



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108285422 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201810169562.7

A61K 47/18(2006.01)

(22)申请日 2012.05.02

C12N 15/63(2006.01)

(30)优先权数据

61/488,428 2011.05.20 US

(62)分案原申请数据

201280024160.9 2012.05.02

(71)申请人 默克专利股份有限公司

地址 德国达姆施塔特

(72)发明人 M·W·普拉切尔 A·黑丁格尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 陈晰

(51)Int.Cl.

C07C 213/10(2006.01)

C07C 219/08(2006.01)

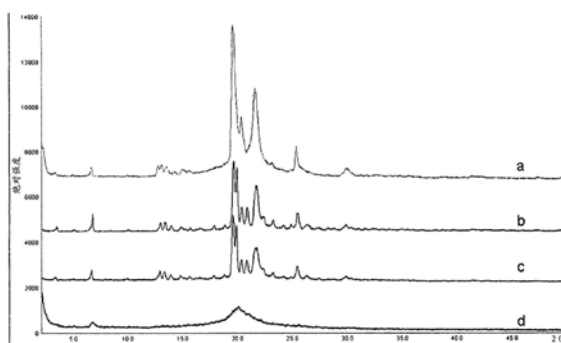
权利要求书2页 说明书15页 附图10页

(54)发明名称

稳定的DOTAP氯化物晶体变体

(57)摘要

本发明涉及稳定的DOTAP氯化物晶体变体，特别是外消旋的(2R,S)-和对映体纯的为(2R)-和(2S)-的DOTAP氯化物的晶体变体，涉及其制备方法，以及涉及其用于制备药物组合物的用途。



1. (2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物晶体，
其中(2R,S)-DOTAP氯化物晶体具有以下特征之一：
2 θ 值包括约12.6、约19.5、约20.2、约21.5和约25.2中至少一个值；或者
2 θ 值包括约6.5、约12.6、约13.4、约19.5、约20.2、约21.5、约25.2和约29.8中至少一个值；或者
对应于图1中所示的图谱的X-射线粉末衍射图谱；
或者
其中(2S)-DOTAP氯化物晶体具有以下特征之一：
2 θ 值包括约12.8、约19.5、约19.8、约20.2和约21.6中至少一个值；
2 θ 值包括约6.5、约12.8、约19.5、约19.8、约20.2、约20.7、约21.6和约25.3中至少一个值；或者
对应于图2中所示的图谱的X-射线粉末衍射图谱；
或者
其中(2R)-DOTAP氯化物晶体具有以下特征之一：
2 θ 值包括约12.8、约19.5、约19.8、约20.3和约21.6中至少一个值；
2 θ 值包括约6.6、约12.8、约19.5、约19.8、约20.3、约20.8、约21.6和约25.3中至少一个值；或者
对应于图3中所示的图谱的X-射线粉末衍射图谱。
2. (2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物晶体，当其在25℃下储存36个月或在40℃下储存12个月时，具有通过HPLC确定的高于99重量%和面积%的稳定性。
3. (2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物晶体，其具有通过HPLC确定的至少约95%的化学纯度。
4. 根据权利要求1至3中一项或多项所述的(2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物晶体，其具有高于160℃的熔点和超过-130J/g的熔化焓。
5. 包含根据权利要求1至4中一项或多项所述的(2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物晶体和药物可接受的载体的药物组合物。
6. 根据权利要求5所述的药物组合物，其还包含一种或多种肽、核苷酸、抗原、细胞生长抑制剂、脂质体、脂质体复合物、纳米颗粒或微乳液或其混合物。
7. 制备根据权利要求1至4中一项或多项所述的晶体形式的(2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物的方法，其包括由一种或多种非质子溶剂结晶(2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物。
8. 根据权利要求7所述的方法，其中所述一种或多种非质子溶剂包含一种或多种质子溶剂。
9. 根据权利要求7或8所述的方法，其中所述结晶在惰性气氛下进行。
10. 根据权利要求7至9中一项或多项所述的方法，其中通过以每分钟0.001℃至0.1℃的速率缓慢冷却5至200小时进行结晶。
11. 根据权利要求10所述的方法，其中所述缓慢冷却的时间段为约10至100小时。
12. 根据权利要求7至11中一项或多项所述的方法，其中由反应溶液直接进行结晶，无需之前事先纯化，所述反应溶液来自制备(2R,S)-、(2S)-或(2R)-DOTAP氯化物的方法。

13. 根据权利要求7至12中一项或多项所述的方法,其进一步包括对 (2R,S)-、(2S)-或 (2R)-DOTAP氯化物晶体进行重结晶。

14. 通过根据权利要求7至13中一项或多项所述的方法得到的 (2R,S)-、(2S)-或 (2R)-DOTAP氯化物晶体。

15. 转染细胞的方法,其包括给予所述细胞根据权利要求1至4中一项或多项所述的 (2R,S)-、(2S)-或 (2R)-DOTAP氯化物晶体。

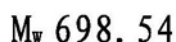
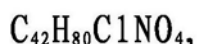
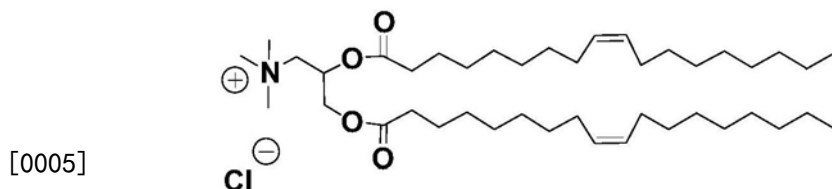
稳定的DOTAP氯化物晶体变体

[0001] 本申请是申请号为201280024160.9、申请日为2012年5月2日、发明名称为“稳定的DOTAP氯化物晶体变体”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及外消旋和对映体纯的DOTAP氯化物晶体变体,涉及其制备方法,以及涉及其用于制备药物组合物的用途。

[0003] DOTAP氯化物的晶体形式和相应的药物组合物具有与DOTAP氯化物的非晶体形式的用途相同的熟知用途。

[0004] 上下文所述的DOTAP氯化物是指N,N,N-三甲基-2,3-双[[(9Z)-1-氧杂-9-十八烯]氧基]-1-丙铵氯化物,也被称为(Z,Z)-N,N,N-三甲基-2,3-双[(1-氧杂-9-十八烯]氧基]-1-丙铵氯化物或1,2-二油酰氧基-3-三甲基铵丙烷氯化物的外消旋体(2R,S)-或同分异构体纯的(2R)-和(resp.) (2S)-的构型,以及其水合物。



[0006] CAS登记号:132172-61-3和477274-39-8(外消旋体),

[0007] 197974-73-58(外消旋体,一水合物)

[0008] 428506-51-8(2S构型),328250-28-8(2R构型)

[0009] 除了其它,DOTAP可以构建脂质体和其它脂质囊泡聚集体。脂质体是包含两性物质、通常是天然脂质的合成的多层囊泡(球形自容纳膜),其中亲水性物质均可以被包封在其含水的内部,并且亲脂性物质可以被包含在其脂质膜的内部。

[0010] 它们特别用于化妆品和药品中,尤其是在皮肤病学中。在此,特别是维生素、辅酶、皮肤护理剂和防晒剂包含在其中。脂质体通常是局部施用。

[0011] 此外,既然与如果以游离的溶解形式使用活性化合物相比,脂质体的胃肠道外应用能够实现更特定的器官分布,因此在制药技术中脂质体正不断获得更多的重视。

[0012] 如果将DNA、RNA或蛋白质结合到脂质体以及其它脂质囊泡聚集体中,就得到脂质体复合物(lipoplexes)。

[0013] 加入油和使用高压匀浆机能够由脂质体强行形成所谓的纳米颗粒(nanopart)。这些是与脂质体尺寸大约相同的颗粒,但其不具有水相,而是具有油相在其内部。它们特别适合于亲脂性物质的包封。

[0014] 微乳液是包含含水的脂质样表面活性剂组分的胶体分散的单相体系。它们的颗粒尺寸为1-500nm并且表现出与液体类似的形式。

[0015] 特别地,就溶解性通常差的肽类活性化合物、核苷酸、疫苗和其它生物药物而言,在上述应用的情况下,增溶效果非常重要。

[0016] 此外,活性化合物的体内降解可以被减缓,并且以该方式实现持续释放效果。

[0017] DOTAP氯化物属于阳离子脂质类。与天然存在的磷脂相反,其不具有两性离子特性。单独的或与磷脂或其它脂质样化合物结合的包含阳离子脂质的脂质体具有正电表面。这样对外表面上具有负电的细胞,例如内皮细胞产生强亲和力。

[0018] 然而,以DOTAP为基础以及其它阳离子脂质体和脂质体复合物透入细胞以及由此将其中结合的活性化合物运送至细胞内部(转染)的能力是特别重要的。

[0019] 对于癌症治疗而言,所有这些性质使得DOTAP氯化物也非常值得关注。这些性质使应用结合到DOTAP阳离子脂质体中的常规细胞生长抑制剂成为可能。

[0020] 根据文献充分了解DOTAP氯化物和其它DOTAP盐例如乙酸盐、溴化物、磷酸二氢盐、硫酸氢盐、碘化物、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、三氟乙酸盐、硫酸盐或硫酸氢盐和三氟甲磺酸盐的转染性质。

[0021] 在一些体外研究中,其它盐例如DOTAP甲基硫酸盐已经取得了比DOTAP氯化物更优的转染率。

[0022] 然而,在体内使用时,在活体中在脂质体表面处发生阴离子交换,意味着这时其它盐的优势不存在。特别是在人的医疗用途中,特别是对于胃肠道外应用,具有生理上可接受的阴离子例如相应的氯化物或乙酸盐的DOTAP盐是优选的。

[0023] 医疗特别是胃肠道外应用对使用的活性化合物和佐剂的质量和纯度提出最高要求。因此,就这些化合物的制备、重复制备和副产物情况,官方部门有非常严格规定。此外,在胃肠道外使用物质的情况下,病原微生物和内毒素的微生物污染必须严格地避免和控制。

[0024] 目前可以得到的无定形形式的DOTAP氯化物和其它DOTAP盐非常不稳定并且因此本身难以以可接受的纯度制备,以使得它们适合用于制备药物制剂。

[0025] 像所有带有油酸基团的脂质,例如天然的磷脂DOPC和DOPE一样,所有的DOTAP盐对氧化非常敏感,并且不饱和脂肪酸衍生物的氧化产物一般具有强毒性。

[0026] 在此,需要适合的制备、纯化和稳定化的方法。例如,DOTAP乙酸盐为高沸点油的形式并且因此工业上仅可能非常困难地获得优等质量的DOTAP乙酸盐。

[0027] 克服不稳定性的常规方法例如加入抗坏血酸或还原的L-谷胱甘肽形式的抗氧化剂,由于不能排除之后加入的活性化合物的相互作用,因此极大地限制了DOTAP氯化物的通用性。在制备、储存和使用期间完全排除氧实际上是不可能的或仅能够通过非常大的努力才实现。

[0028] 商业上获得的DOTAP氯化物为氯仿溶液或无定形固体。

[0029] 除了其氧化敏感性之外,无定形DOTAP氯化物具有极强的吸湿性,并在常规大气湿度水平下在极短的时间内潮解以形成油脂膜。这使得对这种化合物的处理困难的多。

[0030] 因此,在技术上,目前对可得到的无定形形式的DOTAP氯化物的任何处理只有在有力的保护措施下才是可能的。因此,无定形DOTAP氯化物的生产一般推荐在-20℃、保护性气体下储存并仅保证约6个月的保存期。

[0031] Eibel和Unger在DE4013632A1中概述了通过在氯仿/甲醇/含水HCl溶剂体系中进行离子交换,之后通过色谱方法纯化,由DOTAP溴化物合成(2R,S)-DOTAP氯化物。DOTAP溴化物事先由1-溴-2,3-二油酰氧基丙烷原位获得。

[0032] Leventis和Silvius在Biochim.Biophys.Acta,1023(1990)124-132中报导了通过在两相溶剂/NaCl溶液体系中进行离子交换,由DOTAP碘化物合成(2R,S)-DOTAP氯化物。DOTAP碘化物通过借助碘甲烷对相应的二甲基氨基化合物进行甲基化而事先得到。

[0033] Nantz等在Biochim.Biophys.Acta,1299(1996)281-283,J.Med.Chem.40(1997)4069-4078中记载了通过无水离子交换色谱合成(2R,S)-DOTAP氯化物。通过蒸发洗脱液得到希望的化合物。

[0034] Felgner等在US 5,264,618中通过借助氯甲烷对相应的二甲基氨基化合物进行甲基化而直接形成(2R,S)-DOTAP氯化物。表面上,他们通过在-20℃下由乙腈结晶得到了黄色蜡状物质。然而,(2R,S)-DOTAP氯化物在室温下实际上不溶于乙腈。尝试重复这种所谓的结晶仅得到无定形物质,这是由热溶液冷却得到的油状物质的固化得到的。这不是结晶的事实也可以由作者显然未达到纯化效果,而不得不通过色谱纯化物质的事实显而易见。另参见对比实施例,其证实Felgner等未得到(2R,S)-DOTAP氯化物晶体。

[0035] 特别地,如果化合物打算用于胃肠道外用途,考虑到可能的微生物污染,包括用离子交换树脂处理的制备方法极有问题,这是因为相应的树脂是细菌理想的营养介质并且甚至是它们已经被杀灭后,仍存在内毒素污染的风险。

[0036] WO2006/056312A1记载了对映体纯的DOTAP氯化物。未公开详细的结晶方法。

[0037] 因此,本发明的目的是提供具有足够化学和物理稳定性的高纯度DOTAP氯化物盐和水合物的晶体。本发明的另一目的是提供具有长保存期,能够使其被用于制备药物制剂的这些晶体盐。对可以以工业规模进行的用于制备稳定形式的DOTAP氯化物盐和水合物的可重现的方法一直有很大需求。

[0038] 对映体纯的DOTAP氯化物可以通过对映体纯的起始材料获得,类似于针对外消旋体描述的方法,即通过(R)-或(S)-1-氯-2,3-二油酰氧丙烷,通过(R)-或(S)-1-LG-2,3-二油酰氧丙烷和离子交换(LG=离去基团)或通过(R)-或(S)-1-二甲基氨基-2,3-油酰氧丙烷。参见WO2006/056 312。

[0039] 可以提及的另外的制备方法是外消旋的DOTAP氯化物的外消旋体拆分。

[0040] 通过实验手段,现在已经惊奇地发现外消旋的还有对映体纯的DOTAP氯化物晶体可以以简单的方式获得,其具有高化学纯度,出色的稳定性以及适合以较大的技术规模来处理这些化合物的处理性质。以该方式获得的晶体产品在保护气体和室温下具有实际上无限制的稳定性。因此,它们适合作为组分或作为起始材料用于制备药剂。

[0041] 于是,本发明涉及稳定的外消旋的和对映体纯的DOTAP氯化物的晶体变体。

[0042] 稳定的晶体变体可以是结晶和部分结晶的形式。它们具有至今从未达到的至少约95%,优选>98%的纯度。而且,当在25℃下储存36个月或在40℃下储存12个月时,发现(2R,S)-DOTAP氯化物具有至今从未达到的由HPLC确定的相对于起始值高于99%重量和的面积%的稳定性(这方面参见表1和表1a)。

[0043] 为了确定DOTAP氯化物的纯度和含量,本领域技术人员可以容易地设定适合的HPLC方法。例如,带有Inertsil ODS-3柱(150x3mm,3μm)的Agilent 1200HPLC(GI Sciences)可以用作设备。典型的洗脱液为10mM在含水H₃PO₄中的戊烷磺酸钠盐(0.085%)(洗脱液A)和3.85mM在具有含水H₃PO₄的94%乙腈中的戊烷磺酸钠盐(0.085%)(洗脱液B)。适合的梯度如下:(运行时间25分钟,后运行时间5分钟;流速:1.5ml/分钟;220bar;50℃,进

样体积10 μ l)：

[0044]

	时间	洗脱液B	洗脱液A
梯度	0分钟	75%	25%
	1分钟	75%	25%
	6分钟	90%	10%
	7分钟	100%	0%
	20分钟	100%	0%
	25分钟	75%	25%
后运行时间	5分钟	75%	25%

[0045] DOTAP氯化物晶体变体具有低于每当量DOTAP氯化物1当量的结晶水或溶剂的含量。

[0046] (2R)-、(2S)-和(2R,S)-DOTAP晶体显示出出色且非常理想的处理性质,如明显降低的吸湿性和非常良好的自由流动能力。

[0047] (2R)-、(2S)-和(2R,S)-DOTAP晶体的熔点高于160℃,特别是介于183和185℃之间,并且熔化焓为至少-130J/g,优选高于-140J/g,特别是介于-143和-159J/g之间(这方面参见表3)。

[0048] 外消旋的(2R,S)-DOTAP氯化物晶体变体在粉末X射线衍射测定中显现出中等尖的带(这方面参见图1和表2)。晶体变体的2 θ 值为约6.5、12.6、13.4、19.5、20.2、21.5、25.2和29.8,其中选定的2 θ 值为约12.6、19.5、20.2、21.5和25.2。与图1中描述的X射线衍射图形对应的(2R,S)-DOTAP氯化物的晶体形式在本发明的范围内。

[0049] 同样获得了晶体形式的对映体纯的(2S)-DOTAP氯化物。晶体变体的2 θ 值为约6.5、12.8、19.5、19.8、20.2、20.7、21.6和25.3,其中选定的2 θ 值为约12.8、19.5、19.8、20.2和21.6(参见图2和表2)。与图2中描述的X射线衍射图形对应的(2S)-DOTAP氯化物的晶体形式在本发明的范围内。

[0050] 同样获得了晶体形式的对映体纯的(2R)-DOTAP氯化物。晶体变体的2 θ 值为约6.6、12.8、19.5、19.8、20.3、20.8、21.6和25.3,其中选定的2 θ 值为约12.8、19.5、19.8、20.3和21.6(参见图3和表2)。与图3中描述的X射线衍射图形对应的(2R)-DOTAP氯化物的晶体形式在本发明的范围内。

[0051] 本发明还涉及用于制备(2R)-、(2S)-和(2R,S)-DOTAP氯化物的晶体变体的方法,其特征在于将(2R)-、(2S)-和(2R,S)-DOTAP氯化物由非质子介质结晶。用于该目的的非质子介质可以是非质子溶剂或非质子溶剂的混合物,一种或多种非质子溶剂与质子溶剂或质子溶剂的混合物的混合物。

[0052] 适合的非质子溶剂为非质子的含氧溶剂,特别是醚,例如四氢呋喃、甲基四氢呋喃、二噁烷、二乙醚、二丙醚、二异丙醚和甲基叔丁醚;酮,例如丙酮、2-丁酮、甲基异丁酮、甲基异丙酮;以及酯,例如甲酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、碳酸二甲酯、碳酸二乙酯和1,3-二氧戊环-2-酮(1,3-dioxolidin-2-one)。

[0053] 优选的非质子溶剂为酮。

[0054] 适合的质子溶剂特别是醇,例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、2-丁

醇、叔丁醇、3-甲基1-丁醇和乙二醇、甲氧乙醇、乙氧乙醇。

[0055] 如果非质子介质为一种或多种非质子溶剂与质子溶剂的混合物,那么非质子溶剂可以是上述的非质子的含氧溶剂或腈(例如乙腈)。

[0056] 在各个情况下,溶剂可以纯的形式或混合物的形式使用,即可以以混合物的形式使用组中的各种非质子溶剂,也可以以彼此的混合物的形式使用非质子溶剂类型。

[0057] 如果非质子介质是一种或多种非质子溶剂和质子溶剂的混合物,那么根据应用条件、原料纯度和方法的目的(产量、产物纯度、结晶度),可以存在的质子溶剂多于0重量%至40重量%,优选10重量%至20重量%。优选地,应使用包含非常低量水的非质子介质。在特别优选的实施方案中,排除水。

[0058] 在本发明优选的实施方案中,丙酮或2-丙醇被用作非质子介质。在非常优选的实施方案中,使用丙酮和2-丙醇的混合物。一般地,2-丙醇和丙酮的混合物包含0-25%的2-丙醇。

[0059] 这里可以直接由反应溶液进行DOTAP氯化物的结晶,无需之前的纯化。同样地,DOTAP氯化物晶体可以通过无定形的、部分结晶或结晶材料的重结晶得到。

[0060] 在优选的实施方案中,用于制备其晶体形式的DOTAP氯化物是高化学和对映体纯的,优选的纯度约 \geq 约95%或更高,更优选为约98%或更高,甚至更优选约99%或更高。就这一点而言,在此制备DOTAP氯化物晶体使用非常纯的油酸作为反应物,这样导致高纯度的DOTAP氯化物,其比之前可得到的具有较低纯度的DOTAP氯化物更容易结晶。目前可获得的DOTAP氯化物中常见的主要杂质包括但不限于其它脂质或其衍生物。如今,油酸的实际PhEur纯度(因此作为“药品级质量”)仍仅为约65-88%。在此,通过非常纯的油酸,这意味着表现出约95%或更高,优选为约99%或更高的超纯质量。例如,适合的非常纯的油酸可以从RCA(批次0A 11.G.01.2007)或Acme Synthetic Chemicals(批次060528)商购。

[0061] 例如,对映体纯度可以通过确定旋光度来确定。

[0062] 在优选的实施方案中,采用适合的溶剂将用于制备其晶体形式的DOTAP氯化物从混合物中结晶或重结晶出来,溶剂的浓度范围为1份DOTAP氯化物比4份溶剂至1份DOTAP氯化物比100份溶剂,最优选的浓度范围为1份DOTAP氯化物比4份溶剂至1份DOTAP氯化物比10份溶剂。

[0063] DOTAP氯化物变体的结晶一般通过将制备的溶液缓慢冷却至温度低于30℃,例如通过以每分钟0.001℃至0.1℃,例如每分钟0.05℃或每分钟0.004℃的速率的冷却,使得冷却时间为约5至200小时,例如约10小时至50小时而具体完成的。具体的选择是将溶液加热至35℃,然后在12小时期间缓慢冷却至-12℃;或者将溶液加热至较低的温度(例如25℃);或者由室温开始而不加热,并且然后缓慢冷却例如10至50小时,优选至-12℃。晶体的形成或者自发进行,或者通过引入相应的DOTAP氯化物晶体变体进行。缓慢冷却可以通过本领域技术人员已知的任何方法实现。通常,使用低温恒温器。

[0064] 如之前提及的,所有DOTAP盐对氧化非常敏感且因此这样在本申请公开的制备方法中排除氧是优选的,例如通过使用惰性气氛,例如氮气气氛和/或使用具有低氧和过氧化物含量的溶剂。

[0065] 通过所述方法,使用无定形的或部分结晶的DOTAP氯化物作为起始材料用于重结晶,得到具有至今从未达到的纯度以及至今从未达到的稳定性的本质上的DOTAP氯化物晶

体。

[0066] 由于 (2R)-、(2S)-和 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体在规定的条件下具有出色的固体形式的稳定性并在实质上无限制的时间内具有恒定的和非常良好的质量,因此本发明还涉及 (2R)-、(2S)-和 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体用于制备药物制剂的用途。

[0067] 因此,本发明还另外涉及使用要求保护的 (2R)-、(2S)-和 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体形式而得到的药物组合物。这类药物组合物可以包含 (2R,S)-、(2S)-和 (2R)-DOTAP氯化物的晶体变体以及其它药物活性化合物和药物制剂通常使用的已知辅料,以及一种或多种溶剂。

[0068] 例如,这些药物组合物可以是脂质体、脂质体复合物、微乳液和纳米颗粒形式的,并且包括例如选自肽、核苷酸、疫苗或细胞生长抑制剂的活性化合物。

[0069] 本说明书使得本领域技术人员能够以全面的方式实施本发明。此外,以下实施例用于更好地理解本发明和用于说明本发明可能的变型。因此,这些实施例决不被认为是限制性的。

[0070] 以下实施例中提及的所有温度均以摄氏度显示。除非另外说明,含量数据以重量百分比给出。

[0071] 附图的简要说明

[0072] 图1显示了 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体的x-射线图谱,

[0073] 图2显示了 (2S)-DOTAP氯化物晶体的x-射线图谱,

[0074] 图3显示了 (2R)-DOTAP氯化物晶体的x-射线图谱,

[0075] 图4显示了无定形 (2R,S)-DOTAP氯化物的x-射线图谱,

[0076] 图5显示了 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体 (a)、(2R)-DOTAP氯化物晶体 (b) 和 (2S)-DOTAP氯化物晶体 (c) 与商购的 (2R,S)-DOTAP氯化物样品 (Avanti Polar Lipids) (d) 的x-射线图谱对比,

[0077] 图6显示了如Felgner等中所述,当其被冷却时, (2R,S)-DOTAP氯化物 (SM-0318-E) 在乙腈中的乳液,

[0078] 图7显示了如Felgner等中所述,已经冷却至-20℃后的 (2R,S)-DOTAP氯化物 (SM-0318-E) 在乙腈中的乳液,

[0079] 图8显示了如Felgner等中所述,冷却前的 (2R,S)-DOTAP氯化物 (SM-0364-E) 在乙腈中的乳液,

[0080] 图9显示了如Felgner等中所述,已经冷却至-20℃后的 (2R,S)-DOTAP氯化物 (SM-0364-E) 在乙腈中的乳液,

[0081] 图10显示了外消旋的 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体,

[0082] 图11显示了纯 (2R,S)-DOTAP氯化物晶体和纯 (2R)-DOTAP氯化物晶体以及两种晶体形式的混合物的相转变温度和熔点,

[0083] 图12显示了 (2R,S)-DOTAP氯化物 (顶部) 和 (2R)-DOTAP氯化物 (底部) 的DVS曲线: 无定形式: 右侧图; 结晶形式 (左侧图) (参见表征实施例5)。

[0084] 用于说明本发明的实施例

[0085] 关于实验条件的一般注释:

[0086] 为了晶体材料的沉淀最优化,在结晶和重结晶期间非常缓慢地冷却是重要的。

- [0087] 所有的试剂和溶剂具有非常低的含水量。
- [0088] 在氮气气氛下和封闭设备中进行所有的操作。
- [0089] 使用具有纯度超过95%，优选超过98%，甚至更优选超过99%的非常纯的油酸。
- [0090] X射线粉末衍射的测量参数如下：
- [0091] STOE X-射线粉末衍射
- [0092] 衍射：透射
- [0093] 单色仪：弯曲的锗 (Curved Germanium) (111)
- [0094] 辐射波长：1.54060Cu
- [0095] 检测器：线性位置敏感性检测器
- [0096] 扫描模式：Debye-Scherrer/移动位置敏感性检测器/固定的0 ω
- [0097] 如果使用不同的仪器或记录方法 (如反射或透射或者毛细管或窗)，或如果不同的记录条件 (例如大气湿度或温度) 占优势，那么每个峰可能出现略微的差别，这在X-射线粉末衍射研究中是常见的。本领域普通技术人员对这种略微的差别非常熟悉并且能够考虑到使用的方法容易地通过对给定的X-射线粉末衍射模式的严格比对来鉴定给定的材料。
- [0098] 制备实施例1：
- [0099] 外消旋的 (2R,S)-DOTAP氯化物 [(R,S)-1,2-二油酰-3-丙基三甲基氯化铵] 晶体的制备：
- [0100] 起始材料
- [0101] 使用以下化学物质：
- [0102] 来自SIGMA-ALDRICH的N,N'-羰基二咪唑，批次1252812
- [0103] 来自RCA的油酸，批次OA 11.G.01.2007, 99.1面积% (HPLC)，其中试验值可能是99.5%或者甚至更高，因为亚油酸 (主要杂质) 在UV中比油酸显示出更高的响应率。
- [0104] 来自MERCK EPROVA的 (R,S)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇，批次MSCH-103-A，
- [0105] 0.11%的水，99.4% (GC)
- [0106] 来自SIGMA ALDRICH的1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯，批次1076841，99.7% (GC)
- [0107] 来自LINDE的氯甲烷，批次61448
- [0108] 来自SIGMA-ALDRICH的碘化钠，批次1336385, 0.27%的水
- [0109] 来自SIGMA-ALDRICH的氧化铝，批次1336643
- [0110] 来自ICC的乙腈，批次0000426130, 100.0% (GC) <0.015%的水来自BRENNTAG SCHWEIZERHALL的正庚烷，批次0000278245, 96.4% (GC)
- [0111] 来自THOMMEN FURLER的2-丙醇，批次070920211487, 99.96% (GC)，0.03%的水
- [0112] 来自THOMMEN FURLER的丙酮，批次080609324212, 99.98% (GC)，0.16%的水
- [0113] (2R,S)-DODAP [(R,S)-1,2-二油酰-3-二甲基铵丙烷的合成]
- [0114] 在室温下，将2.41kg的N,N'-羰基二咪唑溶解于6.33kg无水乙腈中。将得到的溶液加热至25℃。然后在60分钟的时间内将4.0kg油酸泵入溶液中，同时通过改变添加速度 (形成二氧化碳气体) 将反应温度调节至低于35℃。添加完成后，在30℃下，再搅拌反应溶液90分钟 (气体发生结束)。然后加入11g的1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯，再加入0.83kg的外消旋的 (R,S)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇在0.37kg无水乙腈中的溶液。在30℃下持

续搅拌21小时。将得到的乳液冷却至25℃并停止搅拌。出现两层。分离较低的层,在1mbar/25℃下脱气200分钟,最后用11.7kg正庚烷稀释。向溶液中加入1.21kg碱性氧化铝,在0℃下搅拌悬浮液3小时。过滤悬浮液并用1.5kg之前冷却至0℃的正庚烷洗涤过滤残渣。将合并的滤液混匀得到15.9kg的4.08kg纯(2R,S)-DODAP在正庚烷中的溶液(批号MBA-116,试验值25.7%,产率:88.9%)。

[0115] 另一批以相同的方式进行,得到16.6kg的3.52kg纯(2R,S)-DODAP在正庚烷中的溶液(批号MBA-117,试验值:21.2%,产率:88.6%)。

[0116] (2R,S)-DOTAP氯化物的合成

[0117] 将23.4kg的3.52kg纯(2R,S)-DODAP在正庚烷中的溶液(15.9kg的批号MBA-116和7.5kg的批号MBA-117)装入反应容器并在60℃的夹套温度和减压下蒸馏掉正庚烷。当真空保持稳定在8mbar时,调节夹套温度至25℃。然后加入7.0kg的2-丙醇,然后加入3.1g碘化钠。然后调节反应温度至30℃并且以恒定绝对压力为1200mbar的氯甲烷气氛代替氮气气氛。在这些条件下搅拌反应混合物137小时,直至(2R,S)-DODAP至(2R,S)-DOTAP氯化物的甲基化反应完成(96%的转化率)。消耗氯甲烷1.39kg。

[0118] (2R,S)-DOTAP氯化物的结晶

[0119] 在25℃下,用35.8kg无水丙酮稀释如上文所述制备的(2R,S)-DOTAP氯化物在2-丙醇中的溶液。如上文指出的,2-丙醇的量为7kg,而基于计算在溶液中DOTAP氯化物的量为3.64kg。将清澈的溶液缓慢冷却至-12℃,冷却速率为每分钟0.05℃,即在12又1/3小时的时间段内进行冷却。再将得到的悬浮液保持在-12℃下14小时并然后通过预冷的过滤器(-15℃)过滤。用6.0kg冷的无水丙酮(-18℃)洗涤(2R,S)-DOTAP氯化物粗品两次。

[0120] 未检查在这个特定的实验中此时获得的晶体变体。然而,由其中此时的粗产物被分离的较早的相应实验可知,晶体变体为(2R,S)-DOTAP晶体的变体。

[0121] 为了得到甚至更纯的产物,即除去某些少量杂质,进行重结晶的步骤。

[0122] (2R,S)-DOTAP氯化物的重结晶

[0123] 在封闭的过滤器中,在35℃下将湿的(2R,S)-DOTAP氯化物粗品溶解在44.1kg的无水丙酮和3.5kg的2-丙醇的混合物中。将溶液转移至反应容器并调节至0℃。以每分钟0.004℃的冷却速率将溶液缓慢冷却至-12℃,即在50小时的时间段内进行冷却。再将得到的悬浮液保持在-12℃下16小时并然后用冷却的过滤器-干燥器过滤(-15℃)。用0.8kg冷的无水丙酮(-18℃)洗涤过滤残渣两次并通过施用真空干燥。在干燥期间,使过滤器-干燥器温热至室温。当真空稳定在7.9mbar时,干燥完成。产量:3.46kg外消旋的(2R,S)-DOTAP氯化物晶体((2R,S)-DOTAP晶体,批号MBA-118,试验值:100.0%,产率:37.8%,参照(R,S)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇,HPLC纯度:99.9%面积)。

[0124] 图10中可以见到(2R,S)-DOTAP氯化物晶体的照片。

[0125] 制备实施例2:

[0126] 对映体纯的(2R)-DOTAP氯化物[(R)-1,2-二油酰-3-丙基三甲基铵氯化物]晶体的制备:

[0127] 起始材料

[0128] 使用以下化学物质:

[0129] 来自SIGMA-ALDRICH的N,N'-羰基二咪唑,批次1252812

[0130] 来自ACME SYNTHETIC CHEMICALS的油酸,批次060528,97.8% (HPLC)

[0131] 来自DAISO的(R)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇,批次RMA062151,0.11%的水,99.6% (GC)

[0132] 来自SIGMA ALDRICH的1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯,批次1076841,99.7% (GC)

[0133] 来自LINDE的氯甲烷,批次61448

[0134] 来自SIGMA-ALDRICH的碘化钠,批次1336385,0.27%的水

[0135] 来自SIGMA ALDRICH的乙腈,批次7219K,100.0% (GC),0.005%的水

[0136] 来自BRENNTAG SCHWEIZERHALL的正庚烷,批次0000278245,96.4% (GC)

[0137] 来自THOMMEN FURLER的2-丙醇,批次070629176434,99.96% (GC),0.016%的水

[0138] 来自THOMMEN FURLER的丙酮,批次061201101946,99.98% (GC),0.10%的水

[0139] (2R)-DODAP[(R)-1,2-二油酰-3-二甲基铵丙烷]的合成

[0140] 在室温下,将1.63kg的N,N'-羰基二咪唑溶解在4.3kg的无水乙腈中。将溶液加热至25℃。然后在60分钟时间内将2.7kg油酸泵入溶液中,同时通过变化添加速度(形成二氧化碳气体)将反应温度调节至低于35℃。添加完成后,再将反应溶液在30℃下搅拌105分钟(气体发生结束)。然后加入7.5g的1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯,然后加入0.56kg的对映体纯的(R)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇在0.25kg无水乙腈中的溶液。在30℃下持续搅拌19小时。将得到的乳液冷却至10℃并停止搅拌。出现两层。分离较低的层,并在0.1mbar/20℃下脱气30分钟,最后用9.7kg正庚烷稀释。在0℃下搅拌悬浮液1.5小时并过滤得到12.3kg的2.66kg纯(2R)-DODAP在正庚烷中的溶液(批号MBR-001,试验值:21.6%,产率:88.4%)。

[0141] (2R)-DOTAP氯化物的合成

[0142] 将12.2kg的2.66kg纯(2R)-DODAP在正庚烷中的溶液(批号MBR-001)装入反应容器中并在60℃的夹套温度和减压下将正庚烷蒸馏出来。当真空保持稳定在1mbar,将夹套温度调节至20℃。然后加入3.26kg的2-丙醇,接着加入1.4g碘化钠。然后将反应温度调节至30℃并以具有1250mbar的恒定绝对压力的氯甲烷气氛替代氮气气氛。在这些条件下搅拌反应混合物330小时,直至(2R)-DODAP向(2R)-DOTAP氯化物的甲基化反应完成(97%转化率)。消耗氯甲烷0.58kg。

[0143] (2R)-DOTAP氯化物的结晶

[0144] 在25℃下用16.2kg无水丙酮稀释如上文所述制备的(2R)-DOTAP氯化物在2-丙醇中的溶液。如上文所指出的,2-丙醇的量为3.26kg,而基于计算,溶液中DOTAP氯化物的量为2.78kg。以每分钟0.05℃的冷却速率将清澈的溶液缓慢冷却至-12℃,即在12又1/3小时的时间段内进行冷却。再将得到的悬浮液保持在-12℃下1小时并然后通过预冷的过滤器(-12℃)过滤。用3.2kg冷的无水丙酮(-18℃)洗涤(2R)-DOTAP氯化物粗品两次。结晶产物为(2R)-DOTAP晶体。

[0145] 未检查在这个特定试验中此时得到的晶体变体;然而,由其中此时的粗产物被分离的较早的相应的实验可知,晶体变体为(2R)-DOTAP晶体的变体。

[0146] 为了得到甚至更纯的产物,即除去某些少量杂质,进行重结晶的步骤。

[0147] (2R)-DOTAP氯化物的重结晶

[0148] 在封闭的过滤器中,在35℃下将湿的 (2R)-DOTAP氯化物粗品溶解在20.5kg的无水丙酮和1.63kg的2-丙醇的混合物中。将溶液转移至反应容器并调节至25℃。以每分钟0.05℃的冷却速率将溶液缓慢冷却至-12℃,即在12又1/3小时的时间段内进行冷却。再将得到的悬浮液保持在-12℃下9小时并然后用冷却的过滤器-干燥器(-12℃)过滤。用3.2kg冷的无水丙酮(-18℃)洗涤过滤残渣两次并通过施用真空干燥。在干燥期间,使过滤器-干燥器温热至室温。当真空稳定在0.6mbar时,干燥完成。产量:1.47kg对映体纯的 (2R)-DOTAP氯化物晶体(批号MBR-002,试验值:99.7%,产率:44.7%,参照(R)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇,HPLC纯度:99.9%面积)。

[0149] 制备实施例3:

[0150] 对映体纯的 (2S)-DOTAP氯化物[(S)-1,2-二油酰-3-丙基三甲基铵氯化物]结晶的制备:

[0151] 以与(R)-DOTAP氯化物相同的方式制备 (2S)-DOTAP氯化物[(S)-1,2-二油酰-3-丙基三甲基铵氯化物](参见上文),正好以对映体纯的起始材料(S)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇(来自DAISO的批次SMA062281,0.14%的水,GC:99.8%;所有别的化学物质相同)开始并生成1.67kg对映体纯 (2S)-DOTAP氯化物结晶(批号MBS-002,试验值:99.6%,产率:50.4%,参照(S)-3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇,HPLC纯度:100.0%面积)。

[0152] 表征实施例1

[0153] 稳定性

[0154] 为了确定(2R,S)-DOTAP氯化物晶体的稳定性,将物质在25℃和60%的相对湿度下(表1)或在40℃和75%的相对湿度下(表1a)排除空气储存。以定期间隔测定(2R,S)-DOTAP氯化物的剩余含量并引述其与初始值对比。

[0155] 使用以下方法借助HPLC确定DOTAP氯化物的纯度和含量:

[0156] HPLC设备: Agilent 1200HPLC

[0157] 柱: ODS-3:150x3mm,3μm.GI Sciences:Inertsil

[0158] 洗脱液A: 10mM在0.085%ic含水H₃PO₄中的戊烷磺酸钠盐

[0159] 洗脱液B: 3.85mM在94%乙腈中的戊烷磺酸钠盐,所述乙腈含有0.085%ic含水H₃PO₄

梯度:	0 分钟	75% B
	1 分钟	75% B
	6 分钟	90% B
	7 分钟	100% B
	20 分钟	100% B
	25 分钟	75% B

[0160]

[0161] 后运行时间: 5分钟 75%B

[0162] 运行时间: 25分钟

[0163] 流速: 1.5ml/分钟

[0164] 压力: 大约220bar

[0165] 柱温: 50℃

[0166] 进样体积: 10 μ l

[0167] 得到以下数值:

[0168] 可以在任意需要的时间重复确定稳定性, 表1和1a显示的数值是可重复的。

[0169] 表1:

[0170] 储存条件: 25 $^{\circ}$ C

(2R, S)-DOTAP 氯化物晶体	以月计的暴露时间						
	0	3	6	9	12	24	36
面积%	99.7	99.6	99.5	99.2	99.5	99.7	99.3
重量%	99.5	99.7	99.4	99.2	99.5	99.5	99.7

[0172] 上述稳定性数据证实DOTAP氯化物晶体是稳定的物质。就25 \pm 2 $^{\circ}$ C下储存的样品而言, 甚至36个月之后, 也没有观察到明显的降解。

[0173] 表1a:

[0174] 储存条件: 40 $^{\circ}$ C

(2R, S)-DOTAP 氯化物晶体	以月计的暴露时间				
	0	3	6	9	12
面积%	99.7	99.6	99.4	99.3	99.4
重量%	99.5	99.6	99.6	98.9	99.7

[0176] 上述稳定性数据证实DOTAP氯化物晶体是稳定的物质。就40 \pm 2 $^{\circ}$ C下储存的样品而言, 即使12个月之后, 也没有观察到明显的降解。

[0177] (2R)-和(2S)-DOTAP氯化物晶体显示出相当好的稳定性数值。

[0178] 表征实施例2

[0179] 粉末X-射线图

[0180] 为了表征DOTAP氯化物晶体的结构性质(晶体变体), 记录这些物质的粉末X射线图(衍射图谱)。

[0181] (2R, S)-、(2R)-和(2S)-DOTAP氯化物晶体给出具有中等尖的带的图谱, 其对脂质具有相对良好的分辨率。图谱显示高晶体含量。在偏振显微镜下看不到无定形组分。

[0182] 图1、图2和图3中显示了图谱的实例。为了对比, 图4中显示了可商购的无定形样品的图谱(无定形)。图5显示了与可商购的(2R, S)-DOTAP氯化物样品(Avanti Polar Lipids)(d)相比, (2R, S)-DOTAP氯化物晶体(a)、(2R)-DOTAP氯化物晶体(b)和(2S)-DOTAP氯化物晶体(c)的x-射线图谱比较。

[0183] 表2列出了选定的外消旋的DOTAP氯化物和对映体纯的DOTAP氯化物的各种晶体变体的2 θ 值:

[0184] 表2:

	类型		选定的 2 θ 值
	(2R, S)-DOTAP	外消旋的	12.6、19.5、20.2、21.5 和 25.2
[0185]	(2S)-DOTAP	对映体纯的	12.8、19.5、19.8、20.2 和 21.6
	(2R)-DOTAP	对映体纯的	12.8、19.5、19.8、20.3 和 21.6

[0186] 表征实施例3

[0187] 熔点和熔化焓

[0188] DOTAP氯化物晶体的熔点和熔化焓是通过示差扫描量热法 (DSC) 确定的 (30-350 °C, 5.0 °C/分钟, N₂ 80ml/分钟)。

[0189] 得到的外消旋的 (2R, S)-和对映体纯的 (2R)-和 (2S)-DOTAP氯化物的熔点和熔化焓列在表3中。

[0190] 表3:

类型		熔点		熔化焓
		开始	峰值	
[0191] (2R, S)-DOTAP	外消旋的	161.0 °C	183.5 °C	-143.7 J/g
(2R)-DOTAP	对映体纯的	160.1 °C	183.6 °C	-155.4 J/g
(2S)-DOTAP	对映体纯的	159.2 °C	184.7 °C	-158.4 J/g

[0192] 表征实施例4

[0193] 相转变温度和焓

[0194] DOTAP氯化物晶体的相转变温度和焓是通过示差扫描量热法 (DSC) 确定的 (30-350 °C, 5.0 °C/分钟, N₂ 80ml/分钟)。

[0195] 除了熔点 (参见表征实施例3), 观察到几个向晶体和液晶相的转变点。外消旋的 (2R, S)-和对映体纯的 (2R)-和 (2S)-DOTAP氯化物的相应的相转变温度和焓列在表4中。

[0196] 表4:

类型		(2R, S)-DOTAP 外消旋的	(2R)-DOTAP 对映体纯的	(2S)-DOTAP 对映体纯的
第 1 转变	开始	49.8 °C	40.9 °C	41.0 °C
	峰值	57.4 °C	42.7 °C	43.0 °C
	焓	-58.2 J/g	-14.1 J/g	-13.5 J/g
第 2 转变	开始	64.7 °C	52.4 °C	51.6 °C
	峰值	66.2 °C	60.7 °C	60.3 °C
	焓	-25.0 J/g	-38.0 J/g	-37.0 J/g
第 3 转变	开始	-	81.9 °C	81.6 °C
	峰值	-	84.0 °C	83.8 °C
	焓	-	-33.9 J/g	-33.1 J/g

[0198] 当对纯 (2R, S)-DOTAP氯化物晶体和纯 (2R)-DOTAP氯化物晶体的混合物进行DSC实验时, 观察到外消旋体和对映体的所有相转变温度。图11说明了纯 (2R, S)-DOTAP氯化物晶体和纯 (2R)-DOTAP氯化物晶体以及比例为100:50和63:100的两种晶体形式的混合物的相转变温度和熔点。这些比例对应于 (2S)-DOTAP氯化物在混合物中的含量为33.3mol% 和 19.3mol%。

[0199] 结论:

[0200] 对映体纯的DOTAP氯化物晶体和外消旋的DOTAP氯化物晶体的晶体变体是不同的。

[0201] 表征实施例5

[0202] 取决于相对湿度的吸水性

[0203] 使用Projekt Messtechnik SPS 11-100n水蒸汽吸着分析仪通过动态湿气吸着(DVS)确定DOTAP氯化物的吸水性。将样品置于微量天平顶部上的铝坩埚中,并使其在25℃和0%r.h.(相对湿度)下平衡过夜,之后将它们暴露于25℃下的两次加湿/干燥循环中,所述循环具有 $\Delta r.h. = 5\%h^{-1}$ 的扫描速率和极值下的“isohumid”平衡周期。

[0204] 考察了(2R,S)-DOTAP氯化物晶体、(2R)-DOTAP氯化物晶体、无定形(2R,S)-DOTAP氯化物和无定形(2R)-DOTAP氯化物样品。

[0205] 结果:

[0206] DVS曲线的对比(参见图12:第一循环为实线,第二循环为虚线)指出了晶体和无定形样品之间的特征性区别:晶体样品(图12的左侧图)在低r.h.下表现出稳定的重量,而无定形样品(图12的右侧图)的重量刚好高于0%r.h.就已经增加。此外,对开始已经是晶体的样品而言,在两次循环中观察到明显较大的滞后现象。还可以观察到外消旋的(图12的顶部图)和对映体纯的(图12的底部图)样品之间的差别:外消旋的样品在大约10-15%r.h.下水含量急剧增加,而对映体纯的样品在大约20-25%r.h.下才表现出这种情况。

[0207] 对比实施例1

[0208] 在本文中重复的Felgner等的实验中,已经选择的所有实验条件与US 5,264,618(Felgner等)的实施例5,第27栏,第15至47行的内容保持相近。

[0209] 将31.5g的油酰氯(FLUKA 0733IAH)溶解于125ml氯仿中,在4℃冷却下、1¹/₂小时的时间内,将其滴加至5.0g溶解于37.5ml氯仿和25ml吡啶中的3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇中。搅拌黄色溶液过夜。然后加入125ml冷水和125ml二乙醚。用100ml的0.5N HCL洗涤有机相两次并还用100ml 0.5N碳酸氢钠溶液洗涤有机相两次。加入39g无水硫酸钠并过滤由此获得的悬浮液并用100ml氯仿洗涤。然后在40℃下减压浓缩滤液。得到40.1g褐色液体(SM-0318-A),通过HPLC测定其(2R,S)-DODAP含量为24.3%w/w。在60℃下进一步减压干燥使得重量减至31.2g。

[0210] 如下所述,通过硅胶柱色谱纯化31.0g该物质:

[0211] 硅胶:129g(相对于(2R,S)-DODAP的量计算硅胶的量),Merck 60F 63-200um

[0212] 柱:直径4cm,高度60cm

[0213] 流速:约8ml/分钟

[0214] 流动相首先使用1,500ml氯甲烷(组分1-27),然后使用1,000ml氯甲烷/甲醇95:5(组分28-47)且最后使用1,000ml甲醇。收集组分并根据它们的TLC分析合并。因此,将组分4-33一起在减压下浓缩。得到10.8g褐色油(SM-0318-B),通过HPLC测定其(2R,S)-DODAP的含量为65.6%w/w。组分34-42得到12.6g褐色油(SM 0318-D),通过HPLC测定其(2R,S)-DODAP的含量为54.2%w/w。

[0215] 将10.4g氯甲烷加到由9.6g在高压玻璃管中的组分4-33(SM-0318-B)获得的化合物中。然后封闭玻璃管并在50℃下加热褐色溶液过夜至形成乳液。然后打开管并通过蒸发除去残余的氯甲烷。得到8.0g黄色蜡状物质(SM-0318-E),通过HPLC测定其(2R,S)-DOTAP氯化物的含量为65.0%w/w,(2R,S)-DODAP的含量为1.3%w/w。

[0216] 将14.0g乙腈加入该蜡状物质(SM-0318-E)中。用80ml乙腈(为了得到约1:12的固体与溶剂的比例)将这样获得的乳液转移至烧瓶,并冷却至20℃。未能观察到结晶。在20℃

下得到固化的蜂蜜样黄褐色物质,其甚至在仅略微加热时就开始变成粘稠的褐色物质。

[0217] 结论

[0218] 数据证明根据上述过程制备的1,2-二油酰-3-丙基甲基铵氯化物((2R,S)-DOTAP氯化物)不能以结晶形式得到,上述过程是根据于US 5,264,618 (Felgner等)的实施例5,第27栏,第15至47行的内容。

[0219] 还参见图6和7,它们分别说明了在冷却时的(2R,S)-DOTAP氯化物(SM-0318-E)在乙腈中的乳液,以及已经冷却至-20℃后的(2R,S)-DOTAP氯化物(SM-0318-E)在乙腈中的乳液。

[0220] 对比实施例2

[0221] 再次重复进行Felgner等的实验,证实了与上文相同的发现。

[0222] 已经选择的所有实验条件尽可能保持与US 5,264,618 (Felgner等)在实施例5,第27栏,第15至47行公开的(2R,S)-DOTAP氯化物的制备/分离条件接近。

[0223] 在该实验中,已经特别将重点放在反应物的规模、无水吡啶的使用、甲基化时间和管的温度。

[0224] 在US 5,264,618 (Felgner等)的实施例5中,未能发现关于使用的原材料的有效数据。为了重复工作,使用了来自SIGMA-ALDRICH的油酰氯(产品编号:367850,批次:0733IAH)和来自TCI的3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇(产品编号:D2072,批次:FGC01EF)。二乙醚(产品编号8.22270.1000,批号K33237470)、硫酸钠(产品编号8.22286.5000,批号TA603386)、海砂(产品编号1.07711.5000,批号TA1417811)、硅胶60F 63-200 μ m(产品编号1.07734.9025,批号TA1570234)和乙腈(产品编号1.15500.1000,批号K38172000)均来自Merck KGaA。过分子筛的氯仿(产品编号34854,批号8178C)和吡啶,H₂O \leq 0.005% (产品编号82704,批号1166921)来自Fluka。

[0225] 在室温下将5.0g的3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇溶解于25ml无水吡啶和37.5ml新鲜蒸馏的氯仿中。将溶液冷却至4℃。将31.5g的油酰氯溶解于125ml蒸馏的氯仿中。在1小时内将油酰氯溶液滴加至冷的3-(二甲基氨基)-1,2-丙二醇溶液。搅拌黄色溶液过夜。然后加入125ml冷水和125ml二乙醚。用100ml HCl (0.5N)洗涤有机相两次并还用100ml碳酸氢钠溶液(0.5N)洗涤两次。然后加入39g无水硫酸钠。过滤这样得到的悬浮液并用20ml氯仿洗涤残余固体。然后减压浓缩滤液。得到31.5g褐色液体(SM 0364A),其经HPLC测定的1,2-二油酰-3-二甲基铵丙烷(DODAP)的含量为62.2%w/w。

[0226] 如下所述制备硅胶柱:

[0227] 柱: 直径4cm,高度60cm

[0228] 硅胶: 200g硅胶和42.6g海砂(相对于DODAP的量计算)

[0229] 流速: 约7ml/分钟

[0230] 将15g上文制备的材料(SM 0364A)滴加到硅胶柱上并用50ml氯仿冲洗。首先用1,000ml氯仿洗脱柱,然后用1,000ml氯仿/甲醇95/5洗脱,再用1,250ml氯仿/甲醇90/10洗脱,并最后用2,500ml甲醇洗脱。收集组分并根据其硅胶板(Merck 60F254)上的薄层色谱分析合并,所述硅胶板(Merck 60F254)上薄层色谱分析以体积比为50/15/5/5/2的氯仿/丙酮/甲醇/乙酸/水展开,通过碘检测。减压浓缩后,合并的11-17得到4.88g (SM 0364B),其DODAP的含量为73.2%w/w;组分18-27得到7.24g (SM 0364C),其DODAP的含量为68.2%w/w;组分

28-31得到1.9g (SM 0364D), 其DODAP的含量为40.4%w/w, 所有的都通过HPLC测定。得到总计93.5%的质量平衡。

[0231] 将1.0g获自最纯的组分11-17 (SM-0364-B) 的化合物加入可加高压、厚壁硼硅酸盐玻璃管 (Sigma Aldrich Z181072-1EA) 中。然后使10ml氯甲烷浓缩并进入玻璃管。然后将玻璃管紧密封闭并在70℃下保持72小时。然后将玻璃管冷却至0℃, 打开, 并蒸发除去残余的氯甲烷。这样得到1.11g黄褐色蜡状物质 (SM 0364E), 其 (2R, S) -DOTAP氯化物的含量为69.3%w/w, 并显示其DODAP的含量为1.8%w/w, 油酸含量为2.7%w/w (所有均通过HPLC测定)。

[0232] 将10ml乙腈加入如上文所述获得的1.08g化合物中 (SM 0364E) 并加热至50℃。将这样获得的乳液冷却至-20℃。未能观察到结晶。在-20℃下得到黄褐色蜡状物质。

[0233] 结论:

[0234] 如上文显示的, 当重复US 5,264,618 (Felgner等) 的最接近的实施方案时, 仅可以得到无定形 (2R, S) -DOTAP氯化物。

[0235] 还参见图8和9, 它们分别显示了冷却前 (2R, S) -DOTAP氯化物在乙腈中的乳液 (SM-0364-E), 以及已经被冷却至-20℃后的 (2R, S) -DOTAP氯化物在乙腈中的乳液 (SM-0364-E)。

[0236] 无需进一步详细阐述, 相信本领域技术人员利用之前的说明能够以最完全的程度实施本发明。因此, 前述优选的具体实施方案被理解为仅是举例说明, 且无论如何都不是对其余的公开内容的限制。

[0237] 通过以本发明一般性或特别地描述的反应物和/或操作条件替换前述实施例中使用的那些, 重复前述实施例可以取得相似的成功。

[0238] 根据前文的说明, 本领域技术人员可以容易地确定本发明的本质特征且不背离其精神和范围, 能够对本发明进行各种变化和修改以使其适应不同的用途和条件。

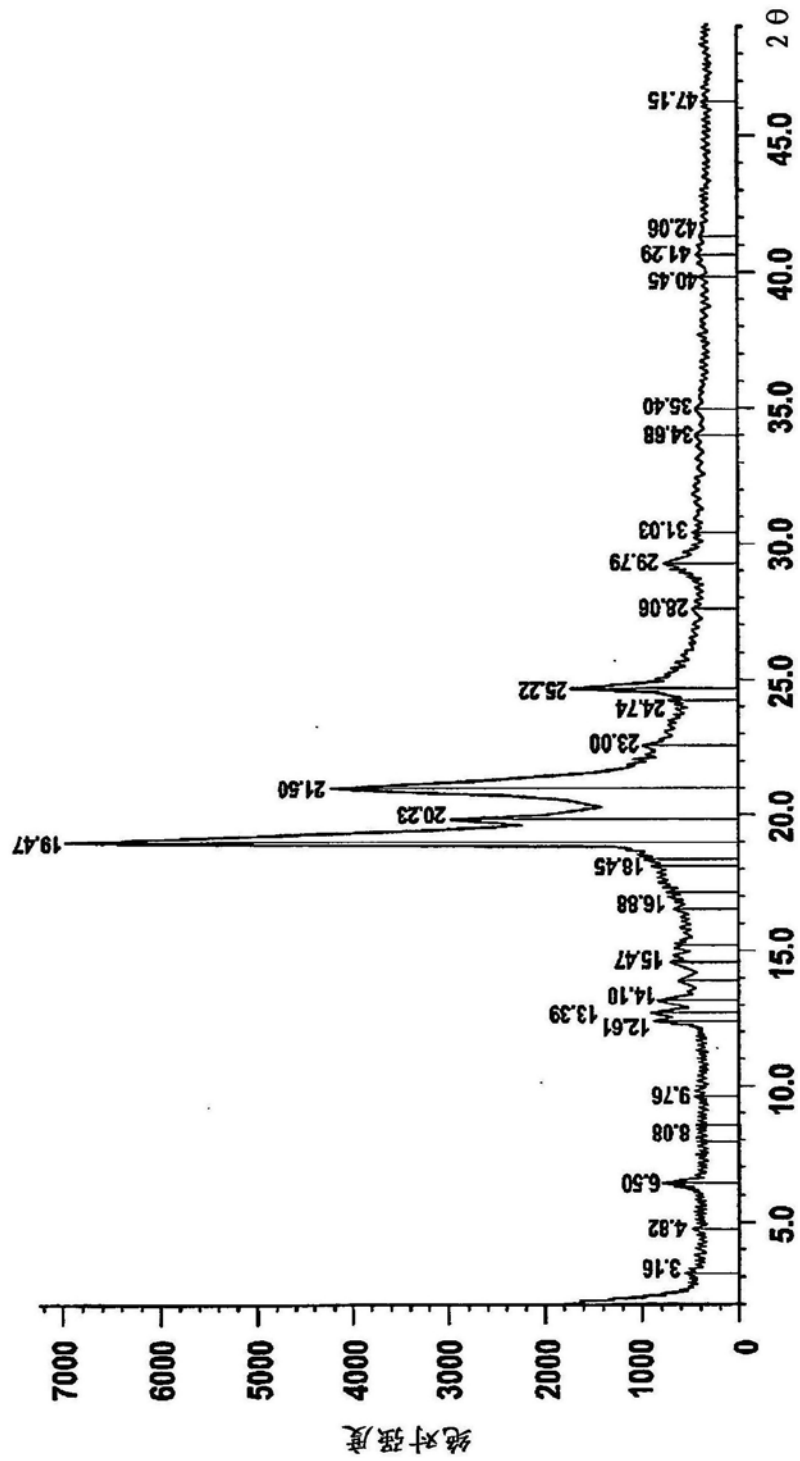


图1

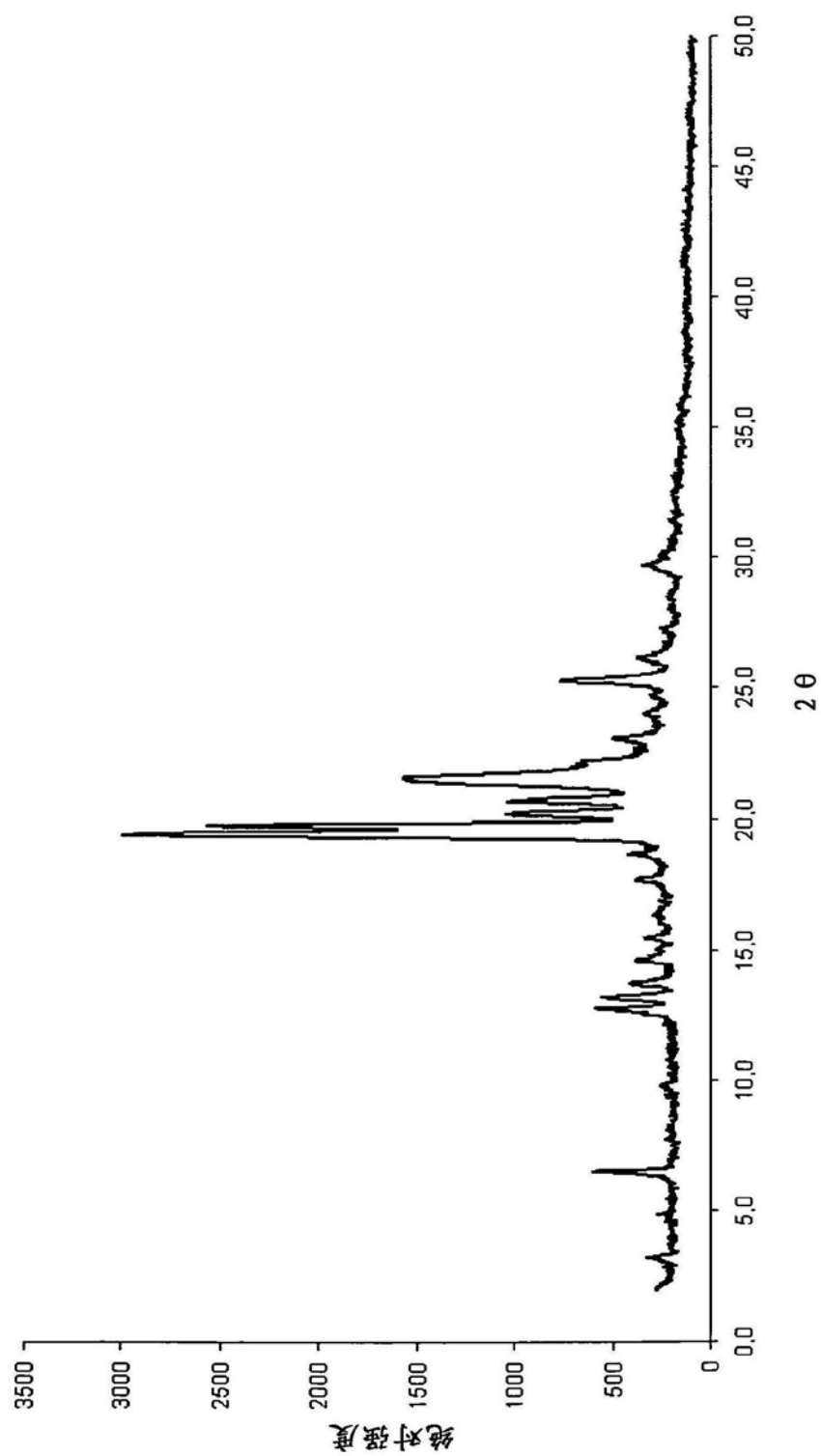


图2

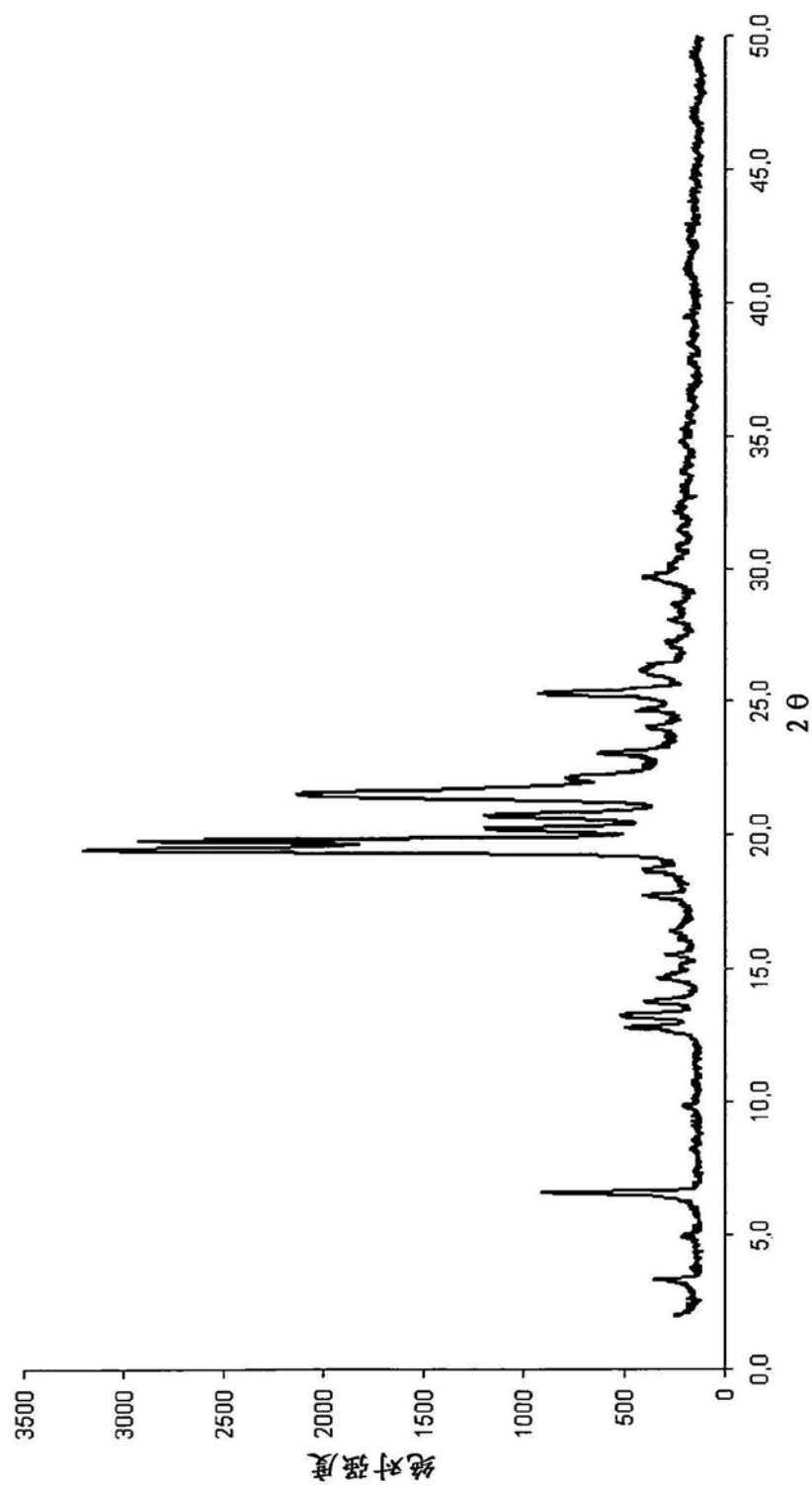


图3

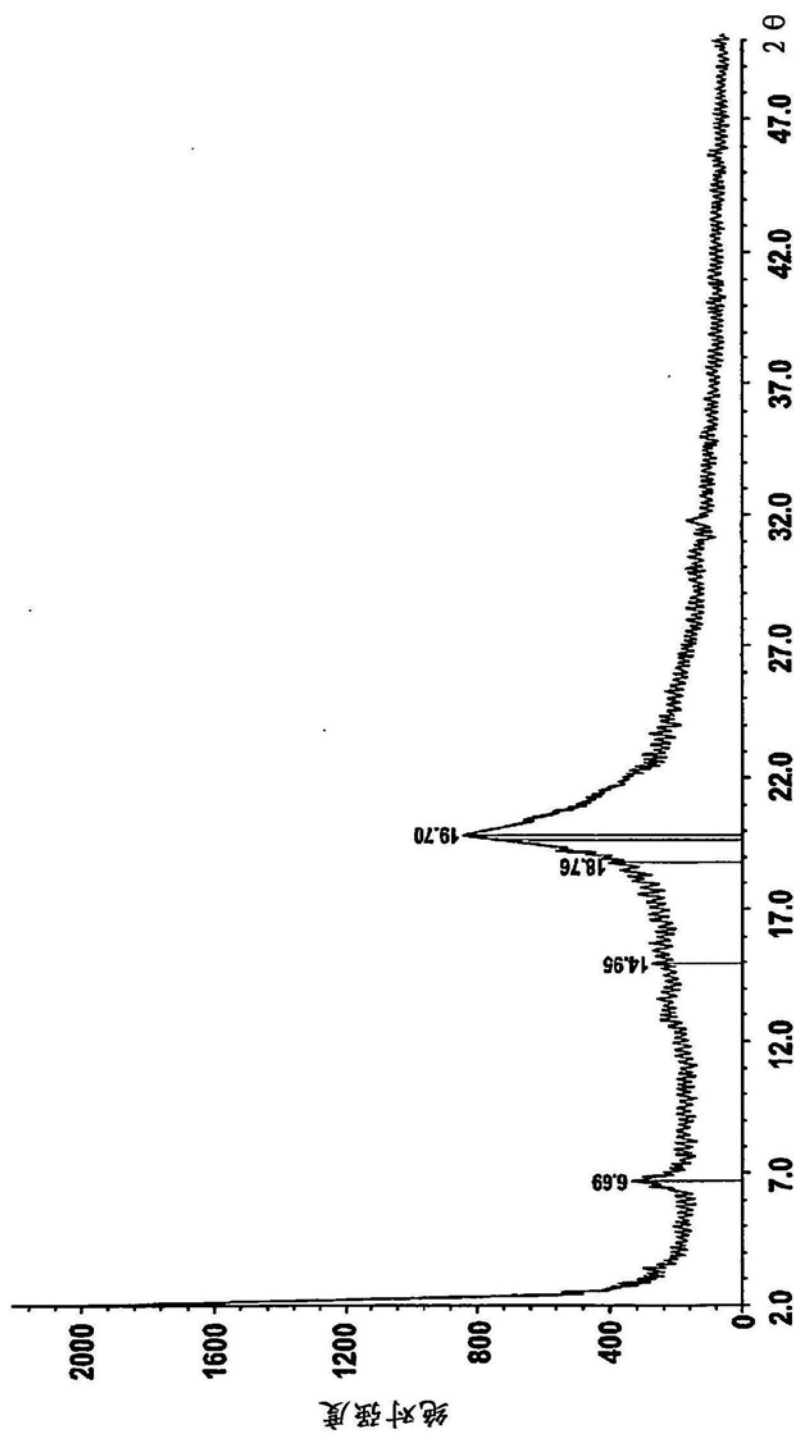


图4

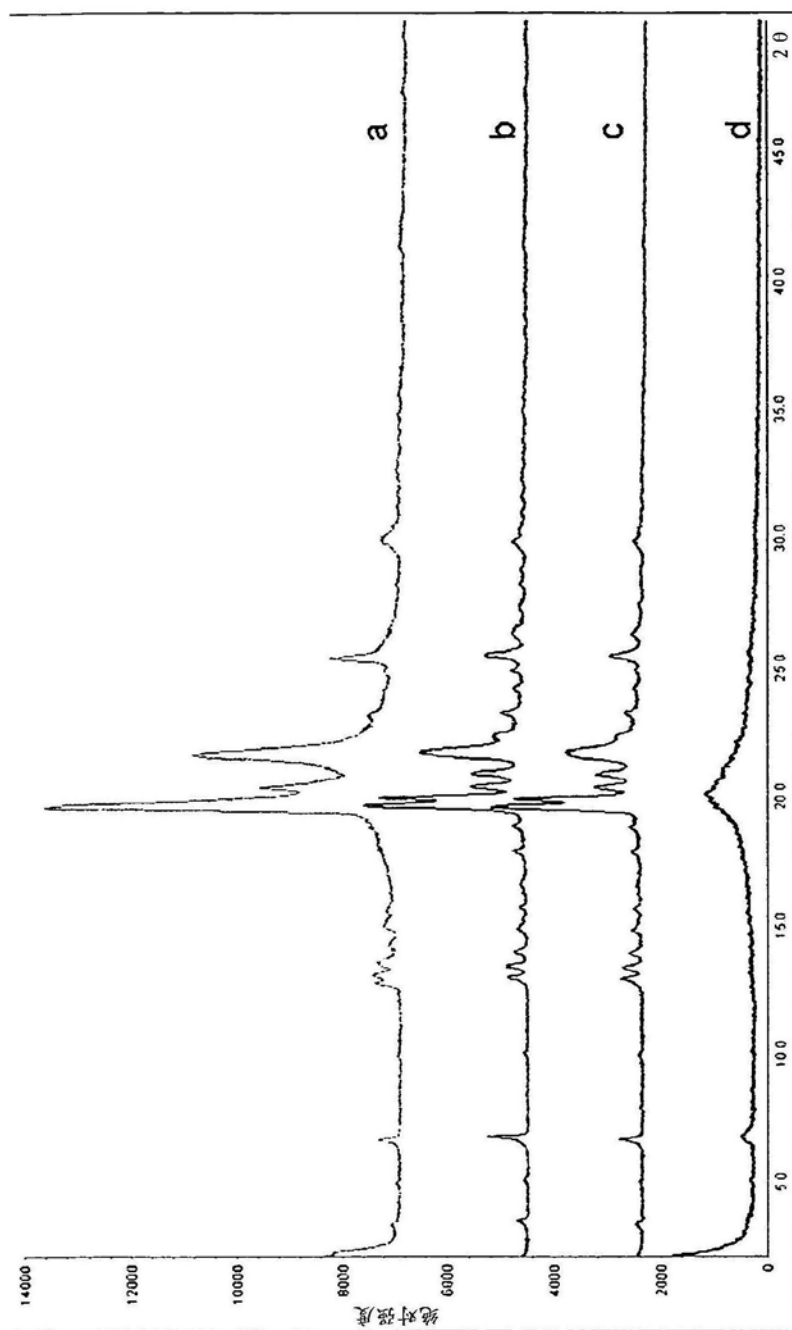


图5

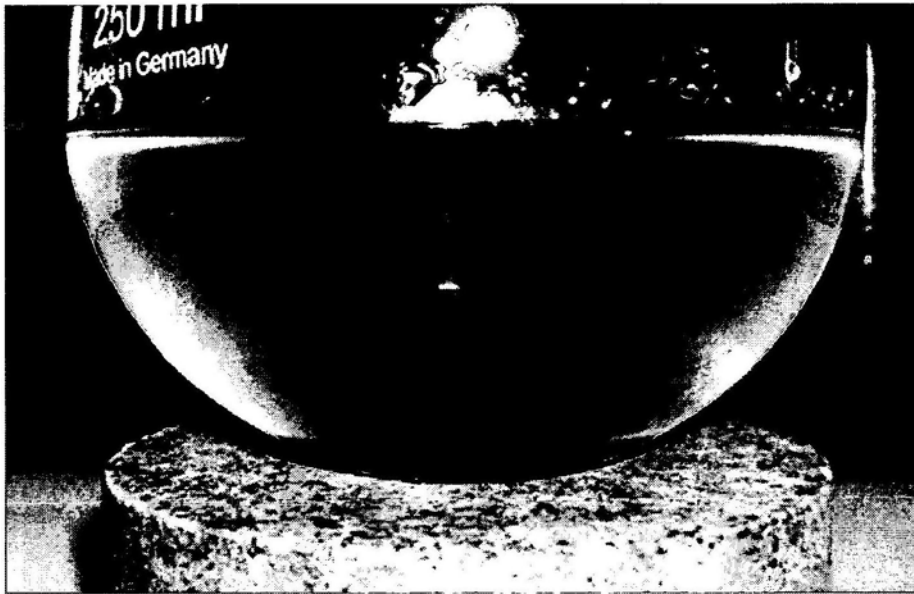


图6

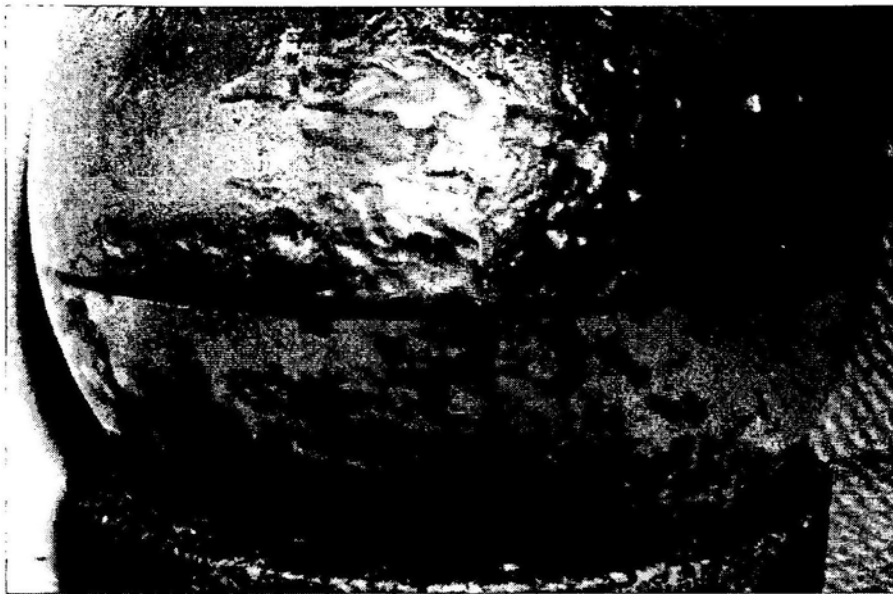


图7

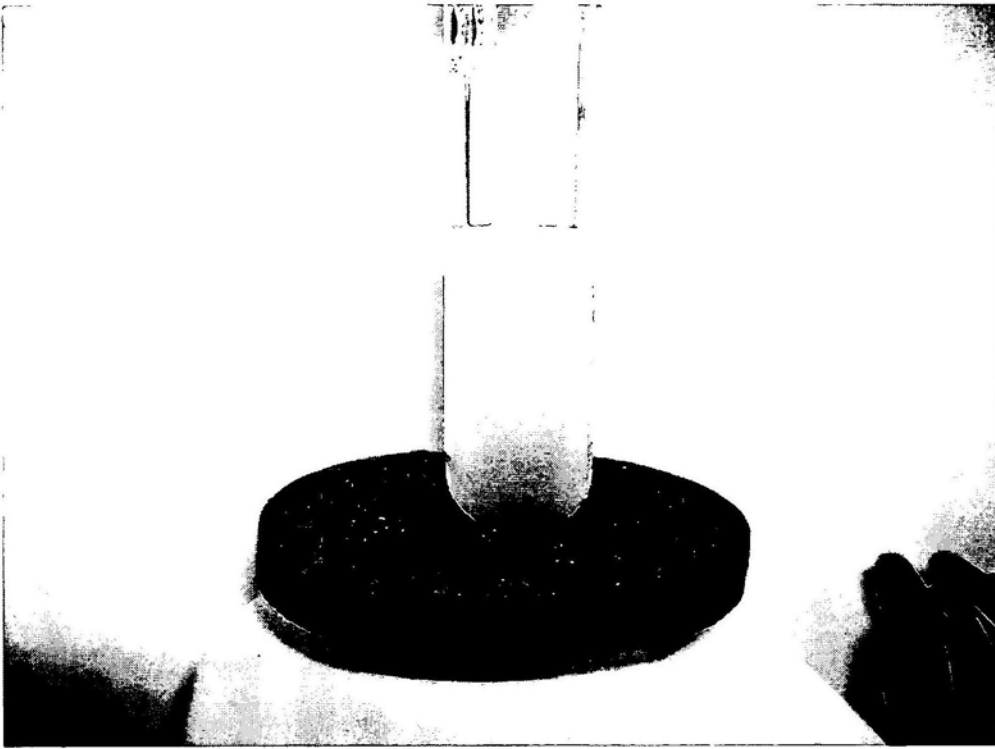


图8

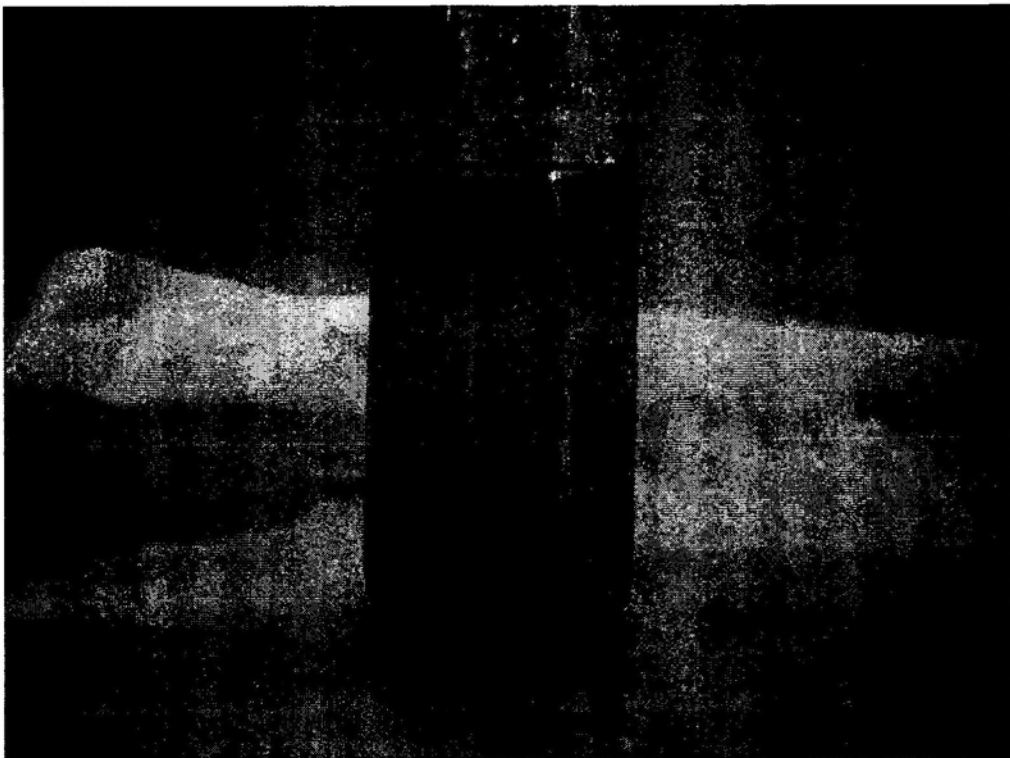


图9

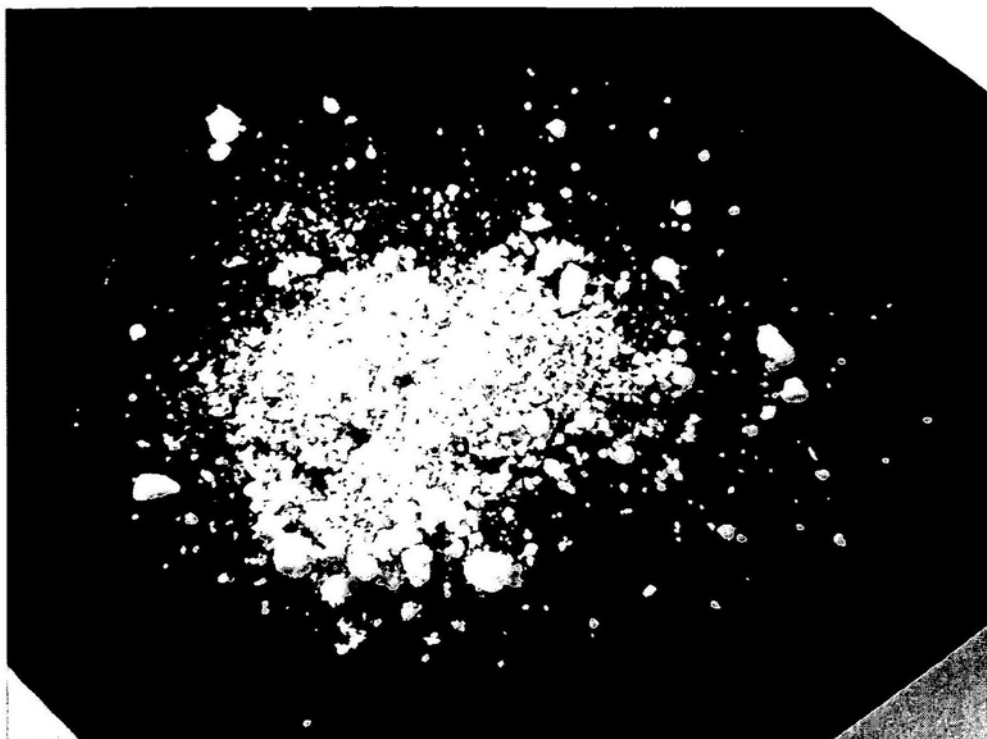


图10

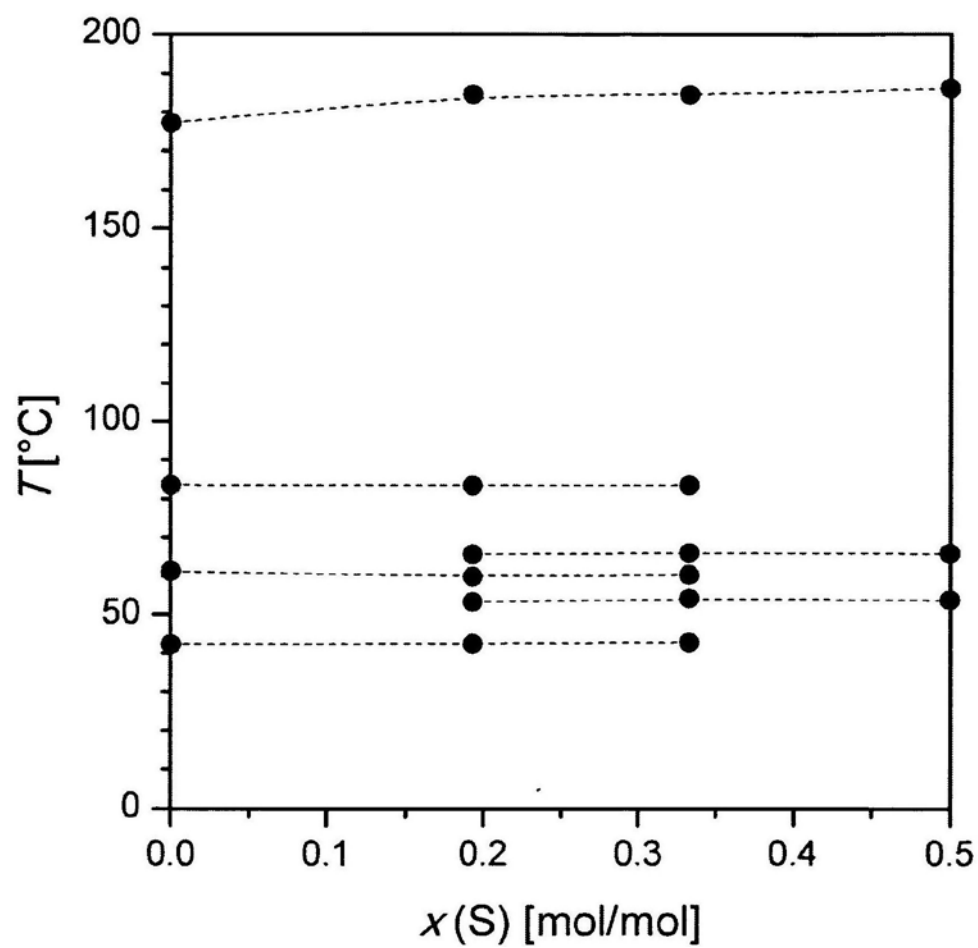


图11

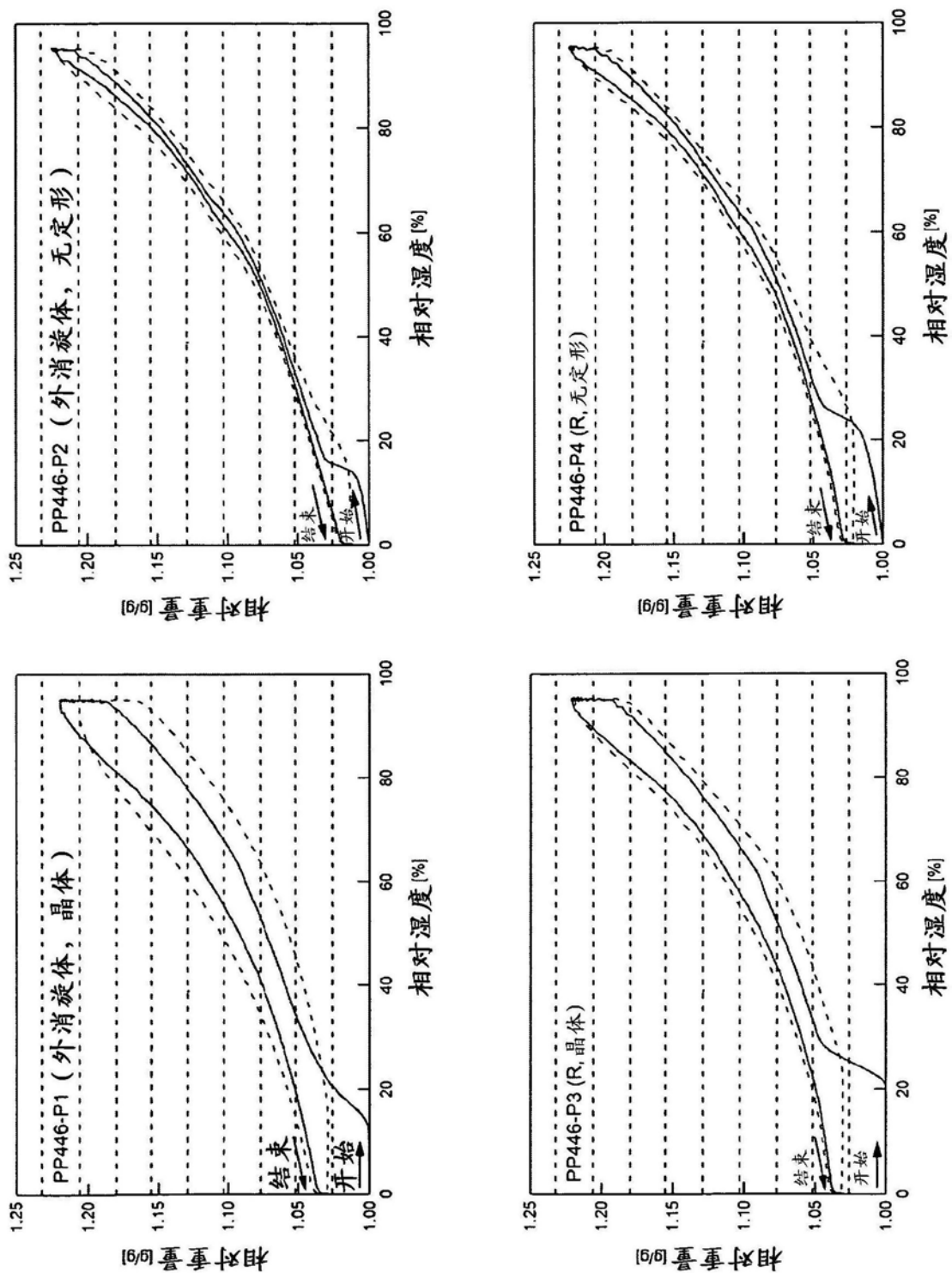


图12

Abstract

The present invention relates to stable crystal modifications of dotap chloride, especially crystal modifications of racemic (2R,S)- and enantiomerically pure (2R)- resp. (2S)-DOTAP chloride, to processes for the preparation thereof, and to the use thereof for the preparation of pharmaceutical compositions.