) 将20mL水中的21g柠檬酸加入步骤(c)或步骤(a)的溶液中,如果需要,用硫酸钠水溶液将硫酸盐含量调节为至多200mol%。然后用无菌过滤水将总体积调节至100mL,并使用0.22μm过滤器过滤,优选亲水PVDF型,例如Millipore **Durapore®** 0.22μm。将滤液装入小瓶(每小瓶2mL或160mg的5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>),同时尽可能保持溶液低温。

[0090] 实施例2:制备包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸盐的冻干组合物

[0091] 将实施例1的小瓶冷冻,随后冷冻干燥。小瓶在顶部空间有氮气的轻微真空下密封并卷曲(crimp)。所得冷冻干燥物含有大于30%w/w的5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF\*Na<sub>2</sub>。

[0092] 实施例3:稳定性测试

[0093] a) 包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸盐的溶液在25°C下的稳定性

[0094] 为了测定包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸、柠檬酸盐和硫酸盐的无菌过滤溶液在25°C下的稳定性,将如实施例1步骤(d)中制备的溶液储存在25°C下。5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF的纯度通过HPLC以周期性间隔测量(%面积)。结果如图4所示。

[0095] 在研究期间,测试溶液的颜色从黄色变深至深黄色。对于保存在室温下的样品,不使用避光保护。在室温下,纯度在7小时的储存期内保持稳定在96%。

[0096] 图4总结了稳定性测试期间分析结果的进展。

[0097] 储存在25°C时,通过HPLC以周期性间隔测量主要降解产物10-甲酰基-(6R)-四氢叶酸(10-FTHFA)的含量。结果如图5所示。

[0098] b) 包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸盐的溶液在5°C下的稳定性

[0099] 为了测定包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸钠的无菌过滤溶液在5°C下的稳定性,将如实施例1步骤d中制备的溶液储存在5°C下。5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF的纯度通过HPLC以周期性间隔测量(%面积)。结果如图4所示。

[0100] 主要降解产物10-甲酰基-(6R)-四氢叶酸(10-FTHFA)的含量通过HPLC以周期性间隔测量。结果如图5所示。

[0101] 在研究期间,测试溶液的颜色从黄色变深至深黄色。在研究期间,稳定性测试溶液储存在冰箱(2°C至8°C)中,仅在分析取样时取出。在取样期间,不使用避光保护。在2°C至8°C下,纯度没有显示出显著变化,在7小时的储存期内保持稳定在97%。

[0102] 图4和图5总结了稳定性测试期间分析结果的进展。

[0103] 对加入了抗坏血酸钠(1mg/mL作为抗氧化剂)并在2°C至8°C下储存的比较测试溶液重复5°C下的稳定性测试。与未添加抗坏血酸钠的测试溶液相比,添加抗坏血酸钠的测试溶液没有显示出显著差别(图4和图5)。因此,就稳定性而言,含有和不含抗坏血酸盐的溶液可以认为是相同的。

[0104] 75mg/mL的5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸盐溶液是澄清的,无论是储存在2-8°C还是室温下都保持澄清,即没有沉淀发生。该溶液稍有粘性,摩尔渗透压质量浓度为约710m0smol/kg。

[0105] 总之,包含75mg/mL 5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸盐的无菌过滤溶液在2°C至8°C下储存时稳定至多7小时,在室温下储存时稳定至多4小时。

[0106] c) 包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸钠的冻干组合物在5°C、25°C和40°C下的稳定性

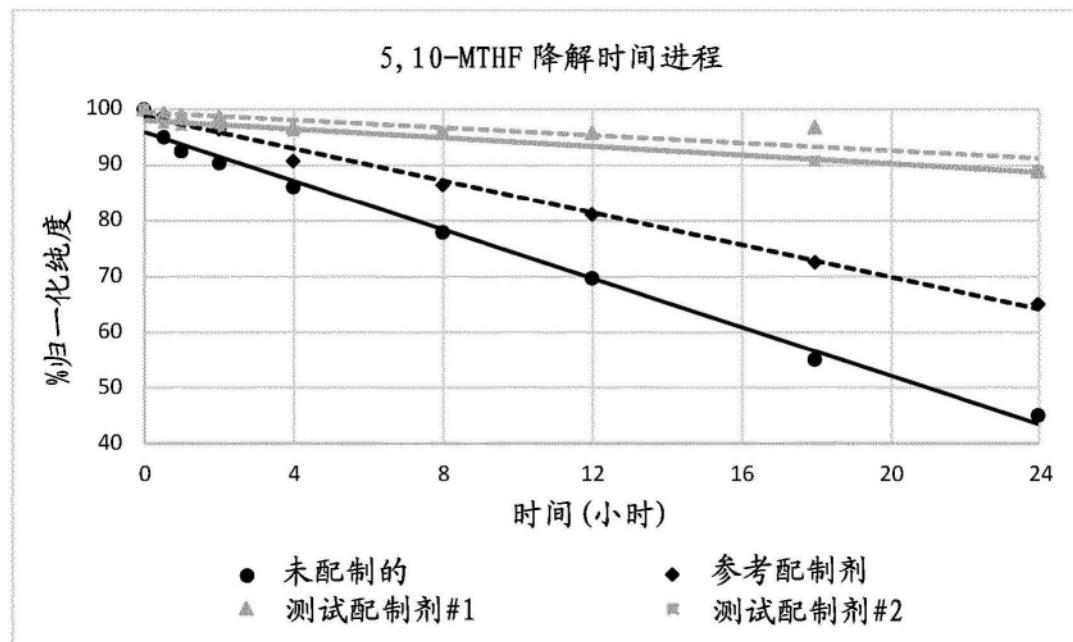
[0107] 为了测定包含5,10-亚甲基-(6R)-四氢叶酸二钠、柠檬酸盐和硫酸盐的冻干组合物在不同温度下随时间的稳定性,将实施例2中制备的冷冻干燥物储存在5°C、25°C和40°C。5,10-CH<sub>2</sub>-(6R)-THF的纯度通过HPLC以周期性间隔测定(%面积)。相对于起始值的结果在图6中以%w/w的相对纯度显示。

[0108] 储存在5°C、25°C和40°C时,通过HPLC以周期性间隔测量主要降解产物10-甲酰基-(6R)-四氢叶酸(10-FTHFA)的含量。结果如图7所示。

时间 (小时)	未配制的	参考制剂 冻干物	测试制剂 #1 冻干物	测试制剂 #2 冻干物
0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,5	94,9	98,8	99,3	97,3
1	92,4	97,8	99,0	97,0
2	90,3	96,2	98,4	96,6
4	85,9	90,5	96,9	95,9
8	77,8	86,5	95,8	95,7
12	69,6	80,9	95,7	N/A
18	55,1	72,4	96,6	90,8
24	44,9	65,0	88,9	88,8

N/A=数据不可用

图1



5, 10-MTHF=5, 10-亚甲基-(6R, S)-四氢叶酸

图2

测试样品	5,10-MTHF	柠檬酸三钠	抗坏血酸	% w/w 5,10-MTHF
未配制的	100 mg	0	0	100%
参考制剂	100 mg	269 mg	0	27%
测试制剂#1	100 mg	250 mg	176 mg	19%
测试制剂#2	100 mg	250 mg	176 mg	19%

5, 10-MTHF=5, 10-亚甲基-(6R, S)-四氢叶酸

图3

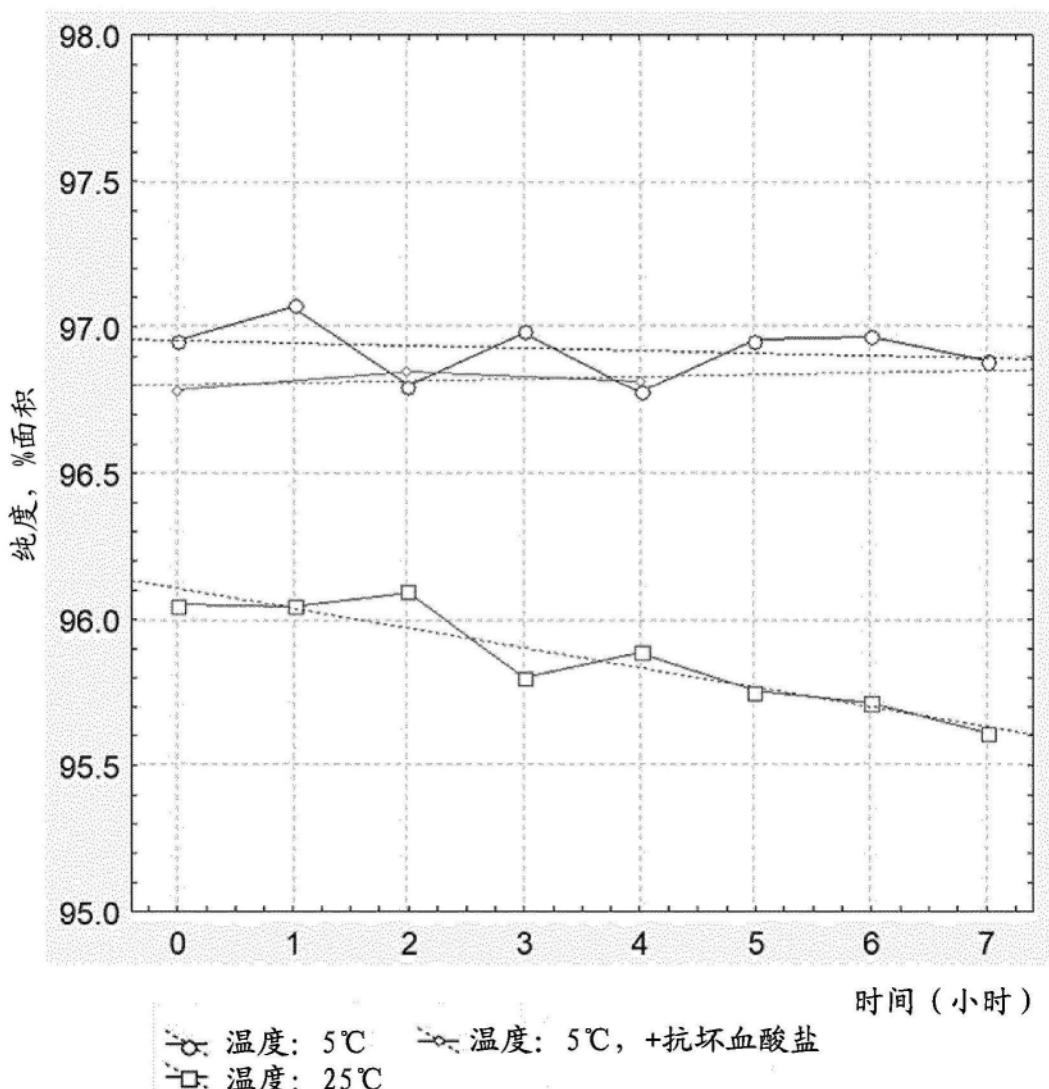


图4

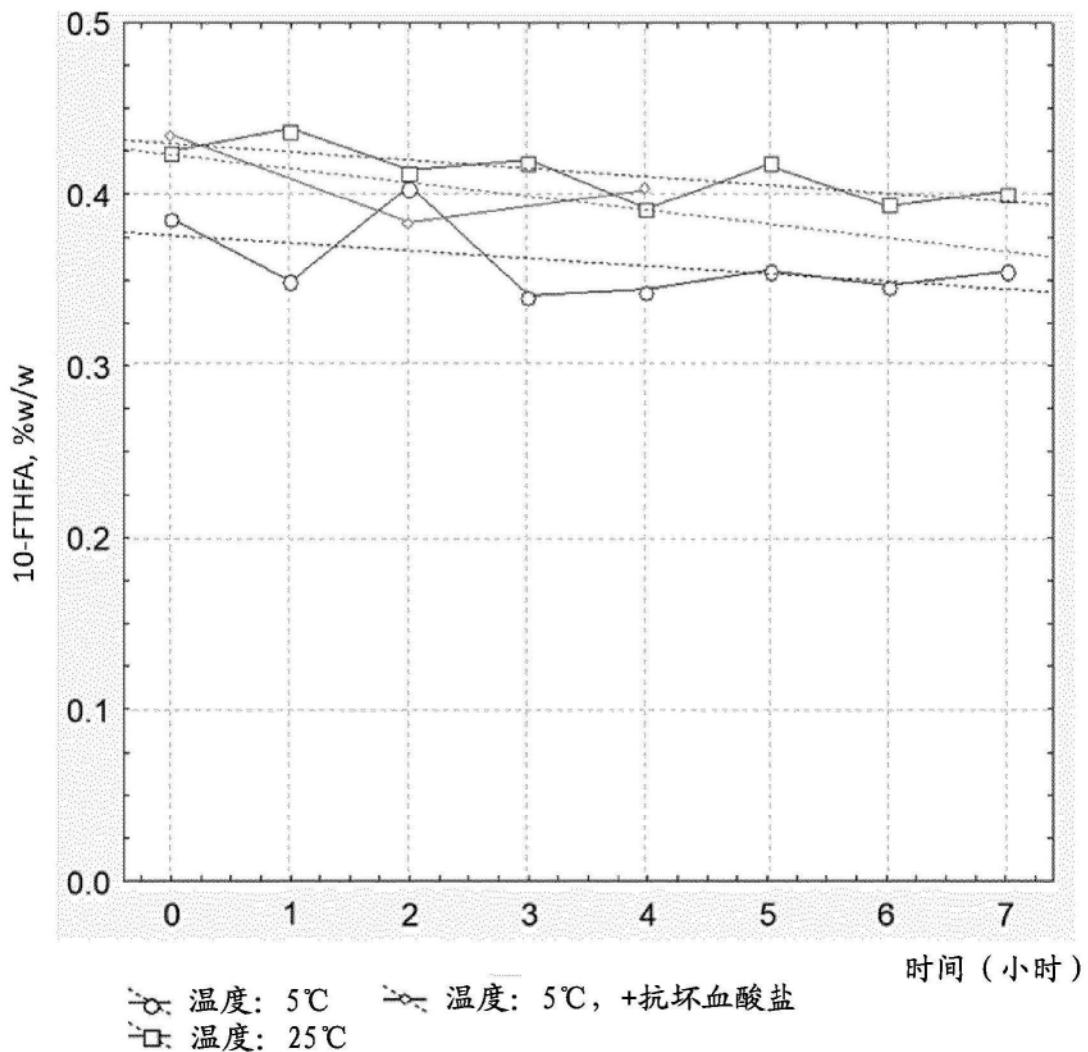
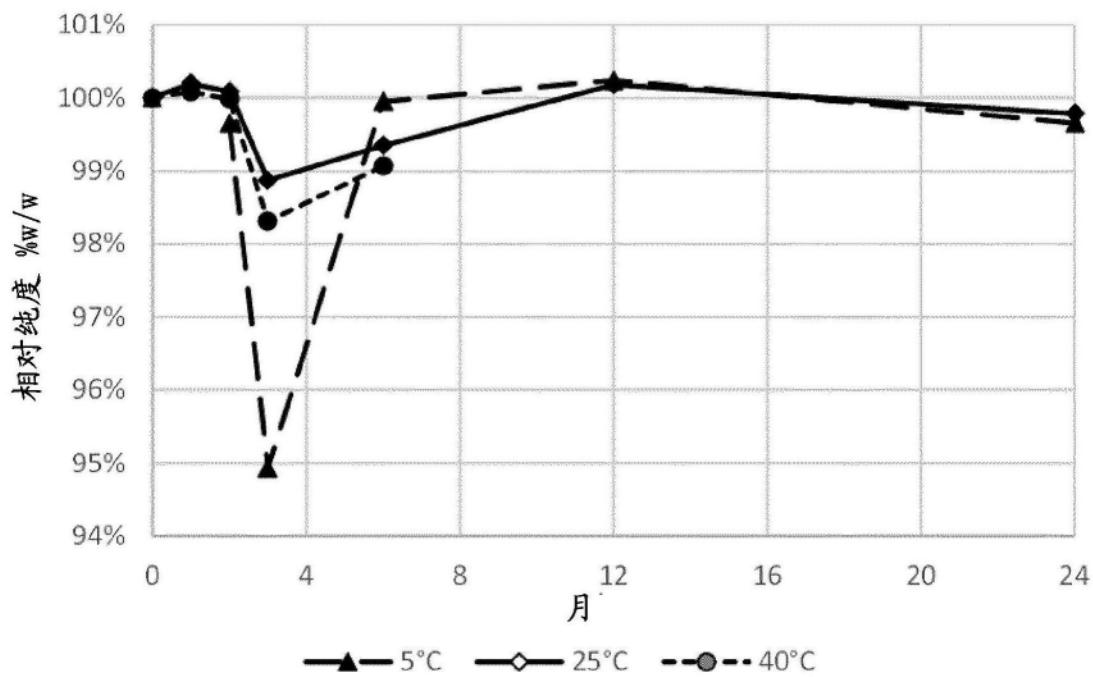


图5



由于 HPLC 测量中的误差，第 3 个月处的值最可能是异常值。

图6

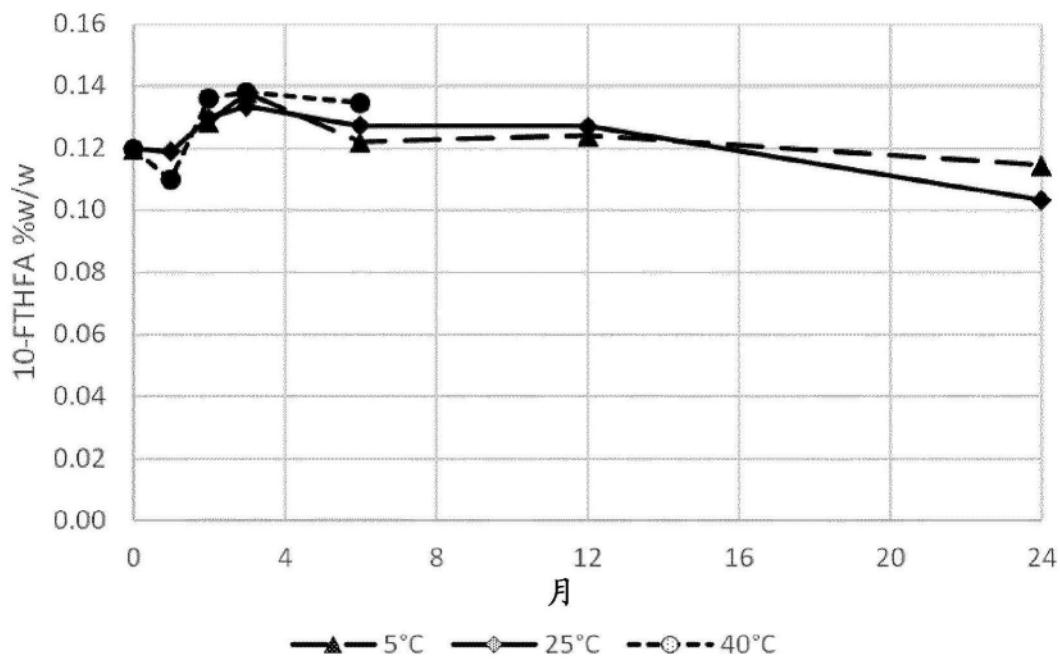


图7