



**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PCT**

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

## PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. **05-91013**

54. TÍTULO SAL CRISTALINA. CLORHIDRATO. MALEATO  
DE S-[2-É1-IMINOETILAMINO]ETIL]-2-METIL-L- CISTEINA.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL CO2C 323/59, A61K31/  
198, A61P29/00, CO2C

71. SOLICITANTE PHARMACIA. CORPORATION.

DOMICILIO 700 CHESTERFIELD. PARKWAY. WEST,  
CHESTERFIELD, MISSOURI 63017-1732, E.U.A.

74. APODERADO CARLOS OLARTE.

22. BOGOTÁ, D. C., SEPTIEMBRE 3 DE 2005

# OLARTE RAISBECK

  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicación : 65891813 00000000 Folios: 223  
Fecha (APP): 2005-09-09 10:24:32  
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NOCI 411 PRESENTAR  
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD**  
**PATENTE PCT**  
**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

11-10-05

**SOLICITUD DE:**

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE**  
**(71)**

**Nombre:** PHARMACIA CORPORATION

**Dirección:** 700 Chesterfield Parkway West,  
Chesterfield, Missouri 63017-1732, E.U.A.

**Nacionalidad o Domicilio:** ESTADOUNIDENSE

**Lugar de Constitución:** Delaware, E.U.A.

**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Fax:** \_\_\_\_\_

**E-mail:** \_\_\_\_\_

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

Número \_\_\_\_\_

**REPRESENTANTE**  
**O APODERADO**

**Nombre:** CARLOS R. OLARTE

**Dirección:** World Trade Center Torre A,  
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

**Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799

**E-mail:** office@olarteraisbeck.com

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

Número 79.782.747 Btá  
TP 74.295

**INVENTOR (ES)**  
**(72)**

**Nombre:** (1) AHMAD SHEIKH; (2) LYLE R. BROSTROM;

(3) ANN M. CZYZEWSKI; (4) VAHID ZIA.

**Dirección:** (1,2,3 Y 4) 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield,  
Missouri 63017-1732, E.U.A.

**Nacionalidad o Domicilio:** (1) Pakistán (2,3 y 4) Estadounidense.

**PCT (86)**

3

Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/000678

Fecha Marzo 4, 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/080956

Fecha Septiembre 23, 2004

4

**Título (54)** SAL CRISTALINA CLORHIDRATO MALEATO DE S-[2-[(1-  
IMINOETIL)AMINO]ETIL]-2-METIL-L-CISTEÍNA.

**Clasificación Internacional (51)** C07C 323/59, A61K 31/198, A61P 29/00, C07C  
319/28

**Prioridad**

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Marzo 11, 2003

(31) Número de Solicitud

60/453,496

5

Comprobante de pago No. 64.439

Fecha 25 Agosto de 2005

10

**ANEXOS**☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☒

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

**FIGURA CARACTERÍSTICA:**

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3  
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicacion : 05091013 00000000 Folios: 223  
Fecha (MM): 2005-09-09 10:24:32  
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC  
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 64,439  
FECHA : AGOSTO 25 DE 2005

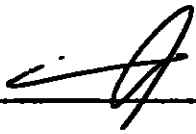
\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE     | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| OLARTE RAISBERR | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 32743730 | 24/08/2005 | 1,616,000.00 |
| OLARTE RAISBERR | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 36577375 | 24/08/2005 | 5,650,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. HISTORICO           | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 443,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | \$ 443,000.    |

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

4

**TRADUCCION OFICIAL No. 04-210**

Efectuada el día 17 de mayo de 2004, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 del 11 de febrero de 2002 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia.

Traducción Oficial de las autenticaciones notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por Pharmacia Corporation a Carlos R. Olarte, y/o James Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri, documento este que viene en español y se explica por sí solo.

(Fdo.) Grover F. Fuller Jr, Abogado Autorizado

La firma y cargo de Grover F. Fuller Jr fueron debidamente certificados por el Notario Público Petrina Thompson el 4/30/05, quien estampo su firma y sello notarial al respaldo.

**APOSTILLA**

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

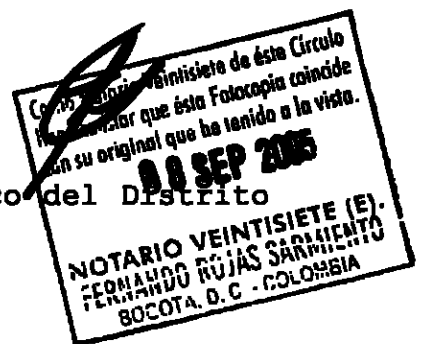
1. País: Distrito de Columbia - Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por Petrina Thompson

3. Que actuó en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia

4. Lleva el sello del Distrito de Columbia.



**SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS**  
C. C. 80.424.773  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL  
RESOLUCION 0138 DE FEBRERO 2002  
MINISTERIO DE JUSTICIA / DEL DISTRITO

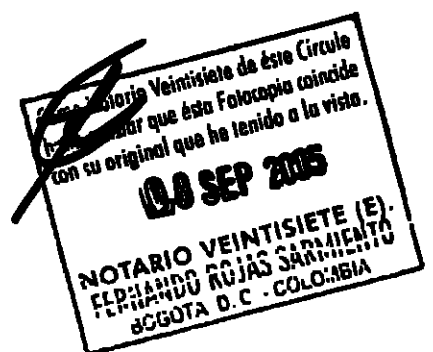
Se certificó:

5. En Washington, D.C.
6. El 30 de abril de 2004
7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el Número 125758
9. Aparece Sello del Distrito de Columbia
10. Firmado por Sherryl H. Newman, Secretario Distrito de Columbia

Es traducción fiel y completa efectuada por:

  
Sergio Andrés Rueda Iglesias  
C.C.80.424.773 de Bogotá

**SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS**  
C. C. 80 2:773  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL  
RESOLUCION No. 0138 DE FEBRERO 11.2002  
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO





## APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*  
*United States of America* **PETRINA THOMPSON**
2. This public document has been signed by ~~NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA~~
3. acting in the capacity of PETRINA THOMPSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE  
DISTRICT OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of \_\_\_\_\_

## CERTIFIED

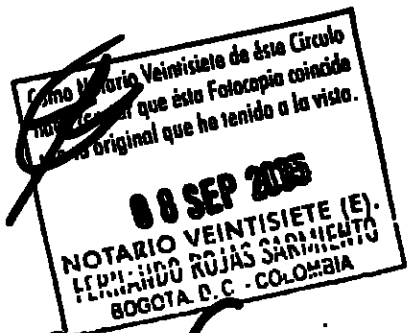
5. at Washington, D. C.
6. the 30 day of APRIL 2004
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 125758

Seal/Stamp



10. Signature

*Sherryl H. Newman*  
**SHERRYL H. NEWMAN**



# OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.  
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C  
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10  
BOGOTA, COLOMBIA  
TELEPHONE: +57-1 638-6200  
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

## Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

**PHARMACIA CORPORATION**

700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, St. Louis,  
MO 63017-1732, Estados Unidos de América.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, James Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models, Industrial Designs and Obtainer's Certificates in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

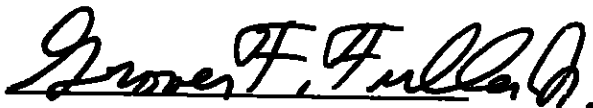
## Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, James Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad, Diseños Industriales y Certificados de Obtentor de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

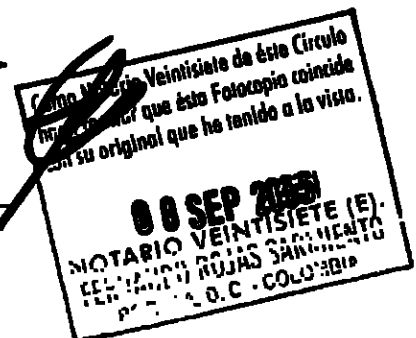


Date/Fecha:

28 april 2004

City/Country/Ciudad,País:

United State of América



# OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.  
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C  
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10  
BOGOTA, COLOMBIA  
TELEPHONE: +57-1 638-6200  
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

4

## Notarial Certification

## Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

of legal age and domiciled in

Grover F. Fuller Jr.

mayor de edad y domiciliado

150 East 42<sup>nd</sup> Street, New York, NY 10017, U.S.A.

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Authorized Attorney of Pharmacia Corporation.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That ~~Pharmacia Corporation~~ having its principal place of business located in St. Louis, Missouri, U.S.A.

4. Que

con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

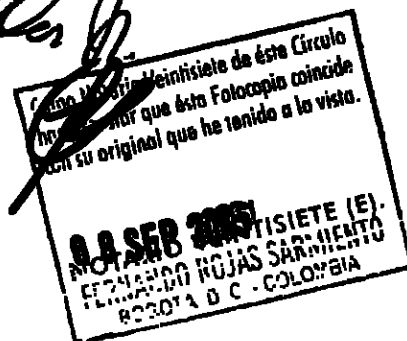
4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): Corporate by laws and Minutes authorizing representation of Mr. Grover Fuller.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s): Artículos de constitución y minutos autorizando la representación del Sr. Grover Fuller.

NOTARY PUBLIC (Signature):

*Grover F. Fuller Jr.*



# OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.  
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C  
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10  
BOGOTÁ, COLOMBIA  
TELEPHONE: +57-1 638-6200  
FAX: +57-1 638-6201

[www.olarteraisbeck.com](http://www.olarteraisbeck.com)

9

## **INSTRUCTIONS FOR THE POWER OF ATTORNEY**

### **FILLING OUT THE FORM CORRECTLY**

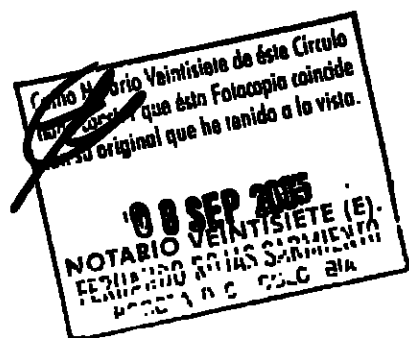
1. The document has TWO (2) pages that must be filled out, the Power of Attorney itself and the Notarial Certification that accompanies it.
2. Please substitute all of the text highlighted in yellow (and only that text) with the appropriate information (or substitute it with a blank space if filled in by hand by the person signing the document).
3. We do NOT need copies of the documents you will list in point 5 of the Notarial Certification.

### **LEGALIZATION**

The signature of the corporate official issuing the Power of Attorney should be authenticated by means of a Notarial Certification as the one enclosed herewith. The Notary's signature should then be authenticated using one of the following two procedures:

1. the Apostille; or
2. if an Apostille is not available or convenient, follow the normal chain of authentication leading to the legalization of the document by the Colombian Consul (the normal chain is that the Notary's signature is authenticated by the Country Clerk; sometimes the Consul legalizes the signature of the Clerk; other times the clerk's signature will first have to be legalized by the Secretary of the respective State).

Please do not hesitate to contact us by telephone or e-mail ([filings@olarteraisbeck.com](mailto:filings@olarteraisbeck.com)) should you have any questions.

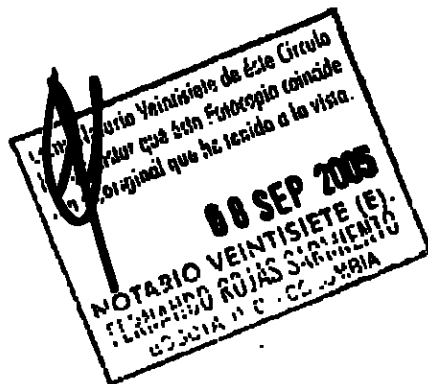


I HEREBY CERTIFY THAT THIS  
IS THE ORIGINAL DOCUMENT

SAMI SWANEK  
4.30.04

Subscribed & Sworn  
before me on 4/30/05.  
*Petrina Thompson*

.. PETRINA THOMPSON  
Notary Public District of Columbia  
.. My Comm. Expires September 30, 2005



ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A QUIEN PUEDA INTERESAR:

Departamento de Comercio de los Estados Unidos

Oficina de Marcas y Patentes

08 de agosto de 2005

POR MEDIO DEL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ADJUNTA SE  
ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO,  
QUE CORRESPONDE A UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 20 DE JUNIO DE  
2003.

Por autoridad del Comisario de Marcas y Patentes

(Fdo.) M. TARVER

Funcionario Certificador

Sello de la Oficina de Marcas y Patentes

EV31956150011S

Expediente: S03300/8 PR

06-27-2003

Código de Barras 102483890

Viene sello estampado por la Oficina de Patentes y Marcas Registradas el 06-20-2003

Al Honorable Comisionado de Marcas Registradas y Patentes.  
Favor registrar los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.

1. Nombre de las partes que otorgan la cesión:

Lyle Brostrom,

Ann Czyzewski,

Ahmad Sheikh,

Vahid Zia

Nombres de cedentes adicionales? [no]

2. Nombre y dirección de la parte beneficiaria de la cesión:

Pharmacia Corporation

Dirección Interna: Departamento Corporativo de Patentes

575 Maryville Centre Drive MC-5S

St. Louis, MO 63141

Dirección: 575 Maryville Centre Drive MC-5S

Cuidad: St. Louis Estado: MO Código: 63141

Se adjuntan nombres o direcciones adicionales? [no]

3. Naturaleza del Traspaso: ☒ Cesión

Fecha de la firma: 13 de junio de 2003 y 16 de junio de 2003.

✓  
12

4. Número de solicitud o de registro:

A. Solicitud de Patente No. 60/453,496

B. Patente No.(s)

Se adjuntan números adicionales? [no]

5. Nombre y dirección de la parte a quien se debe dirigir la correspondencia en relación con el documento:

Nombre: Pharmacia Corporation

Dirección Interna: Departamento Corporativo de Patentes,

575 Maryville Center Drive MC-5S

St. Louis, MO 63141

Dirección: 575 Maryville Center Drive MC-5S

Ciudad: St. Louis Estado: MO Código: 63141

6. Total de Solicitudes y Patentes: [1]

7. Total derechos pagados: (37CFR 3.41): US\$40.00

Se autoriza cargo a la cuenta de depósito? [si]

8. Número de la Cuenta donde se hace el cargo: 19-1025

9. Declaración y firma:

Según mi leal saber y entender, la información precedente es verídica y cualquier copia adjunta corresponde al documento original.

(Fdo.) Philip B. Polster, II Fecha: 20/06/2003

No. Total de páginas incluyendo hoja introductoria: [7]

Registro de Patente No. 014206 Marco: 0529

## CESIÓN

QUE, nosotros Lyle Brostrom, Ann Czyzewski, Ahmad Sheikh, y Vahid Zia, hemos realizado un invento SAL CRISTALINA CLORHIDRATO MALEATO DE S-[2-[(1-IMINOETIL)ANIMO]ETIL] -2-METIL-L-CISTEÍNA (archivo C-3300/8PR US) han ejecutado una solicitud para el departamento de patentes de los Estados Unidos basada en la (serial No. 60/453,496 presentada el 11 de marzo de 2003)

QUE, PHARMACIA CORPORATION, de St. Louis, Missouri, una Corporación del Estado de Delaware, desea adquirir la totalidad del derecho, título e intereses con respecto al mencionado invento, y cualesquiera patentes que se vayan a obtener para el mismo;

EN CONSECUENCIA, por contraprestación onerosa cuyo recibo reconozco, por el presente vendo, cedo y transfiero a Pharmacia Corporation, y a sus sucesores y cesionarios, la totalidad del derecho, . título e intereses en el(los) mencionado(s) invento(s), o en cualquier forma o incorporación del (de los) mismo(s) y con respecto a la(s) solicitud(es) mencionada(s); y con respecto a todas y cualesquiera solicitudes presentadas en cualquier país y que se basen en dicho(s) invento(s), incluido el derecho a presentar solicitudes en países diferentes al país de

registro de prioridad, bajo las disposiciones de cualquier convención internacional; también con respecto a todas y cualesquiera mejoras del (de los) invento(s) que sean hechas por mi en la actualidad o en el futuro, en calidad de empleado, agente o contratista de Pharmacia Corporation; también la totalidad de mi derecho, título e intereses con respecto a todas y cualesquiera patentes, incluyendo reexpediciones y prorrogas de las mismas, que se obtengan en cualquier país con respecto al (a los) mencionado(s) invento(s) o mejoras, y todas y cualesquiera solicitudes continuadas, incluidas aquellas de división, continuación o continuación parcial, solicitudes de sustitución, y solicitudes que reclamen beneficios de una solicitud provisional presentada con anterioridad, que se puedan presentar en cualquier país con respecto al (a los) mencionado(s) invento(s) o mejoras relacionadas; y

Por el presente autorizo y solicito a la autoridad de expedición para que expida todas y cualesquiera patentes relacionadas con la solicitud mencionada, a favor de Pharmacia Corporation, en calidad de cesionaria de la totalidad de los intereses.

Acuerdo además, sin que ello represente pago alguno para Pharmacia Corporation, diferente al reembolso de gastos razonables en los que yo pueda incurrir, sin incluir limitación al reembolso de gastos para los salarios

perdidos, a comunicarle a dicha compañía Pharmacia Corporation, a sus representantes o agentes, cualesquiera hechos relacionados con el (los) mencionado(s) invento(s) o mejoras relacionadas, incluidas pruebas para propósitos de interferencia, oposición u otros procesos legales, cuando quiera que haya solicitudes al respecto; testificar en cualquier interferencia, oposición u otro proceso legal cuando quiera que se me solicite; y firmar y entregar, a solicitud, todos los documentos legales requeridos para que cualquiera de las disposiciones precedentes adquiera validez.

REGISTRO DE PATENTE: No. 014206 MARCO: 0530

SO3300/8

EN FE DE LO CUAL, firmo en la fecha indicada a continuación.

Firma: (Fdo) Lyle Brostom

Fecha: 13 de junio 2003

Nombre: Lyle Brostom

Ciudad y Estado o País de Residencia: Lincolnshire,  
Illinois

Estado de Illinois,

Condado de Cook-

El 13 de junio de 2003, compareció personalmente ante mi Lyle Brostom, a quien conozco como la persona que firmó el instrumento precedente, y reconoció haber firmado el mismo como un acto de su libre voluntad; en fe de lo cual firmo y estampo mi sello oficial en la fecha arriba indicada.

(Fdo.) CARRIE DICK, Notario Público del Estado de Illinois, cuyo cargo expira el 23 de mayo de 2004, según consta en su correspondiente sello notarial.

REGISTRO DE PATENTE No. 014206 MARCO: 0531

EN FE DE LO CUAL, firmo en la fecha indicada a continuación.

Firma: (Fdo) Ann Czyzewski

Fecha: 13 de junio 2003

Nombre: Ann Czyzewski

Ciudad y Estado o País de Residencia: Grayslake, Illinois

Estado de Illinois,

Condado de Cook-

El 13 de junio de 2003, compareció personalmente ante mi Ann Czyzewski, a quien conozco como la persona que firmó el instrumento precedente, y reconoció haber firmado el mismo como un acto de su libre voluntad; en fe de lo cual firmo y estampo mi sello oficial en la fecha arriba indicada.

(Fdo.) CARRIE DICK, Notario Público del Estado de Illinois, cuyo cargo expira el 23 de mayo de 2004, según consta en su correspondiente sello notarial.

18

EN FE DE LO CUAL, firmo en la fecha indicada a continuación.

Firma: (Fdo) Ahmad Sheikh

Fecha: 16 de junio 2003

Nombre: Ahmad Sheikh

Ciudad y Estado o País de Residencia: Des Plaines, Illinois

Estado de Illinois,

Condado de Cook-

El 16 de junio de 2003, compareció personalmente ante mi Ahmad Sheikh, a quien conozco como la persona que firmó el instrumento precedente, y reconoció haber firmado el mismo como un acto de su libre voluntad; en fe de lo cual firmo y estampo mi sello oficial en la fecha arriba indicada.

(Fdo.) CARRIE DICK, Notario Público del Estado de Illinois, cuyo cargo expira el 23 de mayo de 2004, según consta en su correspondiente sello notarial.

19  
SO3300/8

EN FE DE LO CUAL, firmo en la fecha indicada a continuación.

Firma: (Fdo) Vahid Zia Fecha: 16 de junio 2003

Nombre: Vahid Zia

Ciudad y Estado o País de Residencia: Chicago, Illinois

Estado de Illinois,

Condado de Cook-

El 16 de junio de 2003, compareció personalmente ante mi Vahid Zia, a quien conozco como la persona que firmó el instrumento precedente, y reconoció haber firmado el mismo como un acto de su libre voluntad; en fe de lo cual firmo y estampo mi sello oficial en la fecha arriba indicada.

(Fdo.) CARRIE DICK, Notario Público del Estado de Illinois, cuyo cargo expira el 23 de mayo de 2004, según consta en su correspondiente sello notarial.

REGISTRO DE PATENTE No. 014206 MARCO: 0534

90

**APOSTILLA**

**(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)**

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. fue firmado Por: M. Tarver

3. Actuando en su calidad de Funcionario de  
Certificaciones.

4. Lleva el sello de la Oficina de Marcas y Patentes de  
los Estados Unidos

Se certificó:

5. En Washington, D.C.

6. El 12 de agosto de 2005

7. Por parte del funcionario de autenticaciones del  
Departamento de Estados Unidos

8. Bajo el número 05028199-2

9. Aparece sello del Departamento de Estados Unidos de  
América

10. Firmado por Patrick O. Hatchett

21

**APOSTILLE**  
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M. Tarver

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

**Certified**

5. at Washington, D.C.

6. the twelfth of August, 2005

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 05028199-2

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Patrick O. Hatchett

Patrick O.Hatchett

Colombia

92



A 776782

# THE UNITED STATES OF AMERICA

**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:**

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**

**United States Patent and Trademark Office**

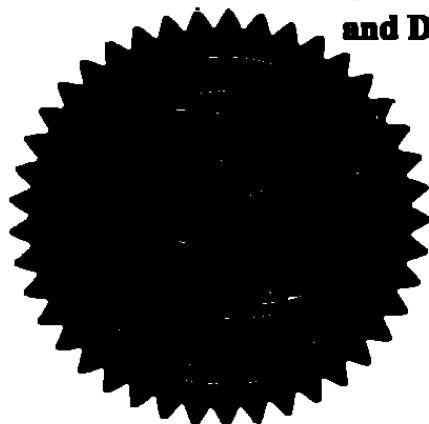
**August 08, 2005**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE  
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON**

**June 20, 2003**

**By Authority of the**

**Under Secretary of Commerce for Intellectual Property  
and Director of the United States Patent and Trademark Office**



*M. Tarver*

**M. TARVER  
Certifying Officer**

73

EV319561500HS

66-23-03

Docket No.: S033008 PR

DIF

FORM PTO-1285 (Prescribed)  
(Rev. 03-01)  
GPO No. 054-0027 (Rev. 04-02-2002)  
Patent Service

RECORD  
P1

06-27-2003

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE  
Patent and Trademark Office

Tab markings → → →



To the Honorable Director of the United States Patent and

102483890

3d original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Lyle Brostrom  
Ann Czyzewski  
Ahmad Sheikh  
Vahid Zia

6-20-03

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: Pharmacia Corporation

Internal Address: Corporate Patent Department

575 Maryville Centre Drive, MC-55

St. Louis, MO 63141

Street Address: 575 Maryville Centre Drive

MC-55

City: St. Louis State: MO ZIP: 63141

Additional names(s) of conveying party(ies)

☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment

☐ Merger

☐ Security Agreement

☐ Change of Name

☐ Other

Execution Date: June 13, 2003 and June 16, 2003

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

60453496

06/15/2003 070011 0000120 191025 60453496

01 FC:0000 40.00 20

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Name: Pharmacia Corporation

Internal Address: Corporate Patent Department

575 Maryville Centre Drive, MC-55

St. Louis, MO 63141

Street Address: 575 Maryville Centre Drive

MC-55

City: St. Louis State: MO ZIP: 63141

6. Total number of applications and patents involved:

1

7. Total fee (37 CFR 3.41):.....\$ 40.00

☐ Enclosed - Any excess or insufficiency should be credited or debited to deposit account

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

19-1025

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Philip B. Peister, II

Name of Person Signing

Signature

June 20, 2003

Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and document:

7

And documents to be recorded with required cover sheet information for  
Mail Stop Assignment Recordation Service  
Patent and Trademark Office, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22304-1450

PATENT

REEL: 014206 FRAME: 0529

24

**ASSIGNMENT**

WHEREAS, WE, Lyle Brostrom, Ann Czyzewski, Ahmad Sheikh, and Vahid Zia have invented an improvement in S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine Maleate Hydrochloride Crystalline Salt (File C-3300/8PR US) and have executed an application for a United States patent based thereon (Serial No. 60/453,496, filed March 11, 2003).

WHEREAS, Pharmacia Corporation, of St. Louis, Missouri, a Corporation of the State of Delaware, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said invention or inventions and any and all patents to be obtained therefore;

NOW, THEREFORE, FOR GOOD AND VALUABLE CONSIDERATION, the receipt of which is hereby acknowledged, WE do hereby sell, assign and transfer to said Pharmacia Corporation, its successors and assigns, the entire right, title and interest in and to said invention or inventions, in any form or embodiment thereof, and in and to said application(s); and in and to any and all applications filed in any country based thereon, including the right to file applications in countries other than the country of priority filing under the provisions of any international convention; also in and to any and all improvements on said invention or inventions now or hereafter made by us as employee(s), agent(s) or contractor(s) of said Pharmacia Corporation; also the entire right, title and interest in and to any and all patents, including reissues and extensions thereof, to be obtained in any country upon said invention, inventions or improvements, and any and all continuing applications, including divisional, continuation and continuation-in-part applications, substitute applications, and applications claiming benefit of an earlier filed provisional application, which may be filed upon said invention, inventions or improvements in any country; and

WE hereby authorize and request the issuing authority to issue any and all patents on said application or applications to said Pharmacia Corporation, as assignee of the entire interest.

WE further agree, without any payment by Pharmacia Corporation other than in reimbursement of reasonable expenses we may incur including without limitation ~~reimbursement for lost wages~~ *JPH*, to communicate to said Pharmacia Corporation, its representatives or agents, any facts relating to said invention, inventions or improvements, including evidence for purposes of interference, opposition or other legal proceedings, whenever requested; testify in any interference, opposition or other legal proceedings, whenever requested; and execute and deliver, on request, all lawful papers required to make any of the foregoing provisions effective.

**PATENT****REEL: 014206 FRAME: 0630**

IS

IN TESTIMONY WHEREOF, WE have hereto set our hands on the dates set after our signature.

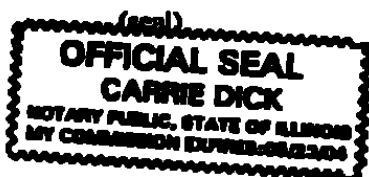
Signature:  Date: 13 June 2003

Name: Lyle Brostrom

City and state or country of residence: Lincolnshire, Illinois

State of IL }  
County of COOK } ss.

On this 13 day of June, 2003, before me personally appeared Lyle Brostrom, to me known to be the person who executed the foregoing instrument and acknowledged that he executed the same as his free act and deed; in testimony whereof I have hereto set my hand and official seal on the day last above written.



  
Notary Public

My Commission Expires: 5/23/04

PATENT  
REEL: 014206 FRAME: 0531

IN TESTIMONY WHEREOF, WE have hereto set our hands on the dates set after our signature.

Signature: *Ann Czyzewski* Date: 6/13/03

Name: Ann Czyzewski

City and state or country of residence: Grayslake, Illinois

State of IL }  
County of COOK } ss.

On this 13 day of June, 2003, before me personally appeared Ann Czyzewski, to me known to be the person who executed the foregoing instrument and acknowledged that he executed the same as his free act and deed; in testimony whereof I have hereto set my hand and official seal on the day last above written.



*Carrie Dick*  
Notary Public

My Commission Expires: 5/23/04

27

S03300/8

IN TESTIMONY WHEREOF, WE have hereto set our hands on the dates set after our signature.

Signature: Ahmad Sheikh Date: 6/16/03

Name: Ahmad Sheikh

City and state or country of residence: Des Plaines, Illinois

State of IL }  
County of COOK } ss.

On this 16 day of June, 2003, before me personally appeared Ahmad Sheikh, to me known to be the person who executed the foregoing instrument and acknowledged that he executed the same as his free act and deed; in testimony whereof I have hereto set my hand and official seal on the day last above written.



Carrie Dick  
Notary Public

My Commission Expires: 5/23/04

PATENT  
REEL: 014206 FRAME: 0533

*[Handwritten mark]*

S03300/8

IN TESTIMONY WHEREOF, WE have hereto set our hands on the dates set after our signature.

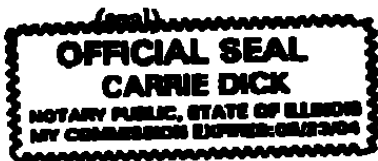
Signature: *V. Zia* Date: 6/16/2003

Name: Vahid Zia

City and state or country of residence: Chicago, Illinois

State of IL }  
County of COOK } ss.

On this 16 day of June, 2003, before me personally appeared Vahid Zia, to me known to be the person who executed the foregoing instrument and acknowledged that he executed the same as his free act and deed; in testimony whereof I have hereto set my hand and official seal on the day last above written.



*Carrie Dick*  
Notary Public

My Commission Expires: 5/23/04

RECORDED: 06/20/2003

PATENT  
REEL: 014206 FRAME: 0534

**(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau**



**(43) International Publication Date**  
**23 September 2004 (23.09.2004)**

## PCT

**(10) International Publication Number**  
**WO 2004/080956 A1**

- (51) International Patent Classification: C07C 323/59, A61K 31/198, A61P 29/00, C07C 319/28
- (21) International Application Number: PCT/IB2004/000678
- (22) International Filing Date: 4 March 2004 (04.03.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/453,496 11 March 2003 (11.03.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA CORPORATION [US/US]; 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017-1732 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): SHEIKH, Ahmad [PK/US]; 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017-1732 (US). BROSTROM, Lyle, R. [US/US]; 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017-1732 (US). CZYZEWSKI, Ann, M. [US/US]; 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017-1732 (US). ZIA, Yahid [US/US]; 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017-1732 (US).
- (74) Agents: LUMB, J., Trevor et al.; Pfizer Inc., P.O. Box 1027, St. Louis, MO 63006 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

**Published:**

— with international search report

**For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.**

**(54) Title: S-[2-[(1-IMINOETHYL)AMINO]ETHYL]-2-METHYL-L-CYSTEINE MALEATE HYDROCHLORIDE CRYSTALLINE SALT**

**(57) Abstract:** A novel mixed salt of S-[2-[(1-liminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine is disclosed. The novel mixed salt, S-[2-[(1-liminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, may be produced to form crystals that may be arranged as generally orderly packed agglomerates, which are particularly useful in making pharmaceutical compositions. Such pharmaceutical compositions are also described, as well as methods to make crystalline S-[2-[(1-liminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, and methods of treating conditions characterized by an overexpression on nitric oxide from the inducible isoform of nitric oxide synthase using the S-[2-[(1-liminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

**WO 2004/080956 A1**

**S-[2-[(1-IMINOETHYL)AMINO]ETHYL]-2-METHYL-L-CYSTEINE  
MALEATE HYDROCHLORIDE CRYSTALLINE SALT**

**FIELD OF THE INVENTION**

[0001] Priority is claimed from U.S. Provisional Application Serial Number 60/453,496, incorporated herein by reference.

[0002] The present invention comprises a novel compound useful in the treatment of disease, and more particularly a novel salt of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, and even more particularly a novel crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, and pharmaceutical compositions thereof, for the treatment of conditions involving an inappropriate expression of nitric oxide from the inducible isoform of nitric oxide synthase.

[0003] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine is described and claimed in commonly assigned U.S. Patent number 6,403,830, herein incorporated by reference.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

[0004] Nitric oxide (NO) is a bioactive free radical gas produced by any one of several isoforms of the enzyme nitric oxide synthase (NOS). The physiological activity of what was later identified as NO was initially discovered in the early 1980's when it was found that vascular relaxation caused by acetylcholine is dependent on the presence of the vascular endothelium. The factor derived from the endothelium, then called endothelium-derived relaxing factor (EDRF), that mediates such vascular relaxation is now known to be NO that is generated in the vascular endothelium by one isoform of NOS. The activity of NO as a vasodilator has been known for well over 100 years. In addition, NO is the active species derived from known nitrovasodilators including amyl nitrite, and glyceryl trinitrate. Nitric oxide is also an endogenous stimulator of soluble guanylate cyclase (cGMP), and thus stimulates cGMP production. When NOS is inhibited by N-monomethylarginine (L-NMMA), cGMP formation is completely prevented. In addition to endothelium-dependent relaxation, NO is known to be involved in a number of biological actions including cytotoxicity of phagocytic cells and cell-to-cell communication in the central nervous system.

[0005] The identification of EDRF as NO coincided with the discovery of a biochemical pathway by which NO is synthesized from the amino acid L-arginine by the enzyme NO synthase. There are at least three types of NO synthase as follows:

(i) a constitutive,  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulin dependent enzyme, located in the brain, that releases NO in response to receptor or physical stimulation;

(ii) a  $\text{Ca}^{++}$  independent enzyme, a 130 kD protein, which is induced after activation of vascular smooth muscle, macrophages, endothelial cells, and a number of other cells by endotoxin and cytokines; and

(iii) a constitutive,  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulin-dependent enzyme, located in the endothelium, that releases NO in response to receptor or physical stimulation.

[0006] Once expressed, inducible nitric oxide synthase (hereinafter "iNOS") generates NO continuously for long periods. Clinical studies have shown that NO production and iNOS expression are increased in a variety of chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid and osteoarthritis (see, e.g. McInnes I. B. et al., *J. Exp. Med.* 184:1519 (1996)), inflammatory bowel disease (see, e.g. Lundberg J. O. N. et al., *Lancet* 344:1673, (1994)), and asthma (see, e.g., Hamid, Q. et al., *Lancet* 342:1510 (1993)), and iNOS is implicated as a major pathological factor in these chronic inflammatory diseases.

[0007] Thus, inhibition of excessive NO production by iNOS is likely to be anti-inflammatory. However, since the production of NO from eNOS and nNOS is involved in normal physiology, it would be desirable for any NOS inhibitor that is used for treating inflammation be selective for iNOS, so that normal physiological modulation of blood pressure by eNOS-generated NO, and non-adrenergic, non-cholinergic neuronal transmission by nNOS-generated NO would remain unaffected.

[0003] With all pharmaceutical compounds and compositions, the chemical and physical stability of a drug compound is important in the commercial development of that drug substance. Such stability includes the stability at ambient conditions, especially to moisture and under storage conditions. Elevated stability at different conditions of storage is needed to predict the different possible storage conditions during the lifetime of a commercial product. A stable drug avoids the use of special storage conditions as well as frequent inventory replacement. A drug compound must also be stable during the manufacturing process which often requires milling of the drug to achieve drug material with uniform particle size and surface area. Unstable materials often undergo polymorphic changes. Therefore, any modification of a drug substance which enhances its stability profile provides a meaningful benefit over less stable substances.

[0009] Several inhibitors of iNOS have been described, such as, for example, *S*-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, which is described and claimed in commonly assigned U.S. Patent 6,403,830. That compound, however, is an amorphous solid. It would

be desirable, therefore, to provide a crystalline solid form of an iNOS inhibitor such as S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

[0010] Fig. 1 shows a powder X-ray diffraction pattern of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride obtained from Example 9 (top pattern) and Example 20 (bottom pattern);

[0011] Fig. 2 is a graph of a differential scanning calorimetry study of a sample (Example 11) of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride;

[0012] Fig. 3 is a thermogravimetric plot of a sample (Example 11) of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride;

[0013] Fig. 4 is a plot of a moisture sorption study of a sample (Example 10) of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride;

[0014] Fig. 5 shows a Raman spectrum of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride obtained from a sample from Example 20;

[0015] Fig. 6 is a photomicrograph of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride from Example 9;

[0016] Fig. 7 are two SEM pictures of the randomly packed agglomerates of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride obtained from Example 9, Fig. 7A shows the generally random shape of the agglomerates, while Fig. 7B shows the random packing of crystals within the agglomerates;

[0017] Fig. 8 shows various SEM pictures of the orderly packed agglomerates of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride made through seeded QESD crystallization process and obtained from Example 20;

[0018] Fig. 9 shows two SEM pictures of the orderly packed agglomerates of crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride made through in-situ seeded QESD crystallization process and obtained from Example 23, Fig. 9A shows the generally cylindrical shape, while Fig. 9B shows the generally ordered crystals;

[0019] Fig. 10 is a conceptual x-T diagram for a ternary system exhibiting LLPS behavior for a fixed amount of anti-solvent

[0020] Fig. 11 is a chart showing coexisting surfaces at constant temperature for a ternary system

[0021] Fig. 12 shows a graph of particle size distribution of orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals;

[0022] Fig. 13 is a graph plotting tablet hardness as a function of compression force;

[0023] Fig. 14 is a graph plotting tablet thickness as a function of compression force; and

[0024] Fig. 15 is a graphical representation of tablet disintegration time.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

[0025] The present invention is directed to a novel crystalline salt form of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, pharmaceutical compositions, four mechanistically different novel crystallization process designs to tailor bulk physical properties during the preparation of the novel salt compound, a process for preparing pharmaceutical compositions, and methods of using said novel mixed crystalline salt compound and compositions for inhibiting or modulating nitric oxide synthesis in a subject in need of such inhibition or modulation by administering a salt of a compound which preferentially inhibits or modulates the inducible isoform of nitric oxide synthase over the constitutive isoforms of nitric oxide synthase. The present salt compound possesses useful nitric oxide synthase inhibiting activity, and is expected to be useful in the treatment or prophylaxis of a disease or condition in which the synthesis or oversynthesis of nitric oxide forms a contributory part.

[0026] Stoichiometrically, the novel salt is two molecules of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine with one molecule of maleic acid and one molecule of hydrochloride.

[0027] The novel crystalline mixed salt is characterized by some or all of the following physical measurements: elemental analysis (such as by combustion analysis), melting point and heat of fusion (differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis), refractive indices (polarized light microscopy), x-ray powder diffraction pattern, Raman spectroscopy and moisture sorption (for example, DVS moisture balance).

[0028] The present novel salt can be used to treat diseases involving cartilage degeneration, which takes place in certain conditions such as arthritis. Accordingly, conditions in which there is an advantage in inhibiting NO production from L-arginine include arthritic conditions such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, gouty arthritis, juvenile arthritis, septic arthritis, spondyloarthritis, acute rheumatic arthritis, enteropathic arthritis, neuropathic arthritis, and pyogenic arthritis. In addition, NO-induced depression of chondrocyte respiration could modulate matrix loss and secondary cartilage mineralization in arthritis, in particular osteoarthritis.

[0029] Other conditions for which the present mixed salt may be useful include chronic or inflammatory bowel disease, cardiovascular ischemia, diabetes, congestive heart failure, myocarditis, atherosclerosis, migraine, glaucoma, aortic aneurysm, reflux esophagitis, diarrhea, irritable bowel syndrome, cystic fibrosis, emphysema, asthma, bronchiectasis,

hyperalgesia, cerebral ischemia, thrombotic stroke, global ischemia (secondary to cardiac arrest), multiple sclerosis and other central nervous system disorders mediated by NO, for example Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Further neurodegenerative disorders in which NO inhibition may be useful include nerve degeneration and/or nerve necrosis in disorders such as hypoxia, hypoglycemia, epilepsy, and in external wounds (such as spinal cord and head injury), hyperbaric oxygen convulsions and toxicity, dementia e.g. pre-senile dementia, and AIDS-related dementia, Sydenham's chorea, Huntington's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Korsakoff's disease, imbecility relating to a cerebral vessel disorder, sleeping disorders, schizophrenia, depression, depression or other symptoms associated with Premenstrual Syndrome (PMS), anxiety and septic shock.

[0030] The present mixed salt may also be used where nitric oxide inhibition may also play a role in the treatment, such as pain including somatogenic (either nociceptive or neuropathic), both acute and chronic. The present mixed salt could be used in any situation that a common NSAID or opioid analgesic would traditionally be administered.

[0031] Still, other disorders that may be treated by inhibiting NO production with the present mixed salt include opiate tolerance in patients needing protracted opiate analgesics, and benzodiazepine tolerance in patients taking benzodiazepines, and other addictive behavior, for example, nicotine and eating disorders. The present mixed salt may also be useful as antibacterial agents.

[0032] Further conditions in which the present mixed salt may be used to inhibit NO production from L-arginine include systemic hypotension associated with septic and/or toxic shock induced by a wide variety of agents; therapy with cytokines such as TNF, IL-1 and IL-2; and as an adjuvant to short term immunosuppression in transplant therapy.

[0033] The present mixed salt may also be useful in the treatment of ocular conditions (such as ocular hypertension retinitis uveitis), systemic lupus erythematosus (SLE), glomerulonephritis, restenosis, inflammatory sequelae of viral infections, acute respiratory distress syndrome (ARDS), oxidant-induced lung injury, IL2 therapy such as in a cancer patient, cachexia, immunosuppression such as in transplant therapy, disorders of gastrointestinal motility, sunburn, eczema, psoriasis, gingivitis, pancreatitis, damage to the gastrointestinal tract resulting from infections, cystic fibrosis, treatment to a dysfunctional immune system such as an adjuvant to short term immunosuppression in organ transplant therapy, induction of labor, adenomatous polyposis, controlling tumor growth, chemotherapy, chemoprevention and bronchitis.

[0034] The present invention is also directed to pharmaceutical compositions for the treatment of pain, asthma and other airway disorders, cancer, arthritis, ocular disorders including retinopathies and glaucoma, inflammation related disorders including irritable bowel syndrome, and other disorders in which an excessive production of nitric oxide plays a role, which comprises a therapeutically effective amount of crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or vehicle.

[0035] Besides being useful for human treatment, this form is also useful for veterinary treatment of companion animals, exotic animals and farm animals, including mammals, rodents, and the like. More preferred animals include horses, dogs, and cats.

## **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

### **Definitions**

[0036] The terms "treat," "treating" and "treatment," as used herein includes prophylactic, palliative treatment, or restorative treatment.

[0037] The term "effective amount" means a dose conducive to treatment. An effective amount may be administered in a single dose, or in divided doses over a period of time.

[0038] The term "ACN" means acetonitrile.

[0039] The term "amorphous" as applied to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine herein refers to a solid state wherein the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine molecules are present in a disordered arrangement and do not form a distinguishable crystal lattice or unit cell. When subjected to X-ray powder diffraction, amorphous *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine does not produce any characteristic crystalline peaks.

[0040] The term "crystalline form" as applied to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine herein refers to a solid state form wherein the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine molecules are arranged to form a distinguishable crystal lattice (i) comprising distinguishable unit cells, and (ii) yielding diffraction peaks when subjected to X-ray radiation.

[0041] The terms "*S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate Form I," "*S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine Form I" and "Form I" all mean *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate crystalline salt Form I, as more

fully described in copending U.S. Application Serial Number 60/453,796, incorporated herein by reference in its entirety.

[0042] The terms "*S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate Form II," "*S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine Form II" and "Form II" all mean *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate crystalline salt Form II, as more fully described in copending U.S. Application Serial Number 60/453,782, incorporated herein by reference in its entirety.

[0043] The terms "*S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride," crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride," and "mixed salt" all refer to the crystalline form of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, having stoichiometrically one mole of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine for 0.5 moles of maleate and 0.5 moles of HCl, as more fully described herein.

[0044] The term "crystallization" as used herein can refer to crystallization and/or recrystallization depending upon the applicable circumstances relating to preparation of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine starting material.

[0045] The term "API," as used herein, means active pharmaceutical ingredient.

[0046] The term "bis," as used herein, means *N,N'*-Methylene-bis-acrylamide

[0047] The term "DI water," as used herein, means deionized water.

[0048] The term "DMF," as used herein, means *N,N*-dimethylformamide.

[0049] The term "D/W/A" refers to a ternary solvent system of *N,N*-dimethylformamide (DMF), water and acetonitrile.

[0050] The term "*S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine drug substance" as used herein means *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine per se as qualified by the context in which the term is used, and can refer to unformulated *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine or to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine present as an ingredient of a pharmaceutical composition.

[0051] The term "DSC" means differential scanning calorimetry.

[0052] The term " $\Delta H_{\text{fus}}$ " or " $\Delta H_{\text{fus}}$ " means the enthalpy of fusion of a substance, and refers to the energy (measured in kilojoules (Kj)) required to melt one gram of the substance at its melting point temperature.

[0053] The term "HPLC" means high pressure liquid chromatography.

[0054] The term "IR" means infrared.

[0055] The term "kN" means kilonewtons.

[0056] The term "kP" means kiloponds.

[0057] The term " $\rho$ ," or rho, as used herein, refers to density.

[0058] The term " $\rho_b$ " means bulk density.

[0059] The term " $\rho_t$ " means tapped density.

[0060] The term "CI" means Compressibility Index, as defined by the formula:

$$CI = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_t}$$

[0061] The term "NMR" means nuclear magnetic resonance, and may apply to nuclear magnetic resonance spectroscopy.

[0062] The term "ml" means milliliters.

[0063] The term "mg" means milligrams.

[0064] The term "g" means grams

[0065] The term "kg" means kilograms

[0066] The term " $\mu$ g" means micrograms

[0067] The term " $\mu$ l" means microliters.

[0068] The term "min" means minutes.

[0069] The term "MW" means molecular weight.

[0070] The term "nucleation," as used herein, means the formation of crystals in a solution.

[0071] The term "Purity" as used herein, unless otherwise qualified, means the chemical purity of crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride according to conventional HPLC assay.

[0072] The term "PXRD" means powder X-ray diffraction.

[0073] The term "rpm" means revolutions per minute.

[0074] The term "seeding," as used herein, means the addition of crystals to a crystallization system, for the purpose of initiating or enhancing nucleation or acting as substrate for further crystallization.

[0075] The term "agglomerates", generally refers to random or orderly packing of individual crystals in units that are not readily destroyed during energetically mild operations such as transfer of solids.

[0076] The term "SEM" means scanning electron microscopy.

[0077] The term "TGA" means thermogravimetric analysis.

[0078] The term "Tm" means melting temperature.

[0079] The term "zwitterion" or "ZW" means a molecule that carries both a positive and negative charge. The term "free zwitterion" means a zwitterion such that the net charge of the molecule is zero. Unless otherwise indicated, the term "zwitterion" and "ZW," as used herein, means S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine zwitterion.

[0080] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt will be useful for treating, among other things, inflammation in a subject, or for treating other nitric oxide synthase-mediated disorders, such as, as an analgesic in the treatment of pain and headaches, or as an antipyretic for the treatment of fever. For example, S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt will be useful to treat arthritis, including but not limited to rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies, gouty arthritis, osteoarthritis, systemic lupus erythematosus, juvenile arthritis, acute rheumatic arthritis, enteropathic arthritis, neuropathic arthritis, psoriatic arthritis, and pyogenic arthritis. Conditions in which the S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt will provide an advantage in inhibiting NO production from L-arginine include arthritic conditions.

[0081] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt will be further useful in the treatment of asthma, bronchitis, menstrual cramps (e.g., dysmenorrhea), premature labor, tendinitis, bursitis, skin-related conditions such as psoriasis, eczema, burns, sunburn, dermatitis, pancreatitis, hepatitis, and from post-operative inflammation including from ophthalmic surgery such as cataract surgery and refractive surgery. S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt also would be useful to treat gastrointestinal conditions such as inflammatory bowel disease, Crohn's disease, gastritis, irritable bowel syndrome and ulcerative colitis.

[0082] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would be useful for the prevention or treatment of cancer, such as colorectal cancer, and cancer of the breast, lung, prostate, bladder, cervix and skin. S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the invention would be useful in treating inflammation and tissue damage in such diseases as vascular diseases, migraine headaches, periarteritis nodosa, thyroiditis, aplastic anemia, Hodgkin's disease, scleroderma, rheumatic fever, type I diabetes, neuromuscular junction disease including myasthenia gravis, white matter disease including multiple sclerosis, sarcoidosis, nephrotic syndrome, Behcet's syndrome,

23

polymyositis, gingivitis, nephritis, hypersensitivity, swelling occurring after injury, myocardial ischemia, and the like. The S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would also be useful in the treatment of ophthalmic diseases, such as glaucoma, retinitis, retinopathies, uveitis, ocular photophobia, and of inflammation and pain associated with acute injury to the eye tissue. Of particular interest among the uses of the present inventive S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt is the treatment of glaucoma, especially where symptoms of glaucoma are caused by the production of nitric oxide, such as in nitric oxide-mediated nerve damage.

[0083] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would also be useful in the treatment of pulmonary inflammation, such as that associated with viral infections and cystic fibrosis. The S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would also be useful for the treatment of certain central nervous system disorders, such as cortical dementias including Alzheimer's disease, and central nervous system damage resulting from stroke, ischemia and trauma.

[0084] The S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt is useful as an anti-inflammatory agent, such as for the treatment of arthritis, with the additional benefit of having significantly less harmful side effects.

[0085] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would also be useful in the treatment of allergic rhinitis, respiratory distress syndrome, endotoxin shock syndrome, and atherosclerosis.

[0086] S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would also be useful in the treatment of pain, including but not limited to postoperative pain, dental pain, muscular pain, and pain resulting from cancer. S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt would be useful for the prevention of dementias, such as Alzheimer's disease.

[0087] Besides being useful for human treatment, S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt is also useful for veterinary treatment of companion animals, exotic animals and farm animals, including mammals, rodents, and the like. More preferred animals include horses, dogs, and cats.

[0088] The present S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt may also be used in co-therapies, partially or completely,

in place of other conventional antiinflammatory therapies, such as together with steroids, NSAIDs, COX-2 selective inhibitors, 5-lipoxygenase inhibitors, LTB<sub>4</sub> antagonists and LTA<sub>4</sub> hydrolase inhibitors.

[0089] Other conditions in which the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention will provide an advantage in inhibiting-NO-inhibition include cardiovascular ischemia, diabetes (type I or type II), congestive heart failure, myocarditis, atherosclerosis, migraine, glaucoma, aortic aneurysm, reflux esophagitis, diarrhea, irritable bowel syndrome, cystic fibrosis, emphysema, asthma, bronchiectasis, hyperalgesia (allodynia), cerebral ischemia (both focal ischemia, thrombotic stroke and global ischemia (for example, secondary to cardiac arrest), multiple sclerosis and other central nervous system disorders mediated by NO, for example Parkinson's disease. Further neurodegenerative disorders in which NO inhibition may be useful include nerve degeneration or nerve necrosis in disorders such as hypoxia, hypoglycemia, epilepsy, and in cases of central nervous system (CNS) trauma (such as spinal cord and head injury), hyperbaric oxygen convulsions and toxicity, dementia e.g. pre-senile dementia, and AIDS-related dementia, cachexia, Sydenham's chorea, Huntington's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Korsakoff's disease, imbecility relating to a cerebral vessel disorder, sleeping disorders, schizophrenia, depression, depression or other symptoms associated with Premenstrual Syndrome (PMS), anxiety and septic shock.

[0090] The *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention will also be useful in the treatment of pain including somatogenic (either nociceptive or neuropathic), both acute and chronic. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt could be used in any situation including neuropathic pain that a common NSAID or opioid analgesic would traditionally be administered.

[0091] Still other disorders or conditions which will be advantageously treated by the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention include treatment or prevention of opiate tolerance in patients needing protracted opiate analgesics, and benzodiazepine tolerance in patients taking benzodiazepines, and other addictive behavior, for example, nicotine addiction, alcoholism, and eating disorders.

[0092] The *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention will also be useful in the treatment or prevention of

drug withdrawal symptoms, for example treatment or prevention of symptoms of withdrawal from opiate, alcohol, or tobacco addiction. 26

[0093] The *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt may also be useful to prevent tissue damage when therapeutically combined with antibacterial or antiviral agents.

[0094] The *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention will also be useful in inhibiting NO production from L-arginine including systemic hypotension associated with septic and/or toxic hemorrhagic shock induced by a wide variety of agents; therapy with cytokines such as TNF, IL-1 and IL-2; and as an adjuvant to short term immunosuppression in transplant therapy.

[0095] The present invention is further directed to the use of the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention for the treatment and prevention of neoplasias. The neoplasias that will be treatable or preventable by the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt and methods of the present invention include brain cancer, bone cancer, a leukemia, a lymphoma, epithelial cell-derived neoplasia (epithelial carcinoma) such as basal cell carcinoma, adenocarcinoma, gastrointestinal cancer such as lip cancer, mouth cancer, esophageal cancer, small bowel cancer and stomach cancer, colon cancer, liver cancer, bladder cancer, pancreas cancer, ovary cancer, cervical cancer, lung cancer, breast cancer and skin cancer, such as squamous cell and basal cell cancers, prostate cancer, renal cell carcinoma, and other known cancers that effect epithelial cells throughout the body. Preferably, the neoplasia to be treated is selected from gastrointestinal cancer, liver cancer, bladder cancer, pancreas cancer, ovary cancer, prostate cancer, cervical cancer, lung cancer, breast cancer and skin cancer, such as squamous cell and basal cell cancers. The present *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt Form II and methods can also be used to treat the fibrosis which occurs with radiation therapy. The present *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt and methods can be used to treat subjects having adenomatous polyps, including those with familial adenomatous polyposis (FAP). Additionally, the present *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt and methods can be used to prevent polyps from forming in patients at risk of FAP.

[0096] Conjunctive treatment of a *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention with another antineoplastic

agent will produce a synergistic effect or alternatively reduce the toxic side effects associated with chemotherapy by reducing the therapeutic dose of the side effect-causing agent needed for therapeutic efficacy or by directly reducing symptoms of toxic side effects caused by the side effect-causing agent. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention will further be useful as an adjunct to radiation therapy to reduce side effects or enhance efficacy.

[0097] In the present invention, another agent which can be combined therapeutically with the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention includes any therapeutic agent which is capable of inhibiting the enzyme cyclooxygenase-2 ("COX-2"). Preferably such COX-2 inhibiting agents inhibit COX-2 selectively relative to the enzyme cyclooxygenase-1 ("COX-1"). Such a COX-2 inhibitor is known as a "COX-2 selective inhibitor". COX-2 selective inhibitors useful in therapeutic combination with the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention include celecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, rofecoxib, ABT-963 (2-(3,4-difluorophenyl)-4-(3-hydroxy-3-methyl-1-butoxy)-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-3(2H)-pyridazinone; described in PCT Patent Application No. WO 00/24719), or meloxicam. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention can also be advantageously used in therapeutic combination with a prodrug of a COX-2 selective inhibitor, for example parecoxib.

[0098] Another chemotherapeutic agent which will be useful in combination with the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention can be selected, for example, from the following non-comprehensive and non-limiting list:

[0099] Alpha-difluoromethylornithine (DFMO), 5-FU-fibrinogen, acanthifolic acid, aminothiadiazole, brequinar sodium, carmofur, Ciba-Geigy CGP-30694, cyclopentyl cytosine, cytarabine phosphate stearate, cytarabine conjugates, Lilly DATHF, Merrel Dow DDFC, dezaguanine, dideoxycytidine, dideoxyguanosine, didox, Yoshitomi DMDC, doxifluridine, Wellcome EHNA, Merck & Co. EX-015, fazarabine, floxuridine, fludarabine phosphate, 5-fluorouracil, N-(2'-furanidyl)-5-fluorouracil, Daiichi Seiyaku FO-152, isopropyl pyrrolizine, Lilly LY-188011, Lilly LY-264618, methobenzaprim, methotrexate, Wellcome MZPES, norspermidine, NCI NSC-127716, NCI NSC-264880, NCI NSC-39661, NCI NSC-612567, Warner-Lambert PALA, pentostatin, piritrexim, plicamycin, Asahi Chemical PL-AC, Takeda TAC-788, thioguanine, tiiazofurin, Erbamont TIF, trimetrexate, tyrosine kinase

inhibitors, tyrosine protein kinase inhibitors, Taiho UFT, uricytin, Shionogi 254-S, aldo-phosphamide analogues, altretamine, anaxirone, Boehringer Mannheim BBR-2207, bestabucil, budotitane, Wakunaga CA-102, carboplatin, carmustine, Chinoi-139, Chinoi-153, chlorambucil, cisplatin, cyclophosphamide, American Cyanamid CL-286558, Sanofi CY-233, cyplatate, Degussa D-19-384, Sumimoto DACHP(Myf)2, diphenylspiromustine, diplatinum cytostatic, Erba distamycin derivatives, Chugai DWA-2114R, ITI E09, elmustine, Erbamon FCE-24517, estramustine phosphate sodium, fotemustine, Unimed G-6-M, Chinoi GYKI-17230, hepsul-fam, ifosfamide, iproplatin, lomustine, mafosfamide, mitolactol, Nippon Kayaku NK-121, NCI NSC-264395, NCI NSC-342215, oxaliplatin, Upjohn PCNU, prednimustine, Proter PTT-119, ranimustine, semustine, SmithKline SK&F-101772, Yakult Honsha SN-22, spiromus-tine, Tanabe Seiyaku TA-077, tauromustine, temozolomide, teroxirone, tetraplatin, trimelamol, Taiho 4181-A, aclarubicin, actinomycin D, actinoplanone, Erbamon ADR-456, aeroplysinin derivative, Ajinomoto AN-201-II, Ajinomoto AN-3, Nippon Soda anisomycins, anthracycline, azino-mycin-A, bisucaberin, Bristol-Myers BL-6859, Bristol-Myers BMY-25067, Bristol-Myers BMY-25551, Bristol-Myers BMY-26605, Bristol-Myers BMY-27557, Bristol-Myers BMY-28438, bleomycin sulfate, bryostatin-1, Taiho C-1027, calicheomycin, chromoximycin, dactinomycin, daunorubicin, Kyowa Hakko DC-102, Kyowa Hakko DC-79, Kyowa Hakko DC-88A, Kyowa Hakko DC89-A1, Kyowa Hakko DC92-B, ditrisarubicin B, Shionogi DOB-41, doxorubicin, doxorubicin-fibrinogen, elsamicin-A, epirubicin, erbstatin, esorubicin, esperamicin-A1, esperamicin-A1b, Erbamon FCE-21954, Fujisawa FK-973, fostriecin, Fujisawa FR-900482, glidobactin, gregatin-A, grincamycin, herbimycin, idarubicin, illudins, kazusamycin, kesarirhodins, Kyowa Hakko KM-5539, Kirin Brewery KRN-8602, Kyowa Hakko KT-5432, Kyowa Hakko KT-5594, Kyowa Hakko KT-6149, American Cyanamid LL-D49194, Meiji Seika ME 2303, menogaril, mitomycin, mitoxantrone, SmithKline M-TAG, neoactin, Nippon Kayaku NK-313, Nippon Kayaku NKT-01, SRI International NSC-357704, oxalysine, oxaunomycin, peplomycin, pilatin, pirarubicin, porothramycin, pyrimidamycin A, Tobishi RA-I, rapamycin, rhizoxin, rodorubicin, sibanomicin, siwenmycin, Sumitomo SM-5887, Snow Brand SN-706, Snow Brand SN-07, sorangicin-A, sparsomycin, SS Pharmaceutical SS-21020, SS Pharmaceutical SS-7313B, SS Pharmaceutical SS-9816B, steffimycin B, Taiho 4181-2, talisomycin, Takeda TAN-868A, terpentecin, thiazine, tricrozarin A, Upjohn U-73975, Kyowa Hakko UCN-10028A, Fujisawa WF-3405, Yoshitomi Y-25024 zorubicin, alpha-carotene, alpha-difluoromethyl-arginine, acitretin, Biotec AD-5, Kyorin AHC-52, alstonine, amonafide, amphetinile, amsacrine, Angiostat, ankinomycin, anti-neoplaston A10, antineoplaston A2,

antineoplaston A3, antineoplaston A5, antineoplaston AS2-1, Henkel APD, aphidicolin glycinate, asparaginase, Avarol, baccharin, batracylin, benfluron, benzotript, Ipsen-Beaufour BIM-23015, bisantrene, Bristo-Myers BMY-40481, Vestar boron-10, bromofosfamide, Wellcome BW-502, Wellcome BW-773, caracemide, carmethizole hydrochloride, Ajinomoto CDAF, chlorsulfaquinoxalone, Chemex CHX-2053, Chemex CHX-100, Warner-Lambert CI-921, Warner-Lambert CI-937, Warner-Lambert CI-941, Warner-Lambert CI-958, clanfenur, claviridenone, ICN compound 1259, ICN compound 4711, Contracan, Yakult Honsha CPT-11, crisnatol, curaderm, cytochalasin B, cytarabine, cytocytin, Merz D-609, DABIS maleate, dacarbazine, datelliptinium, didemnin-B, dihaematoporphyrin ether, dihydrolenperone, dinaline, distamycin, Toyo Pharmar DM-341, Toyo Pharmar DM-75, Daiichi Seiyaku DN-9693, elliprabin, elliptinium acetate, Tsumura EPMTTC, ergotamine, etoposide, etretinate, fenretinide, Fujisawa FR-57704, gallium nitrate, genkwadaphnin, Chugai GLA-43, Glaxo GR-63178, grifolan NMF-5N, hexadecylphosphocholine, Green Cross HO-221, homoharringtonine, hydroxyurea, BTG ICRF-187, ilmofofine, isoglutamine, isotretinoin, Otsuka JI-36, Ramot K-477, Otsuka K-76COONa, Kureha Chemical K-AM, MECT Corp KI-8110, American Cyanamid L-623, leukoregulin, lonidamine, Lundbeck LU-23-112, Lilly LY-186641, NCI (US) MAP, marycin, Merrel Dow MDL-27048, Medco MEDR-340, merbarone, merocyanine derivatives, methylanilinoacridine, Molecular Genetics MGI-136, minactivin, mitonafide, mitoquidone, mopidamol, motretinide, Zenyaku Kogyo MST-16, N-(retinoyl)amino acids, Nisshin Flour Milling N-021, N-acylated-dehydroalanines, nafazatrom, Taisho NCU-190, nocodazole derivative, Normosang, NCI NSC-145813, NCI NSC-361456, NCI NSC-604782, NCI NSC-95580, octreotide, Ono ONO-112, oquizanocine, Akzo Org-10172, pancratistatin, pazelliptine, Warner-Lambert PD-111707, Warner-Lambert PD-115934, Warner-Lambert PD-131141, Pierre Fabre PE-1001, ICRT peptide D, piroxantrone, polyhaematoporphyrin, polypreic acid, Efamol porphyrin, probimane, procarbazine, proglumide, Invitron protease nexin I, Tobishi RA-700, razoxane, Sapporo Breweries RBS, restrictin-P, retelliptine, retinoic acid, Rhone-Poulenc RP-49532, Rhone-Poulenc RP-56976, SmithKline SK&F-104864, Sumitomo SM-108, Kuraray SMANCS, SeaPharm SP-10094, spatol, spirocyclopropane derivatives, spirogermanium, Unimed, SS Pharmaceutical SS-554, strypoldinone, Stypoldione, Suntory SUN 0237, Suntory SUN 2071, superoxide dismutase, Toyama T-506, Toyama T-680, taxol, Teijin TEI-0303, teniposide, thaliblastine, Eastman Kodak TJB-29, tocotrienol, Topostin, Teijin TT-82, Kyowa Hakko UCN-01, Kyowa Hakko UCN-1028, ukrain, Eastman Kodak USB-006, vinblastine sulfate, vincristine, vindesine, vinestramide, vinorelbine, vintriptol, vinzolidine, withanolides,

Yamanouchi YM-534, uroguanylin, combretastatin, dolastatin, idarubicin, epirubicin, estramustine, cyclophosphamide, 9-amino-2-(S)-camptothecin, topotecan, irinotecan (Camptosar), exemestane, decapeptyl (tryptorelin), or an omega-3 fatty acid.

[0100] Examples of radioprotective agents which may be used in a combination therapy with the S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate crystalline salt Form II of this invention include AD-5, adclimón, amifostine analogues, detox, dimiēsnā, I-102, MM-159, N-acylated-dehydroalanines, TGF- Genentech, tiprotimod, amifostine, WR-151327, FUT-187, ketoprofen transdermal, nabumetone, superoxide dismutase (Chiron) and superoxide dismutase Enzon.

[0101] The S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention will also be useful in treatment or prevention of angiogenesis-related disorders or conditions, for example, tumor growth, metastasis, macular degeneration, and atherosclerosis.

[0102] In a further embodiment, the present invention also provides therapeutic combinations for the treatment or prevention of ophthalmic disorders or conditions such as glaucoma. For example the present inventive S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt advantageously will be used in therapeutic combination with a drug which reduces the intraocular pressure of patients afflicted with glaucoma. Such intraocular pressure-reducing drugs include without limitation latanoprost, travoprost, bimatoprost, or unoprostone. The therapeutic combination of the S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention plus an intraocular pressure-reducing drug will be useful because each is believed to achieve its effects by affecting a different mechanism.

[0103] In another combination of the present invention, the present inventive S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt can be used in therapeutic combination with an antihyperlipidemic or cholesterol-lowering drug such as a benzothiepine or a benzothiazepine antihyperlipidemic drug. Examples of benzothiepine antihyperlipidemic drugs useful in the present inventive therapeutic combination can be found in U.S. Patent No. 5,994,391, herein incorporated by reference. Some benzothiazepine antihyperlipidemic drugs are described in WO 93/16055. Alternatively, the antihyperlipidemic or cholesterol-lowering drug useful in combination with a compound of the present invention can be an HMG Co-A reductase inhibitor. Examples of HMG Co-A reductase inhibitors useful in the present therapeutic combination include, individually, benfluorex, fluvastatin, lovastatin, provastatin, simvastatin, atorvastatin, cerivastatin,

bervastatin, ZD-9720 (described in PCT Patent Application No. WO 97/06802), ZD-4522 (CAS No. 147098-20-2 for the calcium salt; CAS No. 147098-18-8 for the sodium salt; described in European Patent No. EP 521471), BMS 180431 (CAS No. 129829-03-4), or NK-104 (CAS No. 141750-63-2). The therapeutic combination of the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention plus an antihyperlipidemic or cholesterol-lowering drug will be useful, for example, in reducing the risk of formation of atherosclerotic lesions in blood vessels. For example, atherosclerotic lesions often initiate at inflamed sites in blood vessels. It is established that antihyperlipidemic or cholesterol-lowering drug reduce risk of formation of atherosclerotic lesions by lowering lipid levels in blood. Without limiting the invention to a single mechanism of action, it is believed that one way the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present combination will work in concert to provide improved control of atherosclerotic lesions by, for example, reducing inflammation of the blood vessels in concert with lowering blood lipid levels.

[0104] In another embodiment of the invention, the present *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt can be used in combination with other compounds or therapies for the treatment of central nervous conditions or disorders such as migraine. For example, the present *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt can be used in therapeutic combination with caffeine, a 5-HT-1B/1D agonist (for example, a triptan such as sumatriptan, naratriptan, zolmitriptan, rizatriptan, almotriptan, or frovatriptan), a dopamine D4 antagonist (e.g., sonopiprazole), aspirin, acetaminophen, ibuprofen, indomethacin, naproxen sodium, isometheptene, dichloralphenazone, butalbital, an ergot alkaloid (e.g., ergotamine, dihydroergotamine, bromocriptine, ergonovine, or methyl ergonovine), a tricyclic antidepressant (e.g., amitriptyline or nortriptyline), a serotonergic antagonist (e.g., methysergide or cyproheptadine), a beta-andrenergic antagonist (e.g., propranolol, timolol, atenolol, nadolol, or metoprolol), or a monoamine oxidase inhibitor (e.g., phenelzine or isocarboxazid).

[0105] A further embodiment provides a therapeutic combination of the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention with an opioid compound. Opioid compounds useful in this combination include without limitation morphine, methadone, hydromorphone, oxymorphone, levorphanol, levallorphan, codeine, dihydrocodeine, dihydrohydroxycodone, pentazocine, hydrocodone, oxycodone, nalmeferene, etorphine, levorphanol, fentanyl, sufentanil, DAMGO,

butorphanol, buprenorphine, naloxone, naltrexone, CTOP, diprenorphine, beta-funaltrexamine, naloxonazine, nalorphine, pentazocine, nalbuphine, naloxone benzoylhydrazone, bremazocine, ethylketocyclazocine, U50,488, U69,593, spiradoline, norbinaltorphimine, naltrindole, DPDPE, [D-Ia<sup>2</sup>, glu<sup>4</sup>]deltorphan, DSLET, met-enkephalin, leu-enkephalin, beta-endorphin, dynorphin A, dynorphin B, and alpha-neoendorphin. An

advantage to the combination of the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention with an opioid compound is that the present inventive *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt will allow a reduction in the dose of the opioid compound, thereby reducing the risk or severity of opioid side effects, such as opioid addiction.

[0106] A further embodiment provides four mechanistically distinct novel crystallization process designs for the preparation of the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt of the present invention with tailored bulk powder characteristics for easy to prepare pharmaceutical compositions comprising *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt together with a pharmaceutically acceptable carrier.

#### ILLUSTRATIVE EXAMPLES

[0107] Methods to make *S*-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine dihydrochloride are known and described in commonly assigned U.S. patent number 6,403,830, incorporated herein by reference. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine free zwitterion is described in co-pending U.S. Application Serial Number 60/453,798, incorporated herein by reference. Crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate Form I is described in co-pending U.S. Application Serial Number 60/453,796, incorporated herein by reference. Crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate Form II is described in co-pending U.S. Application Serial Number 60/453,782, incorporated herein by reference.

#### Characterization of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride

[0108] *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals are birefringent with positive elongation when analyzed by polarized light microscopy. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystalline salt has an aqueous solubility in excess of 150 mg ml<sup>-1</sup>.

[0109] Fig. 1 is powder x-ray pattern of two samples (Examples 9 and 20) of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Both diffraction patterns help establish characteristic peaks useful in characterizing crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

[0110] Fig. 2 is a graph of a differential scanning calorimetry study of a sample of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. It shows a single melt/decomposition thermal event at 197.30 °C with an associated enthalpy of 134.92 J gram<sup>-1</sup>. Since the single thermal event is a composite of thermal degradation of maleic acid in crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride and the melting of the residual crystalline solids, both the peak temperature and enthalpy can vary depending on the analysis conditions such as the sample size, heating rate and the method for sample preparation. Fig. 3 is a thermogravimetric (TGA) plot of a sample of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. TGA shows a weight loss of approximately 1% over the 40-180 °C temperature range.

[0111] Fig. 4 is a plot of a moisture sorption study of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Moisture sorption of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride 25 °C, by DVS moisture balance, showed a moisture uptake of approximately 1.5% between 0 and 70% relative humidity (R.H.). Between 70 and 90% R.H., another 58% moisture was taken up by the solids. It is presumed that at 90% R.H. the crystal structure was destroyed to produce highly hygroscopic amorphous solids. During the de-sorption cycle (from 90 to 30% R.H.), these solids transformed into a mixture of form II of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate and amorphous zwitterion with excess hydrogen chloride. Subsequent de-sorption and re-sorption behavior was very similar to form II of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate. Powder x-ray analysis on the solids at the end of the experiment confirmed the presence of both form II the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate and amorphous solids.

[0112] Fig. 5 shows the Raman spectrum of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride made in Example 20. Briefly, the Raman spectrum is a vibrational signature of a molecule or complex system. Its origin lies in the inelastic collisions between the molecules and photons, which are the particles of light composing a light beam. The collision between the molecules and the photons leads to an exchange of energy with consequent change in energy and hence wavelength of the photon. Thus, a Raman spectrum is a set of very narrow spectral lines emitted from object molecules when illuminated by an incident light. The width of each spectral line is strongly affected by the spectral width of the incident light and hence tightly monochromatic light sources, such as lasers, are used. The wavelength of each Raman line is expressed as a wave number-shift from the incident light, which is the difference between the inverse wavelength of the Raman line and the incident light. The wave number-shift, not the absolute wavelength, of the Raman lines is specific to particular atomic groups in molecules. Raman spectra measure the vibration states of molecules, which are determined by their molecular structure.

#### **Crystallization of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride**

[0113] The diverse selection of examples reported here for the crystallization of mixed salt is organized in three main sub-sections. The first sub-section, Examples 1-6, presents the account of experiments that failed to produce polymorphically pure crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. In most of these experiments mixtures with Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate were obtained. A brief discussion on the reasons for the failure to obtain polymorphically pure crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride is also included at the end of the sub-section.

[0114] External crystal shape of the mixed salt defines the next two main sub-sections. This particular product attribute is driven by distinct underlying crystallization mechanisms and has major implications for the subsequent development of a pharmaceutical composition comprising S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride together with a pharmaceutically acceptable carrier. The two distinct shapes, for the purposes of this invention from here on are referred to as "randomly packed agglomerates" usually but not necessarily non-spherical in overall appearance and "orderly packed agglomerates" usually but not necessarily spherical in overall appearance. In general, primary crystals making up the agglomerate have smaller aspect ratios for the orderly packed agglomerates

when compared to the primary crystals making up randomly packed agglomerates. For the purposes of this invention, aspect ratio is defined as the ratio of the long ferret to the short ferret.

[0115] First, the examples pertinent to the crystallization of "randomly packed agglomerates," Examples 7-19 are discussed. This is followed by a discussion on the underlying crystallization mechanism directing the formation of this particular crystal shape. Also included is a detailed definition of "phase separation" for the purpose of this invention.

[0116] Finally, Examples 20-30, the account of various experiments that followed the diverse variants of processes for the "orderly packed agglomerates" is summarized.

**Feedstock definitions:**

[0117] The zwitterion; *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine used in all the examples reported here was either obtained as amorphous freeze dried solids or solutions in DMF.

[0118] Solid *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine would be referred to as amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine from here on. In most cases, amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine contained some hydrogen-chloride (HCl). Molar equivalents of HCl to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine would be specified in each example for the specific lot of the amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine used for the crystallization of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

[0119] The first DMF/ *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine stock solution had an approximate composition of: *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine 11.7% w/w; water 0.2% w/w; maleic acid 12.4% w/w; and chloride 1.0%. Variability of 10% could be expected for each component of this solution. The aforementioned concentration of maleic acid and chloride in the solution represents approximately 2.0 and 0.5 molar equivalents respectively for each equivalent of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine. This solution would be referred to as the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine from here on.

[0120] The other stock solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine in DMF had an approximate composition of: *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine 11.7% w/w; water 2.83% w/w; maleic acid 14.88% w/w; and chloride 1.0%. The aforementioned concentration of maleic acid and chloride in the solution represents

approximately 2.2 and 0.5 molar equivalents respectively for each equivalent of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine. This solution is referred to as the secondary DMF solution of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine from here on.

#### **Examples of failed experiments with respect to polymorphic purity**

**[0121]** Six distinct experiments produced mixtures of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride with crystalline Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate. The small quantities of the latter were readily detected by the DSC analysis.

#### **Example 1**

**[0122]** In Example 1, 614 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 648 mg of maleic acid, 988 mg of DI water and 2460.7 mg of DMF were added to a 25 ml scintillation vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 16 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 1.0 ml aliquots over 50 minutes. Turbidity subsided completely upon the completion of the charge. The vial was stirred at room temperature for seventeen hours and then heated to 60 °C in forty minutes. It was stirred at this temperature for forty hours and then two ml of acetonitrile were added. The slurry was stirred for another hour at 60 °C and then cooled to 25 °C in one hour and stirred for four hours. The slurry was discharged on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours. PXRD analysis on the product did not show any appreciable amount of Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate mixed in with the S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, however DSC analysis indicated that some Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate was present in the product.

#### **Example 2**

**[0123]** Example 2 involved adding 201 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 209 mg of maleic acid and 1120 mg of DMF to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 5 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 1.0 ml aliquots over 50 minutes. Turbidity did not completely

subside, nevertheless 7 mg of Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate were added as seed crystals. The vial was stirred at room temperature for six hours and then heated to 60 °C in forty minutes. It was stirred at this temperature for forty hours. The slurry was discharged on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours. PXRD analysis on the product did not show any appreciable amount of Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate mixed in with *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, however DSC analysis indicated that Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate was present in the product.

### Example 3

[0124] The objective of Example 3 was to determine if seeding with Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate had contributed to polymorphically impure product in Example 2. 203 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 208 mg of maleic acid and 1137 mg of DMF were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 4 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 1.0 ml aliquots over 50 minutes. Turbidity completely subsided upon the completion of reduced acetonitrile charge. The vial was stirred at room temperature for six hours and then heated to 60 °C in forty minutes. It was stirred at this temperature for forty hours and then cooled to room temperature. The slurry was discharged on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours. PXRD analysis on the product did not show any appreciable amount of Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate mixed in with *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, however DSC analysis indicated that Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate was present in the product.

82

**Example 4**

[0125] The objective of Example 4 was to study the crystallization behavior at sub-ambient temperatures. 201 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 209 mg of maleic acid and 1141 mg of DMF were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 4 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 1.0 ml aliquots over 50 minutes. Turbidity subsided completely upon the completion of the charge. The vial was cooled to -5 °C and stirred for twenty-four hours. The solution had turned into very thick "gel-like" slurry of crystalline solids. 4 ml of acetonitrile were added to the slurry to dilute it. It was then heated back to 25 °C and stirred for four hours. The slurry was discharged on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 40 °C and 28 inches Hg for 24 hours. PXRD analysis on the product did not show any appreciable amount of Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate mixed in with S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, however DSC analysis indicated that Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate was present in the product.

**Example 5**

[0126] In Example 5, maleic acid content of the system was reduced by 25%. It involved adding 304 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 241 mg of maleic acid and 1659 mg of DMF to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 4 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 1.0 ml aliquots over 50 minutes. The turbidity of the system converted into a solid viscous mass at the bottom of the vial after the completion of acetonitrile charge. The vial was heated to 60 °C in forty minutes. Within two and a half hours at 60 °C, solids were observed in the vial. However, they seemed stuck to the walls of the vial and were therefore scrapped with a spatula and suspended back in the solution. The slurry was stirred at this temperature for nineteen hours and then discharged on a fine frit sintered glass funnel. The cake was very wet. It was re-suspended in 2 ml of acetonitrile and then washed. The cake was air dried for half an hour. Solids were then air dried in an open crystallization dish for 2

hours. PXRD analysis on the product showed appreciable amount of Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate mixed in with S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. DSC analysis confirmed PXRD results.

#### **Example 6**

[0127] The objective of Example 6 was to increase yield by using a modified addition regime for acetonitrile at levels similar to those in Example 5. It involved adding 301 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 241 mg of maleic acid and 1660 mg of DMF to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 3 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 1.0 ml aliquots over 50 minutes. The turbidity of the system subsided on the completion of acetonitrile charge and crystals were observed within 30 minutes. The slurry was stirred at room temperature for three hours and then one ml of acetonitrile was added. Stirring continued at room temperature for another nineteen hours. The slurry was discharged on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were then air dried in an open crystallization dish for 2 hours. PXRD analysis on the product did not show any appreciable amount of Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate mixed in with S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, however DSC analysis indicated that Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate was present in the product.

#### **Discussion of Examples 1-6**

[0128] Thermal analysis on the intermediate solid samples withdrawn during various stages of the experiments reported above indicated that Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate crystallized during the cool down or the extended hold periods at any of the hold temperatures reported above. This implies secondary nucleation of Form I of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate during the latter stages of crystallization. Without wishing to be bound by any theory, it is believed that this is explained because during the hold periods, the system is completely depleted of HCl through the formation of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate

12

hydrochloride. However, there is still 0.5 equivalents of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine and 1.75 equivalents of maleic acid in the system at concentrations probably above the solubility of Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate. As the system attempts to de-saturate further through cooling, anti-solvent addition, hold periods or reduced maleic acid content, super-saturation with respect to Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate is depleted through its crystallization in the presence of all the heterogeneous surfaces offered by *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals.

[0129] In summary, for experiments under HCl deficient conditions, any attempt to increase the super-saturation of the system at any stage through anti-solvent addition, cooling or reducing maleic acid content can lead to the loss of control with respect to the polymorphic purity of the product. In a DMF/acetonitrile system in such a hydrochloride deficient state, mixtures with Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate can be expected.

#### **Examples of Randomly packed agglomerates**

[0130] Examples 7, 8 and 9 had stoichiometric amounts of HCl in relation to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine to crystallize *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Example 7 and 8 represent experiments performed at low water and acetonitrile levels. Example 9 is an experiment conducted at the standard water content and acetonitrile levels.

[0131] Experiments captured in Examples 10 through 19 were conducted to demonstrate that *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride could be crystallized and isolated over a wide range of values for the molar equivalents of HCl in relation to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine.

[0132] Examples 10, 11, 12 and 13 were all performed at 26% of the required amount of HCl in relation to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine to crystallize *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Example 13 involved direct precipitation of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, while Examples 10 through 12 involved precipitation of either the Form I or II of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate, followed by solution mediated phase conversion to crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-

methyl-L-cysteine maleate hydrochloride through heating and or extended hold periods at select temperatures.

[0133] Examples 14, 15 and 16 were all performed at 50% of the required amount of HCl in relation to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine to crystallize *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Examples 14 and 15 involved direct precipitation of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, while Example 16 involved precipitation of either the Form I or II of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate, followed by solution mediated phase conversion to crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride through heating and/ or extended hold periods at select temperatures.

[0134] Examples 17, 18 and 19 were performed at HCl levels higher than those required for stoichiometric considerations to convert *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine into crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### Example 7

[0135] To 126.1 grams of the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, 1.46 grams of de-ionized water were added in order to take the water content of the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine to 1.63%. 125.5 grams of this solution was charged to a 500 ml jacketed reactor with agitation set at 354 rpm. A total of 126.58 grams of acetonitrile were added to the reactor through a pump at a rate of 1.4 ml per minute over two hours. Crystals had formed during the addition period. The system was stirred for a total of 53 hours and then the slurry was discharged and filtered on a fine frit sintered glass funnel. Filtration was extremely fast. The cake was rinsed with 83 ml of acetonitrile and air dried for twenty-four hours. It weighed 13.48 grams.

#### Example 8

[0136] To 7.5 grams of the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, 109 microliters of de-ionized water were added in order to take the water content of the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine to 1.63%. This solution was charged to a 25 ml round bottom flask stirred with a magnetic bead. A total of 7.85 grams of acetonitrile were added to the flask in 0.5 ml aliquots

HPL

every three minutes over 54 minutes. The system was stirred for a total of 72 hours and then and then the slurry was discharged and filtered on a 15 ml fine frit sintered glass funnel. [0137] Filtration was slow. The cake was rinsed with 4 ml of acetonitrile and air dried for twenty-four hours. Some solids had crystallized out on the walls of the round bottom flask. They were isolated separately. Mass balance on the all the isolated solids indicated that the solids on the wall represented 65% of the entire product. SEM photomicrographs of the solids from the slurry and the walls confirmed that this experiments produced a "randomly packed agglomerate" shape for the crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### Example 9

[0138] Example 9 was performed with amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water) that did not contain any HCl. The procedure involved adding 565 mg of amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 599 mg of maleic acid, 105 mg of 37% concentrated HCl (aqueous) and 2969 mg of DMF to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 7.5 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 0.5 ml aliquots over 25 minutes. Significant crystallization occurred during the addition of acetonitrile. The vial was stirred at room temperature for twenty-two hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 4 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours.

[0139] Fig. 6 shows a photomicrograph of the product. It seems that the solids are randomly packed agglomerates made of very small, perhaps sub-micron primary crystals. All the analytical data on oven-dried solids from this experiment confirmed its identity as crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Fig. 1, as more fully described below, shows a powder X-ray diffraction pattern (top pattern) of crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride obtained from this example. Fig 7. shows SEM pictures of the randomly packed agglomerates of the product from this example.

**Example 10**

[0140] In Example 10, 301 mg of 0.13 eq. HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 317 mg of maleic acid, 1239 mg of DMF and 457 mg of DI water were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 8 ml of acetonitrile were slowly added in 0.5 ml aliquots. The system was stirred at room temperature for 24 hours to crystallize out. Temperature of the vial was then increased to 55 °C and it was held at this temperature for 48 hours. Photo-microscopy on slurry samples just prior to heating and after 48 hours at the elevated temperature confirmed that the phase conversion to crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride had occurred. The slurry at 55 °C was quickly filtered on a 30 ml fine frit sintered glass funnel and the cake washed with 1 ml of acetonitrile. The solids were air dried for 2 hours. Analytical data on the product confirmed it to be S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Proton NMR analysis indicated that the product may have trapped DMF at 0.06 moles per mole of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

**Example 11**

[0141] In Example 11 313 mg of 0.13 HCl containing amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 313 mg of maleic acid, 1247 mg of DMF and 453 mg of DI water were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 8 ml of acetonitrile were slowly added in 1.0 ml aliquots. Crystallization seemed to have occurred with the addition of 7.5 ml of acetonitrile. The charge was, however completed to 8 ml and the slurry was stirred at room temperature for 24 hours to de-saturate. Temperature of the vial was then increased to 56 °C and it was held at this temperature for 24 hours. Photo-microscopy on slurry samples just prior to heating and after 24 hours at the elevated temperature confirmed that the phase conversion to crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride had occurred. The slurry at 56 °C was quickly filtered on a 30 ml fine frit sintered glass funnel and the cake washed with 1 ml of acetonitrile. The solids were air dried for 2 hours. Analytical data on the product confirmed it to be S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Proton NMR analysis indicated that DMF was not trapped by the product.

15

**Example 12**

[0142] Example 12 was performed to determine if *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride could be nucleated directly by initiating the crystallization process at an elevated temperature and if the filtration of hot slurry could be avoided. 302 mg of 0.13 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 321 mg of maleic acid, 1223 mg of DMF and 453 mg of water were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was heated to 60 °C and stirred to affect a clear solution. 8 ml of acetonitrile were slowly added to the solution at 60 °C in 1 ml aliquots. No crystallization was observed during the addition process, however crystals did form within 20 minutes of the completion of acetonitrile charge. The slurry was stirred at 60 °C for 25 hours. 2 ml of acetonitrile were added to lower the water activity of the system. The slurry was stirred at 60 °C for another 20 hours and then naturally cooled to room temperature and stirred for 2 hours before being filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was rinsed with 2 ml acetonitrile and air dried for 20 minutes. Analytical data on the product confirmed it to be crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

**Example 13**

[0143] Example 13 was conducted in DMF/acetonitrile to simplify the solvent system. The procedure involved adding 202 mg of 0.13 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 213 mg of maleic acid and 1139 mg of DMF to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was heated to 60 °C and stirred to affect a clear solution. 4 ml of acetonitrile were slowly added to the solution at 60 °C in 1 ml aliquots over 20 minutes. Crystals were observed within 20 minutes of the completion of acetonitrile charge. The slurry was stirred for 24 hours at 60 °C and then cooled to 25 °C in forty-five minutes. It was stirred at 25 °C for 2 hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 1 ml of acetonitrile and air dried for twenty minutes. Solids were then dried in a vacuum oven at 40 °C under 28 inches Hg vacuum for 24 hours. Proton NMR analysis on the solids prior to oven drying, however, indicated that there was no trapped DMF in the solids. Oven drying

was therefore not necessary. All the analytical data on air-dried and vacuum dried solids from this experiment confirmed the solids to be crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### Example 14

[0144] In Example 14, 311 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 321 mg of maleic acid, 1231 mg of DMF and 451 mg of DI water were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 8 ml of acetonitrile were slowly added in 0.5 ml aliquots. It was stirred at room temperature for 24 hours to de-saturate. Temperature of the vial was then increased to 57 °C and stirring continued for another 24 hours. The slurry at 57 °C was quickly filtered on a 30 ml fine frit sintered glass funnel and the cake washed with 1 ml of acetonitrile. The solids were air dried for thirty minutes and then placed in a vacuum oven at 40 °C and 28 inches Hg vacuum for 24 hours. Analytical data on the product confirmed it to be crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Proton NMR analysis indicated that neither the air-dried nor the vacuum dried solids had trapped DMF.

#### Example 15

[0145] Example 15 was conducted in DMF/acetonitrile to simplify the solvent system. The procedure involved adding 608 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 648 mg of maleic acid and 3320 mg of DMF to a 25 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 10 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 2 ml aliquots over 20 minutes. Crystals were observed within 20 minutes of the completion of acetonitrile charge and extensive precipitation was observed within 4 hours. The slurry was stirred for 19 hours and then a solid sample was withdrawn for in-process check. Thermal analysis on the sample indicated that it may contain some Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate. The slurry was therefore, heated to 50 °C in order to selectively dissolve the Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate. Solid sample withdrawn thirty minutes after reaching 50 °C indicated that Form I of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate had indeed been eliminated from the desired solids. 4 ml of

acetonitrile were added to the slurry at 50 °C, two hours after reaching the elevated temperature. The slurry was held at 50 °C for another hour and then cooled to 0 °C in five and a half hours using a linear temperature ramp. It was stirred at 0 °C for forty hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. Filtration was extremely slow. The cake was washed with 4 ml of acetonitrile and air dried for one hour. The air-dried cake weighed 198 mg. This however, does not reflect the true yield from the process because five in-process solid samples of up to 30 mg each were withdrawn during this experiment. Proton NMR analysis on the air-dried indicated that there was 0.035 molar equivalent of DMF in the solids. Concentration analysis on the mother liquor prior to the cool down to 0 °C and after the nineteen hour hold at this temperature indicated that this operation did not help desaturate the system any further. This may however, be due to the complete depletion of HCl even before the system was cooled. Analytical data on the product confirmed it to be crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### Example 16

[0146] Example 16 was performed to optimize acetonitrile volumes, evaluate 25% reduction in the amount of maleic acid (to improve yield) and reduce and rationalize hold times. 304 mg of 0.25 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 240 mg of maleic acid and 1662 mg of DMF were added to a 12 ml scintillation vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 3 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 0.5 ml aliquots over 20 minutes. Crystals were observed within two hours of acetonitrile charge. The vial was stirred for twenty-two hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours. Proton NMR analysis on the oven dried solids indicated that there was 0.03 molar equivalent of DMF in the solids. Concentration analysis on the filtrate indicated that this recipe had a molar yield approaching 50%. This may, however, still be suppressed due to the complete depletion of HCl. Analytical data on the product confirmed it to be crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### Example 17

[0147] The objective of Example 17 was to study the crystallization of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride at 0.63 molar

equivalents of HCl (0.13 molar excess). 220 mg of 0.13 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 232 mg of maleic acid, 31.98 mg of 37% concentrated HCl (aqueous) and 1164 mg of DMF were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 3.0 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 0.5 ml aliquots over 25 minutes. Turbidity subsided completely upon the completion of the charge, however some oily residue could be seen on the walls of the vial. The vial was stirred at room temperature for seventeen hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. The cake had compressed very tightly and was difficult to remove from the funnel. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours. Filtrate analysis indicated a molar yield of approximately 75%. Analytical data on the product confirmed it to be crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### Example 18

[0148] Experiment 18 was performed at 0.63 molar equivalents of HCl (0.13 molar excess) with one mole of butanol for each mole of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine. Spiking with butanol was studied because it can be a potential impurity in the feed *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine. 210 mg of 0.13 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 232 mg of maleic acid, 72 mg of butanol, 36.0 mg of 37% concentrated HCl (aqueous) and 1186 mg of DMF were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 3.0 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 0.5 ml aliquots over 25 minutes. The vial was stirred at room temperature for seventeen hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours. Filtrate analysis indicated a molar yield of approximately 60%. Analytical data on the product from this experiment confirmed formation of crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride and indicated that the presence of butanol does not lead to any adverse affect on crystal quality. The yield for the process is, however, lowered.

JPA

**Experiment 19**

[0149] Experiment 19 was performed at 0.88 molar equivalents of HCl (0.33 molar excess). 221 mg of 0.13 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 233 mg of maleic acid, 54.0 mg of 37% concentrated HCl (aqueous) and 1196 mg of DMF were added to a 12 ml vial equipped with a magnetic stirrer. The suspension was stirred to affect a clear solution. 3.0 ml of acetonitrile were slowly added to the solution in 0.5 ml aliquots over 25 minutes. Turbidity subsided completely upon the completion of the charge, however some oily residue could be seen on the walls of the vial. The vial was stirred at room temperature for seventeen hours and then filtered on a fine frit sintered glass funnel. The cake was washed with 2 ml of acetonitrile and air dried for half an hour. The cake had compressed very tightly and was difficult to remove from the funnel. Solids were placed in a vacuum oven at 55 °C and 28 inches Hg for 24 hours.

[0150] Filtrate analysis indicated a molar yield of approximately 58%, which is significantly lower than the 75% observed in experiments where HCl concentration was closer to the stoichiometric. It therefore seems that both the excess and deficiency of HCl in the system tend to lower the yields. Analytical data on the product from this experiment confirmed formation of crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

**Discussion of randomly packed agglomerate examples**

[0151] While Examples 10 through 19, demonstrate that *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride could be crystallized under conditions representing severe deficiency or excess of HCl in relation to *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, all of these examples represent sub-optimal conditions for the crystallization of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. This discussion would therefore be limited to the more optimal procedures for crystallization of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride that are best captured by Examples 7 through 9.

[0152] Examples 7 and 8 only differ in the nature of agitation afforded to the system. The former employed an overhead motor connected to a shaft and a "half moon" blade that does not touch any surface of the crystallization flask, while the latter used a magnetic bead in contact with the bottom surface of the crystallization flask. The bead was agitated with a magnetic plate. This variable was studied in these examples to demonstrate that the randomly

packed agglomerated shape obtained in example 8 was not confounded by the use of magnetic bead, which had shown the propensity of converting orderly packed agglomerates to randomly packed agglomerates upon extended hold periods (see Example 26). Both the examples used 2.0 molar equivalents of maleic acid and 0.5 molar equivalent of HCl for each mole of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine. The water content of the system was held at 1.63% (measured before the addition of acetonitrile), while the ratio of acetonitrile to DMF was 1.4 on weight/weight basis. In Example 9, the water content of the system was 2.3% before the addition of acetonitrile, while the ratio of acetonitrile to DMF was 1.98 on weight/weight basis. Both *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine and *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride are highly soluble in water and therefore the use of extra water in Example 9 allowed the acetonitrile to DMF ratio to be increased to 1.98, without even more significant crystallization during the addition of acetonitrile.

[0153] These three experiments are characterized by: a) fast nucleation and significant crystallization of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride during the acetonitrile addition resulting in rapid de-saturation of the system; b) accelerated growth of the fastest growing crystal face resulting in larger aspect ratios; and c) no visual or other indication of sustained phase separation during or upon completion of acetonitrile charge. Detailed definition, discussion and significance of phase separation would be deferred to the next sub-section on the discussion of QESD crystallization technique. For the purpose of this discussion, it is sufficient to say that the lack of phase separation also contributes to the fast crystallization observed in these three examples.

[0154] In the absence of phase separation, fast crystallization leads to either the formation of very small needle-like crystals, if most of the de-saturation occurs through nucleation from a solution, or slightly elongated needle like crystals if more de-saturation occurs through rapid crystal growth along the long crystal dimension. Either scenario can lead to randomly packed agglomerates through compaction of cake during filtration or even in the crystallization flask if high agitation is afforded (for instance an rpm greater than 350 in Example 7).

#### **Detailed definition of phase separation**

[0155] For the purpose of this invention, phase separation is defined as any state of the crystallization system comprising of more than one liquid phase and or solids that are not crystalline. These non-crystalline solids could resemble a visually observable sticky mass usually but not necessarily completely amorphous, while the second liquid phase could

1/8

resemble visually and or microscopically observable emulsion, visually and or microscopically unobservable emulsion (for instance due to improper sampling), visually and or microscopically observable "oily coating" on the surfaces including crystals in the crystallization flask and visually and or microscopically unobservable "oily coating" (for instance due to the lack of thickness) on the surfaces including crystals in the crystallization flask.

[0156] Phase separation seems to be a manifestation of the "emulsifying agent like" nature of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine in the crystallization system comprising DMF, acetonitrile, water, maleic acid and HCl. It occurs when a certain concentration of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine at a specific water content, maleic acid and HCl strength in a solution of given DMF-acetonitrile composition is achieved prior to or during precipitation of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. The extent of phase separation is a strong function of all these intrinsic process parameters, in addition to variables such as the strength of agitation, available surfaces and addition rate of the acetonitrile.

[0157] By definition when binary phase separation occurs, two phases with different compositions are formed. For the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine/maleic acid/HCl/water/DMF/acetonitrile system, when a visually or microscopically observable classic emulsion results from the phase separation process, the continuous phase becomes the rare phase with higher acetonitrile percentage and lower *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine concentration than the original single phase solution. Conversely, the non-continuous dispersed phase becomes the dense phase with lower acetonitrile percentage and higher *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine concentration than either the continuous rare phase or the original single phase solution. When instead a visually or microscopically observable "oily coating" results from the phase separation process, complete analysis of the two phases becomes difficult. Analysis of the continuous phase, however, does show a higher acetonitrile percentage and lower *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine concentration than the original single phase solution. In fact, these characteristics of the phases could be used as the analytical test to determine the onset of the formation of stable phase separated system, especially under conditions where classic emulsion or observable "oily coating" may be difficult to detect visually or microscopically.

## **Theoretical Crystallization Models**

[0158] While theory plays no part in the instant invention, the following mechanisms are described to better acquaint those skilled in the art with the processes of the present invention.

### **QESD based crystallization**

[0159] Binary solvent mixtures used in QESD based crystallization process are characterized by unfavorable interactions (de-mixing) between the solvent and anti-solvent. Typical solvent combinations include water-acetone, water-acetonitrile, ethanol-cyclohexane and water-ethyl acetate.

[0160] The solvent tends to have very high solubility for the solute, while the anti-solvent is often characterized by negligible solubility for the solute. Solubility of the solute in the solvent as high as 1.92 g/g has been reported. Solvents with high solubility are in fact selected to maximize the strength of interactions between solute and solvent. An emulsifying agent (a surfactant) is usually dissolved in the anti-solvent to facilitate the emulsification process. Anti-solvent to solvent ratios can be as high as 50 to 1.

[0161] The process starts by dissolving the solute in solvent and adding this solution to a solution of anti-solvent and emulsifying agent at a controlled rate. Often a temperature difference is also maintained between the solvent and anti-solvent solutions, with the latter being at a lower temperature. Upon the addition of the solvent solution, a stable emulsion is created, where the solvent solution is the dispersed phase and the anti-solvent solution is the continuous phase. Super-saturation is created through heat transfer (temperature difference) and more importantly mass transfer (counter diffusion of solvent and anti-solvent out of and into the droplets of the dispersed phase). The dispersed phase de-saturates through crystallization in the dispersed phase. At the harvest point, there is only one liquid phase formed through the counter-diffusion mass transfer process described which has been described.

[0162] In QESD crystallization processes, only a fraction of the solute precipitates out due to the mild super-saturation created by the often but not always used temperature differential, which is maintained during the early phases of the process between the solvent and anti-solvent solutions. In other words, the initial super-saturation created by temperature differential is only moderate (maximum reported initial super-saturation in the literature is ~40%) and even as counter-diffusion of anti-solvent and solvent commences, the rate of

super-saturation generation is slow because of the slow transfer across the droplet boundary. Consequently, such processes operate under relatively mild residual super-saturation for much of the duration and are therefore characterized by slow overall de-saturation rates. Another common feature of such processes is that the concentration of the solute in the continuous phase actually increases, albeit only slightly, as the solubility of the solute increases in the anti-solvent-rich phase through diffusion of the solvent from the dispersed phase.

#### **High super-saturated induced LLPS based crystallization**

[0163] There is growing evidence that super-saturated solutions, especially those of protein, protein like molecules and systems that make colloidal solutions can undergo a further super-saturation induced separation into two meta-stable "non-equilibrium" liquid phases of different compositions. The on-set of phase-separation or de-mixing on cursory inspection resemble typical cloud point for a crystallization process, however, techniques such as microscopy readily indicate that the turbidity is not due to the formation of crystalline solids. The de-mixing process inherently creates an even more super-saturated phase coexisting with a less super-saturated or even under-saturated phase. Crystallization initially commences in the higher super-saturation phase, which can for certain conditions resemble a typical dispersed phase in an emulsion or a quasi-emulsion of the type described in the preceding section. Agglomerate-like morphologies similar to those shown in FIG. 8 have also been reported for processes based on high super saturation induced LLPS.

[0164] Both binary and single solvent systems exhibiting LLPS type behavior are known. In all cases, the solubility of the solute in the solvent system of choice is moderate (numbers at high end are no greater than 200 mg/gram), which is in sharp contrast to the solvent solutions used in QESD type design.

[0165] A significant body of literature exists on the solution properties of the systems that exhibit LLPS under super-saturated conditions. In addition to typical transitions such as solidification below the liquidus, phase diagrams also exhibit an atypical liquid-liquid phase separation, also referred to as coacervation, wherein the meta-stable solution forms two distinct non-equilibrium liquid phases with unequal concentrations of the solute. The co-existence curve on the diagram represents the concentration of coexisting solute rich and solute poor liquid phases as a progressively more super-saturated solution of the solute is created by continuing to move vertically downward from the liquidus line.

[0166] Experimental techniques to establish the co-existence curve include two very simple procedures; cloud point and temperature quench methods. Briefly, with the former, the opacification temperature is determined for each fixed solute concentration, while with the latter the super-saturated solution is cooled to a fixed temperature below the phase separation temperature and then the two co-existing phases are analyzed for concentration. For binary systems (solute and single-solvent), the maximum temperature on the co-existence curve is called the critical temperature of phase separation and the corresponding concentration is called the critical concentration.

[0167] Critical concentration plays a pivotal role in establishing the "morphology" of the two phases. In systems with concentration less than the critical concentration, nucleation and growth of spherical, uniformly sized droplets containing the solute rich phase is observed. In systems with concentration greater than the critical concentration, again nucleation and growth of spherical, uniformly sized droplets is often observed. In this case, however, the droplets contain the solute poor phase. In extreme cases, instead of phase separation, gelation could also be observed as the temperature is lowered below the liquidus line. Crystalline domains can often be observed as this gel phase (usually amorphous solids) containing system is cooled to temperatures below the co-existence curve. In systems with concentration very close to critical concentration, two inter-connected domains appear.

[0168] For a ternary system comprising solute, solvent and anti-solvent, the co-existence surface (see FIG. 10) represents LLPS temperature as a function of solute  $c_1$  for a fixed amount of anti-solvent at concentration  $c_2$ . At a fixed temperature, the LLPS properties of the system are described by an isothermal coexistence curve (see FIG. 11), which gives the concentrations  $(c_1, c_2)^I$  and  $(c_1, c_2)^{II}$  in the two coexisting phases I and II generated by starting with solutions of different solute concentration for a fixed amount of anti-solvent. The partitioning of the two phases can be best captured by the tie lines connecting the points I and II on the coexisting curve drawn at constant temperature (see FIG. 11). For a ternary system, the critical point  $(c_1, c_2)^c$  is defined as the point on coexistence plot where the condition  $(c_1, c_2)^I$  equal  $(c_1, c_2)^{II}$  is satisfied. The location of this point as a function of temperature is described as the critical line on the co-existence surface. As shown in FIG. 10, the net effect of adding a fixed amount of anti-solvent or precipitating agent (such as polyethylene glycol) to a solute-solvent solution is the upward shift of the entire coexistence curve towards the liquidus (which may itself move upward but not to the same extent as the upward move of co-existence curve), in addition to some distortion in the symmetry of the shape of the curve

30

itself. The latter has consequences for the composition of two phases and their relative fractions.

[0169] As more precipitating agent or a stronger precipitating agent is introduced in the solute solvent solution, the shifts become more pronounced and the curve more asymmetric.

The net effect of these shifts is that the gap between the liquidus and coexistence curve

-- reduces as LLPS temperature increases and consequently, LLPS occurs at even lower super-saturations. Critical point moving to lower concentrations of the solute due to the asymmetry has implications for the morphology of the phase separated liquid phases.

[0170] The slope of LLPS temperature as a function of anti-solvent concentration at the critical point, the critical temperature and the concentration of the anti-solvent can actually be used to calculate the LLPS temperature in the absence of the anti-solvent by the mathematical model developed in reference 15. This is extremely attractive when LLPS of a solute solvent system is not accessible due to either freezing of the system or crystallization of solute prior to reaching the LLPS temperature or super-saturation. Furthermore, the slope of the tie lines in FIG. 11 is proportional to the fractional decrease in solute solubility due to the presence of a given concentration of the anti-solvent or the precipitating agent. In other words, the slope of tie lines characterizes the effectiveness of a solute-precipitating agent such as the anti-solvent. Consequently, this information can be used to predict the liquidus lines in the presence of the anti-solvent.

[0171] The effect of a second solute (such as structurally related impurities) similar to the primary solute is usually limited to vertical displacement (usually downwards *i.e.*, decrease in LLPS temperature) of the coexistence curve along the temperature axis for the binary system<sup>18</sup>. During these displacements the curve retains its shape, unlike the situation encountered in the presence of a precipitating agent or an anti-solvent. However, if the second solute or the impurity is dissimilar to the primary solute, then in addition to vertical displacement (again usually downwards) along the temperature axis, the shape of the coexistence curve is also distorted. The curves become increasingly asymmetric, with the critical points shifting to higher primary solute concentrations, while at the same time the maximum LLPS temperature shifting to lower primary solute concentrations. It seems that the net effect of a second solute is that more super-saturation is needed to observe LLPS in ternary systems containing a second solute phase such as an impurity.

[0172] In the context of LLPS based design, the dissimilarity between solute species is best captured by identifying the differences in the critical point for each species in a binary system comprising of that solute and a solvent common to all the species under investigation. The

asymmetry caused in the coexistence curve by the presence of dissimilar second solutes such as impurities, again has consequences for the relative fraction and morphology of the two liquid phases obtained upon LLPS.

[0173] Cycling through the LLPS surface can significantly reduce induction times to nucleation well above the LLPS temperatures ( $> 2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nucleation rate increases in excess of six folds have been reported at temperatures greater than LLPS temperatures by  $1\text{--}1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Two reasons have been postulated for this significant increase in nucleation rate. First is the reduction in the  $\Delta G_{\text{nuc}}$  because the system approaches the spinodal just above the bi-nodal at LLPS temperature. In the spinodal region density fluctuations are higher than at any other point in the vicinity and this in turn leads to reduction in  $\Delta G_{\text{nuc}}$ . Furthermore, the number of molecules needed to make a stable pre-nucleation cluster drops significantly, because of the reduction in  $\Delta G_{\text{nuc}}$ . Second, in the approach to LLPS temperature, phenomenon akin to wetting of the crystal nuclei surfaces by high solute concentration liquid can also enhance nucleation rate. The nucleation rate reduces back to that predicted by classical nucleation rate expressions as the system enters the LLPS regime. The rates can be estimated with some accuracy from the respective super-saturations in the solute rich and solute poor phases by using appropriate classical nucleation models.

[0174] Crystal morphology obtained through crystallization under the LLPS surface seems to be related to the onset single-phase solute concentration in relation to the critical point. This is in turn related to the actual "morphology" of the solute rich and solute poor liquid phases on either side of the critical point. As described earlier, in systems with concentration less than the critical concentration, nucleation and growth of spherical, uniformly sized droplets containing the solute rich phase is observed. Crystallization commences in the highly super-saturated solute-rich droplet through multiple nucleations at the core of the droplet thereby transforming it into polycrystalline solid phase. New crystals form and grow radially outwards from the poly-crystalline core and consume not only the remaining solute in the droplet but also the solute in solute-poor phase, which cannot usually precipitate on its own because of the low super-saturation in the solute-poor continuous phase.

[0175] In systems with concentration greater than the critical concentration, again nucleation and growth of spherical, uniformly sized droplets is often observed. In this case, however, the droplets contain the solute poor phase. Irregular polycrystalline solids with very small primary particles are obtained for these systems. However, if the concentration is significantly higher than the critical concentration, gelation (due to the formation of

amorphous solids) might be observed even before LLPS temperature is approached. When such a system is brought below the LLPS curve, crystals form within the gel matrix. The rate of transformation of a gel phase containing system to a totally crystalline material is however, significantly slower than a corresponding system that contains high concentration liquid droplets instead. The reason for slow transformation in the gel phase is related to the fact the mobility is arrested due to the formation of the gel, which in turn retards the crystal nucleation rate.

[0176] In summary LLPS based crystallization processes operating below the co-existence curve and to the left of the critical point can produce morphologies similar to those observed for crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride (see FIG. 8). In such processes the super-saturation in the solute-rich dispersed phase is usually very high. Also analysis of solute concentration in the solute-poor continuous phase show a continual decrease as the overall system crystallizes out. In conclusion, basic observations and data, all the crystallization process characterization data and observed crystal morphology are congruent with the general features of an LLPS based crystallization process operating just below the co-existence curve and to the left of the critical point. This conceptual design is therefore proposed as the model to describe the crystallization of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride as orderly packed spherical agglomerates.

[0177] All three designs for a crystallization process for S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride to produce orderly packed agglomerates take the procedures reported in Examples 7 through 9 for the randomly packed agglomerates as the starting points. Major modifications include changes in the level of maleic acid, water content and acetonitrile to DMF ratio. The ratio of acetonitrile to DMF on weight/weight basis is relaxed from either 1.4 or 1.8 to whatever is necessary to achieve phase separation prior to or during early stages of the precipitation of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals. Maleic acid molar equivalents in relation to S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine is increased to at least 2.2 from 2.0 and water content of the system prior to the addition of acetonitrile is at least 2.83% on weight basis. Increase in the levels of maleic acid and water enhances the solubility of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine in the solvent solution and therefore helps ensure that the concentration of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine at a specific water content, maleic acid and HCl strength in a solution of given DMF-acetonitrile composition does not drop below a specific level needed for phase separation manifested

either as visually or microscopically emulsion or visually or microscopically observable or even unobservable "oily coating" of surfaces including those offered by the small number of crystals that might form during the addition of anti-solvent. All three designs involve addition of the anti-solvent solution to the solvent solution and are performed at relatively mild levels of agitation.

[0178] In externally seeded crystallization process for *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, anti-solvent solution (acetonitrile) is added to solvent solution (best described by the secondary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine solution as defined earlier) in a controlled manner such that the total addition time is preferably in excess of about thirty minutes and more preferable still, about ninety minutes. Addition of the anti-solvent solution can be continuous, for instance using a pump at a specific addition rate, or preferably intermittently where a small aliquot of the total anti-solvent solution volume is added at given time intervals. These intervals are optimal when the duration between successive aliquot additions is long enough to ensure that most of the turbidity (manifestation of unstable phase separation) that forms immediately upon the addition of an aliquot has had adequate time to subside. The anti-solvent solution is added until the turbidity that results from the addition of each aliquot either does not completely subside or subsides but leaves behind a very fine oily coating only visible on surfaces such as the agitation shaft, agitation blade, walls of the reactor or baffles in the crystallization flask. At this point a very small amount of seed crystals is added to the system. Seed crystals are preferably very small crystals of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, such as those made in Examples 7 through 9. No more than 1% of these seed crystals on weight basis of the original mass of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine dissolved in the solvent solution are usually needed for the purpose of successful externally seeded crystallization process. Seed crystals act as substrate for non-continuous phase that manifests itself either as an emulsion or oily coating. The process is often very slow and takes more than forty-eight hours before the system is completely de-saturated. The process can, however be accelerated, for instance, by increasing the amount of seeding. Orderly packed agglomerates obtained from this type of externally seeded crystallization process are often spherical in shape and are very similar in size.

[0179] Seed crystals can also be created *in-situ* during the anti-solvent solution addition. These crystals can then act as substrate for the non-continuous phase that manifests itself either as an emulsion or oily coating upon phase separation. Nucleation of seed crystals can

be promoted in the mixture of solvent and anti-solvent prior to phase separation, for instance by slightly reducing the water content of the solvent solution or slightly reducing the amount of maleic acid or preferably by altering the rate of super-saturation generation, while keeping everything else the same as for externally seeded crystallization process. The latter, could for instance be achieved by altering the rate of addition for the anti-solvent solution.

Modifications to the thermal history of solvent and anti-solvent solutions could also be used as alter the kinetics of crystallization, without changing the overall composition of the system. The main advantage of the *in-situ* seeded crystallization stems from the fact that seed crystals need not be added externally and their addition need not be so tightly linked to observable phase separation as is the case in the externally seeded crystallization process. Added complexity emanates from the fact that de-saturation of the system caused through the formation of seed crystals must be controlled at levels low enough to ensure that the residual concentration of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine in a mixture of solvent and anti-solvent solutions of a given composition does not fall below the level needed for phase separation manifested either as visually or microscopically emulsion or visually or microscopically observable or even unobservable "oily coating" of surfaces. Furthermore, for an optimum design of *in-situ* seeded crystallization, it would be preferable if the *in-situ* seed crystals were small in size or had low aspect ratios. This helps ensure that the final shape of orderly packed agglomerate, which to a certain degree resembles the shape of the substrate seed crystals is similar to that obtained in externally seeded crystallization process where small crystals are used as seeds. At a more practical level, this preference for small size or short low aspect ratio *in-situ* seeds necessitates that the low extent of de-saturation mentioned earlier be achieved through primarily crystal nucleation process as opposed to crystal growth of fewer nuclei to large sizes. The latter can lead to the formation of large needle like seed crystals, which upon coating with the non-continuous phase and subsequent counter-diffusion controlled crystallization to form orderly packed agglomerates could lead to overall shapes that are more elongated as opposed to spherical. Directing low levels of de-saturation primarily through nucleation of large number of small crystals is however, difficult for *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystallization. Consequently, it is likely that overall shapes dissimilar to spheres would be obtained from an *in-situ* seeded crystallization process for *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Depending on the extent of de-saturation and the resulting substrate surface, the overall crystallization times for *in-situ* seeded crystallization process can be significantly shorter than the externally seeded QESD crystallization process. Since

both the *in-situ* seeded and externally seeded crystallization processes provide ample crystals as surfaces for coating with the non-continuous phase, the possibility of crystallizing *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride as scale on the walls and other surfaces in the crystallization flask through solidification of non-continuous phase adhering to them is significantly reduced by the reduction in the fraction of non-continuous phase available to coat these non-crystalline surfaces.

[0180] The final design approach to crystallization for *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals as orderly packed agglomerates is to eliminate crystalline substrate (seeds) prior to, during or after phase separation. In addition to ensuring that no crystallization takes place during the mixing of solvent and anti-solvent solutions, a microscopically or preferably visually observable emulsion is generated. This must happen even if oily coating is observed prior to achieving the emulsified state. The simplest approach to obtain a visually observable emulsion for the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride system is to further increase the ratio of acetonitrile to DMF. Acetonitrile levels in excess of 110% (by weight) of the amount of acetonitrile used in either the externally seeded or *in-situ* seeded crystallization processes described above have proven to be adequate to obtain a visually observable emulsion. Such a state, however, often accompanies oily coating on the walls of the crystallization flask and other external surfaces such as the agitator shaft, blades and baffles (if present). While orderly packed agglomerates, spherical in overall shape can be obtained from the slurry of such a crystallization process after at least 48 hours, the oily coating on walls of the crystallization flask usually crystallizes as scale on the walls that resembles randomly packed agglomerates. If the slurry is not carefully withdrawn from the crystallization flask, both randomly packed and orderly packed agglomerates could be seen in the product. The extent of scaling seems to be related to, among other variables, the amount of extra acetonitrile used to generate a visually observable emulsion.

[0181] In summary, all three design approaches to crystallization are capable of producing orderly packed agglomerates. The differences lay in the quality of the agglomerates and also the ease of operability and controllability. Based on these three factors, externally seeded crystallization approach is preferable. Examples demonstrating all three approaches follow.

#### **Examples of Orderly Packed agglomerates**

[0182] Examples 20, 21 and 22 represent the externally seeded crystallization system described in the preceding section, while Examples 23 and 24 represent the *in-situ* seeded

57

crystallization system and Example 25 demonstrates a non-seeded crystallization process. Example 26, demonstrates that orderly packed agglomerates could be destroyed under certain agitation conditions. Solids after such an operation have many features characteristic of the randomly packed agglomerates.

#### Example 20

[0183] In Example 20, 54 grams of amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water), 57.5 grams of maleic acid, 287 grams of DMF and 10.1 grams of 37% concentrated HCl (aqueous) were added to a 1.2 liter jacketed reactor. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine turned into a thick sticky mass upon stirring at 350 rpm and took 1 hour to dissolve, despite good solubility in the solvent system. 750 ml of acetonitrile were added to the clear solution in 20 ml aliquots over forty-five minutes. With the addition of 710 ml, the solution became turbid and remained so; the acetonitrile charge was completed nonetheless. One hour after the completion of charge, most of the turbidity had subsided, however, an oily residue had formed on the walls of the reactor. 1 gram of 37% concentrated HCl (aqueous) was added to the reactor to help dissolve the oil. This addition did not succeed in reducing the extent of oiling out and therefore 27.2 grams of DMF were added to the reactor to increase the solubility of the system. Almost all the oily residue on the walls, re-dissolved within fifteen minutes of the second DMF addition. The solution was stirred overnight at 350 rpm. During the hold period it did not crystallize and therefore 400 mg of seed crystals (that is, crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride) were used to induce nucleation. The system was stirred for another 48 hours and then the slurry was discharged in 300 ml aliquots on a 350 ml fine frit sintered glass funnel.

[0184] Filtration was extremely fast. The cake was rinsed with 100 ml of acetonitrile and air dried for one hour. It weighed 46.64 grams. The solids were placed in a vacuum oven at 50 °C and 28 inches Hg vacuum for 24 hours. Oven dried solids weighed 42.96 grams.

[0185] This represented approximately 89% recovery on weight basis and 65% on molar basis. Concentration analysis for the zwitterion and HCl on the filtrate helped close the mass balance and verify that HCl was stoichiometric throughout the crystallization. Fig. 8 shows various SEM pictures of the product. It is quite evident from Fig. 8 that this experiment produced an almost mono-dispersed population of orderly packed agglomerates, spherical in shape. Fig. 1 shows PXRD comparison of the solids made in this example and the randomly packed agglomerates reported earlier. The upper powder x-ray diffraction pattern is from

**Example 9**, while the lower powder x-ray diffraction pattern is from **Example 20**. It seems that the shape differences between the two solids do not have any bearing on the peak shape or intensity. Table 1 summarizes analytical data on the product from this example. Fig. 5 shows the Raman spectrum of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride obtained from a sample from **Example 20**.

#### **Example 21**

[0186] The objective of **Example 21** was to rationalize DMF and HCl addition protocols and identify better mixing conditions for dissolving S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine during the early stages of the process.

[0187] 45.78 grams of maleic acid, 251 grams of DMF and 8.82 grams of 37% concentrated HCl (aqueous) were added to a 1.2 liter jacketed reactor. The system was stirred at 275 rpm to affect a clear solution. 43.3 grams of amorphous freeze dried S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water) were then added to the reactor and it was stirred at 50 rpm for two hours to completely dissolve all the solids. Agitation was increased back to 275 rpm and 612 ml of acetonitrile were added to the solution in 15 ml aliquots over ninety minutes. The solution remained almost clear upon the completion of the acetonitrile charge. 429 mg of seed crystals (that is, crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride) were added to the solution and it was stirred for 45 hours. The slurry was discharged in 200 ml aliquots on a 350 ml fine frit sintered glass funnel.

[0188] Filtration was extremely fast. The cake was rinsed with 60 ml of acetonitrile and air dried for one and a half hours. It weighed 36.50 grams. The solids were placed in a vacuum oven at 50 °C and 28 inches Hg vacuum for 24 hours. Oven dried solids weighed 36.42 grams. This represented approximately 94% recovery on weight basis and 70% on molar basis. Concentration analysis for the zwitterion and HCl on the filtrate helped close the mass balance and verify that HCl was stoichiometric throughout the crystallization. Overall shape of the crystals was the same as seen in **Example 20**. Table 1 summarizes analytical data on the product from this example.

#### **Example 22**

[0189] The objective of **Example 22** was to establish the upper limit on the equivalents of HCl that the system could tolerate without losing control over the formation of orderly

51

packed agglomerates. The total HCl content of the system was approximately 0.73 molar equivalents as opposed to the typical 0.5 molar equivalents.

[0190] 55.97 grams of maleic acid, 307 grams of DMF and 10.78 grams of 37% concentrated HCl (aqueous) were added to a 1.2 liter jacketed reactor. The system was stirred at 275 rpm to affect a clear solution. Agitation was reduced to 50 rpm and then 52.2 grams of 0.23 eq. HCl containing amorphous freeze dried *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (containing approximately 10% water) were added to the reactor. All the *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine dissolved within 20 minutes and the stirrer speed was increased back to 275 rpm. Of the 750 ml of acetonitrile to be added, 695 ml were added in 20 ml aliquots over ninety minutes before the solution turned turbid to the point where turbidity would not readily subside. Upon agitation for one hour, turbidity reduced, but a brown oily residue formed at the bottom of the reactor. 10.2 grams of DMF were added to the reactor to dissolve the oily residue and then the system was seeded with 533 mg of seed crystals (that is, crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride). It was stirred for 24 hours. During this time significant precipitation had taken place. The remaining 55 ml of acetonitrile from the original charge plus 30 ml to compensate for the extra DMF were added to the reactor and it was stirred for another 20 hours. Mother liquor concentration at this stage of the process was found to be 45% higher than the typical value for a large-scale crystallization at 0.5 equivalents of HCl. 70 ml of acetonitrile were added to the slurry and it was stirred for another 4 hours. The slurry was then discharged on a 350 ml fine frit sintered glass funnel in 200 ml aliquots. Filtration was extremely fast. The cake was rinsed with 80 ml of acetonitrile and air dried for one and a half hours. It weighed 38.10 grams. The solids were placed in a vacuum oven at 50 °C and 28 inches Hg vacuum for 24 hours. Oven dried solids weighed 36.75 grams. This represented approximately 78% recovery on weight basis and 56% on molar basis. Concentration analysis on the mother liquor samples before the third acetonitrile charge and 4 hours after it, indicated a net reduction of 15% in the concentration of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine in solution. Chloride ion analysis on the filtrate helped verify that HCl equivalent at the onset was 0.73 with 0.23 equivalents attending *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine.

[0191] Overall shape of the crystals seemed similar to that seen in the preceding experiments, however the bulk density of the powder seemed slightly lower. Table 1 summarizes analytical data on the product from this example.

**Table 1: Solid state characterization data for Examples 20-22**

| Example     | C     | H    | N     | S     | Cl   | T <sub>m</sub> | $\Delta H_{fus}$ | DMF NMR | Maleic acid NMR |
|-------------|-------|------|-------|-------|------|----------------|------------------|---------|-----------------|
| Theoretical | 40.64 | 6.65 | 14.22 | 10.85 | 6.00 | N/A            | N/A              | 0.000   | 0.500           |
| 20          | 40.29 | 6.53 | 14.03 | 10.79 | 6.06 | 193.91         | 140.18           | 0.019   | 0.525           |
| 21          | 40.41 | 6.77 | 14.31 | 10.86 | 6.11 | 199.17         | N/A              | 0.027   | 0.490           |
| 22          | 40.42 | 6.87 | 14.26 | 10.77 | 6.19 | 199.50         | 130.48           | N/A     | N/A             |

**Example 23**

[0192] The primary objective of Example 23 was to understand and establish appropriate primary crystallization conditions for the formation of *in-situ* seeds used as substrate for the orderly packed agglomerates and to reduce the total crystallization time. Acetonitrile was increased by 10% on the amounts used in Examples 19 and 20 and no seeding was performed upon the completion of acetonitrile charge.

[0193] 15.00 grams of the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, 233.3 mg of maleic acid and 413 microliters of de-ionized water were added to a 50 ml Erlenmeyer flask and stirred to affect a clear solution before being added to a 50 ml jacketed reactor. The reactor was stirred at 153 rpm. 18.2 ml of acetonitrile (from a total of 27.7 ml) were added to the solution in 1.3 ml aliquots over thirty-nine minutes. With the addition of this amount of acetonitrile, needle-like crystals (shape and crystallinity verified by polarized light microscopy) were observed in the reactor. The remaining 9.5 ml of acetonitrile were added in 1.5 ml aliquots over three minutes. Sixty minutes after the addition of 27.7 ml of acetonitrile, another 2.77 ml of acetonitrile were added (this representing the extra 10% on the amounts used in Examples 19 and 20). Agitation was increased to 254 rpm for two hours and then reduced back to 150 rpm. The system was stirred for a total of 24 hours and then the slurry was discharged onto a 30 ml fine frit sintered glass funnel.

[0194] Filtration was fast. The cake was rinsed twice with 6 ml of acetonitrile and air dried for one and a half hours. The solids weighed 1.05 grams. The crystals had most of the major features of the orderly packed agglomerates when analyzed by scanning electron microscopy but the overall shape seemed cylindrical (Fig. 9) as opposed to the spherical shape seen in Examples 20, 21 and 22. This difference was attributed to the shape of the seed crystals acting as substrate crystals, which for this example were needle-like.

**Example 24**

[0195] The primary objective of Example 24 was to perform Example 23 at large scale in a 50-liter reactor.

[0196] 9.5 kg of the secondary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine solution were added to a 50 liter jacketed reactor. The reactor was stirred at 125 rpm. 11.04 liters of acetonitrile (from a total of 18.45 liters) were added to the solution in 840 ml aliquots over thirty-six minutes. During the addition of this amount of acetonitrile, needle-like crystals (shape and crystallinity verified by polarized light microscopy) were observed in the reactor. 4.97 liter of acetonitrile were added in 1.65 liter aliquots over nine minutes and the remaining 2.42 liter was added after forty-eight minutes from the start of the original acetonitrile charge. The system was stirred for a total of six hours and then the slurry was discharged on the filter.

[0197] Filtration was fast and only took eight minutes. The cake was rinsed twice with 2.0 kg of acetonitrile and air dried for twenty-four hours. The solids weighed 1.08 kg. The crystals had most of the major features of the orderly packed agglomerates when analyzed by scanning electron microscopy but the overall shape seemed similar to that obtained in Example 23 and unlike the spherical shape seen in Examples 20, 21 and 22. This difference was attributed to the shape of the substrate crystals, which for this example was needle-like.

**Example 25**

[0198] The primary objective of Example 25 was to increase the amount of acetonitrile by 20% on the amounts used in examples 20 and 21 and to study the possibility of eliminating both external and in-situ seeding with *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride prior to, during or just after phase separation. 25.01 grams of the primary DMF solution of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine solution and 687 mg of de-ionized water were added to a 125 ml jacketed reactor. 346 mg of maleic acid were added to the reactor and the system was stirred at 173 rpm to affect a clear solution. 56 ml of acetonitrile were added to the solution in 3 ml aliquots over sixty minutes. The solution became very turbid with the addition of the last aliquot of acetonitrile, however, most of the turbidity subsided within fifteen minutes, leaving behind thin oily coating on the walls of the reactor. The reactor was heated to 55 °C (temperature of the jacket) in order to determine if the oily coating could be dissolved. The operation did not succeed and the reactor was cooled back to room temperature. The system was stirred for 48 hours and then the slurry was discharged onto a 150 ml fine frit sintered glass funnel.

[0199] Filtration was fast. The cake was rinsed with 10 ml of acetonitrile and air dried for one and a half hours. The solids weighed 1.57 grams and had all the major features of the orderly packed agglomerates when analyzed by scanning electron microscopy.

[0200] Some solids were observed to be plastered on the walls of the reactor. This scale was removed by slurrying in 25 ml of acetonitrile and then filtered on 150 ml fine frit sintered glass funnel. The solids were air dried for 1 hour and they weighed 1.01 grams. These solids had shape features similar to those of randomly packed agglomerates.

#### **Example 26**

[0201] The objective of Example 26 was to determine if orderly packed agglomerates could be converted into small crystals that would then compact as randomly packed agglomerates.

[0202] 200 mg of orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals made in Example 20, were added to an 8 ml vial. 3.95 grams of the filtrate from Example 23 and a magnetic bead was added to the vial and the resulting slurry was stirred through a magnetic plate at maximum speed for 4 days. Slurry samples were withdrawn each day for photo-microscopy to check if the orderly packed agglomerates were grinding in the very narrow gap between the stirring magnetic bead and the bottom of the vial.

[0203] Photo-microscopy analysis indicated that at least 72 hours (or 3 days) were necessary to completely grind the orderly packed crystals. These ground crystals compacted into randomly packed agglomerates upon filtration.

#### **ALTERNATIVE SOLVENT SYSTEMS**

##### **EXAMPLE 27: Methanol / Acetone Crystallization**

[0204] Methanol is one of the few organic solvents in which *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals exhibit moderate solubility (6.2 wt%). Additionally, the presence of excess maleic acid dramatically increases the solubility. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals were found to readily dissolve in as little as 4g methanol per gram *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride in the presence of 1.5eq. excess maleic acid. Making only minor adjustments to the demonstrated DMF / acetonitrile process, the methanol / acetone crystallization process described below was developed and demonstrated at the 1 L scale.

[0205] Maleic acid (23.57g – 1.5Eq.) was charged to a 500mL roundbottom flask. Methanol (160g – 4g per gram) was added and the flask was stirred to form a clear solution. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride (40.00g) was then charged to the round bottom flask and dissolved to form a clear solution. This solution was charged to a jacketed 1L reactor operating at room temperature. Agitation was set to 225 rpm.

[0206] Acetone (544g - 17mL per gram) was weighed out, and a peristaltic pump was calibrated to deliver approximately 9mL per minute. Fifteen minutes into the acetone addition, the solution turned slightly hazy but clarified upon increasing agitation. After 1 hour 20 minutes of addition (44.68g of acetone remaining to be added) the crystallization mixture was distinctly turbid. The acetone addition was stopped, and 400mg of seeds were added. Agitation was set to 240 rpm and stirred overnight. The crystallization mixture was a thick slurry after 17 hours. Solids were filtered and washed twice with acetone and dried on the filter. Yield was 74.8%.

#### EXAMPLE 28: -Butanol / Acetone Crystallization

[0207] 1-Butanol was selected as the best solvent to explore the possibility of utilizing a high boiling solvent that can easily be exchanged with water from the upstream aqueous chromatography purification step. While *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride does not exhibit high solubility in 1-butanol (0.05wt%), the addition of excess maleic acid greatly increases its solubility. This process was again designed to be very similar to the DMF / acetonitrile process. Following is a description of the initial process run at the 1L scale.

[0208] *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride (38g), DI water (200mL), 1-Butanol (500mL), and maleic acid (29.46g – 1.5 eq.) were added to a jacketed 1L reactor. The mixture was stirred to form a clear solution. This solution was distilled under vacuum (135 torr) and temperature of 53 – 67C to 200mL. 1-Butanol (250mL) was charged and distillation was continued at 135 torr and 70C until the volume was reduced to 200mL. The temperature was adjusted to 50C. DI Water (2.5mL) and 1-butanol (475mL) were charged. *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystal seeds (1.5g) were added and washed into the reactor with 1-butanol (25mL). Acetone (300mL) was added to the crystallization mixture over 3 hours via syringe pump. One hour after the acetone addition was complete, the crystallization mixture was cooled to 10C over 10 hours. The crystallization mixture was filtered for 14 hours after

acetone addition was complete. The crystallization mixture filtered very easily and no cake cracking was observed. An acetone wash (300mL) was charged to the reactor and rinsed onto the cake. Solids were dried in a vacuum oven at 50C, 24 inches Hg overnight. The product mass was 40.45g, representing a yield of 78%.

[0209] DSC analysis showed that the solid state form of both products was crystalline S-[2-[(1-Imineethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. The solvent content of each product, after drying overnight under vacuum at 50C is shown in Table 2.

Table 2: Residual Solvent Content

| Example No.                | Methanol | Butanol | Acetone |
|----------------------------|----------|---------|---------|
| 27<br>(methanol / acetone) | 0.64%    | N/A     | 1.37%   |
| 28<br>(butanol / acetone)  | N/A      | 0.39%   | 1.10%   |

The 1-butanol/acetone system may be preferable, as both are Class III solvents.

[0210] The penultimate step is SMB chromatography purification that is most easily performed in an aqueous solution. Solvent exchanging from water into 1-butanol can be easily achieved, but complete removal of water from a methanol system would not be possible. This also favors the 1-butanol/acetone system over the methanol/acetone system.

**Process Development**

[0211] Similar to the DMF/acetonitrile crystallization, the 1-butanol/acetone crystallization has several parameters that can affect the crystallization. Intrinsic parameters include: 1)temperature, 2)hydrochloric acid content, 3)maleic acid content, 4) water content, 5) compound loading, and 6) acetone amount. Extrinsic parameters include: 1) seeding, 2) reactor geometry, 3) acetone addition protocol and 4) mixing. Each of these parameters is discussed in greater detail below.

**Intrinsic Parameters**

**1. Temperature**

**EXAMPLE 29**

5X

[0212] Maleic acid (0.59g – 1.5 eq) was weighed out in a 50mL roundbottom flask. 1-butanol (8g ) was charged and the mixture was stirred to form a clear solution. S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride (1.00g) and water (1000uL) were charged and the mixture was stirred to form a clear colorless solution. The solution was rotary evaporated at 50C. 1-butanol (6g) was charged and rotary evaporation continued. 1-Butanol (8g) was added to make a flowable solution. 1-Butanol (2.89g) and water (130uL) were charged to take the solution to the desired initial conditions: 0.5 Eq. HCL, 2.0 Eq. maleic acid, 14 volumes 1-butanol / Kg S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, KF = 1.5%. Acetone (6mL) was charged dropwise. Nucleation was not observed during the acetone charge. S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystal seeds (10mg) were charged followed by an addition amount of acetone (0.5mL). The crystallization mixture was stirred at room temperature and appeared to be a thick slurry after several hours. The crystallization appeared to behave in a manner very similar to the DMF/acetonitrile crystallization. The slurry was filtered on a 15mL fine frit sintered glass funnel. The cake was washed twice with 15mL acetone and pulled dry.

[0213] Microanalytical, DSC, and PXRD show the solids to be crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. Microanalytical and DSC data are summarized in Table 3.

Table 3: Isothermal room temperature crystallization data

| Example | Description | Microanalytical |       |      |      | DSC      |           |
|---------|-------------|-----------------|-------|------|------|----------|-----------|
|         |             | C               | H     | N    | Cl   | Temp (C) | Enthalpy  |
| 29      | Room Temp.  | 40.46           | 13.90 | 6.81 | 5.85 | 200.15   | 148.1 J/g |
|         | Theory      | 40.64           | 14.22 | 6.65 | 6.00 |          |           |

[0214] The 1-butanol/acetone crystallization proceeded at room temperature as expected with no nucleation occurring prior to the charge of seeds. The product was crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

## 2. Hydrochloric Acid

[0215] HCl plays a role in the behavior of the crystallization. It is desired to have a stoichiometric amount (0.5eq) HCl in the system. Below this target amount could result in a

reduced yield, as HCl becomes the limiting reagent, or result in a mixture of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride and the 1:1 maleate salt (S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate, Form II). Excess HCl in the system would likely result in reduced yields due to increased solubility and solids with poor physical properties.

### 3. Maleic Acid

#### EXAMPLE 30

[0216] It is known that an excess of maleic acid is required based on work done with the DMF/acetonitrile crystallization, and the target amount for the initial experiment was 2.0 equivalents. A crystallization mixture with 1.75 equivalents of maleic acid was brought to the initial conditions: 0.5 eq. HCl, 1.75 Eq. maleic acid, 14 volumes 1-BuOH / g S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, 1.5% KF.

[0217] Upon cold storage overnight of this solution, solids were observed to precipitate out. It appears therefore that having only 1.75 equivalents of maleic results in an unstable supersaturated solution that can precipitate out readily.

[0218] Three side-by-side crystallizations (Examples 30A, 30B and 30C) were run with 2.0, 2.25, and 2.50 eq. Maleic, respectively, to evaluate the effect on the crystallization. Maleic acid (1.78g – 1.5 eq) was charged to a 100mL round bottom flask. 1-Butanol (34.0g – 14 vols) was charged and stirred to dissolve. S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride (3.00g) was charged to the solution. Water was charged (3200uL) and the mixture was stirred to form a clear solution. The solution was rotary evaporated at 55C under vacuum. 1-Butanol (24g) was charged back to the mixture and rotary evaporation was continued until KF was 1.00%. Butanol (23.29g) and water (0.434g) was added to take the solution to 14 volumes 1-butanol / S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride and KF of 1.5%. The solution was divided into 3 portions (12.9g each) and labeled "A", "B", and "C". 98mg maleic acid (0.25eq) was charged to flask B and 197mg maleic acid (0.5eq) charged to flask C and each was stirred to form a clear solution.

[0219] Acetone (6mL) was charged to each flask dropwise in 1mL aliquots over 35 minutes. Each experiment was observed to nucleate during the acetone charge; the most solids were observed with the low maleic acid content (2.0 eq.) and the least with the highest maleic acid content (2.50 eq.). At the end of the acetone addition, 10mg seeds were charged to each flask

and the experiments were held at room temperature over the weekend. Each experiment was filtered on a 15mL fine frit sintered glass funnel and the cake was washed twice with 15mL acetone. The cakes were pulled dry on the filter.

[0220] Microanalytical and DSC data on the isolated solids from each experiment are summarized in Table 3. In all three experiments, microanalytical data match those predicted by theory for S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. DSC results for all lots also show a large endothermic event near 200C, corresponding to the melting point of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. In Example 30A, there is a very small event at 54C that could correspond to a small amount of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate, form II. This is very likely due to the considerable amount of uncontrolled nucleation that occurred during the acetone charge in this particular Example. Since nucleation occurred during the acetone charge even in the presence of 2.50eq. maleic acid, albeit to a lesser degree, it appears that the acetone addition rate was far too fast. The small amount of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate, form II formed in the presence of only 2.0 eq. maleic acid is therefore not likely due to low maleic acid levels directly, but could likely be avoided with a slower acetone addition rate.

**Table 4: Microanalytical and DSC Data - Varying Maleic Acid**

| Example | Description        | Microanalytical |       |      |      | DSC      |           |
|---------|--------------------|-----------------|-------|------|------|----------|-----------|
|         |                    | C               | H     | N    | Cl   | Temp (C) | Enthalpy  |
| 30A     | 2.0 Eq.<br>Maleic  | 40.27           | 13.95 | 6.64 | 5.93 | 54.28    | 7.3 J/g   |
|         |                    |                 |       |      |      | 199.52   | 156.9 J/g |
| 30B     | 2.25 Eq.<br>Maleic | 40.50           | 13.98 | 6.70 | 5.91 | 201.11   | 148.4 J/g |
| 30C     | 2.50 Eq.<br>Maleic | 40.47           | 13.91 | 6.61 | 5.84 | 199.75   | 159.4 J/g |
|         | Theory             | 40.64           | 14.22 | 6.65 | 6.00 |          |           |

[0221] Analysis of the mother liquor from each experiment summarized in Table 3 showed that, as expected, concentration of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine increased with increasing maleic acid. Lower maleic acid content in the crystallization system, therefore, is expected to increase yield.

**Table 5: Mother Liquor Analysis**

| Example | Description          | Wt% S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine |
|---------|----------------------|----------------------------------------------------------|
| 30A     | 2.0 Eq. Maleic Acid  | 0.84%                                                    |
| 30B     | 2.25 Eq. Maleic Acid | 0.90%                                                    |
| 30C     | 2.50 Eq. Maleic Acid | 1.09%                                                    |

[0222] Based on this Example, maleic acid content in the range of 2.0 – 2.5 will result in formation of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, provided the addition rate of acetone does not cause considerable nucleation during the charge. Maleic acid as low as 1.75 eq. may result in an unstable supersaturated solution that could readily crash out in the event of extended hold times. It is desirable, therefore, to target the maleic acid range of 2.0 to 2.25 eq. in the crystallization system.

#### 4. Water Content

[0223] At water levels at or below 4% at 25 C, S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride is the stable form. Above 4%, mixtures of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride and S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate, Form II are observed. It is preferable, therefore to target the water content of the system to be below 4% for formation of crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride

#### 5. Compound Loading

[0224] Operating at 14 volumes 1-butanol seems to result in the most controlled crystallization, and the increased volume does not appear to adversely affect yield. It is preferable, therefore, to utilize 14 volumes of 1-butanol per g of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

#### 6. Acetone Amount

[0225] Typically, 6 volumes of acetone per gram of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride have been used. At the end of this addition, one can observe the bursts of white solids coming out of solution with the addition of each drop

of acetone. The solids characteristically dissipate, but the solution is often slightly turbid upon addition of the complete six volumes. These observations suggest that the system is highly supersaturated at this point and that adding significantly more than 6 volumes of acetone could result in over-stressing the phase separation. Adding significantly less acetone, alternatively, may not allow the system to reach phase separation. This could not only jeopardize the spherical agglomerate morphology but also negatively impact the yield.

## **Extrinsic Parameters**

### **1. Seeding**

[0226] Briefly, the addition of seeds at the time of phase separation may assist in controlling the crystallization. Having solids present in the bulk at the time of phase separation provides a substrate upon which the dispersed phase can deposit and crystallize into agglomerates. Controlling the size and shape of the substrate through controlled seed addition versus nucleation in the bulk may also be important for controlling the overall shape of the agglomerate. Throughout the development of the process, the amount of seed added to the 1-butanol/acetone system has varied from 1-3% of the total S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride in the batch. No dramatic difference in the behavior of the crystallization was observed.

[0227] In the initial 1-butanol/acetone process used, seeds (3%) were charged prior to the acetone addition. In order to ensure a monodisperse particle size distribution, it is preferable to charge seeds as close to the time of phase separation as possible. Charging seeds prior to initiating the acetone addition may cause nucleation at different times during the charge, resulting in a multi-modal distribution.

[0228] A protocol similar to that used in the DMF/acetonitrile crystallization may be preferable in the 1-butanol/acetone crystallization. After the bulk (~90%) of the solvent charge, a seed slurry of approximately half of the remaining 10% would be charged. The remaining solvent would be used as a rinse of the seed vessel and charge lines.

### **2. Reactor Characteristics**

[0229] Based upon experience with the DMF/acetonitrile system, reactor geometry also may affect the performance of the crystallization, most directly in terms of the yield. It is not favorable to perform the crystallization in a crystallizer with a large aspect ratio and a large surface to volume ratio, such as in a small cylindrical vial. At the time of phase separation, the dispersed phase may be deposited on the walls instead of on the seed crystals. In the

extreme case, small-scale crystallizations conducted without seeding in narrow vials have resulted in crystallization entirely on the walls with virtually no solids in the bulk. As the 1-butanol / acetone crystallization is also a phase separating system, a reactor with a relatively small aspect ratio and small surface to volume ratio is expected to be optimal.

### 3. Acetone Addition

[0230] The acetone addition protocol has varied from as little as 35 minutes to as long as 3 hours and 45 minutes. As noted in section 4.1.3, addition of acetone too quickly can result in the premature nucleation of sticky solids in the bulk, which can lead to a mixture of salts in the final product. Charging acetone over 3 hour 45 minutes showed virtually no advantage over a 2 hour or 1 hour charge time. At the end of the addition, the solution was turbid in all cases and all crystallizations proceeded as expected, resulting in high quality S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride. It appears, therefore, that while charging acetone too quickly can result in shortened induction time and the premature nucleation of solids during the acetone addition, there is not an obvious limit for the maximum addition time. A target addition time of two hours may be preferred, as it is in the middle of the range found to be acceptable.

### 4. Mixing

[0231] Mixing is an important parameter with respect to liquid-liquid phase separation crystallizations. Agitation should be sufficient such that the dense agglomerates formed do not settle in a "deadzone" underneath the agitator. At large scale, it may be useful to blow nitrogen up gently through the bottom valve to minimize the deadzone.

[0232] It appears that the spherical agglomerates are fairly robust and not easily broken up during extended agitation periods, and the agglomerates appear to be intact after 11 days of stirring.

[0233] In the event that chromatography is incorporated into the synthetic process of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, it is recommended that the chromatographed product be well characterized before proceeding with the final crystallization. In preparation for chromatography, S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crude product is dissolved in water with a slight excess (~0.2eq.) of maleic acid. The purified aqueous solution is the starting material for the final 1-butanol / acetone crystallization.

[0234] It is recommended that the purified aqueous solution be well characterized in terms of concentration, maleic acid content, as well as HCl content prior to use in the 1-butanol / acetone crystallization. It is unknown if portions of HCl may be removed in chromatography. In previous work, chloride ion concentration was measured by ion chromatography. If the chloride content is significantly below 0.5eq (<0.45), it is recommended to add HCl to target the desired value.

[0235] The chromatography is run with only a slight excess of maleic acid. Maleic acid therefore may be added to the purified solution to achieve the target 2.0 equivalents. Additionally, the concentration S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (freebase) should be accurately quantified as the basis of the acid additions. Both the maleic acid and S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine free base concentrations have been quantitated using HPLC.

[0236] If chromatography is removed from the synthesis, the solvent exchange to achieve the appropriate initial conditions can be simplified by using 1-butanol as the primary dissolution solvent and adding just enough water (~8% by KF) to obtain a clear colorless solution. This solution is then distilled for only a short time to achieve a KF of less than 1.5%.

#### **POWDER CHARACTERISTICS OF SPHERICAL ORDERLY PACKED AGGLOMERATES OF S-[2-[(1-IMINOETHYL)AMINO]ETHYL]-2-METHYL-L-CYSTEINE MALEATE HYDROCHLORIDE CRYSTALS**

[0237] Orderly packed agglomerates of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals made in Example 20 were studied to determine its powder characteristics that are relevant to the development of a pharmaceutical composition with S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride together with a pharmaceutically acceptable carrier. Before testing, the solids were passed through 80-mesh screen corresponding to 177 micrometer opening in order to fragment some very large loose aggregates of the orderly packed agglomerates. The properties tested included powder flow characteristics, powder particle size distribution, powder bulk and tapped density and powder compressibility and compaction.

[0238] Powder flow was evaluated using an aperture flow tester, measured as the smallest opening at which the powder freely flows through. The powder flow test was repeatedly successful through a 6-mm aperture opening. A powder flow of 6-mm is considered good for formulation development of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals. Successful repetition of flow through a narrower 4-mm opening was,

however, dependent on how the powder was introduced to the tester. The calculated compressibility index of 17.8 % also indicated good to fair flow characteristics for these orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals.

[0239] Particle size distribution of the powder was measured using sieve analysis. The mean particle size distribution was calculated using the geometric mean method. The particle size distribution data is presented in Fig. 12. These orderly packed agglomerates displayed a mean particle size of 134 micrometers (referred to from here on as  $\mu\text{m}$ ). Only 1.63% of material was considered as fines, less than 75- $\mu\text{m}$ , with more than 90% within 105-250- $\mu\text{m}$ . More than 75% of the material was within 105-150- $\mu\text{m}$ . The tight range in the powder particle size distribution for orderly packed agglomerates is between 100 and 200- $\mu\text{m}$ , which is highly desirable for the development of a pharmaceutical composition with *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride together with a pharmaceutically acceptable carrier.

[0240] Bulk powder density was evaluated as the mass of material within a 50-ml graduated cylinder. Tapped powder density was calculated at the equilibrium point, where addition tapping did not alter the powder volume. Orderly packed agglomerates exhibited a bulk powder density of 0.41-g/ml, with a tapped density of 0.50-g/ml.

[0241] The powder was evaluated for direct compression without any excipients. Compacts of 100-mg in weight were manufactured using an 8/32 inch (6.35-mm) round concave tooling. Tablets were compressed at various compression forces and evaluated for strength, thickness and disintegration. The direct compression profile of orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals is presented in Fig. 13. The orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals displays good compressibility profile, without use of excipients. Relatively strong small tablets (8/32 inch), as hard as 11-kP, are possible with compression force between 900 and 1000 kg. Tablet strength reaches an apparent maximum between 900 and 1000 kg compression force. Minor adhesion to the punch and die walls were observed during compression experiments. However, the sticking was considered to be a minor problem and could easily be resolved by using an appropriate lubricant. The effect of tablet thickness as a function of compression force is presented in Fig. 14. Tablet disintegration times were also evaluated for compacts of orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate

hydrochloride crystals. Three tablets were compressed with compression forces between 500 and 600, corresponding to 8 kP tablet hardness for this material. All tablets displayed rapid disintegration times of less than 2 minutes and well below the target of 10 minutes (See Fig. 15).

[0242] In summary, orderly packed agglomerates of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride crystals show highly desirable properties for the development of a pharmaceutical composition, such as tablets, with *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride together with a pharmaceutically acceptable carrier.

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

[0243] Also embraced within this invention is a class of pharmaceutical compositions comprising crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride in association with one or more non-toxic, pharmaceutically-acceptable carriers and/or diluents and/or adjuvants (collectively referred to herein as "carrier" materials) and, if desired, other active ingredients. The crystalline of *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride of the present invention may be administered by any suitable route, preferably in the form of a pharmaceutical composition adapted to such a route, and in a dose effective for the treatment intended. The active *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride and compositions may, for example, be administered orally, intravascularly, intraperitoneally, subcutaneously, intramuscularly or topically.

[0244] For oral administration, the pharmaceutical composition may be in the form of, for example, a tablet, capsule, suspension or liquid. The pharmaceutical composition is preferably made in the form of a dosage unit containing a particular amount of the active ingredient. Examples of such dosage units are tablets or capsules. The active ingredient may also be administered by injection as a composition wherein, for example, saline, dextrose or water may be used as a suitable carrier.

[0245] The amount of therapeutically active compound that is administered and the dosage regimen for treating a disease condition with the compound and/or compositions of this invention depends on a variety of factors, including the age, weight, sex and medical condition of the subject, the severity of the disease, the route and frequency of administration, and the particular compound employed, and thus may vary widely. The pharmaceutical compositions may contain active ingredients in the range of about 0.1 to 2000 mg, preferably in the range of about 0.5 to 500 mg and most preferably between about 1 and 100 mg. A daily dose of about 0.01 to 100 mg/kg body weight, preferably between about 0.5 and about 20 mg/kg body weight and most preferably between about 0.1 to 10 mg/kg body weight, may be appropriate. The daily dose can be administered in one to four doses per day.

[0246] Crystalline *S*-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride can also be administered by a transdermal device. Preferably topical administration will be accomplished using a patch either of the reservoir and porous membrane type or of a solid matrix variety. In either case, the active agent is delivered

continuously from the reservoir or microcapsules through a membrane into the active agent permeable adhesive, which is in contact with the skin or mucosa of the recipient. If the active agent is absorbed through the skin, a controlled and predetermined flow of the active agent is administered to the recipient. In the case of microcapsules, the encapsulating agent may also function as the membrane.

[0247] The oily phase of the emulsions of this invention may be constituted from known ingredients in a known manner. While the phase may comprise merely an emulsifier, it may comprise a mixture of at least one emulsifier with a fat or an oil or with both a fat and an oil. Preferably, a hydrophilic emulsifier is included together with a lipophilic emulsifier which acts as a stabilizer. It is also preferred to include both an oil and a fat. Together, the emulsifier(s) with or without stabilizer(s) make-up the so-called emulsifying wax, and the wax together with the oil and fat make up the so-called emulsifying ointment base which forms the oily dispersed phase of the cream formulations. Emulsifiers and emulsion stabilizers suitable for use in the formulation of the present invention include Tween 60, Span 80, cetostearyl alcohol, myristyl alcohol, glyceryl monostearate, and sodium lauryl sulfate, among others.

[0248] The choice of suitable oils or fats for the formulation is based on achieving the desired cosmetic properties, since the solubility of the active compound in most oils likely to be used in pharmaceutical emulsion formulations is very low. Thus, the cream should preferably be a non-greasy, non-staining and washable product with suitable consistency to avoid leakage from tubes or other containers. Straight or branched chain, mono- or dibasic alkyl esters such as di-isoadipate, isocetyl stearate, propylene glycol diester of coconut fatty acids, isopropyl myristate, decyl oleate, isopropyl palmitate, butyl stearate, 2-ethylhexyl palmitate or a blend of branched chain esters may be used. These may be used alone or in combination depending on the properties required. Alternatively, high melting point lipids such as white soft paraffin and/or liquid paraffin or other mineral oils can be used.

[0249] Formulations suitable for topical administration to the eye also include eye drops wherein the active ingredients are dissolved or suspended in suitable carrier, especially an aqueous solvent for the active ingredients. The active ingredients are preferably present in such formulations in a concentration of 0.5 to 20%, advantageously 0.5 to 10% and particularly about 1.5% w/w.

[0250] For therapeutic purposes, S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride is ordinarily combined with one or more adjuvants appropriate to the indicated route of administration. If administered per os, the compound may be admixed with

lactose, sucrose, starch powder, cellulose esters of alkanolic acids, cellulose alkyl esters, talc, stearic acid, magnesium stearate, magnesium oxide, sodium and calcium salts of phosphoric and sulfuric acids, gelatin, acacia gum, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, and/or polyvinyl alcohol, and then tableted or encapsulated for convenient administration. Such capsules or tablets may contain a controlled-release formulation as may be provided in a dispersion of active compound in hydroxypropylmethyl cellulose. Formulations for parenteral administration may be in the form of aqueous or non-aqueous isotonic sterile injection solutions or suspensions. These solutions and suspensions may be prepared from sterile powders or granules having one or more of the carriers or diluents mentioned for use in the formulations for oral administration. The crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride may be dissolved in water, polyethylene glycol, propylene glycol, ethanol, corn oil, cottonseed oil, peanut oil, sesame oil, benzyl alcohol, sodium chloride, and/or various buffers. Other adjuvants and modes of administration are well and widely known in the pharmaceutical art.

[0251] The invention being thus described, it is apparent that the same can be varied in many ways. Such variations are not to be regarded as a departure from the spirit and scope of the present invention, and all such modifications and equivalents as would be obvious to one skilled in the art are intended to be included within the scope of the following claims.

**CLAIMS**

**What is claimed is:**

- 1. A crystalline form of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride characterized by at least one of: x-ray powder pattern substantially as shown in Fig. 1; a loss of mass of about 1 percent over a range of temperature of about forty degrees Celsius to about one-hundred eighty degrees Celsius; Raman spectrum substantially as shown in Fig. 5; and elemental analysis substantially as in Table 1.**
- 2. The crystalline form of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride of claim 1 wherein a plurality of crystals are amassed as agglomerates..**
- 3. The crystalline form of S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride agglomerates of claim 2 wherein said plurality of crystals are amassed as generally orderly packed agglomerates.**
- 4. A pharmaceutical composition comprising the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride of claim 1 together with a pharmaceutically acceptable carrier.**
- 5. A method of treating a condition wherein pathologically high production forms a part in a subject in need of such treatment comprising administering to the subject an effective amount of the crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride of claim 1.**
- 6. A method of making the generally orderly packed agglomerate crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride of claim 3 utilizing a crystallization procedure comprising adding an anti-solvent to a solvent solution in which is dissolved S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, thereby forming a system comprising two phases, and precipitating generally orderly packed agglomerate crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.**

7. The method of claim 6 wherein the anti-solvent solution is added to the solvent solution in which is dissolved S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride, followed by addition of seed crystals to the system.
8. The method of claim 6 wherein the anti-solvent comprises acetone.
9. The method of claim 6 wherein the solvent solution comprises 1-butanol and S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.
10. The method of claim 6 wherein the anti-solvent comprises acetonitrile, and the solvent solution comprises *N,N*-dimethylformamide and S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.
11. The method of claim 6 wherein the anti-solvent comprises acetone, and the solvent solution comprises 1-butanol and S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.
12. The method of claim 7 wherein no less than about one percent by weight of the total S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride in the system is introduced as added seed crystals.
13. The method of claim 6 wherein a sufficient amount of anti-solvent is added to a solvent solution comprising S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride in a reaction vessel to form a reaction system, until one of a) turbidity or b) an oily coating on a surface of said reaction vessel is visually apparent, and adding seed crystals to said system.
14. The method of claim 7 wherein the seed crystals are created *in-situ* by at least one of: reducing the water content of the solvent solution; reducing the amount of maleic acid; or altering the rate of super-saturation generation.
15. The method of claim 6 wherein no seed crystals are added to the system, and the ratio of anti-solvent added to the system exceeds the ratio of solvent solution in which is dissolved

S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride by about one hundred and ten percent by weight that of the ratio of anti-solvent to solvent used in a system wherein seed crystals are added, to precipitate generally orderly packed agglomerate crystalline S-[2-[(1-Iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride.

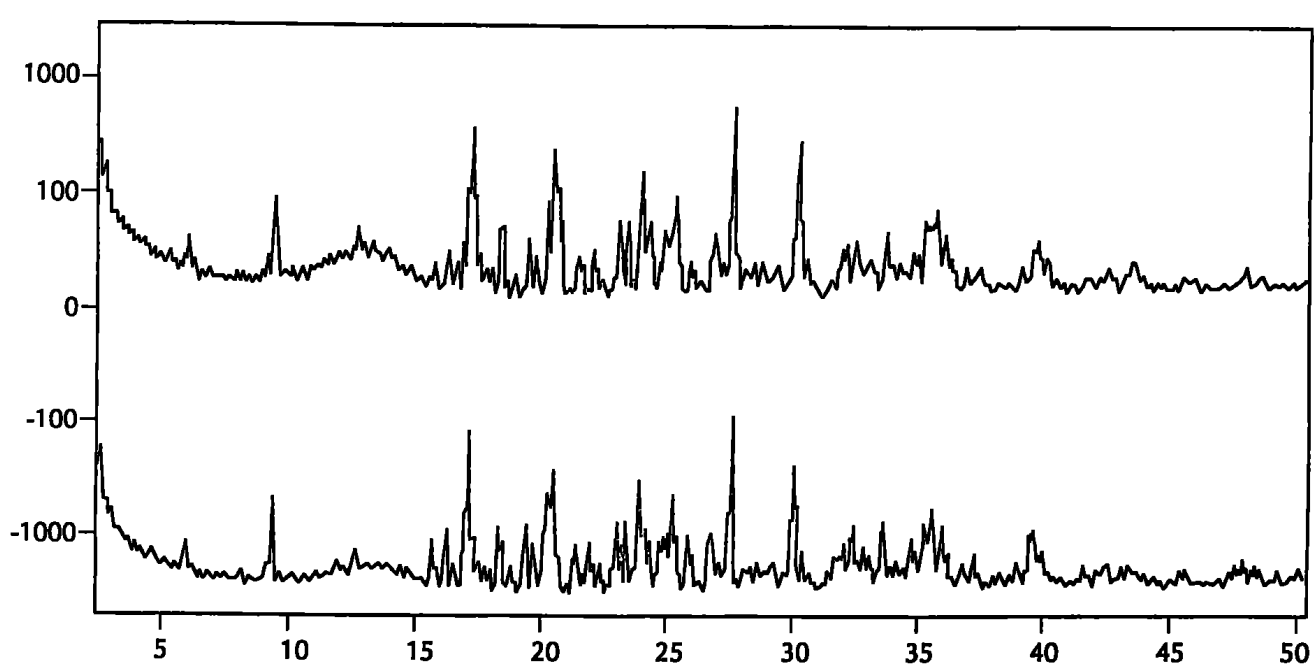
65

WO 2004/080946

PCT/US2004/000678

67

FIG. 1



1/11

6

2/11

FIG. 2

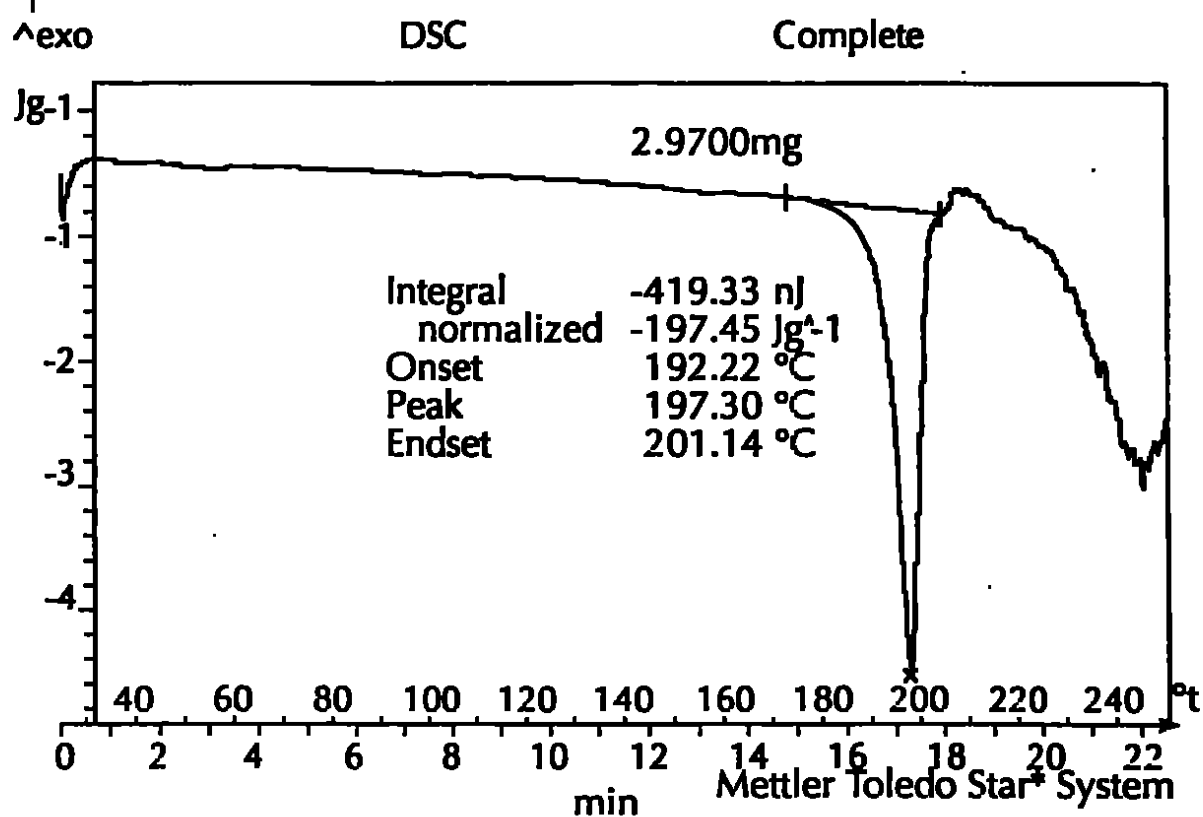
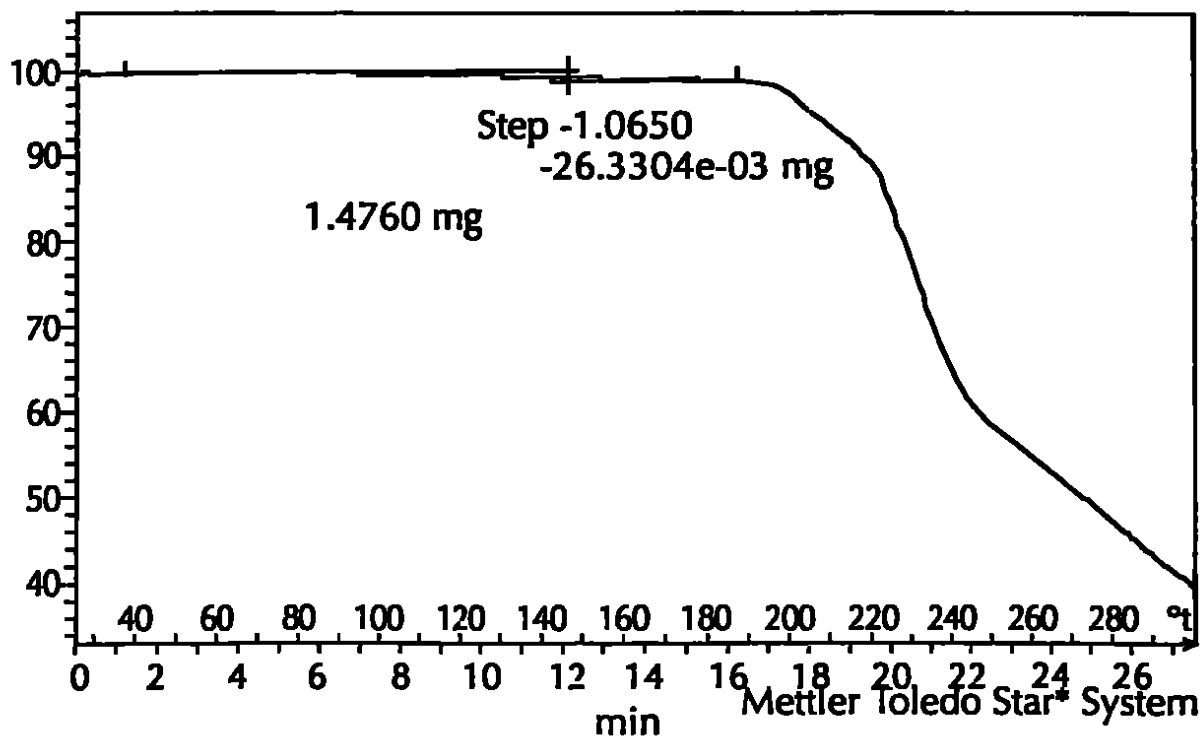


FIG. 3

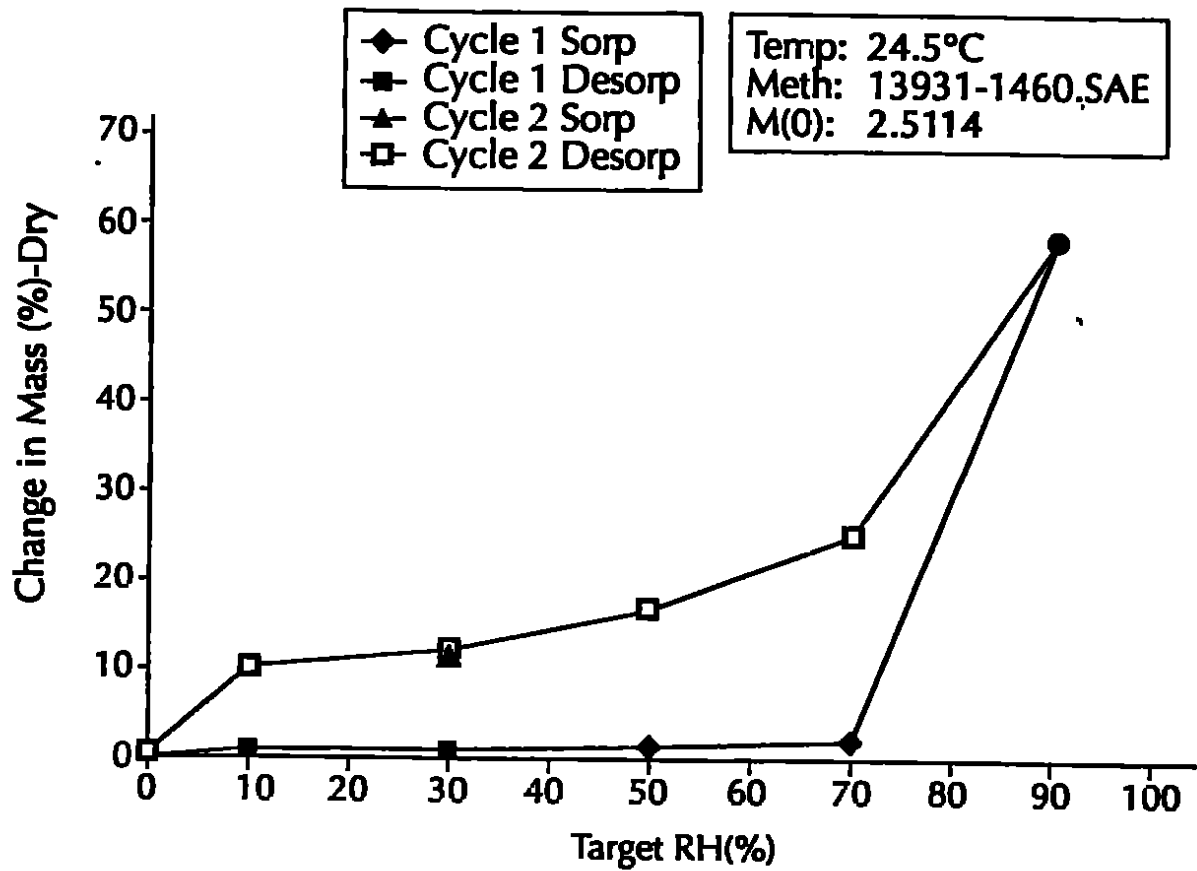
TGA



67

3/11

FIG. 4

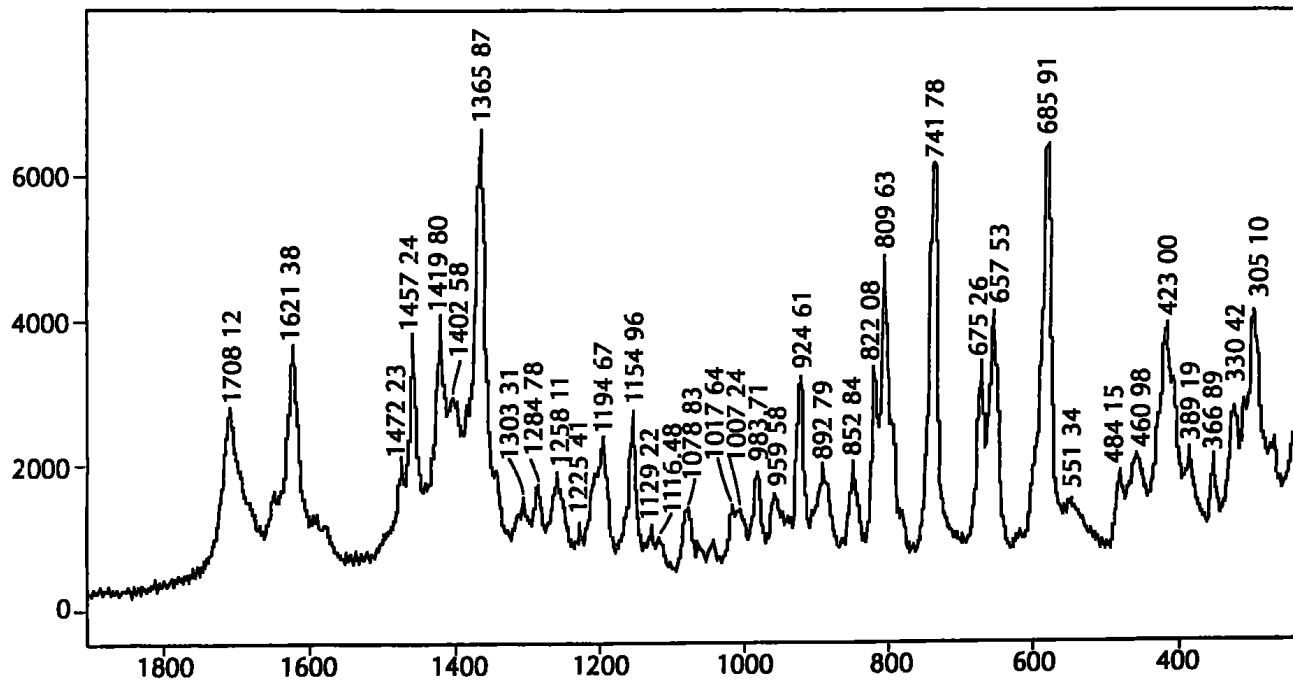


*[Signature]*

68

4/11

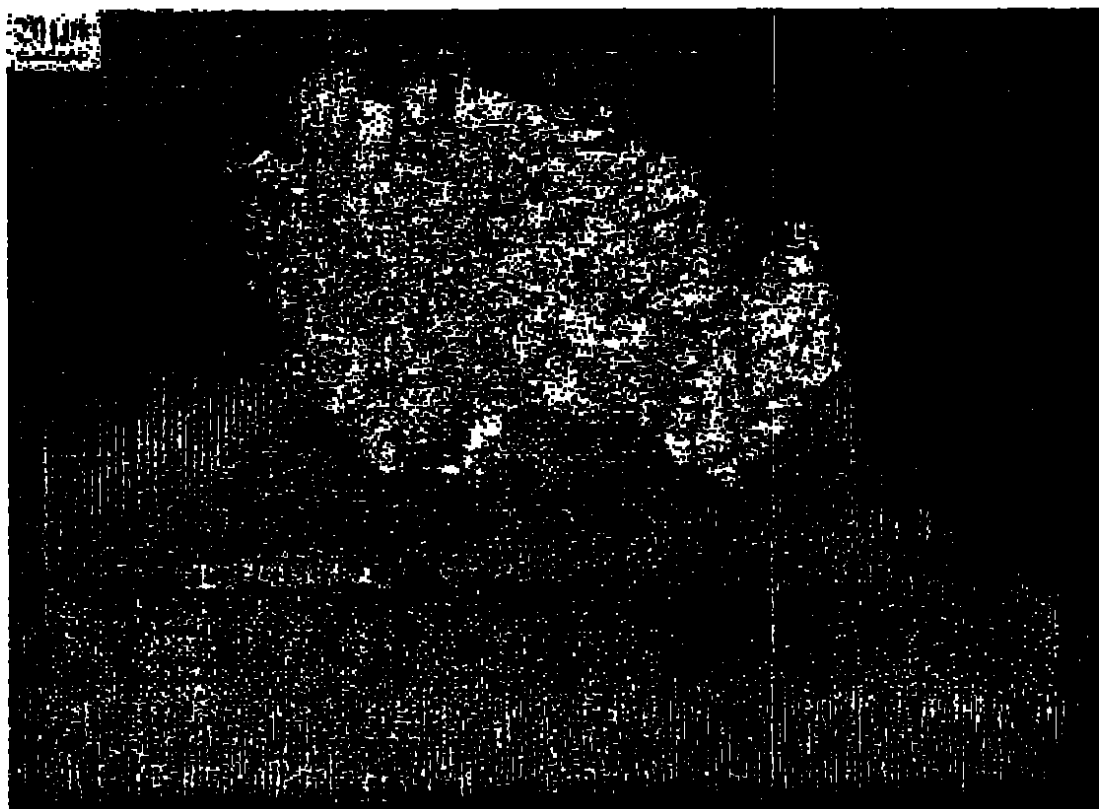
FIG. 5



69

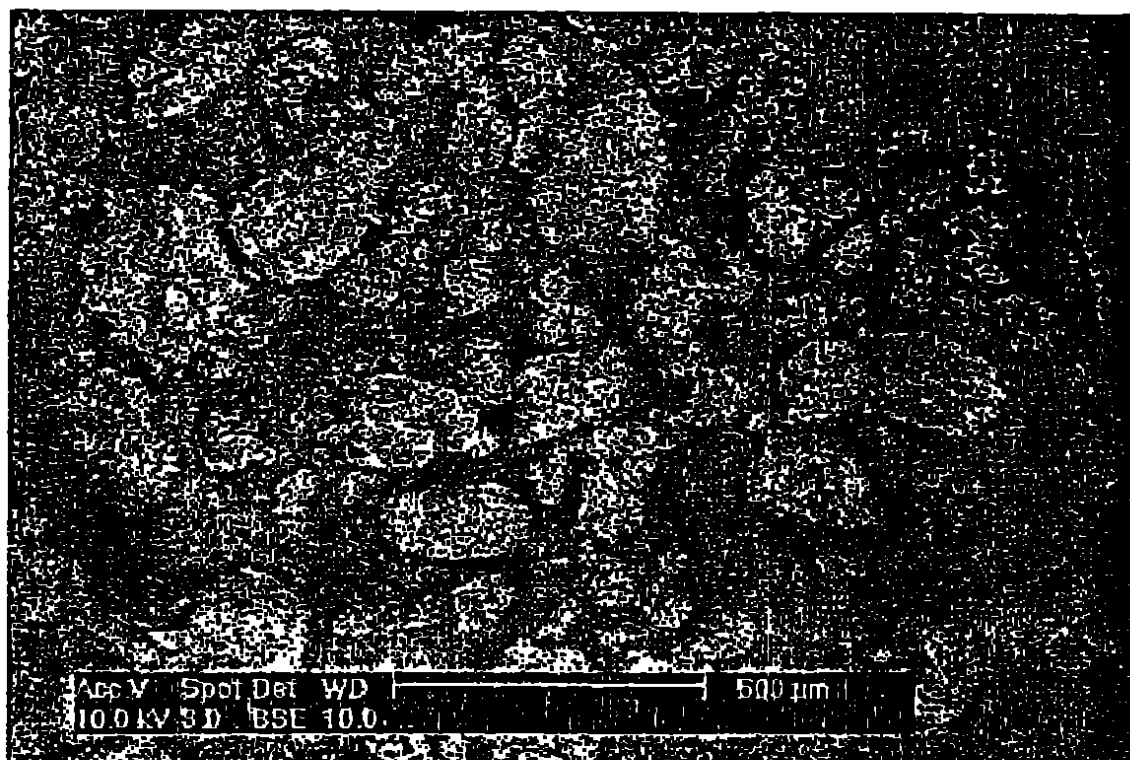
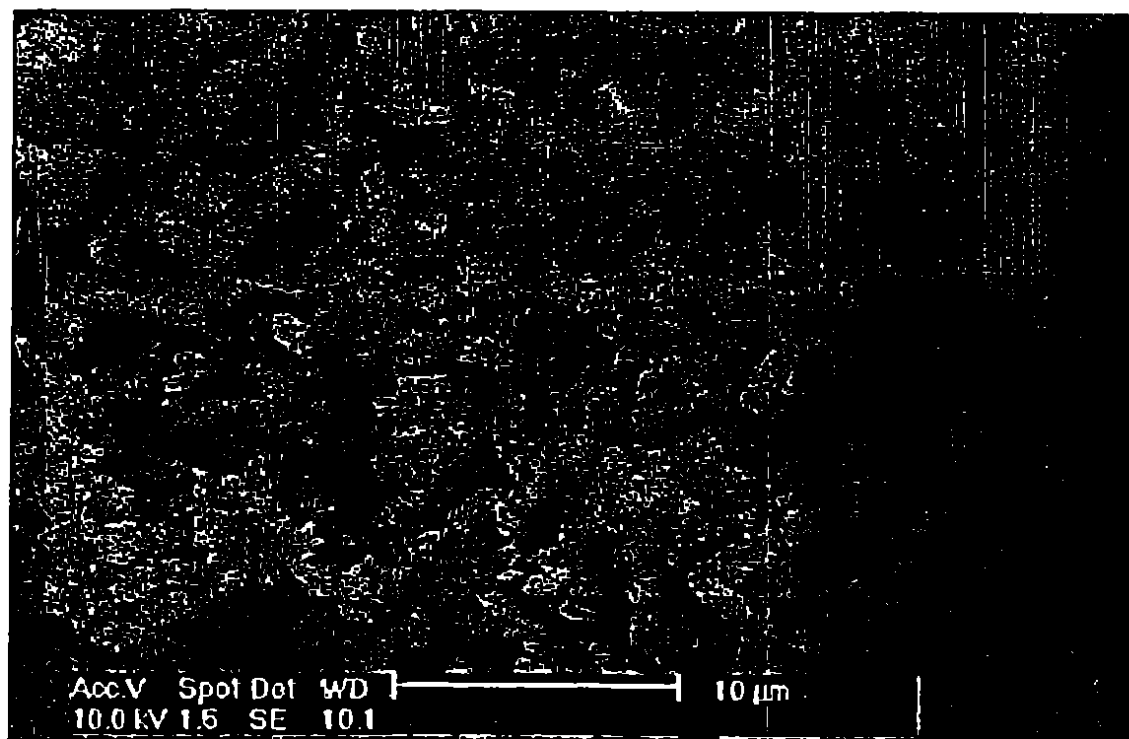
5/11

**FIG. 6**



20

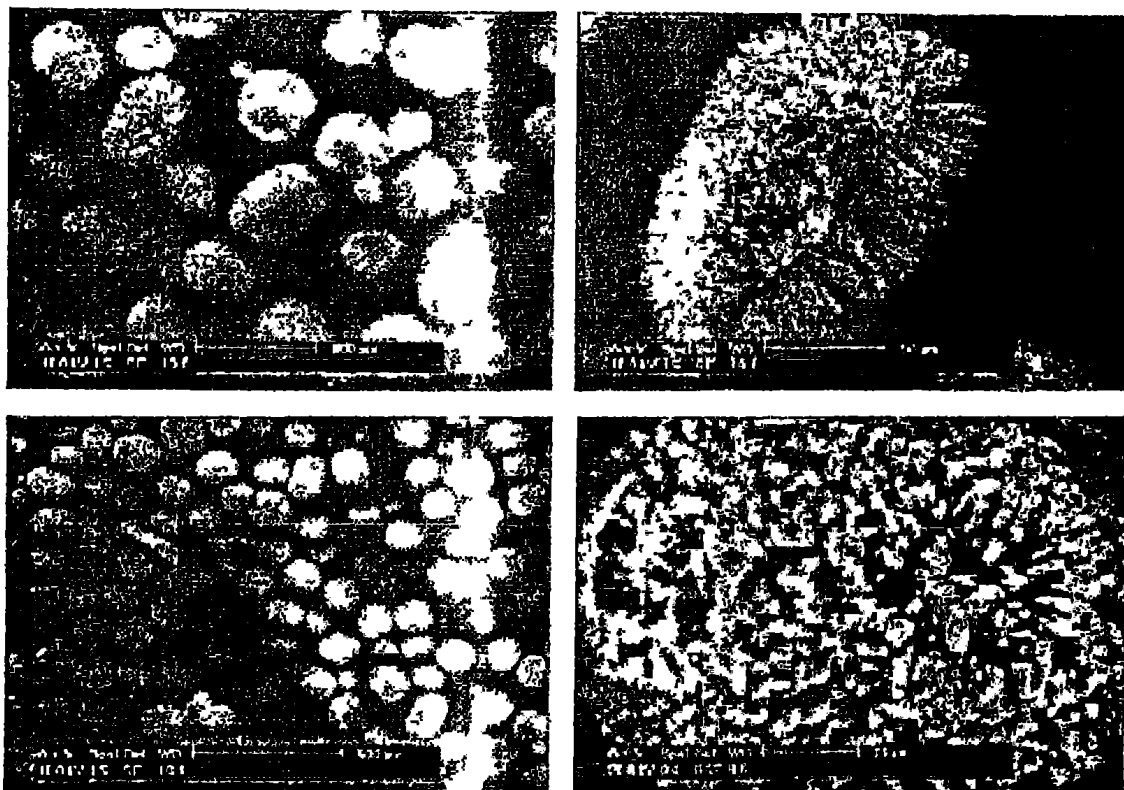
6/11

**FIG. 7A****FIG. 7B**

21

7/11

FIG. 8



22

8/11

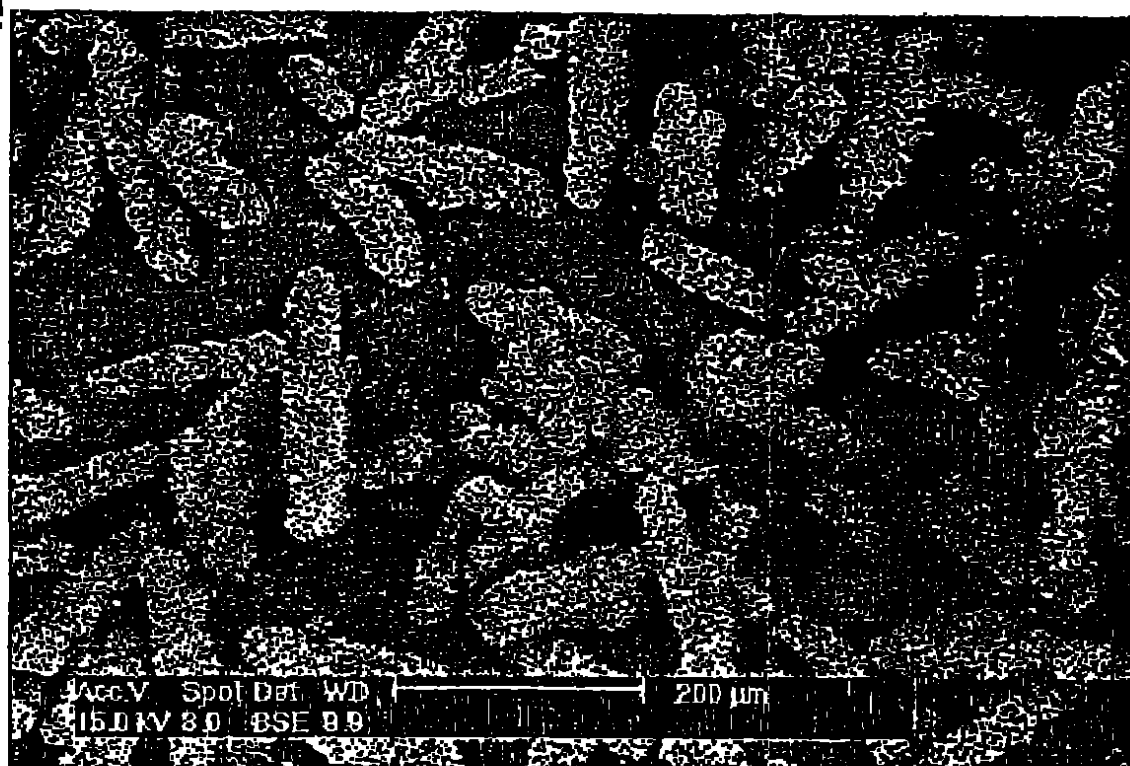
**FIG. 9A****FIG. 9B**

FIG. 10

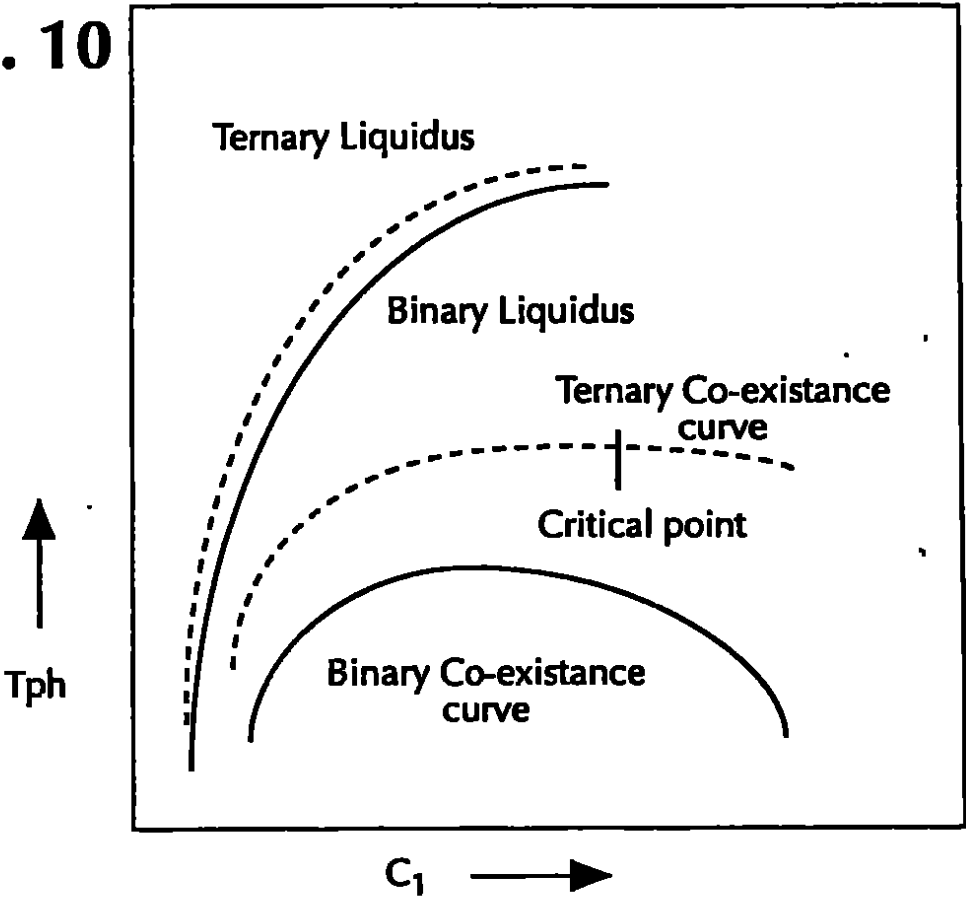
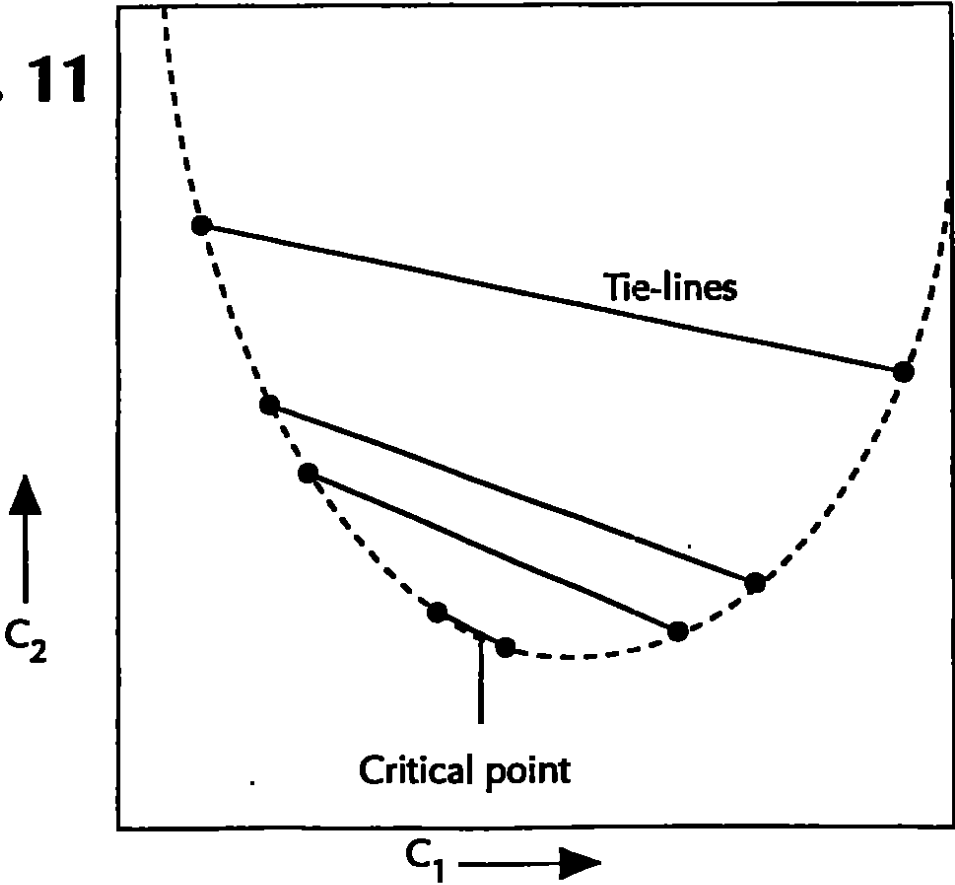


FIG. 11



gll

10/11

FIG. 12

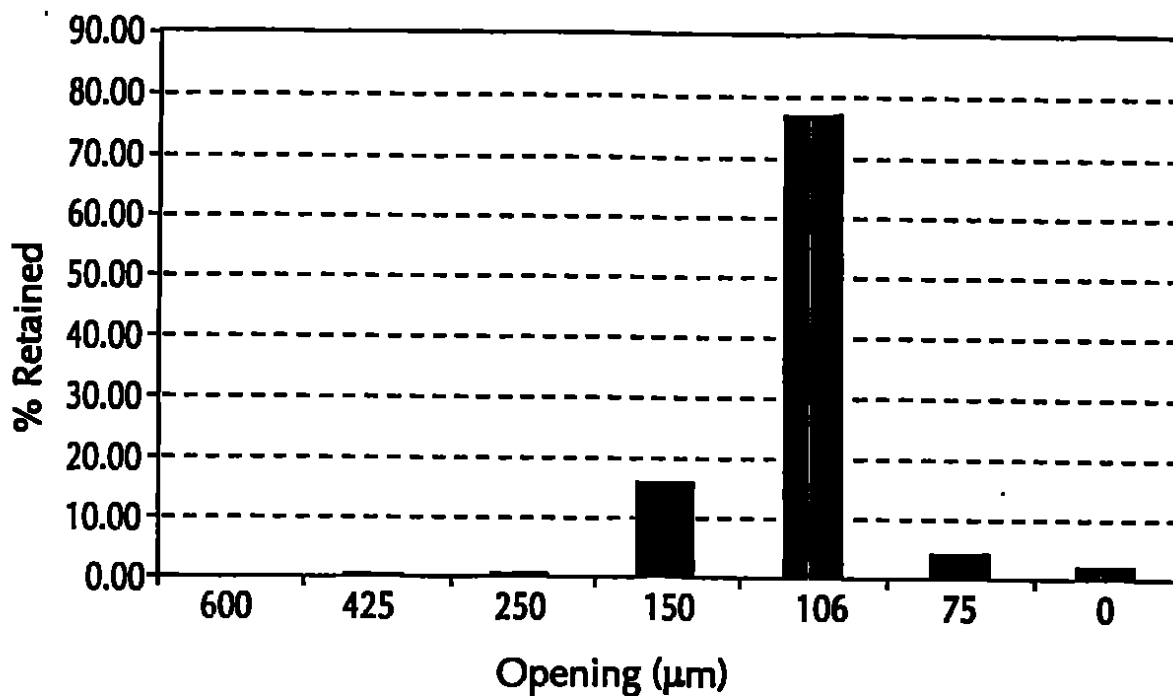
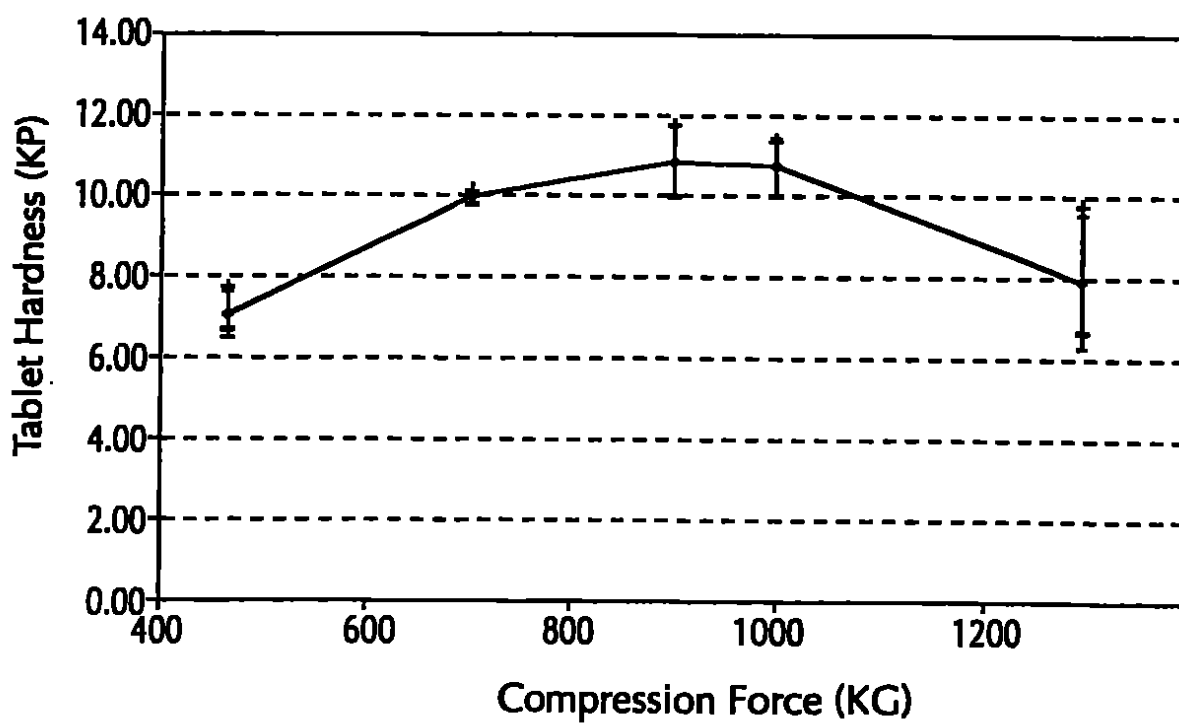


FIG. 13



9

11/11

FIG. 14

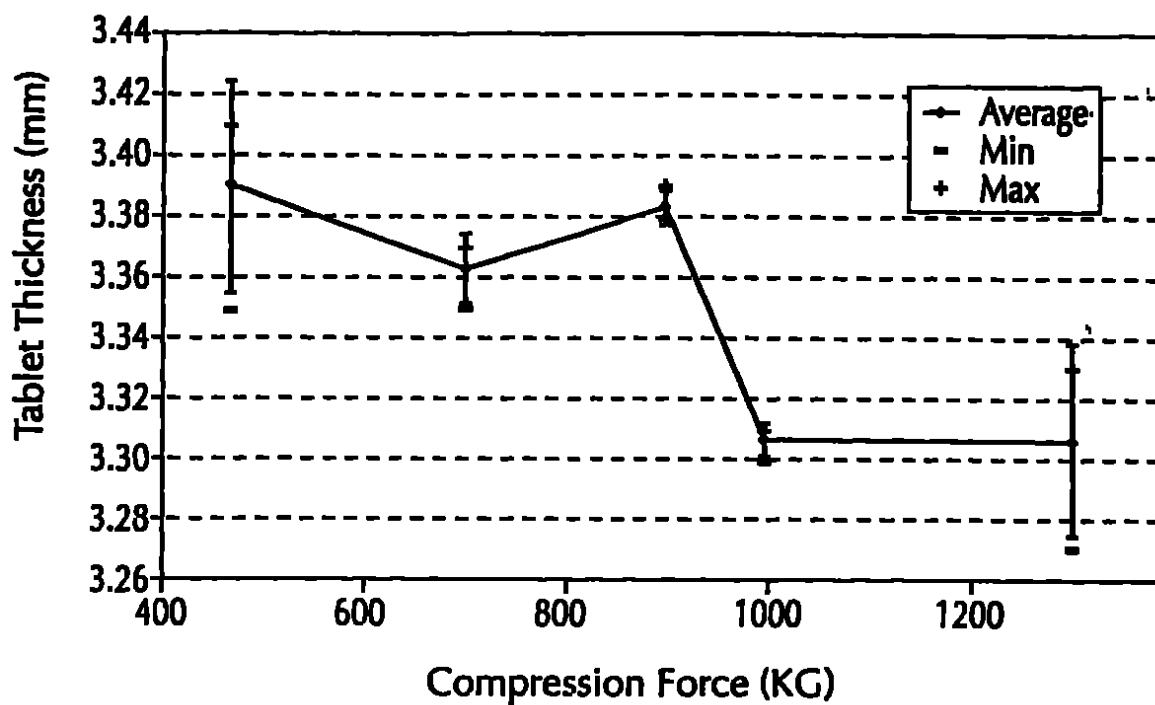
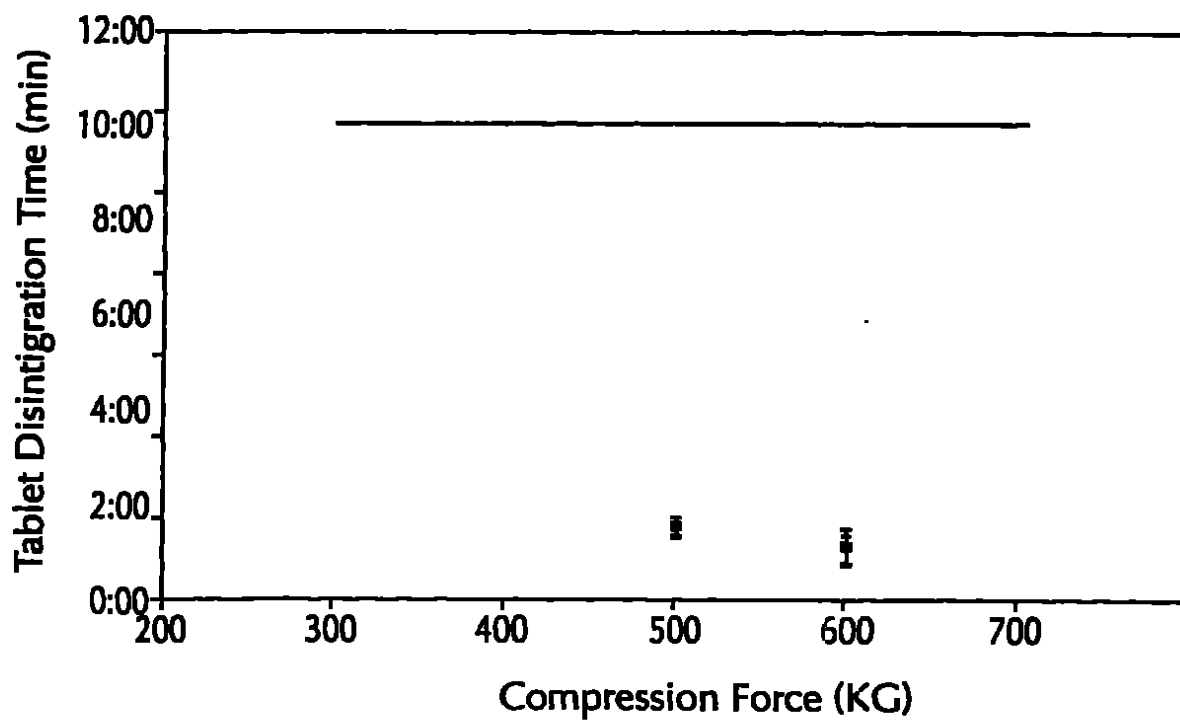


FIG. 15



70

**SAL CRISTALINA CLORHIDRATO MALEATO DE S-[2-[(1-  
IMINOETIL)AMINO]ETIL]-2-METIL-L-CISTEÍNA**

**CAMPO DE LA INVENCION**

5           Se reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/453.496, incorporada a la presente memoria como referencia.

          La presente invención comprende un nuevo compuesto útil en el tratamiento de enfermedades, y más particularmente una nueva sal de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, y aún más particularmente un nuevo  
10   clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino y composiciones farmacéuticas del mismo, para el tratamiento de afecciones que implican una expresión inapropiada de óxido nítrico por la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa.

          La S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se describe y reivindica  
15   en la patente de EE.UU. de cesión común con la presente nº 6.403.830, incorporada a la presente memoria como referencia.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

          El óxido nítrico (NO) es un gas radical libre bioactivo producido mediante  
20   una cualquiera de varias isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La actividad fisiológica de lo que se identificó después como NO se descubrió inicialmente a principios de los 80 cuando se encontró que la relajación vascular causada por la acetilcolina depende de la presencia de endotelio vascular. El factor derivado del endotelio, entonces denominado factor relajante  
25   derivado del endotelio (EDRF), que media dicha relajación vascular se sabe

27

ahora que es el NO que se genera en el endotelio vascular por una isoforma de la NOS. La actividad del NO como vasodilatador ha sido bien conocida durante los últimos 100 años. Además, el NO es la especie activa derivada de nitrovasodilatadores conocidos incluyendo nitrito de amilo y trinitrato de glicerilo. El óxido nítrico es también un estimulante endógeno de la guanilato ciclasa soluble (GMPc), y por tanto estimula la producción de GMPc. Cuando se inhibe la NOS por *N*-monometilarginina (L-NMMA), se evita totalmente la formación de GMPc. Además de la relajación dependiente del endotelio, el NO es conocido por estar implicado en una serie de acciones biológicas incluyendo la citotoxicidad de células fagocíticas y la comunicación célula-célula en el sistema nervioso central.

La identificación del EDRF como NO coincidió con el descubrimiento de una ruta bioquímica mediante la que se sintetiza el NO a partir del aminoácido L-arginina mediante la enzima NO sintasa. Existen al menos tres tipos de NO sintasa como los siguientes:

- (I) una enzima constitutiva dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina, localizada en el cerebro, que libera NO en respuesta al receptor o a la estimulación física;
- (II) una enzima independiente del  $\text{Ca}^{++}$ , una proteína de 130 kDa, que se induce después de la activación de células del músculo liso vascular, macrófagos, células endoteliales y una serie de otras células mediante endotoxina y citoquinas; y
- (III) una enzima constitutiva dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina, localizada en el endotelio, que libera NO en respuesta al receptor o a la

29

estimulación física.

Una vez expresada, la óxido nítrico sintasa inducible (en adelante "iNOS") genera NO continuamente durante largos periodos. Los estudios clínicos han mostrado que la producción de NO y la expresión de iNOS aumentan en una serie de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide y osteoartritis (véase, por ejemplo, McInnes I.B., *et al.*, J. Exp. Med. 184: 1519 (1996)), enfermedad inflamatoria del intestino (véase, por ejemplo, Lundberg J.O. N. *et al.*, Lancet 344: 1673 (1994)) y asma (véase, por ejemplo, Hamid Q. *et al.*, Lancet 342: 1510 (1993)), y la iNOS está implicada como factor patológico importante en estas enfermedades inflamatorias crónicas.

Por tanto, la inhibición de la producción excesiva de NO por la iNOS es probable que sea antiinflamatoria. Sin embargo, puesto que la producción de NO a partir de eNOS y nNOS está implicada en la fisiología normal, sería deseable para cualquier inhibidor de NOS que se utilice para tratar la inflamación que sea selectivo por iNOS, de modo que la modulación fisiológica normal de la presión sanguínea mediante NO generado por eNOS y la transmisión neuronal no colinérgica sin cambios mediante NO generado por nNOS permanecieran sin cambios.

Con todos los compuestos y composiciones farmacéuticos, la estabilidad química y física de un compuesto fármaco es importante en el desarrollo comercial de esa sustancia fármaco. Dicha estabilidad incluye la estabilidad en condiciones ambientales, especialmente ante la humedad y en condiciones de almacenamiento. Es necesaria una elevada estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento para predecir las diferentes condiciones de

*Handwritten signature*

almacenamiento durante la vida útil de un producto comercial. Un fármaco estable evita el uso de condiciones de almacenamiento especiales así como un replazo frecuente del inventario. Un compuesto fármaco debe ser también estable durante el proceso de fabricación que a menudo requiere moler el fármaco para conseguir material fármaco con tamaño de partícula y área superficial uniformes. Los materiales inestables experimentan a menudo cambios polimórficos. Por lo tanto, cualquier modificación de una sustancia fármaco que potencie su perfil de estabilidad proporciona un beneficio significativo frente a sustancias menos estables.

10        Se han descrito diversos inhibidores de la iNOS, tales como por ejemplo S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, que se describe y reivindica en la patente de EE.UU. de cesión común con la presente 6.403.830. Este compuesto, sin embargo, es un sólido amorfo. Sería deseable por lo tanto proporcionar una forma sólida cristalina de un Inhibidor de iNOS tal como S-[2-

15        [(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Fig. 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino obtenido a partir del ejemplo 9 (patrón superior) y el ejemplo 20 (patrón inferior);

la Fig. 2 es una gráfica de un estudio de calorimetría de barrido diferencial de una muestra (ejemplo 11) de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-

40

iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino;

la Fig. 3 es una representación termogravimétrica de una muestra (ejemplo 11) de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino;

la Fig. 4 es una representación de un estudio de absorción de humedad de una muestra (ejemplo 10) de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino;

la Fig. 5 muestra un espectro Raman del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino obtenido de una muestra del ejemplo 20;

la Fig. 6 es una microfotografía del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino del ejemplo 9;

la Fig. 7 son dos fotos de SEM de aglomerados empaquetados aleatoriamente de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino obtenido del ejemplo 9, la Fig. 7a muestra la forma generalmente aleatoria de los aglomerados, mientras que la Fig. 7b muestra el empaquetado aleatorio de los cristales en los aglomerados;

la Fig. 8 muestra diversas fotos de SEM de aglomerados empaquetados ordenadamente de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-

81

**L-cisteína cristalino preparados mediante un proceso de cristalización por QESD sembrados y obtenidos a partir del ejemplo 20;**

la Fig. 9 muestra dos fotos SEM de aglomerados empaquetados ordenadamente de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino preparados mediante un proceso de cristalización por QESD sembrados *in situ* y obtenidos a partir del ejemplo 23. La Fig. 9A muestra una forma generalmente cilíndrica, mientras que la Fig. 9B muestra los cristales generalmente ordenados;

10

la Fig. 10 es una diagrama x-T conceptual para un sistema ternario que exhibe un comportamiento de LLPS para una cantidad fija de antidisolvente;

la Fig. 11 es una gráfica que muestra las superficies coexistentes a temperatura constante para un sistema ternario;

15

la Fig. 12 muestra una gráfica de la distribución del tamaño de partícula de aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína;

20

la Fig. 13 es una gráfica que representa la dureza del comprimido en función de la fuerza de compresión;

la Fig. 14 es una gráfica que representa el grosor del comprimido en función de la fuerza de compresión; y

25

82

la Fig. 15 es una representación gráfica del tiempo de disgregación del comprimido.

## 5 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una nueva forma de sal cristalina de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, a composiciones farmacéuticas, a cuatro nuevos diseños de proceso de cristalización de mecanismos diferentes para ajustar las propiedades físicas brutas durante la preparación del nuevo compuesto sal, a un proceso para preparar composiciones farmacéuticas, y a procedimientos de uso de dicho nuevo compuesto sal cristalina mixta y sus composiciones para inhibir o modular la síntesis de óxido nítrico en un sujeto necesitado de dicha inhibición o modulación mediante la administración de una sal de un compuesto que inhibe o modula preferiblemente la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa frente a las isoformas constitutivas de la óxido nítrico sintasa. El presente compuesto sal posee una útil actividad inhibidora de óxido nítrico sintasa, y se espera que sea útil en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o afección en la que la síntesis o sobresíntesis de óxido nítrico sea una parte fundamental.

Estequiométricamente, la nueva sal es dos moléculas de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína con una molécula de ácido maleico y una molécula de clorhidrato.

La nueva sal mixta cristalina se caracteriza mediante algunas o todas de las siguientes medidas físicas: análisis elemental (tal como mediante análisis de combustión), punto de fusión y calor de fusión (análisis de calorimetría de

barrido diferencial y termogravimétrico), índices de refracción (microscopía de luz polarizada), patrón de difracción de rayos X en polvo, espectroscopía Raman y absorción de humedad (por ejemplo balance de humedad por DVS).

La presente nueva sal puede utilizarse para tratar enfermedades que implican la degeneración de cartilago, que tiene lugar en ciertas afecciones tales como la artritis. En consecuencia, las afecciones en las que es una ventaja inhibir la producción de NO a partir de L-arginina incluyen afecciones artríticas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis séptica, espondiloartritis, artritis reumática aguda, artritis enteropática, artritis neuropática y artritis piogénica. Además, la depresión inducida por el NO de la respiración de condrocitos podría modular la pérdida de matriz y la mineralización del cartilago secundaria en la artritis, en particular la osteoartritis.

Otras afecciones para las que la presente sal mixta puede ser útil incluyen enfermedades intestinales crónicas o inflamatorias, isquemia cardiovascular, diabetes, insuficiencia cardiaca congestiva, miocarditis, aterosclerosis, migraña, glaucoma, aneurisma aórtico, esofagitis de reflujo, diarrea, síndrome del intestino irritable, fibrosis quística, enfisema, asma, bronquiectasia, hiperalgesia, isquemia cerebral, apoplejía trombótica, isquemia global (consecuencia de parada cardiaca), esclerosis múltiple y otros trastornos del sistema nervioso central mediados por NO, por ejemplo enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Los trastornos neurodegenerativos adicionales en los que la inhibición del NO puede ser útil incluyen degeneración nerviosa y/o necrosis nerviosa en trastornos tales como hipoxia, hipoglucemia, epilepsia y en heridas externas (tales como lesiones de la médula espinal y

gh

cerebrales), convulsiones y toxicidad por oxígeno hiperbárico, demencia, por ejemplo demencia presenil y demencia relacionada con el SIDA, corea de Sydenham, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Korsakoff, imbecilidad relacionada con un trastorno vascular cerebral, trastornos del sueño, esquizofrenia, depresión, depresión u otros síntomas asociados al síndrome premenstrual (PMS), ansiedad y shock séptico.

La presente sal mixta puede utilizarse también cuando la inhibición del óxido nítrico puede desempeñar también un papel en el tratamiento tal como en dolor, incluyendo somatogénico (nociceptivo o neuropático), tanto agudo como crónico. La presente sal mixta podría utilizarse en cualquier situación en que se administraría tradicionalmente un AINE o analgésico opiode común.

Además, otros trastornos que pueden tratarse inhibiendo la producción de NO con la presente sal mixta incluyen tolerancia a opiodes en pacientes que necesitan analgésicos opiodes prolongadamente, y tolerancia a benzodiazepina en pacientes que toman benzodiazepinas, y otros comportamientos adictivos, por ejemplo a nicotina y trastornos de alimentación. La presente sal mixta puede ser también útil como agente antibacteriano.

Las afecciones adicionales en las que la presente sal mixta puede utilizarse para inhibir la producción de NO a partir de L-arginina incluyen hipotensión sistémica asociada a shock séptico y/o tóxico inducido por una amplia variedad de agentes; terapia con citoquinas tales como TNF, IL-1 e IL-2; y como coadyuvante para inmunosupresión a corto plazo en terapia de trasplantes.

La presente sal mixta puede ser también útil en el tratamiento de

51

afecciones oculares (tales como hipertensión ocular, retinitis, uveítis), lupus  
sistémico eritematoso (SLE), glomerulonefritis, reestenosis, secuelas  
inflamatorias de infecciones virales, síndrome de dificultades respiratorias  
agudas (ARDS), lesión pulmonar inducida por oxidante, terapia de IL2 tal como  
5 en un paciente de cáncer, caquexia, inmunosupresión tal como en terapia de  
transplante, trastornos de la motilidad gastrointestinal, quemaduras solares,  
eccema, psoriasis, gingivitis, pancreatitis, lesión del tracto gastrointestinal como  
resultado de infecciones, fibrosis quística, tratamiento de un sistema inmune  
disfuncional tal como un coadyuvante para inmunosupresión a corto plazo en  
10 terapia de transplante de órganos, inducción del parto, poliposis adenomatosa,  
control del crecimiento tumoral, quimioterapia, quimioprevención y bronquitis.

La presente invención está también dirigida a composiciones  
farmacéuticas para el tratamiento de dolor, asma y otros trastornos de las vías  
respiratorias, cáncer, artritis, trastornos oculares incluyendo retinopatías y  
15 glaucoma, trastornos relacionados con la inflamación incluyendo síndrome del  
intestino irritable, y otros trastornos en los que una producción excesiva de  
óxido nítrico desempeña un papel, que comprenden una cantidad  
terapéuticamente eficaz de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-  
2-metil-L-cisteína cristalino junto con un portador, diluyente o vehículo  
20 farmacéuticamente aceptable.

Además de ser útil para tratamiento humano, esta forma es también útil  
para tratamiento veterinario de animales de compañía, animales exóticos y  
animales de granja, incluyendo mamíferos, roedores y similares. Los animales  
más preferidos incluyen caballos, perros y gatos.

Al

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

### **Definiciones**

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", como se utilizan en la  
5 presente memoria, incluyen tratamiento profiláctico, paliativo o restaurativo.

La expresión "cantidad eficaz" significa una dosis que conduce al  
tratamiento. Puede administrarse una cantidad eficaz en una dosis única o en  
dosis divididas durante un periodo de tiempo.

El término "ACN" significa acetonitrilo.

10 El término "amorfo" como se aplica a la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-  
metil-L-cisteína de la presente memoria, designa un estado sólido en el que las  
moléculas de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se presentan en  
una disposición desordenada y no forman una redícula cristalina o celda unitaria  
distinguible. Cuando se somete a difracción de rayos X en polvo, la S-[2-[(1-  
15 iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína amorfa no produce ningún pico cristalino  
característico.

La expresión "forma cristalina", como se aplica a la S-[2-[(1-  
iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente memoria, designa una  
forma en estado sólido en la que las moléculas de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-  
20 2-metil-L-cisteína están dispuestas para formar una redícula cristalina  
distinguible (i) que comprende celdas unitarias distinguibles, y (ii) que  
proporciona picos de difracción cuando se somete a radiación de rayos X.

Las expresiones "forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-  
metil-L-cisteína", "forma I de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína" y  
25 "forma I" significan todas la forma I de sal cristalina de maleato de S-[2-[(1-

87

iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, como se describe con más detalle en la solicitud de EE.UU. en tramitación con la presente nº de serie 60/453.796, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad.

5 Las expresiones "forma II de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína", "forma II de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína" y "forma II" significan todas forma II de sal cristalina de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, como se describe con más detalle en la solicitud de EE.UU. en tramitación con la presente nº de serie 60/453.782, incorporada a la presente como referencia en su totalidad.

10 Las expresiones "clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína", "clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalina" y "sal mixta" designan todas la forma cristalina de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, que tiene estequiométricamente un mol de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína  
15 por 0,5 moles de maleato y 0,5 moles de HCl, como se describe con más detalle en la presente memoria.

El término "cristalización", como se utiliza en la presente memoria, puede designar cristalización y/o recristalización dependiendo de las circunstancias aplicables referentes a la preparación de material de partida S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.  
20

El término "IFA", como se utiliza en la presente memoria, significa Ingrediente farmacéutico activo.

El término "bis", como se utiliza en la presente memoria, significa N,N-metilen-bis-acrilamida.

25 El término "agua DI", como se utiliza en la presente memoria, significa

45

agua desionizada.

El término "DMF", como se utiliza en la presente memoria, significa *N,N*-dimetilformamida.

5 El término "D/A/A" designa un sistema disolvente ternario de *N,N*-dimetilformamida (DMF), agua y acetonitrilo.

El término "sustancia fármaco *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína", como se utiliza en la presente memoria, significa *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína *per se* como se califica por el contexto en el que se utiliza el término, y puede designar *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína no formulada o *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína  
10 presente como un ingrediente de una composición farmacéutica.

El término "DSC" significa calorimetría de barrido diferencial.

El término " $\Delta H_{fus}$ " o " $\Delta H_{fus}$ " significa la entalpía de fusión de una sustancia, y designa la energía (medida en kilojulios (kJ)) requerida para fundir  
15 un gramo de la sustancia a su temperatura de punto de fusión.

El término "HPLC" significa cromatografía líquida a alta presión.

El término "IR" significa infrarrojo.

El término "kN" significa kilonewtons.

El término "kP" significa kilopondios.

20 El término " $\rho_s$ " o  $\rho_s$ , como se utiliza en la presente memoria, designa la densidad.

El término " $\rho_b$ " significa densidad aparente.

El término " $\rho_t$ " significa densidad aparente compactada.

El término "IC" significa índice de compresibilidad, como se define  
25 mediante la fórmula:

cd

$$IC = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_i}$$

El término "RMN" significa resonancia magnética nuclear, y puede aplicarse a espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

El término "ml" significa mililitros.

5 El término "mg" significa miligramos.

El término "g" significa gramos.

El término "kg" significa kilogramos.

El término "µg" significa microgramos.

El término "µl" significa microlitros.

10 El término "min" significa minutos.

El término "PM" significa peso molecular.

El término "nucleación", como se utiliza en la presente memoria, significa la formación de cristales en una solución.

15 El término "pureza", como se utiliza en la presente memoria, a menos que se califique de otro modo, significa la pureza química de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino según un ensayo convencional de HPLC.

El término "PXRD" significa difracción de rayos X en polvo.

El término "rpm" significa revoluciones por minuto.

20 El término "sembrar", como se utiliza en la presente memoria, significa la adición de cristales a un sistema de cristalización con el fin de iniciar o potenciar la nucleación o actuar como sustrato para una cristalización adicional.

El término "aglomerado" designa generalmente el empaquetado aleatorio u ordenado de cristales individuales en unidades que no se destruyen

fácilmente durante operaciones energéticamente moderadas, tales como transferencia de sólidos.

El término "SEM" significa microscopía de barrido electrónico.

El término "TGA" significa análisis termogravimétrico.

5 El término "Tm" significa temperatura de fusión.

La expresión "ión dipolar" o "ZW" significa una molécula que porta tanto una carga positiva como negativa. La expresión "ión dipolar libre" significa un ión dipolar tal que la carga neta de la molécula sea cero. A menos que se indique otra cosa, la expresión "ión dipolar" y "ZW", como se utilizan en la presente memoria, significan el ión dipolar de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína será útil para tratar, entre otras cosas, la inflamación en un sujeto, o para tratar otros trastornos mediados por óxido nítrico sintasa tales como, como un analgésico en el tratamiento del dolor y dolores de cabeza, o como antipirético para el tratamiento de la fiebre. Por ejemplo, la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína será útil para tratar la artritis, incluyendo pero sin limitación, artritis reumatoide, espondiloartropatías, artritis gotosa, osteoartritis, lupus sistémico eritematoso, 15 artritis juvenil, artritis reumática aguda, artritis enteropática, artritis neuropática, artritis psoriásica y artritis piogénica. Las afecciones en las que la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína proporcionará una ventaja en la inhibición de la producción de NO a partir de L-arginina incluyen afecciones artríticas.

25 La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-

al

metil-L-cisteína será útil además en el tratamiento de asma, bronquitis, calambres menstruales (por ejemplo dismenorrea), parto prematuro, tendinitis, bursitis, afecciones relacionadas con la piel tales como psoriasis, eccema, quemaduras, quemaduras solares, dermatitis, pancreatitis, hepatitis e.  
5 inflamación postoperatoria, incluyendo desde cirugía oftálmica tal como cirugía de cataratas hasta cirugía refractaria. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería también útil para tratar afecciones gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria del Intestino, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome del intestino irritable y colitis  
10 ulcerosa.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería útil para la prevención o el tratamiento del cáncer, tal como cáncer colorrectal y cáncer de mama, pulmón, próstata, vejiga, cuello del útero y piel. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-  
15 2-metil-L-cisteína de la invención sería útil en el tratamiento de la inflamación y la lesión de tejidos en enfermedades tales como enfermedades vasculares, dolores de cabeza de migraña, periarteritis nodular, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, escleroderma, fiebre reumática, diabetes de tipo I, enfermedad de la articulación neuromuscular, incluyendo miastenia grave,  
20 enfermedad de la sustancia blanca, incluyendo esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behcet, polimiositis, gingivitis, nefritis, hipersensibilidad, hinchazón presente tras lesión, isquemia miocárdica y similares. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería también útil en el tratamiento de enfermedades oftálmicas  
25 tales como glaucoma, retinitis, retinopatías, uveitis, fotofobia ocular y de

42

inflamación y dolor asociados a lesión aguda en el tejido ocular. Es de Interés particular entre los usos de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la invención el tratamiento del glaucoma, especialmente cuando los síntomas de glaucoma están causados por la producción de óxido nítrico, tal como en lesión nerviosa mediada por óxido nítrico.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería también útil en el tratamiento de inflamación pulmonar, tal como la asociada a infecciones virales y fibrosis quística. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería también útil para el tratamiento de ciertos trastornos del sistema nervioso central tales como demencias corticales, incluyendo enfermedad de Alzheimer, y lesión del sistema nervioso central como resultado de apoplejía, isquemia y traumatismo.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína es útil como agente antiinflamatorio tal como para el tratamiento de la artritis, con el beneficio adicional de tener significativamente menos efectos secundarios nocivos.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería también útil en el tratamiento de rinitis alérgica, síndrome de las dificultades respiratorias, síndrome de shock de endotoxina y aterosclerosis.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería también útil en el tratamiento del dolor, incluyendo pero sin limitación dolor postoperatorio, dolor dental, dolor muscular y dolor

23

resultante del cáncer. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería útil para la prevención de demencias tales como la enfermedad de Alzheimer.

Además de ser útil para tratamiento humano, la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína es también útil para tratamiento veterinario de animales de compañía, animales exóticos y animales de granja, incluyendo mamíferos, roedores y similares. Los animales más preferidos incluyen caballos, perros y gatos.

La presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede utilizarse también en coterapias, parcial o completamente en lugar de otras terapias antiinflamatorias convencionales, tales como conjuntamente con esteroides, AINE, inhibidores selectivos de COX-2, inhibidores de 5-lipooxigenasa, antagonistas de LTB<sub>4</sub> e inhibidores de hidrolasa LTA<sub>4</sub>.

Otras afecciones en las que la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención proporcionará una ventaja en la inhibición de la producción de NO incluyen isquemia cardiovascular, diabetes (tipo I o tipo II), insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, aterosclerosis, migraña, glaucoma, aneurisma aórtico, esofagitis de reflujo, diarrea, síndrome del intestino irritable, fibrosis quística, enfisema, asma, bronquiectasia, hiperalgesia (alodinia), isquemia cerebral (tanto isquemia focal, apoplejía trombótica como isquemia global (por ejemplo consecuencia de parada cardíaca)), esclerosis múltiple y otros trastornos del sistema nervioso central mediados por NO, por ejemplo enfermedad de Parkinson. Otros trastornos neurodegenerativos en los que la inhibición de NO

AK

puede ser útil incluyen degeneración nerviosa o necrosis nerviosa en trastornos tales como hipoxia, hipoglucemia, epilepsia y en casos de traumatismo del sistema nervioso central (SNC) (tales como lesiones de médula espinal y cerebrales), convulsiones y toxicidad por oxígeno hiperbárico, demencia, por ejemplo demencia presenil y demencia relacionada con el SIDA, caquexia, corea de Sydenham, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Korsakoff, imbecilidad referida a un trastorno vascular cerebral, trastornos del sueño, esquizofrenia, depresión, depresión u otros síntomas asociados al síndrome premenstrual (PMS), ansiedad y shock séptico.

10 La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención será también útil en el tratamiento del dolor, incluyendo somatogénico (nociceptivo o neuropático), tanto agudo como crónico. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína podría utilizarse en cualquier situación que incluya dolor  
15 neuropático en la que se administraría tradicionalmente un AINE o analgésico opioide común.

Otros trastornos o afecciones que se tratarán ventajosamente con la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención incluyen el tratamiento o la prevención de tolerancia a  
20 opioides en pacientes que necesitan analgésicos opioides prolongadamente, y tolerancia a benzodiazepinas en pacientes que toman benzodiazepinas, y otros comportamientos adictivos, por ejemplo adicción a nicotina, alcoholismo y trastornos alimentarios.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-  
25 metil-L-cisteína de la presente invención será también útil en el tratamiento o la

15

prevención de síntomas de abstinencia de fármacos, por ejemplo el tratamiento o la prevención de síntomas de abstinencia por adicción a opioides, alcohol o tabaco.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede ser también útil para prevenir lesiones de tejidos cuando se combina terapéuticamente con agentes antibacterianos o antivirales.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención será también útil para inhibir la producción de NO a partir de L-arginina, incluyendo la hipotensión sistémica asociada al shock séptico y/o tóxico hemorrágico inducido por una amplia variedad de agentes; la terapia con citoquinas tales como TNF, IL-1 e IL-2; y como coadyuvante para la inmunosupresión a corto plazo en terapia de trasplantes.

La presente invención está dirigida adicionalmente al uso de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención para el tratamiento y la prevención de neoplasias. Las neoplasias que serán tratables o prevenibles mediante la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y procedimientos de la presente invención incluyen cáncer de cerebro, cáncer de hueso, una leucemia, un linfoma, neoplasia derivada de célula epitelial (carcinoma epitelial) tal como carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de labio, cáncer de boca, cáncer esofágico, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de piel, tal como

cánceres de células escamosas y células basales, cáncer de próstata, carcinoma celular renal y otros cánceres conocidos que afectan a las células epiteliales por todo el cuerpo. Preferiblemente, la neoplasia a tratar se selecciona de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, 5 cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de piel, tal como cánceres de células escamosas y células basales. La presente forma II de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y sus procedimientos puede utilizarse también para tratar la fibrosis que aparece con 10 terapia de radiación. La presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y sus procedimientos pueden utilizarse para tratar sujetos que tienen pólipos adenomatosos, incluyendo aquellos con poliposis adenomatosa familiar (FAP). Además, la presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y sus 15 procedimientos pueden utilizarse para prevenir la formación de pólipos en pacientes con riesgo de FAP.

El tratamiento conjunto de una sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención con otro agente antineoplásico producirá un efecto sinérgico o reducirá como alternativa 20 los efectos secundarios tóxicos asociados a la quimioterapia al reducir la dosis terapéutica del agente causante del efecto secundario necesitada para eficacia terapéutica, o al reducir directamente los síntomas de los efectos secundarios tóxicos causados por el agente causante del efecto secundario. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la 25 presente invención será adicionalmente útil como coadyuvante en terapia de

radiación para reducir los efectos secundarios o potenciar la eficacia.

En la presente invención, otro agente que puede combinarse terapéuticamente con la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención incluye cualquier agente terapéutico que sea capaz de inhibir la enzima ciclooxigenasa-2 ("COX-2"). Preferiblemente, dichos agentes inhibidores de COX-2 inhiben COX-2 selectivamente respecto a la enzima ciclooxigenasa-1 ("COX-1"). Dicho inhibidor de COX-2 es conocido como un "inhibidor selectivo de COX-2". Los inhibidores selectivos de COX-2 útiles en combinación terapéutica con la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención incluyen celecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, rofecoxib, ABT-963 (2-(3,4-difluorofenil)-4-(3-hidroxi-3-metil-1-butoxi)-5-[4-(metilsulfonil)fenil]-3(2H)-piridazinona; descrita en la solicitud de patente PCT nº WO 00/24719) o meloxicam. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención puede utilizarse también ventajosamente en combinación terapéutica con un profármaco de un inhibidor selectivo de COX-2, por ejemplo parecoxib.

Puede seleccionarse otro agente quimioterapéutico que será útil en combinación con la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención, por ejemplo, de la siguiente lista no exhaustiva y no limitante:

Alfa-difluorometilornitina (DFMO), 5-FU-fibrinógeno, ácido acantifólico, aminotiadiazol, brequinar de sodio, carmofur, CGP-30694 de Ciba-Geigy, ciclopentilcitosina, fosfato estearato de citarabina, conjugados de citarabina, DATHF de Lilly, DDFC de Merrel Dow, dezaguanina, didesoxicitidina,

AB

didesoxiguanosina, didox, DMDC de Yoshitomi, doxifluridina, EHNA de Wellcome, EX-015 de Merck & Co., fazarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, 5-fluorouracilo, *N*-(2'-furanidil)-5-fluorouracilo, FO-152 de Daiichi Seiyaku, Isopropilpirrolizina, LY-188011 de Lilly, LY-264618 de Lilly, 5 metobenzaprima, metotrexato, MZPES de Wellcome, norespermidina, NSC-127716 de NCI, NSC-264880 de NCI, NSC-39661 de NCI, NSC-612567 de NCI, PALA de Warner-Lambert, pentostatina, pirritrexim, plicamicina, PL-AC de Asahi Chemical, TAC-788 de Takeda, tioguanina, tiazofurina, TIF de Erbamont, trimetrexato, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de tirosina proteína quinasa, UFT de Taiho, uricitina, 254-S de Shionogi, análogos de aldofosfamida, altretamina, anaxirona, BBR-2207 de Boehringer Mannheim, bestrabucilo, budotitano, CA-102 de Wakunaga, carboplatino, carmustina, Chinoin-139, Chinoin-153, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, CL-286558 de American Cyanamid, CY-233 de Sanofi, ciplatato, D-19-384 de Degussa, 15 DACHP(Myf)2 de Sumimoto, difenilespiromustina, diplatino citostático, derivados de distamicina de Erba, DWA-2114R de Chugai, E09 de ITI, elmustina, FCE-24517 de Erbamont, estramustina fosfato de sodio, fotemustina, G-6-M de Unimed, GYKI-17230 de Chinoin, hepsul-fam, ifosfamida, ioproplatino, lomustina, mafosfamida, mitolactol, NK-121 de Nippon 20 Kayaku, NSC-264395 de NCI, NSC-342215 de NCI, oxaliplatino, PCNU de Upjohn, prednimustina, PTT-119 de Proter, ranimustina, semustina, SK&F-101772 de SmithKline, SN-22 de Yakult Honsha, espiromustina, TA-077 de Tanabe Seiyaku, tauromustina, temozolomida, teroxirona, tetraplatino, trimelamol, 4181-A de Taiho, aclarubicina, actinomicina D, actinoplanona, ADR- 25 456 de Erbamont, derivados de aeroplisinina, AN-201-II de Ajinomoto, AN-3 de

29

Ajinomoto, anisomicinas de Nippon Soda, antraciclina, acinomicina A, bisucaberina, BL-6859 de Bristol Myers, BMY-25067 de Bristol Myers, BMY-25551 de Bristol-Myers, BMY-26605 de Bristol Myers, BMY-27557 de Bristol Myers, BMY-28438 de Bristol Myers, sulfato de bleomicina, briostatina-1, C-5 1027 de Taiho, caliquemicina, cromoximicina, dactinomicina, daunorubicina, DC-102 de Kyowa Hakko, DC-79 de Kyowa Hakko, DC-88A de Kyowa Hakko, DC89-A1 de Kyowa Hakko, DC92-B de Kyowa Hakko, ditrisarubicina B, DOB-41 de Shionogi, doxorubicina, doxorubicina-fibrinógeno, elsamicina-A, epirubicina, erbstatina, esorubicina, esperamicina-A1, esperamicina<sup>2</sup>Alb, FCE-10 21954 de Erbamont, FK-973 de Fujisawa, fostriecina, FR-900482 de Fujisawa, glidobactina, gregatina-A, grincamicina, herbimicina, idarubicina, iludinas, kazusamicina, kesarirodinas, KM-5539 de Kyowa Hakko, KRN-8602 de Kirin Brewery, KT-5432 de Kyowa-Hakko, KT-5594 de Kyowa Hakko, KT-6149 de Kyowa Hakko, LL-D49194 de American Cyanamid, ME 2303 de Meiji Seika, 15 menogarilo, mitomicina, mitoxantrona, M-TAG de SmithKline, neoenactina, NK-313 de Nippon-Kayaku, NKT-01 de Nippon Kayaku, NSC-357704 de SRI International, oxalisina, oxaunomicina, peplomicina, pilatina, pirarubicina, porotramicina, pirindamicina A, RA-I de Tobishi, rapamicina, rizoxina, rodorubicina, sibanomicina, siwenmicina, SM-5887 de Sumitomo, SN-706 de 20 Snow Brand, SN-07 de Snow Brand, sorangicina A, esparsomicina, SS-21020 de SS-Pharmaceutical, SS-7313B de SS Pharmaceutical, SS-9816B de SS-Pharmaceutical, estefimicina B, 4181-2 de Taiho, talisomicina, TAN-868A de Takeda, terpentecina, trazina, tricozarina A, U-73975 de Upjohn, UCN-10028A de Kyowa Hakko, WF-3405 de Fujisawa, Y-25024 de Yoshitomi, zorubicina, 25 alfa-caroteno, alfa-difluorometilarginina, acitretina, AD-5 de Biotec, AHC-52 de

100

Kyorin, alstonina, amonafida, anfetinila, amsacrina, angiostat, anquinomicina, antineoplastón A10, antineoplastón A2, antineoplastón A3, antineoplastón A5, antineoplastón AS2-1, APD de Henkel, glicinato de afidicolina, asparaginasa, avarol, bacularina, batracilina, benflurón, benzotript, BIM-23015 de Ipsen-  
5 Beaufour, bisantreno, BMY-40481 de Bristol-Myers, boro-10 de Vestar, bromofosfamida, BW-502 de Wellcome, BW-773 de Wellcome, caracemida, clorhidrato de carmetizol, CDAF de Ajinomoto, clorosulfaquinoxalona, CHX-2053 de Chemex, CHX-100 de Chemex, CI-921 de Warner-Lambert, CI-937 de Warner-Lambert, CI-941 de Warner Lambert, CI-958 de Warner-Lambert,  
10 clarfénur, claviridenona, compuesto 1259 de ICN, compuesto 4711 de ICN, contracán, CPT-11 de Yakult Honsha, crisnatol, curaderm, citocalasina B, citarabina, citocitina, D-609 de Merz, maleato de DABIS, dacarbazina, dateliptinio, didemnina-B, dihematoporfirinéter, dihidrolenperona, dinalina, distamicina, DM-341 de Toyo Pharmar, DM-75 de Toyo Pharmar, DN-9693 de  
15 Daiichi Seiyaku, eliprabina, acetato de eliptinio, EPMTc de Tsumura, ergotamina, etopósido, etretinato, fenretinida, FR-57704 de Fujisawa, nitrato de galio, genkwadafnina, GLA-43 de Chugai, GR-63178 de Glaxo, NMF-5N grifolán, hexadecilfosfocolina, HO-221 de Green Cross, homoharringtonina, hidroxiurea, ICRF-187 de BTG, ilmofosina, isoglutamina, isotretinoína, JI-36 de  
20 Otsuka, K-477 de Ramot, K-76COONa de Otsuka, K-AM de Kureha Chemical, KI-8110 de MECT Corp., L-623 de American Cyanamid, leucoregulina, lonidamina, LU-23-112 de Lundbeck, LY-186641 de Lilly, MAP de NCI(US), maricina, MDL-27048 de Merrell Dow, MEDR-340 de Medco, merbarona, derivados de merocianina, metilanilinoacridina, MGI-136 de Molecular  
25 Genetics, minactivina, mitonafida, mitoquidona, mopidamol, motretinida, MST-

101

16 de Zenyaku Kogyo, *N*-(retinoil)aminoácidos, N-021 de Nisshin Flour Milling, deshidroalaninas *N*-aciladas, nafazatrom, NCU-190 de Taisho, derivados de nocodazol, normosang, NSC-145813 de NCI, NSC-361456 de NCI, NSC-604782 de NCI, NSC-95580 de NCI, octreotida, ONO-112 de Ono, 5 oquizanocina, Org-10172 de Akzo, pancratistatina, pacellptina, PD-111707 de Warner-Lambert, PD-115934 de Warner-Lambert, PD-131141 de Warner-Lambert, PE-1001 de Pierre Fabre, péptido D de ICRT, piroxantrona, polihematoporfirina, ácido polipreico, porfirina de Efamol, probimano, procarbazina, proglumida, proteasa nexín I de Invitrón, RA-700 de Tobishi, 10 razoxano, RBS de Sapporo Breweries, restrictina-P, retellptina, ácido retinolco, RP-49532 de Rhone-Poulenc, RP-56976 de Rhone-Poulenc, SK&F-104864 de SmithKline, SM-108 de Sumitomo, SMANCS de Kuraray, SP-10094 de SeaPharm, espatol, derivados de espirociclopropano, espirogermanio, unimed, SS-554 de SS Pharmaceuticals, estripoldinona, estipoldinona, SUN 0237 de 15 Suntory, SUN 2071 de Suntory, superóxido dismutasa, T-506 de Toyama, T-680 de Toyama, taxol, TEI-0303 de Teijin, tenipósido, taliblastina, TJB-29 de Eastman Kodak, tocotrienol, topostina, TT-82 de Teijin, UCN-01 de Kyowa Hakko, UCN-1028 de Kyowa Hakko, ucráfina, USB-006 de Eastman Kodak, sulfato de vinblastina, vincristina, vindesina, vinestramida, vinorelbina, vintriptol, 20 vinzolidina, witanolidas, YM-534 de Yamanouchi, uroguanilina, combretastatina, dolastatina, idarubicina, epirubicina, estramustina, ciclofosfamida, 9-amino-2-(*S*)-camptotecina, topotecán, irinotecán (Camptosar), exemestano, decapeptilo (triptorelina) o un ácido graso omega 3..

Los ejemplos de agentes radioprotectores que pueden utilizarse en una 25 terapia de combinación con la forma II de sal cristalina de maleato de *S*-[2-[(1-

102

Iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de esta invención incluyen AD-5, adqunona, análogos de amifostina, detox, dimesna, 1-102, MM-159, deshidroalaninas N-aciladas, TGF-Genentech, tiptotimod, amifostina, WR-151327, FUT-187, cetoprofeno transdérmico, nabumetona, superóxido.  
5 dismutasa (Chiron) y superóxido dismutasa Enzon.

La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención será también útil en el tratamiento o la prevención de trastornos o afecciones relacionados con la angiogénesis, por ejemplo crecimiento de tumores, metástasis, degeneración macular y  
10 aterosclerosis.

En una realización adicional, la presente invención proporciona también combinaciones terapéuticas para el tratamiento o la prevención de trastornos o afecciones oftálmicos tales como glaucoma. Por ejemplo, la presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína  
15 de la invención se utilizará ventajosamente en combinación terapéutica con un fármaco que reduce la presión intraocular de pacientes afectados de glaucoma. Dichos fármacos reductores de la presión intraocular incluyen sin limitación latanoprost, travoprost, bimatoprost o unoprostol. La combinación terapéutica de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-  
20 cisteína de la presente invención más un fármaco reductor de la presión intraocular será útil porque se cree que cada uno alcanza sus efectos afectando a un mecanismo diferente.

En otra combinación de la presente invención, la presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la  
25 invención puede utilizarse en combinación terapéutica con un fármaco

antihiperlipidémico o reductor del nivel de colesterol tal como un fármaco antihiperlipidémico de benzotiepina o benzotiazepina. Pueden encontrarse ejemplos de fármacos antihiperlipidémicos de benzotiepina útiles en la presente combinación terapéutica de la invención en la patente de EE.UU. nº 5.994.391, incorporada a la presente memoria como referencia. Se describen algunos fármacos antihiperlipidémicos de benzotiazepina en el documento WO 93/16055. Como alternativa, el fármaco antihiperlipidémico o reductor del nivel de colesterol útil en combinación con un compuesto de la presente invención puede ser un inhibidor de HMG Co-A reductasa. Los ejemplos de Inhibidores de HMG-CoA reductasa útiles en la presente combinación terapéutica incluyen, individualmente, benfluorex, fluvastatina, lovastatina, provastatina, simvastatina, atorvastatina, cerivastatina, bervastatina, ZD-9720 (descrito en la solicitud de patente PCT nº WO 97/06802), ZD-4522 (nº CAS 147098-20-2 para la sal de calcio, nº CAS 147098-18-8 para la sal de sodio; descrito en la patente europea nº EP 521471), BMS 180431 (nº CAS 129829-03-4) o NK-104 (nº CAS 141750-63-2). La combinación terapéutica de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención más un fármaco antihiperlipidémico o reductor del nivel de colesterol será útil, por ejemplo, en la reducción del riesgo de formación de lesiones ateroscleróticas en vasos sanguíneos. Por ejemplo, las lesiones ateroscleróticas se inician a menudo en sitios inflamados de vasos sanguíneos. Está establecido que los fármacos antihiperlipidémicos o reductores del nivel de colesterol reducen el riesgo de formación de lesiones ateroscleróticas al reducir los niveles lipídicos en la sangre. Sin limitar la invención a un solo mecanismo de acción, se cree que de algún modo la sal cristalina clorhidrato

104

maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente combinación actuará concertadamente para proporcionar un control mejorado de las lesiones ateroscleróticas, por ejemplo, reduciendo la inflamación de los vasos sanguíneos concertadamente con la reducción de los niveles lipídicos en sangre.

En otra realización de la invención, la presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede utilizarse en combinación con otros compuestos o terapias para el tratamiento de afecciones o trastornos del sistema nervioso central tales como migraña. Por ejemplo, la presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede utilizarse en combinación terapéutica con cafeína, un agonista de 5-HT-1B/1D (por ejemplo un triptano tal como sumatriptano, naratriptano, zolmitriptano, rizatriptano, almotriptano o frovatriptano), un antagonista de dopamina D4 (por ejemplo sonепiprazol), aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, indometacina, naproxeno de sodio, isomethepteno, dicloralfenazona, butalbital, un alcaloide del cornezuelo (por ejemplo ergotamina, dihidroergotamina, bromocriptina, ergonovina o metilergonovina), un antidepresivo tricíclico (por ejemplo amitriptilina o nortriptilina), un antagonista serotoninérgico (por ejemplo metisergida o ciproheptadina), un antagonista beta-adrenérgico (por ejemplo propranolol, timolol, atenolol, nadolol o metoprolol), o un inhibidor de monoamino oxidasa (por ejemplo fenelezina o isocarboxazida).

Una realización adicional proporciona una combinación terapéutica de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención con un compuesto opioide. Los compuestos

105

opioides útiles en esta combinación incluyen sin limitación morfina, metadona, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfanol, codeína, dihidrocodeína, dihidrohidroxicodeína, pentazocina, hidrocodona, oxicodona, nalmefeno, etorfina, levorfanol, fentanilo, sufentanilo, DAMGO, butorfanol, buprenorfina, 5 naloxona, naltrexona, CTOP, diprenorfina, beta-funaltrexamina, naloxonazina, nalorfina, pentazocina, nalbufina, naloxona, benzolhidrazona, bremazocina, etilcetociclazocina, U50.448, U69.593, espiradolina, norbinaltorfimina, naltrindol, DPDPE, [D-la<sup>2</sup>, glu<sup>4</sup>]deltorfina, DSLET, met-enkefalina, leu-enkefalina, beta-endorfina, dinorfina A, dinorfina B y alfa-neoendorfina. Una ventaja de la 10 combinación de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención con un compuesto opioide es que la presente sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la invención permitirá una reducción de la dosis del compuesto opioide, reduciendo así el riesgo o la 15 gravedad de los efectos secundarios opioides, tales como la adicción a opioides.

Una realización adicional proporciona cuatro nuevos diseños de proceso de cristalización de mecanismos diferentes para la preparación de la sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína 20 de la presente invención con características en polvo bruto ajustadas para preparar fácilmente composiciones farmacéuticas que comprenden sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

106

## EJEMPLOS ILUSTRATIVOS

Los procedimientos para preparar diclorhidrato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína son conocidos y se describen en la patente de EE.UU. de cesión común con la presente nº 6.403.830, incorporada a la presente memoria como referencia. El ión dipolar libre de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se describe en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº de serie 60/453.798, incorporada a la presente memoria como referencia. La forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino se describe en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº de serie 60/453.796, incorporada a la presente memoria como referencia. La forma II de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino se describe en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº de serie 60/453.782, incorporada a la presente memoria como referencia.

15

### **Caracterización del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína**

Los cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína son birrefringentes con una elongación positiva cuando se analizan mediante microscopía de luz polarizada. La sal cristalina clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína tiene una solubilidad acuosa superior a 150 mg.ml<sup>-1</sup>.

25

La Fig. 1 es un patrón de rayos X en polvo de dos muestras (ejemplos 9

107

y 20) de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. Ambos patrones de difracción ayudan a establecer los picos característicos útiles en la caracterización del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino.

5

La Fig. 2 es una gráfica de un estudio de calorimetría de barrido diferencial de una muestra del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino. Muestra un solo evento térmico de fusión/descomposición a 197,30°C con una entalpía asociada de 134,92 J.g<sup>-1</sup>. Puesto que el único evento térmico está compuesto por la degradación térmica de ácido maleico en clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalina y la fusión de los sólidos cristalinos residuales, tanto la temperatura pico como la entalpía pueden variar dependiendo de condiciones de análisis tales como el tamaño de muestra, la velocidad de calentamiento y el procedimiento para la preparación de muestra. La Fig. 3 es una representación termogravimétrica (TGA) de una muestra del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino. La TGA muestra una pérdida de peso de aproximadamente un 1% en el intervalo de temperatura de 40-180°C.

15  
20

La Fig. 4 es una representación de un estudio de absorción de humedad del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino. La absorción de humedad del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino a 25°C mediante balance de humedad por DVS mostró una incorporación de humedad de aproximadamente

25

108

1,5% entre 0 y 70% de humedad relativa (HR). Entre 70 y 9% de HR, se incorporó otro 58% de humedad a los sólidos. Se supone que a 90% de HR la estructura cristalina se destruyó, produciendo sólidos amorfos altamente higroscópicos. Durante el ciclo de desorción (de 90 a 30% de HR), estos sólidos se transformaron en una mezcla de la forma II del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino y el ión dipolar amorfo con cloruro de hidrógeno en exceso. El posterior comportamiento de desorción y resorción fue muy similar, hasta la forma II de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino. El análisis de rayos X en polvo de los sólidos al final del experimento confirmó la presencia tanto de forma II de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino como de sólidos amorfos.

La Fig. 5 muestra el espectro Raman del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino preparado en el ejemplo 20. Brevemente, el espectro Raman es una firma vibracional de una molécula o sistema complejo. Su origen se basa en las colisiones inelásticas entre las moléculas y los fotones, que son las partículas de luz que componen un haz de luz. La colisión entre las moléculas y los fotones conduce a un intercambio de energía con el consiguiente cambio de energía, y por tanto de longitud de onda, del fotón. Por tanto, un espectro Raman es un conjunto de líneas espectrales muy estrechas emitidas por moléculas objetivo cuando se iluminan con una luz incidente. La anchura de cada línea espectral está fuertemente afectada por la anchura espectral de la luz incidente, y por tanto se utilizan fuentes de luz estrechamente monocromáticas tales como láser. La longitud de onda de cada

109

línea Raman se expresa como un desplazamiento de número de onda desde la luz incidente, que es la diferencia entre la longitud de onda inversa de la línea Raman y de la luz incidente. El desplazamiento del número de onda, no de la longitud de onda absoluta, de las líneas Raman es específico de grupos atómicos particulares en las moléculas. Los espectros Raman miden los estados de vibración de moléculas, que están determinados por su estructura molecular.

#### **Cristalización de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína**

La diversa selección de ejemplos reseñada aquí para la cristalización de sales mixtas está organizada en tres subsecciones principales. La primera subsección, los ejemplos 1-6, presenta la descripción de experimentos que no consiguieron producir clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino polimórficamente puro. En la mayoría de estos experimentos se obtuvieron mezclas con la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Se incluye también una breve discusión de las razones del fracaso en obtener clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino polimórficamente puro al final de la subsección.

La forma cristalina externa de la sal mixta define las dos siguientes subsecciones. Este atributo particular del producto está regido por los distintos mecanismos de cristalización subyacentes y tiene importantes implicaciones para el desarrollo posterior de una composición farmacéutica que comprende

110

clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las dos formas distintas, con los fines de esta invención, se designan desde ahora como "aglomerados empaquetados aleatoriamente", de apariencia global habitualmente, pero no necesariamente, no esférica, y "aglomerados empaquetados ordenadamente", de apariencia global habitualmente, pero no necesariamente, esférica. En general, los cristales primarios que constituyen el aglomerado tienen relaciones de aspecto menores para los aglomerados empaquetados ordenadamente en comparación con los cristales primarios que constituyen los aglomerados empaquetados aleatoriamente. Con los fines de esta invención, la relación de aspecto se define como la relación del lado largo al lado corto.

En primer lugar se discuten los ejemplos pertinentes para la cristalización de "aglomerados empaquetados aleatoriamente", ejemplos 7-19. Esto es seguido por una discusión sobre el mecanismo de cristalización subyacente que dirige la formación de esta forma de cristal particular. Se incluye también una definición detallada de "separación de fases" con los fines de esta invención.

Finalmente, en los ejemplos 20-30 se resume la descripción de diversos experimentos que siguieron las diversas variantes de los procesos para los "aglomerados empaquetados ordenadamente".

#### **Definiciones de las materias primas:**

El ión dipolar *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína utilizado en todos los ejemplos aquí reseñados se obtuvo en forma de sólidos liofilizados amorfos o soluciones en DMF.

La S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sólida se designará como S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa en adelante. En la mayoría de los casos, la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa contenía algo de cloruro de hidrógeno (HCl). Los equivalentes molares de HCl a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se especificarán en cada ejemplo para el lote específico de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa utilizada para la cristalización de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

La primera solución madre de DMF/S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína tenía una composición aproximada de: S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína 11,7% p/p; agua 0,2% p/p; ácido maleico 12,4% p/p y cloruro 1,0%. Podría esperarse una variabilidad de un 10% para cada componente de esta solución. La concentración anteriormente citada de ácido maleico y cloruro en la solución representa aproximadamente 2,0 y 0,5 equivalentes molares respectivamente por cada equivalente de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Esta solución se designará como solución primaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en adelante.

La otra solución madre de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en DMF tenía una composición aproximada de: S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína 11,7% p/p; agua 2,83% p/p; ácido maleico 14,88% p/p y cloruro 1,0%. La concentración anteriormente citada de ácido maleico y cloruro en la solución representa aproximadamente 2,2 y 0,5 equivalentes molares respectivamente por cada equivalente de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Esta solución se designa en adelante como solución secundaria en

112

DMF de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína.

### **Ejemplos de experimentos fallidos con respecto a la pureza polimórfica**

Seis experimentos distintos produjeron mezclas de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino con forma I cristalina de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. Las pequeñas cantidades de este último se detectaron fácilmente mediante análisis DSC.

### **Ejemplo 1**

En el ejemplo 1 se añadieron 614 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 648 mg de ácido maleico, 988 mg de agua DI y 2.460,7 mg de DMF a un vial de centelleo de 25 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 16 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml durante 50 minutos. La turbidez desapareció completamente tras la terminación de la carga. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas y después se calentó a 60°C durante 40 minutos. Se agitó a esta temperatura durante 40 horas y después se añadieron 2 ml de acetonitrilo. La suspensión se agitó durante otra hora a 60°C, y después se enfrió hasta 25°C durante una hora y se agitó durante 4 horas. La suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas. El análisis por PXRD del producto no mostró ninguna cantidad apreciable de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-

103

lminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína mezclada con el clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, sin embargo el análisis por DSC indicó que estaba presente algo de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína en el producto.

5

## **Ejemplo 2**

El ejemplo 2 implicó añadir 201 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 209 mg de ácido maleico y 1.120 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 5 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml durante 50 minutos. La turbidez no desapareció totalmente, sin embargo se añadieron 7 mg de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína como cristales simiente. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y después se calentó hasta 60°C durante 40 minutos. Se agitó a esta temperatura durante 40 horas. La suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas. El análisis por PXRD del producto no mostró ninguna cantidad apreciable de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína mezclada con clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, sin embargo el análisis por DSC indicó que la forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína estaba presente en el producto.

114

### **Ejemplo 3**

El objetivo del **ejemplo 3** era determinar si el sembrado con la forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína había contribuido al producto polimórficamente impuro del **ejemplo 2**. Se añadieron 203 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 208 mg de ácido maleico y 1.137 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 4 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml durante 50 minutos. La turbidez desapareció totalmente tras la terminación de la carga reducida de acetonitrilo. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y después se calentó hasta 60°C en 40 minutos. Se agitó a esta temperatura durante 40 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas. El análisis por PXRD del producto no mostró ninguna cantidad apreciable de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína mezclada con clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, sin embargo el análisis por DSC indicó que la forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína estaba presente en el producto.

1/5

#### **Ejemplo 4**

El objetivo del ejemplo 4 era estudiar el comportamiento de cristalización a temperaturas subambientales. Se añadieron 201 mg de S-[2-  
5 [(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 209 mg de ácido maleico y 1.141 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 4 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml  
10 durante 50 minutos. La turbidez desapareció completamente tras la terminación de la carga. El vial se enfrió hasta  $-5^{\circ}\text{C}$  y se agitó durante 24 horas. La solución se había vuelto una suspensión "de tipo gel" muy densa de sólidos cristalinos. Se añadieron 4 ml de acetonitrilo a la suspensión para diluirla. Se calentó de nuevo entonces hasta  $25^{\circ}\text{C}$  y se agitó durante 4 horas. La  
15 suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a  $40^{\circ}\text{C}$  y 94,8 kPa durante 24 horas. El análisis por PXRD del producto no mostró ninguna cantidad apreciable de forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-  
20 cisteína mezclada con clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, sin embargo el análisis por DSC indicó que la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína estaba presente en el producto.

### Ejemplo 5

En el ejemplo 5, el contenido de ácido maleico del sistema es redujo un 25%. Implicó añadir 304 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. 5 liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 241 mg de ácido maleico y 1.659 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 4 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml durante 50 minutos. La turbidez 10 del sistema lo convirtió en una masa viscosa sólida en el fondo del vial después de la terminación de la carga de acetonitrilo. El vial se calentó hasta 60°C en 40 minutos. A las 2,5 horas a 60°C, se observaron sólidos en el vial. Sin embargo, parecían pegados a las paredes del vial y por lo tanto se rascaron con una espátula y se suspendieron de nuevo en la solución. La suspensión se agitó a 15 esta temperatura durante 19 horas y después se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina. La torta estaba muy húmeda. Se resuspendió en 2 ml de acetonitrilo y después se lavó. La torta se secó al aire durante media hora. Los sólidos se secaron después al aire en una placa de cristalización abierta durante 2 horas. El análisis por PXRD del producto mostró una cantidad 20 apreciable de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína mezclada con clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. El análisis por DSC confirmó los resultados de PXRD.

### Ejemplo 6

117

El objetivo del ejemplo 6 era aumentar el rendimiento utilizando un régimen de adición modificado para niveles de acetonitrilo similares a los del ejemplo 5. Implicó añadir 301 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 241 mg de ácido maleico y 1.660 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 3 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml durante 50 minutos. La turbidez del sistema desapareció tras la terminación de la carga de acetonitrilo y se observaron cristales a los 30 minutos. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se añadió 1 ml de acetonitrilo. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 19 horas. La suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se secaron después al aire en una placa de cristalización abierta durante 2 horas. El análisis por PXRD del producto no mostró ninguna cantidad apreciable de forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína mezclada con clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, sin embargo el análisis por DSC indicó que la forma I de maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína estaba presente en el producto.

#### Discusión de los ejemplos 1-6

El análisis térmico de las muestras sólidas intermedias extraídas durante diversas etapas de los experimentos reseñados anteriormente indicó que la

118

forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalizó durante el enfriamiento o los periodos prolongados de equilibrado a cualquiera de las temperaturas de equilibrado reseñadas anteriormente. Esto implica una nucleación secundaria de la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína durante las últimas etapas de la cristallización. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que esto se explica debido a que, durante los periodos de equilibrado, en el sistema se elimina totalmente el HCl mediante la formación de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino. Sin embargo, existen todavía 0,5 equivalentes de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y 1,75 equivalentes de ácido maleico en el sistema a concentraciones probablemente superiores a la solubilidad de la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Cuando el sistema intenta desaturarse adicionalmente mediante enfriamiento, adición de antidisolvente, periodos de equilibrado o un contenido de ácido maleico reducido, la sobresaturación con respecto a la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se elimina mediante su cristallización en presencia de todas las superficies heterogéneas ofrecidas por los cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

En resumen, para experimentos en condiciones deficientes de HCl, cualquier intento de aumentar la sobresaturación del sistema en cualquier etapa mediante la adición de antidisolvente, enfriamiento o reducción del contenido de ácido maleico puede conducir a una pérdida del control con respecto a la pureza polimórfica del producto. En un sistema de DMF/acetonitrilo en dicho estado deficiente de clorhidrato, pueden esperarse

119

mezclas con la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

#### **Ejemplos de aglomerados empaquetados aleatoriamente**

5 Los ejemplos 7, 8 y 9 tenían cantidades estequiométricas de HCl con relación a la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para cristalizar clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Los ejemplos 7 y 8 representan experimentos realizados a bajos niveles de agua y acetónitrilo. El ejemplo 9 es un experimento realizado al contenido de agua y  
10 niveles de acetónitrilo estándar.

Los experimentos captados en los ejemplos 10 a 19 se realizaron para demostrar que el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína podía cristalizarse y aislarse en un amplio intervalo de valores para los equivalentes molares de HCl con respecto a la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-  
15 metil-L-cisteína.

Los ejemplos 10, 11, 12 y 13 se realizaron todos al 26% de la cantidad necesaria de HCl con respecto a la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para cristalizar clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El ejemplo 13 implicó la precipitación directa de clorhidrato  
20 maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, mientras que los ejemplos 10 a 12 implicaron la precipitación de la forma I o II del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, seguido de la conversión de fase mediada por solución en clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino mediante calentamiento y/o periodos de equilibrado  
25 prolongados a temperaturas seleccionadas.

120

Los ejemplos 14, 15 y 16 se realizaron todos al 50% de la cantidad necesaria de HCl con respecto a la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para cristalizar clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Los ejemplos 14 y 15 implicaron la precipitación directa de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, mientras que el ejemplo 14 implicó la precipitación de la forma I o II del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, seguido de la conversión de fase medlada por solución en clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino mediante calentamiento y/o periodos de equilibrio prolongados a temperaturas seleccionadas.

Los ejemplos 17, 18 y 19 se realizaron a niveles de HCl mayores de los necesarios por consideraciones estequiométricas para convertir S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

15

#### **Ejemplo 7**

Se añadieron 1,46 g de agua desionizada a 126,1 g de la solución primaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para llevar el contenido de agua de la solución primaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína al 1,63%. Se cargaron 125,5 g de esta solución en un reactor con camisa de 500 ml con agitación fijada a 354 rpm. Se añadieron un total de 126,58 g de acetonitrilo al reactor mediante una bomba a una velocidad de 1,4 ml por minuto durante dos horas. Los cristales se habían formado durante el periodo de adición. El sistema se agitó durante un total de 53 horas y después la suspensión se descargó y se filtró en un embudo de

20

25

8/1  
121

vidrio sinterizado de frita fina. La filtración fue extremadamente rápida. La torta se aclaró con 83 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 24 horas. Pesó 13,48 g.

#### 5 Ejemplo 8

Se añadieron 109 µl de agua desionizada a 7,5 g de solución primaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para llevar el contenido de agua de la solución primaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína al 1,63%. Esta solución se cargó en un matraz de fondo redondo de 25 ml agitado con una perla magnética. Se añadieron un total de 7,85 g de acetonitrilo al matraz en alícuotas de 0,5 ml cada tres minutos durante 54 minutos. El sistema se agitó durante un total de 72 horas y después se descargó la suspensión y se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 15 ml.

La filtración fue lenta. La torta se aclaró con 4 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 24 horas. Algunos sólidos habían cristalizado en las paredes del matraz de fondo redondo. Se aislaron separadamente. El balance de masas de todos los sólidos aislados indicó que los sólidos en la pared representaban un 65% del producto completo. Las microfotografías por SEM de los sólidos de la suspensión y las paredes confirmaron que estos experimentos produjeron una forma de "aglomerado empaquetado aleatoriamente" para el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

#### Ejemplo 9

El ejemplo 9 se realizó con S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-

cisteína liofilizada amorfa (que contenía aproximadamente 10% de agua) que no contenía HCl. El procedimiento implicó añadir 565 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa (que contenía aproximadamente 10% de agua), 599 mg de ácido maleico, 105 mg de HCl. 5 concentrado al 37% (acuoso) y 2.969 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 7,5 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 0,5 ml durante 25 minutos. Ocurrió una cristalización significativa durante la adición del acetonitrilo. El vial se agitó a temperatura ambiente 10 durante 24 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritina fina. La torta se lavó con 4 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas.

La Fig. 6 muestra una microfotografía del producto. Parece que los 15 sólidos son aglomerados empaquetados aleatoriamente compuestos por cristales primarios muy pequeños, quizás submicroscópicos. Todos los datos analíticos de los sólidos secados en estufa de este experimento confirmaron su identidad como clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino. La Fig. 1, como se describe con más detalle a continuación, 20 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (patrón superior) de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino obtenido a partir de este ejemplo. La Fig. 7 muestra fotos por SEM de los aglomerados empaquetados aleatoriamente del producto de este ejemplo.

123

### **Ejemplo 10**

En el ejemplo 10, se añadieron 301 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 317 mg de ácido maleico, 1.239 mg de DMF y 457 mg de agua DI a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 8 ml de acetonitrilo en alícuotas de 0,5 ml. El sistema se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas para cristalizarlo. La temperatura del vial se aumentó después hasta 55°C, y se mantuvo a esta temperatura durante 48 horas. La fotomicroscopía de las muestras en suspensión justo antes del calentamiento y después de 48 horas a temperaturas elevadas confirmó que había ocurrido la conversión de fases a clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino. La suspensión a 55°C se filtró rápidamente en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina de 30 ml y la torta se lavó con 1 ml de acetonitrilo. Los sólidos se secaron al aire durante 2 horas. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. El análisis de RMN de protón indicó que el producto puede haber atrapado DMF a 0,06 mol por mol de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína.

### **Ejemplo 11**

En el ejemplo 11, se añadieron 313 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 313 mg de ácido maleico, 1.247 mg de DMF y 453 mg de agua DI a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético.

128

La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 8 ml de acetonitrilo en alícuotas de 1,0 ml. La cristalización parecía haber ocurrido con la adición de 7,5 ml de acetonitrilo. La carga se completó sin embargo hasta 8 ml, y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 24 horas para desaturar. La temperatura del vial se aumentó después hasta 56°C, y se mantuvo a esta temperatura durante 24 horas. La fotomicroscopía de muestras en suspensión justo antes del calentamiento y después de 24 horas a temperatura elevada confirmó que había ocurrido la conversión de fases a clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína 10 cristalino. La suspensión a 56°C se filtró rápidamente en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas de 30 ml y la torta se lavó con 1 ml de acetonitrilo. Los sólidos se secaron al aire durante 2 horas. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El análisis por RMN de protón indicó que no había DMF atrapada en 15 el producto.

### **Ejemplo 12**

El ejemplo 12 se realizó para determinar si el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína podía nuclearse directamente 20 iniciando el proceso de cristalización a una temperatura elevada y si podía evitarse la filtración de la suspensión en caliente. Se añadieron 302 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 321 mg de ácido maleico, 1.223 mg de DMF y 453 mg de agua a un vial de 12 ml equipado con 25 un agitador magnético. La suspensión se calentó a 60°C y se agitó para dar

125

una solución transparente. Se añadieron lentamente 8 ml de acetonitrilo a la solución a 60°C en alícuotas de 1 ml. No se observó cristalización durante el proceso de adición, sin embargo, se formaron cristales a los 20 minutos de la terminación de la carga de acetonitrilo. La suspensión se agitó a 60°C durante 25 horas y se añadieron 2 ml de acetonitrilo para reducir la actividad de agua del sistema. La suspensión se agitó a 60°C durante otras 20 horas y después se enfrió naturalmente hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas antes de filtrar en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas. La torta se aclaró con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 20 minutos. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

### **Ejemplo 13**

El ejemplo 13 se realizó en DMF/acetonitrilo para simplificar el sistema disolvente. El procedimiento implicó añadir 202 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 213 mg de ácido maleico y 1.139 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se calentó a 60°C y se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 4 ml de acetonitrilo a la solución a 60°C en alícuotas de 1 ml durante 20 minutos. Se observaron cristales a los 20 minutos de la terminación de la carga de acetonitrilo. La suspensión se agitó durante 24 horas a 60°C y después se enfrió hasta 25°C en 45 minutos. Se agitó a 25°C durante 2 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas. La torta se lavó con 1 ml de acetonitrilo y se secó al

126.

aire durante 20 minutos. Los sólidos se secaron después en una estufa de vacío a 40°C a 94,8 kPa de vacío durante 24 horas. El análisis de RMN de protón de los sólidos antes de secar en estufa, sin embargo, indicó que no había DMF atrapada en los sólidos. El secado en estufa fue por tanto  
5 innecesario. Todos los datos analíticos de los sólidos secados al aire y secados a vacío de este experimento confirmaron que los sólidos eran clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino.

#### **Ejemplo 14**

10 En el ejemplo 14, se añadieron 311 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 321 mg de ácido maleico, 1.231 mg de DMF y 451 mg de agua DI a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron  
15 lentamente 8 ml de acetonitrilo en alícuotas de 0,5 ml y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas para desaturar. La temperatura del vial se aumentó después hasta 57°C y se continuó la agitación durante otras 24 horas. La suspensión a 57°C se filtró rápidamente en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 30 ml y la torta se lavó con 1 ml de acetonitrilo. Los sólidos se  
20 secaron al aire durante 30 minutos y después se dispusieron en una estufa de vacío a 40°C y 98,4 kPa de vacío durante 24 horas. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino. El análisis de RMN de protón indicó que ni los sólidos secados al aire ni secados a vacío habían atrapado  
25 DMF.

12A

### Ejemplo 15

El ejemplo 15 se realizó en DMF/acetonitrilo para simplificar el sistema disolvente. El procedimiento implicó añadir 608 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 648 mg de ácido maleico y 3.320 mg de DMF a un vial de 25 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 10 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 2 ml durante 20 minutos. Se observaron cristales a los 20 minutos de la terminación de la carga de acetonitrilo y se observó una extensa precipitación a las 4 horas. La suspensión se agitó durante 19 horas y después se extrajo una muestra sólida para comprobación interna. El análisis térmico de la muestra indicó que puede contener algo de forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La suspensión se calentó por lo tanto a 50°C para disolver selectivamente la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La muestra sólida extraída 30 minutos después de alcanzar los 50°C indicó que la forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se había eliminado completamente de los sólidos deseados. Se añadieron 4 ml de acetonitrilo a la suspensión a 50°C, dos horas después de alcanzar la temperatura elevada. La suspensión se mantuvo a 50°C durante otra hora y después se enfrió hasta 0°C en cinco horas y media utilizando un gradiente lineal de temperaturas. Se agitó a 0°C durante 40 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fríta fina. La filtración fue extremadamente lenta. La torta se lavó con 4 ml de acetonitrilo y se secó al aire

128

durante 1 hora. La torta secada al aire pesó 198 mg. Esto no refleja sin embargo el verdadero rendimiento del proceso, debido a que se extrajeron cinco muestras sólidas en proceso de hasta 30 mg cada una durante este experimento. El análisis de RMN de protón del producto secado al aire indicó que había 0,035 equivalentes molares de DMF en los sólidos. El análisis de la concentración en las aguas madre antes del enfriamiento hasta 0°C y después de 19 horas mantenidas a esta temperatura indicó que esta operación no ayudaba a desaturar más el sistema. Esto puede ser debido, sin embargo, a la completa eliminación del HCl incluso antes de enfriar el sistema. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

#### Ejemplo 16

El ejemplo 16 se realizó para optimizar los volúmenes de acetonitrilo, evaluar una reducción del 25% de la cantidad de ácido maleico (para mejorar el rendimiento) y reducir y racionalizar los tiempos de equilibrado. Se añadieron 304 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,25 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 240 mg de ácido maleico y 1.662 mg de DMF a un vial de centelleo de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 3 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 0,5 ml durante 20 minutos. Se observaron cristales a las 2 horas de la carga de acetonitrilo. El vial se agitó durante 22 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos

129

se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas. El análisis de RMN de protón de los sólidos secados en estufa indicó que había 0,03 equivalentes molares de DMF en los sólidos. El análisis de concentración del filtrado indicó que esta formulación tenía un rendimiento molar de aproximadamente un 50%. Esto puede suprimirse, sin embargo, debido a la completa eliminación del HCl. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino.

#### 10 Ejemplo 17

El objetivo del ejemplo 17 era estudiar la cristalización de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína a 0,63 equivalentes molares de HCl (exceso 0,13 molar). Se añadieron 220 mg de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 232 mg de ácido maleico, 31,98 mg de HCl concentrado al 37% (acuoso) y 1.164 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 3,0 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 0,5 ml durante 25 minutos. La turbidez desapareció completamente tras la terminación de la carga, sin embargo pudo observarse cierto residuo oleoso en las paredes del vial. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. La torta se había comprimido muy estrechamente y fue difícil extraerla del embudo. Los sólidos se dispusieron en una estufa de

730

vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas. Los análisis del filtrado indicaron un rendimiento molar de aproximadamente un 75%. Los datos analíticos del producto confirmaron que era clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

5

### **Ejemplo 18**

El experimento 18 se realizó a 0,63 equivalentes molares de HCl (exceso molar de 0,13) con un mol de butanol por cada mol de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Se estudió la adición controlada de butanol debido a que puede ser una impureza potencial en la alimentación de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Se añadieron 210 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 232 mg de ácido maleico, 72 mg de butanol, 36,0 mg de HCl concentrado al 37% (acuoso) y 1.186 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 3,0 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 0,5 ml durante 25 minutos. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas. El análisis del filtrado indicó un rendimiento molar de aproximadamente un 60%. Los datos analíticos del producto de este experimento confirmaron la formación de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino e indicaron que la presencia de butanol no conduce a ningún efecto adverso

10

15

20

25

sobre la calidad del cristal. Sin embargo, el rendimiento del proceso se reduce.

### Experimento 19

El experimento 19 se realizó a 0,88 equivalentes molares de HCl. (exceso molar de 0,33). Se añadieron 221 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,13 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua), 233 mg de ácido maleico, 54,0 mg de HCl concentrado al 37% (acuoso) y 1.196 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para dar una solución transparente. Se añadieron lentamente 3,0 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 0,5 ml durante 25 minutos. La turbidez desapareció completamente tras la terminación de la carga, sin embargo, pudo observarse cierto residuo oleoso en las paredes del vial. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. La torta se había comprimido muy estrechamente y fue difícil de extraer del embudo. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 55°C y 94,8 kPa durante 24 horas.

El análisis del filtrado indicó un rendimiento molar de aproximadamente un 58%, que es significativamente menor que el 75% observado en experimentos en los que la concentración de HCl era más cercana a la estequiométrica. Por lo tanto, parece que tanto el exceso como la deficiencia de HCl en el sistema tiende a reducir los rendimientos. Los datos analíticos del producto de este experimento confirmaron la formación de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

**Discusión de los ejemplos de aglomerado empaquetado aleatoriamente**

Aunque los ejemplos 10 a 19 demostraron que el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína podía cristalizarse en condiciones que representan una grave deficiencia o exceso de HCl con respecto a la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, todos estos ejemplos representan condiciones subóptimas para la cristalización del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Esta discusión se limitaría por lo tanto a los procedimientos más óptimos para la cristalización del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, que se captan mejor por los ejemplos 7 a 9.

Los ejemplos 7 y 8 difieren sólo en la naturaleza de la agitación proporcionada al sistema. El primero empleaba un motor suspendido conectado a un eje y una hoja "de media luna" que no toca ninguna superficie del matraz de cristalización, mientras que el segundo empleaba una perla magnética en contacto con la superficie del fondo del matraz de cristalización. La perla se agitó con una placa magnética. Esta variable se estudió en estos ejemplos para demostrar que la forma aglomerada empaquetada aleatoriamente del ejemplo 8 no se modificó por el uso de la perla magnética, que había mostrado la tendencia de convertir aglomerados empaquetados ordenadamente en aglomerados empaquetados aleatoriamente tras largos periodos de equilibrado (véase el ejemplo 26). Ambos ejemplos utilizaron 2,0 equivalentes molares de ácido maleico y 0,5 equivalentes molares de HCl por cada mol de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El contenido de agua del sistema se mantuvo al 1,63% (medido antes de la adición de

23

acetonitrilo), mientras que la relación de acetonitrilo a DMF fue de 1,4 en peso/peso. En el ejemplo 9, el contenido de agua del sistema fue del 2,3% antes de la adición de acetonitrilo, mientras que la relación de acetonitrilo a DMF fue de 1,98 en peso/peso. Tanto la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína son altamente solubles en agua, y por lo tanto el uso de agua extra en el ejemplo 9 permitió aumentar la relación de acetonitrilo a agua a 1,98 sin una cristalización aún más significativa durante la adición de acetonitrilo.

Estos tres experimentos se caracterizan por: a) una nucleación rápida y una cristalización significativa del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína durante la adición de acetonitrilo, dando como resultado una rápida desaturación del sistema; b) un crecimiento acelerado de la cara cristalina de crecimiento más rápido, dando como resultado relaciones de aspecto mayores; y c) ninguna indicación visual u otra de una separación de fases sostenida durante o tras la terminación de la carga de acetonitrilo. La definición, discusión y significado detallados de la separación de fases se pospondrá hasta la siguiente subsección sobre la discusión de la técnica de cristalización por QESD. Con el fin de esta discusión, resulta suficiente decir que la carencia de separación de fases contribuye también a la rápida cristalización observada en estos tres ejemplos.

En ausencia de la separación de fases, la rápida cristalización conduce a la formación de cristales de tipo aguja muy pequeños si la mayoría de la desaturación ocurre mediante nucleación a partir de una solución, o cristales de tipo aguja ligeramente alargados si ocurre más desaturación mediante un crecimiento cristalino rápido a lo largo de la dimensión larga del cristal. Cada

131

escenario puede conducir a aglomerados empaquetados aleatoriamente mediante la compactación de la torta durante la filtración o incluso en el matraz de cristalización si se proporciona una alta agitación (por ejemplo a rpm superiores a 350 en el ejemplo 7).

5

#### **Definición detallada de la separación de fases**

Con los fines de esta invención, la separación de fases se define como cualquier estado del sistema de cristalización que comprende más de una fase líquida y/o sólidos que no sean cristalinos. Estos sólidos no cristalinos podrían parecer una masa pegajosa visualmente observable habitualmente, pero no necesariamente, completamente amorfa, aunque la segunda fase líquida podría parecer una emulsión observable visual y/o microscópicamente, una emulsión no observable visual y/o microscópicamente (por ejemplo debido a un muestreo inapropiado), un "recubrimiento oleoso" observable visual y/o microscópicamente sobre las superficies, incluyendo los cristales en el matraz de cristalización y un "recubrimiento oleoso" no observable visual y/o microscópicamente (por ejemplo debido a la falta de grosor) sobre las superficies, incluyendo los cristales en el matraz de cristalización.

La separación de fases parece ser una manifestación de la naturaleza "de tipo agente emulsionante" de la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en el sistema de cristalización que comprende DMF, acetonitrilo, agua, ácido maleico y HCl. Ocurre cuando se alcanza una cierta concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína con un contenido de agua, potencia de ácido maleico y HCl específicos en una composición de DMF-acetonitrilo dada, antes o durante la precipitación del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-

13

iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. La extensión de la separación de fases es en gran medida función de todos estos parámetros intrínsecos del proceso, además de variables tales como la fuerza de agitación, las superficies disponibles y la velocidad de adición del acetonitrilo.

- 5 Por definición, cuando ocurre la separación de fases binaria, se forman dos fases con diferentes composiciones. Para el sistema *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína/ácido maleico/HCl/agua/DMF/acetonitrilo, cuando el proceso de separación de fases da como resultado una emulsión clásica visual o microscópicamente observable, la fase continua se convierte en
- 10 la fase rarificada con mayor porcentaje de acetonitrilo y menor concentración de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína que la solución monofásica original. A la inversa, la fase dispersada no continua se convierte en la fase densa con menor porcentaje de acetonitrilo y mayor concentración de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína que la fase rarificada continua o la
- 15 solución monofásica original. Cuando, en lugar de ello, el proceso de separación de fases da como resultado un "recubrimiento oleoso" visual o microscópicamente observable, el análisis completo de las dos fases se hace difícil. Sin embargo, el análisis de la fase continua muestra un mayor porcentaje de acetonitrilo y una menor concentración de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-
- 20 metil-*L*-cisteína que la solución monofásica original. De hecho, estas características de las fases podrían utilizarse como ensayo analítico para determinar el inicio de la formación del sistema estable de fases separadas, especialmente en condiciones en que la clásica emulsión o "recubrimiento oleoso" observable pueda ser difícil de detectar visual o microscópicamente.

## **Modelos teóricos de cristalización**

Aunque la teoría no desempeña ningún papel en la presente invención, los siguientes mecanismos se describen para familiarizar mejor a los expertos en la técnica con los procesos de la presente invención.

### **Cristalización basada en QESD**

Las mezclas binarias de disolventes utilizadas en la cristalización basada en QESD se caracterizan por interacciones desfavorables (desmezclado) entre el disolvente y el antidisolvente. Las combinaciones de disolventes típicas incluyen agua-acetona, agua-acetonitrilo, etanol-ciclohexano y agua-acetato de etilo.

El disolvente tiende a tener una muy alta solubilidad por el soluto, mientras que el antidisolvente se caracteriza a menudo por una solubilidad despreciable por el soluto. Se ha reseñado una solubilidad del soluto en el disolvente del orden de 1,92 g/g. Se seleccionan de hecho disolventes de alta solubilidad para maximizar la fuerza de las interacciones entre soluto y disolvente. Se disuelve habitualmente un agente emulsionante (un tensioactivo) en el antidisolvente para facilitar el proceso de emulsionamiento. Las relaciones de antidisolvente a disolvente pueden ser del orden de 50 a 1.

El proceso se inicia disolviendo el soluto en el disolvente y añadiendo esta solución a una solución de antidisolvente y agente emulsionante a velocidad controlada. A menudo, se mantiene también una diferencia de temperatura entre las soluciones de disolvente y antidisolvente, estando este último a menor temperatura. Tras la adición de la solución de disolvente, se

132

crea una emulsión estable en la que la solución de disolvente es la fase dispersada y la solución de antidisolvente es la fase continua. La sobresaturación se crea mediante transferencia de calor (diferencia de temperatura) y más importante mediante transferencia de masas.

5 (contradifusión de disolvente y antidisolvente fuera y dentro de las gotitas de la fase dispersada). La fase dispersada se desatura mediante cristalización en la fase dispersada. En el punto de recogida existe sólo una fase líquida formada mediante el proceso de transferencia de masas por contradifusión que se ha descrito.

10 En los procesos de cristalización por QESD, precipita sólo una fracción del soluto debido a la moderada sobresaturación creada por el diferencial de temperatura utilizado a menudo, pero no siempre, que se mantiene durante las fases tempranas del proceso entre las soluciones de disolvente y antidisolvente. En otras palabras, la sobresaturación inicial creada por el

15 diferencial de temperatura es sólo moderada (la sobresaturación inicial máxima reseñada en la bibliografía es de ~40%) e incluso cuando comienza la contradifusión de antidisolvente y disolvente, la velocidad de generación de sobresaturación es lenta debido a la lenta transferencia a través de los límites de la gotita. En consecuencia, dichos procesos actúan a sobresaturación

20 residual relativamente moderada durante la mayor parte de la duración, y por lo tanto se caracterizan por lentas velocidades globales de desaturación. Otro rasgo común de dichos procesos es que la concentración del soluto en la fase continua realmente aumenta, aunque sólo ligeramente, a medida que aumenta la solubilidad del soluto en la fase rica en antidisolvente mediante la difusión del

25 disolvente desde la fase dispersada.

### **Cristalización basada en LLPS Inducida altamente sobresaturada**

Existe una creciente evidencia de que las soluciones sobresaturadas, especialmente aquellas de proteínas, moléculas de tipo proteína y sistemas que producen soluciones coloidales pueden experimentar una separación adicional inducida por la sobresaturación en dos fases líquidas metaestables "no en equilibrio" de diferentes composiciones. El inicio de la separación de fases o desmezclado en una inspección superficial se parece al típico punto de enturbiamiento para un proceso de cristalización, sin embargo, técnicas tales como la microscopía indican fácilmente que la turbidez no es debida a la formación de sólidos cristalinos. El proceso de desmezclado crea inherentemente una fase aún más supersaturada coexistiendo con una fase menos supersaturada o incluso infrasaturada. La cristalización comienza inicialmente en la fase de mayor sobresaturación, que puede parecer en algunas condiciones una fase dispersada típica en una emulsión o cuasiemulsión del tipo descrito en la sección precedente. Se han reseñado también morfologías de tipo aglomerado similares a las mostradas en la FIG. 8 para procesos basados en LLPS Inducida por alta sobresaturación.

Son conocidos tanto sistemas binarios como de disolvente único que exhiben un comportamiento de tipo LLPS. En todos los casos, la solubilidad del soluto en el sistema disolvente de elección es moderada (las cifras no son mayores de 200 mg/g como máximo), que está en fuerte contraste con las soluciones de disolvente utilizadas en el diseño de tipo QESD.

Existe un cuerpo significativo de bibliografía sobre las propiedades en solución de los sistemas que exhiben LLPS en condiciones supersaturadas.

139

- Además de las transiciones típicas tales como la solidificación por debajo del liquidus, los diagramas de fase exhiben también una separación de fases líquido-líquido atípica, también designada como coacervación, en la que la solución metaestable forma dos fases líquidas distintas no en equilibrio con concentraciones desiguales de soluto. La curva de coexistencia en el diagrama representa la concentración de fases líquidas rica en soluto y pobre en soluto coexistentes a medida que se crea una solución progresivamente más supersaturada del soluto al continuar moviéndose verticalmente hacia abajo desde la línea de liquidus.
- 10 Las técnicas experimentales para establecer la curva de coexistencia incluyen dos procedimientos muy simples; los procedimientos de punto de enturbiamiento e inactivación por temperatura. Brevemente, con el primero se determina la temperatura de opacificación para cada concentración de soluto fijada, mientras que con el segundo la solución supersaturada se enfría a una
- 15 temperatura fijada por debajo de la temperatura de separación de fases, y después se analiza la concentración en las dos fases coexistentes. Para sistemas binarios (soluto y un único disolvente), la temperatura máxima en la curva de coexistencia se denomina la temperatura crítica de separación de fases y la correspondiente concentración se denomina concentración crítica.
- 20 La concentración crítica desempeña un papel clave en el establecimiento de la "morfología" de las dos fases. En sistemas de concentración menor que la concentración crítica, se observa la nucleación y crecimiento de gotitas esféricas de tamaño uniforme que contienen la fase rica en soluto. En sistemas de concentración mayor que la concentración crítica, se observan de nuevo a
- 25 menudo la nucleación y crecimiento de gotitas esféricas de tamaño uniforme.

140

Sin embargo, en este caso, las gotitas contienen la fase pobre en soluto. En los casos extremos, en lugar de separación de fases podría observarse también gelificación a medida que se reduce la temperatura por debajo de la línea de liquidus. Pueden observarse a menudo dominios cristalinos a medida que este sistema que contiene fase de gel (habitualmente sólidos amorfos) se enfría a temperaturas por debajo de la curva de coexistencia. En sistemas de concentración muy cercana a la concentración crítica, aparecen dos dominios interconectados.

Para un sistema ternario que comprende soluto, disolvente y antidisolvente, la superficie de coexistencia (véase la FIG. 10) representa la temperatura de LLPS en función del soluto  $c_1$  para una cantidad fija de antidisolvente a una concentración  $c_2$ . A la temperatura fijada, las propiedades de LLPS del sistema se describen mediante una curva de coexistencia isotérmica (véase la FIG. 11) que proporciona las concentraciones  $(c_1, c_2)^I$  y  $(c_1, c_2)^{II}$  en las dos fases I y II coexistentes generadas empezando con soluciones de diferente concentración de soluto para una cantidad fijada de antidisolvente. El reparto de las dos fases puede captarse mejor mediante las líneas de unión que conectan los puntos I y II en la curva de coexistencia trazada a temperatura constante (véase la FIG. 11). Para un sistema ternario, el punto crítico  $(c_1, c_2)^c$  se define como el punto en la gráfica de coexistencia en el que se satisface la condición  $(c_1, c_2)^I$  igual a  $(c_1, c_2)^{II}$ . La localización de este punto en función de la temperatura se describe como la línea crítica en la superficie de coexistencia. Como se muestra en la FIG. 10, el efecto neto de añadir una cantidad fija de antidisolvente o agente precipitante (tal como polietilenglicol) a una solución de soluto-disolvente es el desplazamiento hacia arriba de toda la

241

curva de coexistencia hacia el liquidus (que puede moverse a su vez hacia arriba pero no en la misma extensión que el movimiento hacia arriba de la curva de coexistencia), además de cierta distorsión en la simetría de la forma de la curva misma. Esto último tiene consecuencias para la composición de las

5 dos fases y sus fracciones relativas.

A medida que se introduce más agente precipitante o un agente precipitante más fuerte en la solución de soluto-disolvente, los desplazamientos se hacen más pronunciados y la curva más asimétrica. El efecto neto de estos desplazamientos es que la distancia entre el liquidus y la curva de coexistencia  
10 se reduce a medida que aumenta la temperatura de LLPS y, en consecuencia, la LLPS ocurre a supersaturaciones aún menores. El movimiento del punto crítico a menores concentraciones de soluto debido a la asimetría tiene implicaciones para la morfología de las fases líquidas separadas en fases.

La pendiente de la temperatura de LLPS en función de la concentración  
15 de antidisolvente en el punto crítico, la temperatura crítica y la concentración de antidisolvente pueden utilizarse realmente para calcular la temperatura de LLPS en ausencia de antidisolvente mediante el modelo matemático desarrollado en la referencia 15. Esto es extremadamente atractivo cuando la LLPS de un sistema soluto-disolvente no es accesible debido a la congelación  
20 del sistema o la cristalización del soluto antes de alcanzar la temperatura de LLPS o sobresaturación. Además, la pendiente de las líneas de unión en la FIG. 11 es proporcional a la reducción fraccionada de la solubilidad del soluto debido a la presencia de una concentración dada de antidisolvente o agente precipitante. En otras palabras, la pendiente de las líneas de unión caracteriza  
25 la eficacia de un agente precipitante de soluto tal como el antidisolvente. En

112

consecuencia, esta información puede utilizarse para predecir las líneas de liquidus en presencia de antidisolvente.

El efecto de un segundo soluto (tal como impurezas estructuralmente relacionadas) similar al soluto primario está habitualmente limitado al desplazamiento vertical (habitualmente hacia abajo, concretamente la reducción de la temperatura de LLPS) de la curva de coexistencia a lo largo del eje de temperatura para el sistema binario<sup>18</sup>. Durante estos desplazamientos, la curva retiene su forma, al contrario de la situación encontrada en presencia de un agente precipitante o un antidisolvente. Sin embargo, si el segundo soluto o la impureza no es similar al soluto primario, entonces además del desplazamiento vertical (de nuevo habitualmente hacia abajo) a lo largo del eje de temperatura, la forma de la curva de coexistencia se distorsiona también. Las curvas se vuelven cada vez más asimétricas, desplazándose los puntos críticos a mayores concentraciones de soluto primario, mientras que al mismo tiempo la temperatura de LLPS máxima se desplaza a concentraciones menores de soluto primario. Parece que el efecto neto de un segundo soluto es que se necesita más sobresaturación para observar la LLPS en sistemas ternarios que contienen una segunda fase de soluto tal como una impureza.

En el contexto del diseño basado en LLPS, la desemejanza entre las especies de soluto se capta mejor identificando las diferencias en el punto crítico para cada especie en un sistema binario que comprende ese soluto y un disolvente común a todas las especies en investigación. La asimetría causada en la curva de coexistencia por la presencia de segundos solutos desemejantes tales como impurezas tiene de nuevo consecuencias para la fracción relativa y la morfología de las dos fases líquidas obtenidas tras LLPS.

W3

La ciclación mediante la superficie de LLPS puede reducir significativamente los tiempos de inducción de la nucleación bastante por encima de las temperaturas de LLPS ( $>2,0^{\circ}\text{C}$ ). Se han reseñado aumentos de la velocidad de nucleación de más de 6 veces a temperaturas mayores que la temperatura de LLPS por  $1-1,5^{\circ}\text{C}$ . Se han postulado dos razones para el aumento significativo de la velocidad de nucleación. En primer lugar, la reducción de la  $\Delta G_{\text{nuc}}$  debido a que el sistema se aproxima al espinodal justo por encima del binodal a la temperatura de LLPS. En la región espinodal, las fluctuaciones de densidad son mayores que en cualquier otro punto en las cercanías, y esto a su vez conduce a la reducción de la  $\Delta G_{\text{nuc}}$ . Además, el número de moléculas necesario para preparar un conglomerado de prenucleación estable cae significativamente debido a la reducción de la  $\Delta G_{\text{nuc}}$ . En segundo lugar, al aproximarse a la temperatura de LLPS, el fenómeno similar al humedecimiento de las superficies de los núcleos cristalinos por líquido de alta concentración de soluto puede potenciar también la velocidad de nucleación. La velocidad de nucleación se reduce de nuevo a la predicha por las expresiones de velocidad de nucleación clásicas a medida que el sistema entra en el régimen de LLPS. Las velocidades pueden estimarse con cierta exactitud a partir de las respectivas supersaturaciones en las fases rica en soluto y pobre en soluto utilizando modelos de nucleación clásicos apropiados.

La morfología del cristal obtenido mediante cristalización bajo la superficie de LLPS parece estar relacionada con la concentración de soluto monofásico inicial con respecto al punto crítico. Ésta está a su vez relacionada con la "morfología" real de las fases líquidas rica en soluto y pobre en soluto a cada lado del punto crítico. Como se describe anteriormente, en sistemas de

12/11

- concentración menor que la concentración crítica, se observa la nucleación y el crecimiento de gotitas esféricas de tamaño uniforme que contienen la fase rica en soluto. La cristalización comienza en la gotita rica en soluto altamente supersaturada mediante múltiples nucleaciones en el núcleo de la gotita, transformándola así en una fase sólida policristalina. Se forman nuevos cristales que crecen radialmente hacia fuera a partir del núcleo policristalino y consumen no sólo el soluto restante en la gotita sino también el soluto en la fase pobre en soluto, que no puede precipitar habitualmente por sí solo debido a la baja sobresaturación en la fase continua pobre en soluto.
- En sistemas de concentración mayor que la concentración crítica, se observan de nuevo a menudo la nucleación y el crecimiento de gotitas esféricas de tamaño uniforme. Sin embargo, en este caso, las gotitas contienen la fase pobre en soluto. Se obtienen sólidos policristalinos Irregulares con partículas primarias muy pequeñas para estos sistemas. Sin embargo, si la concentración es significativamente mayor que la concentración crítica, podría observarse gelificación (debida a la formación de sólidos amorfos) incluso antes de acercarse a la temperatura de LLPS. Cuando dicho sistema se lleva por debajo de la curva de LLPS, se forman cristales en la matriz de gel. La velocidad de transformación de un sistema que contiene una fase de gel en un material totalmente cristalino es, sin embargo, significativamente más lenta que el correspondiente sistema que contiene en cambio gotitas líquidas de alta concentración. La razón de la lenta transformación en la fase de gel está relacionada con el hecho de que la movilidad se reduce debido a la formación del gel, lo que a su vez retarda la velocidad de nucleación del cristal.
- En resumen, los procesos de cristalización basados en LLPS que actúan

125

por debajo de la curva de coexistencia y a la izquierda del punto crítico pueden producir morfologías similares a las observadas para clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino (véase la FIG. 8). En dichos procesos, la sobresaturación en la fase dispersada rica en soluto es habitualmente muy alta. También el análisis de la concentración de soluto en la fase continua pobre en soluto muestra una reducción continua a medida que el sistema global cristaliza. En conclusión, las observaciones y datos básicos, todos los datos de caracterización del proceso de cristalización y la morfología cristalina observada son congruentes con los rasgos generales de un proceso de cristalización basado en LLPS que actúa justo por debajo de la curva de coexistencia y a la izquierda del punto crítico. Se propone por tanto este diseño conceptual como modelo para describir la cristalización de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína en forma de aglomerados esféricos empaquetados ordenadamente.

Los tres diseños para el proceso de cristalización de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína para producir aglomerados empaquetados ordenadamente toman los procedimientos reseñados en los ejemplos 7 a 9 con los aglomerados empaquetados aleatoriamente como puntos de partida. Las modificaciones más importantes incluyen cambios en el nivel de ácido maleico, el contenido de agua y la relación de acetonitrilo a DMF. La relación de acetonitrilo a DMF en peso/peso se relaja desde 1,4 ó 1,8 a la que sea necesaria para conseguir la separación de fases antes de o durante las etapas tempranas de la precipitación de los cristales de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. Los equivalentes molares de ácido maleico con respecto a la *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína

146

aumentan al menos a 2,2 desde 2,0, y el contenido de agua del sistema antes de la adición de acetonitrilo es de al menos un 2,83% en peso. El aumento de los niveles de ácido maleico y agua potencia la solubilidad de la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en la solución de disolvente y por lo tanto ayuda a asegurar que la concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína a un contenido de agua específico, la potencia de ácido maleico y HCl en una solución de composición DMF-acetonitrilo dada no cae por debajo de un nivel específico necesario para que la separación de fases se manifieste como una emulsión observable visual o microscópicamente o un "recubrimiento oleoso" observable o incluso no observable visual o microscópicamente de superficies, incluyendo las ofrecidas por el pequeño número de cristales que podría formarse durante la adición del antidisolvente. Los tres diseños implican la adición de la solución de antidisolvente a la solución de disolvente y se realizan a niveles relativamente moderados de agitación.

En el proceso de cristalización sembrada externamente para dar el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, se añade solución de antidisolvente (acetonitrilo) a la solución de disolvente (descrita preferiblemente por la solución secundaria en DMF de solución de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como se define anteriormente) de manera controlada, de tal modo que el tiempo de adición total es preferiblemente de más de aproximadamente 30 minutos, y más preferiblemente aún, de aproximadamente 90 minutos. La adición de la solución de antidisolvente puede ser continua, por ejemplo utilizando una bomba a una velocidad de adición específica, o preferiblemente intermitente cuando se añade una pequeña alícuota del volumen de solución total de

antidisolvente a intervalos de tiempo dados. Estos intervalos son óptimos cuando la duración entre las sucesivas adiciones de alícuotas es suficientemente larga para asegurar que la mayoría de la turbidez (manifestación de una separación de fases inestable) que se forma inmediatamente tras la adición de una alícuota ha tenido el tiempo adecuado para desaparecer. La solución de antidisolvente se añade hasta que la turbidez que resulta de la adición de cada alícuota no desaparece totalmente o desaparece pero deja detrás un recubrimiento oleoso muy fino visible sólo sobre superficies tales como el eje de agitación, la hoja de agitación, las paredes del reactor o los deflectores en el matraz de cristalización. En este punto se añade una cantidad muy pequeña de cristales simiente al sistema. Los cristales simiente son preferiblemente cristales muy pequeños de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, tales como los preparados en los ejemplos 7 a 9. No es necesario habitualmente más de un 1% de estos cristales simiente en peso de la masa original de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína disuelta en la solución de disolvente con el fin de un proceso de cristalización con sembrado externo exitoso. Los cristales simiente actúan como sustrato para la fase no continua que se manifiesta como una emulsión o recubrimiento oleoso. El proceso es a menudo muy lento y lleva más de 48 horas antes de que el sistema esté completamente desaturado. Sin embargo, el proceso puede acelerarse, por ejemplo aumentando la cantidad de sembrado. Los aglomerados empaquetados ordenadamente obtenidos a partir de este tipo de proceso de cristalización con sembrado externo son a menudo de forma esférica y son muy similares de tamaño.

148

Los cristales simiente pueden crearse también *in situ* durante la adición de solución de antidisolvente. Estos cristales pueden actuar entonces como sustrato para la fase no continua que se manifiesta como una emulsión o recubrimiento oleoso tras la separación de fases. La nucleación de los cristales simiente puede promoverse en la mezcla de disolvente y antidisolvente antes de la separación de fases, por ejemplo reduciendo ligeramente el contenido de agua de la solución de disolvente o reduciendo ligeramente la cantidad de ácido maleico, o preferiblemente alterando la velocidad de generación de la sobresaturación manteniendo lo demás igual que para el proceso de cristalización con sembrado externo. Esto último podría conseguirse por ejemplo alterando la velocidad de adición de la solución de antidisolvente. Podrían utilizarse también modificaciones del historial térmico de las soluciones de disolvente y antidisolvente, como alterar la cinética de cristalización, sin cambiar la composición global del sistema. La ventaja principal de la cristalización por sembrado *in situ* parte del hecho de que los cristales simiente no necesitan añadirse externamente y su adición no necesita ligarse tan estrechamente a una separación de fases observable, como es el caso en el proceso de cristalización por sembrado externo. La complejidad añadida surge del hecho de que la desaturación del sistema causada mediante la formación de los cristales simiente debe controlarse a niveles suficientemente bajos para asegurar que la concentración residual de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en una mezcla de soluciones de disolvente y antidisolvente de una composición dada no cae por debajo del nivel necesario para una separación de fases manifestada como una emulsión observable visual o microscópicamente o un "recubrimiento oleoso" observable o incluso

inobservable visual o microscópicamente de superficies. Además, para un diseño óptimo de la cristalización por sembrado *in situ*, sería preferible si los cristales simiente *in situ* fueran de pequeño tamaño o tuvieran bajas relaciones de aspecto. Esto ayuda a asegurar que la forma final del aglomerado.

5 empaquetado ordenadamente, que se parece en cierto grado a la forma de los cristales simiente sustrato, es similar a la obtenida en el proceso de cristalización por sembrado externo en el que se utilizan cristales pequeños como simiente. A un nivel más práctico, esta preferencia por un tamaño pequeño o una baja relación de aspecto de las simientes *in situ* necesita que la

10 baja extensión de la desaturación citada anteriormente se consiga mediante un proceso de nucleación de cristal primario en contraposición al crecimiento de cristales de menos núcleos a tamaños mayores. Esto último puede conducir a la formación de cristales simiente de tipo aguja grande, que tras el recubrimiento con la fase no continua y la posterior cristalización controlada por

15 contradifusión para formar aglomerados empaquetados ordenadamente, podría conducir a formas globales que son más alargadas en contraposición con la esférica. Dirigir bajos niveles de desaturación principalmente mediante la nucleación de un gran número de cristales pequeños es sin embargo difícil para la cristalización de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-

20 metil-L-cisteína. En consecuencia, es probable que se obtuvieran formas globales diferentes de esferas a partir de un proceso de cristalización por sembrado *in situ* para el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Dependiendo de la extensión de la desaturación y de la superficie de sustrato resultante, los tiempos de cristalización globales para el

25 proceso de cristalización por sembrado *in situ* pueden ser significativamente

más cortos que el proceso de cristalización por QESD por sembrado externo.

Puesto que tanto los procesos de cristalización por sembrado *in situ* como externo proporcionan cristales amplios como superficies para recubrimiento con la fase no continua, la posibilidad de cristalizar el clorhidrato maleato de S-[2-  
5 [(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en forma de escamas sobre las paredes y otras superficies del matraz de cristalización mediante la solidificación de la fase no continua adhiriéndose a ellas se reduce significativamente mediante la reducción de la fracción de fase no continua disponible para recubrir estas superficies no cristalinas.

10 El enfoque de diseño final para la cristalización de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en forma de aglomerados empaquetados ordenadamente es eliminar el sustrato cristalino (simiente) antes, durante o después de la separación de fases. Además de asegurar que no tiene lugar cristalización durante el mezclado de las soluciones de  
15 disolvente y antidisolvente, se genera una emulsión observable microscópicamente o, preferiblemente, visualmente. Esto debe suceder incluso si se observa un recubrimiento oleoso antes de conseguir el estado emulsionado. El enfoque más simple para obtener una emulsión visualmente observable para el sistema de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-  
20 iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína es aumentar adicionalmente la relación de acetonitrilo a DMF. Los niveles de acetonitrilo superiores a 110% (en peso) de la cantidad de acetonitrilo utilizada en los procesos de cristalización por sembrado externo o *in situ* descritos anteriormente han demostrado ser adecuados para obtener una emulsión visualmente observable. Dicho estado,  
25 sin embargo, está acompañado a menudo por un recubrimiento oleoso sobre

las paredes del matraz de cristalización y otras superficies externas tales como el eje agitador, hojas y deflectores (si están presentes). Aunque pueden obtenerse aglomerados empaquetados ordenadamente de forma global esférica a partir de la suspensión de dicho proceso de cristalización después de al menos 48 horas, el recubrimiento oleoso sobre las paredes del matraz de cristalización cristaliza habitualmente en forma de escamas sobre las paredes que parecen aglomerados empaquetados aleatoriamente. Si la suspensión no se extrae cuidadosamente del matraz de cristalización, podrían observarse tanto aglomerados empaquetados aleatoriamente como empaquetados ordenadamente en el producto. La extensión de la escamación parece estar relacionada, entre otras variables, con la cantidad de acetonitrilo extra utilizada para generar una emulsión visualmente observable.

En resumen, los tres enfoques de diseño de cristalización son capaces de producir aglomerados empaquetados ordenadamente. Las diferencias se basan en la calidad de los aglomerados y también en la facilidad de operabilidad y controlabilidad. Basándose en estos tres factores, es preferible el enfoque de cristalización por sembrado externo. A continuación se dan ejemplos que demuestran los tres enfoques.

## 20 Ejemplos de aglomerados empaquetados ordenadamente

Los ejemplos 20, 21 y 22 representan el sistema de cristalización por sembrado externo descrito en la sección precedente, mientras que los ejemplos 23 y 24 representan el sistema de cristalización por sembrado *in situ* y el ejemplo 25 demuestra un proceso de cristalización sin sembrado. El ejemplo 26 demuestra que podrían destruirse aglomerados empaquetados

152.

ordenadamente en ciertas condiciones de agitación. Los sólidos después de dicha operación tienen muchos rasgos característicos de los aglomerados empaquetados aleatoriamente.

## 5 Ejemplo 20

En el ejemplo 20, se añadieron 54 g de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa (que contiene aproximadamente 10% de agua), 57,5 g de ácido maleico, 287 g de DMF y 10,1 g de HCl concentrado al 37% (acuoso) a un reactor con camisa de 1,2 l. La *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína se volvió una masa pegajosa densa tras agitación a 350 rpm y llevó 1 hora disolverla, a pesar de la buena solubilidad en el sistema de disolvente. Se añadieron 750 ml de acetonitrilo a la solución transparente en alícuotas de 20 ml durante 45 minutos. Con la adición de 710 ml, la solución se volvió turbia y permaneció así; la carga de acetonitrilo se completó de todos modos. Una hora después de la terminación de la carga, la mayoría de la turbidez había desaparecido, sin embargo se había formado un residuo oleoso sobre las paredes del reactor. Se añadió 1 g de HCl concentrado al 37% (acuoso) al reactor para ayudar a disolver el aceite. Esta adición no tuvo éxito en la reducción de la extensión del aceite y por lo tanto se añadieron 27,2 g de DMF al reactor para aumentar la solubilidad del sistema. Casi todo el residuo oleoso de las paredes se redisolvió a los 15 minutos de la segunda adición de DMF. La solución se agitó durante una noche a 350 rpm. Durante el periodo de equilibrado no cristalizó, y por lo tanto se utilizaron 400 mg de cristales simiente (es decir, clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino) para inducir la nucleación. El sistema se agitó durante otras 48 horas

y después la suspensión se descargó en alícuotas de 300 ml en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina de 350 ml.

La filtración fue extremadamente rápida. La torta se aclaró con 100 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora. Pesó 46,64 g. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 50°C y 94,8 kPa de vacío durante 24 horas. Los sólidos secados en estufa pesaron 42,96 g.

Esto representaba una recuperación de aproximadamente un 89% en peso y un 65% en moles. El análisis de la concentración del ión dipolar y el HCl en el filtrado ayudó a completar el balance de masas y verificar que el HCl era estequiométrico durante la cristalización. La Fig. 8 muestra diversas fotos de SEM del producto. Resulta bastante evidente a partir de la Fig. 8 que este experimento produjo una población casi monodispersada de aglomerados empaquetados ordenadamente de forma esférica. La Fig. 1 muestra la comparación por PXRD de los sólidos preparados en este ejemplo y los aglomerados empaquetados aleatoriamente reseñados anteriormente. El patrón de difracción de rayos X en polvo superior es del ejemplo 9, mientras que el patrón de difracción de rayos X en polvo inferior es del ejemplo 20. Parece que las diferencias de forma entre los dos sólidos no tienen ninguna influencia sobre la forma o la intensidad del pico. La Tabla 1 resume los datos analíticos del producto de este ejemplo. La Fig. 5 muestra el espectro Raman del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino obtenido de una muestra del ejemplo 20.

### **Ejemplo 21**

El objetivo del ejemplo 21 era racionalizar los protocolos de adición de

154

DMF y HCl e identificar las mejores condiciones de mezclado para disolver *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína durante las etapas tempranas del proceso.

Se añadieron 45,78 g de ácido maleico, 251 g de DMF y 8,82 g de HCl. 5 concentrado al 37% (acuoso) a un reactor con camisa de 1,2 l. El sistema se agitó a 275 rpm para dar una solución transparente. Se añadieron después 43,3 g de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína liofilizada amorfa (que contenía aproximadamente 10% de agua) al reactor y se agitó a 50 rpm durante 2 horas para disolver completamente todos los sólidos. La agitación se 10 aumentó de nuevo a 275 rpm y se añadieron 612 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 15 ml durante 90 minutos. La solución permaneció casi transparente tras la terminación de la carga de acetonitrilo. Se añadieron 429 mg de cristales simiente (es decir, clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino) a la solución y se agitó durante 15 45 horas. La suspensión se descargó en alícuotas de 200 ml en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas de 350 ml.

La filtración fue extremadamente rápida. La torta se aclaró con 60 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 1,5 horas. Pesó 36,50 g. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 50°C y 94,8 kPa de vacío durante 24 20 horas. Los sólidos secados en estufa pesaron 36,42 g. Esto representa aproximadamente un 49% de recuperación en peso y un 70% en moles. El análisis de la concentración para el ión dipolar y el HCl del filtrado ayudó a completar el balance de masas y verificar que el HCl era estequiométrico durante la cristalización. El tamaño global de los cristales fue el mismo que el 25 observado en el ejemplo 20. La tabla 1 resume los datos analíticos en el

BS

producto de este ejemplo.

## Ejemplo 22

El objetivo del ejemplo 22 era establecer el límite superior de los equivalentes de HCl que el sistema podría tolerar sin perder el control sobre la formación de aglomerados empaquetados ordenadamente. El contenido de HCl total del sistema fue aproximadamente de 0,73 equivalentes molares en contraposición con los 0,5 equivalentes molares típicos.

Se añadieron 55,97 g de ácido maleico, 307 g de DMF y 10,78 g de HCl concentrado al 37% (acuoso) a un reactor con camisa de 1,2 l. El sistema se agitó a 275 rpm para dar una solución transparente. La agitación se redujo a 50 rpm y después se añadieron 52,5 g de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa que contenía 0,23 eq. de HCl (que contenía aproximadamente 10% de agua) al reactor. Toda la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se disolvió en 20 minutos, y la velocidad del agitador se aumentó de nuevo a 275 rpm. De los 750 ml de acetonitrilo a añadir, 695 ml se añadieron en alícuotas de 20 ml durante 90 minutos antes de que la solución se volviera turbia hasta el punto en que la turbidez no desaparecía fácilmente. Tras agitación durante 1 hora, la turbidez se redujo, pero se formó un residuo oleoso marrón en el fondo del reactor. Se añadieron 10,2 g de DMF al reactor para disolver el residuo oleoso y después el sistema se sembró con 533 mg de cristales simiente (es decir, clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino). Se agitó durante 24 horas. Durante este tiempo, había tenido lugar una precipitación significativa. Los restantes 55 ml de acetonitrilo de la carga original más 30 ml para

156

compensar la DMF extra se añadieron al reactor, y se agitó durante otras 20 horas. Se encontró que la concentración de las aguas madre en esta etapa del proceso era un 45% mayor que el valor típico para cristalización a gran escala a 0,5 equivalentes de HCl. Se añadieron 70 ml de acetonitrilo a la suspensión y se agitó durante otras 4 horas. La suspensión se descargó después en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina de 350 ml en alcuotas de 200 ml. La filtración fue extremadamente rápida. La torta se aclaró con 80 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 1,5 horas. Pesó 38,10 g. Los sólidos se dispusieron en una estufa de vacío a 50°C y 94,8 kPa de vacío durante 24 horas. Los sólidos secados en estufa pesaron 36,75 g. Esto representaba aproximadamente un 78% de recuperación en peso y 56% en moles. El análisis de concentración en las muestras de las aguas madre antes de la tercera carga de acetonitrilo y 4 horas después de ella indicó una reducción neta de un 15% en la concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en solución. El análisis del ión cloruro en el filtrado ayudó a verificar que el equivalente de HCl al inicio era de 0,73, con 0,23 equivalentes acompañantes de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

La forma global de los cristales parecía similar a la observada en los experimentos precedentes, sin embargo, la densidad aparente del polvo parecía ligeramente menor. La Tabla 1 resume los datos analíticos en el producto de este ejemplo.

157

**Tabla 1: Datos de caracterización en estado sólido para los ejemplos 20-22**

| Ejemplo | C     | H    | N     | S     | Cl   | Tm     | $\Delta H$ fus | RMN<br>DMF | RMN<br>ácido<br>maleico |
|---------|-------|------|-------|-------|------|--------|----------------|------------|-------------------------|
| Teórico | 40,64 | 6,65 | 14,22 | 10,85 | 6,00 | N/A    | N/A            | 0,000      | 0,500                   |
| 20      | 40,29 | 6,53 | 14,03 | 10,79 | 6,06 | 193,91 | 140,18         | 0,019      | 0,525                   |
| 21      | 40,41 | 6,77 | 14,31 | 10,86 | 6,11 | 199,17 | N/A            | 0,027      | 0,490                   |
| 22      | 40,42 | 6,87 | 14,26 | 10,77 | 6,19 | 199,50 | 130,48         | N/A        | N/A                     |

**5 Ejemplo 23**

El objetivo principal del ejemplo 23 era entender y establecer las condiciones de cristalización primarias apropiadas para la formación de simiente *in situ* utilizada como sustrato para los aglomerados empaquetados ordenadamente y reducir el tiempo total de cristalización. Se aumentó el acetónitrilo un 10% en las cantidades utilizadas en los ejemplos 19 y 20, y no se realizó ningún sembrado tras la terminación de la carga de acetónitrilo.

Se añadieron 15,00 g de la solución primaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, 233,3 mg de ácido maleico y 413 µl de agua desionizada a un Erlenmeyer de 50 ml, y se agitó para dar una solución transparente antes de añadirla a un reactor con camisa de 50 ml. El reactor se agitó a 153 rpm. Se añadieron 18,2 ml de acetónitrilo (de un total de 27,7 ml) a la solución en alícuotas de 1,3 ml durante 39 minutos. Con la adición de esta cantidad de acetónitrilo, se observaron en el reactor cristales de tipo aguja

158.

(tamaño y cristalinidad verificados mediante microscopía de luz polarizada). Los 9,5 ml restantes de acetonitrilo se añadieron en alícuotas de 1,5 ml durante 3 minutos. 60 minutos después de la adición de 27,7 ml de acetonitrilo, se añadieron otros 2,77 ml de acetonitrilo (representando esto el 10% extra de las cantidades utilizadas en los ejemplos 19 y 20). La agitación se aumentó a 254 rpm durante 2 horas y después se redujo de nuevo a 150 rpm. El sistema se agitó durante un total de 24 horas y después la suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina de 30 ml.

La filtración fue rápida. La torta se aclaró dos veces con 6 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 1,5 horas. Los sólidos pesaron 1,05 g. Los cristales tenían la mayoría de los rasgos principales de los aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se analizaron mediante microscopía de barrido electrónico, pero la forma global parecía cilíndrica (Fig. 9) en contraposición con la forma esférica observada en los ejemplos 20, 21 y 22. Esta diferencia se atribuyó a la forma de los cristales siempre que actúan como cristales sustrato, que para este ejemplo eran de tipo aguja.

#### **Ejemplo 24**

El objetivo principal del ejemplo 24 era realizar el ejemplo 23 a gran escala en un reactor de 50 l.

Se añadieron 9,5 kg de la solución secundaria en DMF de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína a un reactor con camisa de 50 l. El reactor se agitó a 125 rpm, se añadieron 11,04 l de acetonitrilo (de un total de 18,45 l) a la solución en alícuotas de 840 ml durante 36 minutos. Durante la adición de esta cantidad de acetonitrilo, se observaron cristales de tipo aguja

154

(forma y cristalinidad verificadas mediante microscopía de luz polarizada) en el reactor. Se añadieron 4,97 l de acetonitrilo en alícuotas de 1,65 l durante 9 minutos y los 2,42 l restantes se añadieron después de 48 minutos desde el inicio de la carga original de acetonitrilo. El sistema se agitó durante un total de 6 horas y después la suspensión se descargó en el filtro.

La filtración fue rápida y llevó sólo 8 minutos. La torta se aclaró dos veces con 2,0 kg de acetonitrilo y se secó al aire durante 24 horas. Los sólidos pesaron 1,08 kg. Los cristales tenían la mayoría de los rasgos principales de los aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se analizaron mediante microscopía de barrido electrónico, pero la forma global parecía similar a la obtenida en el ejemplo 23 y diferente de la forma esférica observada en los ejemplos 20, 21 y 22. Esta diferencia se atribuyó a la forma de los cristales sustrato, que para este ejemplo eran de tipo aguja.

#### 15 Ejemplo 25

El objetivo principal del ejemplo 25 era aumentar la cantidad de acetonitrilo en un 20% de las cantidades utilizadas en los ejemplos 20 y 21 y estudiar la posibilidad de eliminar el sembrado tanto externo como *in situ* con clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína antes, durante o justo después de la separación de fases. Se añadieron 25,01 g de la solución primaria en DMF de solución de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y 687 mg de agua desionizada a un reactor con camisa de 125 ml. Se añadieron 346 mg de ácido maleico al reactor y el sistema se agitó a 173 rpm para dar una solución transparente. Se añadieron 56 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 3 ml durante 60 minutos. La solución se volvió muy

turbia con la adición de la última alícuota de acetonitrilo, sin embargo, la mayoría de la turbidez desapareció a los 15 minutos, dejando detrás un fino recubrimiento oleoso sobre las paredes del reactor. El reactor se calentó a 55°C (temperatura de la camisa) para determinar si el recubrimiento oleoso podía disolverse. La operación no tuvo éxito y el reactor se enfrió de nuevo a temperatura ambiente. El sistema se agitó durante 48 horas y después la suspensión se descargó en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas de 150 ml.

La filtración fue rápida. La torta se aclaró con 10 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 1,5 horas. Los sólidos pesaron 1,57 g y tenían todos los rasgos principales de los aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se analizaron mediante microscopía de barrido electrónico.

Se observaron algunos sólidos depositados sobre las paredes del reactor. Se retiró esta escama mediante suspensión en 25 ml de acetonitrilo y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas de 150 ml. Los sólidos se secaron al aire durante 1 hora y pesaron 1,01 g. Estos sólidos tenían rasgos de forma similares a los de los aglomerados empaquetados aleatoriamente.

## 20 Ejemplo 26

El objetivo del ejemplo 26 era determinar si los aglomerados empaquetados ordenadamente podían convertirse en cristales pequeños que se compactarían después en forma de aglomerados empaquetados aleatoriamente.

25 Se añadieron 200 mg de aglomerados empaquetados ordenadamente

161

de cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína preparados en el ejemplo 20 a un vial de 8 ml. Se añadieron 3,95 g del filtrado del ejemplo 23 y una perla magnética al vial y la suspensión resultante se agitó mediante una placa magnética a velocidad máxima durante 4 días. Se  
5 extrajeron muestras de suspensión cada día para comprobar por fotomicroscopía si los aglomerados empaquetados ordenadamente se estaban moliendo en el muy estrecho espacio entre la perla magnética y el fondo del vial.

El análisis por fotomicroscopía indicó que eran necesarias al menos 72  
10 horas (o 3 días) para moler completamente los cristales empaquetados ordenadamente. Estos cristales molidos se compactaron en aglomerados empaquetados aleatoriamente tras la filtración.

## SISTEMAS DISOLVENTES ALTERNATIVOS

15

### EJEMPLO 27: Cristallización con metanol/acetona

El metanol es uno de los pocos disolventes orgánicos en los que los cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína exhiben una moderada solubilidad (6,2% en peso). Además, la  
20 presencia de ácido maleico en exceso aumenta drásticamente la solubilidad. Se encontró que los cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se disolvían fácilmente a tan sólo 4 g de metanol por gramo de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en presencia de 1,5 eq. de ácido maleico en exceso. Haciendo  
25 sólo ajustes menores al proceso de DMF/acetonitrilo demostrado, se desarrolló

162

el proceso de cristalización en metanol/acetona descrito a continuación y se demostró a escala de 1 l.

Se cargó ácido maleico (23,57 g – 1,5 eq.) en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadió metanol (160 g – 4 g por gramo) y el matraz se agitó para formar una solución transparente. Se cargó después clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (40,00 g) en el matraz de fondo redondo y se disolvió, formando una solución transparente. Esta solución se cargó en un reactor de 1 l con camisa que funcionaba a temperatura ambiente. La agitación se fijó a 225 rpm.

Se pesó acetona (544 g – 17 ml por gramo) y se calibró una bomba peristáltica para suministrar aproximadamente 9 ml por minuto. A los 15 minutos del comienzo de la adición de acetona, la solución se volvió ligeramente turbia pero se clarificó tras aumentar la agitación. Después de 1 hora 20 minutos de adición (quedaban por añadir 44,68 g de acetona), la mezcla de cristalización estaba distintamente turbia. Se detuvo la adición de acetona y se añadieron 400 mg de simiente. La agitación se fijó a 240 rpm y se agitó durante una noche. La mezcla de cristalización era una suspensión densa después de 17 horas. Los sólidos se filtraron y se lavaron dos veces con acetona y se secaron en el filtro. El rendimiento fue de 74,8%.

20

#### **EJEMPLO 28: Cristalización con butanol/acetona**

Se seleccionó 1-butanol como el mejor disolvente para explorar la posibilidad de utilizar un disolvente de alto punto de ebullición que puede intercambiarse fácilmente por agua de la etapa de purificación por cromatografía acuosa aguas arriba. Aunque el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-

25

iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína no exhibe una alta solubilidad en 1-butanol (0,05% en peso), la adición de ácido maleico en exceso aumenta en gran medida su solubilidad. Este proceso se diseñó de nuevo para ser muy similar al proceso con DMF/acetonitrilo. A continuación se da una descripción  
5 del proceso inicial realizado a escala de 1 l.

Se añadieron clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (38 g), agua DI (200 ml), 1-butanol (500 ml) y ácido maleico (29,46 g – 1,5 eq.) a un reactor de 1 l con camisa. La mezcla se agitó para formar una solución transparente. Esta solución se destiló a vacío (18 kPa) y a una  
10 temperatura de 53-67°C hasta 200 ml. Se cargó 1-butanol (250 ml) y se continuó la destilación a 18 kPa y 70°C hasta que el volumen se redujo a 200 ml. La temperatura se ajustó a 50°C. Se cargaron agua DI (2,5 ml) y 1-butanol (475 ml). Se añadieron cristales simiente de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (1,5 g) y se lavaron en el reactor con 1-  
15 butanol (25 ml). Se añadió acetona (300 ml) a la mezcla de cristalización durante 3 horas mediante una bomba de jeringuilla. Una hora después de completar la adición, la mezcla de cristalización se enfrió a 10°C durante 10 horas. La mezcla de cristalización se filtró durante 14 horas después de completar la adición de acetona. La mezcla de cristalización se filtró muy  
20 fácilmente y no se observó agrietamiento de la torta. Se cargó un lavado con acetona (300 ml) en el reactor y se aclaró en la torta. Los sólidos se secaron en una estufa de vacío a 50°C, 81,3 kPa durante una noche. La masa del producto fue de 40,45 g, representando un rendimiento de un 78%.

El análisis por DSC mostró que la forma de estado sólido para ambos  
25 productos era clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-

164

cistefna cristalino. El contenido de disolvente de cada producto, después de secar durante una noche a vacío a 50°C, se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2: Contenido de disolvente residual**

5

| Nº ejemplo            | Metanol | Butanol | Acetona |
|-----------------------|---------|---------|---------|
| 27 (metanol/ acetona) | 0,64%   | N/A     | 1,37%   |
| 28 (butanol/ acetona) | N/A     | 0,39%   | 1,10%   |

El sistema 1-butanol/acetona puede ser preferible, ya que ambos son disolventes de clase III.

La penúltima etapa es una purificación mediante cromatografía SMB, que se realiza más fácilmente en una solución acuosa. El intercambio de disolvente entre agua y 1-butanol puede conseguirse fácilmente, pero la eliminación completa del agua de un sistema con metanol no sería posible. Esto favorece también al sistema 1-butanol/acetona frente al sistema metanol/acetona.

15

**Desarrollo del proceso**

De forma similar a la cristalización con DMF/acetonitrilo, la cristalización con 1-butanol/acetona tiene diversos parámetros que pueden afectar a la cristalización. Los parámetros intrínsecos incluyen: 1) temperatura, 2) contenido de ácido clorhídrico, 3) contenido de ácido maleico, 4) contenido de agua, 5) carga de compuesto y 6) cantidad de acetona. Los parámetros extrínsecos incluyen: 1) sembrado, 2) geometría del reactor, 3) protocolo de

20

165

adición de acetona y 4) mezclado. Cada uno de estos parámetros se discute con más detalle a continuación.

### **Parámetros Intrínsecos**

#### **5 1. Temperatura**

#### **EJEMPLO 29**

Se pesó ácido maleico (0,59 g – 1,5 eq.) en un matraz de fondo redondo de 50 ml, se cargó 1-butanol (8 g) y la mezcla se agitó para formar una solución transparente. Se cargó clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-  
10 metil-L-cisteína (1,00 g) y agua (1000 µl) y la mezcla se agitó para formar una solución incolora transparente. La solución se sometió a rotavapor a 50°C. Se cargó 1-butanol (6 g) y continuó en rotavapor. Se añadió 1-butanol (8 g) para preparar una solución fluida. Se cargaron 1-butanol (2,89 g) y agua (130 µl) para llevar la solución a las condiciones iniciales deseadas: 0,5 eq. de HCl, 2,0  
15 eq. de ácido maleico, 14 volúmenes de 1-butanol/kg de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, KF= 1,5%. Se cargó gota a gota acetona (6 ml). No se observó nucleación durante la carga de acetona. Se cargaron simientes cristalinas de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (10 mg) seguidas de una cantidad  
20 adicional de acetona (0,5 ml). La mezcla de cristalización se agitó a temperatura ambiente y pareció ser una suspensión densa después de varias horas. La cristalización parecía comportarse de manera muy similar a la cristalización con DMF/acetonitrilo. La suspensión se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 15 ml. La torta se lavó dos veces con 15 ml de  
25 acetona y se secó por succión.

166

Los microanálisis, DSC y PXRD muestran que los sólidos son clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino. Los datos microanalíticos y de DSC se resumen en la **tabla 3**.

**5    Tabla 3: Datos de cristalización isotérmica a temperatura ambiente**

| Ejemplo | Descripción       | Microanálisis |       |      |      | DSC           |           |
|---------|-------------------|---------------|-------|------|------|---------------|-----------|
|         |                   | C             | H     | N    | Cl   | Temp.<br>(°C) | Entalpía  |
| 29      | Temp.<br>ambiente | 40,46         | 13,90 | 6,81 | 5,85 | 200,15        | 148,1 J/g |
|         | Teórico           | 40,64         | 14,22 | 6,65 | 6,00 |               |           |

La cristalización en 1-butanol/acetona procedió a temperatura ambiente como se esperaba, sin ocurrir nucleación antes de la carga de las semillas. El  
10    producto fue clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

**2.    Ácido clorhídrico**

El HCl desempeña un papel en el comportamiento de la cristalización.  
15    Se desea tener una cantidad estequiométrica (0,5 eq.) de HCl en el sistema. Por debajo de este objetivo, podría resultar un rendimiento reducido, ya que el HCl se convierte en el reactivo limitante, o resultar una mezcla de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y la sal maleato 1:1 (maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, forma II). El HCl en  
20    exceso en el sistema daría probablemente como resultado rendimientos

LA

reducidos debido a un aumento de la solubilidad y sólidos con peores propiedades físicas.

### 3. Ácido maleico

#### 5 EJEMPLO 30

Es sabido que es necesario un exceso de ácido maleico basándose en el trabajo realizado con la cristalización con DMF/acetonitrilo, y la cantidad objetivo para el experimento inicial fue de 2,0 equivalentes. Se llevó una mezcla de cristalización con 1,75 equivalentes de ácido maleico a las  
10 condiciones iniciales: 0,5 eq. de HCl, 1,75 eq. de ácido maleico, 14 volúmenes de 1-BuOH/g de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, 1,5% por KF.

Tras un almacenamiento en frío durante una noche de esta solución, se  
15 observaron precipitar sólidos. Parece por lo tanto que tener sólo 1,75 equivalentes de ácido maleico da como resultado una solución supersaturada inestable que puede precipitar fácilmente.

Se realizaron tres cristalizaciones simultáneamente (ejemplos 30A, 30B y 30C) con 2,0, 2,25 y 2,50 eq. de ácido maleico, respectivamente, para  
20 evaluar el efecto sobre la cristalización. Se cargó ácido maleico (1,78 g – 1,5 eq.) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se cargó 1-butanol (34,0 g – 14 volúmenes) y se agitó para disolverlo. Se cargó clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína (3,00 g) en la solución. Se cargó agua (3.200 µl) y la mezcla se agitó para formar una solución transparente. La  
25 solución se sometió a rotavapor a 55°C a vacío. Se cargó de nuevo 1-butanol

168

(24 g) en la mezcla y continuó en el rotavapor hasta que el valor por KF fue de un 1,00%. Se añadieron butanol (23,29 g) y agua (0,434 g) para llevar la solución a 14 volúmenes de 1-butanol/clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína y un valor por KF de un 1,5%. La solución se dividió en 3 porciones (12,9 g cada una) y se marcó "A", "B" y "C". Se cargaron 98 mg de ácido maleico (0,25 eq.) en el matraz B, se cargaron 197 mg (0,5 eq.) de ácido maleico en el matraz C, y se agitó cada uno para formar una solución transparente.

Se cargó gota a gota acetona (6 ml) en cada matraz en alícuotas de 1 ml durante 35 minutos. Se observó nuclear cada experimento durante la carga de acetona; se observaron más sólidos con el contenido menor de ácido maleico (2,0 eq.) y menos con el contenido más alto de ácido maleico (2,50 eq.). Al final de la adición de acetona, se cargaron 10 mg de semillas en cada matraz y los experimentos se mantuvieron a temperatura ambiente durante un fin de semana. Se filtró cada experimento en un embudo de vidrio sinterizado de fritina fina de 15 ml y la torta se lavó dos veces con 15 ml de acetona. Las tortas se secaron por succión en el filtro.

Los datos microanalíticos y de DSC de los sólidos aislados de cada experimento se resumen en la Tabla 3. En los tres experimentos, los datos microanalíticos coinciden con los predichos por la teoría para el clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. Los resultados de DSC para todos los lotes muestran también un gran evento endotérmico cercano a 200°C, correspondiente al punto de fusión del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. En el ejemplo 30A, existe un evento muy pequeño a 54°C que podría corresponder a una pequeña cantidad

169

de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, forma II. Esto es muy probablemente debido a la considerable cantidad de nucleación incontrolada que ocurrió durante la carga de acetona en este ejemplo particular. Puesto que la nucleación ocurrió durante la carga de acetona incluso en presencia de 2,50 eq. de ácido maleico, aunque en un menor grado, parece que la velocidad de adición de acetona fue demasiado rápida. La pequeña cantidad de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, forma II, formada en presencia de sólo 2,0 eq. de ácido maleico no es debida por lo tanto, probablemente, directamente a los bajos niveles de ácido maleico, pero podría evitarse probablemente con una velocidad de adición de acetona más lenta.

Tabla 4: Datos microanalíticos y de DSC. Variación de ácido maleico

| Ejemplo | Descripción         | Microanálisis |       |      |      | DSC        |           |
|---------|---------------------|---------------|-------|------|------|------------|-----------|
|         |                     | C             | H     | N    | Cl   | Temp. (°C) | Entalpía  |
| 30A     | 2,0 eq. de maleico  | 40,27         | 13,95 | 6,64 | 5,93 | 54,28      | 7,3 J/g   |
|         |                     |               |       |      |      | 199,52     | 156,9 J/g |
| 30B     | 2,25 eq. de maleico | 40,50         | 13,98 | 6,70 | 5,91 | 201,11     | 148,4 J/g |
| 30C     | 2,50 eq. de maleico | 40,47         | 13,91 | 6,61 | 5,84 | 199,75     | 159,4 J/g |
|         | Teórico             | 40,64         | 14,22 | 6,65 | 6,00 |            |           |

El análisis de las aguas madre de cada experimento resumido en la tabla

120

3   mostró que, como se esperaba, la concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína aumentaba al aumentar el ácido maleico. Por lo tanto, se espera que aumente el rendimiento un contenido menor de ácido maleico en el sistema de cristalización.

5

**Tabla 5: Análisis de las aguas madre**

| Ejemplo | Descripción               | % en peso de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína |
|---------|---------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 30A     | 2,0 eq. de ácido maleico  | 0,84%                                                          |
| 30B     | 2,25 eq. de ácido maleico | 0,90%                                                          |
| 30C     | 2,50 eq. de ácido maleico | 1,09%                                                          |

Basándose en este ejemplo, un contenido de ácido maleico en el intervalo de 2,0-2,5 dará como resultado la formación de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, a condición de que la velocidad de adición de la acetona no cause una nucleación considerable durante la carga. Tan sólo 1,75 eq. de ácido maleico puede dar como resultado una solución supersaturada inestable que podría descomponerse fácilmente en el caso de tiempos de equilibrio prolongados. Resulta deseable, por lo tanto, dirigir el intervalo de ácido maleico de 2,0 a 2,25 eq. en el sistema de cristalización.

**4.    Contenido de agua**

171

A niveles de agua de o por debajo de un 4% a 25°C, el clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína es la forma estable. Por encima del 4%, se observan mezclas de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína y maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, forma II. Resulta preferible, por lo tanto, dirigir el contenido de agua del sistema para que sea menor de un 4% para la formación de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino.

#### 5. Carga de compuesto

Operar a 14 volúmenes de 1-butanol parece dar como resultado la cristalización más controlada, y el aumento de volumen no parece afectar adversamente al rendimiento. Por lo tanto, es preferible utilizar 14 volúmenes de 1-butanol por g de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína.

#### 6. Cantidad de acetona

Típicamente se han utilizado 6 volúmenes de acetona por gramo de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. Al final de esta adición, pueden observarse las apariciones de sólidos blancos que proceden de la solución con la adición de cada gota de acetona. Los sólidos característicamente se disipan, pero la solución a menudo está ligeramente turbia tras la adición de los seis volúmenes completos. Estas observaciones sugieren que el sistema está altamente sobresaturado en este punto y que añadir significativamente más de 6 volúmenes de acetona podría dar como resultado una sobretensión en la separación de fases. Añadir significativamente

172

menos acetona, como alternativa, puede no permitir al sistema alcanzar la separación de fases. Esto podría no sólo comprometer la morfología de aglomerado esférico sino influir también negativamente sobre el rendimiento.

## **5 Parámetros extrínsecos**

### **1. Siembra**

Brevemente, la adición de simientes en el momento de separación de fases puede ayudar a controlar la cristalización. Tener sólidos presentes en la masa en el momento de separación de fases proporciona un sustrato sobre el cual la fase dispersada puede depositarse y cristalizar en aglomerados. Controlar el tamaño y forma del sustrato mediante una adición controlada de simiente frente a la nucleación en la masa puede ser también importante para controlar la forma global del aglomerado. A lo largo del desarrollo del proceso, la cantidad de simiente añadida al sistema 1-butanol/acetona ha variado desde 1 a 3% del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína total en el lote. No se observó una diferencia drástica en el comportamiento de la cristalización.

En el proceso con 1-butanol/acetona inicial utilizado, se cargaron simientes (3%) antes de la adición de acetona. Para asegurar una distribución de tamaño de partícula monodispersada, resulta preferible cargar las simientes tan cerca del momento de separación de fases como sea posible. Cargar las simientes antes de iniciar la adición de acetona puede causar la nucleación en diferentes momentos durante la carga, dando como resultado una distribución multimodal.

Puede ser preferible un protocolo similar al utilizado en la cristalización

173

con DMF/acetonitrilo en la cristalización con 1-butanol/acetona. Después de la carga de la mayoría del disolvente (~90%), se cargaría una suspensión de simiente de aproximadamente la mitad del 10% restante. El disolvente restante se utilizaría como aclarado del recipiente de simiente y las líneas de carga.

5

## **2. Características del reactor**

Basándose en la experiencia con el sistema DMF/acetonitrilo, la geometría del reactor puede afectar también a la actuación de la cristalización, lo más directamente en términos de rendimiento. No es favorable realizar la cristalización en un cristalizador con una alta relación de aspecto y una alta relación de superficie a volumen, tal como en un vial cilíndrico pequeño. En el momento de la separación de fases, la fase dispersada puede depositarse sobre las paredes en lugar de sobre los cristales simiente. En caso extremo, las cristalizaciones a pequeña escala realizadas sin sembrado en viales estrechos han dado como resultado la cristalización enteramente sobre las paredes, virtualmente sin sólidos en la masa. Ya que la cristalización con 1-butanol/acetona es también un sistema separador de fases, se espera que sea óptimo un reactor con una relación relativamente pequeña de aspecto y una relación superficie a volumen pequeña.

15  
20

## **3. Adición de acetona**

El protocolo de adición de acetona ha variado desde tan sólo 35 minutos hasta del orden de 3 horas y 45 minutos. Como se observa en la sección 4.1.3., la adición de acetona demasiado rápidamente puede dar como resultado la nucleación prematura de sólidos pegajosos en la masa, que puede conducir a

25

17/11

una mezcla de sales en el producto final. La carga de acetona durante 3 horas y 45 minutos no mostró virtualmente ninguna ventaja frente a un tiempo de carga de 2 horas o 1 hora. Al final de la adición, la solución estaba turbia en todos los casos y todas las cristalizaciones procedieron como se esperaba, dando como resultado un clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína de alta calidad. Parece, por lo tanto, que aunque cargar acetona demasiado rápido puede dar como resultado un tiempo de inducción acortado y la nucleación prematura de sólidos durante la adición de acetona, no hay un límite obvio para el tiempo máximo de adición. Puede preferirse un tiempo de adición diana de dos horas, ya que está a la mitad del intervalo encontrado aceptable.

#### 4. Mezclado

El mezclado es un parámetro importante con respecto a las cristalizaciones con separación de fases líquido-líquido. La agitación debería ser suficiente de modo que los aglomerados densos formados no se asienten en una "zona muerta" por debajo del agitador. A gran escala, puede ser útil soplar nitrógeno suavemente a través de la válvula inferior para minimizar la zona muerta.

Parece que los aglomerados esféricos son bastante robustos y no se degradan fácilmente durante periodos de agitación prolongados, y los aglomerados parecen estar intactos después de 11 días de agitación.

En el caso de incorporar cromatografía al proceso sintético del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, se recomienda que el producto cromatografiado se caracterice bien antes de

128

proceder a la cristalización final. En la preparación para la cromatografía, se disuelve el producto bruto clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína en agua con un ligero exceso (~0,2 eq.) de ácido maleico. La solución acuosa purificada es el material de partida para la cristalización final con 1-butanol/acetona.

Se recomienda que la solución acuosa purificada se caracterice bien en términos de concentración, contenido de ácido maleico, así como contenido de HCl antes del uso en la cristalización con 1-butanol/acetona. Se desconoce si pueden eliminarse porciones de HCl en la cromatografía. En trabajos anteriores, se midió la concentración de ión cloruro mediante cromatografía iónica. Si el contenido de cloruro es significativamente menor de 0,5 eq. (<0,45), se recomienda añadir HCl para dirigirse al valor deseado.

La cromatografía se realiza con sólo un ligero exceso de ácido maleico. Por lo tanto, puede añadirse ácido maleico a la solución purificada para conseguir los 2,0 equivalentes objetivo. Además, la concentración de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína (base libre) debería cuantificarse exactamente como base de las adiciones de ácido. Las concentraciones tanto de ácido maleico como de base libre de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína se han cuantificado utilizando HPLC.

Si la cromatografía se elimina de la síntesis, el intercambio de disolventes para conseguir las condiciones iniciales apropiadas puede simplificarse utilizando 1-butanol como disolvente primario de disolución, y añadiendo el agua justa suficiente (~8% por KF) para obtener una solución incolora transparente. Esta solución se destila después durante un corto periodo para conseguir un valor por KF menor de 1,5%.

176

**CARACTERÍSTICAS EN POLVO DE AGLOMERADOS ESFÉRICOS  
EMPAQUETADOS ORDENADAMENTE DE CRISTALES DE CLORHIDRATO  
MALEATO DE S-[2-[(1-IMINOETIL)AMINO]ETIL]-2-METIL-L-CISTEÍNA**

5

Se estudiaron aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína preparados en el ejemplo 20 para determinar sus características en polvo que son relevantes para el desarrollo de una composición farmacéutica con clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Antes del ensayo, los sólidos se pasaron a través de un tamiz de malla 80 correspondiente a una abertura de 177 micrómetros para fragmentar algunos agregados sueltos muy grandes de los aglomerados empaquetados ordenadamente. Las propiedades ensayadas incluían las características de flujo del polvo, la distribución del tamaño de partícula de polvo, la densidad aparente y aparente compactada del polvo y la compresibilidad y compactación del polvo.

Se evaluó el flujo del polvo utilizando un medidor de flujo de abertura, medido como la menor abertura a la que el polvo fluye libremente a su través. El ensayo de flujo de polvo fue repetidamente exitoso a través de una abertura de 6 mm. Un flujo de polvo de 6 mm se considera bueno para el desarrollo de una formulación de cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La repetición exitosa del flujo a través de un abertura más estrecha de 4 mm dependía, sin embargo, de cómo se introdujera el polvo en el medidor. El índice de compresibilidad calculado de

127

17,8% indicó también características de flujo de buenas a aceptables para estos aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína.

La distribución del tamaño de partícula del polvo se midió utilizando análisis de tamices. La distribución del tamaño medio de partícula se calculó utilizando el procedimiento de la media geométrica. Los datos de distribución del tamaño de partícula se presentan en la Fig. 12. Estos aglomerados empaquetados ordenadamente presentaron un tamaño medio de partícula de 134 micrómetros (designados en adelante como  $\mu\text{m}$ ). Sólo un 1,63% del material se consideró como finos, menos de 75  $\mu\text{m}$ , con más de un 90% en el intervalo 105-250  $\mu\text{m}$ . Más de un 75% del material estaba en 105-150  $\mu\text{m}$ . El estrecho intervalo en la distribución del tamaño de partícula de polvo para los aglomerados empaquetados ordenadamente está entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ , que es altamente deseable para el desarrollo de una composición farmacéutica con clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La densidad aparente del polvo se evaluó como la masa del material en un cilindro graduado de 50 ml. La densidad aparente compactada del polvo se calculó en el punto de equilibrio, en el que la compactación adicional no alteró el volumen del polvo. Los aglomerados empaquetados ordenadamente exhibieron una densidad aparente del polvo de 0,41 g/ml, con una densidad aparente compactada de 0,50 g/ml.

El polvo se evaluó por compresión directa sin ningún excipiente. Se fabricaron productos compactos de 100 mg de peso utilizando una herramienta cóncava redonda de 6,35 mm. Los comprimidos se comprimieron a diversas

28

fuerzas de compresión y se evaluó la resistencia, grosor y disgregación. El perfil de compresión directa de aglomerados empaquetados ordenadamente de los cristales de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína se presenta en la Fig. 13. Los aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína presentan un buen perfil de compresibilidad sin el uso de excipientes. Son posibles comprimidos pequeños relativamente resistentes (6,35 mm) del orden de 11 kP de dureza con una fuerza de compresión entre 900 y 1.000 kg. La resistencia del comprimido alcanza un máximo aparente entre 900 y 1.000 kg de fuerza de compresión. Se observó una menor adhesión a las paredes de la boquilla y el punzón durante los experimentos de compresión. Sin embargo, la adhesividad se consideró que era un problema menor y pudo resolverse fácilmente utilizando un lubricante adecuado. El efecto del grosor del comprimido en función de la fuerza de compresión se presenta en la Fig. 14. Se evaluaron también los tiempos de disgregación de comprimido para productos compactos de aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína. Se comprimieron tres comprimidos con fuerzas de compresión entre 500 y 600, correspondientes a una dureza de comprimido de 8 kP para este material. Todos los comprimidos presentaron tiempos de disgregación rápidos de menos de 2 minutos y bastante por debajo del objetivo de 10 minutos (véase la Fig. 15).

En resumen, los aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína muestran propiedades altamente deseables para el desarrollo de una

179

composición farmacéutica, tales como comprimidos, con clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## 5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Se comprende también en esta invención una clase de composiciones farmacéuticas que comprende clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino en asociación con uno o más vehículos y/o diluyentes y/o coadyuvantes no tóxicos farmacéuticamente aceptables (designados colectivamente en la presente memoria como materiales "vehículo") y, si se desea, otros ingredientes activos. Los cristales de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento pretendido. El clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína activo y sus composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o tópica.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma, por ejemplo, de un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se prepara preferiblemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del ingrediente activo. Son ejemplos de dichas unidades de dosificación comprimidos o cápsulas. El ingrediente activo puede administrarse también mediante inyección en forma de una composición en la que, por ejemplo, puede utilizarse solución salina,

180

dextrosa o agua como vehículo adecuado.

La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y el régimen de dosificación para tratar una afección patológica con el compuesto y/o las composiciones de esta invención depende de una serie de factores, incluyendo la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía y frecuencia de administración y el compuesto particular empleado, y por tanto puede variar ampliamente. Las composiciones farmacéuticas pueden contener ingredientes activos en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 2.000 mg, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 500 mg, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 100 mg. Puede ser apropiada una dosis diaria de entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal. La dosis diaria puede administrarse en una a cuatro dosis al día.

El clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino puede administrarse también mediante un dispositivo transdérmico. La administración tópica preferible se realizará utilizando un parche de tipo depósito y membrana porosa o de la variedad de matriz sólida. En cualquier caso, el agente activo se libera continuamente del depósito o microcápsulas a través de una membrana al adhesivo permeable al agente activo, que está en contacto con la piel o la mucosa del receptor. Si el agente activo se absorbe a través de la piel, se administra un flujo controlado y predeterminado del agente activo al receptor. En el caso de microcápsulas, el agente encapsulante puede funcionar también como membrana.

181

La fase oleosa de las emulsiones de esta invención puede estar constituida por ingredientes conocidos de manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante, puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizador. Se prefiere también incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el emulsionante o emulsionantes con o sin estabilizante o estabilizantes constituyen la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa constituyen la denominada base de ungüento emulsionante que forma la fase dispersada aceitosa de las formulaciones de crema. Los emulsionantes y estabilizantes de emulsión adecuados para uso en la formulación de la presente invención incluyen Tween 80, Span 80, alcohol cetosteárilico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio, entre otros.

La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación está basada en conseguir las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que se utilizan probablemente en formulaciones de emulsión farmacéutica es muy baja. Por tanto, la crema debería ser preferiblemente un producto no graso, que no manche y lavable con una consistencia adecuada para evitar derrames de los tubos u otros envases. Pueden utilizarse ésteres alquílicos mono- o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-

102

etilhexilo o una combinación de ésteres de cadena ramificada. Estos pueden utilizarse solos o en combinación, dependiendo de las propiedades necesarias. Como alternativa, pueden utilizarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina suave blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

5 Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo incluyen también gotas oculares en las que los ingredientes activos se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para los ingredientes activos. Los ingredientes activos están preferiblemente presentes en dichas formulaiones en una concentración de 0-5 a 20%,  
10 ventajosamente de 0,5 a 10% y particularmente de aproximadamente 1,5% p/p.

Con fines terapéuticos, se combina habitualmente el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína con uno o más coadyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Si se administra por vía oral, el compuesto puede mezclarse con lactosa, sacarosa, almidón en polvo,  
15 ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ésteres alquílicos de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, poli(vinilpirrolidona) y/o poli(alcohol vinílico), y después comprimirse o encapsularse para una administración conveniente. Dichas cápsulas o  
20 comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que puede proporcionarse en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetilcelulosa. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones de inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas soluciones y suspensiones pueden  
25 prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que tienen uno o más de los

103

vehículos o diluyentes citados para uso en las formulaciones para administración oral. El clorhidrato maleato de S-[2-[(1-Iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino puede disolverse en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro de sodio y/o diversos tampones. Otros coadyuvantes y modos de administración son bien y ampliamente conocidos en la técnica farmacéutica.

Habiéndose descrito así la invención, resulta evidente que la misma puede variarse de muchas maneras. Dichas variaciones no han de considerarse como una desviación del espíritu y alcance de la presente invención, y todas dichas modificaciones y equivalentes, como sería obvio para un experto en la técnica, se pretende que se incluyan en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

104

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo  
contenid en las siguientes:

**REIVINDICACIONES**

5

1. Una forma cristalina de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína caracterizada por al menos uno de: un patrón de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Fig. 1; una pérdida de masa de aproximadamente un 1% en un intervalo de temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 180°C; un espectro Raman sustancialmente como se muestra en la Fig. 5; y un análisis elemental sustancialmente como en la Tabla 1.

2. La forma cristalina del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína de la reivindicación 1, en la que se acumula una pluralidad de cristales en forma de aglomerados.

3. La forma cristalina de los aglomerados de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína de la reivindicación 2, en la que dicha pluralidad de cristales se acumula generalmente en forma de aglomerados empaquetados ordenadamente.

4. Una composición farmacéutica que comprende el clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

145

5. Un procedimiento de tratamiento de una afección de la que forma parte la producción patológicamente alta en un sujeto necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino de la reivindicación 1.

6. Un procedimiento de preparación de aglomerados generalmente empaquetados ordenadamente de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína de la reivindicación 3, que utiliza un procedimiento de cristalización que comprende añadir un antidisolvente a una solución de disolvente en la que se disuelve clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína; formando así un sistema que comprende dos fases, y precipitando el aglomerado generalmente empaquetado ordenadamente de clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína cristalino.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la solución de antidisolvente se añade a la solución de disolvente en la que se disuelve clorhidrato maleato de *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-*L*-cisteína, seguido de la adición de cristales simiente al sistema.

8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el antidisolvente comprende acetona.

9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la solución de disolvente comprende 1-butanol y clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

5 10. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el antidisolvente comprende acetonitrilo, y la solución de disolvente comprende N,N-dimetilformamida y clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

10 11. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el antidisolvente comprende acetona, y la solución de disolvente comprende 1-butanol y clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

15 12. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que no menos de aproximadamente un 1% en peso del clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína total en el sistema se introduce en forma de cristales simiente añadidos.

20 13. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que se añade una cantidad suficiente de antidisolvente a una solución de disolvente que comprende clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en un recipiente de reacción para formar un sistema de reacción hasta que resulta visualmente evidente uno de a) turbidez o b) un recubrimiento oleoso sobre una superficie de dicho recipiente de reacción, y se añaden  
25 cristales simiente a dicho sistema.

14. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que los cristales  
simiente se crean *in situ* mediante al menos uno de: reducir el contenido de  
agua de la solución de disolvente; reducir la cantidad de ácido maleico; o  
5 alterar la velocidad de generación de la sobresaturación.

15. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que no se añaden  
cristales simiente al sistema y la relación de antidisolvente añadido al sistema  
supera la relación de solución de disolvente en la que se disuelve clorhidrato  
10 maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en aproximadamente  
un 110% en peso de la relación de antidisolvente a disolvente utilizada en un  
sistema en el que se añaden cristales simiente, para precipitar el aglomerado  
generalmente empaquetado ordenadamente de clorhidrato maleato de S-[2-[(1-  
iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino.

158

## **RESUMEN**

Se describe una nueva sal mixta de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La nueva sal mixta, clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, puede producirse para formar cristales.

5 que pueden disponerse en forma de aglomerados generalmente empaquetados ordenadamente que son particularmente útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas. Se describen también dichas composiciones farmacéuticas, así como procedimientos para preparar clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino, y procedimientos de

10 tratamiento de afecciones caracterizadas por una sobreexpresión de óxido nítrico por la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa utilizando el clorhidrato maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

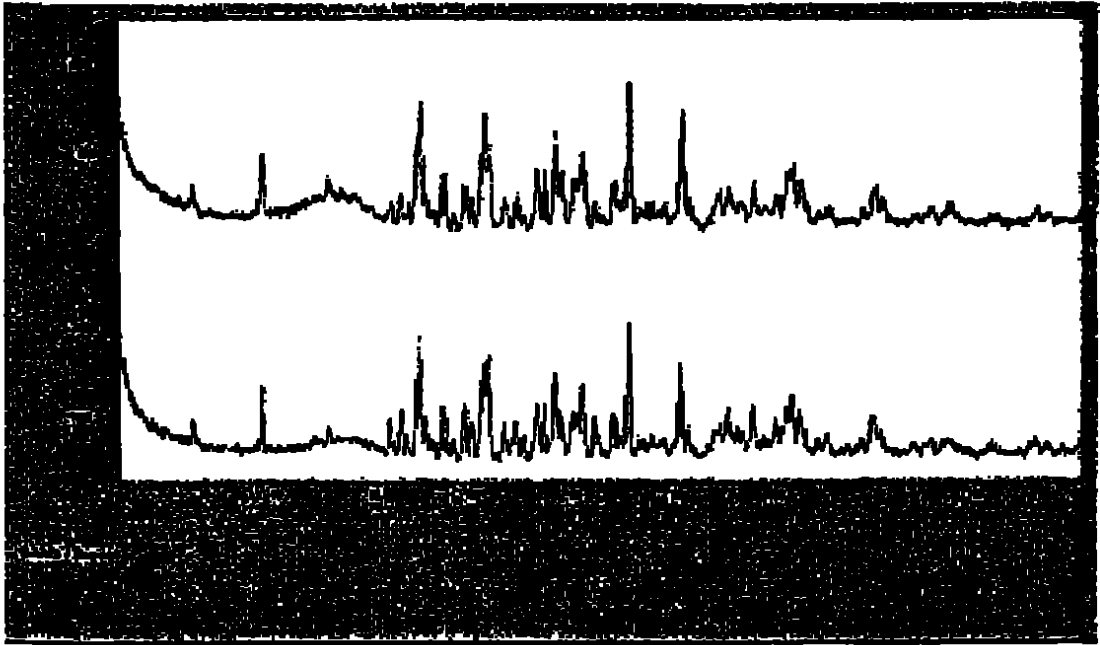


FIG. 1

100

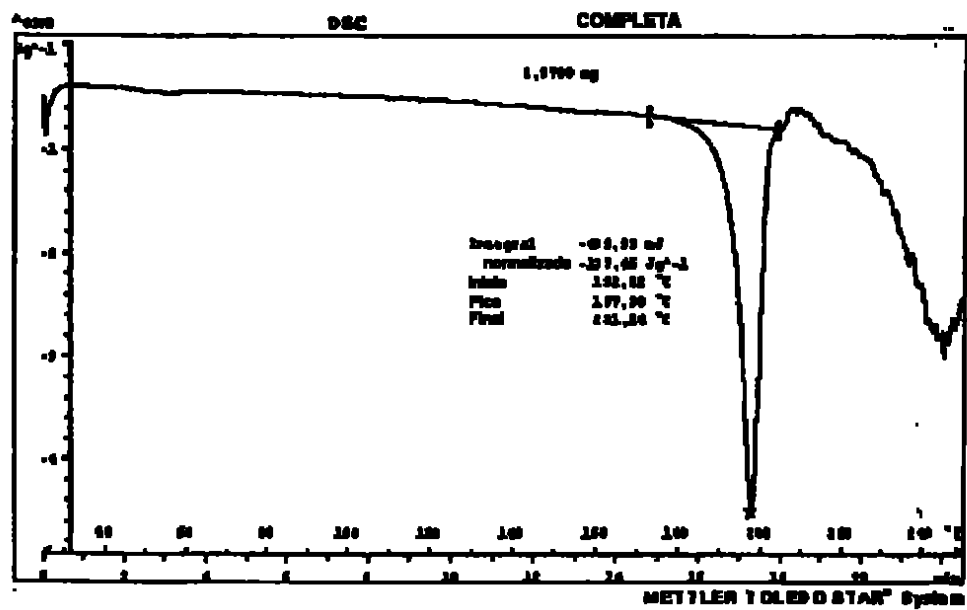


FIG. 2

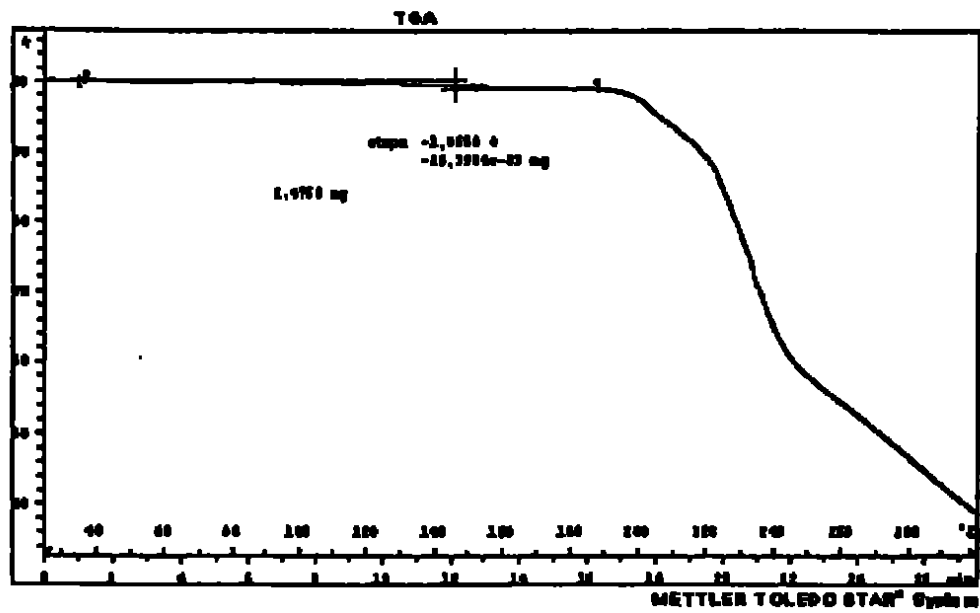


FIG. 3

101

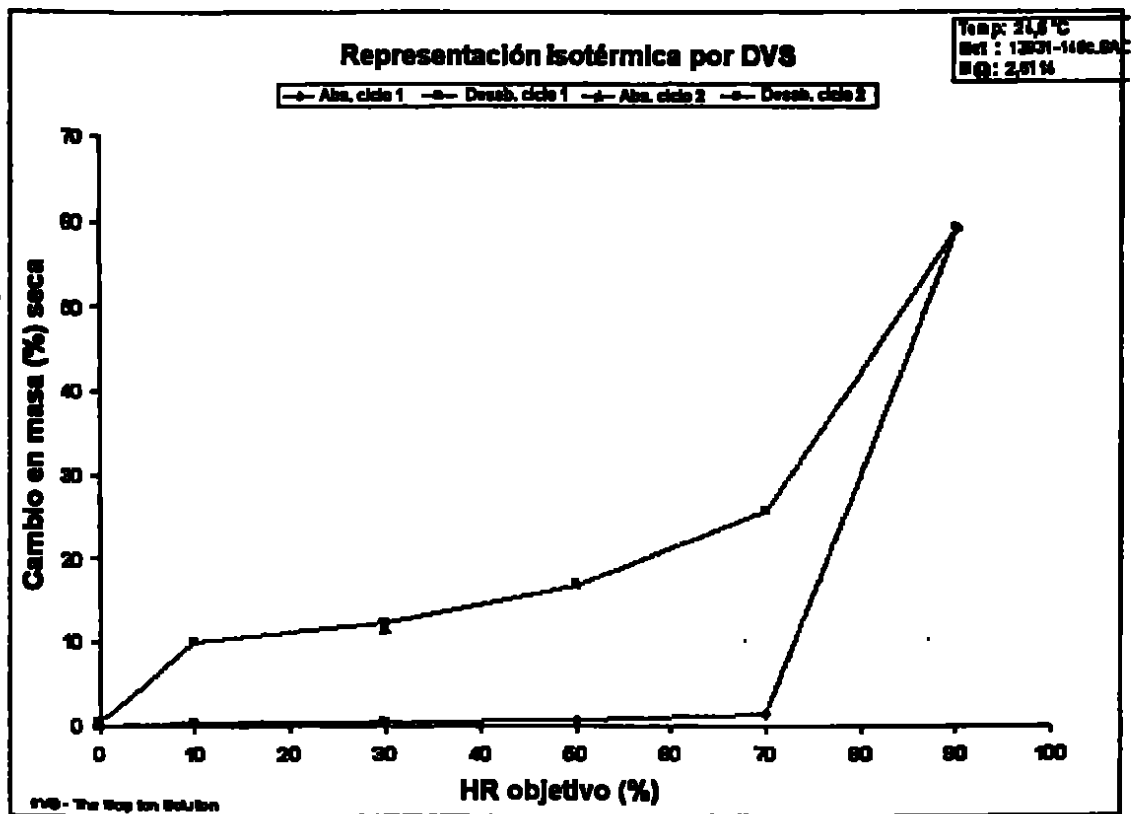


FIG. 4

147

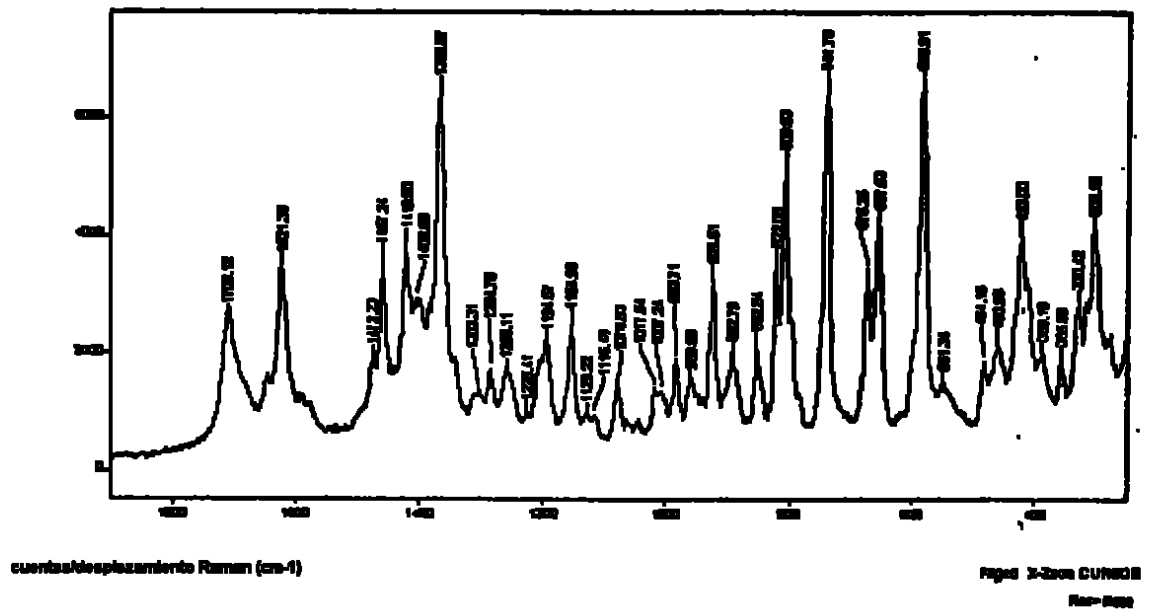


FIG. 5

103

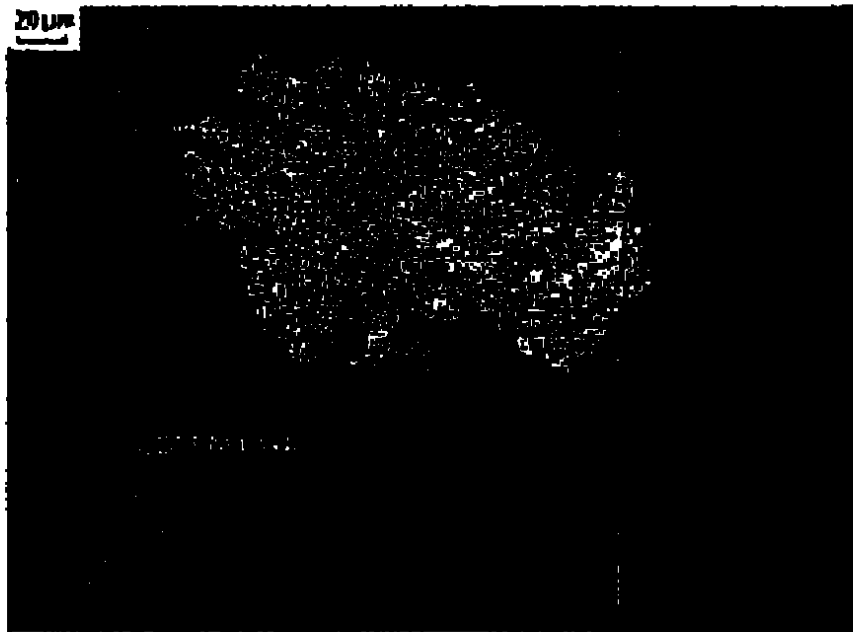


**FIG. 6**

MS

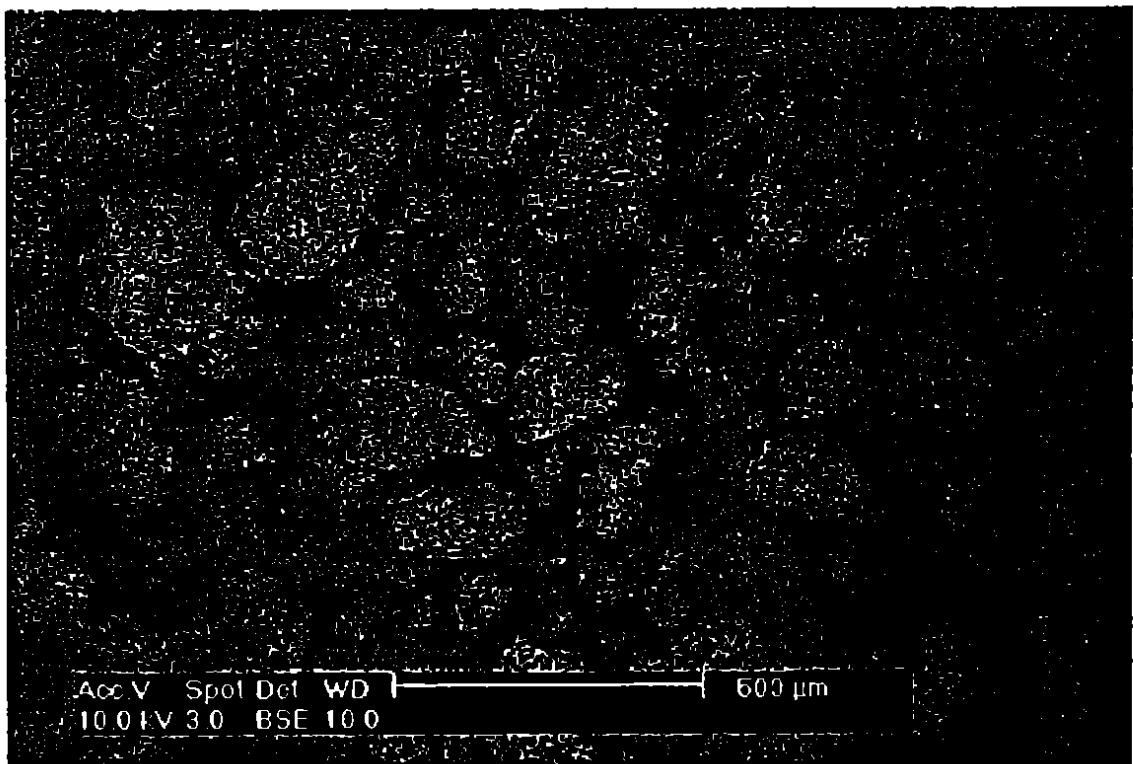


FIG. 7A

105

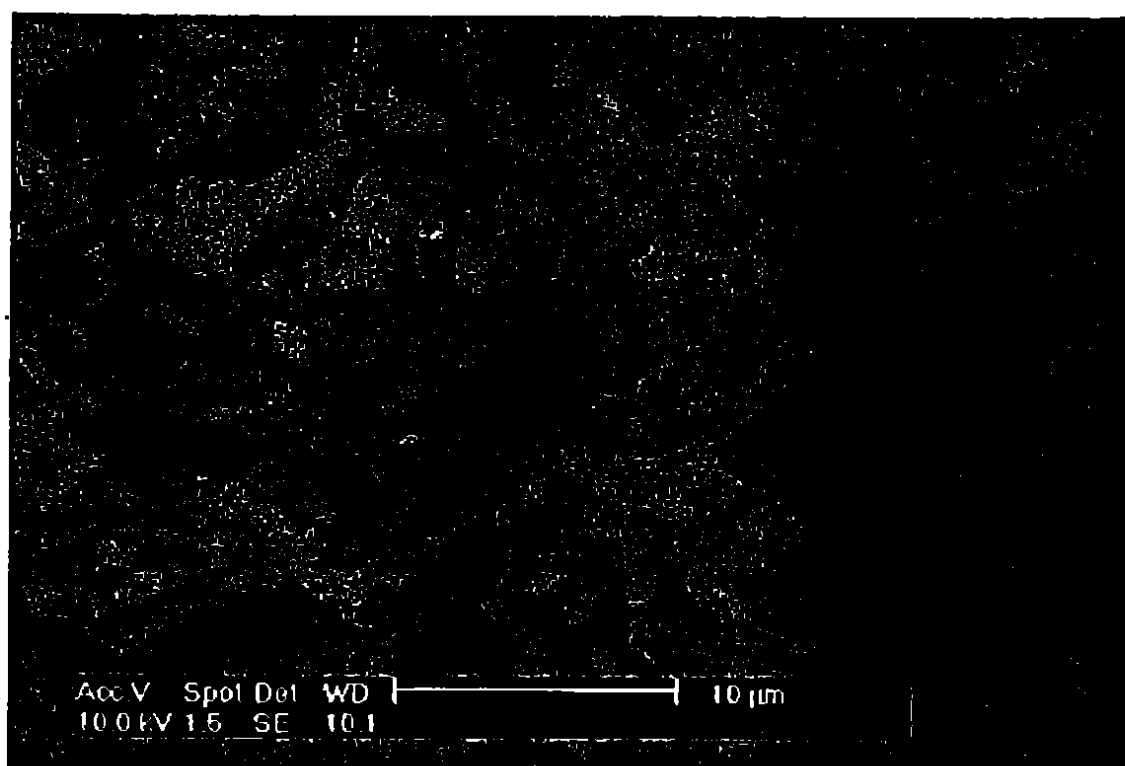


**FIG. 7B**

Feb.

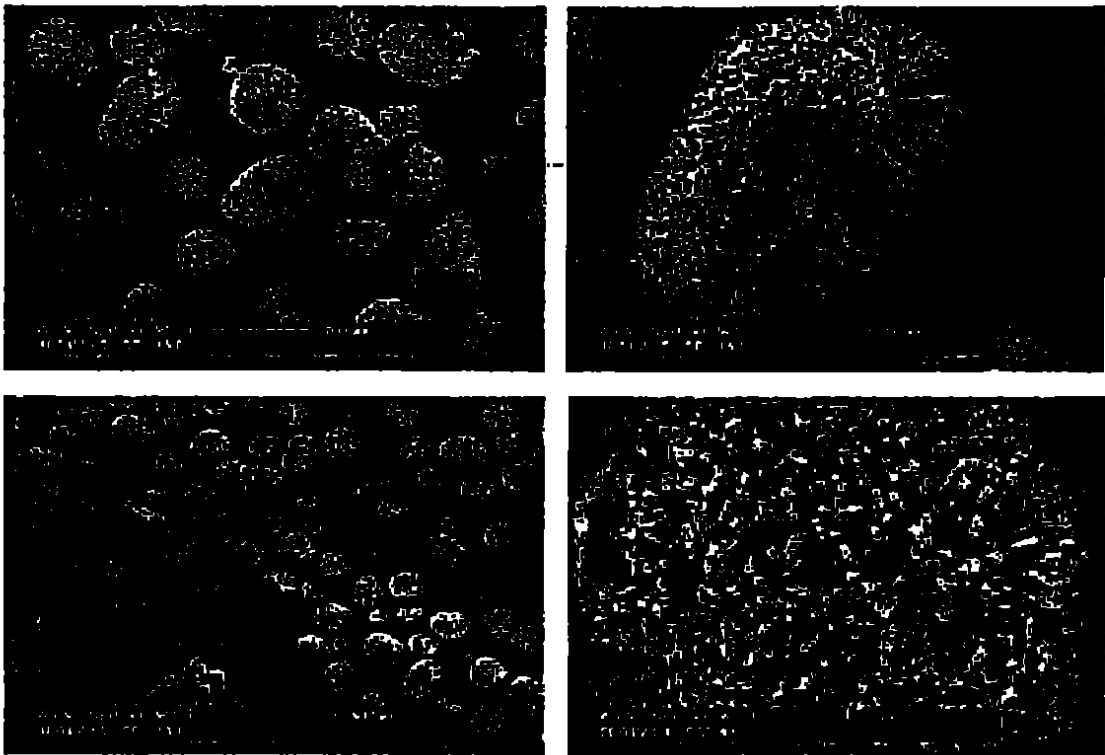


FIG. 8

17

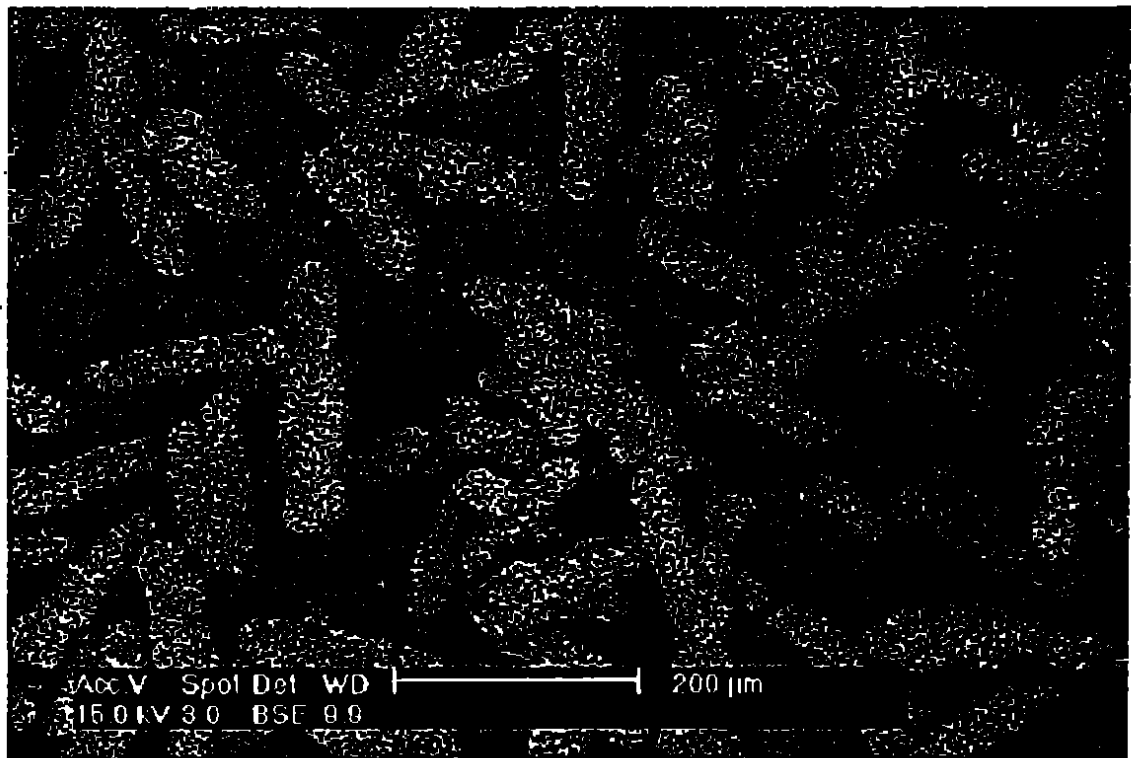


**FIG. 9A**

198

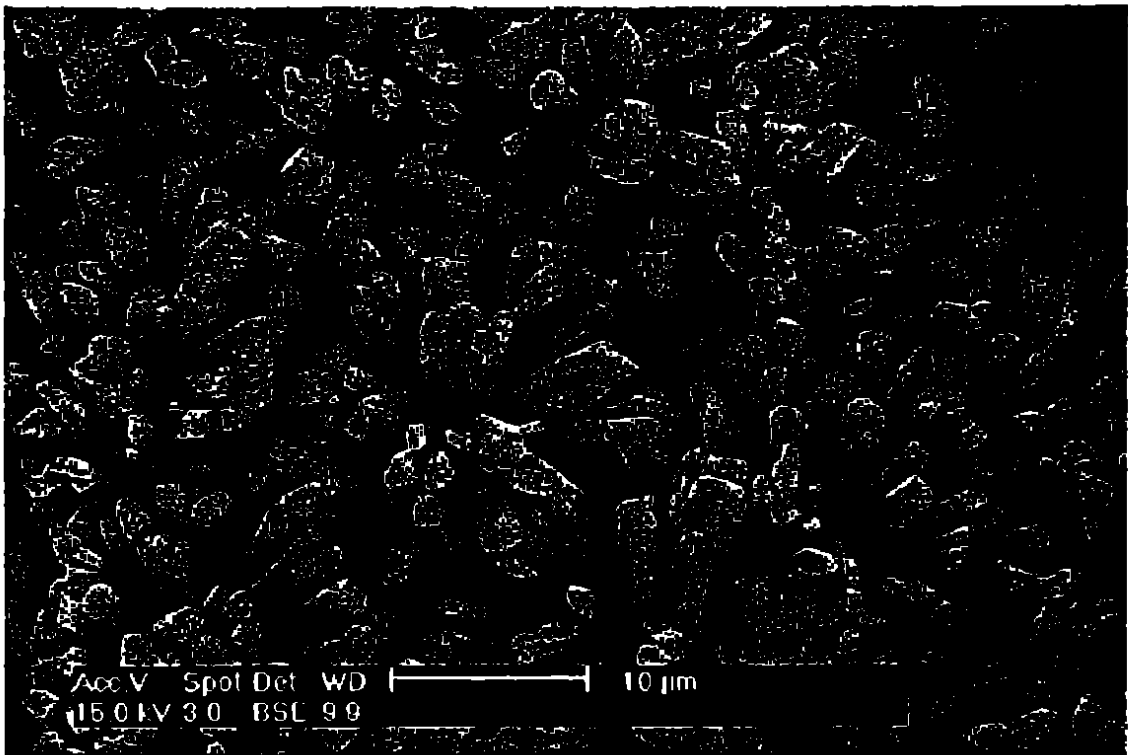


**FIG. 9B**

ML

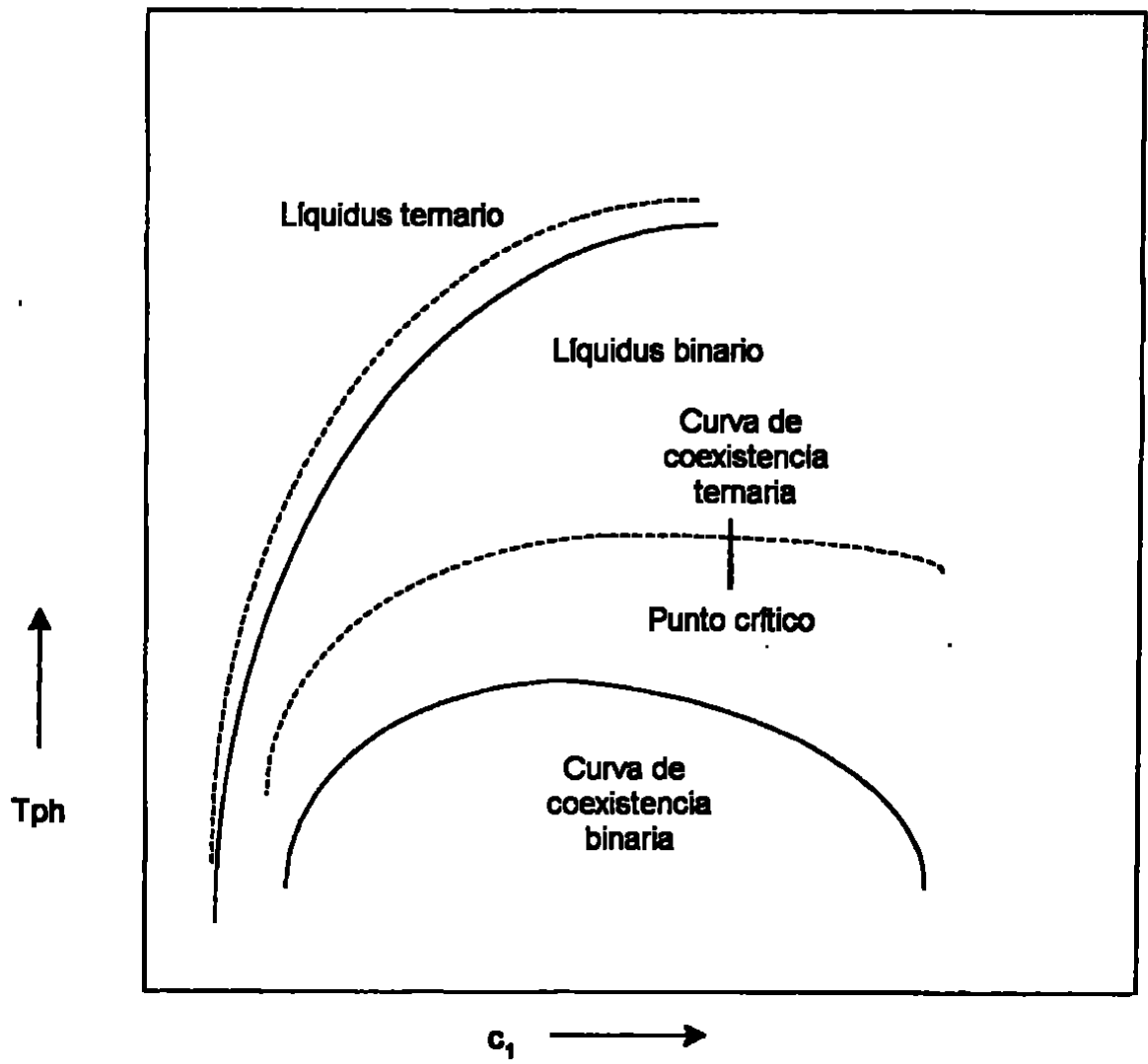


**FIG. 10**

202

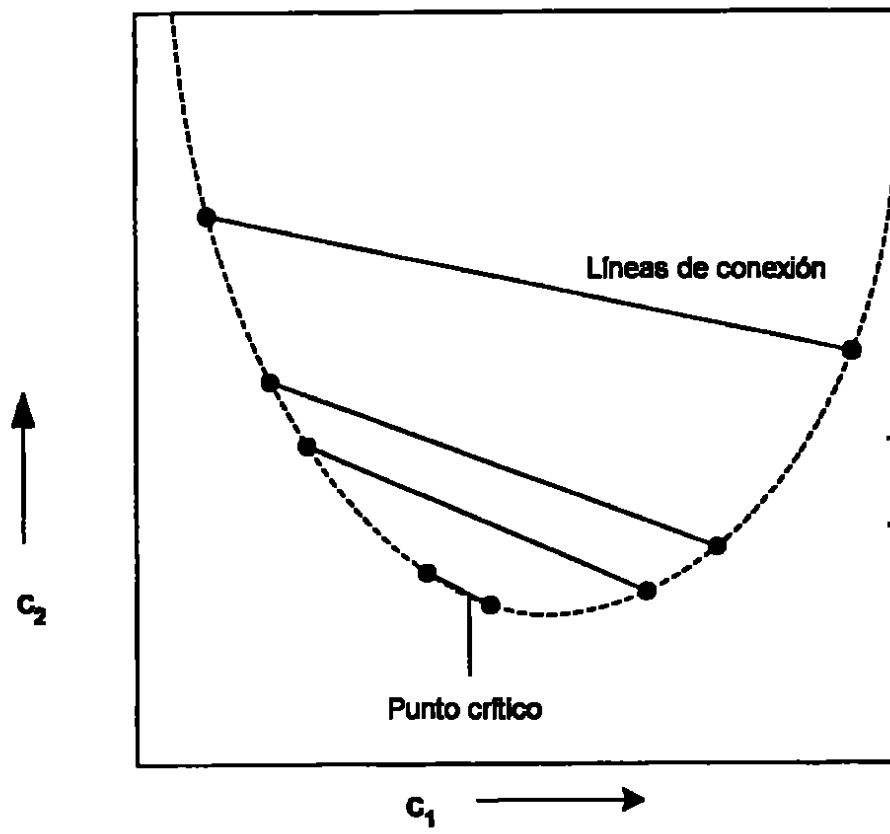


FIG. 11

201

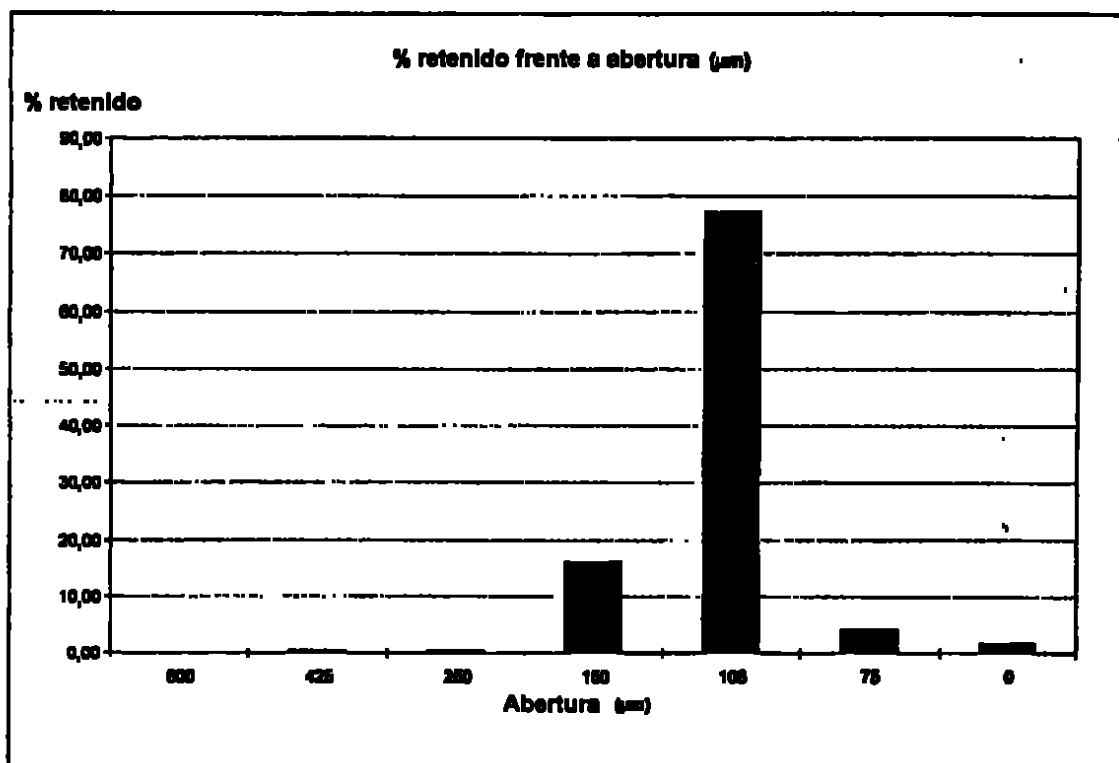


**FIG. 12**

202

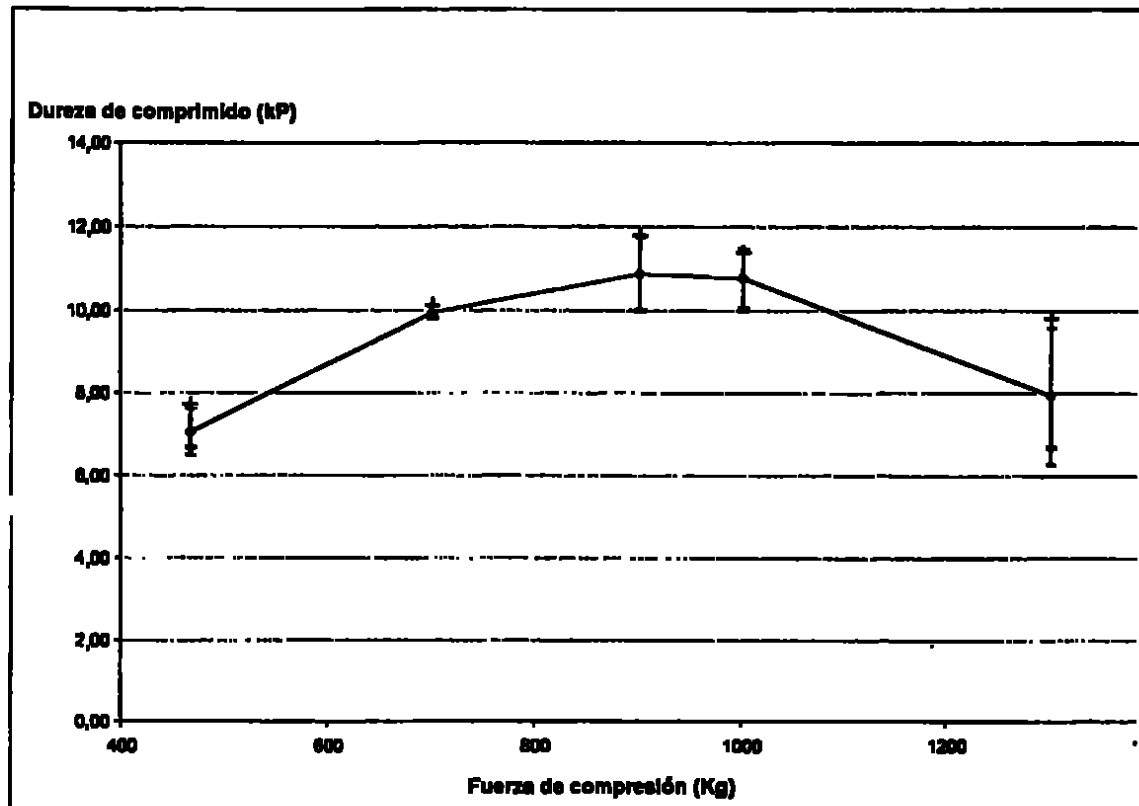


FIG. 13

203

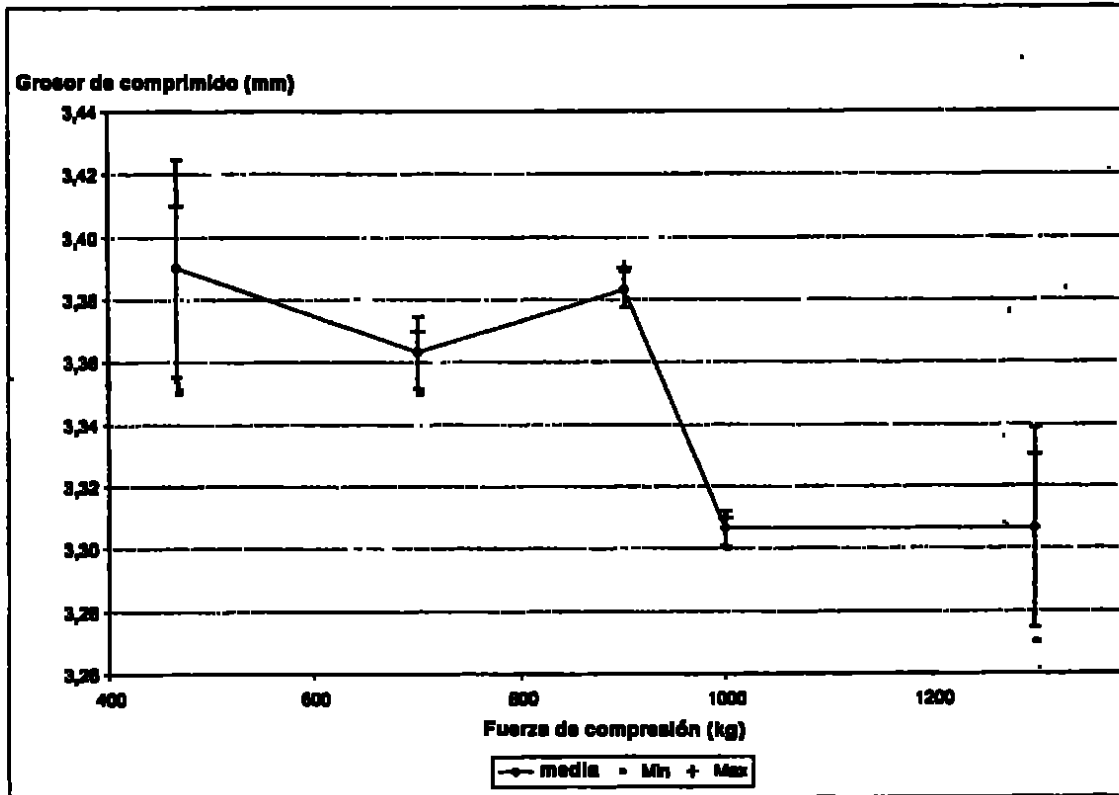


FIG. 14

208

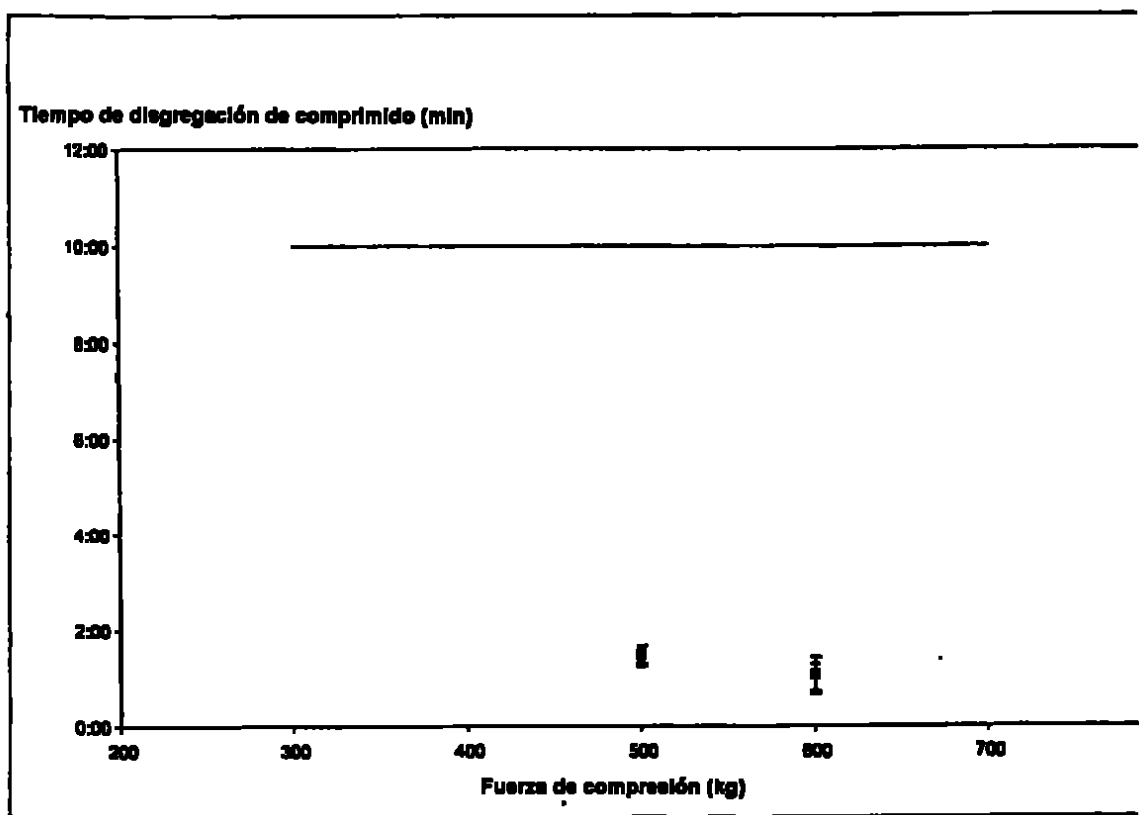


FIG. 15

205

**TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES**  
**PCT**  
**NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN**  
**PRELIMINAR INTERNACIONAL**  
**(PCT Regla 71.1)**  
**De: AUTORIDAD DE REVISIÓN PRELIMINAR INTERNACIONAL**

**Para:**  
**LUMB, J. Trevor**  
**PFIZER INC**  
**P.O. Box 1027**  
**St. Louis, MO 63006**  
**Estados Unidos de América.**

**Sello de recibido 17 de marzo de 2005 PHARMACIA – Departamento**  
**Global de Patentes, St. Louis MO.**

**Fecha de expedición: 07.03.2005**  
**Referencia del expediente del solicitante o mandatario: 3300/8**  
**Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/000678**  
**Fecha de presentación internacional: 04.03.2004**  
**Fecha de prioridad: 11.03.2003**  
**Solicitante: PHARMACIA CORPORATION**

- 1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.**
- 2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.**
- 3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.**

**4. RECORDATORIO**

**Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39.1) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).**

**Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de**

106

informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

**Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:**

**Oficina de Patentes Europea P.B. 5818 Patentlaan 2**

**NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas**

**Tel: +31 70 340-2040, Tx : 31 651 epo nl**

**Fax: +31 70 340-3016**

**Funcionario Autorizado: Cardenas, C**

**Tel: + 31 70 340-3370**

202

**TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES**  
**PCT**  
**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD**  
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)  
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: 3300/8  
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/000678  
Fecha de presentación internacional: 04.03.2004  
Fecha de prioridad: 11.03.2003  
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: C07C323/59, A61K 31/198, A61P29/00, C07C319/28  
Solicitante: PHARMACIA CORPORATION

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme el Artículo 36.
2. Este INFORME consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
  - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de      hojas, descritas a continuación:
    - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
    - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
  - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s))     , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).
4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- 205
- |                                     |               |                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro I    | Base de este informe                                                                                                                                                 |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro II   | Prioridad                                                                                                                                                            |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro III  | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial                                                                   |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro IV   | Falta de unidad de Invención                                                                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro V    | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VI   | Ciertos documentos citados                                                                                                                                           |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VII  | Defectos en la Solicitud Internacional                                                                                                                               |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional                                                                                                                 |

Fecha de radicación de la demanda: 27.09.2004

Fecha de elaboración de este reporte: 07.03.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea P.B. 5818 Patentlaan 2

NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas

Tel: +31 70 340-2040, Tx : 31 651 epo nl

Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: English, R

Tel: + 31 70 340-2860

---

#### **Recuadro I. Base de este informe**

---

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma\_\_\_\_, que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
  - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
  - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un*

requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe):

**Descripción, Páginas**

1 - 66 tal como se presentaron inicialmente

**Reivindicaciones, Números**

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

**Dibujos, hojas**

1/11-11/11 tal como se presentaron inicialmente

☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) - ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

\* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

---

**Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial**

---

9/10

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
- ☒ a las reivindicaciones Nos. 5

debido a que:

- ☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 5 en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):
- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):

ver hoja separada

- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☐ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ la lista de de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

- La lista en papel
- ☐ no se presentó
  - ☐ no cumple con la norma estándar

- La lista en formato legible por ordenador
- ☐ no se presentó
  - ☐ no cumple con la norma estándar

- ☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidas y/o de aminoácidos, si únicamente se han presentado en formato legible por ordenador, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver recuadro suplementario para más detalles.

711

**Recuadro No. V                    Declaración razonada según el Artículo 35(2)  
con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial:  
anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración**

**1.      Declaración**

|                            |     |                            |
|----------------------------|-----|----------------------------|
| Novedad (N)                | Si: | Reivindicaciones 1-15      |
|                            | No: | Reivindicaciones           |
| Nivel Inventivo (NI)       | Si: | Reivindicaciones           |
|                            | No: | Reivindicaciones 1-15      |
| Aplicación Industrial (AI) | Si: | Reivindicaciones 1-4, 6-15 |
|                            | No: | Reivindicaciones           |

**2.      Citas y explicaciones (Regla 70.7)**

**ver hoja separada.**

**Ítem III**

**No formulación de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial**

1. La reivindicación 5 se relaciona con temas, considerados por esta Autoridad, cubiertos por provisiones de la Regla 67.1(iv) del PCT. De manera que no se formulará ningún concepto con respecto a la aplicación industrial de los temas encontrados en estas reivindicaciones (Artículo 34(a)(i) del PCT).

**Ítem V**

**Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones sustentando dicha declaración**

Se hace referencia al siguiente documento:

D1: US 6 403 830 B2 (R.K. Webber, et al.) 11 de junio de 2002

**2. Materia**

La presente solicitud se relaciona con una forma cristalina de hidrocloreuro de S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína maleato caracterizada por al menos una entre varias propiedades físicas (reivindicaciones 1-3) y el uso farmacéutico de este compuesto como inhibidores de la óxido nítrico reductasa inducible (reivindicaciones 4,5). También se relaciona con un método de producir un hidrocloreuro de S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína maleato cristalino, aglomerado, compactado y generalmente ordenado (reivindicaciones 6-15).

**3. Novedad**

El documento D1 describe la S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína (ejemplo 20) y varias de sus sales, incluyendo varios hidrocloreuros (ejemplos 1, 21-23, 32, 58, tabla 5) y un hidrato de maleato (tabla 8, línea 7). Sin embargo, no se menciona la sal de hidrocloreuro de maleato mezclada en D1 o en ninguna otra parte del estado de la técnica anterior. De manera consecuente, la materia encontrada en la reivindicación 1 es considerada novedosa y por lo tanto cumplen con los requisitos establecidos en el Artículo 33(2) del PCT.

La materia de las reivindicaciones independientes 4-6 se relacionan con el uso y preparación de la sal de la reivindicación 1 y por lo tanto

también es novedosa y cumple con los requisitos establecidos en el Artículo 33(2) del PCT.

7/13

#### **4. Nivel Inventivo**

4.1 D1 es considerado como la anterioridad más cercana a la materia encontrada en las reivindicaciones 1, 4 y 5, y divulga la S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína (ejemplo 20) y varias de sus sales (ver el párrafo 3 arriba). Estos compuestos demuestran ser inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *sigla en inglés*) (columna 2, líneas 40-50; tabla 9). En particular, la sal hidrato de maleato está descrita en D1 (tabla 8, línea 7).

El compuesto de la presente solicitud difiere del compuesto del estado de la técnica anterior debido a que el agua en la estructura cristalina de la última ha sido reemplazada por hidrocloreuro. No es posible determinar cual es el efecto técnico de este reemplazo, puesto que no se proporciona ningún dato farmacológico u otro tipo de dato para ninguno de los compuestos. El problema a resolverse por las presentes reivindicaciones 1, 4 y 5 es por lo tanto el suministro de sales alternas de S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína que inhiban óxido nítrico sintasa inducibles.

El solicitante resuelve este problema por medio de la sal de hidrocloreuro de maleato de la reivindicación 1. Puesto que varias otras sales de S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína demuestran en D1 ser inhibidores de las óxido nítrico sintasa inducibles (iNOS), aquel experto en el estado de la técnica esperaría que la sal de hidrocloreuro de maleato también sería un inhibidor de las iNOS. De manera consecuente, la materia de las reivindicaciones 1, 4 y 5 no pueden considerarse en tener nivel inventivo y no cumple con los requisitos establecidos en el Artículo 33(3) del PCT.

Las reivindicaciones dependientes 2 y 3 no contienen ninguna característica la cual, al combinarse con las características de cualquier reivindicación al cual se refieren, cumplen con los requisitos establecidos por el Artículo 33(3) del PCT con respecto al nivel inventivo, puesto que el experto en el estado de la técnica esperaría que la sal de hidrocloreuro de maleato en forma de cristales aglomerados sería un inhibidor de las iNOS.

4.2. La reivindicación independiente 6 se refiere a un método para producir un aglomerado generalmente compactado de manera ordenada de hidrocloreuro de S-[2-[(1-iminoetil)amino]-etil]-2-metil-L-cisteína maleato cristalino mediante una cristalización en un sistema de dos solventes. Este método es considerado normal en el estado de la técnica. De manera consecuente, la materia de la reivindicación 6 no puede considerarse en tener nivel inventivo y no cumple con los requisitos establecidos en el Artículo 33(3) del PCT.

El reconocimiento de nivel inventivo para el proceso de la reivindicación 6 depende del establecimiento del nivel inventivo en el producto final.

214

**5. Aplicación Industrial**

Para la evaluación de la reivindicación 5 de la presente, sobre si es industrialmente aplicable, no existen criterios unificados en los Estados pertenecientes al PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable aquella materia que reivindique el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero permite, sin embargo, reivindicar sobre un compuesto conocido para primero uso en tratamiento médico y el uso de tal compuesto en la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

|                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                        |                                                                                                                 |                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>To:</b><br><br><b>LUMB, J., Trevor</b><br><b>Pfizer Inc.</b><br><b>P.O. Box 1027</b><br><b>St. Louis, MO 63006</b><br><b>ETATS-UNIS D'AMERIQUE</b> |                                                                        | <b>RECEIVED</b><br><b>MAR 17 2005</b><br><b>PHARMACIA</b><br><b>GLOBAL PATENT DEPT.</b><br><b>ST. LOUIS, MO</b> | <b>NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF</b><br><b>THE INTERNATIONAL PRELIMINARY</b><br><b>REPORT ON PATENTABILITY</b><br><b>(PCT Rule 71.1)</b> |
|                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                        | <b>Date of mailing</b><br><b>(day/month/year)</b> <b>07.03.2005</b>                                             |                                                                                                                                           |
| <b>Applicant's or agent's file reference</b><br><b>63006</b>                                                                                                                                                                           |                                                                        | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>                                                                                   |                                                                                                                                           |
| <b>International application No.</b><br><b>PCT/B2004/000678</b>                                                                                                                                                                        | <b>International filing date (day/month/year)</b><br><b>04.03.2004</b> | <b>Priority date (day/month/year)</b><br><b>11.03.2003</b>                                                      |                                                                                                                                           |
| <b>Applicant</b><br><b>PHARMACIA CORPORATION</b>                                                                                                                                                                                       |                                                                        |                                                                                                                 |                                                                                                                                           |

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

#### 4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Name and mailing address of the International preliminary examining authority:</b><br><br><b>European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2</b><br><b>NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas</b><br><b>Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl</b><br><b>Fax: +31 70 340 - 3016</b> | <b>Authorized Officer</b><br><b>Cardenas, C</b><br><b>Tel. +31 70 340-3370</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

2/6

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                 |                                                                                                                                                                    |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>3300/8</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                       |                                                                                                                                                                    | See Form PCT/PEAA/16 |
| International application No.<br><b>PCT/B2004/000678</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | International filing date (day/month/year)<br><b>04.03.2004</b> | Priority date (day/month/year)<br><b>11.03.2003</b>                                                                                                                |                      |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br><b>C07C323/59, A61K31/198, A61P29/00, C07C319/28</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                 |                                                                                                                                                                    |                      |
| Applicant<br><b>PHARMACIA CORPORATION</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                 |                                                                                                                                                                    |                      |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).</p> |                                                                 |                                                                                                                                                                    |                      |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the opinion</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                 |                                                                                                                                                                    |                      |
| Date of submission of the demand<br><br><b>27.09.2004</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                 | Date of completion of this report<br><br><b>07.03.2005</b>                                                                                                         |                      |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br> European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas<br>Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl<br>Fax: +31 70 340 - 3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                 | Authorized Officer<br><br>English, R<br><br>Telephone No. +31 70 340-2880<br> |                      |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/IB2004/000678

**Box No. I Basis of the report**

1. With regard to the language, this report is based on the International application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
  - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
  - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements\* of the International application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

**Description, Pages**

1-66 as originally filed

**Claims, Numbers**

1-15 as originally filed

**Drawings, Sheets**

1/11-11/11 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing *(specify)*:
  - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing *(specify)*:
  - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

\* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/IB2004/000678

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 5

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 5 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

**see separate sheet**

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATI NAL PRELIMINARY REP RT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/IB2004/000678

9/11

**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

|                               |             |          |
|-------------------------------|-------------|----------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 1-15     |
|                               | No: Claims  |          |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |          |
|                               | No: Claims  | 1-15     |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-4,6-15 |
|                               | No: Claims  |          |

**2. Citations and explanations (Rule 70.7):**

**see separate sheet**

**Re Item III**

**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. Claim 5 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of this claim (Article 34(4)(a)(I) PCT).

**Re Item V**

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following document:

D1: US 6 403 830 B2 (R.K. Webber, et al.) 11 June 2002

**2. Subject-matter**

The present application concerns a crystalline form of S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride characterised by at least one of a number of physical properties (claims 1-3) and the pharmaceutical use of this compound as inhibitors of inducible nitric oxide reductase (claims 4,5). It also concerns a method of making a generally ordered packed agglomerate crystalline S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride (claims 6-15).

**3. Novelty**

Document D1 describes S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine (example 20) and a number of its salts, including various hydrochlorides (examples 1,21-23,32,58, table 5) and a maleate hydrate (table 8, 7th entry). However, there is no mention of the mixed maleate hydrochloride salt in D1 or anywhere else in the prior art. Consequently, the subject-matter of claim 1 is considered to be new and to satisfy the requirements of Article 33(2) PCT.

The subject-matter of independent claims 4-6 concern the use and preparation of the salt of claim 1 and is therefore also new and satisfies the requirements of Article 33(2) PCT.

**4. Inventive step**

- 4.1** The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1,4,5, and discloses S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cystein and a number of its salts (see paragraph 3, above). These compounds are shown to be iNOS inhibitors (column 2, lines 40-50; table 9). In particular the maleate hydrate salt is described in D1 (table 8, 7th entry).

The compound of the present application differs from the prior art compound in that the water in the crystal structure of the latter has been replaced by hydrogen chloride. It is not possible to determine what the technical effect of this replacement is, since no pharmacological or other data are provided for either compound. The problem to be solved by the present claims 1,4,5 is therefore the provision of alternative salts of S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine which inhibit iNOS.

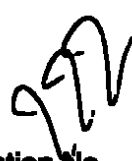
The applicant solves this problem by means of the maleate hydrochloride salt of claim 1. Since various other salts of S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine are shown in D1 to be inhibitors of iNOS, the person skilled in the art would expect that the maleate hydrochloride salt would also be an inhibitor of iNOS. Consequently, the subject-matter of claims 1,4,5 cannot be considered to involve an inventive step and does not satisfy the requirements of Article 33(3) PCT.

Dependent claims 2,3 do not contain any features which, in combination with the features of the claim to which it refer, meet the requirements of the PCT in respect inventive step, since the person skilled in the art would also expect that the maleate hydrochloride salt in the form of agglomerated crystals would be an inhibitor of iNOS.

- 4.2** Independent claim 6 concerns a method for making a generally orderly packed agglomerate of crystalline S-[2-[(1-iminoethyl)amino]-ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride by crystallisation in a two-solvent system. This method is considered to be normal in the art. Consequently, the subject-matter of claim 6 cannot be considered to involve an inventive step and does not satisfy the requirements of Article 33(3) PCT.

Recognition of inventive step for the process of claim 6 depends on the

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY  
(SEPARATE SHEET)**

International application No. 

**PCT/IB2004/000678**

establishment of inventive step for the end product.

**5 Industrial applicability**

For the assessment of the present claim 5 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2004/000678

24

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |            |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|------------|
| US 6403830                                | B2                  | 14-02-2002                 | US 2002019563 A1    | 14-02-2002 |
|                                           |                     | AU 4774501 A               | 08-10-2001          |            |
|                                           |                     | AU 4941501 A               | 08-10-2001          |            |
|                                           |                     | BR 0109386 A               | 15-04-2003          |            |
|                                           |                     | CA 2402199 A1              | 04-10-2001          |            |
|                                           |                     | CA 2402436 A1              | 04-10-2001          |            |
|                                           |                     | CN 1419539 T               | 21-05-2003          |            |
|                                           |                     | EP 1265859 A2              | 18-12-2002          |            |
|                                           |                     | EP 1265860 A1              | 18-12-2002          |            |
|                                           |                     | JP 2003528852 T            | 30-09-2003          |            |
|                                           |                     | JP 2003528853 T            | 30-09-2003          |            |
|                                           |                     | WO 0172702 A2              | 04-10-2001          |            |
|                                           |                     | WO 0172703 A1              | 04-10-2001          |            |
|                                           |                     | US 2003199701 A1           | 23-10-2003          |            |
|                                           |                     | US 2002111493 A1           | 15-08-2002          |            |
|                                           |                     | ZA 200206455 A             | 13-08-2003          |            |
|                                           |                     | ZA 200206459 A             | 13-08-2003          |            |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/IB2004/000678

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C323/59 A61K31/198 A61P29/00 C07C319/28

223

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPO

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A          | US 6 403 830 B2 (R.K. WEBBER, ET AL.)<br>11 June 2002 (2002-06-11)<br>cited in the application<br>column 2, line 40 - column 4, line 21<br>table 8, 7th entry (maleic acid); claims<br>1,8<br>----- | 1-15                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 June 2004

Date of mailing of the international search report

02 07 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

English, R

## REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

|                                                                                                              | USUARIO | RADICADOR |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| <b>PATENTE DE INVENCION</b>                                                                                  | ( )     | ( )       |
| <b>MODELO DE UTILIDAD</b>                                                                                    | ( )     | ( )       |
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                                                 | ( )     | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| - Descripción de la invención.                                                                               | ( )     | ( )       |
| - Dibujos de ser estos pertinentes.                                                                          | ( )     | ( )       |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| <b>COMPLETA</b> ( )                                                                                          |         |           |
| <b>INCOMPLETA</b> ( )                                                                                        |         |           |
| <b>DISEÑO INDUSTRIAL</b> ( )                                                                                 |         |           |
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial                                             | ( )     | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.                         | ( )     | ( )       |
| - Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | ( )     | ( )       |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                              | ( )     | ( )       |
| <b>COMPLETA</b> ( )                                                                                          |         |           |
| <b>INCOMPLETA</b> ( )                                                                                        |         |           |
| <b>ESQUEMA DE TRAZADO</b> ( )                                                                                |         |           |
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.                                           | ( )     | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.                         | ( )     | ( )       |
| - Representación gráfica del esquema de trazado                                                              | ( )     | ( )       |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| <b>COMPLETA</b> ( )                                                                                          |         |           |
| <b>INCOMPLETA</b> ( )                                                                                        |         |           |

Firma Responsable:

Fecha:

*[Firma]*  
2005-09-09

Folio ~~205~~ 226

2020  
Bogotá DC

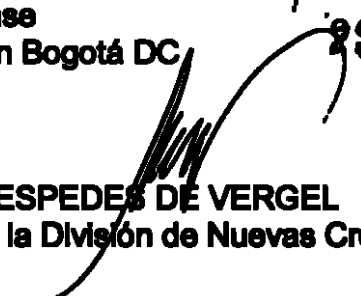
Doctor(a)  
**CARLOS R. OLARTE**  
Apoderado(a) y/o Representante  
**PHARMACIA CORPORATION**

|                    |                                          |                          |
|--------------------|------------------------------------------|--------------------------|
| <b>REFERENCIA:</b> | <b>Radicación No.</b>                    | <b>05 91013</b>          |
|                    | <b>Solicitud Internacional</b>           | <b>PCT/IB2004/000678</b> |
|                    | <b>Fecha límite inicio fase Nacional</b> | <b>11 - 10 - 2005</b>    |
|                    | <b>Trámite</b>                           | <b>011</b>               |
|                    | <b>Evento</b>                            | <b>379</b>               |
|                    | <b>Actuación</b>                         | <b>416</b>               |
|                    | <b>Oficio No.</b>                        | <b>1508</b>              |
|                    | <b>Folios</b>                            | <b>001</b>               |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC

29 NOV. 2005

  
**ALIX CESPEDES DE VERGEL**  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Al contestar favor Indique el número de  
radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10  
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220  
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69  
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165  
Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
Bogotá D.C. - Colombia