

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 906**

51 Int. Cl.:

**C07C 219/08** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2005** **E 05802304 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 1814843**

54 Título: **(2R)-enantiómero de cloruro de DOTAP**

30 Prioridad:

**26.11.2004 DE 102004057303**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.09.2015**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
FRANKFURTER STRASSE 250  
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**PLATSCHER, MICHAEL y  
HEDINGER, ALFRED**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 545 906 T3**

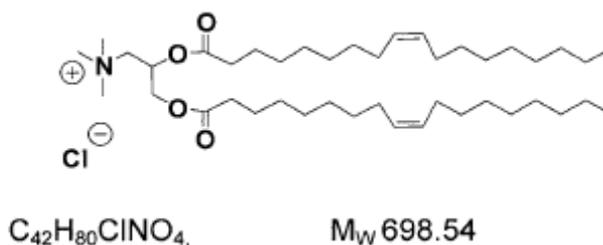
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

(2R)-enantiómero de cloruro de DOTAP

La presente invención hace referencia al cloruro de (2R)-DOTAP enantioméricamente puro, así como a su utilización para preparar composiciones farmacéuticas.

- 5 En cuanto a lo antes mencionado, así como a continuación, el término cloruro de DOTAP hace referencia al cloruro de N,N,N-trimetil-2,3-bis[[[(9Z)-1-oxo-9-octadecenil]oxi]-1-propanaminio, denominado también cloruro de (Z,Z)-N,N,N-trimetil-2,3-bis[(1-oxo-9-octadecenil)oxi]-1-propanaminio o cloruro de 1,2-dioleoiloxi-3-tri-metilamoniopropano, y a sus hidratos.



- 10 N° de CAS: 132172-61-3 y 477274-39-8 (racemato),  
197974-73-58 (racemato, monohidrato)  
428506-51-8 (forma 2S), 328250-28-8 (forma 2R)

- 15 Los liposomas son vesículas artificiales de varias capas (esféricas en membranas cerradas en sí mismas) en base a sustancias ambifílicas, por lo general lípidos naturales, en donde pueden incorporarse tanto sustancias hidrofílicas encapsuladas en el espacio interior acuoso, así como también pueden incorporarse sustancias lipófilicas en el área interior de la membrana lipídica.

Los liposomas se utilizan principalmente en el área de la cosmética y la medicina, en especial en la dermatología. En los mismos se incorporan ante todo vitaminas, coenzimas, protectores para la piel y protectores solares. Los liposomas se utilizan por lo general de forma tópica.

- 20 Mediante los liposomas puede alcanzarse una distribución más específica del órgano, como si los componentes activos se utilizaran de forma disuelta.

Cuando se incluye ADN, ARN o proteínas, se obtienen entonces lipoplexos.

- 25 Añadiendo aceites y utilizando homogeneizadores de alta presión, a partir de liposomas puede forzarse la formación de las así llamadas nanopartículas (Nanoparts). Éstas consisten en partículas de aproximadamente el mismo orden de magnitud que los liposomas, las cuales sin embargo no poseen una fase acuosa en el interior, sino una fase oleosa. Dichas partículas son apropiadas en particular para el encapsulado de sustancias lipófilicas.

Las microemulsiones son sistemas homogéneos de dispersión coloidal en base a componentes acuosos, similares a los lípidos y surfactantes. Las mismas presentan un tamaño de las partículas de 1-500 nm y se comportan de modo similar a los líquidos.

- 30 En particular en combinación con los componentes activos peptídicos, nucleótidos, vacunas y otros productos biofarmacéuticos que normalmente se disuelven con dificultad, el efecto que facilita la dispersión es de gran importancia en el caso de las utilidades antes descritas.

De este modo, puede también frenarse la degradación de los componentes activos en el organismo, logrando un efecto de liberación sostenida.

- 35 El cloruro de DOTAP pertenece a la categoría de los lípidos catiónicos. A diferencia de los fosfolípidos que se presentan de forma natural, éstos no poseen un carácter zwitteriónico. Los liposomas en base a lípidos catiónicos, solos o combinados con fosfolípidos u otros compuestos a modo de lípidos, presentan una superficie cargada de

forma positiva. Además, resulta una elevada afinidad con respecto a aquellas células que hacia el exterior poseen una superficie cargada de forma negativa, por ejemplo las células del endotelio.

5 No obstante, en los liposomas y lipoplexos a base de DOTAP y en otros liposomas catiónicos se considera especialmente importante la capacidad de poder penetrar en células, transportando de este modo hacia el interior de las células los componentes activos que se encuentran encapsulados dentro de los mismos (transfección).

Todas las propiedades mencionadas hacen que el cloruro de DOTAP también sea de gran interés para la terapia del cáncer. A través de esas propiedades se presenta la posibilidad de aplicar agentes citotóxicos tradicionales incorporados en liposomas de DOTAP catiónicos.

10 Las propiedades de transfección del cloruro de DOTAP y de otras sales de DOTAP, como por ejemplo del acetato, bromuro, dihidrógeno fosfato, hidrógeno sulfato, yoduro, mesilato, metilsulfato, trifluoracetato, sulfato o disulfato y triflato son conocidas de forma suficiente a través de las publicaciones.

El dihidrógeno fosfato de DOTAP y el mesilato de DOTAP se mencionan en las publicaciones sólo como racematos. Todas las otras sales antes indicadas se mencionan respectivamente como racemato y enantiómero 2S, donde con respecto al cloruro y al metilsulfato se mencionan adicionalmente también los enantiómeros 2R.

15 En algunos estudios in vitro, otras sales, como por ejemplo el metilsulfato de DOTAP, han alcanzando mejores tasas de transfección que el cloruro de DOTAP.

20 Sin embargo, aplicado in vivo, en el organismo viviente tiene lugar un intercambio de aniones en la superficie del liposoma, de manera que las ventajas de otras sales no se consideran en este caso. Por ello, especialmente en la aplicación medicinal en el ser humano y en particular para la aplicación parenteral se prefieren las sales de DOTAP con aniones fisiológicamente aceptables, como por ejemplo el cloruro correspondiente o el acetato.

25 Las aplicaciones en el ámbito de la medicina, en particular las aplicaciones parenterales, implican las exigencias más elevadas en cuanto a la calidad y a la pureza de los componentes activos y de los coadyuvantes utilizados. De este modo, por parte de las autoridades existen reglamentaciones muy estrictas en cuanto a la producción, la reproducibilidad de la producción, así como del perfil de subproductos de los compuestos mencionados. En el caso de las sustancias utilizadas de forma parenteral se añade el hecho de que deben evitarse y controlarse estrictamente contaminaciones microbiológicas a través de gérmenes patógenos y endotoxinas.

El cloruro de DOTAP y otras sales de DOTAP son extremadamente inestables y es dificultoso producirlos con una pureza aceptable, de manera que sean adecuados para una utilización para preparar la fórmula de un medicamento.

30 Como todos los lípidos que portan residuos de ácidos oleicos, como por ejemplo los fosfolípidos naturales DOPC y DOPE, todas las sales de DOTAP son muy sensibles a la oxidación. No obstante, los productos de la oxidación de derivados insaturados de los ácidos grasos presentan generalmente una toxicidad elevada.

En ese caso se requieren métodos de producción y de purificación adecuados. A modo de ejemplo, el acetato de DOTAP se presenta como un aceite de alto punto de ebullición y por eso, técnicamente, puede obtenerse con una calidad suficiente sólo con gran dificultad.

35 Los métodos tradicionales para superar la inestabilidad, como por ejemplo la adición de antioxidantes en forma de ácido ascórbico o L-glutatión reducido, limitan en alto grado la aplicabilidad general del cloruro de DOTAP, puesto que no pueden excluirse interacciones con los componentes activos que deben incorporarse de forma posterior. Es muy difícil excluir completamente el oxígeno durante la producción, almacenamiento y utilización, y esto sólo es posible además realizando una gran inversión.

40 El cloruro de DOTAP sólo puede obtenerse a través del comercio como solución de cloroformo o como sustancia sólida amorfa.

Junto con su sensibilidad a la oxidación, el cloruro de DOTAP amorfo también es extremadamente higroscópico y con la humedad normal del aire se derrite rápidamente formando una película grasosa. Esto dificulta enormemente la manejabilidad de ese compuesto.

45 De este modo, para el cloruro de DOTAP amorfo es recomendado por el fabricante generalmente un almacenamiento bajo gas protector a -20°C y se garantiza sólo una duración del compuesto de aproximadamente 6 meses.

Por las publicaciones se conocen solamente diferentes vías de síntesis para la producción de cloruro de DOTAP racémico amorfo:

5 Eibel y Unger, en DE4013632A1, describen la síntesis de cloruro de DOTAP a partir de bromuro de DOTAP a través del intercambio de iones en el sistema de disolventes cloroformo/metanol/HCl acuoso y una purificación subsiguiente mediante cromatografía. El bromuro de DOTAP se obtiene previamente in situ a partir de 1-bromo-2,3-dioleoil-oxipropano.

10 Leventis y Silvius, en Biochim. Biophys. Acta, 1023 (1990) 124-132, informan sobre la síntesis de cloruro de DOTAP a partir de yoduro de DOTAP a través del intercambio de iones en el sistema de dos fases de disolvente/solución de NaCl. El yoduro de DOTAP se obtiene previamente a través de la metilación del compuesto de dimetilamino correspondiente mediante yoduro de metilo.

Nantz y otros, en Biochim. Biophys. Acta, 1299 (1996) 281-283, J. Med. Chem. 40 (1997) 4069-4078, describen la síntesis de cloruro de DOTAP a través de cromatografía no acuosa del intercambio de iones. El compuesto deseado se obtiene evaporando el eluato.

15 Felgner y otros, solicitud US 5,264,618, efectúan la metilación del compuesto correspondiente de dimetilamino, formando cloruro de DOTAP directamente mediante cloruro de metilo. En este caso se obtiene una cera amarilla, supuestamente a través de una cristalización a partir de acetonitrilo a -20°C. Sin embargo, a temperatura ambiente el cloruro de DOTAP es prácticamente insoluble en acetonitrilo. Los intentos de reproducir esa así llamada cristalización dieron como resultado solamente un material amorfo a través de la solidificación de la sustancia separada del aceite al enfriar la solución caliente... Se evidencia que no es una cristalización debido a que los  
20 autores claramente no logran un efecto de purificación y deben purificar la sustancia mediante cromatografía.

Por consiguiente, hasta el momento no se conocen vías de síntesis para producir los dos cloruros de DOTAP enantioméricos ni sus propiedades características. A través de Chemical Abstracts se otorgaron números para los dos enantiómeros, pero en las publicaciones correspondientes se describen exclusivamente trabajos con el cloruro de DOTAP racémico.

25 En particular cuando los compuestos se prevén para la aplicación parenteral, una producción que incluya un tratamiento con resina desmineralizadora se considera extremadamente problemática en cuanto a una posible contaminación microbiológica, puesto que las resinas correspondientes son un medio de cultivo ideal para los gérmenes y aún después de destruir estos últimos existe el riesgo de la contaminación a través de endotoxinas.

30 Por tanto, es objeto de la presente invención poner a disposición sales e hidratos de cloruro de DOTAP con una pureza elevada y con una estabilidad química y física suficiente. Otro objeto de la invención consiste en proporcionar las sales mencionadas con una elevada estabilidad en cuanto a su almacenamiento, de manera que las mismas puedan utilizarse para preparar formulaciones farmacéuticas. A su vez, existe una gran necesidad en cuanto a un proceso reproducible, que pueda realizarse a escala técnica, para producir formas estables de sales e hidratos de cloruro de DOTAP.

35 El cloruro de DOTAP enantioméricamente puro puede obtenerse a partir de eductos enantioméricamente puros, de forma análoga al procedimiento descrito para el racemato, es decir

mediante (R, así como S)-1-cloro-2,3-dioleoiloxipropano,

mediante (R, así como S)-1-LG-2,3-dioleoiloxipropano e intercambio de iones (LG=grupo de salida) o mediante (R, así como S)-1-dimetilamino-2,3-dioleoiloxipropano.

40 Como otro método de producción puede mencionarse la separación del racemato del cloruro de DOTAP racémico.

A través de ensayos, de forma sorprendente, se descubrió que tanto el cloruro de DOTAP racémico, así como el cristalino, enantioméricamente puro, pueden obtenerse de forma sencilla con una pureza química elevada y con una excelente estabilidad. Los productos cristalinos así obtenidos son estables prácticamente de forma ilimitada a temperatura ambiente bajo gas protector. Por ese motivo son adecuados como constituyentes o como material inicial  
45 para preparar formulaciones de medicamentos.

A través de ensayos, de forma sorprendente, se descubrió que tanto el cloruro de DOTAP racémico, así como el cristalino, enantioméricamente puro, pueden obtenerse de forma sencilla con una pureza química elevada y con una excelente estabilidad. Los productos cristalinos así obtenidos son estables prácticamente de forma ilimitada a temperatura ambiente bajo gas protector. Por ese motivo son adecuados como constituyentes o como material inicial  
50 para preparar formulaciones de medicamentos.

Por consiguiente, es objeto de la presente invención el cloruro de (2R)-DOTAP enantioméricamente puro.

5 Las modificaciones estables del cristal pueden presentarse en forma cristalina o parcialmente cristalina. Las mismas presentan una pureza hasta el momento nunca antes alcanzada de > 98%, junto con una estabilidad hasta el momento nunca antes alcanzada de > 98% con respecto al valor inicial después de 12 meses de almacenamiento bajo exclusión de aire a 25°C y 60% de humedad del aire relativa. (véase al respecto la tabla 1). Las modificaciones del cristal del cloruro de DOTAP poseen un contenido menor a 1 equivalente de agua o disolvente de cristal en 1 equivalente de cloruro de DOTAP.

10 Las modificaciones del cristal del cloruro de DOTAP racémico se presentan por ejemplo en tres modificaciones diferentes del cristal (tipo I, tipo II, y tipo III) y en el caso de mediciones de difracción de rayos X de polvo muestran bandas semi-agudas (véanse al respecto las ilustraciones 1 a 3 y la tabla 2).

Los valores 2 theta seleccionados para las tres modificaciones diferentes del cristal se ubican en 12,6, 19,5, 20,2, 21,5 y 25,2 (tipo I); así como en 3,3, 4,9, 19,3, 20,0 y 23,5 (tipo II); así como en 2,8, 5,8, 20,0, 21,2 y 25,1 (tipo III).

15 Los cloruros de DOTAP enantioméricamente puros se obtienen igualmente en forma cristalina. Los valores 2 theta seleccionados para la modificación del cristal hallada se ubican en 12,8, 19,4, 19,8, 20,2, y 21,5 (tipo IV, véase la ilustración 4).

Los enantiómeros son ópticamente activos. De este modo, el cloruro de (2S)-DOTAP posee un valor de rotación de -2,12°, el cloruro de (2R)-DOTAP un valor de +2,12° ( $[\alpha]_D$  a 20°C, solución al 1% en peso en diclorometano).

20 A continuación se describe un procedimiento para producir modificaciones del cristal del cloruro de DOTAP, caracterizado porque el cloruro de DOTAP se cristaliza desde un medio aprótico. Como medio aprótico pueden utilizarse para este fin disolventes apróticos o sus mezclas.

25 El medio aprótico puede también contener disolventes próticos en menor proporción, como por ejemplo agua. En casos excepcionales, bajo condiciones apropiadas, puede estar contenido también el 25 % en peso de disolventes próticos. La cristalización de los cloruros de DOTAP puede realizarse sin una purificación previa, directamente a partir de la solución de reacción. Del mismo modo, el cloruro de DOTAP cristalino puede obtenerse a través de la recristalización de material amorfo, parcialmente cristalino o cristalino.

Como disolventes apróticos son adecuados ante todo

éter, como por ejemplo tetrahidrofurano, metiltetrahidrofurano, dioxano, dietil éter, dipropil éter, diisopropil éter y metil terc- butil éter

cetonas, como por ejemplo acetona y 2-butanona, metil isobutil cetona, metil isopropil cetona,

nitrilos, como por ejemplo acetonitrilo y

éster, como por ejemplo etilformiato, metilacetato, etilacetato, propilacetato, isopropilacetato, butilacetato, isobutilacetato, dimetilcarbonato, dietilcarbonato y 1,3-dioxolidin-2-ona.

30 Los disolventes mencionados pueden utilizarse respectivamente de forma pura o en una mezcla, es decir que en la mezcla pueden utilizarse tanto diferentes disolventes apróticos de un grupo como también tipos de disolventes apróticos, empleados unos con otros. Del modo antes indicado, en el disolvente aprótico utilizado o en la mezcla de disolventes utilizada pueden estar contenidos aditivos de disolventes próticos.

Los aditivos de disolventes próticos de ese tipo generalmente pueden estar compuestos por los siguientes disolventes:

alcoholes como por ejemplo metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n- butanol, iso-butanol, 2-butanol, terc-butanol, 3- metil-1-butanol y etilenglicol, metoxietanol, etoxietanol, o

agua.

35 Los aditivos de disolventes próticos pueden consistir a su vez en aditivos de los disolventes puros o de las mezclas de esos disolventes próticos.

La cristalización de las modificaciones del cloruro de DOTAP se alcanza generalmente de forma dirigida a través del enfriamiento lento de la solución producida hasta alcanzar temperaturas inferiores a 30°C. La formación de los

crisales se efectúa de forma espontánea o a través de inoculación con la modificación del cristal correspondiente del cloruro de DOTAP.

5 Las diferentes modificaciones del cristal del cloruro de DOTAP pueden transformarse unas en otras. Las transformaciones pueden lograrse a través de tratamientos térmicos de las modificaciones aisladas del cristal al aumentar la temperatura o agitando continuamente de forma más prolongada sus suspensiones, bajo condiciones de cristalización.

A través de la utilización de cloruro de DOTAP amorfo o parcialmente cristalino como material inicial para la cristalización, a través del procedimiento descrito se obtienen cloruros de DOTAP esencialmente cristalinos de una pureza nunca alcanzada hasta el momento, junto con una estabilidad nunca alcanzada hasta el momento.

10 También es posible la utilización de cloruros de DOTAP cristalinos para producir formulaciones de medicamentos, ya que los cloruros de DOTAP cristalinos, bajo las condiciones dadas, en forma sólida, proporcionan nuevas calidades de los liposomas, en combinación con fosfolípidos adecuados, colesterol y sus derivados, donde dichas calidades representan por una parte encapsulados más compactos de los lípidos y, por otra parte, los mismos se estructuran de modo más uniforme, en comparación con las formas tradicionales. De este modo, los liposomas que se producen a partir de enantiómeros puros muestran una temperatura de transición de fases principal superior en 5°C, en comparación con los liposomas a partir de cloruro de DOTAP racémico. Ésta se considera una medida para la densidad del encapsulado. Por este motivo, los enantiómeros de cloruro de DOTAP presentan también un derrame reducido del compuesto que se encuentra incluido dentro.

20 Esto tiene como consecuencia el hecho de que los liposomas cargados con compuestos farmacéuticamente activos, en la interacción con el metabolismo, liberan componentes activos de forma retardada en el organismo humano o animal. De manera ventajosa, de este modo, en particular los componentes activos sensibles pueden ser transportados de forma dirigida hacia el lugar o el órgano deseado, en donde el efecto del medicamento se considera deseable.

25 Los enantiómeros de cloruro de DOTAP, en particular en combinación con lípidos quirales como fosfolípidos, colesterol y sus derivados, presentan también diferentes propiedades de transfección específicas de las líneas celulares.

Para producir esos nuevos liposomas de forma dirigida, para el experto es posible seleccionar una forma o una determinada proporción de la mezcla de los cloruros de DOTAP que se encuentran a disposición, con el fin de producir liposomas con nuevas propiedades determinadas.

30 Por consiguiente, otro objeto de la invención consiste también en las composiciones farmacéuticas que resultan de la utilización del cloruro de DOTAP indicado en las reivindicaciones. Las composiciones farmacéuticas de esa clase pueden contener cloruro de (2R)-DOTAP junto con otros componentes activos farmacéuticos y coadyuvantes conocidos utilizados generalmente en la preparación de medicamentos, así como uno o varios disolventes.

35 Las composiciones farmacéuticas mencionadas pueden presentarse por ejemplo como liposomas, lipoplexos, microemulsiones y nanopartículas y, a modo de ejemplo, contienen un componente activo del grupo de los péptidos, nucleótidos, vacunas o agentes citostáticos.

La presente descripción posibilita al experto aplicar la invención con amplitud. Los siguientes ejemplos sirven además para mejorar la comprensión y para ilustrar posibles variantes de la invención.

40 Todas las temperaturas mencionadas en los siguientes ejemplos están indicadas en grados Celsius. A menos que se indique de otro modo, los datos del contenido figuran como % en peso.

### Ejemplos para ilustrar la invención

#### Ejemplo 1

##### Estabilidades

45 Para determinar la estabilidad de los cloruros de DOTAP cristalinos, las sustancias se almacenan junto con modelos de comparación a 25°C y 60% de humedad relativa, bajo exclusión del aire. A intervalos periódicos se mide el contenido restante de cloruro de DOTAP y se indica en comparación con el valor inicial.

La pureza y el contenido de cloruro de DOTAP se determinan con HPLC. Para el tipo I se hallaron los siguientes valores:

La determinación de la estabilidad puede repetirse en cualquier momento; los valores indicados en la tabla 1 pueden ser reproducidos.

Tabla 1

| Cloruro de (R,S) –DOTAP cristalino, tipo I | Tiempo de exposición en meses |         |         |         |         |         |
|--|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|  | 0                             | 1       | 2       | 3       | 6       | 12      |
| % de la superficie                         | 100 %                         | 100,0 % | 100,0 % | 100,0 % | 100,0 % | 100,0 % |
| % del peso                                 | 98,6 %                        | 97 %    | 97,9 %  | 97,2 %  | 98,2 %  | 98,7 %  |

5 **Ejemplo 2**

[Diagrama de rayos X de polvo]

Para caracterizar las propiedades estructurales (modificaciones del cristal) de los cloruros de DOTAP cristalinos se registran diagramas de rayos X de polvo (espectros de difracción) de esas sustancias. Los cloruros de DOTAP cristalinos dan como resultado para los lípidos espectros relativamente bien determinados con bandas semi-agudas. Los espectros indican partes cristalinas elevadas. Bajo el microscopio de polarización no son visibles partes amorfas.

Ejemplos de espectros se muestran en la ilustración 1 (tipo I), ilustración 2 (tipo II), ilustración 3 (tipo III) e ilustración 4 (tipo IV).

Para establecer una comparación, en la ilustración 5 (amorfo) se muestra un espectro de una muestra amorfa que puede adquirirse a través del comercio.

En la tabla 2 se presenta una lista de valores 2 theta seleccionados para las diferentes modificaciones del cristal de los cloruros de DOTAP racémicos y enantioméricamente puros:

Tabla 2

| Tipo     |                         | Valores 2 theta seleccionados  |
|----------|-------------------------|--------------------------------|
| Tipo I   | racémico                | 12,6, 19,5, 20,2, 21,5 y 25,2  |
| Tipo II  |                         | 3,3, 4,9, 19,3, 20,0 y 23,5    |
| Tipo III |                         | 2,8, 5,8, 20,0, 21,2 y 25,1    |
| Tipo IV  | enantioméricamente puro | 12,8, 19,4, 19,8, 20,2, y 21,5 |

20 **Ejemplo 3**

Temperaturas de transición de fases principal

Las mediciones por calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry - DSC) se efectúan en agua en liposomas multilamerales De las cantidades calculadas de cloruro de DOTAP racémico o enantioméricamente puro se producen liposomas según el método de película delgada. La concentración de lípidos asciende respectivamente a 0,1 g/ml. Cantidades adecuadas de esas dispersiones se colocan a continuación en crisoles de

aluminio que pueden ser cerrados y se miden con un calorímetro 204 Phoenix (Netzsch, Selb, Alemania). Respectivamente tres recorridos sucesivos de caliente/frío desde -50°C a +20°C se realizan con 1 °C/min.

- 5 Para las tres variantes de cloruro de DOTAP se hallaron temperaturas de transición de fases inferiores a 0°C. Para los ciclos de enfriamiento dicha temperatura se ubica respectivamente en -23°C a -24°C. Las diferencias entre el cloruro de DOTAP racémico y enantioméricamente puro pueden observarse respectivamente en los ciclos de calentamiento. El cloruro de (2R)-DOTAP y (2S)-DOTAP muestran ambos una transición de fases endotérmica que se ubica alrededor de -12,5 °C, mientras que para el racemato la transición de fases se ubica en -17,5 °C (véase la ilustración 6).

#### **Ejemplo 4**

- 10 Propiedades de transfección en células COS-7

Cloruro de DOTAP racémico y enantioméricamente puro, así como metilsulfato DOTAP racémico, se dispersan respectivamente con la misma cantidad de colesterol en el medio de transfección y se someten a ultrasonido. Los liposomas y solución de plásmido GFP se mezclan y se incuban 15 minutos,

Cantidades por 6 pocillos: 2 µg de plásmido/8 µg de lípido.

- 15 Después de 5 horas de incubación se succiona de las células el líquido sobrenadante a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>, se agregan 2 ml de medio fresco y se incuba otras 20 horas. Después del procesamiento, el análisis FACS da como resultado una transfección eficiente para todos los lipoplejos. Puede establecerse una diferencia significativa entre las tasas de transfección para las mezclas de lípidos por separado:

(R)-DOTAP complejo de cloruro/colesterol: 32,4 %

- 20 (S)-DOTAP complejo de cloruro/colesterol: 11,0 %

(R, S)-DOTAP complejo de cloruro/colesterol: 25,9 %

(R, S)-DOTAP complejo de metilsulfato/colesterol: 20,2 %

**REIVINDICACIONES**

1. Cloruro de (2R)-1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamoniopropano (cloruro de (2R)-DOTAP) enantioméricamente puro
2. Utilización de cloruro de (2R)-DOTAP enantioméricamente puro como constituyente para la preparación de medicamentos.
- 5 3. Composición farmacéutica que contiene cloruro de (2R)-DOTAP enantioméricamente puro junto con componentes activos farmacéuticos, coadyuvantes o un disolvente.
4. Composición farmacéutica que contiene cloruro de (2R)-DOTAP enantioméricamente puro según la reivindicación 3, caracterizada porque como componente activo farmacéutico se utiliza un componente activo seleccionado del grupo de los péptidos, nucleótidos, vacunas y agentes citostáticos.
- 10 5. Composición farmacéutica que contiene cloruro de (2R)-DOTAP enantioméricamente puro según la reivindicación 3, caracterizada porque la misma presenta liposomas, lipoplexos, nanopartículas o microemulsiones.

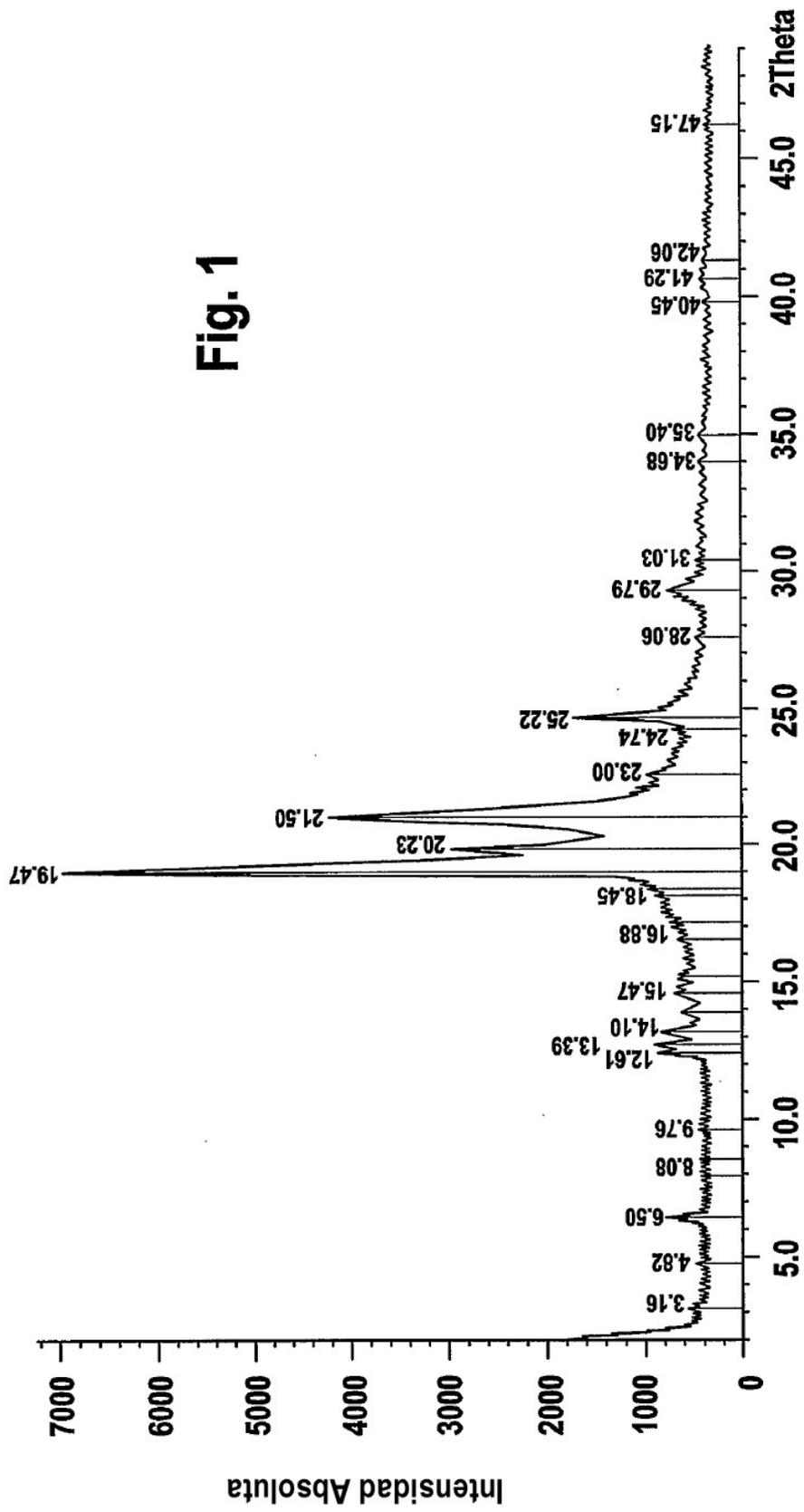
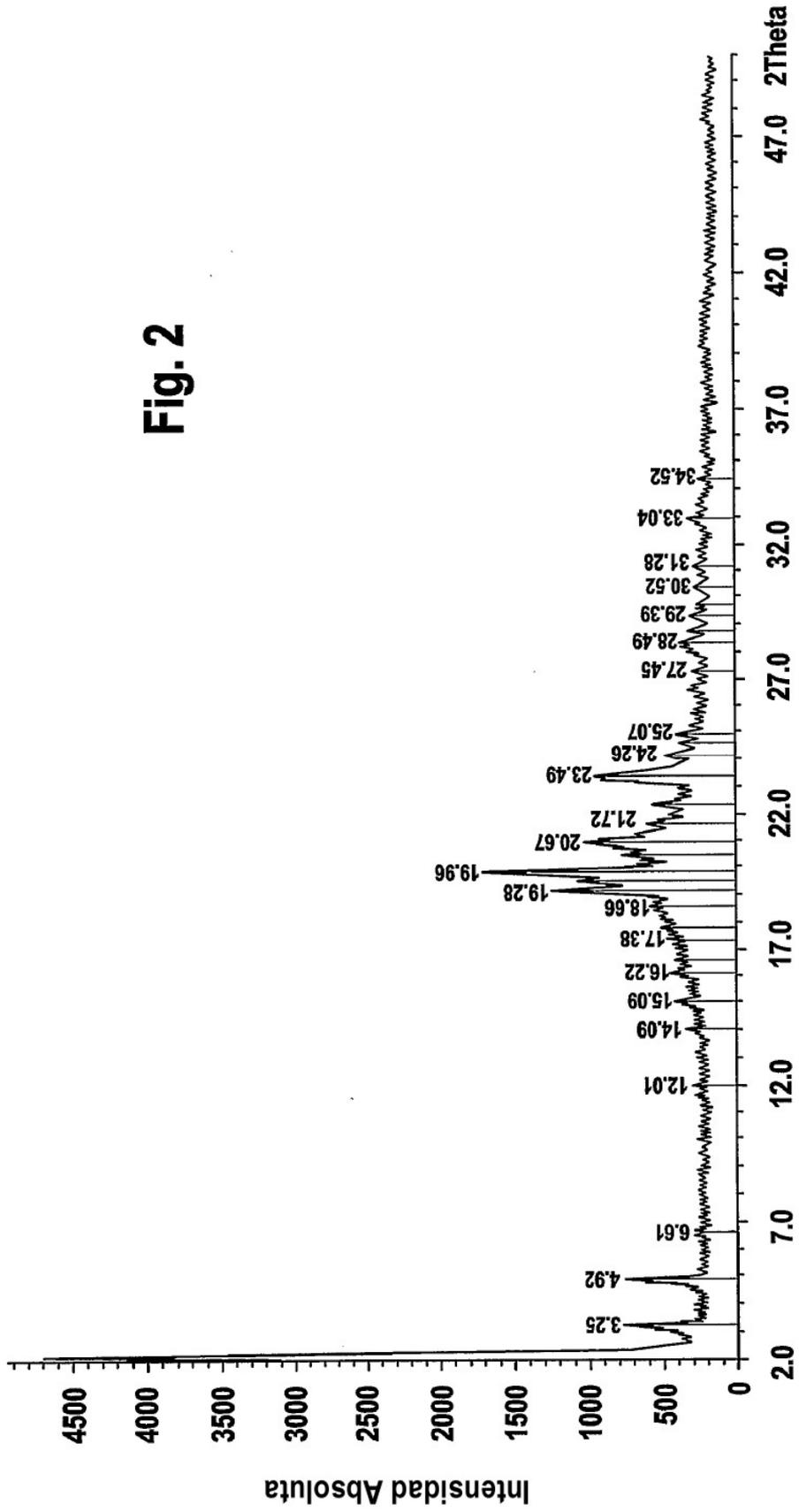


Fig. 2



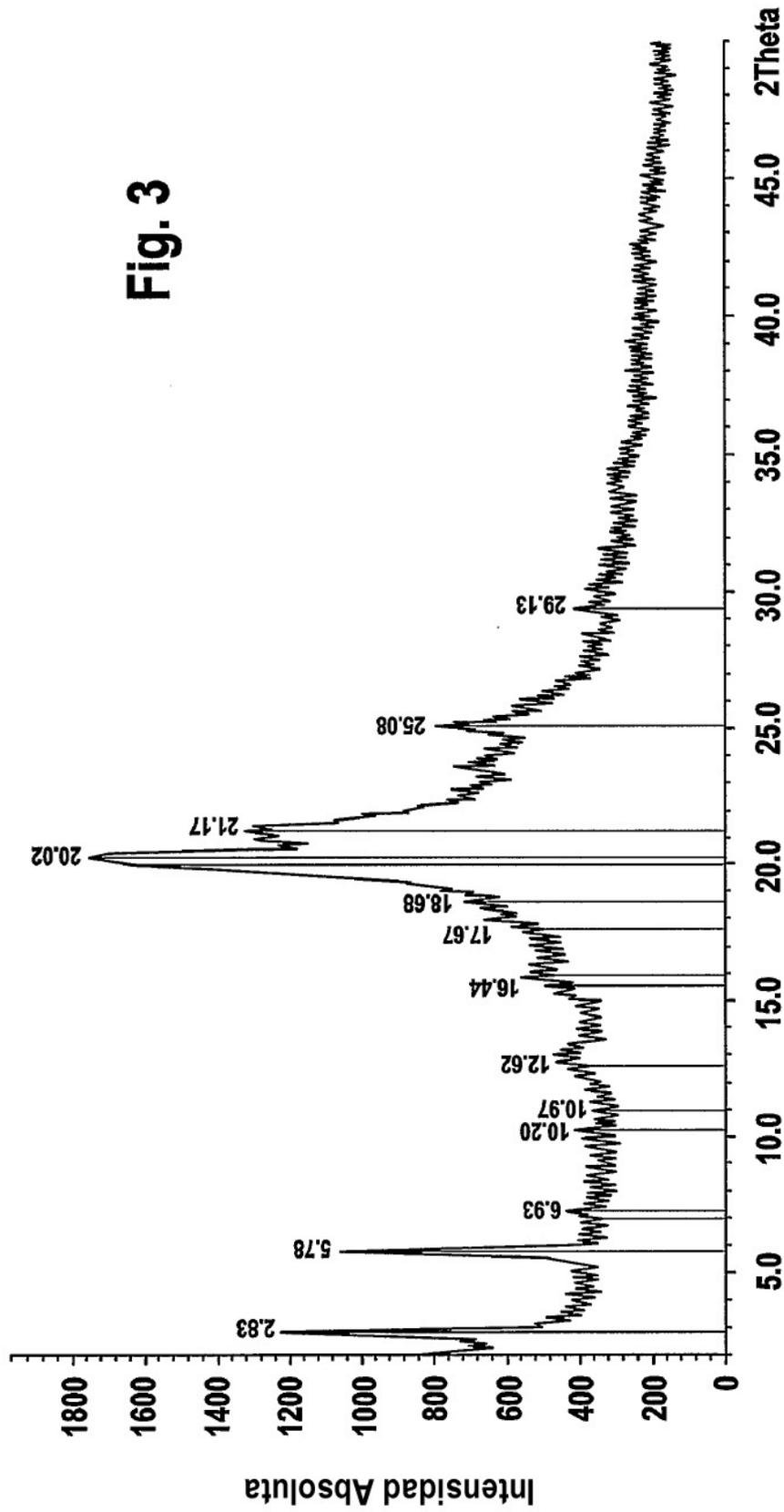
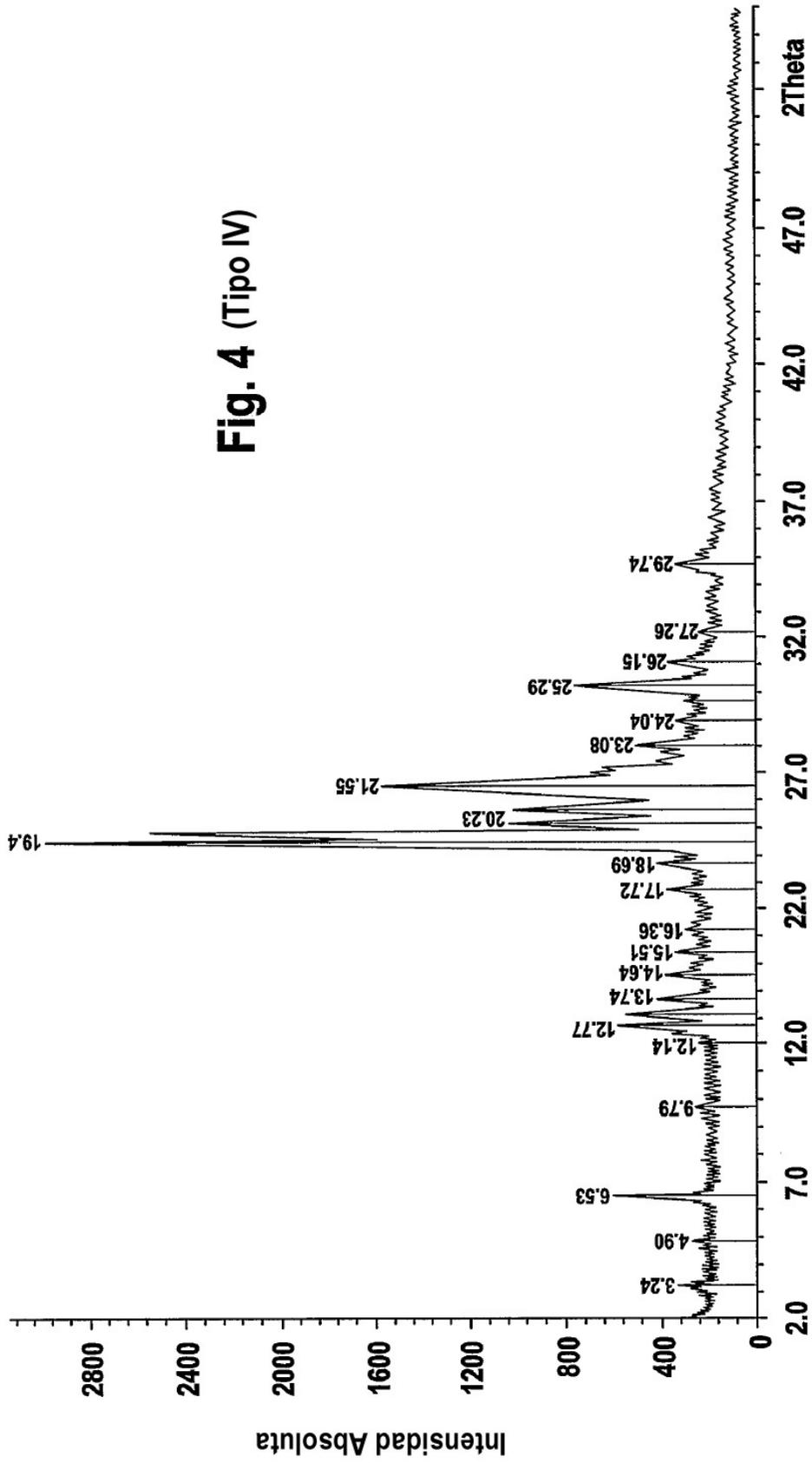
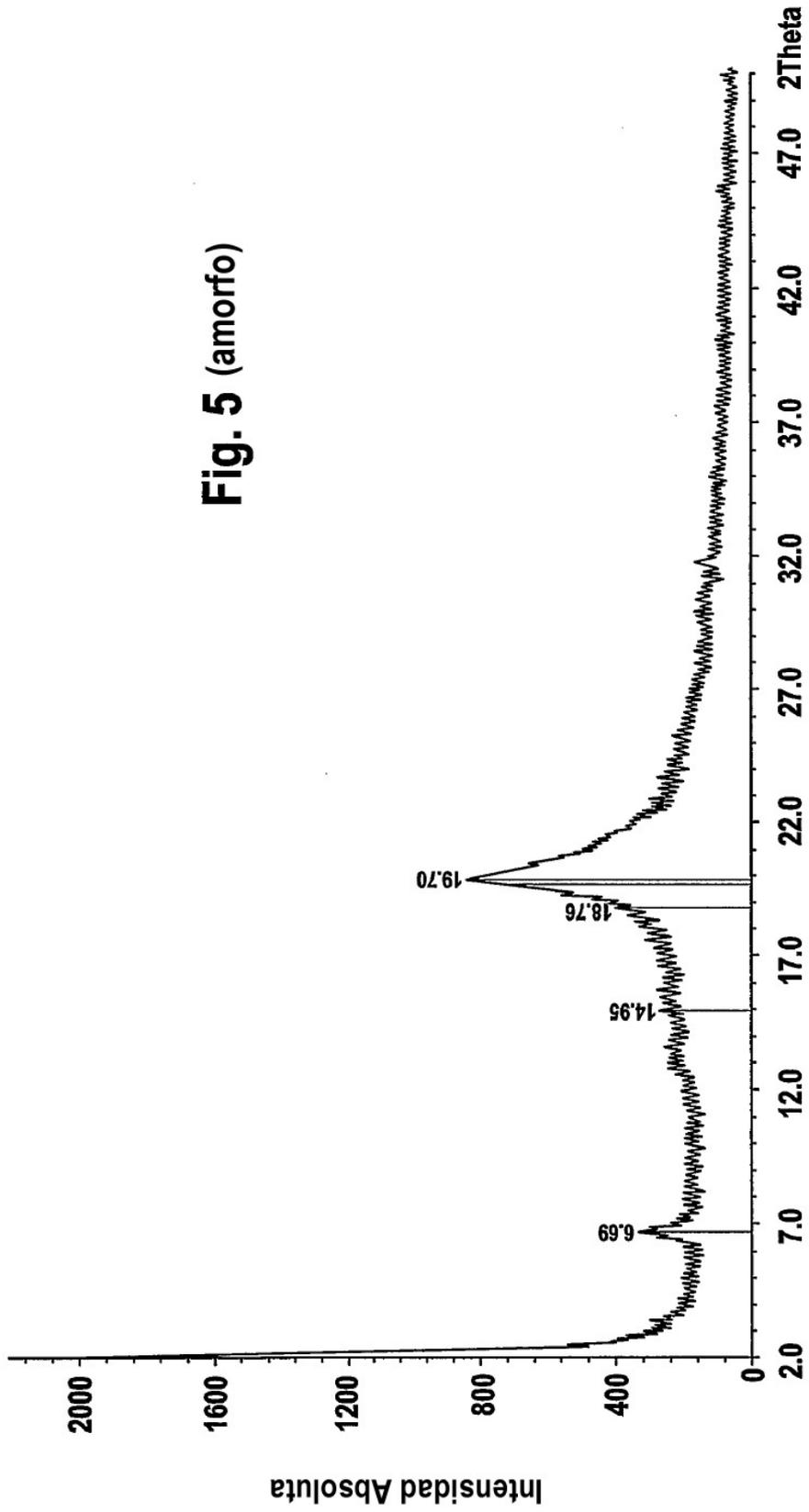
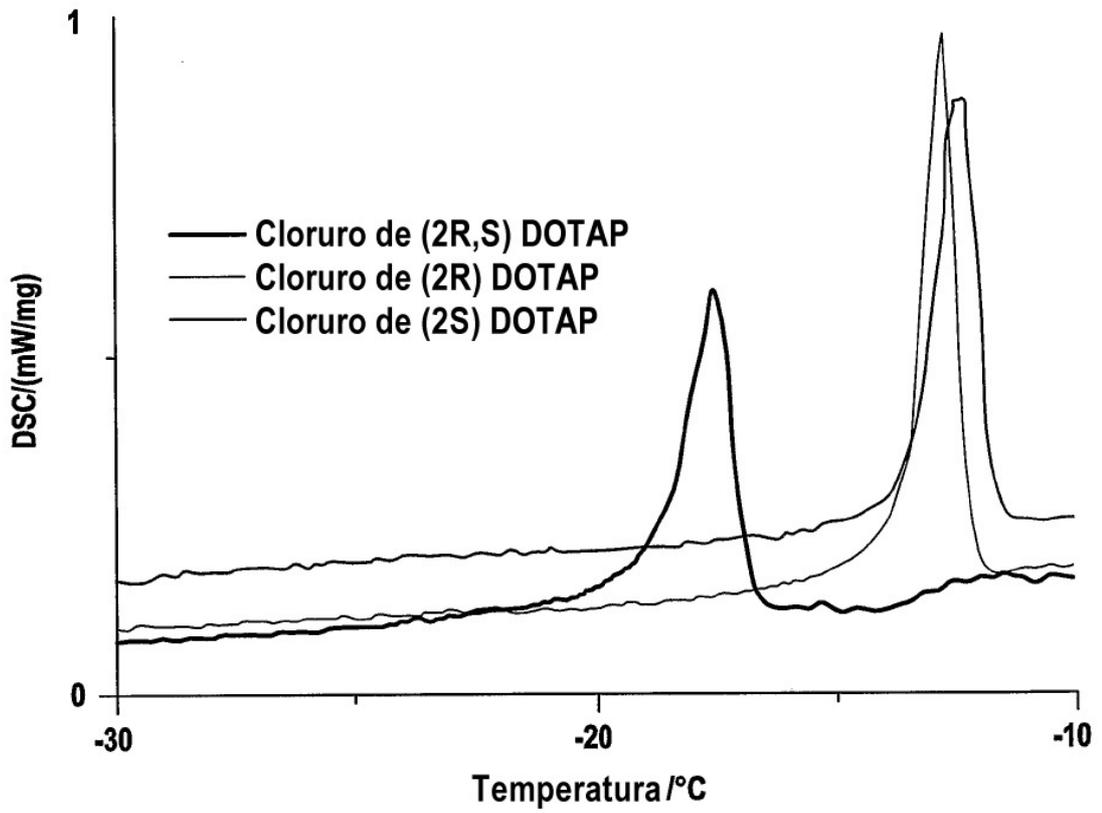


Fig. 4 (Tipo IV)



**Fig. 5 (amorfo)**





**Fig. 6**  
 (Temperaturas  
 de transición  
 de fases principal)

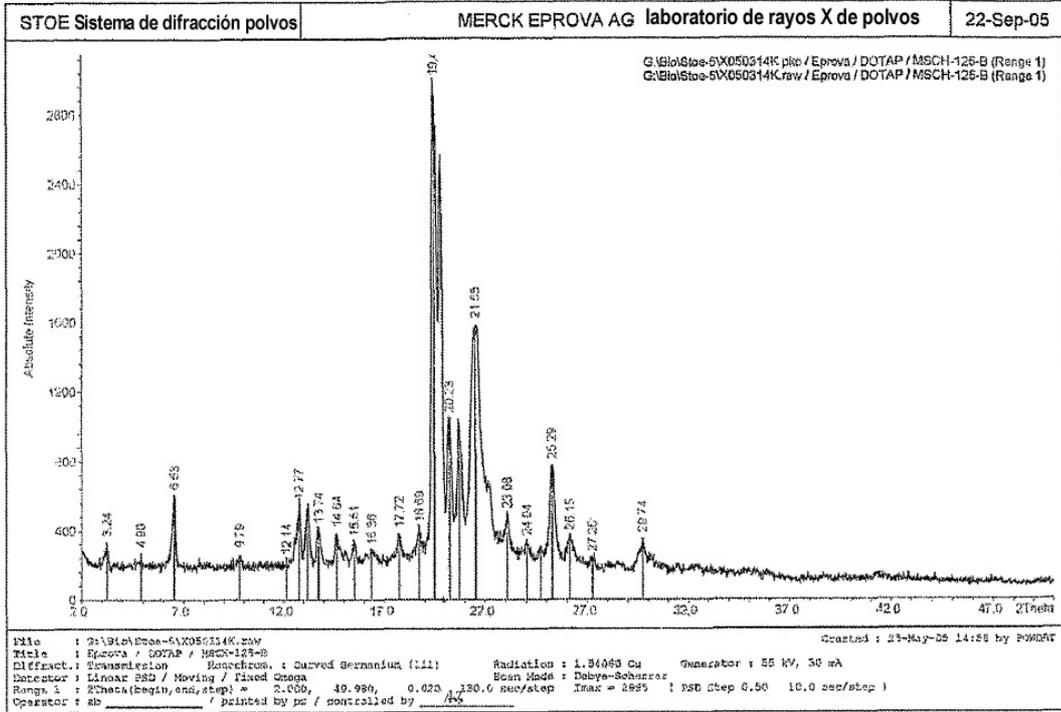
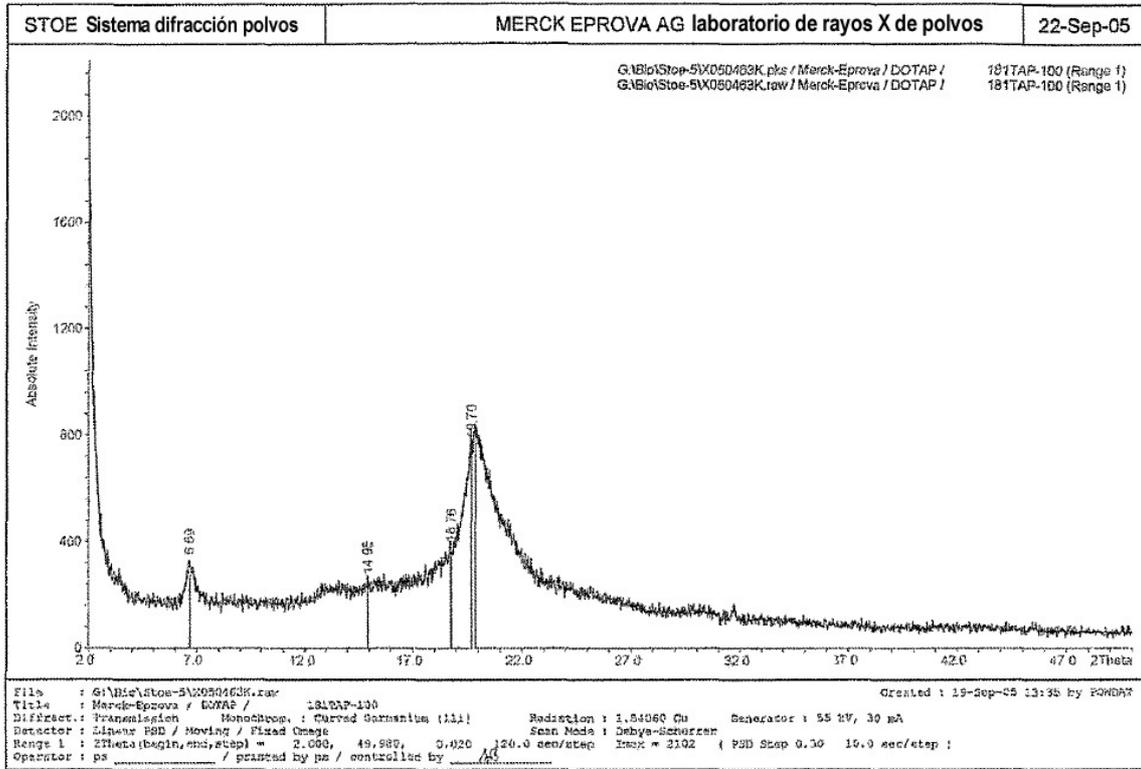


Ilustración 4: (Tipo IV)



**Ilustración 5: (amorfo)**

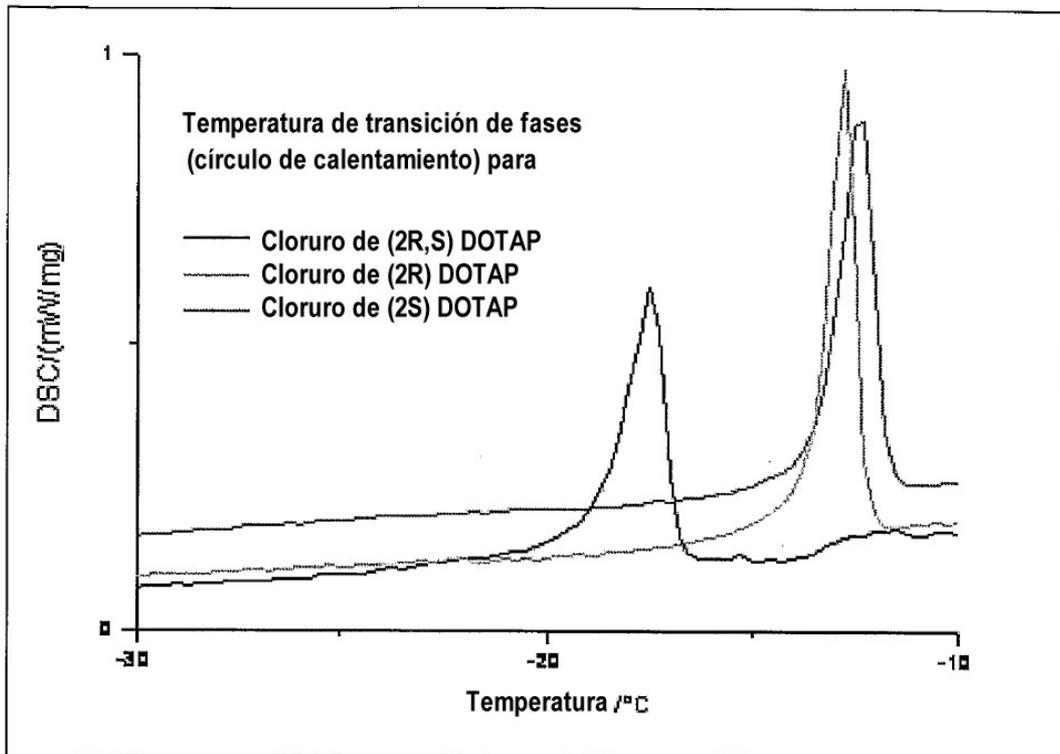


Ilustración 6: temperaturas de transición de fases principal