

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 526**

51 Int. Cl.:  
**C07C 219/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012 PCT/EP2012/001882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12159704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012 E 12719274 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2709981**

54 Título: **Preparación de modificaciones cristalinas estables de cloruro de DOTAP**

30 Prioridad:  
**20.05.2011 US 201161488428 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.10.2019**

73 Titular/es:  
**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:  
**PLATSCHER, MICHAEL WILHELM y  
HEDINGER, ALFRED**

74 Agente/Representante:  
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 726 526 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).

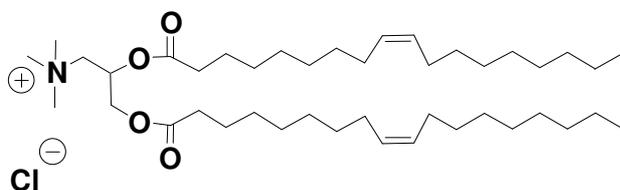
## DESCRIPCIÓN

Preparación de modificaciones cristalinas estables de cloruro de DOTAP

La presente invención se refiere a un proceso para preparar modificaciones cristalinas de cloruro de DOTAP racémico y enantioméricamente puro.

- 5 Las formas cristalinas de cloruro de DOTAP y sus correspondientes composiciones farmacéuticas tienen los mismos usos bien conocidos que los de las formas no cristalinas de cloruro de DOTAP.

10 Cloruro de DOTAP anteriormente y a continuación indica formas (2R,S) racémicas o (2R) resp. (2S) isoméricamente puras de cloruro de N,N,N-trimetil-2,3-bis[[(9Z)-1-oxo-9-octadecenil]oxi]-1-propanaminio, también conocido como 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-trimetilamonio propano y sus hidratos.



$C_{42}H_{80}ClNO_4$ ,  $P_M 698,54$

Números de registro CAS: 132172-61-3 y 477274-39-8 (racemato),

197974-73-58 (racemato, monohidrato)

- 15 428506-51-8 (forma 2S), 328250-28-8 (forma 2R)

DOTAP puede, entre otras estructuras, formar parte de los liposomas y de otros agregados vesiculares lipídicos. Los liposomas son vesículas sintéticas con múltiples capas (membranas esféricamente autocontenidas) que comprenden sustancias anfifílicas, normalmente lípidos naturales, en cuyo interior acuoso pueden encapsularse sustancias hidrófilas, y también pueden incorporarse sustancias lipofílicas dentro de la membrana lipídica.

- 20 Se emplean en particular en productos cosméticos y en medicina, especialmente en dermatología. Aquí se embeben especialmente vitaminas, coenzimas, agentes para el cuidado de la piel y protectores solares. Los liposomas se aplican generalmente por vía tópica.

25 Adicionalmente, los liposomas están adquiriendo cada vez más importancia en la tecnología farmacéutica, ya que la aplicación parenteral de liposomas permite lograr una distribución en órganos más específica que si los compuestos activos se usan en forma disuelta libremente.

Si se incorporan ADN, ARN o proteínas a los liposomas y a otros agregados vesiculares lipídicos, se obtienen lipoplejos.

- 30 La adición de aceites y el uso de homogeneizadores de alta presión permiten la formación de las denominadas nanopartículas (nanopartes) que aparecen a partir de forzar a los liposomas. Estas son partículas de aproximadamente el mismo tamaño que los liposomas, pero que no tienen una fase acuosa, sino que es su lugar tiene una fase oleosa en su interior. Son especialmente adecuadas para la encapsulación de sustancias lipofílicas.

Las microemulsiones son sistemas coloidalmente dispersos de fase única que comprenden componentes acuosos, similares a lípidos y tensioactivos. Tienen un tamaño de partículas de 1-500 nm y se comportan de manera similar a los líquidos.

- 35 Especialmente en conexión con compuestos peptídicos activos, nucleótidos, vacunas y otros biofármacos, que normalmente presentan una mala solubilidad, el efecto solubilizante tiene una enorme importancia en el caso de las aplicaciones que se describen a continuación.

Además, la degradación de los compuestos activos en el organismo puede ser más lenta y de esta manera se consigue un efecto de liberación mantenida.

5 El cloruro de DOTAP pertenece a la clase de lípidos catiónicos. Al contrario de lo que ocurre naturalmente con los fosfolípidos, estos no tienen carácter de ion dipolar. Los liposomas que comprenden lípidos catiónicos, solos o combinados con fosfolípidos u otros compuestos similares a lípidos, tienen una superficie con carga positiva. Esto da lugar a una alta afinidad por células cuya superficie está cargada negativamente en su exterior, por ejemplo, las células endoteliales.

10 No obstante, es especialmente importante la capacidad de los liposomas y lipoplejos a base de DOTAP y de otros de tipo catiónico para penetrar en las células y, por tanto, transportar al interior de la célula (transfección) compuestos activos incorporados en su interior.

Todas estas propiedades hacen que el cloruro de DOTAP sea muy interesante también para terapia antineoplásica. Estas propiedades dan lugar a la posibilidad de aplicar fármacos citostáticos convencionales incorporados a liposomas de DOTAP catiónicos.

15 Las propiedades de transfección del cloruro de DOTAP y de otras sales de DOTAP, como por ejemplo, acetato, bromuro, dihidrogenofosfato, hidrogenosulfato, yoduro, mesilato, metilsulfato, trifluoroacetato, sulfato o disulfato y triflato, se conocen adecuadamente a partir de la literatura.

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

20 No obstante, utilizado *in vivo*, el intercambio aniónico en la superficie del liposoma tiene lugar en el organismo vivo, lo que significa que aquí no se observan las ventajas de otras sales. Especialmente en su uso médico en humanos, en particular para su aplicación parenteral, se prefieren las sales de DOTAP con aniones fisiológicamente aceptables, como por ejemplo, el cloruro o el acetato correspondiente.

25 Las aplicaciones médicas, especialmente parenterales, conllevan las más altas demandas de calidad y pureza de los compuestos activos y los adyuvantes utilizados. Por tanto, existen regulaciones muy estrictas por parte de las autoridades con respecto a la preparación, reproducibilidad de la preparación y perfil de subproductos de estos compuestos. En el caso de sustancias utilizadas por vía parenteral, además debe evitarse y controlarse estrictamente la contaminación microbiológica por microorganismos patógenos y endotoxinas.

30 Las formas amorfas disponibles actualmente de cloruro de DOTAP y de otras sales de DOTAP son extremadamente inestables y, por tanto, son difíciles *per se* de preparar con una pureza aceptable de modo que sean útiles para su uso en la preparación de una formulación de medicamento.

Al igual que todos los lípidos portadores de radicales de ácido oleico, como por ejemplo, los fosfolípidos naturales DOPC y DOPE, todas las sales de DOTAP son muy sensibles a la oxidación y los productos de oxidación de derivados de ácidos grasos insaturados tienen, en general, alta toxicidad.

35 Aquí se requieren métodos de preparación, purificación y estabilización adecuados. Por ejemplo, el acetato de DOTAP está en forma de un aceite de alto punto de ebullición y a nivel industrial puede, por tanto, obtenerse solo con gran dificultad con la calidad adecuada.

40 Los métodos convencionales para superar la inestabilidad, como por ejemplo, la adición de antioxidantes en forma de ácido ascórbico o L-glutatión reducido, limitan en gran medida la capacidad de uso general del cloruro de DOTAP, ya que no pueden excluirse interacciones con los compuestos activos que se incorporan más adelante. La exclusión completa de oxígeno durante la preparación, almacenamiento y uso es virtualmente imposible o solo puede facilitarse con un esfuerzo muy grande.

El cloruro de DOTAP está disponible en el mercado como una solución en cloroformo o como un sólido amorfo.

45 Además de su sensibilidad a la oxidación, el cloruro de DOTAP amorfo es también extremadamente higroscópico y se licúa con facilidad en un tiempo extremadamente corto a niveles normales de humedad atmosférica para proporcionar una película oleosa. Esto hace que sea mucho más difícil la manipulación de este compuesto.

Técnicamente, cualquier manipulación de las formas amorfas de cloruro de DOTAP disponibles en la actualidad es, por tanto, solo posible con medidas de protección energéticas. De este modo, el fabricante de cloruro de DOTAP amorfo generalmente recomienda su conservación con un gas protector a -20 °C y solo se garantiza una semivida de aproximadamente 6 meses.

Eibel y Unger, en el documento DE4013632A1, describen la síntesis de cloruro de (2R,S)-DOTAP a partir de bromuro de DOTAP mediante intercambio iónico en el sistema de solventes cloroformo/metanol/HCl acuoso seguido de purificación mediante cromatografía. El bromuro de DOTAP se obtiene con antelación *in situ* a partir de 1-bromo-2,3-dioleoiloxipropano.

5 Leventis y Silvius, *Biochim. Biophys. Acta*, 1023 (1990) 124-132, publican la síntesis de cloruro de (2R,S)-DOTAP a partir de yoduro de DOTAP mediante intercambio iónico en el sistema de dos fases solvente/solución de NaCl. El yoduro de DOTAP se obtiene con antelación mediante metilación del correspondiente compuesto dimetilamino mediante yoduro de metilo.

10 Nantz y cols., *Biochim. Biophys. Acta*, 1299 (1996) 281-283, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 4069-4078, describen la síntesis de cloruro de (2R,S)-DOTAP mediante cromatografía de intercambio iónico no acuosa. El compuesto deseado se obtiene mediante evaporación del eluido.

15 Felgner y cols., en el documento US 5 264 618, llevaron a cabo la metilación del compuesto dimetilamino correspondiente para obtener directamente el cloruro de (2R,S)-DOTAP mediante cloruro de metilo. Aparentemente obtuvieron una cera amarilla mediante cristalización a partir de acetonitrilo a -20 °C. Sin embargo, el cloruro de (2R,S)-DOTAP es prácticamente insoluble en acetonitrilo a temperatura ambiente. Los intentos por reproducir esta denominada cristalización proporcionaron solo material amorfo mediante la solidificación de la sustancia oleosa obtenida a partir de una solución caliente mediante enfriamiento. El hecho de que no sea una cristalización es también evidente debido al hecho de que los autores aparentemente no consiguen un efecto de purificación y tienen que purificar la sustancia mediante cromatografía. Véanse también los ejemplos comparativos que demuestran que Felgner y cols. no consiguen cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino.

En particular, si se pretende que los compuestas sean para uso parenteral, una preparación que incluye tratamiento con una resina de intercambio iónico es extremadamente problemática debido a una posible contaminación microbiológica, ya que las resinas correspondientes son un medio nutritivo ideal para las bacterias e incluso después de haber sido eliminadas, aún existe riesgo de contaminación por endotoxinas.

25 En el documento WO 2006/056312 A1 se describe el cloruro de DOTAP enantioméricamente puro. No se describe un proceso detallado para su cristalización.

30 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar sales e hidratos de cloruro de DOTAP cristalino altamente puros y con la estabilidad química y física adecuada. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar estas sales cristalinas con semividas largas, que permitan que se puedan utilizar para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Sigue existiendo una gran demanda de un proceso reproducible para la preparación de formas estables de sales e hidratos de cloruro de DOTAP que puedan llevarse a cabo a escala industrial.

35 El cloruro de DOTAP enantioméricamente puro puede obtenerse a partir de materiales de partida enantioméricamente puros de manera análoga a los procesos descritos para el racemato, es decir, a través de (R)- o (S)-1-cloro-2,3-dioleoiloxipropano, a través de (R) o (S)-1-GS-2,3-dioleoiloxipropano e intercambio iónico (GS = grupo saliente) o a través de (R)- o (S)-1-dimetilamino-2,3-dioleoiloxipropano. Consulte el documento WO 2006/056 312.

Un método de preparación adicional que puede mencionarse es la resolución de racematos del cloruro de DOTAP racémico.

40 Mediante experimentación, se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que puede obtenerse cloruro de DOTAP cristalino tanto racémico como enantioméricamente puro de manera sencilla con alta pureza química, excelente estabilidad y propiedades de manipulación adecuadas para manejar estos compuestos a mayor escala técnica. Los productos cristalinos obtenidos de este modo tienen una estabilidad prácticamente ilimitada a temperatura ambiente con un gas protector. Por tanto, son adecuados como constituyentes o materiales de partida para la preparación de medicamentos.

45 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un proceso para preparar modificaciones cristalinas estables de cloruro de DOTAP racémico y enantioméricamente puro.

50 Las modificaciones cristalinas estables pueden estar en forma cristalina y parcialmente cristalina. Estas tienen una pureza no lograda hasta el momento de al menos aproximadamente el 95 %, preferiblemente >98 %. Adicionalmente, se ha encontrado que el cloruro de (2R,S)-DOTAP tiene una estabilidad no alcanzada hasta el momento del 99 % en peso y % de área determinado mediante HPLC en relación con el valor inicial cuando se conserva a 25 °C durante 36 meses o a 40 °C durante 12 meses (véanse a este respecto la tabla 1 y la tabla 1a).

- 5 Un experto en la materia puede establecer fácilmente un método de HPLC adecuado para determinar la pureza y el contenido del cloruro de DOTAP. Por ejemplo, puede usarse un equipo de HPLC Agilent 1200 con una columna Inertsil ODS-3 (150 x 3 mm, 3 µm) (GI Sciences). Los eluyentes típicos son la sal sódica del ácido pentanosulfónico 10 mM en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> acuoso (0,085 %) (eluyente A) y la sal sódica del ácido pentanosulfónico 3,85 mM en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> acuoso (0,085 %) (eluyente B) que contiene acetonitrilo al 94 %. Un gradiente adecuado es el siguiente (tiempo de funcionamiento 25 min; tiempo posterior 5 min; flujo: 1,5 ml/min; 220 bares; 50 °C, volumen de inyección 10 µl):

	tiempo	Eluyente B	Eluyente A
gradiente	0 min	75 %	25 %
	1 min	75 %	25 %
	6 min	90 %	10 %
	7 min	100 %	0 %
	20 min	100 %	0 %
	25 min	75 %	25 %
tiempo posterior	5 min	75 %	25 %

Las modificaciones cristalinas del cloruro de DOTAP tienen un contenido de menos de 1 equivalente de agua o solvente de cristalización por equivalente de cloruro de DOTAP.

- 10 (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP cristalinos muestran unas propiedades de manipulación excelentes y altamente deseables como su notable reducción de la higroscopicidad y muy buenas capacidades de fluido libre.

(2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP cristalinos tienen un punto de fusión por encima de 160 °C, especialmente entre 183 y 185 °C, y una entalpía de fusión de al menos -130 J/g, preferiblemente por encima de -140 J/g, especialmente entre -143 y -159 J/g (véase a este respecto la tabla 3).

- 15 Las modificaciones cristalinas del cloruro de (2R,S)-DOTAP racémico muestran bandas moderadamente definidas en las medidas por difracción de rayos-X en polvo (véanse a este respecto la figura 1 y la tabla 2). Los valores de 2-theta para la modificación cristalina son aproximadamente 6,5; 12,6; 13,4; 19,5; 20,2; 21,5; 25,2 y 29,8, donde los valores de 2-theta seleccionados son aproximadamente 12,6; 19,5; 20,2; 21,5 y 25,2. Las formas cristalinas de cloruro de (2R,S)-DOTAP correspondientes al patrón de difracción de rayos X en polvo mostradas en la figura 1, están dentro del alcance de la invención.

- 20 Los cloruros de (2S)-DOTAP enantioméricamente puros se obtienen probablemente en forma cristalina. Los valores de 2-theta para la modificación cristalina son aproximadamente 6,5; 12,8; 19,5; 19,8; 20,2; 20,7; 21,6 y 25,3, donde los valores de 2-theta seleccionados son aproximadamente 12,8; 19,5; 19,8; 20,2 y 21,6 (véanse la fig. 2 y la tabla 2). Las formas cristalinas de cloruro de (2S)-DOTAP correspondientes al patrón de difracción de rayos X en polvo mostradas en la figura 2 están dentro del alcance de la invención.

- 25 Los cloruros de (2R)-DOTAP enantioméricamente puros se obtienen probablemente en forma cristalina. Los valores de 2-theta para la modificación cristalina son aproximadamente 6,6; 12,8; 19,5; 19,8; 20,3; 20,8; 21,6 y 25,3, donde los valores de 2-theta seleccionados son aproximadamente 12,8; 19,5; 19,8; 20,3 y 21,6 (véanse la fig. 3 y la tabla 2). Las formas cristalinas de cloruro de (2R)-DOTAP correspondientes al patrón de difracción de rayos X en polvo mostradas en la figura 3, están dentro del alcance de la invención.

- 30 La invención se refiere a un proceso para la preparación de modificaciones cristalinas de cloruro de (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP que se caracterizan porque el cloruro de (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP se cristaliza a partir de un medio aprótico. El medio aprótico utilizado para este fin es un solvente aprótico, o una mezcla de solventes apróticos, o una mezcla de uno o más solventes apróticos con un solvente prótico o una mezcla de solventes próticos.

Los solventes apróticos adecuados son solventes apróticos que contienen oxígeno, en particular,

éteres, como por ejemplo, tetrahidrofurano, metiltetrahidrofurano, dioxano, éter dietílico, éter dipropílico, éter diisopropílico y éter metil *terc*-butílico,

cetonas, como por ejemplo, acetona y 2-butanona, metil isobutilcetona, metil isopropilcetona y

ésteres, como por ejemplo, formato de etilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, dimetilcarbonato, dietilcarbonato y 1,3-dioxolidin-2-ona.

5 Los solventes apróticos preferidos son las cetonas.

Los solventes próticos adecuados son, en particular,

alcoholes, como por ejemplo, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, 2-butanol, *terc*-butanol, 3-metil-1-butanol y etilenglicol, metoxietanol, etoxietanol.

10 Si el medio aprótico es una mezcla de uno o más solventes apróticos con un solvente prótico entonces el solvente aprótico puede ser un solvente aprótico que contiene oxígeno como se definió anteriormente o un

nitrilo, como por ejemplo, acetonitrilo.

Los solventes pueden en cada caso utilizarse en forma pura o en forma de mezcla, es decir, es posible tanto usar los diversos solventes apróticos de un grupo en forma de mezcla como emplear tipos de solventes apróticos en forma de mezcla entre ellos.

15 Si el medio aprótico es una mezcla de uno o más solventes apróticos con un solvente prótico, entonces los solventes próticos pueden estar presentes en una cantidad mayor del 0 al 40 % en peso, preferiblemente del 10 al 20 % en peso, dependiendo de las condiciones aplicadas, la pureza de las materias primas y el objetivo del proceso (rendimiento, pureza del producto, grado de cristalinidad). Preferiblemente, debería emplearse un medio aprótico que contenga muy bajas cantidades de agua. En una realización especialmente preferida se excluye el agua.

20 En una realización preferida de la invención se utiliza acetona o 2-propanol como medio aprótico. En una realización muy preferida se emplea una mezcla de acetona y 2-propanol. Típicamente, una mezcla de 2-propanol y acetona comprende del 0 al 25 % de 2-propanol.

25 La cristalización de los cloruros de DOTAP puede llevarse a cabo aquí directamente a partir de la solución de reacción sin purificación previa. Del mismo modo, el cloruro de DOTAP cristalino puede obtenerse mediante recristalización de material amorfo, parcialmente cristalino o cristalino.

30 En una realización preferida, los cloruros de DOTAP utilizados para preparar formas cristalinas de los mismos, son de alta pureza química y óptica, preferiblemente con una pureza de aproximadamente  $\geq 95$  % o superior, más preferiblemente de aproximadamente el 98 % o superior, incluso más preferiblemente de aproximadamente el 99 % o superior. A este respecto, la preparación de cloruros de DOTAP cristalinos en este documento utiliza ácido oleico muy puro como reactivo, lo que lleva a la obtención de cloruros de DOTAP altamente puros que cristalizan más fácilmente que los cloruros de DOTAP de menor pureza disponibles previamente. Entre las principales impurezas típicas de los cloruros de DOTAP disponibles en la actualidad se incluyen, pero sin limitaciones, otros lípidos o sus derivados. La pureza según la Farmacopea Europea (PhEUR) actual (siendo por tanto, «calidad farmacéutica») del ácido oleico sigue siendo a día de hoy solo de aproximadamente del 65 al 88 %. En este documento, por ácido oleico muy puro se entiende una calidad ultrapura de aproximadamente el 95 % o superior, preferiblemente de aproximadamente el 99 % o superior. Un ácido oleico muy puro adecuado puede, por ejemplo, obtenerse comercialmente de RCA (n.º de lote OA 11.G.01.2007) o de Acme Synthetic Chemicals (n.º de lote 060528).

La pureza enantiomérica puede, por ejemplo, determinarse mediante la determinación de la rotación óptica.

40 En una realización preferida, los cloruros de DOTAP utilizados para preparar formas cristalinas de los mismos se cristalizan o recristalizan a partir de mezclas con solventes adecuados dentro de los intervalos de concentración de 1 parte de cloruro de DOTAP por cada 4 partes de solvente hasta 1 parte de cloruro de DOTAP por cada 100 partes de solvente, más preferiblemente dentro de los intervalos de concentración de 1 parte de cloruro de DOTAP por cada 4 partes de solvente hasta 1 parte de cloruro de DOTAP por cada 10 partes de solvente.

45 La cristalización de las modificaciones del cloruro de DOTAP se consigue en general específicamente mediante enfriamiento lento de la solución preparada a una velocidad de 0,001 a 0,1 °C por minuto, por ejemplo, de 0,05 °C por minuto o 0,004 °C por minuto, lo que lleva a tiempos de enfriamiento de aproximadamente 10 a 50 horas. El *modus operandi* según la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas es calentar la solución a 35 °C y, a continuación, enfriar lentamente hasta -12 °C durante un periodo de 12 horas, o calentar la solución a temperaturas más bajas, por ejemplo, 25 °C, o empezar a partir de temperatura ambiente sin calentar y, a

continuación, enfriar lentamente de 10 a 50 horas, hasta -12 °C. La formación de los cristales se lleva a cabo de manera espontánea o mediante inoculación de la correspondiente modificación cristalina de cloruro de DOTAP.

El enfriamiento lento puede ejecutarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Típicamente se utiliza un criostato.

5 Como se mencionó previamente, todas las sales de DOTAP son más sensibles a la oxidación y, por tanto, se prefiere la exclusión del oxígeno durante los métodos de preparación descritos en este documento, por ejemplo, empleando una atmósfera inerte, por ejemplo, atmósfera de nitrógeno y/o usando solventes con un bajo contenido de oxígeno y peróxido.

10 El uso de cloruro de DOTAP amorfo o parcialmente cristalino como material de partida para la recristalización proporciona, mediante el proceso descrito, esencialmente cloruros de DOTAP cristalinos de una pureza nunca alcanzada hasta ahora, junto con una estabilidad tampoco alcanzada hasta ahora.

15 Pueden utilizarse cloruros de (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP cristalinos para la preparación de formulaciones de medicamentos ya que los cloruros de (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP cristalinos tienen una estabilidad excelente en forma sólida en las condiciones establecidas y tienen una calidad constante y muy buena durante un tiempo prácticamente ilimitado.

20 Adicionalmente son posibles también composiciones farmacéuticas resultado del uso de las formas de cloruros de (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP cristalinos. Las composiciones farmacéuticas de este tipo pueden comprender las modificaciones cristalinas de cloruros de (2R)-, (2S)- y (2R,S)-DOTAP junto con otros compuestos farmacéuticamente activos y adyuvantes conocidos empleados normalmente en la preparación de medicamentos, así como uno o más solventes.

Estas composiciones farmacéuticas pueden, por ejemplo, estar en forma de liposomas, lipoplejos, microemulsiones y nanopartículas e incluyen, por ejemplo, un principio activo del grupo de los péptidos, nucleótidos, vacunas o agentes citostáticos.

25 La presente descripción permite al experto en la materia aplicar la invención de manera exhaustiva. Además, los siguientes ejemplos sirven para entender mejor e ilustrar las posibles variantes de la invención. Por tanto, estos ejemplos no deberían ser de ningún modo restrictivos.

Todas las temperaturas mencionadas en los siguientes ejemplos están indicadas en grados centígrados. Siempre que no se indique otra cosa, los datos contenidos se proporcionan como % en peso.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 En la figura 1 se muestra el espectro de difracción de rayos X del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino.

En la figura 2 se muestra el espectro de difracción de rayos X del cloruro de (2S)-DOTAP cristalino.

En la figura 3 se muestra el espectro de difracción de rayos X del cloruro de (2R)-DOTAP cristalino.

En la figura 4 se muestra el espectro de difracción de rayos X del cloruro de (2R,S)-DOTAP amorfo.

35 En la figura 5 se muestran los espectros de difracción de rayos X del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino (a), cloruro de (2R)-DOTAP cristalino (b) y cloruro de (2S)-DOTAP cristalino (c) en comparación con una muestra comercial de cloruro de (2R,S)-DOTAP (Avanti Polar Lipids) (d).

En la figura 6 se muestra una emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0318-E) en acetonitrilo cuando se enfría como se describe en Felgner y cols.

40 En la figura 7 se muestra una emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0318-E) en acetonitrilo tras su enfriamiento hasta -20 °C como se describe en Felgner y cols.

En la figura 8 se muestra una emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0364-E) en acetonitrilo antes de su enfriamiento como se describe en Felgner y cols.

En la figura 9 se muestra una emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0364-E) en acetonitrilo tras su enfriamiento hasta -20°C como se describe en Felgner y cols.

En la figura 10 se muestra el cloruro (2R,S)-DOTAP cristalino racémico.

En la figura 11 se muestran las temperaturas de la fase de transición y los puntos de fusión del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino puro y del cloruro de (2R)-DOTAP puro cristalino, así como de dos mezclas de ambas formas cristalinas.

- 5 En la figura 12 se muestran las curvas de absorción dinámica de vapor (DVS) para el cloruro de (2R,S)-DOTAP (superior) y cloruro de (2R)-DOTAP (inferior); formas amorfas: diagramas de la derecha; formas cristalinas (diagramas de la izquierda) (véase el ejemplo de caracterización 5).

### Ejemplos para ilustrar la invención

#### Observaciones generales sobre las condiciones experimentales:

- 10 Es importante enfriar muy lentamente durante la cristalización y la recristalización para optimizar la precipitación del material cristalino.

Todos los reactivos y solventes comprenden muy bajo contenido en agua.

Todas las operaciones se llevaron a cabo en un aparato cerrado bajo atmósfera de nitrógeno.

- 15 Se usa un ácido oleico muy puro con una pureza de más del 95 %, preferiblemente más del 98 %, incluso más preferiblemente más del 99 %.

#### Las mediciones de los parámetros para la difracción de rayos X en polvo son las siguientes:

Difracción de rayos X en polvo STOE

Difracción: transmisión

Monocromador: curvo de Germanio (111)

- 20 Longitud de onda de radiación: 1,54060 Cu

Detector: detector sensible a la posición lineal

Modo de escaneo: Debye-Sherrer / Detector sensible a la posición en movimiento / Omega fijo

- 25 Es frecuente en los estudios de difracción de rayos X en polvo que puedan aparecer ligeras diferencias en las bandas individuales si se utilizan diferentes aparatos o métodos de registro, como reflexión o transmisión, o capilares o ventanas, o si se implantan diferentes condiciones de registro (p. ej., humedad atmosférica o temperatura). Un experto en la materia está muy familiarizado con estas ligeras diferencias y sería capaz de identificar con facilidad un material determinado por una coincidencia cercana con un patrón de difracción de rayos X en polvo determinado considerando la metodología utilizada.

### Ejemplo de preparación 1:

- 30 Preparación de cloruro de (2R,S)-DOTAP racémico cristalino [cloruro de (R,S)-1,2-dioleoil-3-propiltrimetilamonio]:

#### *Materiales de partida*

Se utilizaron los siguientes compuestos químicos:

N,N'-carbonildiimidazol de SIGMA-ALDRICH, n.º de lote 1252812

- 35 Ácido oleico de RCA, n.º de lote OA 11.G.01.2007; % de área del 99,1 (HPLC), donde el ensayo podría ser del 99,5 % o incluso más alto ya que el ácido linoleico (la principal impureza) muestra tasas de respuesta mucho más altas con luz UV que el ácido oleico.

(R,S)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol, de MERCK EPROVA, n.º de lote MSCH-103-A; 0,11 % de agua; 99,4 % (CG)

## ES 2 726 526 T3

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno de SIGMA ALDRICH, n.º de lote 1076841; 99,7 % (CG)

Cloruro de metilo de LINDE, n.º de lote 61448

Yoduro sódico de SIGMA-ALDRICH, n.º de lote 1336385; 0,27 % de agua

Óxido de aluminio de SIGMA-ALDRICH, n.º de lote 1336643

5 Acetonitrilo de ICC, n.º de lote 0000426130; 100,0 % (CG); <0,015 % de agua

n-Heptano de BRENNTAG SCHWEIZERHALL, n.º de lote 0000278245; 96,4 % (CG)

2-Propanol de THOMMEN FURLER, n.º de lote 070920211487; 99,96 % (CG); 0,03 % de agua

Acetona de THOMMEN FURLER, n.º de lote 080609324212; 99,98 % (CG); 0,16 % de agua

### *Síntesis de (2R,S)-DODAP [(R,S)-1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano]*

10 Se disuelven 2,41 kg de N,N'-carbonildiimidazol a temperatura ambiente en 6,33 kg de acetonitrilo seco. La solución resultante se calienta a 25 °C. A continuación se bombean 4,0 kg de ácido oleico dentro de la solución durante un periodo de 60 minutos mientras que la temperatura de reacción se regula por debajo de 35 °C mediante la variación de la velocidad de adición (formación de gas de dióxido de carbono). Tras completar la adición, la solución de reacción se agita durante 90 minutos más a 30 °C (evolución del gas finalizada). A continuación se añaden 11 g de 15 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno seguido de una solución de 0,83 kg de (R,S)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol racémico en 0,37 kg de acetonitrilo seco. La agitación se continúa a 30 °C durante 21 horas. La emulsión resultante se enfría a 25 °C y se detiene la agitación. Aparecen dos capas. La capa inferior se aísla, se degasea a 1 mbar/25 °C durante 200 minutos y, finalmente, se diluye con 11,7 kg de n-heptano. Se añade a la solución 1,21 kg de óxido de aluminio básico y la suspensión se agita durante 3 horas a 0 °C. La suspensión se filtra y el residuo del 20 filtro se lava con 1,5 kg de n-heptano previamente enfriado a 0 °C. Los filtrados combinados se homogeneizan para obtener una solución de 15,9 kg de 4,08 kg de (2R,S)-DODAP puro en n-heptano (n.º de lote MBA-116, ensayo: 25,7 %, rendimiento: 88,9 %).

Se obtiene otro lote del mismo modo que da lugar a una solución de 16,6 kg de 3,52 kg de (2R,S)-DODAP puro en n-heptano (n.º de lote MBA-117; ensayo: 21,2 %, rendimiento: 88,6 %).

### 25 *Síntesis de cloruro de (2R,S)-DOTAP*

Se cargan 23,4 kg de una solución de 3,52 kg de (2R,S)-DODAP puro en n-heptano (15,9 kg de n.º de lote MBA-116 y 7,5 kg de n.º de lote MBA-117) en el recipiente de reacción y el n-heptano se elimina por destilación a una temperatura de camisa de 60 °C y presión reducida. Cuando el vacío permanece estable a 8 mbar la temperatura de camisa se ajusta a 25 °C. A continuación se añaden 7,0 kg de 2-propanol seguido de 3,1 g de yoduro sódico. 30 A continuación se ajusta la temperatura de reacción a 30 °C y la atmósfera de nitrógeno se sustituye por una atmósfera de cloruro de metilo con presión absoluta constante de 1200 mbar. La mezcla de reacción se agita en estas condiciones durante 137 horas hasta que finaliza la reacción de metilación de (2R,S)-DODAP a cloruro de (2R,S)-DOTAP (conversión del 96 %). El consumo de cloruro de metilo es de 1,39 kg.

### *Cristalización de cloruro de (2R,S)-DOTAP*

35 La solución de cloruro de (2R,S)-DOTAP en 2-propanol preparado como se describe anteriormente se diluye con 35,8 kg de acetona seca a 25 °C. La cantidad de 2-propanol, como se indica anteriormente, es de 7 kg y la cantidad de cloruro de DOTAP según los cálculos es de 3,64 kg en la solución. La solución transparente se enfría lentamente hasta -12 °C con una velocidad de enfriamiento de 0,05 °C por minuto, es decir, el enfriamiento se produce durante un periodo de 12½ horas. La suspensión resultante se mantiene a -12 °C durante 14 horas más y, a continuación, 40 se filtra a través de un filtro previamente enfriado (-15 °C). El cloruro de (2R,S)-DOTAP sin procesar se lava dos veces con 6,0 kg de acetona seca fría (-18 °C).

No se comprueba la modificación cristalina obtenida en este punto de este experimento en particular; no obstante, a partir de los experimentos previos correspondientes en los que se aisló el producto sin procesar en este punto, se sabe que la modificación cristalina se corresponde con la de (2R,S)-DOTAP cristalino.

45 Para conseguir un producto incluso más puro, es decir, para eliminar algunas impurezas menores, se realiza un paso de recristalización.

*Recristalización de cloruro de (2R,S)-DOTAP*

El cloruro de (2R,S)-DOTAP húmedo sin procesar se disuelve en el filtro cerrado en una mezcla de 44,1 kg de acetona seca y 3,5 kg de 2-propanol a 35 °C. La solución se transfiere al recipiente de reacción y se lleva a 0 °C. La solución se enfría lentamente hasta -12 °C con una velocidad de enfriamiento de 0,004 °C por minuto, es decir, el enfriamiento se produce durante un periodo de 50 horas. La suspensión resultante se mantiene a -12 °C durante 16 horas más y, a continuación, se filtra con un secador de filtro enfriado (-15 °C). El residuo del filtro se lava dos veces con 0,8 kg de acetona seca en frío (-18 °C) y se seca aplicando vacío. Durante el secado, se deja que el secador de filtro se atempere a temperatura ambiente. El secado se completa cuando el vacío es estable a 7,9 mbar. Rendimiento: 3,46 kg de cloruro de (2R,S)-DOTAP racémico cristalino ((2R,S)-DOTAP cristalino, n.º de lote MBA-118, ensayo: 100,0 %, rendimiento: 37,8 % en ref. a (R,S)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol, pureza en HPLC: 99,9 % del área).

Puede encontrarse una imagen del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino en la figura 10.

**Ejemplo de preparación 2:**

Preparación de cloruro de (2R)-DOTAP cristalino enantioméricamente puro [cloruro de (R)-1,2-dioleoil-3-propiltrimetilamonio]:

*Materiales de partida*

Se utilizaron los siguientes compuestos químicos:

N,N'-carbonildiimidazol de SIGMA-ALDRICH, n.º de lote 1252812

Ácido oleico de ACME SYNTHETIC CHEMICALS, n.º de lote 060528; 97,8 % (HPLC)

(R)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol, de DAISO, n.º de lote RMA062151;

0,11 % de agua; 99,6 % (CG)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno de SIGMA ALDRICH, n.º de lote 1076841; 99,7 % (CG)

Cloruro de metilo de LINDE, n.º de lote 61448

Yoduro sódico de SIGMA-ALDRICH, n.º de lote 1336385; 0,27 % de agua

Acetonitrilo de SIGMA ALDRICH, n.º de lote 7219K; 100,0 % (CG); 0,005 % de agua

n-Heptano de BRENNTAG SCHWEIZERHALL, n.º de lote 0000278245; 96,4 % (CG)

2-Propanol de THOMMEN FURLER, n.º de lote 070629176434; 99,96 % (CG); 0,016 % de agua

Acetona de THOMMEN FURLER, n.º de lote 061201101946; 99,98 % (CG); 0,10 % de agua

*Síntesis de (2R)-DODAP [(R)-1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano]*

Se disuelven 1,63 kg de N,N'-carbonildiimidazol a temperatura ambiente en 4,3 kg de acetonitrilo seco. La solución se calienta a 25 °C. A continuación se bombean 2,7 kg de ácido oleico dentro de la solución durante un periodo de 60 minutos mientras que la temperatura de reacción se regula por debajo de 35 °C mediante la variación de la velocidad de adición (formación de gas de dióxido de carbono). Tras completar la adición, la solución de reacción se agita durante 105 minutos más a 30 °C (evolución del gas finalizada). A continuación se añaden 7,5 g de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno seguido de una solución de 0,56 kg de (R)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol enantioméricamente puro en 0,25 kg de acetonitrilo seco. La agitación se continúa a 30 °C durante 19 horas. La emulsión resultante se enfría hasta 10°C y se detiene la agitación. Aparecen dos capas. La capa inferior se aísla, se degasea a 0,1 mbar/20 °C durante 30 minutos y, finalmente, se diluye con 9,7 kg de n-heptano. La suspensión se agita durante 1,5 horas a 0 °C y se filtra para obtener una solución de 12,3 kg de 2,66 kg de (2R)-DODAP puro en n-heptano (n.º de lote MBR-001, ensayo: 21,6 %, rendimiento: 88,4 %).

*Síntesis de cloruro de (2R)-DOTAP*

5 Se carga una solución de 12,2 kg de 2,66 kg de (2R)-DODAP puro en n-heptano (n.º de lote MBR-001) se carga en el recipiente de reacción y el n-heptano se elimina por destilación a una temperatura de camisa de 60 °C y presión reducida. Cuando el vacío permanece estable a 1 mbar, la temperatura de camisa se ajusta a 20 °C. A continuación se añaden 3,26 kg de 2-propanol seguido de 1,4 g de yoduro sódico. A continuación se ajusta la temperatura de reacción a 30 °C y la atmósfera de nitrógeno se sustituye por una atmósfera de cloruro de metilo con presión absoluta constante de 1250 mbar. La mezcla de reacción se agita en estas condiciones durante 330 horas hasta que finaliza la reacción de metilación de (2R)-DODAP en cloruro de (2R)-DOTAP (conversión del 97 %). El consumo de cloruro de metilo es de 0,58 kg.

#### *Cristalización de cloruro de (2R)-DOTAP*

10 La solución de cloruro de (2R)-DOTAP en 2-propanol preparado como se describe anteriormente se diluye con 16,2 kg de acetona seca a 25 °C. La cantidad de 2-propanol, como se indica anteriormente, es de 3,26 kg y la cantidad de cloruro de DOTAP según los cálculos es de 2,78 kg en la solución. La solución transparente se enfría lentamente hasta -12 °C con una velocidad de enfriamiento de 0,05 °C por minuto, es decir, el enfriamiento se produce durante un periodo de 12½ horas. La suspensión resultante se mantiene a -12 °C durante una hora más y, a continuación, se filtra a través de un filtro previamente enfriado (-12 °C). El cloruro de (2R)-DOTAP sin procesar se lava dos veces con 3,2 kg de acetona seca en frío (-18 °C). El producto cristalino es (2R)-DOTAP cristalino.

No se comprueba la modificación cristalina obtenida en este punto de este experimento en particular; no obstante, a partir de los experimentos anteriores correspondientes en los que se aisló el producto sin procesar en este punto, se sabe que la modificación cristalina se corresponde con la de (2R,S)-DOTAP cristalino.

20 Para conseguir un producto incluso más puro, es decir, para eliminar algunas impurezas menores, se realiza un paso de recristalización.

#### *Recristalización de cloruro de (2R)-DOTAP*

25 El cloruro de (2R)-DOTAP húmedo sin procesar se disuelve en el filtro cerrado en una mezcla de 20,5 kg de acetona seca y 1,63 kg de 2-propanol a 35 °C. La solución se transfiere al recipiente de reacción y se lleva a 25 °C. La solución se enfría lentamente hasta -12 °C con una velocidad de enfriamiento de 0,05 °C por minuto, es decir, el enfriamiento se produce durante un periodo de 12½ horas. La suspensión resultante se mantiene a -12 °C durante 9 horas más y, a continuación, se filtra con un secador de filtro enfriado (-12°C). El residuo del filtro se lava dos veces con 3,2 kg de acetona seca fría (-18 °C) y se seca aplicando vacío. Durante el secado, se deja que el secador de filtro se atempere a temperatura ambiente. El secado se completa cuando el vacío es estable a 0,6 mbar. Rendimiento: 1,47 kg de cloruro de (2R)-DOTAP cristalino enantioméricamente puro (n.º de lote: MBR-002, ensayo: 99,7 %, rendimiento: 44,7 % en ref. a (R)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol, pureza en HPLC: 99,9 % del área).

#### **Ejemplo de preparación 3:**

35 Preparación de cloruro de (2S)-DOTAP cristalino enantioméricamente puro [cloruro de (S)-1,2-dioleoil-3-propiltrimetilamonio]:

40 El cloruro de (2S)-DOTAP [cloruro de (S)-1,2-dioleoil-3-propiltrimetilamonio] se produce de la misma forma que el cloruro de (R)-DOTAP (véase a continuación) empezando a partir del material de partida enantioméricamente puro (S)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol (n.º de lote SMA062281 de DAISO, 0,14 % de agua, CG: 99,8 %; el resto de los compuestos químicos son idénticos) y tiene un rendimiento de 1,67 kg de cloruro de (2S)-DOTAP cristalino enantioméricamente puro (n.º de lote MBS-002, ensayo: 99,6 %, rendimiento: 50,4 % en ref. a (S)-3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol, pureza en HPLC: 100,0 % del área).

#### **Ejemplo de caracterización 1**

##### **Estabilidades**

45 Para determinar la estabilidad del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino, la sustancia se conserva a 25 °C y a una humedad relativa del 60 % (tabla 1) o a 40 °C y una humedad relativa del 75 % (tabla 1a) con exclusión de aire. El contenido restante del cloruro de (2R,S)-DOTAP se mide a intervalos periódicos y se indica en comparación con el valor inicial.

La pureza y contenido de cloruro de DOTAP se determinan mediante HPLC utilizando el siguiente método:

## ES 2 726 526 T3

5	Aparato de HPLC:	Agilent 1200 HPLC
	Columna:	ODS-3: 150 x 3 mm, 3 $\mu$ m. GI Sciences: Inertsil
	Eluyente A:	sal sódica del ácido pentanosulfónico 10 mM en H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> acuoso al 0,085 %
	Eluyente B:	sal sódica del ácido pentanosulfónico 3,85 mM en acetonitrilo al 94 % que contiene H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> acuoso al 0,085 %
	Gradiente:	0 min 75 % de B 1 min 75 % de B 6 min 90 % de B 7 min 100 % de B
10		20 min 100% de B 25 min 75 % de B
	Tiempo posterior:	5 min 75 % de B
	Tiempo de ejecución:	25 min
	Flujo:	1,5 ml/min
15	Presión:	aprox. 220 bares
	Temperatura de la columna:	50 °C
	volumen de inyección:	10 $\mu$ l

Se encuentran los siguientes valores:

20 La determinación de la estabilidad puede repetirse en cualquier momento deseado, los valores indicados en las tablas 1 y 1a son reproducibles.

Tabla 1:

Condiciones de almacenamiento: 25 °C							
Cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino	Tiempo de exposición en meses						
	0	3	6	9	12	24	36
% de área	99,7	99,6	99,5	99,2	99,5	99,7	99,3
% en peso	99,5	99,7	99,4	99,2	99,5	99,5	99,7

25 Los datos de estabilidad anteriores confirman que el cloruro de DOTAP cristalino es una sustancia estable. Incluso después de 36 meses, no se observó degradación significativa en las muestras almacenadas a 25  $\pm$  2 °C.

Tabla 1a:

Condiciones de almacenamiento: 40 °C					
Cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino	Tiempo de exposición en meses				
	0	3	6	9	12
% de área	99,7	99,6	99,4	99,3	99,4
% en peso	99,5	99,6	99,6	98,9	99,7

30 Los datos de estabilidad anteriores confirman que el cloruro de DOTAP cristalino es una sustancia estable. Incluso en condiciones aceleradas después de 12 meses, no se observó degradación significativa en las muestras almacenadas a 40  $\pm$  2 °C.

Los cloruros de (2R)- y (2S)-DOTAP cristalinos muestran valores de estabilidad comparables.

### Ejemplo de caracterización 2

#### Diagramas de difracción de rayos X de polvo

35 Para la caracterización de las propiedades estructurales (modificaciones cristalinas) de los cloruros de DOTAP cristalinos, se registraron diagramas de difracción de rayos X de polvo (espectros de difracción) de estas sustancias.

Los cloruros de (2R,S)-, (2R)- y (2S)-DOTAP cristalinos proporcionan espectros con bandas moderadamente definidas que tienen una resolución relativamente buena para los lípidos. Los espectros indican contenidos cristalinos elevados. No se observan fracciones amorfas al microscopio de polarización.

En la figura 1, figura 2 y figura 3 se muestran ejemplos de espectros.

- 5 Para su comparación, se muestra un espectro de una muestra amorfa comercial en la figura 4 (amorfo). En la figura 5 se muestra la comparación de los espectros de difracción de rayos X del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino (a), cloruro de (2R)-DOTAP cristalino (b) y cloruro de (2S)-DOTAP cristalino (c) en comparación con una muestra comercial de cloruro (2R,S)-DOTAP (Avanti Polar Lipids) (d).

- 10 En la tabla 2 se enumeran los valores seleccionados de 2-theta para las diversas modificaciones cristalinas de los cloruros de DOTAP racémicos y enantioméricamente puros:

Tabla 2:

Tipo		Valores seleccionados de 2-theta
(2R,S)-DOTAP	racémico	12,6; 19,5; 20,2; 21,5 y 25,2
(2S)-DOTAP	enantioméricamente puro	12,8; 19,5; 19,8; 20,2 y 21,6
(2R)-DOTAP	enantioméricamente puro	12,8; 19,5; 19,8; 20,3 y 21,6

### Ejemplo de caracterización 3

- 15 **Punto de fusión y entalpía de fusión**

El punto de fusión y la entalpía de fusión de los cloruros de DOTAP cristalinos se determinan mediante calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC) (30-350 °C; 5,0 °C/min; 80 ml/min de N<sub>2</sub>).

En la tabla 3 se enumeran los puntos de fusión y las entalpía de fusión resultantes de los cloruros de (2R,S)-DOTAP racémico y (2R)- resp. (2S)-DOTAP enantioméricamente puros.

20

Tabla 3:

Tipo		punto de fusión		entalpía de fusión
		inicio	valor máximo	
(2R,S)-DOTAP	racémico	161,0 °C	183,5 °C	-143,7 J/g
(2R)-DOTAP	enantioméricamente puro	160,1 °C	183,6 °C	-155,4 J/g
(2S)-DOTAP	enantioméricamente puro	159,2 °C	184,7 °C	-158,4 J/g

### Ejemplo de caracterización 4

#### Temperaturas y entalpías de la transición de fase

- 25 Las temperaturas y la entalpía de la transición de fase de los cloruros de DOTAP cristalinos se determinan mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) (30-350 °C, 5,0 °C/min, 80 ml/min de N<sub>2</sub>).

Además de los puntos de fusión (véase el ejemplo de caracterización 3) se observan varios puntos de transición a las fases cristalina resp. líquida-cristalina. En la tabla 4 se enumeran las temperaturas y entalpías correspondientes de la transición de fase para los cloruros de (2R,S)-DOTAP racémico y (2R)- resp. (2S)-DOTAP enantioméricamente puros.

Tabla 4:

	tipo	(2R,S)- DOTAP racémico	(2R)-DOTAP enantioméricamente puro	(2S)-DOTAP enantioméricamente puro
1. <sup>a</sup> transición	inicio	49,8 °C	40,9 °C	41,0 °C
	valor máximo	57,4 °C	42,7 °C	43,0 °C
	entalpía	-58,2 J/g	-14,1 J/g	-13,5 J/g
2. <sup>a</sup> transición	inicio	64,7 °C	52,4 °C	51,6 °C
	valor máximo	66,2 °C	60,7 °C	60,3 °C
	entalpía	-25,0 J/g	-38,0 J/g	-37,0 J/g
3. <sup>a</sup> transición	inicio	-	81,9 °C	81,6 °C
	valor máximo	-	84,0 °C	83,8 °C
	entalpía	-	-33,9 J/g	-33,1 J/g

5 Cuando el experimento de DSC se realiza con mezclas de cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino puro y cloruro de (2R)-DOTAP cristalino puro, se observan todas las temperaturas de transición de fase de ambos, el racemato y el enantiómero. En la figura 11 se muestran las temperaturas de la fase de transición y los puntos de fusión del cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino puro y del cloruro de (2R)-DOTAP puro cristalino, así como de las mezclas de ambas formas cristalinas en proporciones 100:50 y 63:100. Estas proporciones se corresponden con un contenido 33,3 mol% resp. 19,3 mol% de cloruro de (2S)-DOTAP en las mezclas.

#### Conclusión:

10 Las modificaciones cristalinas de cloruro de DOTAP cristalino enantioméricamente puro y de cloruro de DOTAP racémico cristalino son distintas.

#### **Ejemplo de caracterización 5**

##### **Absorción de agua en dependencia de la humedad relativa**

15 La absorción de agua del cloruro de DOTAP se determina mediante absorción dinámica de vapor (Dynamic Vapor Sorption, DVS) usando un analizador de absorción de vapor de agua Projekt Messtechnik SPS 11-100n. Las muestras se colocan en crisoles de aluminio sobre una microbalanza y se deja que se equilibren a 25 °C y 0 % de h.r. (humedad relativa) durante toda la noche antes de exponerlas a dos ciclos de humidificación/secado a 25 °C con una velocidad de barrido de  $\Delta$  h.r. = 5 % h<sup>-1</sup> y periodos de equilibrado «isohúmedo» a los valores extremos.

20 Se estudian las muestras de cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino, cloruro de (2R)-DOTAP cristalino, cloruro de (2R,S)-DOTAP amorfo y cloruro de (2R)-DOTAP amorfo.

#### Resultados:

25 La comparación de las curvas de DVS (véase la figura 12: línea continua del primer ciclo, línea discontinua del segundo ciclo) indica diferencias características entre las muestras cristalinas y amorfas: las muestras cristalinas (diagramas de la izquierda de la figura 12) muestran un peso estable a una h.r. baja, mientras que el peso de las muestras amorfas (diagramas de la derecha de la figura 12) aumenta justo desde por encima de una h.r. del 0 %. Además, en las muestras que se cristalizaron al inicio, se observa una histéresis significativamente mayor en ambos ciclos. También puede observarse una diferencia entre las muestras racémicas (diagramas superiores de la figura 12) y enantioméricamente puras (diagramas inferiores de la figura 12): las muestras racémicas muestran un aumento más rápido en el contenido de agua a aproximadamente el 10-15 % de h.r., mientras que las muestras isoméricamente puras muestran esta etapa a una h.r. de aproximadamente el 20-25 %.

#### **Ejemplo comparativo 1**

En el experimento de Felgner y cols. reproducido en este documento, todas las condiciones experimentales se han elegido para que coincidieran los más posible con el ejemplo 5, columna 27, líneas 15 a 47 del documento US 5 264 618 (Felgner y cols.).

Se añadieron gota a gota 31,5 g de cloruro de oleoil (FLUKA 0733IAH) disueltos en 125 ml de cloroformo a 4 °C con enfriamiento durante un periodo de 1½ horas a 5,0 g de 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol, disuelto en 37,5 ml de cloroformo y 25 ml de piridina. La solución de color amarillo se agitó durante toda la noche. A continuación se añadieron 125 ml de agua fría y 125 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó dos veces con 100 ml de HCl 0,5 N y otras dos veces con 100 ml de una solución de bicarbonato sódico 0,5 N. Se añadieron 39 g de sulfato sódico anhidro y la suspensión obtenida de este modo se filtró y lavó con 100 ml de cloroformo. A continuación, el filtrado se concentró a presión reducida a 40 °C, obteniéndose 40,1 g de un líquido de color marrón (SM-0318-A) con un contenido de (2R,S)-DODAP del 24,3 % p/p medido mediante HPLC. El secado adicional a presión reducida a 60 °C daba lugar a una reducción del peso a 31,2 g.

10 Se purificaron 31,0 g de este material mediante una cromatografía en columna de ácido silícico del siguiente modo:

Gel de sílice: 129 g (la cantidad de gel de sílice se calculó en relación con la cantidad de (2R,S)-DODAP) Merck 60 F 63-200 µm

Columna: 4 cm de diámetro, 60 cm de longitud

Flujo: aproximadamente 8 ml/min

15 Como primera fase móvil se usaron 1500 ml de cloruro de metileno (fracciones 1-27), a continuación, 1000 ml de cloruro de metileno/metanol 95:5 (fracciones 28-47) y, finalmente, 1000 ml de metanol. Se recogieron las fracciones y se combinaron según su análisis en TLC. De este modo, las fracciones 4-33 se concentraron juntas a presión reducida. Se obtuvieron 10,8 g de un aceite de color marrón (SM-0318-B) con un contenido de (2R,S)-DOPAP del 65,6 % p/p medido mediante HPLC. Y las fracciones 34-42 dieron como resultado 12,6 g de un aceite de color marrón (SM0318-D) con un contenido de (2R,S)-DOPAP del 54,2 % p/p medido mediante HPLC.

25 Se añadieron 10,4 g de cloruro de metileno a 9,6 g del compuesto obtenido fuera de las fracciones 4-33 (SM-0318-B) en un tubo de vidrio a alta presión. A continuación se cerró el tubo de vidrio y la solución de color marrón se calentó durante toda la noche a 50 °C para formar una emulsión. Después se abrió el tubo y se eliminó el cloruro de metileno residual mediante evaporación. Se obtuvieron 8,0 g de una cera de color amarillo (SM-0318-E) con un contenido de cloruro de (2R,S)-DOTAP del 65,0 % p/p y el 1,3 % p/p de (2R,S)-DODAP, ambos medidos mediante HPLC.

30 Se añadieron 14,0 g de acetonitrilo a esta cera (SM-0318-E). La emulsión obtenida de este modo se transfirió con 80 ml de acetonitrilo (para obtener una proporción de sólido con respecto al solvente de aproximadamente 1:12) a un matraz y se enfrió a 20 °C. No se pudo observar cristalización. A 20 °C se obtuvo un material de color amarillo parduzco similar a miel solidificado que, incluso si se calienta solo ligeramente, tiende a convertirse en un material de color parduzco viscoso y pegajoso.

#### Conclusión

35 Los datos demuestran que el cloruro de 1,2-dioleoil-3-propiltrimetilamonio (cloruro de (2R,S)-DOTAP) preparado según el procedimiento anterior, que se realiza de acuerdo con el ejemplo 5, columna 27, líneas 15 a 47 del documento US 5 264 618 (Felgner y cols.) no puede obtenerse en forma cristalina.

Véanse también las figuras 6 y 7 que ilustran la emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0318-E) en acetonitrilo cuando se enfría y la emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0318-E) en acetonitrilo después de enfriar hasta -20°C, respectivamente.

#### Ejemplo comparativo 2

40 Se preparó una reproducción adicional del experimento de Felgner y cols. que confirmó el mismo resultado obtenido previamente.

Todas las condiciones experimentales se eligieron para que fueran lo más próximas posibles a las de la preparación/aislamiento del cloruro de (2R,S)-DOTAP tal como se describe en el ejemplo 5, columna 27, líneas 15 a 47 del documento US 5 264 618 (Felgner y cols.).

45 En este experimento se hizo un énfasis especial sobre la escala de reactivos, el uso de piridina anhidro, el tiempo de metilación y la temperatura del tubo.

En el ejemplo 5 del documento US 5 264 618 (Felgner y cols.) no pudieron encontrarse datos válidos sobre la materia prima utilizada. Para la reelaboración se utilizaron cloruro de oleoil de SIGMA-ALDRICH (n.º de artículo

367850, n.º de lote 0733IAH) y 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol de TCI (n.º de artículo D2072, n.º de lote FGC01EF). Éter dietílico (n.º de artículo 8.22270.1000, n.º de lote K33237470), sulfato sódico (n.º de artículo 8.22286.5000, n.º de lote TA603386), arena de mar (n.º de artículo 1.07711.5000, n.º de lote TA1417811), gel de sílice 60 F 63-200µm (n.º de artículo 1.07734.9025, n.º de lote TA1570234) y acetonitrilo (n.º de artículo 1.15500.1000, n.º de lote K38172000) eran todos de Merck KGaA. Cloroformo (n.º de artículo 34854, n.º de lote 8178C) y piridina por encima del tamiz molecular, H<sub>2</sub>O ≤ 0,005 % (n.º de artículo, 82704, n.º de lote 1166921) eran de Fluka.

Se disolvieron 5,0 g de 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol a temperatura ambiente en 25 ml de piridina anhidro y 37,5 ml de cloroformo recién destilado. La solución se enfrió hasta 4 °C. Se disolvieron 31,5 g de cloruro de oleoil en 125 ml de cloroformo destilado. La solución de cloruro de oleoil se añadió gota a gota a la solución fría de 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol durante un periodo de una hora. La solución de color amarillo se agitó durante toda la noche. A continuación se añadieron 125 ml de agua fría y 125 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó dos veces con 100 ml de HCl 0,5 N y, a continuación, otras dos veces con 100 ml de una solución de bicarbonato sódico 0,5 N. A continuación se añadieron 39 g de sulfato sódico anhidro. La suspensión obtenida de este modo se filtró y el sólido residual se lavó con 20 ml de cloroformo. El filtrado se concentró a continuación a presión reducida. Se obtuvieron 31,5 g de un líquido de color marrón (SM 0364 A) con un contenido de 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP) del 62,2 % p/p medido mediante HPLC.

Se preparó una columna de gel de sílice del siguiente modo:

	Columna:	4 cm de diámetro, 60 cm de longitud
20	Gel de sílice:	200 g de gel de sílice y 42,6 g de arena de mar (calculado en relación con la cantidad de DODAP)
	Flujo:	aproximadamente 7 ml/min

Se añadieron gota a gota 15 g del material preparado anteriormente (SM 0364 A) dentro de la columna de gel de sílice y se lavó con 50 ml de cloroformo. La columna se eluyó en primer lugar con 1000 ml de cloroformo, a continuación con 1000 ml de cloroformo/metanol en una proporción 95/5, después con 1250 ml de cloroformo/metanol en una proporción 90/10 y, finalmente, con 2500 ml de metanol. Se recogieron fracciones que se combinaron según su análisis en cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice (Merck 60 F254), se desarrolló con cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua en una proporción 50/15/5/5/2 por volumen y se detectó con yodo. Tras concentrar a presión reducida las fracciones 11-17 combinadas dieron lugar a 4,88 g (SM 0364 B) con un contenido de DODAP del 73,2 % p/p; las fracciones 18-27 dieron como resultado 7,24 g (SM 0364 C) con un contenido de DODAP del 68,2 % p/p y las fracciones 28-31 dieron como resultado 1,9 g (SM 0364 D) con un contenido de DODAP del 40,4 % p/p, todas medidas mediante HPLC. En total el resultado del equilibrio de masas era del 93,5 %.

Se añadió 1,0 g del compuesto obtenido fuera de las fracciones más puras 11-17 (SM-0364-B) en un tubo de vidrio de borosilicato de paredes gruesas altamente presurizable (Sigma Aldrich Z181072-1EA). A continuación se condensaron 10 ml de cloruro de metilo dentro del tubo de vidrio. Después, el tubo de vidrio se cerró herméticamente y se mantuvo durante 72 horas a 70 °C. Posteriormente el tubo se enfrió hasta 0 °C abierto y el cloruro de metilo residual se eliminó mediante evaporación. Esto dio lugar a 1,11 g de una cera de color amarillo parduzco (SM 0364 E) con un contenido de cloruro de (2R,S)-DOTAP del 69,3 % p/p y que mostraba un contenido de DODAP del 1,8 % p/p y un contenido de ácido oleico del 2,7 % p/p (todos medidos mediante HPLC).

A 1,08 g del compuesto obtenido como se ha descrito anteriormente (SM 0364 E) se añadieron 10 ml de acetonitrilo y se calentó a 50 °C. La emulsión obtenida de este modo se enfrió hasta -20 °C. No pudo observarse cristalización. A -20 °C se obtuvo una cera de color amarillo parduzco.

Conclusión:

45 Como se muestra anteriormente, cuando se reelaboraron las realizaciones más próximas del documento US 5 264 618 (Felgner y cols.) solo pudo obtenerse cloruro de (2R,S)-DOTAP amorfo.

Véanse también las figuras 8 y 9 que ilustran la emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0364-E) en acetonitrilo antes de su enfriamiento y la emulsión de cloruro de (2R,S)-DOTAP (SM-0364-E) en acetonitrilo después de enfriar hasta -20°C, respectivamente.

50 Sin una mayor elaboración, se cree que un experto en la materia puede, usando la descripción precedente, emplear la presente invención en toda su extensión dentro del alcance según se define por las reivindicaciones adjuntas. Por

tanto, las realizaciones específicas preferidas precedentes deben ser entendidas como meramente ilustrativas y en ningún modo limitantes del resto de la memoria descriptiva.

5 Los ejemplos precedentes pueden repetirse con un éxito similar sustituyendo los reactivos descritos genérica o específicamente y/o las condiciones de funcionamiento de esta invención como se define en las reivindicaciones adjuntas para aquellas utilizadas en los ejemplos previos.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una forma cristalina de cloruro de (2R,S)-, (2S)- o (2R)-DOTAP, que comprende cristalizar el cloruro de (2R,S)-, (2S)- o (2R)-DOTAP a partir de uno o más solventes apróticos, en el que la cristalización tiene lugar mediante enfriamiento lento de 35 °C a -12 °C durante un periodo de 12 horas o enfriamiento lento desde una temperatura inferior a 35 °C durante un periodo de 10 a 50 horas, cuyo cloruro de (2R,S)-DOTAP cristalino tiene una de las siguientes características:
- valores de 2-theta que comprenden al menos valores de 12,6; 19,5; 20,2; 21,5 y 25,2; o
- valores de 2-theta que comprenden al menos valores de 6,5; 12,6; 13,4; 19,5; 20,2; 21,5; 25,2 y 29,8;
- o
- cuyo cloruro de (2S)-DOTAP cristalino tiene una de las siguientes características:
- valores de 2-theta que comprenden al menos valores de 12,8; 19,5; 19,8; 20,2 y 21,6; o
- valores de 2-theta que comprenden al menos valores de 6,5; 12,8; 19,5; 19,8; 20,2; 20,7; 21,6 y 25,3;
- o
- cuyo cloruro de (2R)-DOTAP cristalino tiene una de las siguientes características:
- valores de 2-theta que comprenden al menos valores de 12,8; 19,5; 19,8; 20,3 y 21,6; o
- valores de 2-theta que comprenden al menos valores de 6,6; 12,8; 19,5; 19,8; 20,3; 20,8; 21,6 y 25,3;
- determinados utilizando una longitud de onda de radiación de 1,54060 Å (Cu);
- y/o
- cuyo cloruro de (2R,S)-, (2S)- o (2R)-DOTAP cristalino tiene una pureza química de al menos aproximadamente el 95 % determinada mediante HPLC.
2. Un proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque el cloruro de (2R,S)-, (2S)- o (2R)-DOTAP cristalino tiene un punto de fusión superior a 160 °C y una entalpía de fusión de más de -130 J/g.
3. Un proceso según la reivindicación 1 o 2, en el que el uno o más solventes apróticos comprende uno o más solventes próticos.
4. Un proceso según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cristalización tiene lugar en una atmósfera inerte.
5. Un proceso según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cristalización se lleva a cabo directamente a partir de una solución de reacción sin purificación previa, en la que la solución de reacción proviene de un proceso de preparación de cloruro de (2R,S)-, (2S)- o (2R)-DOTAP.
6. Un proceso según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una recristalización del cloruro de (2R,S)-, (2S)- o (2R)-DOTAP cristalino.

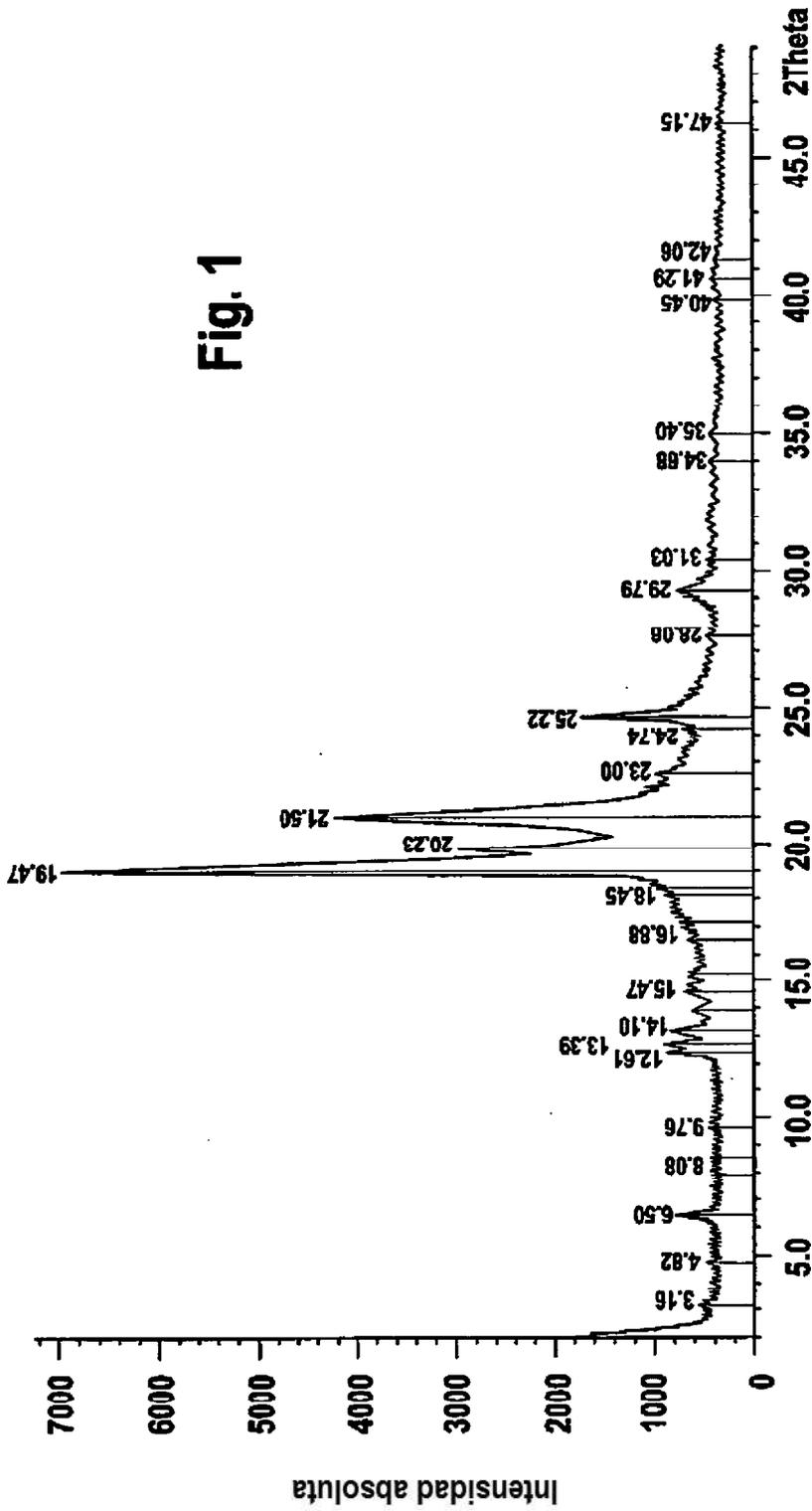


Fig. 1

Fig. 1

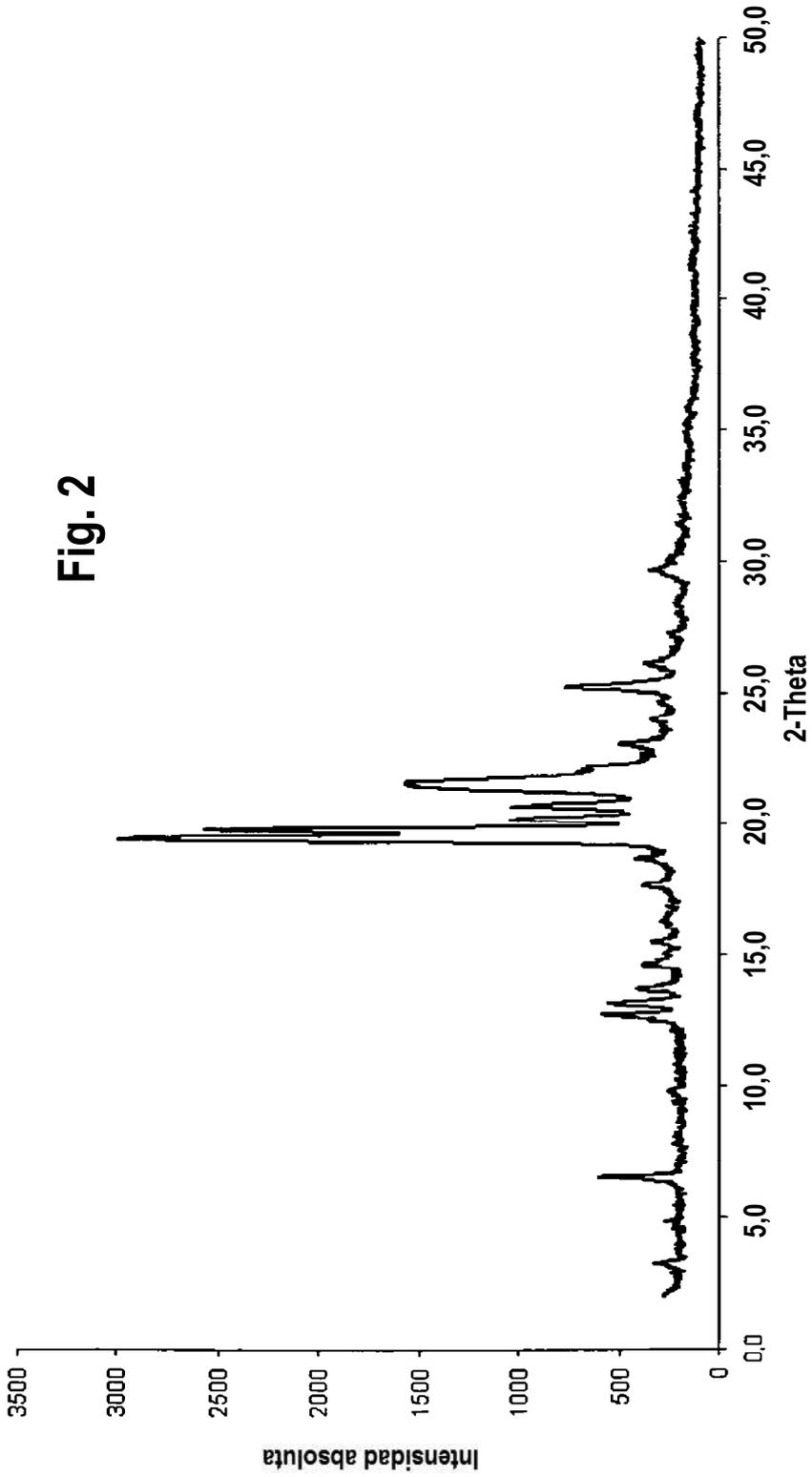


Fig. 2

Fig. 2

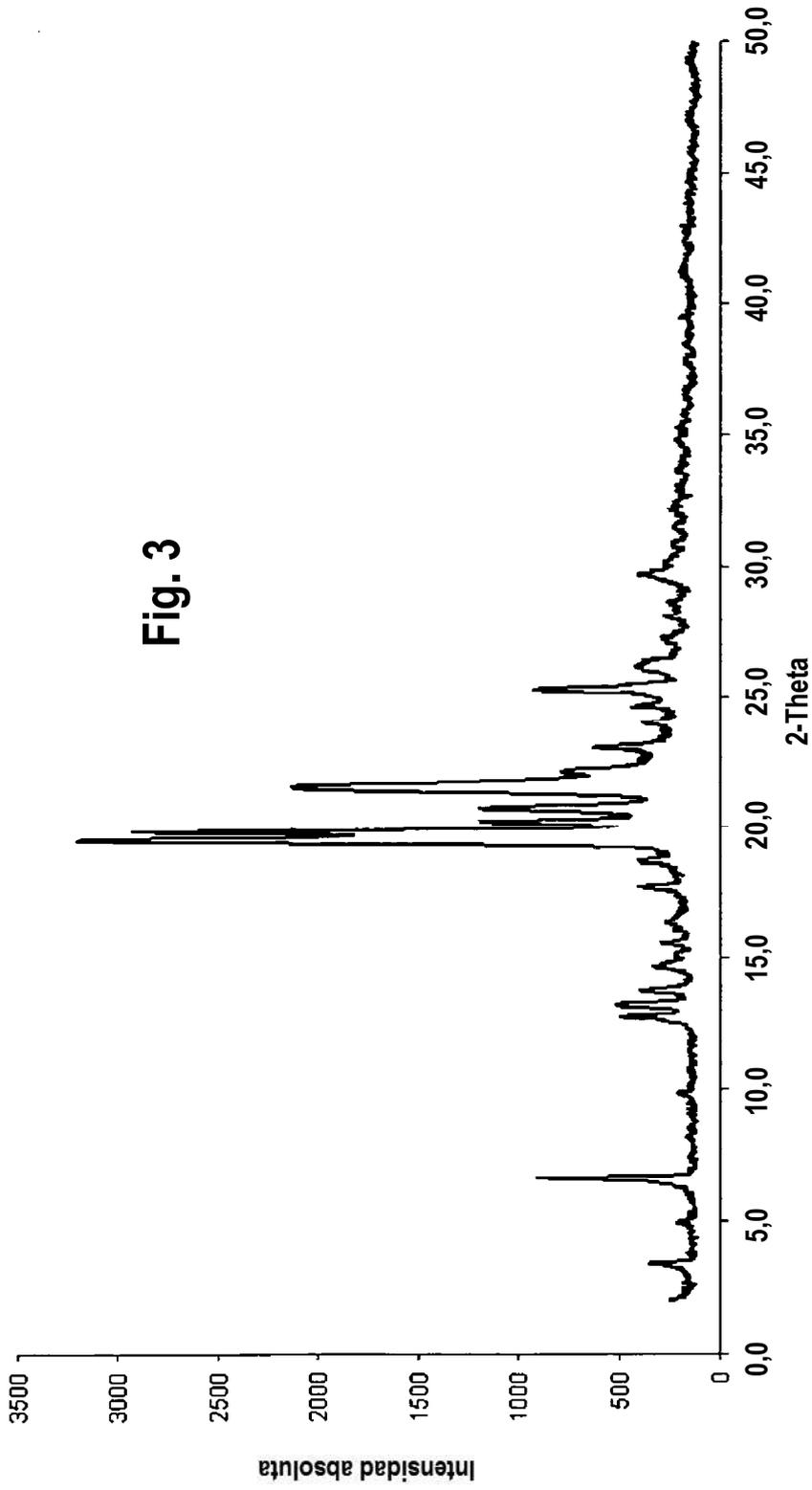


Fig. 3

Fig. 3

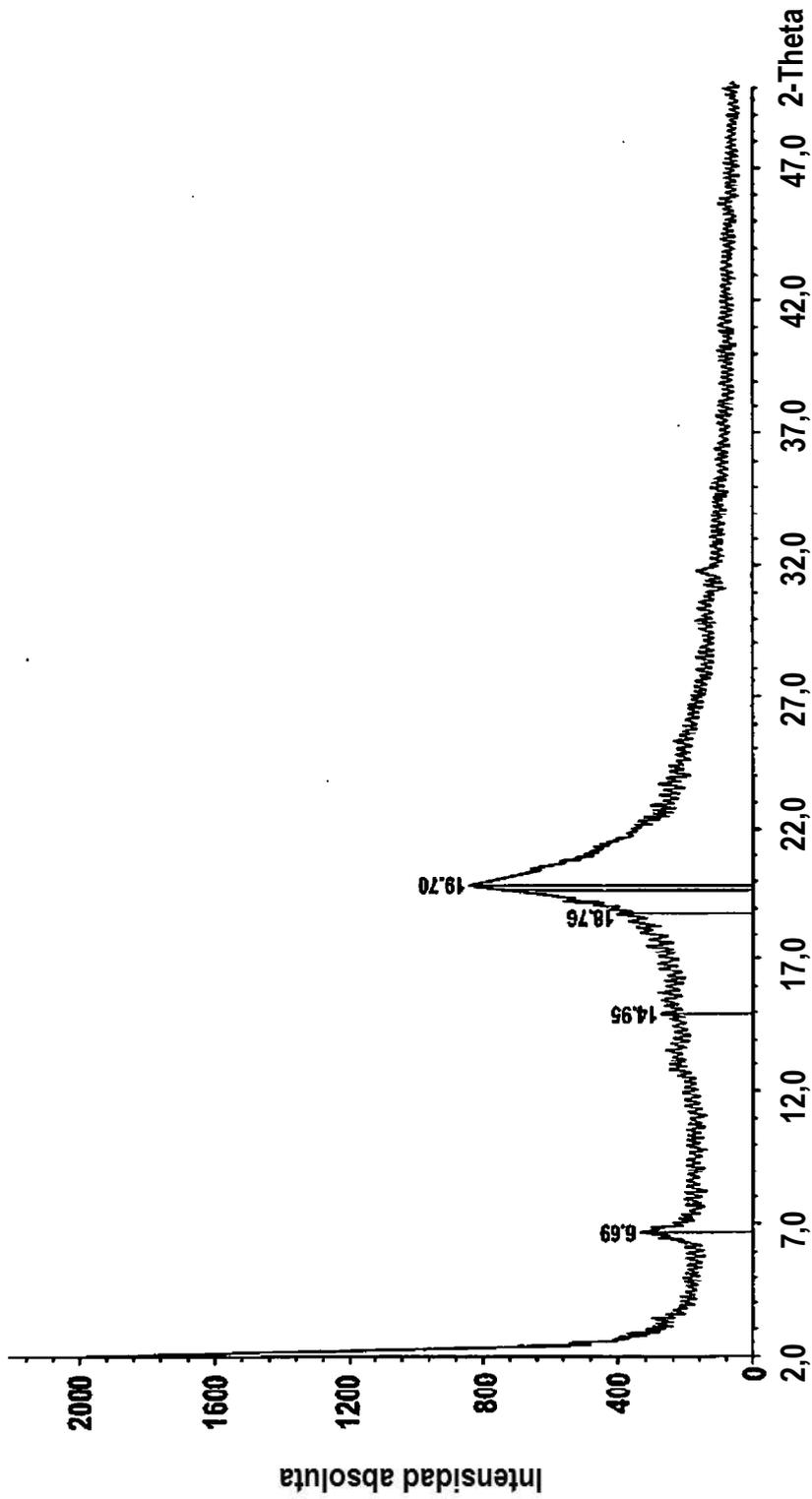


Fig. 4

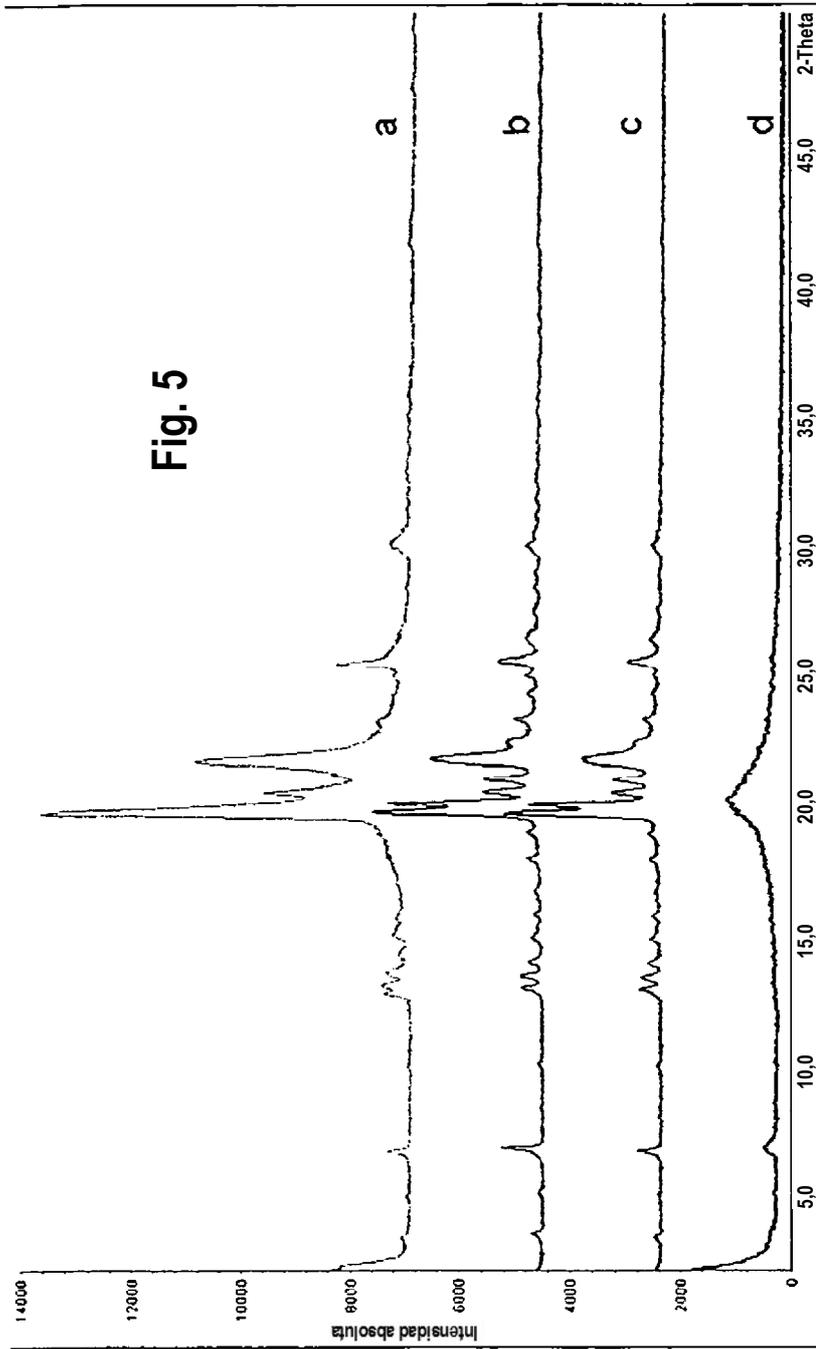


Fig. 5

Fig. 5

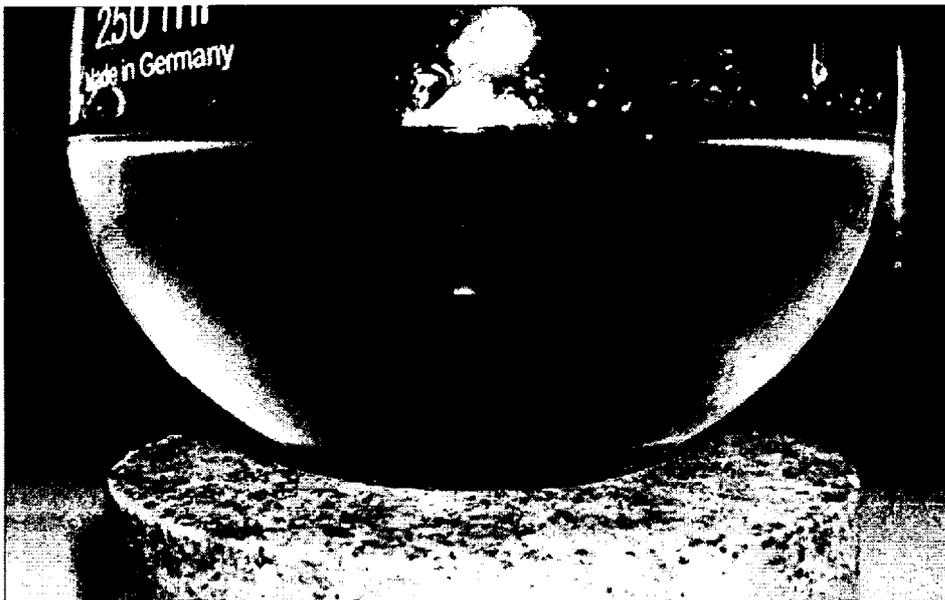


Fig. 6

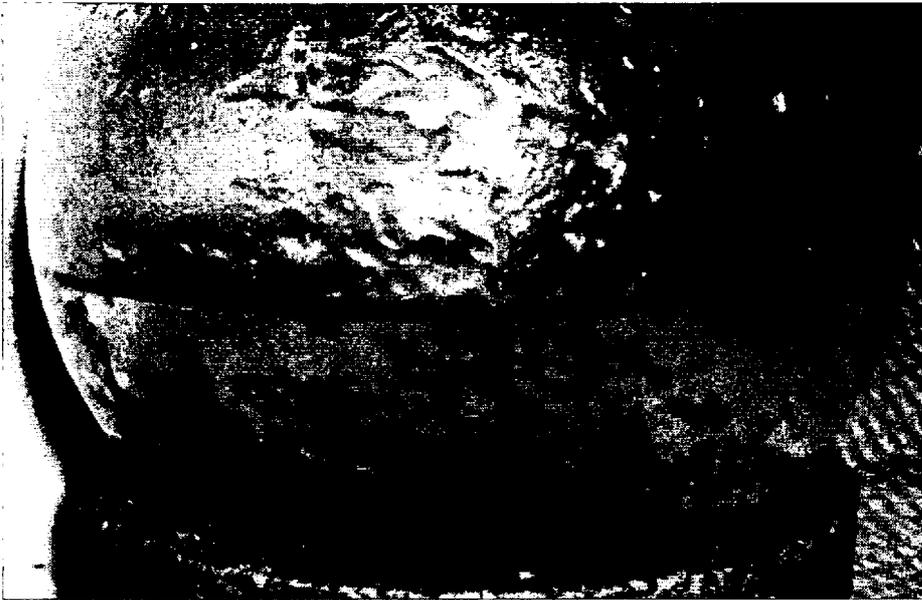


Fig. 7

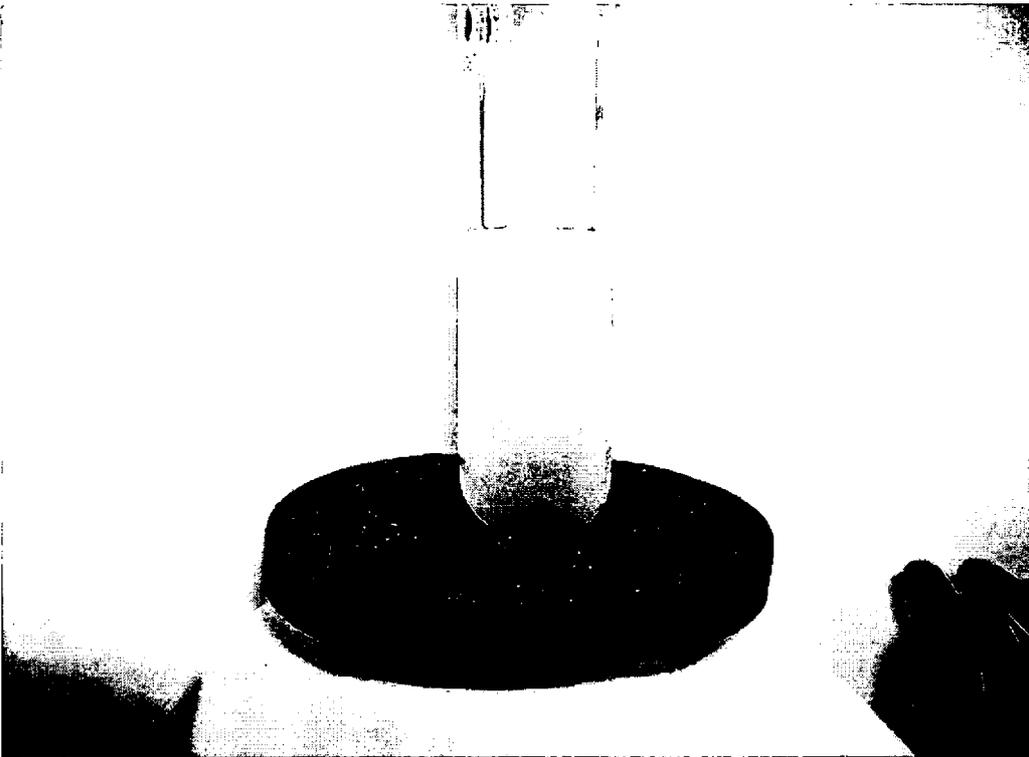


Fig. 8

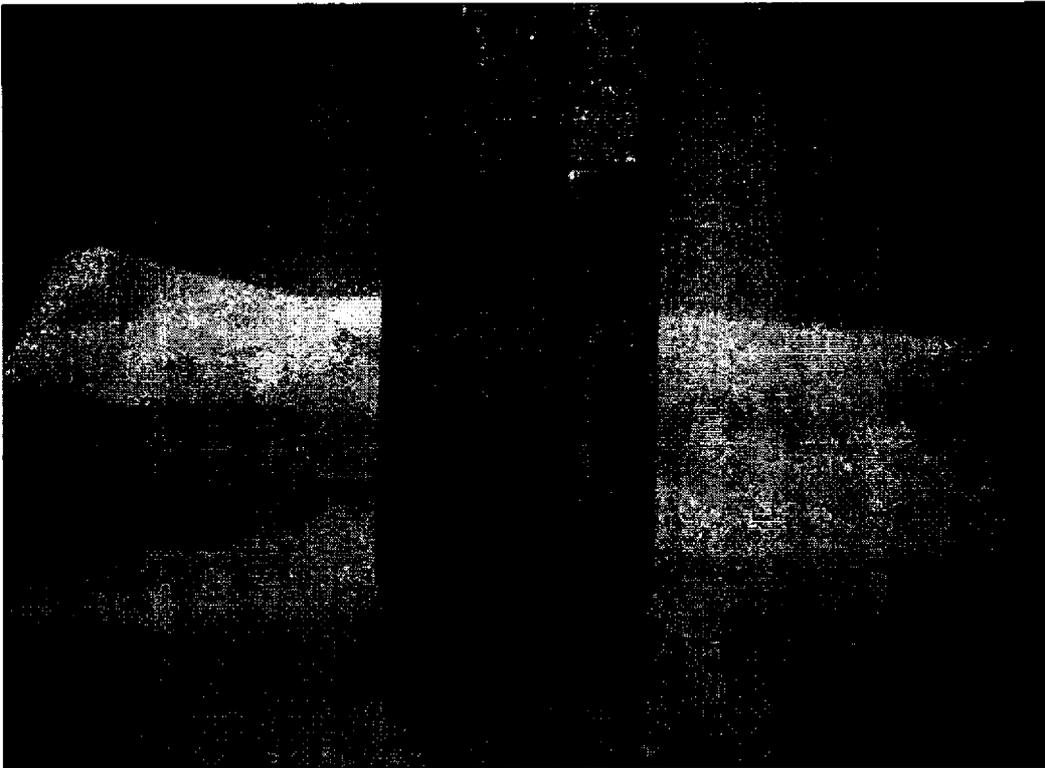


Fig. 9



Fig. 10

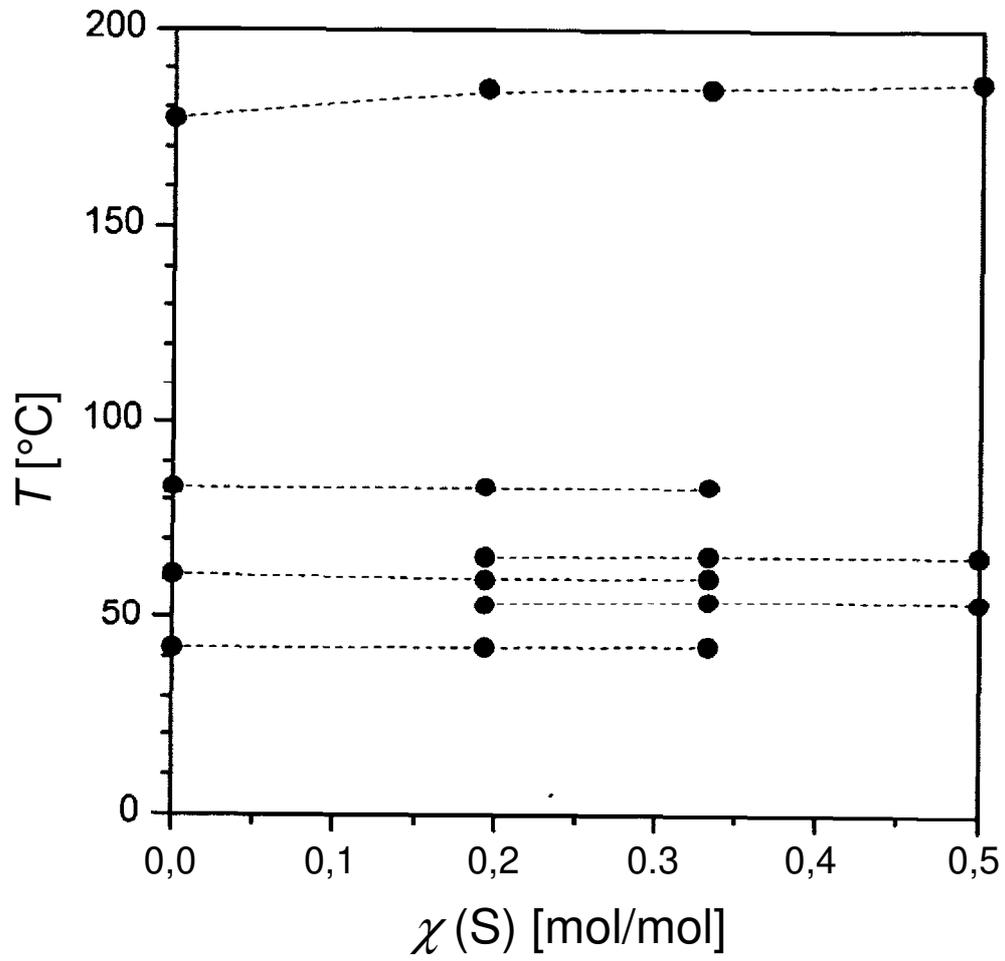


Fig. 11

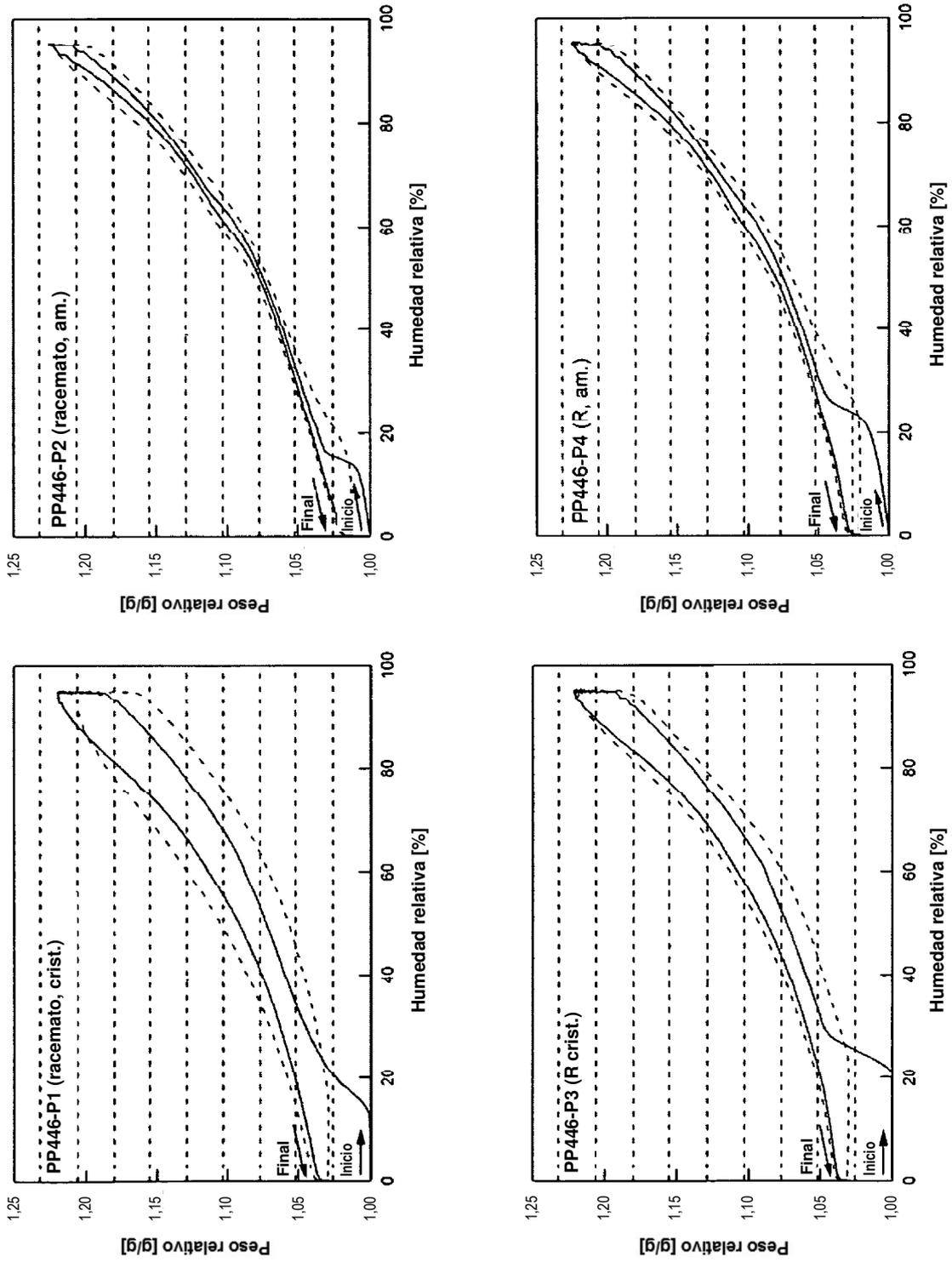


Fig. 12