



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 001**

51 Int. Cl.:
C07C 323/59 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07C 319/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04717188 .9**
96 Fecha de presentación : **04.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1603872**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2(1-iminoetil)etil]-2-metil-L-cisteína.**

30 Prioridad: **11.03.2003 US 453496 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2011

73 Titular/es: **PHARMACIA CORPORATION**
100 Route 206 North
Peapack, New Jersey 07977, US

72 Inventor/es: **Sheikh, Ahmad;**
Brostrom, Lyle, R.;
Czyzewski, Ann, M. y
Zia, Vahid

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 001 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína

Campo de la invención

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

La S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se describe y reivindica en la Patente de Estados Unidos de cesión común con número 6.403.830.

Antecedentes de la invención

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso bioactivo, producido por una cualquiera de las diversas isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La actividad fisiológica de lo que posteriormente se identificó como NO se descubrió inicialmente a principios de los años 80 cuando se encontró que la relajación vascular provocada por acetil colina era dependiente de la presencia del endotelio vascular. El factor derivado del endotelio, denominado entonces factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), que media dicha relajación vascular, se sabe ahora que es NO que se genera en el endotelio vascular por una isoforma de NOS. La actividad de NO como vasodilatador se ha conocido desde hace más de 100 años. Además, el NO es la especie activa derivada de los nitrovasodilatadores conocidos incluyendo amilnitrito y gliceriltrinitrato. El óxido nítrico es también un estimulante endógeno de guanilato ciclasa soluble (GMPc) y, de esta manera, estimula la producción de GMPc. Cuando NOS se inhibe por N-monometilarginina (L-NMMA), la formación de GMPc se evita completamente. Además de la relajación dependiente del endotelio, se sabe que el NO está implicado en numerosas acciones biológicas incluyendo citotoxicidad de las células fagocíticas y la comunicación de célula a célula en el sistema nervioso central.

La identificación de EDRF como NO coincide con el descubrimiento de una ruta bioquímica mediante la cual el NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la enzima NO sintasa. Hay al menos tres tipos de NO sintasa como sigue:

- (i) una enzima constitutiva dependiente de Ca^{++} /calmodulina, localizada en el cerebro, que libera NO como respuesta al receptor o estimulación física;
- (ii) una enzima independiente de Ca^{++} , una proteína de 130 kD que se induce después de la activación del músculo liso vascular, macrófagos, células endoteliales y un número de otras células por endotoxinas y citoquinas; y
- (iii) una enzima constitutiva, dependiente de Ca^{++} /calmodulina, localizada en el endotelio, que libera NO como respuesta al receptor o estimulación física.

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

De esta manera, la inhibición de la producción excesiva de NO por 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 que cualquier inhibidor de NOS que se use para tratar la inflamación sea selectivo para iNOS, de manera que la modulación fisiológica normal de la presión sanguínea por el NO generado por eNOS y la transmisión neuronal no adrenérgica y no colinérgica por el NO generado por nNOS permanezcan sin afectar.

Con todos los compuestos farmacéuticos y composiciones, la estabilidad química y física de un compuesto farmacéutico es importante en el desarrollo comercial de esta sustancia farmacéutica. Dicha estabilidad incluye la estabilidad en condiciones ambiente, especialmente en condiciones de humedad y almacenamiento. La estabilidad elevada en diferentes condiciones de almacenamiento es necesaria para predecir las diferentes condiciones de almacenamiento posibles durante la vida útil de un producto comercial. Un fármaco estable evita el uso de condiciones de almacenamiento especiales así como una restitución de inventario frecuente. Un compuesto farmacéutico debe ser estable también durante el procedimiento de fabricación, que a menudo requiere la molienda del fármaco para conseguir un material farmacéutico con un tamaño de partícula y área superficial uniforme. Los materiales inestables a menudo experimentan cambios polimórficos. Por lo tanto, cualquier modificación de una sustancia farmacéutica que potencie su perfil de estabilidad proporciona un beneficio significativo respecto a las sustancias menos estables.

Se han descrito diversos inhibidores de iNOS, tales como por ejemplo, S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, que se describe y reivindica en la Patente de Estados Unidos de cesión común 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-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

5 **Breve descripción de los dibujos**

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

10 La **Figura 2** es un gráfico de un estudio de calorimetría de barrido diferencial de una muestra (**Ejemplo 11**) de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína;

La **Figura 3** es una representación termogravimétrica de una muestra (**Ejemplo 11**) de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína;

La **Figura 4** es una representación de un estudio de absorción de humedad de una muestra (**Ejemplo 10**) de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína;

15 La **Figura 5** muestra un espectro Raman de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína obtenido a partir de una muestra del **Ejemplo 20**;

La **Figura 6** es una fotomicrografía del clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína del **Ejemplo 9**;

20 La **Figura 7** son dos dibujos SEM de los aglomerados envasados aleatoriamente de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína obtenidos del **Ejemplo 9**, la **Figura 7A** muestra la forma generalmente aleatoria de los aglomerados, mientras que la **Figura 7B** muestra el empaquetado aleatorio de los cristales dentro de los aglomerados;

25 La **Figura 8** muestra diversos dibujos SEM de los aglomerados empaquetados ordenadamente de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína preparado por un procedimiento de cristalización QESD con siembra y obtenido a partir del **Ejemplo 20**;

La **Figura 9** muestra dos dibujos SEM de aglomerados empaquetados ordenadamente de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína preparado por un procedimiento de cristalización QESD con siembra *in situ* y obtenido a partir del **Ejemplo 23**, la **Figura 9A** muestra la forma generalmente cilíndrica mientras que la **Figura 9B** muestra los cristales generalmente ordenados;

30 La **Figura 10** es un diagrama x-T conceptual para un sistema ternario que presenta comportamiento LLPS para una cantidad fija de anti-disolvente;

La **Figura 11** es un diagrama que muestra las superficies coexistentes a temperatura constante para un sistema ternario.

35 La **Figura 12** muestra un gráfico de la distribución del tamaño de partícula de aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína;

La **Figura 13** es un gráfico que representa la dureza del comprimido como una función de la fuerza de compresión;

La **Figura 14** es un gráfico que representa el espesor del comprimido como una función de la fuerza de compresión; y

La **Figura 15** es una representación gráfica del tiempo de disgregación del comprimido.

40 **Sumario de la invención**

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 diseños del procedimiento de cristalización nuevos y mecanísticamente diferentes para adaptar las propiedades físicas volumétricas durante la preparación del nuevo compuesto de sal, a un procedimiento para preparar composiciones farmacéuticas y a dicho nuevo compuesto de sal cristalina mixta y a composiciones para su uso en procedimientos para inhibir o modular la síntesis de óxido nítrico en un sujeto en necesidad de dicha inhibición o modulación, administrando una sal de un compuesto que preferentemente inhibe o modula la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa respecto a las isoformas constitutivas de la óxido nítrico sintasa. El presente compuesto de sal posee actividad inhibidora de óxido nítrico sintasa útil y se espera que sea útil en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección en la que la síntesis o sobresíntesis del óxido nítrico forma una parte contribuyente.

Estequiométricamente, la nueva sal son 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 está caracterizada por algunas o todas las siguientes mediciones físicas: análisis elemental (tal como por análisis de combustión), punto de fusión y calor de fusión (calorimetría de barrido diferencial y análisis termogravimétrico), índices de refracción (microscopía de luz polarizada), patrón de difracción de polvo de rayos X, espectroscopía Raman y absorción de humedad (por ejemplo, equilibrio de humedad DVS).

La presente nueva sal puede usarse para tratar enfermedades que impliquen degeneración del cartílago, que tiene lugar en ciertas afecciones tales como artritis. Por consiguiente, las afecciones en las que existe una ventaja en la inhibición de la producción de NO a partir de L-arginina incluyen afecciones artríticas tales como artritis reumatoide, artrosis, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis séptica, espondiloartritis, artritis reumática aguda, artritis enteropática, artritis neuropática y artritis piogénica. Además, la depresión inducida por NO de la respiración de los condrocitos podría modular la pérdida de matriz y la mineralización de cartílago secundaria en la artritis, en particular en la artrosis.

Otras afecciones para las que la presente sal mixta puede ser útil incluyen enfermedad inflamatoria o crónica del intestino, isquemia cardiovascular, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, aterosclerosis, migraña, glaucoma, aneurisma aórtico, esofagitis por reflujo, diarrea, síndrome de colon irritable, fibrosis quística, enfisema, asma, bronquiectasia, hiperalgesia, isquemia cerebral, ictus trombotico, isquemia global (secundaria a parada cardíaca), 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 puede ser útil una inhibición de NO incluyen degeneración nerviosa y/o necrosis de nervios en trastornos tales como hipoxia, hipoglucemia, epilepsia y en heridas externas (tales como lesión craneal y de la médula espinal), 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, retraso mental moderado relacionado con un trastorno de los vasos cerebrales, trastornos del sueño, esquizofrenia, depresión, depresión u otras síntomas asociados con síndrome premenstrual (SPM), ansiedad y choque séptico.

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

Todavía otros trastornos que pueden tratarse por inhibición de la producción de NO con la presente sal mixta incluyen tolerancia a opiáceos en pacientes que necesiten analgésicos opiáceos prolongados y tolerancia a benzodiazepina en pacientes que tomen benzodiazepinas y otros comportamientos adictivos, por ejemplo, trastornos de la alimentación y por nicotina. La presente sal mixta también puede ser útil como agente antibacteriano.

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

La presente sal mixta también puede ser útil en el tratamiento de afecciones oculares (tales como hipertensión ocular, retinitis uveítis), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, reestenosis, secuelas inflamatorias de infecciones víricas, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por oxidante, terapia con IL-2 tal como en un paciente con cáncer, caquexia, inmunosupresión tal como en la terapia de trasplantes, trastornos de la motilidad gastrointestinal, quemaduras solares, eccema, psoriasis, gingivitis, pancreatitis, daños en el tracto gastrointestinal resultantes de infecciones, fibrosis quística, tratamiento para un sistema inmune disfuncional, tal como un adyuvante para inmunosupresión a corto plazo en la terapia de trasplante de órganos, inducción del parto, poliposis adenomatosa, control del crecimiento de tumores, quimioterapia, quimioprevención y bronquitis.

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

Aparte de ser útil para el tratamiento de seres humanos, esta forma también es útil para el 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.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento”, como se usan en el presente documento, incluyen el tratamiento profiláctico, paliativo o reparador.

- 5 La expresión “cantidad eficaz” significa una dosis que conduce al tratamiento. Una cantidad eficaz puede administrarse en una sola dosis o en dosis divididas durante un periodo de tiempo.

El término “ACN” significa acetonitrilo.

- 10 El término “amorfo” como se aplica a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en el presente documento se refiere a un estado sólido en el que las moléculas de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína están presentes en una disposición desordenada y no forman una red cristalina distinguible o celdilla unitaria. Cuando se somete a difracción de rayos X de polvo, la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína amorfa no produce ningún pico cristalino característico.

- 15 La expresión “forma cristalina”, como se aplica a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en el presente documento, se refiere a una forma en estado sólido en la que las moléculas de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína están dispuestas para formar una red cristalina distinguible (i) que comprende celdillas unitarias distinguibles y (ii) que produce picos de difracción cuando se somete a radiación de rayos X.

- 20 Las expresiones “Forma I del 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 “Forma I” significan todas Forma I de la sal cristalina de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, como se describe más completamente en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos en trámite junto con la presente 2004/0204488.

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 la sal cristalina de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, como se describirá más completamente en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos en trámite junto con la presente 2004/0209956.

- 25 Las expresiones “clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína”, “clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína” y “sal mixta” se refieren todas a la forma cristalina del clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína que tiene estequiométricamente 1 mol de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína por 0,5 moles de maleato y 0,5 moles de HCl, como se describirá más completamente en el presente documento.

- 30 El término “cristalización”, como se usa en el presente documento, puede referirse a cristalización y/o recristalización dependiendo de las circunstancias aplicables relacionadas con la preparación del material de partida para la S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

El término “API”, como se usa en el presente documento, significa ingrediente farmacéutico activo.

El término “bis”, como se usa en el presente documento, significa *N,N'*-metilen-bis-acrilamida.

- 35 El término “agua DI”, como se usa en el presente documento, significa agua desionizada.

El término “DMF”, como se usa en el presente documento, significa *N,N*-dimetilformamida.

El término “D/A/A” se refiere a un sistema disolvente ternario de *N,N*-dimetilformamida (DMF), agua y acetonitrilo.

- 40 La expresión “sustancia farmacéutica de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína”, como se usa en el presente documento, significa S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína *per se*, como se califica en el contexto en el que se usa el término, y puede referirse a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína no formulada o S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína presente como un ingrediente de una composición farmacéutica.

El término “DSC” significa calorimetría de barrido diferencial.

Los términos “ ΔH_{fus} ” o “ ΔH_{fus} ” significan la entalpía de fusión de una sustancia, y se refieren a la energía (medida en kilojulios (kJ)) requerida para fundir un gramo de la sustancia a la temperatura de su punto de fusión.

- 45 El término “HPLC” significa cromatografía líquida de alta presión.

El término “IR” significa infrarrojo.

El término “kN” significa kilonewtons.

El término “kP” significa kilopondios.

El término “ ρ ” o rho, como se usa en el presente documento, se refiere a densidad.

El término “ ρ_v ” significa densidad volumétrica.

El término “ ρ_d ” significa densidad aparente.

El término “ IC ” significa Índice de Compresibilidad, como se define por la fórmula:

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

5

El término “RMN” significa resonancia magnética nuclear y puede aplicarse a espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

El término “ml” significa mililitros.

El término “mg” significa miligramos.

10 El término “g” significa gramos

El término “kg” significa kilogramos

El término “ μg ” significa microgramos

El término “ μl ” significa microlitros.

El término “min” significa minutos.

15 El término “PM” significa peso molecular.

El término “nucleación”, como se usa en el presente documento, significa la formación de cristales en una solución.

El término “Pureza” como se usa en el presente documento, a menos que se condicione de otra manera, significa la pureza química del clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de acuerdo con el ensayo de HPLC convencional.

20 El término “PXRD” significa difracción de rayos X de polvo.

El término “rpm” significa revoluciones por minuto.

El término “siembra”, como se usa en el presente documento, significa la adición de cristales a un sistema de cristalización para el fin de iniciar o potenciar la nucleación o actuar como sustrato para la cristalización adicional.

25 El término “aglomerados”, generalmente se refiere al empaquetamiento aleatorio u ordenado de cristales individuales en unidades que no se destruyen fácilmente durante las operaciones energéticamente moderadas, tales como transferencia de sólidos.

El término “SEM” significa microscopía electrónica de barrido.

El término “TGA” significa análisis termogravimétrico.

El término “ T_m ” significa temperatura de fusión.

30 El término “zwitterión” o “ZW” significa una molécula que lleva una carga tanto positiva como negativa. El término “zwitterión libre” significa un zwitterión tal que la carga neta de la molécula es cero. A menos que se indique de otra manera, el término “zwitterión” y “ZW”, como se usa en el presente documento, significa zwitterión de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

35 La sal cristalina de clorhidrato de 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 la óxido nítrico sintasa, tal como, como un analgésico en el tratamiento del dolor y las cefaleas o como un antipirético para el tratamiento de la fiebre. Por ejemplo, la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína será útil para tratar la artritis, incluyendo, pero sin limitación, la artritis reumatoide, espondiloartropatías, artritis gotosa, artrosis, lupus eritematoso sistémico, artritis juvenil, artritis reumática aguda, artritis enteropática, artritis neuropática, artritis psoriásica y artritis piogénica. Las afecciones en las que la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína proporcionarán una ventaja en la inhibición de la producción de NO a partir de L-arginina incluyendo afecciones artríticas.

40

La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína será útil además en el

tratamiento del 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 inflamación posoperatoria, incluyendo de cirugía oftálmica tal como cirugía por cataratas y cirugía refractiva. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína también sería útil para tratar afecciones gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome de colon irritable y colitis ulcerosa.

La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería útil para la prevención o tratamiento del cáncer, tal como cáncer colorrectal y cáncer de la mama, pulmón, próstata, vejiga, cuello uterino y piel. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la invención sería útil en el tratamiento de la inflamación y los daños tisulares en enfermedades tales como enfermedades vasculares, cefaleas migrañosas, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, esclerodermia, fiebre reumática, diabetes tipo I, enfermedad de la unión neuromuscular, incluyendo miastenia grave, enfermedad de la materia blanca, incluyendo esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behcet, polimiositis, gingivitis, nefritis, hipersensibilidad, hinchazón que se produce después de una lesión, isquemia miocárdica y similares. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína también sería útil en el tratamiento de enfermedades oftálmicas, tales como glaucoma, retinitis, retinopatías, uveítis, fotofobia ocular, y de la inflamación y el dolor asociados con una lesión aguda en el tejido ocular. Es de interés particular entre los usos de la presente invención la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína el tratamiento del glaucoma, especialmente cuando los síntomas del glaucoma están causados por la producción de óxido nítrico, tal como en el daño nervioso mediado por óxido nítrico.

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

La sal cristalina de clorhidrato de 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 perjudiciales.

La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína también sería útil en el tratamiento de la rinitis alérgica, el síndrome de dificultad respiratoria, el síndrome de choque endotóxico y la aterosclerosis.

La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína también sería útil en el tratamiento del dolor, incluyendo, pero sin limitación, dolor posoperatorio, dolor dental, dolor muscular y dolor resultante de cáncer. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sería útil para la prevención de demencias, tal como la enfermedad de Alzheimer.

Aparte de ser útil para el tratamiento de seres humanos, la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína también sería útil para el 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 de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína también puede usarse en coterapias, parcialmente o completamente, en lugar de otras terapias antiinflamatorias convencionales, tal como junto con esteroides, AINE, inhibidores selectivos de COX-2, inhibidores de 5-lipooxigenasa, antagonistas de LTB₄ e inhibidores de LTA₄ hidrolasa.

Otras afecciones en las que la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención proporcionará una ventaja en la inhibición de NO incluyen isquemia cardiovascular, diabetes (tipo I o tipo II), insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, aterosclerosis, migraña, glaucoma, aneurisma aórtico, esofagitis por reflujo, diarrea, síndrome de colon irritable, fibrosis quística, enfisema, asma, bronquiectasia, hiperalgesia (alodinia), isquemia cerebral (tanto isquemia focal como ictus trombótico) e isquemia global (por ejemplo, secundaria a parada cardíaca), esclerosis múltiple y otros trastornos del sistema nervioso central mediados por NO, por ejemplo, enfermedad de Parkinson. Los trastornos neurodegenerativos adicionales en los que la inhibición de NO puede ser útil incluyen degeneración nerviosa o necrosis de nervios en trastornos tales como hipoxia, hipoglucemia, epilepsia y en casos de traumatismo del sistema nervioso central (SNC) (tales como lesión craneal y de médula espinal), 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, retraso mental moderado relacionado con un trastorno de los vasos cerebrales, trastornos del sueño, esquizofrenia, depresión, depresión u otros síntomas asociados con síndrome premenstrual (SPM), ansiedad y choque séptico.

La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención

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

Todavía otros trastornos o afecciones que se tratarán ventajosamente mediante la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención incluyen el tratamiento o la prevención de la tolerancia a opiatos en pacientes que necesiten analgésicos opiatos prolongados y la tolerancia a benzodiazepina en pacientes que tomen benzodiazepinas, y otros comportamientos adictivos, por ejemplo, adicción a nicotina, alcoholismo y trastornos de la alimentación.

La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención también será útil en el tratamiento o la prevención de los síntomas de abstinencia farmacológica, por ejemplo, el tratamiento o prevención de los síntomas de la abstinencia de opiatos, alcohol o adicción a tabaco.

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

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

La presente invención se refiere además a una sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención para su uso en el tratamiento y la prevención de neoplasias. Las neoplasias que serán tratables o prevenibles mediante la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y procedimientos de la presente invención incluyen cáncer cerebral, cáncer de hueso, una leucemia, un linfoma, neoplasia derivada de células epiteliales (carcinoma epitelial) tal como carcinoma de células basales, adenocarcinoma, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de labios, 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 pulmonar, cáncer de mama y cáncer de piel, tal como cánceres de células basales y células escamosas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales y otros cánceres conocidos que afectan a las células epiteliales por todo el cuerpo. Preferentemente, la neoplasia a tratar se selecciona de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, 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 sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína Forma II también puede usarse para tratar la fibrosis que aparece con la terapia de radiación. La presente sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y procedimientos pueden usarse para tratar a sujetos que tengan pólipos adenomatosos, incluyendo aquellos con poliposis adenomatosa familiar (PAF). Además, la presente sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede usarse para prevenir que se formen pólipos en pacientes en riesgo de PAF.

El tratamiento conjunto de una sal cristalina de clorhidrato de 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 como alternativa reducirá los efectos secundarios tóxicos asociados con la quimioterapia reduciendo la dosis terapéutica del agente causante de efectos secundarios necesario para la eficacia terapéutica, o reduciendo directamente los síntomas de efectos secundarios tóxicos causados por el agente causante de efectos secundarios. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención será útil además como adyuvante a la terapia de radiación para reducir los efectos secundarios o aumentar la eficacia.

En la presente invención, otro agente que puede combinarse terapéuticamente con la sal cristalina de clorhidrato de 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"). Preferentemente, dichos agentes de inhibición de COX-2 inhiben la COX-2 selectivamente respecto a la enzima ciclooxigenasa-1 ("COX-1"). Se sabe que dicho inhibidor de COX-2 es un "inhibidor selectivo de COX-2". Los inhibidores selectivos de COX-2 útiles en la combinación terapéutica con la sal cristalina de clorhidrato de 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; descrito en la Solicitud de Patente PCT Nº WO 00/24719), o meloxicam. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención también puede usarse ventajosamente en la combinación terapéutica con un profármaco de un inhibidor selectivo de COX-2, por ejemplo, parecoxib.

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

- Alfa-difluorometilomitina (DFMO), 5-FU-fibrinógeno, ácido acantifólico, aminotiadiazol, brequinar sódico, carmofur, Ciba-Geigy CGP-30694, ciclopentil citosina, estearato de fosfato de citarabina, conjugados de citarabina, Lilly DATHF, Merrel Dow DDFC, dezaguanina, didesoxicitidina, didesoxiguanosina, didox, Yoshitomi DMDC, doxifluridina, Wellcome EHNA, Merck & Co. EX-015, fazarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, 5-fluorouracilo, *N*-(2'-furanidil)-5-fluorouracilo, Daiichi Seiyaku FO-152, isopropil pirrolizina, Lilly LY-188011, Lilly LY-264618, metobenzaprim, metotrexato, Wellcome MZPES, norespermidina, NCI NSC-127716, NCI NSC-264880, NCI NSC-39661, NCI NSC-612567, Warner-Lambert PALA, pentostatina, piritrexim, plicamicina, Asahi Chemical PL-AC, Takeda TAC-788, tioguanina, tiazofurina, Erbamont TIF, trimetrexato, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de tirosina proteína quinasa, Taiho UFT, uricitina, Shionogi 254-S, análogos de aldofosfamida, altretamina, anaxirona, Boehringer Mannheim BBR-2207, bestrabucilo, budotitano, Wakunaga CA-102, carboplatino, carmustina, Chinoin-139, Chinoin-153, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, American Cyanamid CL-286558, Sanofi CY-233, ciplatato, Degussa D-19-384, Sumimoto DACHP(My)2, difenilespiromustina, diplatino citostático, derivados de distamicina Erba, Chugai DWA-2114R, ITI E09, elmustina, Erbamont FCE-24517, fosfato sódico de estramustina, fotemustina, Unimed G-6-M, Chinoin GYKI-17230, hepsulfam, ifosfamida, iproplatino, lomustina, mafosfamida, mitolactol, Nippon Kayaku NK-121, NCI NSC-264395, NCI NSC-342215, oxaliplatino, Upjohn PCNU, prednimustina, Proter PTT-119, ranimustina, semustina, SmitKline SK&F-101772, Yakult Honsha SN-22, espiromustina, Tanabe Seiyaku TA-077, taumustina, temozolomida, teroxirona, tetraplatino, trimelamol, Taiho 4181-A, aclarubicina, actinomicina D, actinoplanona, Erbamont ADR-456, derivado de aeroplisinina, Ajinomoto AN-201-II, Ajinomoto AN-3, anisomicinas Nippon Soda, antraciclina, azinomicina-A, bisucaberina, Bristol-Myers BL-6859, Bristol-Myers BMY-25067, Bristol-Myers BMY-25551, Bristol-Myers BMY-26605, Bristol-Myers BMY-27557, Bristol-Myers BMY-28438, sulfato de bleomicina, briostatina-1, Taiho C-1027, caliquemicina, cromoximicina, dactinomicina, daunorubicina, Kyowa Hakko DC-102, Kyowa Hakko DC-79, Kyowa Hakko DC-88A, Kyowa Hakko DC89-A1, Kyowa Hakko DC92-B, ditrisarubicina B, Shionogi DOB-41, doxorubicina, doxorubicina-fibrinógeno, elsamicina-A, epirubicina, erbstatina, esorubicina, esperamicina-A1, esperamicina-Alb, Erbamont FCE-21954, Fujisawa FK-973, fostriecina, Fujisawa FR-900482, glidobactina, gregatina-A, grincamicina, herbimicina, idarubicina, iludinas, kazuamicina, kesarirodinas, 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, menogarilo, mitomicina, mitoxantrona, SmitKline M-TAG, neoenactina, Nippon Kayaku NK-313, Nippon Kayaku NKT-01, SRI International NSC-357704, oxalisina, oxaunomicina, peplomicina, pilatina, pirarubicina, porotramicina, pirindamicina A, Tobishi RA-I, rapamicina, rizoxina, rodorubicina, sibanomicina, siwenmicina, Sumitomo SM-5887, Snow Brand SN-706, Snow Brand SN-07, sorangicina-A, esparsomicina, SS Pharmaceutical SS-21020, SS Pharmaceutical SS-7313B, SS Pharmaceutical SS-9816B, estefimicina B, Taiho 4181-2, talisomicina, Takeda TAN-868A, terpentecina, trazina, tricozarina A, Upjohn U-73975, Kyowa Hakko UCN-10028A, Fujisawa WF-3405, zorubicina Yoshitomi Y-25024, alfacaroteno, alfa-difluorometil-arginina, acitretina, Biotec AD-5, Kyorin AHC-52, alstonina, amonafida, anfetinilo, amsacrina, Angiostat, anquinomicina, antineoplaston A10, antineoplaston A2, antineoplaston A3, antineoplaston A5, antineoplaston AS2-1, Henkel APD, glicinato de afidicolina, asparaginasa, Avarol, baccharina, benfluron, benzotript, Ipsen-Beaufour BIM-23015, bisantreno, Bristo-Myers BMY-40481, Vestar boron-10, bromofosfamida, Wellcome BW-502, Wellcome BW-773, caracemida, clorhidrato de carmetizol, Ajinomoto CDAF, clorsulfaquinoxalona, Chemex CHX-2053, Chemex CHX-100, Warner-Lambert CI-921, Warner-Lambert CI-937, Warner-Lambert CI-941, Warner-Lambert CI-958, clarfenu, claviridenona, ICN compuesto 1259, ICN compuesto 4711, Contracan, Yakult Honsha CPT-11, crisnatol, curaderm, citochalasina B, citarabina, citocitina, Merz D-609, maleato DABIS, dacarbazina, dateliptinilo, didemina-B, éter de dihematoporfirina, dihidrolenperona, dinalina, distamicina, Toyo Farma DM-341, Toyo Farma DM-75, Daiichi Seiyaku DN-9693, eliprabina, acetato de eliptinio, Tsumura EPMTC, ergotamina, etopósido, etretinato, fenretinida, Fujisawa FR-57704, nitrato de galio, genkwadafina, Chugai GLA-43, Glaxo GR-63178, grifolán NMF-5N, hexadecilfosfocolina, Green Cross HO-221, homoharringtonina, hidroxurea, BTG ICRF-187, ilomofosina, isoglutamina, isotretinoína, Otsuka JI-36, Ramot K-477, Otsuka K-76COONa, Kureha Chemical K-AM, MECT Corp KI-8110, American Cyanamid L-623, leucorregulina, lonidamina, Lundbeck LU-23-112, Lilly LY-186641, NCI (US) MAP, maricina, Merrel Dow MDL-27048, Medco MEDR-340, merbarona, derivados de merocianina, metilnilinoacridina, Molecular Genetics MGI-136, minactivina, mitonafida, mitoquidona, mopidamol, motretinida, Zenyaku Kogyo MST-16, N-(retinilo)aminoácidos, Nissin Flour Milling N-021, deshidroalaninas *N*-aciladas, nafazatrom, Taisho NCU-190, derivado de nocodazol, Normosang, NCI DSC-145813, NCI NSC-361456, NCI NSC-604782, NCI DSC-95580, octreotida, Ono ONO-112, oquizanocina, Akzo Org-10172, pancreatistatina, pazeliptina, Warner-Lambert PD-111707, Warner-Lambert PD-115934, Warner-Lambert PD-131141, Pierre Fabre PE-1001, péptido D ICRT, piroxantrona, polihematoporfirina, ácido polipreico, porfirina Efamol, probimano, procarbazona, proglumida, proteasa nexina I Invitron, Tobishi RA-700, razoxano, Sapporo Breweries RBS, restrictina-P, reteliptina, ácido retinoico, Rhone-Poulenc RP-49532, Rhone-Poulenc RP-56976, SmitKline SK&F-104864, Sumitomo SM-108, Kuraray SMANCS, SeaPharm SP-10094, espatol, derivados de espirociclopropano, espirogermanio, Unimed, SS Pharmaceutical SS-554, estripoldinona, estipoldiona, Suntory SUN 0237, Suntory SUN 2071, superóxido dismutasa, Toyama T-506, Toyama T-680, taxol, Teijin TEI-0303, tenipósido, taliblastina, Eastman Kodak TJB-29, tocotrienol, Topostina, Teijin TT-82, Kyowa Hakko UCN-01, Kyowa Hakko UCN-1028, ucraina, Eastman Kodak USB-006, sulfato de vinblastina, vincristina, vindesina, vinestramida, vinorelbina, vintriptol, vinzolidina, witanolidas, Yamanouchi YM-534, 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 usarse en una terapia de combinación con la sal cristalina de

maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína Forma II de la presente invención incluyen AD-5, adchnon, análogos de amifostina, detox, dimesna, 1-102, MM-159, deshidroalaninas *N*-aciladas, TGF-Genentech, tiprotimod, amifostina, WR-151327, FUT-187, ketoprofeno transdérmico, nabumetona, superóxido dismutasa (Chiron) y superóxido dismutasa Enzon.

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

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

En otra combinación de la presente invención, la presente sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede usarse en la combinación terapéutica con un fármaco antihiperlipidémico o de disminución de los niveles de colesterol, tal como un fármaco antihiperlipidémico de benzotiapina o benzotiazepina. Pueden encontrarse ejemplos de fármacos antihiperlipidémicos de benzotiapina útiles en la presente combinación terapéutica de la invención en la Patente de Estados Unidos N° 5.994.391. Algunos fármacos antihiperlipidémicos de benzotiazepina se describen en el documento WO 93/16055. Como alternativa, el fármaco antihiperlipidémico o de disminución de los niveles de colesterol en combinación con un compuesto de la presente invención puede ser un inhibidor de la HMG Co-A reductasa. Los ejemplos de inhibidores de la HMG Co-A 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 N° WO 97/06802), ZD-4522 (N° CAS 147098-20-2 para la sal de calcio; N° CAS 147098-18-8 para la sal de sodio; descrito en la Patente Europea N° EP 521471), BMS 180431 (N° CAS 129829-03-4) o NK-104 (N° CAS 141750-63-2). La combinación terapéutica de la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención más un fármaco antihiperlipidémico o de disminución de los niveles 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 con frecuencia en sitios inflamados en los vasos sanguíneos. Se establece que el fármaco antihiperlipidémico o de disminución de los niveles de colesterol reduce el riesgo de formación de lesiones ateroscleróticas disminuyendo los niveles de lípidos en sangre. Sin limitar la invención a un solo mecanismo de acción, se cree que una forma en la que la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente combinación funcionará de acuerdo con el objetivo de proporcionar un control mejorado de lesiones ateroscleróticas es, por ejemplo, reduciendo la inflamación de los vasos sanguíneos de acuerdo con la disminución de los niveles de lípidos en sangre.

La presente sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede usarse 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 de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede usarse en combinación terapéutica con cafeína, un agonista 5-HT-1B/1D (por ejemplo, un triptán tal como sumatriptán, naratriptán, zolmitriptán, rizatriptán, almotriptán o frovatriptán), un antagonista de dopamina D4 (por ejemplo, sonepiprazol), aspirina, paracetamol, ibuprofeno, indometacina, naproxeno sódico, isometepteno, dicloralfenazona, butalbital, un alcaloide del ergot (por ejemplo, ergotamina, dihidroergotamina, bromocriptina, ergonovina o metil ergonovina), 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 metprolol) o un inhibidor de la monoamina oxidasa (por ejemplo, fenelzina o isocarboxacid).

La invención proporciona además una combinación terapéutica de la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención con un compuesto opioide. Los compuestos opioides útiles en esta combinación incluyen, sin limitación, morfina, metadona, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levorfanol, codeína, dihidrocodeína, dihidrohidroxicodona, pentazocina, hidrocodona, oxicodona, nalmefeno, etorfina, levorfanol, fentanilo, sufentanilo, DAMGO, butorfanol, buprenorfina, naloxona, naltrexona, CTOP, diprenorfina, beta-funaltrexamina, naloxonazina, nalorfina, pentazocina, nalbufina, naloxona benzoilhidrazona, bremazocina, etilcetociclazocina, U50.488, U69.593, espiradolina, norbinaltorfimina, naltrindol, DPDPE, [D-la², glu⁴] deltorfina, DSLET, met-enkefalina, leu-enkefalina, beta-endorfina, dinorfina A, dinorfina B y alfa-neoendorfina. Una ventaja de la combinación de la sal cristalina de clorhidrato de 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 de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la invención permitirá una reducción en la dosis del compuesto opioide, reduciendo de este modo el riesgo o la gravedad de efectos secundarios de opioides, tal como la adicción a opioides.

La invención proporciona además cuatro nuevos diseños de procedimientos de cristalización mecánicamente diferentes para la preparación de la sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención con características de polvo a granel adaptadas para facilitar la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos ilustrativos

Los procedimientos para preparar diclorhidrato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se conocen y se describen en la patente de Estados Unidos de cesión común con número 6.403.830. El zwitterión libre de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2004/0225150. La Forma I cristalina del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2004/0204498. La Forma II cristalina del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2004/0209956.

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

Los cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína son birrefringentes, con un alargamiento positivo cuando se analizan por microscopía de luz polarizada. La sal cristalina de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína tiene una solubilidad acuosa mayor de 150 mg ml⁻¹.

La **Figura 1** es un patrón de rayos x de polvo de dos muestras (**Ejemplos 9 y 20**) de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Ambos patrones de difracción ayudan a establecer picos característicos útiles para caracterizar el clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

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

La **Figura 4** es una representación de un estudio de absorción de humedad del clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La absorción de humedad del clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína a 25 °C por equilibrio de humedad DVS mostró una actualización de humedad de aproximadamente el 1,5% entre el 0 y el 70% de humedad relativa (H.R.). Entre el 70 y el 90% de H.R., otro 58% de humedad fue captado por los sólidos. Se supone que al 90% de H.R. la estructura cristalina se destruye para producir sólidos amorfos altamente higroscópicos. Durante el ciclo de desorción (del 90 al 30% de H.R.), estos sólidos se transforman en una mezcla de la forma II del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino y el zwitterión amorfo, con un exceso de cloruro de hidrógeno. El comportamiento de desorción y re-sorción posterior era muy similar a la de la forma II del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino. El análisis de rayos x de polvo sobre los sólidos al final del experimento confirmó la presencia de tanto la forma II del maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalino como de sólidos amorfos.

La **Figura 5** muestra el espectro Raman del clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína preparado en el **Ejemplo 20**. Brevemente, el espectro Raman es una firma vibratoria de una molécula o sistema complejo. Su origen se encuentra en las colisiones inelásticas entre las moléculas y fotones, que son las partículas de luz que componen un rayo de luz. La colisión entre las moléculas y los fotones conduce a un intercambio de energía, con un cambio consecuente en la energía y, de esta manera, en la longitud de onda del fotón. De esta manera, un espectro Raman es un conjunto de líneas espectrales muy estrechas emitidas desde las moléculas objeto cuando se iluminan por una luz incidente. La anchura de cada línea espectral se ve fuertemente afectada por la anchura espectral de la luz incidente y, por este motivo, se usan las fuentes de luz fuertemente monocromáticas, tales como láseres. La longitud de onda de cada línea Raman se expresa como un desplazamiento del número de onda desde la luz incidente, que es la diferencia entre la longitud de onda inversa de la línea Raman y la luz incidente. El desplazamiento del número de onda, no la longitud de onda absoluta, de las líneas Raman es específico para grupos atómicos particulares en las moléculas. Los espectros Raman miden los estados de vibración de las moléculas, que están determinados por su estructura molecular.

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

La diversa selección de ejemplos presentados aquí para la cristalización de la sal mixta se organiza en tres sub-secciones principales. La primera sub-sección, **Ejemplos 1-6**, presenta el grupo de experimentos que fallaron a la hora de producir clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína 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. Un breve análisis de las razones para el fallo para obtener clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína morfológicamente puro se incluye también al final de la sub-sección.

- 5 La forma cristalina externa de la sal mixta define las dos siguientes sub-secciones principales. Este atributo particular del producto está dirigido por mecanismos de cristalización subyacentes distintos y tiene implicaciones principales para el desarrollo posterior de una composición farmacéutica que comprende clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las dos formas distintas, para los fines de la presente invención a partir de aquí denominadas “aglomerados empaquetados aleatoriamente” normalmente, aunque no necesariamente, tienen un aspecto global no esférico y “aglomerados empaquetados ordenadamente” normalmente, aunque no necesariamente, con un aspecto global esférico. En general, los cristales primarios que constituyen el aglomerado tienen proporciones de aspecto menores para los aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se comparan con los cristales primarios que constituyen los aglomerados empaquetados aleatoriamente. Para los fines de la presente invención, la proporción de aspecto está definida como la proporción del ferrete largo al ferrete corto.

En primer lugar, se analizan los ejemplos pertinentes a la cristalización de “aglomerados empaquetados aleatoriamente”, **Ejemplos 7-19**. Esto va seguido de un análisis del mecanismo de cristalización subyacente, dirigido a la formación de esta forma cristalina particular. Se incluye también una definición detallada de la “separación de fases” para el fin de la presente invención.

- 20 Finalmente, se resumen los **Ejemplos 20-30**, el conjunto de diversos experimentos que siguieron las diversas variantes de procedimientos para los “aglomerados empaquetados ordenadamente”.

Definiciones de materias primas:

El zwitterión S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína usado en todos los ejemplos presentados aquí se obtuvo como sólidos secados por congelación amorfo o soluciones en DMF.

- 25 La S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína sólida se denominará S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa de aquí 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 usada para la cristalización de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

- 30 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%. Puede esperarse una variabilidad del 10% para cada componente de esta solución. La concentración mencionada anteriormente de ácido maleico y cloruro en la solución representa aproximadamente 2,0 y 0,5 equivalentes molares respectivamente para cada equivalente de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Esta solución se denominará solución en DMF primaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de aquí en adelante.

- 40 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 mencionada anteriormente de ácido maleico y cloruro en la solución representa aproximadamente 2,2 y 0,5 equivalentes molares respectivamente para cada equivalente de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Esta solución se denomina solución en DMF secundaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de aquí en adelante.

Ejemplos de experimentos fallidos con respecto a la pureza polimórfica.

- 45 Seis experimentos distintos produjeron mezclas de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína con la 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 por análisis DSC.

Ejemplo 1

- 50 En el **Ejemplo 1**, 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 un 10% de agua), 648 mg de ácido maleico, 988 mg de agua DI y 2460,7 mg de DMF se añadieron a un vial de centelleo de 25 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 completarse la carga. El vial se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas y después se calentó a 60 °C en cuarenta minutos. Se agitó a esta temperatura durante cuarenta horas y después se añadieron dos ml de acetonitrilo. La suspensión se agitó durante otra hora a 60 °C y después se enfrió a 25 °C en una hora y se agitó durante cuatro 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 pusieron en un horno de vacío a 55 °C y 94,6 kPa durante 24 horas. El análisis de PXRD sobre el producto no mostró ninguna cantidad apreciable de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína mezclada con el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína; sin embargo el análisis DSC indicaba que algo de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína estaba presente en el producto.

Ejemplo 2

El **Ejemplo 2** implica 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 un 10% de agua), 209 mg de ácido maleico y 1120 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 completamente, ni siquiera aunque se añadieron 7 mg de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como cristales de siembra. El vial se agitó a temperatura ambiente durante seis horas y después se calentó a 60 °C en cuarenta minutos. Se agitó a esta temperatura durante cuarenta 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 pusieron en un horno de vacío a 55 °C y 94,6 kPa durante 24 horas. El análisis PXRD sobre el producto no mostró ninguna cantidad apreciable de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína mezclado con clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, sin embargo el análisis DSC indicaba que la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína estaba presente en el producto.

Ejemplo 3

El objetivo del **Ejemplo 3** era determinar si la siembra con la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína había contribuido al producto polimórficamente impuro en el **Ejemplo 2**. 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 un 10% de agua), 208 mg de ácido maleico y 1137 mg de DMF se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 completamente tras completarse la carga de acetonitrilo reducido. El vial se agitó a temperatura ambiente durante seis horas y después se calentó a 60 °C en cuarenta minutos. Se agitó a esta temperatura durante cuarenta horas y después se enfrió a temperatura ambiente. 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 pusieron en un horno de vacío a 55 °C y 94,6 kPa durante 24 horas. El análisis PXRD sobre el producto no mostró ninguna cantidad apreciable de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína mezclada con el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, sin embargo el análisis DSC indicaba que la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína estaba presente en el producto.

Ejemplo 4

El objetivo del **Ejemplo 4** era estudiar el comportamiento de cristalización a temperaturas por debajo de la ambiente. 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 un 10% de agua), 209 mg de ácido maleico y 1141 mg de DMF se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 completamente tras completarse la carga. El vial se enfrió a -5 °C y se agitó durante 24 horas. La solución se había convertido en una suspensión "de tipo gel" muy espesa de sólidos cristalinos. Se añadieron 4 ml de acetonitrilo a la suspensión para diluirla. Después se calentó de nuevo a 25 °C y se agitó durante cuatro 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 pusieron en un horno de vacío a 40 °C y 94,6 kPa durante 24 horas. El análisis PXRD sobre el producto no mostró ninguna cantidad apreciable de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína mezclada con clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, sin embargo el análisis DSC indicó que la Forma I del 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 se redujo un 25%. Implicaba añadir 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 un 10% de agua), 241 mg de ácido maleico y 1659 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener una solución transparente. Se añadieron lentamente 4 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 1,0 ml durante 50 minutos. La turbidez del sistema lo convirtió en una masa viscosa sólida en el fondo del vial, después de completarse la carga de acetonitrilo. El vial se calentó a 60 °C en cuarenta minutos. En las dos horas y media siguientes a 60 °C, se observaron sólidos en el vial. Sin embargo, parecían pegados a las paredes del vial y, por lo tanto, se rasparon con una espátula y se volvieron a suspender en

la solución. La suspensión se agitó a esa temperatura durante diecinueve horas y después se descargó sobre un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La torta era muy húmeda. Se volvió a suspender en 2 ml de acetonitrilo y después se lavó. La torta se secó al aire durante media hora. Los sólidos después se secaron al aire en una placa de cristalización abierta durante dos horas. El análisis PXRD sobre el producto mostró una cantidad apreciable de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína mezclada con el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El análisis DSC confirmó los resultados de PXRD.

Ejemplo 6

El objetivo del **Ejemplo 6** era aumentar el rendimiento usando un régimen de adición modificado para acetonitrilo a niveles similares a los del **Ejemplo 5**. Implicaba 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 un 10% de agua), 241 mg de ácido maleico y 1660 mg de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 al completarse la carga de acetonitrilo y los cristales se observaron durante 30 minutos. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante tres horas y después se añadió un ml de acetonitrilo. La agitación continuó a temperatura ambiente durante diecinueve horas más. 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 secaron después al aire en una placa de cristalización abierta durante 2 horas. El análisis PXRD sobre el producto no mostró ninguna cantidad apreciable de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína mezclada con el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, sin embargo el análisis DSC indicaba que la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína estaba presente en el producto.

Análisis de los Ejemplos 1-6

El análisis térmico de las muestras sólidas intermedias extraídas durante las diversas fases de los experimentos presentados anteriormente indicaba que la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína cristalizaba durante el enfriamiento o los periodos de mantenimiento prolongados a cualquiera de las temperaturas de mantenimiento presentadas anteriormente. Esto implica la nucleación secundaria de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína durante las fases posteriores de cristalización. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que esto se explica porque durante los periodos de mantenimiento, el sistema está completamente agotado de HCl por la formación de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Sin embargo, aún hay 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 por encima de la solubilidad de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. A medida que el sistema intenta des-saturarse adicionalmente por refrigeración, la adición de un anti-disolvente, los periodos de mantenimiento o un contenido de ácido maleico reducido, con super-saturación con respecto a la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se agota a través de su cristalización en presencia de todas las superficies heterogéneas ofrecidas por los cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

En resumen, para los experimentos en condiciones de deficiencia de HCl, cualquier intento de aumentar la super-saturación del sistema en cualquier fase por adición de anti-disolvente, refrigeración o reducción del contenido de ácido puede conducir a la pérdida del control con respecto a la pureza polimórfica del producto. En un sistema de DMF/acetonitrilo en dicho estado deficiente en clorhidrato, pueden esperarse mezclas con la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Ejemplos de aglomerados empaquetados aleatoriamente

Los **Ejemplos 7, 8 y 9** tienen cantidades estequiométricas de HCl respecto a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para cristalizar clorhidrato de 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 acetonitrilo. El **Ejemplo 9** es un experimento realizado al contenido de agua y niveles de acetonitrilo convencionales.

Los experimentos capturados en los **Ejemplos 10 a 19** se realizaron para demostrar que el clorhidrato de 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 respecto a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Los **Ejemplos 10, 11, 12 y 13** se realizaron todos al 26% de la cantidad requerida de HCl respecto a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para cristalizar clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El **Ejemplo 13** implicaba la precipitación directa de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, mientras que los **Ejemplos 10 a 12** implicaban la precipitación de la Forma I o II de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, seguido de conversión de fases mediada en solución a clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína por calentamiento y/o periodos de mantenimiento prolongados a las temperaturas seleccionadas.

Los **Ejemplos 14, 15, y 16** se realizaron todos al 50% de la cantidad requerida de HCl respecto a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para cristalizar clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-

cisteína. Los **Ejemplos 14 y 15** implicaban la precipitación directa de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, mientras que el **Ejemplo 14** implicaba la precipitación de cualquiera de la Forma I o II de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, seguido de conversión de fases mediada por solución a clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína por calentamiento y/o periodos de mantenimiento prolongados a las temperaturas seleccionadas.

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

Ejemplo 7

A 126,1 gramos de la solución en DMF primaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, se le añadieron 1,46 gramos de agua desionizada para hacer que el contenido de la solución en DMF primaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína fuera del 1,63%. Se cargaron 125,5 gramos de esta solución a un reactor encamisado de 500 ml con la agitación ajustada a 354 rpm. Un total de 126,58 gramos de acetonitrilo se añadieron al reactor, mediante una bomba, a una velocidad de 1,4 mililitros 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 vidrio sinterizado de frita fina. La filtración fue extremadamente rápida. La torta se enjuagó con 83 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante veinticuatro horas. Pesaba 13,48 gramos.

Ejemplo 8

A 7,5 gramos de solución en DMF primaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, se le añadieron 109 microlitros de agua desionizada para llevar el contenido de la solución en DMF primaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína al 1,63%. Esta solución se cargó a un matraz de fondo redondo de 25 ml agitado con una perla magnética. Se añadió un total de 7,85 gramos 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 la suspensión se descargó y se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 15 ml.

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

Ejemplo 9

El **Ejemplo 9** se realizó con S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa (que contenía aproximadamente un 10% de agua) que no contenía nada de HCl. El procedimiento implicaba añadir 565 mg de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada amorfa (que contenía aproximadamente un 10% de agua), 599 de ácido maleico, 105 mg de HCl concentrado al 37% (acuoso) y 2969 de DMF a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para conseguir una solución transparente. Se añadieron 7,5 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 durante veintidós horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La torta se lavó con 4 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 55°C y 94,6 kPa durante 24 horas.

La **Figura 6** muestra una fotomicrografía del producto. Parece que los sólidos son aglomerados empaquetados aleatoriamente preparados de cristales primarios muy pequeños, quizás submicrométricos. Todos los datos analíticos sobre sólidos secados en el horno de este experimento confirmaron su identidad como clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La **Figura 1**, como se describe más completamente más adelante, muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (patrón superior) de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína obtenido a partir de este ejemplo. La **Figura 7** muestra dibujos SEM de los aglomerados empaquetados aleatoriamente del producto de este ejemplo.

Ejemplo 10

En el **Ejemplo 10**, 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 un 10% de agua), 317 mg de ácido maleico, 1239 mg de DMF y 457 de agua de DI se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 cristalización. La temperatura del vial se aumentó después a 55°C y se mantuvo a esta temperatura durante 48 horas. La fotomicroscopía sobre las muestras de suspensión justo antes del calentamiento después de 48 horas a temperatura elevada confirmó que había ocurrido la conversión de fases a clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La suspensión a 55°C se

filtró rápidamente en un vidrio sinterizado de frits 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 sobre el producto confirmaron que era clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El análisis RMN de protones indicaba que el producto podía tener DMF atrapada a 0,06 moles por mol de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Ejemplo 11

En el **Ejemplo 11** 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 un 10% de agua), 313 mg de ácido maleico, 1247 mg de DMF y 453 de agua de DI se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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, sin embargo, se completó hasta 8 ml y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas para des-saturarla. La temperatura del vial se aumentó entonces a 56°C y se mantuvo a esta temperatura durante 24 horas. La fotomicroscopía sobre las muestras de suspensión justo antes del calentamiento después de 24 horas a la temperatura elevada confirmaron que había ocurrido la conversión de fase a clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La suspensión a 56°C se filtró rápidamente en un embudo de vidrio sinterizado de frits 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 sobre el producto confirmaron que era clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El análisis RMN de protones indicaba que el producto no había atrapado la DMF.

Ejemplo 12

El **Ejemplo 12** se realizó para determinar si el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína podía nuclearse directamente iniciando el procedimiento de cristalización a una temperatura elevada y si podía evitarse la filtración de la suspensión caliente. 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 un 10% de agua), 321 mg de ácido maleico, 1223 mg de DMF y 453 mg de agua se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se calentó a 60°C se agitó para obtener 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 procedimiento de adición, sin embargo los cristales se formaron a los 20 minutos de completarse la carga de acetonitrilo. La suspensión se agitó a 60°C durante 25 horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo para reducir la actividad de agua del sistema. La suspensión se agitó a 60°C durante 20 horas más y después se enfrió de forma natural a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas antes de filtrarlo en un embudo de vidrio sinterizado de frits fina. La torta se enjuagó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 20 minutos. Los datos analíticos sobre el producto confirmaron que era clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Ejemplo 13

El **Ejemplo 13** se realizó en DMF/acetonitrilo para simplificar el sistema de disolvente. El procedimiento implicaba 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 un 10% de agua), 213 mg de ácido maleico y 1139 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 obtener una solución transparente. Se añadieron lentamente 4 ml de acetonitrilo a la solución a 60°C en alícuotas de 1 ml durante 20 minutos. Los cristales se observaron a los 20 minutos de completarse la carga de acetonitrilo. La suspensión se agitó durante 24 horas a 60°C y después se enfrió a 25°C en 45 minutos. Se agitó a 25°C durante 2 horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frits fina. La torta se lavó con 1 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante 20 minutos. Los sólidos se secaron después en un horno de vacío a 40°C a 94,6 kPa de vacío durante 24 horas. El análisis de RMN de protones sobre los sólidos antes de secarlos en el horno, sin embargo, indicaba que no había DMF atrapada en los sólidos. El secado en el horno, por lo tanto, no fue necesario. Todos los datos analíticos sobre los sólidos secados al aire y secados en el horno de este experimento confirmaron que los sólidos eran clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Ejemplo 14

En el **Ejemplo 14**, 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 un 10% de agua), 321 mg de ácido maleico, 1231 mg de DMF y 451 mg de agua DI se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener una solución transparente. Se añadieron lentamente 8 ml de acetonitrilo en alícuotas de 0,5 ml. Se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas para des-saturarlo. La temperatura del vial se aumentó entonces a 57°C y la agitación continuó durante 24 horas más. La suspensión a 57°C se filtró rápidamente en un embudo de vidrio sinterizado de frits fina de 30 ml y la torta se lavó con 1 ml de acetonitrilo. Los sólidos se ayudaron a secarse durante treinta minutos y después se pusieron en un horno de vacío a 40°C y 94,6 kPa de vacío durante 24 horas. Los datos analíticos sobre el producto confirmaron que era clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. El análisis de RMN de protones indicaba que ni los sólidos secados al aire ni los sólidos secados al vacío tenían DMF atrapada.

Ejemplo 15

El **Ejemplo 15** se realizó en DMF/acetonitrilo para simplificar el sistema de disolvente. El procedimiento implicaba 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 un 10% de agua), 648 mg de ácido maleico y 3320 mg de DMF a un vial de 25 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener una solución transparente. Se añadieron lentamente 10 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 2 ml durante 20 minutos. Los cristales se observaron a los 20 minutos de completarse la carga de acetonitrilo y se observó precipitación exhaustiva a las 4 horas. La suspensión se agitó durante 19 horas y después una muestra de sólido se extrajo para la comprobación interna durante el procedimiento. El análisis térmico sobre la muestra indicaba que podía contener algo de la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La suspensión, por lo tanto, se calentó 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 treinta minutos después de alcanzar 50°C indicaba que la Forma I de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, de hecho, se había eliminado 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 una hora más y después se enfrió a 0°C en cinco horas y media usando una rampa de temperatura lineal. Se agitó a 0°C durante cuarenta horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina. La filtración fue extremadamente lenta. La torta se lavó con 4 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora. La torta secada al aire pesaba 198 mg. Sin embargo, esto no refleja el rendimiento verdadero del procedimiento, porque se extrajeron cinco muestras sólidas durante el procedimiento, de hasta 30 mg cada una, durante este experimento. El análisis de RMN de protones sobre el sólido secado al aire indicaba que había 0,035 equivalentes molares de DMF en los sólidos. Los análisis de concentración sobre las aguas madre antes de enfriar a 0°C y después de diecinueve horas mantenidas a esta temperatura indicaban que esta operación no ayudaba ya más a des-saturar el sistema. Sin embargo, esto puede deberse a un agotamiento completo del HCl, incluso antes de que el sistema se enfriara. Los datos analíticos sobre el producto confirmaron que era clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Ejemplo 16

El **Ejemplo 16** se realizó para optimizar los volúmenes de acetonitrilo, evaluar la reducción del 25% en la cantidad de ácido maleico (para mejorar el rendimiento) y reducir y racionalizar los tiempos de mantenimiento. 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 un 10% de agua), 240 mg de ácido maleico y 1662 mg de DMF se añadieron a un vial de centelleo de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener una solución transparente. Se añadieron lentamente 3 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 0,5 ml durante 20 minutos. Los cristales se observaron a las dos horas de la carga de acetonitrilo. El vial se agitó durante veintidós horas y después se filtró sobre 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 pusieron en un horno de vacío a 55°C y 94,6 kPa durante 24 horas. El análisis de RMN de protones sobre los sólidos secados en el horno indicaba que había 0,03 equivalentes molares de DMF en los sólidos. El análisis de concentración en el filtrado indicaba que esta receta tenía un rendimiento molar de aproximadamente el 50%. Sin embargo, este aún puede suprimirse debido al agotamiento completo de HCl. Los datos analíticos sobre el producto confirmaron que era clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Ejemplo 17

El objetivo del **Ejemplo 17** era estudiar la cristalización de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína a 0,63 equivalentes molares de HCl (exceso molar de 0,13). 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 un 10% de agua), 232 mg de ácido maleico, 31,98 mg de HCl concentrado al 37% (acuoso) y 1164 mg de DMF se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 completarse la carga, sin embargo podía observarse algún residuo oleoso en las paredes del vial. El vial se agitó a temperatura ambiente durante diecisiete horas y después se filtró 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. La torta se había comprimido muy firmemente y era difícil de retirar del embudo. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 55°C y 94,6 kPa durante 24 horas. El análisis del filtrado indicaba un rendimiento molar de aproximadamente el 75%. Los datos analíticos sobre el producto confirmaron que era clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

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. La adición puntual con butanol se estudió porque podía ser una impureza potencial en el suministro de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. 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 un 10% de agua), 232 mg de ácido maleico, 72 mg de butanol, 36,0 mg de HCl concentrado al

37% (acuoso) y 1186 mg de DMF se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 diecisiete horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 55°C y 94,6 kPa durante 24 horas. Los análisis del filtrado indicaban un rendimiento molar de aproximadamente el 60%. Los datos analíticos sobre el producto de este experimento confirmaron la formación de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína e indicaban que la presencia de butanol no conducía a ningún efecto secundario sobre la calidad del cristal. El rendimiento para este procedimiento, sin embargo, disminuye.

Experimento 19

El **Experimento 19** se realizó a 0,88 equivalentes molares de HCl (exceso molar de 0,33). 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 un 10% de agua), 233 mg de ácido maleico, 54,0 mg de HCl concentrado al 37% (acuoso) y 1196 mg de DMF se añadieron a un vial de 12 ml equipado con un agitador magnético. La suspensión se agitó para obtener 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 completarse la carga, sin embargo podía verse algo del residuo oleoso en las paredes del vial. El vial se agitó a temperatura ambiente durante diecisiete horas y después se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de fritas finas. La torta se lavó con 2 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante media hora. La torta se había comprimido muy fuertemente y era difícil de retirar del embudo. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 55°C y 94,6 kPa durante 24 horas.

El análisis del filtrado indicaba un rendimiento molar de aproximadamente el 58%, que es significativamente menor que el 75% observado en los 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 tienden a reducir los rendimientos. Los datos analíticos sobre el producto a partir de este experimento confirmaron la formación de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

Análisis de los ejemplos de aglomerado empaquetado aleatoriamente

Aunque los **Ejemplos 10 a 19**, demuestran que el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína podía cristalizar en condiciones que representan deficiencia grave o exceso de HCl respecto a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, todos estos ejemplos representan condiciones sub-óptimas para la cristalización de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Este análisis podría limitarse, por lo tanto, a los procedimientos más óptimos para la cristalización de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína que se capturan mejor mediante los **Ejemplos 7 a 9**.

Los **Ejemplos 7 y 8** solo difieren en la naturaleza de agitación ofrecida por el sistema. El primero empleaba un motor superior conectado a un eje y una paleta con forma de "media luna", que no tocaba ninguna superficie del matraz de cristalización, mientras que el último usaba una perla magnética en contacto con la superficie inferior del matraz de cristalización. La perla se agitó con una placa magnética. Esta variable se estudió en estos ejemplos para demostrar que la forma de aglomerado empaquetado aleatoriamente en el ejemplo 8 no se confundía por el uso de la perla magnética, que había mostrado la propensión de convertir los aglomerados empaquetados ordenadamente en aglomerados empaquetados aleatoriamente tras periodos de mantenimiento prolongados (véase el Ejemplo 26). Ambos ejemplos usaban 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 acetonitrilo) mientras que la proporción de acetonitrilo a DMF era de 1,4 en una base de peso/peso. En el **Ejemplo 9**, el contenido de agua del sistema era del 2,3% antes de la adición de acetonitrilo, mientras que la proporción de acetonitrilo a DMF era de 1,98 en una base peso/peso. Tanto S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como clorhidrato de 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 que la proporción de acetonitrilo a DMF aumentara a 1,98, sin una cristalización aún más significativa durante la adición de acetonitrilo.

Estos tres experimentos se caracterizan por: a) nucleación rápida y cristalización significativa de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína durante la adición de acetonitrilo, dando como resultado una des-saturación rápida del sistema; b) crecimiento acelerado de la cara cristalina que crece más rápido, dando como resultado proporciones de aspecto mayores; y c) sin indicación visual u otra de separación de fases sostenida durante o tras completarse la carga de acetonitrilo. La definición detallada, análisis y significado de la separación de fases podría posponerse a la siguiente sub-sección sobre el análisis de la técnica de cristalización QESD. Para el fin de este análisis, es suficiente decir que la ausencia de separación de fases contribuye también a la cristalización rápida observada en estos tres ejemplos.

En ausencia de separación de fases, la cristalización rápida conduce a la formación de cristales de tipo acicular muy pequeños, si la mayor parte de la des-saturación ocurre por nucleación en una solución, o cristales de tipo acicular ligeramente alargados si la mayor parte de la des-saturación ocurre por crecimiento cristalino rápido a lo largo de la dimensión larga del cristal. Cualquiera de estos escenarios puede conducir a aglomerados empaquetados

aleatoriamente, por compactación de la torta durante la filtración o incluso en el matraz de cristalización si se consigue una alta agitación (por ejemplo, un número de rpm mayor de 350 en el **Ejemplo 7**).

Definición detallada de la separación de fases

5 Para el fin de la presente 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 son cristalinos. Estos sólidos no cristalinos podrían parecer una masa pegajosa que normalmente puede observarse visualmente, aunque no necesariamente completamente amorfa, aunque la segunda fase líquida podía parecer una emulsión visual y/o microscópicamente observable, una emulsión visual y/o microscópicamente no observable (por ejemplo, debido a un muestreo inapropiado), un "revestimiento oleoso" visual y/o microscópicamente observable sobre las superficies, incluyendo 10 cristales en el matraz de cristalización, y un "revestimiento oleoso" visual y/o microscópicamente no observable (por ejemplo, debido a la ausencia de espesor) sobre las superficies, incluyendo cristales en el matraz de cristalización.

La separación de fases parece ser una manifestación de la naturaleza similar a un "agente de emulsión" de 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 una cierta concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína a un 15 contenido específico de agua, ácido maleico y potencia de HCl en una solución de una composición de DMF-acetonitrilo dada se consigue antes de o durante la precipitación de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La extensión de la separación de fases es una función fuerte de todos estos parámetros del procedimiento intrínsecos, además de las variables tales como la potencia de agitación, superficies disponibles y velocidad de adición de acetonitrilo.

20 Por definición, cuando ocurre la separación de fases binaria, se forman dos fases con diferentes composiciones. Para el sistema de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína/ácido maleico/HCl/agua/DMF/acetonitrilo, cuando una emulsión clásica visual o microscópicamente observable se obtiene como resultado del procedimiento de separación de fases, la fase continua se convierte en la fase rara, con mayor porcentaje de acetonitrilo y menor concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína que la solución de una sola fase original. A la 25 inversa, la fase dispersada no continua se convierte en la fase densa con un menor porcentaje de acetonitrilo y mayor concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína que cualquiera de la fase rara continua o la solución en fase de una sola fase original. Cuando en lugar de ello se obtiene como resultado un "revestimiento oleoso" visual o microscópicamente observable a partir del procedimiento de separación de fases, el análisis completo de las dos fases se hace difícil. El análisis de la fase continua, sin embargo, muestra un mayor porcentaje de acetonitrilo y menor concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína que la solución de una sola 30 fase original. De hecho, estas características de las fases podrían usarse como el ensayo analítico para determinar el comienzo de la formación de un sistema separado de fases estables, especialmente en condiciones en las que la emulsión clásica o "revestimiento oleoso" observable puede ser difícil de detectar visual o microscópicamente.

Modelos de Cristalización Teóricos

35 Aunque la teoría no toma parte en la presente invención, los siguientes mecanismos se describen para informar mejor por los expertos en la materia con los procedimientos de la presente invención

Cristalización basada en QESD

Las mezclas de disolventes binarios, usadas en el procedimiento de cristalización basado en QESD, están 40 caracterizadas por interacciones desfavorables (des-mezcla) entre el disolvente y el anti-disolvente. Las combinaciones de disolvente típicas incluyen agua-acetona, agua-acetonitrilo, etanol-ciclohexano y agua-acetato de etilo.

El disolvente tiende a tener una solubilidad muy alta para el soluto, mientras que el anti-disolvente a menudo se caracteriza por una solubilidad insignificante para el soluto. Se ha informado de una solubilidad del soluto en el 45 disolvente tan alta como 1,92 g/g. Los disolventes con alta solubilidad, de hecho, se seleccionan para maximizar la potencia de las interacciones entre soluto y disolvente. Un agente emulsionante (un tensioactivo) normalmente se disuelve en el anti-disolvente para facilitar el procedimiento de emulsión. Las proporciones de anti-disolvente a disolvente pueden ser tan altas como 50 a 1.

El procedimiento empieza disolviendo el soluto en un disolvente y añadiendo a esta solución a una solución anti-disolvente y agente de emulsión a una velocidad controlada. A menudo, una diferencia de temperatura se mantiene 50 también entre el disolvente y las soluciones de anti-disolvente, estando este último a una menor temperatura. Tras la adición de la solución de disolvente, se crea una emulsión estable, siendo la solución de disolvente la fase dispersada y siendo la solución de anti-disolvente la fase continua. Esto crea super-saturación por transferencia de calor (diferencia de temperatura) y, lo más importante, transferencia de masa (contra-difusión de disolvente y anti-disolvente fuera de y hacia las gotas de la fase dispersada). La fase dispersada se des-satura por cristalización en la 55 fase dispersada. En el punto de recogida, solo hay una fase líquida formada por el procedimiento de transferencia de masa por contra-difusión que se acaba de describir.

En los procedimientos de cristalización QESD, solo una fracción del soluto precipita debido a la super-saturación

moderada creada por el diferencial de temperatura usado a menudo, aunque no siempre, que se mantiene durante las fases tempranas del procedimiento entre las soluciones de disolvente y anti-disolvente. En otras palabras, la super-saturación inicial creada por el diferencial de temperatura solo es moderada (la super-saturación inicial presentada máxima en la bibliografía es ~40%) e incluso, a medida que comienza la contra-difusión del anti-disolvente y el disolvente, la velocidad de generación de super-saturación es lenta, debido a la lenta transferencia a través del límite de gota. En consecuencia, dichos procedimientos funcionan a una super-saturación residual relativamente moderada durante gran parte de la duración y, por lo tanto, están caracterizados por velocidades de des-saturación globales lentas. Otra característica común de dichos procedimientos es que la concentración del soluto en la fase continua realmente aumenta, aunque solo ligeramente, a medida que aumenta la solubilidad del soluto en la fase rica en anti-disolvente por difusión del disolvente desde la fase dispersada.

Cristalización basada en LLPS inducida por alta super-saturación

Hay una evidencia de que las soluciones super-saturadas, especialmente aquellas de proteínas, moléculas similares a proteínas y sistemas que forman soluciones coloidales pueden experimentar una separación adicional inducida por super-saturación en dos fases líquidas metaestables “que no están en equilibrio”, de diferentes composiciones. El comienzo de la separación de fases o des-mezcla en la inspección superficial parece el punto de nebulización típico para un procedimiento de cristalización, sin embargo las técnicas tales como microscopía fácilmente indican que la turbidez no se debe a la formación de sólidos cristalinos. El procedimiento de des-mezcla crea inherentemente una fase aún más super-saturada que coexiste con una fase menos super-saturada o incluso sub-saturada. La cristalización inicialmente comienza en la fase de mayor super-saturación, que para ciertas condiciones parece una fase dispersada típica en una emulsión o casi emulsión del tipo descrito en la sección anterior. Las morfologías del tipo aglomerado similares a aquellas mostradas en la Figura 8 se han presentado también para procedimientos basados en LLPS inducida por alta super-saturación.

Se conocen sistemas de disolvente, tanto binarios como individuales, que presentan comportamiento de tipo LLPS. En todos los casos, la solubilidad del soluto en el sistema de disolvente de elección es moderada (los números en el extremo superior no son mayores de 200 mg/gramo), que está en fuerte contraste con las soluciones de disolvente usadas en el diseño de tipo QESD.

Un cuerpo significativo de literatura existe sobre las propiedades de solución de los sistemas que presentan LLPS en condiciones super-saturadas. Además de las transiciones típicas, tales como solidificación por debajo de la línea de liquidus, los diagramas de fase también presentan una separación de fases líquido-líquido atípica denominada coacervación, en la que la solución metaestable forma dos fases líquidas que no están en equilibrio, distintas, con concentraciones diferentes del soluto. La curva de coexistencia en el diagrama representa la concentración de las fases líquidas coexistentes rica en soluto y pobre en soluto, a medida que se crea una solución progresivamente más super-saturada del soluto, al moverse continuamente verticalmente hacia abajo desde la línea de liquidus.

Las técnicas experimentales para establecer la curva de coexistencia incluyen dos procedimientos muy sencillos; el punto de nebulización y los procedimientos de inactivación por temperatura. Brevemente, con el primero, la temperatura de opacificación se determina para cada concentración de soluto fija, mientras que con el último la solución super-saturada se enfría a una temperatura fija por debajo de la temperatura de separación de fases y después las dos fases coexistentes se analizan para concentración. Para sistemas binarios (soluto y un solo disolvente), la temperatura máxima en la curva de coexistencia se denomina temperatura crítica de la separación de fases y la concentración correspondiente se denomina concentración crítica.

La concentración crítica desempeña un papel principal en el establecimiento de la “morfología” de las dos fases. En los sistemas con concentración menor que la concentración crítica, se observa la nucleación y crecimiento de gotas esféricas de tamaño uniforme que contienen la fase rica en solución. En sistemas con concentración mayor que la concentración crítica, a menudo se observa de nuevo la nucleación y el crecimiento de gotas esféricas de tamaño uniforme. En este caso, sin embargo, las gotas contienen la fase pobre en soluto. En casos extremos, en lugar de la separación de fases, podría observarse también gelificación a medida que la temperatura baja por debajo de la línea de liquidus. Los dominios cristalinos a menudo pueden observarse a medida que este sistema que contiene una fase gel (normalmente sólidos amorfos) se enfría a temperaturas por debajo de la curva de coexistencia. En sistemas con concentración muy cercana a la concentración crítica, aparecen dos dominios interconectados.

Para un sistema ternario que comprende soluto, disolvente y anti-disolvente, la superficie de coexistencia (véase la Figura 10) representa la temperatura LLPS como una función del soluto c_1 para una cantidad fija de anti-disolvente a la concentración c_2 . A una temperatura fija, las propiedades LLPS del sistema se describen mediante una curva de coexistencia isotérmica (véase la Figura 11), que da las concentraciones $(c_1, c_2)^I$ y $(c_1, c_2)^{II}$ en las dos fases coexistentes I y II, generadas partiendo de soluciones de diferente concentración de soluto para una cantidad fija de anti-disolvente. El reparto de las dos fases puede capturarse mejor por las líneas de unión que conectan los puntos I y II sobre la curva de coexistencia dibujada a temperatura constante (véase la Figura 11). Para un sistema ternario, el punto crítico $(c_1, c_2)^C$ se define como el punto en la representación de coexistencia donde se satisface la condición $(c_1, c_2)^I$ igual a $(c_1, c_2)^{II}$. La localización de este punto como una función de la temperatura se describe como la línea crítica sobre la superficie de coexistencia. Como se muestra en la Figura 10, el efecto neto de añadir una cantidad fija de anti-disolvente o agente de precipitación (tal como polietilenglicol) a una solución soluto-disolvente es el

desplazamiento hacia arriba de toda la curva de coexistencia hacia el liquidus (que también puede moverse hacia arriba pero no en la misma extensión que se mueve hacia arriba la curva de coexistencia) además de alguna distorsión en la simetría de la forma de la propia curva. Esto último tiene consecuencias para la composición de las dos fases y sus fracciones relativas.

A medida que se introducen más agentes de precipitación o un agente de precipitación más fuerte en la solución de disolvente y soluto, el desplazamiento se hace más pronunciado y la curva más asimétrica. El efecto neto de estos desplazamientos es que el hueco entre el liquidus y la curva de coexistencia se reduce a medida que aumenta la temperatura de LLPS y, en consecuencia, LLPS ocurre a super-saturaciones incluso menores. El punto crítico que se mueve a menores concentraciones del soluto debido a la asimetría tiene implicaciones para la morfología de la fase separada de las fases líquidas.

La pendiente de temperatura de LLPS como una función de la concentración de anti-disolvente en el punto crítico, la temperatura crítica y la concentración de anti-disolvente pueden usarse realmente para calcular la temperatura de LLPS en ausencia del anti-disolvente, mediante un modelo matemático desarrollado en la referencia 15. Esto es extremadamente atractivo cuando LLPS de un sistema de soluto y disolvente no es accesible debido a la congelación del sistema o cristalización del soluto antes de alcanzar la temperatura LLPS o super-saturación. Adicionalmente, la pendiente de las líneas de unión en la Figura 11 es proporcional a la disminución fraccionada en la solubilidad de soluto debido a la presencia de una concentración dada del anti-disolvente o el agente de precipitación. En otras palabras, la pendiente de las líneas de unión caracteriza la eficacia de un agente de precipitación de soluto, tal como el anti-disolvente. En consecuencia, esta información puede usarse para predecir las líneas liquidus en presencia del anti-disolvente.

El efecto de un segundo soluto (tal como impurezas relacionadas estructuralmente) similar al soluto primario normalmente está limitado al desplazamiento vertical (normalmente hacia abajo, es decir, disminución en la temperatura de LLPS) de la curva de coexistencia a lo largo del eje de temperatura para el sistema binario¹⁸. Durante estos desplazamientos, la curva retiene su forma, a diferencia de la situación encontrada en presencia de un agente de precipitación o anti-disolvente. Sin embargo, si el segundo soluto o la impureza son distintos del soluto primario, entonces además del desplazamiento vertical (de nuevo normalmente hacia abajo) a lo largo del eje de temperatura, la forma de la curva de coexistencia también está distorsionada. Las curvas se hacen cada vez más asimétricas, con los puntos críticos desplazándose a concentraciones de soluto primarias más altas mayores, mientras que al mismo tiempo la temperatura de LLPS máxima se desplaza a concentraciones de soluto primario menores. Parece que el efecto neto de un segundo soluto es que es necesaria más super-saturación para observar LLPS en sistemas ternarios que contienen una segunda fase de soluto, tal como una impureza.

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

El ciclo a través de la superficie de LLPS puede reducir significativamente los tiempos de inducción a nucleación bastante por encima de las temperaturas de LLPS ($> 2,0^{\circ}\text{C}$). La velocidad de nucleación aumenta más de seis veces habiéndose presentado a temperaturas mayores que las temperaturas de LLPS en $1-1,5^{\circ}\text{C}$. Se han postulado dos razones para este aumento significativo en la velocidad de nucleación. En primer lugar está la reducción en ΔG_{nuc} porque el sistema se aproxima al espinodal justo por encima del bi-nodal a la temperatura de LLPS. En la región espinodal las fluctuaciones de densidad son mayores que en cualquier otro punto en las proximidades y esto, a su vez, conduce a la reducción en ΔG_{nuc} . Adicionalmente, el número de moléculas necesarias para hacer una agrupación pre-nucleación estable cae significativamente, debido a la reducción en ΔG_{nuc} . En segundo lugar, en la aproximación a la temperatura LLPS, un fenómeno parecido a la humectación de las superficies de los núcleos de los cristales por una alta concentración de soluto líquido puede potenciar 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 LLPS. Las velocidades pueden estimarse con alguna precisión respecto a la super-saturaciones respectivas en las fases rica en soluto y pobre en soluto, usando modelos de nucleación clásicos apropiados.

La morfología del cristal obtenido por cristalización bajo la superficie LLPS parece estar relacionada con el comienzo de la concentración de soluto monofásica, en relación con el punto crítico. Esto a su vez está relacionado con la "morfología" real de las fases rica en soluto y pobre en soluto en cualquier lado del punto crítico. Como se ha descrito anteriormente, en los sistemas con concentración menor que la concentración crítica, se observa la nucleación y el crecimiento de gotas esféricas de tamaño uniforme que contienen una fase rica en soluto. La cristalización comienza en las gotas ricas en soluto altamente super-saturadas por nucleaciones múltiples en el núcleo de la gota, transformándolo de esta manera en la fase sólida policristalina. Se forman nuevos cristales y crecen radialmente hacia fuera desde el núcleo policristalino y consumen no solo el soluto restante en la gota sino también el soluto en la fase pobre en soluto, que normalmente no puede precipitar por sí mismo debido a la baja super-saturación en la fase continua pobre en soluto.

En los sistemas con concentración mayor que la concentración crítica, de nuevo se observa a menudo la nucleación y el crecimiento de gotas esféricas de tamaño uniforme. En este caso, sin embargo, las gotas contienen la fase pobre en soluto. Los sólidos policristalinos irregulares con partículas primarias muy pequeñas se obtienen para estos sistemas. Sin embargo, si la concentración es significativamente mayor que la concentración crítica, la gelificación (debido a la formación de sólidos amorfos) podría observarse incluso antes de acercarse a la temperatura de LLPS. Cuando dicho sistema se lleva por debajo de la curva de LLPS, los cristales se forman dentro de la matriz de gel. La velocidad de transformación de un sistema que contiene una fase gel a un material totalmente cristalino, sin embargo, es significativamente más lenta que un sistema correspondiente que contiene una alta concentración de gotas líquidas en lugar de ello. La razón para una transformación lenta en la fase de gel está relacionada con el hecho de que la movilidad está detenida debido a la formación del gel, que a su vez retarda la velocidad de nucleación cristalina.

En resumen, los procedimientos de cristalización basados en LLPS que funcionan por debajo de la curva de coexistencia, y a la izquierda del punto crítico, pueden producir morfologías similares a aquellas observadas para clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (véase la Figura 8). En dichos procedimientos, la super-saturación en la fase dispersada rica en soluto normalmente es muy alta. También, el análisis de la concentración de soluto en la fase continua pobre en soluto muestra una disminución continua a medida que todo el sistema cristaliza. En conclusión, para observaciones básicas y datos, todos los datos de caracterización del procedimiento de cristalización y morfología del cristal observada son congruentes con las características generales de un procedimiento de cristalización basado en LLPS, que funciona justo por debajo de la curva de coexistencia y hacia la izquierda del punto crítico. Este diseño conceptual, por lo tanto, se propone como el modelo para describir la cristalización de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como aglomerados esféricos empaquetados ordenadamente.

Los tres diseños para un procedimiento de cristalización para clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína para producir aglomerados empaquetados ordenadamente usan los procedimientos presentados en los Ejemplos 7 a 9 para los aglomerados empaquetados aleatoriamente como los puntos de partida. Las modificaciones principales incluyen cambios en el nivel de ácido maleico, contenido de agua y proporción de acetonitrilo a DMF. La proporción de acetonitrilo a DMF en una base peso/peso está relajada respecto a 1,4 ó 1,8 siempre y cuando sea necesario conseguir una separación de fases antes de o durante las fases tempranas de la precipitación de los cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Los equivalentes molares de ácido maleico en relación a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína aumenta a al menos 2,2 desde 2,0 y el contenido de agua del sistema antes de la adición de acetonitrilo es de al menos el 2,83% en una base en peso. El aumento en los niveles de ácido maleico potencia la solubilidad de 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 específico de agua, ácido maleico y potencia de HCl en una solución de una composición de DMF-acetonitrilo dada no cae por debajo del nivel específico necesario para la separación de fases manifestado por una emulsión visual o microscópica o un "revestimiento oleoso" visual o microscópicamente observable o incluso no observable de las superficies, incluyendo aquellos ofrecidos por el pequeño número de cristales que podrían formarse durante la adición del anti-disolvente. Estos tres diseños implican la adición de la solución de anti-disolvente a la solución de disolvente, y se realizan a niveles relativamente moderados de agitación.

En un procedimiento de cristalización con siembra externa para clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, se añade una solución de anti-disolvente (acetonitrilo) a la solución de disolvente (que se describe mejor mediante la solución en DMF secundaria de la solución de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como se ha definido anteriormente) de una manera controlada, de forma que el tiempo de adición total preferentemente es mayor de aproximadamente treinta minutos y, más preferentemente aún, de aproximadamente noventa minutos. La adición de la solución de anti-disolvente puede ser continua, por ejemplo, usando una bomba a una velocidad de adición específica o preferentemente intermitentemente, añadiéndose una pequeña alícuota del volumen de solución de anti-disolvente total a intervalos de tiempo dados. Estos intervalos son óptimos cuando la duración entre las adiciones de alícuotas sucesivas es suficientemente larga para asegurar que la mayor parte de la turbidez (manifestación de separación de fases inestable) que se forma inmediatamente después de la adición de una alícuota ha tenido un tiempo adecuado para desaparecer. La solución de anti-disolvente se añade hasta que la turbidez que resulta de la adición de cada alícuota no desaparece completamente o desaparece pero deja detrás un revestimiento oleoso muy fino solo visible sobre las superficies tales como el eje de agitación, la paleta de agitación, las paredes del reactor o los tabiques deflectores en el matraz de cristalización. En este punto, una cantidad muy pequeña de cristales de siembra se añade al sistema. Los cristales de siembra son preferentemente cristales muy pequeños de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, tales como aquellos preparados en los **Ejemplos 7 a 9**. Normalmente, no es necesario más del 1% de estos cristales de siembra en una base 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 procedimiento de cristalización exitoso con siembra externa. Los cristales de siembra actúan como sustrato para una fase no continua que se manifiesta por sí misma como una emulsión o un revestimiento oleoso. El procedimiento a menudo es muy lento y tarda más de cuarenta y ocho horas antes de que el sistema se des-sature completamente. El procedimiento, sin embargo, puede acelerarse por ejemplo, aumentando la cantidad de siembra. Los aglomerados empaquetados

ordenadamente obtenidos a partir de este tipo de procedimiento de cristalización con siembra externa a menudo son de forma esférica y son de un tamaño similar.

Los cristales de siembra pueden crearse también *in situ* durante la adición de la solución de anti-disolvente. Estos cristales pueden actuar entonces como sustrato para la fase no continua que se manifiesta por sí misma como una emulsión o revestimiento oleoso tras la separación de fases. La nucleación de los cristales de siembra puede promoverse en la mezcla de disolvente y anti-disolvente 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, preferentemente, alterando la velocidad de generación de super-saturación mientras se mantiene todo lo demás igual para el procedimiento de cristalización con siembra externa. Esto último podría conseguirse, por ejemplo, alterado la velocidad de adición para la solución de anti-disolvente. Las modificaciones al historial térmico de las soluciones de disolvente y anti-disolvente podrían usarse también como alteración de la cinética de cristalización, sin cambiar la composición global del sistema. La ventaja principal de los sistemas de cristalización con siembra *in situ* parten del hecho de que no es necesario añadir externamente los cristales de siembra, y no es necesario que su adición esté muy relacionada con la separación de fases observable, como es el caso en el procedimiento de cristalización con siembra externa. La complejidad añadida emana del hecho de que la des-saturación del sistema provocada por la formación de cristales de siembra debería 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 anti-disolvente de una composición dada no cae por debajo del nivel necesario para la separación de fases manifestada como una emulsión visual o microscópica observable o como un “revestimiento oleoso” visual o microscópicamente observable, o incluso no observable, de las superficies. Adicionalmente, para un diseño óptimo de la cristalización de semillas *in situ*, sería preferible que los cristales de siembra *in situ* fueran de un tamaño pequeño o tuvieran bajas proporciones de aspecto. Esto ayuda a asegurar que la forma final del aglomerado empaquetado ordenadamente, que hasta un cierto grado parece la forma de los cristales de siembra del sustrato, es similar a la obtenida en el procedimiento de cristalización con siembra, donde se usan pequeños cristales como semilla. A un nivel más práctico, esta preferencia de tamaño pequeño o proporción de aspecto baja o corta de las semillas *in situ* necesita que la baja extensión de la des-saturación mencionada anteriormente se consiga principalmente por un procedimiento de nucleación de cristales en oposición al crecimiento cristalino de menos núcleos a mayores tamaños. Esto último puede conducir a la formación de grandes cristales de siembra de tipo aguja que, tras el revestimiento con la fase no continua y posterior cristalización controlada de contra-difusión para formar aglomerados empaquetados ordenadamente, podría conducir a formas globales que son más alargadas, a diferencia de las esféricas. Dirigir bajos niveles de des-saturación principalmente por nucleación de un gran número de pequeños cristales, sin embargo, es difícil para la cristalización del clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. En consecuencia, es probable que las formas globales distintas a esferas puedan obtenerse a partir de un procedimiento de cristalización por siembra *in situ* para clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Dependiendo de la extensión de la des-saturación y la superficie del sustrato resultante, los tiempos de cristalización globales para el procedimiento de cristalización por siembra *in situ* pueden ser significativamente más cortos que el procedimiento de cristalización QESD con siembra externa. Puesto que los procedimientos de cristalización tanto por siembra *in situ* como por siembra externa proporcionan amplios cristales como superficies para revestimiento con la fase no continua, la posibilidad de cristalizar clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína como escamas sobre las paredes u otras superficies en el matraz de cristalización por solidificación de la fase no continua, que se adhiere a las mismas, se reduce significativamente por la reducción en la fracción de fase no continua disponible para revestir estas superficies no cristalinas.

El enfoque de diseño final a la cristalización para cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en forma de aglomerados empaquetados ordenadamente consiste en eliminar el sustrato cristalino (semillas) antes de, durante o después de la separación de fases. Además de asegurar que no tiene lugar cristalización durante la mezcla de las soluciones de disolvente y anti-disolvente, se genera una emulsión que puede observarse microscópicamente o preferentemente visualmente. Esto debe suceder incluso aunque el revestimiento oleoso se observe antes de conseguir el estado emulsionado. El enfoque más simple para obtener una emulsión observable visualmente para el sistema de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína es aumentar adicionalmente la proporción de acetonitrilo a DMF. Los niveles de acetonitrilo mayores del 110% (en peso) de la cantidad de acetonitrilo usado en cualquiera de los procedimientos de cristalización con siembra externa o con siembra *in situ* descritos anteriormente han resultado ser adecuados para obtener una emulsión visualmente observable. Dicho estado, sin embargo, a menudo acompaña el revestimiento oleoso sobre las paredes del matraz de cristalización y otras superficies externas, tales como el eje de agitación, las paletas y los tabiques deflectores (si estuvieran presentes). Aunque los aglomerados empaquetados ordenadamente, pueden obtenerse con forma global esférica a partir de la suspensión de dicho procedimiento de cristalización después de al menos 48 horas, el revestimiento oleoso sobre las paredes del matraz de cristalización normalmente cristaliza en forma de escamas sobre las paredes que parecen aglomerados empaquetados aleatoriamente. Si la suspensión no se extrae cuidadosamente del matraz de cristalización, tanto los aglomerados empaquetados aleatoriamente como los empaquetados ordenadamente pueden verse en el producto. La extensión de las escamas parece estar relacionada, entre otras variables, con la cantidad de acetonitrilo extra usado para generar una emulsión visualmente observable.

En resumen, los tres enfoques de diseño a cristalización son capaces de producir aglomerados empaquetados

ordenadamente. Las diferencias radican en la calidad de los aglomerados y también en la facilidad de las capacidades de operación y control. En base a estos tres factores, es preferible el enfoque de cristalización con siembra externa. Los ejemplos que demuestran estos tres enfoques son los siguientes.

Ejemplos de aglomerados empaquetados ordenadamente

Los **Ejemplos 20, 21 y 22** representan el sistema de cristalización con siembra externa descrito en la sección anterior, mientras que los **Ejemplos 23 y 24** representan el sistema de cristalización con siembra *in situ* y el **Ejemplo 25** demuestra un procedimiento de cristalización sin siembra. El **Ejemplo 26** demuestra que los aglomerados empaquetados ordenadamente podrían destruirse en ciertas condiciones de agitación. Los sólidos después de dicha operación tienen muchos elementos característicos de los aglomerados empaquetados aleatoriamente.

Ejemplo 20

En el **Ejemplo 20**, 54 gramos de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada, amorfa (que contenía aproximadamente un 10% de agua), 57,5 gramos de ácido maleico, 287 gramos de DMF y 10,1 gramos de HCl concentrado al 37% (acuoso) se añadieron a un reactor encamisado de 1,2 litros. La S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se convirtió en una masa pegajosa y espesa después de la agitación a 350 rpm y tardó 1 hora en disolverse, 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 cuarenta minutos. Con la adición de 710 ml, la solución se hizo turbia y así permaneció; la carga de acetonitrilo se completó no obstante. Una hora después de completarse la carga, la mayor parte de la turbidez había desaparecido; sin embargo, un residuo oleoso se había formado 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 dio como resultado la reducción de la extensión del aceite y por lo tanto se añadieron 27,2 de DMF al reactor para aumentar la solubilidad del sistema. Casi todo el residuo oleoso en las paredes se redisolvió a los quince minutos de la adición de la segunda adición de DMF. La solución se agitó durante una noche a 350 rpm. Durante el periodo de mantenimiento no cristalizó y, por lo tanto, se usaron 400 mg de cristales de siembra (es decir, clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína) para inducir la nucleación. El sistema se agitó durante 48 horas más y, después, la suspensión se descargó en alícuotas de 300 ml mediante un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina de 350 ml.

La filtración fue extremadamente rápida. La torta se enjuagó con 100 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora. Pesaba 46,64 gramos. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 50°C y un vacío de 94,6 kPa durante 24 horas. Los sólidos secados en el horno pesaban 42,96 gramos.

Esto representaba aproximadamente un 89% de recuperación en una base en peso y un 65% en base molar. El análisis de concentración para el zwitterión y HCl en el filtrado ayudó a cerrar el balance de masas y verificar que el HCl era estequiométrico a lo largo de la cristalización. La **Figura 8** muestra diversos dibujos SEM del producto. Es bastante evidente, a partir de la **Figura 8**, que este experimento produjo una población casi monodispersada de aglomerados empaquetados ordenadamente, de forma esférica. La **Figura 1** muestra la comparación de PXRD de los sólidos preparados en este ejemplo y los aglomerados empaquetados aleatoriamente presentados anteriormente. El patrón de difracción de rayos X de polvo superior es del **Ejemplo 9**, mientras que el patrón de difracción de rayos X de polvo inferior es del **Ejemplo 20**. Parece que las diferencias de forma entre los dos sólidos no tienen ningún soporte en la forma de pico o intensidad. La **Tabla 1** resume los datos analíticos sobre el producto de este ejemplo. La **Figura 5** muestra el espectro Raman del clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína obtenido a partir de la muestra del **Ejemplo 20**.

Ejemplo 21

El objetivo del **Ejemplo 21** era racionalizar los protocolos de adición de DMF y HCl e identificar las mejores condiciones de mezcla para disolver S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína durante las fases tempranas del procedimiento.

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

La filtración fue extremadamente rápida. La torta se enjuagó con 60 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora y media. Pesaba 36,50 gramos. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 50°C y un vacío de 94,6 kPa durante 24 horas. Los sólidos secados en horno pesaban 36,42 gramos. Esto representaba aproximadamente un 94% de recuperación en una base en peso y un 70% en una base molar. El análisis de concentración para el

zwitterión y el HCl en el filtrado ayudó a cerrar el balance de masas y verificar que el HCl era estequiométrico a lo largo de la cristalización. La forma global de los cristales era la misma que la observada que en el **Ejemplo 20**. La **Tabla 1** resume los datos analíticos del producto a partir de este ejemplo.

Ejemplo 22

- 5 El objetivo del **Ejemplo 22** era establecer el límite superior sobre 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 era aproximadamente 0,73 equivalentes molares, a diferencia de los 0,5 equivalentes molares típicos.

10 Se añadieron 55,97 gramos de ácido maleico, 307 gramos de DMF y 10,78 gramos de HCl concentrado al 37% (acuoso) a un reactor encamisado de 1,2 litros. El sistema se agitó a 275 rpm para obtener una solución transparente. La agitación se redujo a 50 rpm y después se añadieron 52,2 gramos de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína liofilizada, amorfa, que contenía 0,23 eq. de HCl (que contenía aproximadamente un 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 noventa minutos antes de que la solución se hiciera turbia, hasta el punto en el que turbidez no desapareciera fácilmente. Tras la agitación durante una hora, la turbidez se redujo pero un residuo oleoso pardo se formó en el fondo del reactor. Se añadieron 10,2 gramos de DMF al reactor para disolver el residuo oleoso y después el sistema se sembró con 535 mg de cristales de siembra (es decir clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína). Se agitó durante 24 horas. Durante este tiempo, había tenido lugar una precipitación significativa. Los 55 ml restantes de acetonitrilo de la carga original más 30 ml para compensar la DMF extra se añadieron al reactor y se agitó durante 20 horas más. La concentración de las aguas madre en esta fase del procedimiento se encontró que era un 45% mayor que el valor típico para una cristalización a gran escala a 0,5 equivalentes de HCl. Se añadieron 70 ml de acetonitrilo a la suspensión y se agitó durante 4 horas más. La suspensión se descargó entonces en un embudo de vidrio sinterizado de fritada fina de 350 ml, en alícuotas de 200 ml. La filtración fue extremadamente rápida. La torta se enjuagó con 80 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora y media. Pesaba 38,10 gramos. Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 50°C y un vacío de 94,6 kPa durante 24 horas. Los sólidos secados en el horno pesaban 36,75 gramos. Esto representaba aproximadamente un 78% de recuperación en una base en peso y un 56% en una base molar. El análisis de la concentración de las muestras de aguas madre antes de la tercera carga de acetonitrilo y 4 horas después de la misma, indicaban una reducción neta del 15% en la concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en la solución. El análisis de ión cloruro en el filtrado ayudó a verificar que los equivalentes de HCl al comienzo eran 0,73, estando 0,23 equivalentes dirigidos a S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

35 La forma global de los cristales parecía similar a la observada en los experimentos anteriores, sin embargo la densidad volumétrica del polvo parece ligeramente inferior. La **Tabla 1** resume los datos analíticos del producto de este ejemplo.

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

Ejemplo	C	H	N	S	Cl	Tm	ΔH fus	RMN DMF	RMN ácido 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

Ejemplo 23

- 40 El objetivo primario del **Ejemplo 23** era entender y establecer condiciones de cristalización primaria apropiadas para la formación de semillas *in situ*, usadas como sustrato para los aglomerados empaquetados ordenadamente, y para reducir el tiempo de cristalización total. El acetonitrilo aumentó un 10% sobre las cantidades usadas en los **Ejemplos 19 y 20** y no se realizó la siembra tras completarse la carga de acetonitrilo.

45 Se añadieron 15,00 gramos de solución en DMF primaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, 233,3 mg de ácido maleico y 413 microlitros de agua desionizada a un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se agitó para obtener una solución transparente antes de añadirla a un reactor encamisado de 50 ml. El reactor se agitó a 153 rpm. Se añadieron 18,2 ml de acetonitrilo (de un total de 27,7 ml) a la solución en alícuotas de 1,3 ml durante treinta y nueve minutos. Con la adición de esta cantidad de acetonitrilo, se observaron cristales de tipo acicular (forma y cristalinidad verificadas por microscopía de luz polarizada) en el reactor. Los 9,5 ml restantes de acetonitrilo se añadieron en alícuotas de 1,5 ml durante tres minutos. Sesenta minutos después de la adición de 27,7 ml de acetonitrilo, se añadieron 2,77 ml más de acetonitrilo (representando esto el 10% extra de las cantidades usadas en los **Ejemplos**

19 y 20). La agitación se aumentó a 254 durante dos 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 sobre un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 30 ml.

La filtración fue rápida. La torta se enjuagó dos veces con 6 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora y media. Los sólidos pesaban 1,05 gramos. Los cristales tenían la mayor parte de las características principales de aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se analizaron por microscopía electrónica de barrido, aunque la forma global parecía cilíndrica (**Figura 9**) a diferencia de la forma esférica observada en los **Ejemplos 20, 21 y 22**. Esta diferencia se atribuye a la forma de los cristales de siembra, que actuaban como cristales de sustrato que para este ejemplo eran de tipo acicular.

Ejemplo 24

El objetivo primario del **Ejemplo 24** era realizar el **Ejemplo 23** a una mayor escala, en un reactor de 50 litros.

Se añadieron 9,5 kg de la solución en DMF secundaria de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína a un reactor encamisado de 50 litros. El reactor se agitó a 125 rpm. Se añadieron 11,04 litros de acetonitrilo (de un total de 18,45 litros) a la solución en alícuotas de 840 ml durante treinta y seis minutos. Durante la adición de esta cantidad de acetonitrilo, se observaron cristales de tipo acicular (forma y cristalinidad verificada por microscopía de luz polarizada) en el reactor. Se añadieron 4,97 litros de acetonitrilo en alícuotas de 1,65 litros durante nueve minutos y los 2,42 litros restantes se añadieron después de cuarenta y ocho minutos desde el inicio de la carga de acetonitrilo original. El sistema se agitó durante un total de seis horas y después la suspensión se descargó sobre el filtro.

La filtración fue rápida y solo tardó ocho minutos. La torta se enjuagó dos veces con 2,0 kg de acetonitrilo y se secó al aire durante veinticuatro horas. Los sólidos pesaban 1,08 kg. Los cristales tenían la mayor parte de las características principales de los aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se analizaban por microscopía electrónica de barrido, pero la forma global parecía similar a la obtenida en el **Ejemplo 23** y, era diferente de la forma esférica observada en los **Ejemplos 20, 21 y 22**. Esta diferencia se atribuía a la formas de los cristales de sustrato, que para este ejemplo era de tipo acicular.

Ejemplo 25

El objetivo primario del **Ejemplo 25** era aumentar la cantidad de acetonitrilo un 20% sobre las cantidades usadas en los ejemplos 20 y 21, y estudiar la posibilidad de eliminar la siembra tanto externa como *in situ* con clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína antes de, durante o justo después de la separación de fases. Se añadieron 25,01 gramos de la solución en DMF primaria de la solución de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y 687 mg de agua desionizada a un reactor encamisado de 125 ml. Se añadieron 346 mg de ácido maleico al reactor y el sistema se agitó a 173 rpm para obtener una solución transparente. Se añadieron 56 ml de acetonitrilo a la solución en alícuotas de 3 ml durante sesenta minutos. La solución se hizo muy turbia con la adición de la última alícuota de acetonitrilo, sin embargo, la mayor parte de la turbidez desapareció en quince minutos, dejando detrás solo un revestimiento oleoso sobre las paredes del reactor. El reactor se calentó a 55°C (temperatura de la camisa) para determinar si el revestimiento oleoso podía disolverse. La operación no tuvo éxito y el reactor se volvió a enfriar a temperatura ambiente. El sistema se agitó durante 48 horas y después la suspensión se descargó sobre el embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 150 ml.

La filtración fue rápida. La torta se enjuagó con 10 ml de acetonitrilo y se secó al aire durante una hora y media. Los sólidos pesaban 1,57 gramos y tenían las características principales de los aglomerados empaquetados ordenadamente cuando se analizaron por microscopía electrónica de barrido.

Se observó que algunos sólidos se pegaban sobre las paredes del reactor. Estas escamas se retiraron mediante una suspensión en 25 ml de acetonitrilo y después filtrando en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 150 ml. Los sólidos se secaron al aire durante 1 hora y pesaban 1,01 gramos. Estos sólidos tenían características de forma similares a las de los aglomerados empaquetados aleatoriamente.

Ejemplo 26

El objetivo del **Ejemplo 26** era determinar si los aglomerados empaquetados ordenadamente podían convertirse en pequeños cristales que después se compactarían como aglomerados empaquetados aleatoriamente.

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

El análisis de foto-microscopía indicaba que eran necesarias al menos 72 horas (o 3 días) para completar la molienda de los cristales empaquetados ordenadamente. Estos cristales molidos se compactaron en aglomerados

empaquetados aleatoriamente tras la filtración.

Sistemas de disolvente alternativos

Ejemplo 27: Cristalización en metanol / acetona

El metanol es uno de los pocos disolventes orgánicos en el que los cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína presentan solubilidad moderada (6,2% en peso). Adicionalmente, la presencia de ácido maleico aumenta drásticamente la solubilidad. Se descubrió que los cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se disolvían fácilmente en una cantidad tan pequeño como 4 g de metanol por gramo de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína en presencia de 1,5 equivalentes de exceso de ácido maleico. Haciendo solo ajustes mínimos al procedimiento de DMF/acetonitrilo demostrado, se desarrolló el procedimiento de cristalización en metanol/acetona descrito a continuación y se demostró a la escala de 1 l.

Se cargó ácido maleico (23,57 g - 1,5 eq) a 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. El clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (40,00g) se cargó después en el matraz de fondo redondo y se disolvió para formar una solución transparente. Esta solución se cargó a un reactor de 1 l encamisado que funcionaba a temperatura ambiente. La agitación se ajustó a 225 rpm.

La acetona (544 g - 17 ml por gramo) se pesó y una bomba peristáltica se calibró para suministrar aproximadamente 9 ml por minuto. Quince minutos tras la adición de acetona, la solución se hizo ligeramente turbia pero se aclaró tras aumentar la agitación. Después de 1 hora y 20 minutos de adición (se añadieron los 44,68 g de acetona restantes) la mezcla de cristalización era notablemente turbia. La adición de acetona se detuvo y se añadieron 400 mg de semilla. La agitación se ajustó a 240 rpm y se agitó durante una noche. La mezcla de cristalización era una suspensión espesa después de 17 horas. Los sólidos se filtraron y se lavaron dos veces con acetona y se secaron en el filtro. El rendimiento era de 74,8%.

Ejemplo 28. Cristalización en butanol / acetona

Se seleccionó 1-butanol como el mejor disolvente para explorar las posibilidades de usar un disolvente de alto punto de ebullición que puede cambiarse fácilmente por agua desde la etapa previa de purificación cromatográfica acuosa. Aunque el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína no presenta una alta solubilidad en 1-butanol (0,05% en peso), la adición de un exceso de ácido maleico aumenta en gran medida su solubilidad. Este procedimiento se designó de nuevo que era muy similar al procedimiento de DMF/acetonitrilo. A continuación se da una descripción del procedimiento inicial, realizado a la escala de 1 l.

El clorhidrato de 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 (24,46 g - 1,5 equivalentes) se añadió a un reactor de 1 l encamisado. La mezcla se agitó para formar una solución transparente. Esta solución se destiló al vacío (135 torr) y una temperatura de 53 - 67°C hasta 200 ml. Se cargó 1-butanol (250 ml) y la destilación continuó a 135 torr 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). Los cristales de siembra de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (1,5 g) se añadieron y se lavaron en el reactor con 1-butanol (25 ml). Se añadió acetona (300 ml) a la mezcla de cristalización durante 3 horas mediante una bomba de jeringa. Una hora después de haberse completado la adición de acetona, la mezcla de cristalización se enfrió a 10°C durante 10 horas. La mezcla de cristalización se filtró durante 14 horas después de haberse completado la adición de acetona. La mezcla de cristalización se filtró muy fácilmente y no se observó agrietamiento de la torta. Se cargó un lavado de acetona (300 ml) al reactor y se enjuagó sobre la torta. Los sólidos se secaron en un horno de vacío a 50°C, a 81,1 kPa durante una noche. La masa de producto era 40,45 g, representado un rendimiento del 78%.

El análisis de DSC mostró que la forma en estado sólido de ambos productos era clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. En la Tabla 2 se muestra el contenido de disolvente de cada producto, después del secado durante una noche al vacío a 50°C.

Tabla 2: Contenido de disolvente residual

Ejemplo N°	Metanol	Butanol	Acetona
27 (metanol / acetona)	0,64%	N/A	1,37%
28 (butanol / acetona)	N/A	0,39%	1,10%

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

La penúltima etapa es purificación cromatográfica SMB, que se realiza más fácilmente en una solución acuosa. El intercambio de disolvente de agua en 1-butanol puede conseguirse fácilmente, aunque la retirada completa del agua del sistema de metanol no sería posible. Esto también favorece el sistema de 1-butanol/acetona sobre el sistema de metanol/acetona.

5 **Desarrollo del procedimiento**

Similar a la cristalización en DMF/acetonitrilo, la cristalización en 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) siembra, 2) geometría del reactor, 3) protocolo de adición de acetona y 4) mezcla. Cada uno de estos parámetros se analiza con mayor detalle a continuación.

Parámetros intrínsecos

1. Temperatura

Ejemplo 29

Se pesó ácido maleico (0,59 g - 1,5 equivalentes) 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. El clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (1,00 g) y agua (1000 µl) se cargaron y la mezcla se agitó para formar una solución incolora transparente. La solución se evaporó rotatoriamente a 50°C. Se cargó 1-butanol (6 g) y la evaporación rotatoria continuó. Se añadió 1-butanol (8 g) para crear una solución fluida. El 1-butanol (2,89 g) y el agua (130 µl) se cargaron para llevar a la solución a las condiciones iniciales deseadas: 0,5 eq. de HCl, 2,0 equivalentes de ácido maleico, 14 volúmenes de 1-butanol / kg de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, KF = 1,5%. La acetona se cargó gota a gota (6 ml). La nucleación no se observó durante la carga de acetona. Los cristales de siembra de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (10 mg) se cargaron seguido de una cantidad de adición de acetona (0,5 ml). La mezcla de cristalización se agitó a temperatura ambiente y pareció ser una suspensión espesa después de varias horas. La cristalización parecía comportarse de una manera muy similar a la de la cristalización de DMS/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 acetona y se secó.

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

Tabla 3. Datos de cristalización isotérmica a temperatura ambiente

Ejemplo	Descripción	Microanalítica				DSC	
		C	H	N	Cl	Temp (°C)	Entalpía
29	Temperatura ambiente	40,46	13,90	6,81	5,85	200,15	148,1 J/g
	Teoría	40,64	14,22	6,65	6,00		

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

2. Ácido clorhídrico

El HCl desempeña un papel en el comportamiento de la cristalización. Se desea tener una cantidad estequiométrica (0,5 equivalentes) de HCl en el sistema. Por debajo de esta cantidad diana podría obtenerse como resultando un rendimiento reducido, puesto que el HCl se convierte en el reactivo limitante o da como resultado una mezcla de clorhidrato de 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 exceso de HCl en el sistema es probable que diera como resultado rendimientos reducidos debido al aumento de solubilidad y sólidos con malas propiedades físicas.

3. Ácido maleico

Ejemplo 30

Se sabe que se requiere un exceso de ácido maleico basado en el trabajo realizado con la cristalización en DMF/acetonitrilo y la cantidad diana para el experimento inicial era 2,0 equivalentes. Una mezcla de cristalización con 1,75 equivalentes de ácido maleico se llevó a las condiciones iniciales: 0,5 equivalentes de HCl, 1,75 equivalentes de ácido maleico, 14 volúmenes de 1-BuOH / g de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-

iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, 1,5% de KF.

Tras el almacenamiento en frío durante una noche de esta solución, se observó que los sólidos precipitaban. Por lo tanto, parece que tener solo 1,75 equivalentes de ácido maleico da como resultado una solución super-saturada inestable que puede precipitar fácilmente.

- 5 Se realizaron tres cristalizaciones cara a cara (**Ejemplos 30A, 30B y 30C**) con 2,0, 2,25 y 2,50 equivalentes de ácido Maleico respectivamente, para evaluar el efecto sobre la cristalización. El ácido maleico (1,78 g - 1,5 equivalentes) se cargó en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se cargó 1-butanol (34,0 g - 14 volúmenes) y se agitó hasta disolverlo. Se cargó clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (3,00 g) a la solución. Se cargó agua (3200 ul) y la mezcla se agitó hasta formar una solución transparente. La solución se evaporó rotatoriamente a 55°C al vacío. Se cargó 1-butanol (24 g) de vuelta a la mezcla y la evaporación rotatoria continuó hasta que KF era del 1,00%. Se añadieron butanol (23,29 g) y agua (0,434 g) para llevar la solución a 14 volúmenes de 1-butanol /clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína y KF de 1,5%. La solución se dividió en 3 partes (12,9 g cada una) y se marcó como "A", "B" y "C". Se cargaron 98 mg de ácido maleico (0,25 equivalentes) al matraz B y se cargaron 197 de ácido maleico (0,5 equivalentes) al matraz C y cada uno se agitó hasta formar una solución transparente.

- 15 Se cargó acetona (6 ml) a cada matraz gota a gota en alícuotas de 1 ml durante 35 minutos. Se observó que cada experimento nucleaba durante la carga de acetona; se observó que la mayoría de los sólidos tenían un bajo contenido de ácido maleico (2,0 equivalentes) y la minoría el mayor contenido de ácido maleico (2,50 equivalentes). Al final de la adición de acetona, se cargaron semillas de 10 mg a cada matraz y los experimentos se mantuvieron a temperatura ambiente durante el fin de semana. Cada experimento se filtró en un embudo de vidrio sinterizado de frita fina de 15 ml y la torta se lavó dos veces con 15 ml de acetona. Las tortas se secaron sobre el filtro.

- 20 Los datos microanalíticos y de DSC sobre los sólidos aislados de cada experimento se resumen en la Tabla 3. En los tres experimentos, los datos microanalíticos se ajustan con los predichos por la teoría para clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Los resultados de DSC para todos los lotes también muestra un gran acontecimiento endotérmico cerca de 200°C, correspondiente al punto de fusión de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. En el **Ejemplo 30A** hay un acontecimiento muy pequeño a 54°C, que podría corresponder a una pequeña cantidad de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, forma II. Esto es muy probable debido a la considerable cantidad de nucleación no controlada que ocurre 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 equivalentes de ácido maleico, aunque en un menor grado, parece que la velocidad de adición de acetona era demasiado rápida. La pequeña cantidad de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, forma II, formado en presencia de solo 2,0 equivalentes de ácido maleico, por lo tanto, no es probable debido a los bajos niveles de ácido maleico directamente, pero podría evitarse probablemente con una velocidad de adición de acetona más lenta.

35 **Tabla 4: Datos microanalíticos y de DSC - ácido maleico variable**

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

- 40 El análisis de las aguas madre de cada experimento resumido en la Tabla 3 mostraba que, como era de esperar, la concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína aumentaba con el aumento de ácido maleico. El menor contenido de ácido maleico en el sistema de cristalización, por lo tanto, se espera que aumente el rendimiento.

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. Ácido Maleico	0,84%
30B	2,25 Eq. Ácido Maleico	0,90%
30C	2,50 Eq. Ácido Maleico	1,09%

Basándose en este ejemplo, el contenido de ácido maleico en el intervalo de 2,0 - 2,5 daría como resultado la formación de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína con la condición de que la velocidad de adición de acetona no provoque una nucleación considerable durante la carga. El ácido maleico en una cantidad tan baja como 1,75 equivalentes puede dar como resultado una solución super-saturada inestable que podría aplastarse fácilmente en el caso de tiempos de mantenimiento prolongados. Es deseable, por lo tanto, dirigir el intervalo de ácido maleico de 2,0 a 2,25 equivalentes en el sistema de cristalización.

4. Contenido de agua

A niveles de agua a o por debajo del 4% a 25°C, el clorhidrato de 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 de 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. Es preferente, por lo tanto, dirigir el contenido de agua del sistema a por debajo del 4% para la formación de clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

5. Carga de compuesto

Trabajar a 14 volúmenes de 1-butanol parece que da como resultado la cristalización más controlada y el mayor volumen no parece afectar negativamente al rendimiento. Por lo tanto, es preferible usar 14 volúmenes de 1-butanol por gramo de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.

6. Cantidad de acetona

Típicamente, se han usado 6 volúmenes de acetona por gramo de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. Al final de esta adición, puede observarse los estallidos de sólidos blancos que salen de la solución con la adición de cada gota de acetona. Los sólidos característicamente se disipan, pero la solución a menudo se hace ligeramente turbia tras la adición de los seis volúmenes completos. Estas observaciones sugieren que el sistema está altamente super-saturado en este punto, y que la adición de significativamente más de 6 volúmenes de acetona podría dar como resultado una sobre-tensión de la separación de fases. La adición de significativamente menos acetona, como alternativa, podría no permitir que el sistema alcanzara la separación de fases. Esto no solo pondría en peligro la morfología del aglomerado esférico sino que también afectaría negativamente al rendimiento.

Parámetros extrínsecos

1. Siembra

Brevemente, la adición de semillas en el momento de la separación de fases puede ayudar a controlar la cristalización. Tener sólidos presentes en el volumen en el momento de la separación de fases proporciona un sustrato sobre el que la fase dispersada puede depositarse y cristalizar en aglomerados. Controlar el tamaño y la forma del sustrato mediante la adición controlada de semillas frente a la nucleación en el volumen puede ser importante también para controlar la forma global del aglomerado. A lo largo del desarrollo del procedimiento, la cantidad de semilla añadida al sistema de 1-butanol/acetona ha variado un 1-3% del clorhidrato de 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 procedimiento inicial usado con 1-butanol/acetona, las semillas (3%) se cargaron antes de la adición de acetona. Para asegurar una distribución monodispersa del tamaño de partícula, es preferible cargar las semillas tan cerca del momento de la separación de fases como sea posible. Cargar las semillas antes de iniciar la adición de acetona puede provocar la nucleación en diferentes momentos durante la carga, dando como resultado una distribución multimodal.

Un protocolo similar al usado en la cristalización en DMF/acetónitrilo puede preferirse en la cristalización de 1-butanol/acetona. Después del grueso (~90%) de la carga de disolvente, se cargaría una suspensión de semillas de aproximadamente la mitad del 10% restante. El disolvente restante se usaría como un enjuague del recipiente de siembra y las líneas de carga.

2. Características del reactor

Basándose en la experiencia con el sistema de DMF/acetonitrilo, la geometría del reactor también puede afectar al rendimiento de la cristalización más directamente en términos del rendimiento. No es favorable realizar la cristalización en un cristalizador con una gran proporción de aspecto y una gran proporción 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 de siembra. En el caso extremo, las cristalizaciones a pequeña escala realizadas sin siembra en viales estrechos han dado como resultado la cristalización totalmente sobre las paredes, con prácticamente nada de sólidos en el volumen. Como la cristalización en 1-butanol/acetona también es un sistema de separación de fases, se espera que un reactor con una proporción de aspecto relativamente pequeña y una proporción de superficie a volumen pequeña sea óptimo.

3. Adición de acetona

El protocolo de adición de acetona varía de tan poco como 35 minutos hasta tanto como 3 horas y 45 minutos. Como se indica en la sección 4.1.3, la adición de acetona demasiado rápida puede dar como resultado la nucleación prematura de sólidos pegajosos en el volumen, que puede conducir a una mezcla de sales en el producto final. La carga de acetona durante 3 horas 45 minutos no mostró prácticamente ninguna ventaja respecto a un tiempo de carga de 2 horas o 1 hora. Al final de la adición, la solución era turbia en todos los casos y todas las cristalizaciones transcurrieron como se esperaba, dando como resultado clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de alta calidad. Parece, por lo tanto, que aunque la carga de acetona demasiado rápida puede dar como resultado un tiempo de inducción acortado y la nucleación prematura de los sólidos durante la adición de acetona, no hay un límite obvio para el tiempo de adición máximo. Puede preferirse un tiempo de adición diana de dos horas, que está en la mitad del intervalo encontrado como aceptable.

4. Mezcla

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

Parece que los aglomerados esféricos son más robustos y no se rompen tan fácilmente durante los periodos de agitación prolongados y los aglomerados parecen estar intactos después de 11 días de agitación.

En el caso de que se incorpore cromatografía al procedimiento de síntesis de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, se recomienda que el producto cromatografiado se caracterice bien antes de pasar a la cristalización final. Durante la preparación para la cromatografía, el producto bruto de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se disuelve en agua con un ligero exceso (~0,2 equivalentes) de ácido maleico. La solución acuosa purificada es el material de partida para la cristalización final en 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 de su uso en la cristalización en 1-butanol/acetona. Se desconoce si pueden retirarse partes del HCl durante la cromatografía. En el trabajo previo, la concentración de ión cloruro se midió por cromatografía de iones. Si el contenido de cloruro está significativamente por debajo de 0,5 equivalentes (<0,45), se recomienda añadir HCl para obtener el valor deseado.

La cromatografía se realiza con solo un ligero exceso de ácido maleico. Por lo tanto, el ácido maleico puede añadirse a la solución purificada para conseguir los 2,5 equivalentes diana. Adicionalmente, la concentración de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína (base libre) debería cuantificarse con precisión como la base de las adiciones de ácido. Tanto el ácido maleico como las concentraciones de base libre de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se han cuantificado usando HPLC.

Si la cromatografía se retira de la síntesis, el intercambio de disolvente para conseguir las condiciones iniciales apropiadas puede simplificarse usando 1-butanol como el disolvente de disolución primaria y añadiendo justo el agua suficiente (~8% por KF) para obtener una solución incolora transparente. Esta solución se destila después solo durante un corto tiempo para conseguir un KF de menos 1,5%.

Características de polvo del aglomerado esférico empaquetado ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína

Los aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína preparados en el **Ejemplo 20** se estudiaron para determinar sus características de polvo, que son pertinentes para el desarrollo de una composición farmacéutica con clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Antes del ensayo, los sólidos se hicieron pasar por 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 características de flujo de polvo, distribución de tamaño de partícula de polvo, volumen de polvo y densidad aparente, y compresibilidad y compactación del polvo.

El flujo de polvo se evaluó usando un aparato de ensayo de la abertura de flujo, medida como la abertura más pequeña a través de la cual el polvo fluye libremente. El ensayo de flujo de polvo se repitió satisfactoriamente a través de una abertura con una apertura de 6 mm. Un flujo de polvo de 6 mm se considera bueno para el desarrollo de la formulación de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína. La repetición satisfactoria del flujo a través de una abertura de 4 mm más estrecha, sin embargo, dependía de cómo se introducía el polvo al aparato de ensayo. El índice de compresibilidad calculado del 17,8% también indicaba características de flujo de buenas a moderadas para estos aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de **S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína**.

La distribución del tamaño de partícula del polvo se midió usando un análisis de tamizado. La distribución del tamaño de partícula medio se calculó usando el procedimiento de media geométrica. Los datos de distribución de tamaño de partícula se presentan en la **Figura 12**. Estos aglomerados empaquetados ordenadamente presentaban un tamaño de partícula medio de 134 micrómetros (que a partir de ahora se menciona en μm). Solo el 1,63% del material se consideró como finos, menos de 75 μm , con más del 90% dentro de 105-250 μm . Más del 75% del material estaba dentro de 105-150 μm . El intervalo limitado en la distribución del tamaño de partícula de polvo para aglomerados empaquetados ordenadamente es entre 100 y 200 μm , que es altamente deseable para el desarrollo de una composición farmacéutica con clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La densidad volumétrica del polvo se evaluó como la masa del material dentro de un cilindro graduado de 50 ml. La densidad aparente del polvo se calculó como el punto de equilibrio, cuando la adición con golpeteo no alteraba el volumen de polvo. Los aglomerados empaquetados ordenadamente presentaban una densidad en polvo volumétrica de 0,41 g/ml con una densidad aparente de 0,50 g/ml.

El polvo se evaluó para compresión directa sin ningún excipiente. Se fabricaron compactos de 100 mg en peso usando una herramienta cóncava redondeada de 8/32 pulgadas (6,35 mm). Los comprimidos se comprimieron a diversas fuerzas de compresión y se evaluaron para resistencia, espesor y disgregación. El perfil de compresión directa de los aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína se presenta en la **Figura 13**. Los aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína presentan un buen perfil de compresibilidad sin usar excipientes. Son posibles comprimidos relativamente fuertes (6,35 mm), tan duros como 11 kP, con una fuerza de compresión entre 900 y 1000 kg. La resistencia del comprimido alcanza un máximo aparente entre 900 y 1000 kg de fuerza de compresión. La adhesión minoritaria de las paredes del punzón y el troquel se observó durante los experimentos de compresión. Sin embargo, se consideró que la adherencia era un problema minoritario y podía resolverse fácilmente usando un lubricante apropiado. El efecto del espesor del comprimido como una función de la fuerza de compresión se presenta en la **Figura 14**. Los tiempos de disgregación del comprimido se evaluaron también para compactos de aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de 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 rápida de menos de 2 minutos y estaban bastante por debajo de la diana de 10 minutos (Véase la **Figura 15**).

En resumen, los aglomerados empaquetados ordenadamente de cristales de clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína muestran propiedades altamente deseables para el desarrollo de una composición farmacéutica, tal como comprimidos, con clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Composiciones farmacéuticas

También se incluyen dentro de la presente invención una clase de composiciones farmacéuticas que comprenden clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína junto con uno o más vehículos, diluyentes y/o adyuvantes no tóxicos y farmacéuticamente aceptables (denominados colectivamente en el presente documento materiales de "soporte") y, si desea, otros ingredientes activos. El clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína de la presente invención puede administrarse por cualquier vía adecuada, preferentemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha vía y en una dosis eficaz para el tratamiento pretendido. El clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína activo y las composiciones por ejemplo, pueden administrarse por vía oral, intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o tópica.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se prepara preferentemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del ingrediente activo. Los ejemplos de dichas unidades de dosificación son comprimidos o cápsulas. El ingrediente activo puede administrarse también por inyección como una composición en la que, por ejemplo, puede usarse solución salina, dextrosa o agua como un vehículo adecuado.

La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y el régimen de dosificación para tratar una patología con el compuesto y/o composiciones de la presente invención depende de una diversidad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo y estado médico del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía y frecuencia de administración y el compuesto particular empleado y, de esta manera, puede variar ampliamente. Las composiciones farmacéuticas pueden contener ingredientes activos en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 2000 mg, preferentemente en un intervalo de aproximadamente 0,5 a 500 mg y más preferentemente entre aproximadamente 1 y 100 mg. Una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal y más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal puede ser apropiada. La dosis diaria puede administrarse en una a cuatro dosis por día.

El clorhidrato cristalino de maleato S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede administrarse también mediante un dispositivo transdérmico. Preferentemente, la administración tópica se conseguirá usando un parche del tipo de depósito y membrana porosa, o una variedad de matriz sólida. En cualquier caso, el agente activo se suministra continuamente desde el depósito o las microcápsulas a través de una membrana hacia el adhesivo permeable al agente activo, que está en contacto con la piel o la mucosa del destinatario. Si el agente activo se absorbe a través de la piel, un flujo controlado y predeterminado de agente activo se administra al destinatario. En el caso de microcápsulas, el agente de encapsulación puede funcionar también como la membrana.

La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos, de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender meramente 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. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo, que actúa como estabilizador. Se prefiere también incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el emulsionante o emulsionantes con o sin el estabilizador o estabilizadores constituyen lo que se denomina cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa constituyen lo que se denomina base de pomada emulsionante que forma la fase dispersada oleosa de las formulaciones en crema. Los emulsionantes y los estabilizadores de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la presente invención incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárilico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico, entre otros.

La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación está basada en la consecución de las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la probabilidad de que se use la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites en formulaciones de emulsión farmacéuticas es muy baja. De esta manera, la crema debería ser preferentemente un producto no graso, que no manche y lavable, con una consistencia adecuada para evitar fugas de los tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, mono o dibásicos, 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-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada. Estos pueden usarse solos o en combinación, dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión, tales como parafina blanca blanda y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo incluyen también gotas para los ojos en las que los ingredientes activos están disueltos o suspendidos en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para los ingredientes activos. Los ingredientes activos están presentes preferentemente en dichas formulaciones en una concentración del 0,5 al 20%, ventajosamente del 0,5 al 10% y particularmente aproximadamente del 1,5% p/p.

Para fines terapéuticos, el clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína normalmente se combina con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Si se administra *per os*, el compuesto puede mezclarse con lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, alquil ésteres de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y de calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma arábiga, alginato sódico, polivinilpirrolidona y/o alcohol polivinílico y después formarse en comprimidos o encapsularse para una administración conveniente. Dichas cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que puede proporcionarse en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetil celulosa. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para inyección estéril isotónica acuosa o no acuosa. Estas soluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles o gránulos que tienen uno o más de los vehículos o diluyentes mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. El clorhidrato cristalino de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína puede disolverse en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro sódico y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración se conocen bien y ampliamente en la técnica farmacéutica.

REIVINDICACIONES

1. Clorhidrato de maleato de S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína.
2. Una forma cristalina de la sal de la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica que comprende la sal de la reivindicación 1 o la forma cristalina de la
5 reivindicación 2, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La sal de la reivindicación 1, la forma cristalina de la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de una afección en la que forma parte una producción de NO patológicamente alta.
5. La sal de la reivindicación 1, la forma cristalina de la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de la
10 reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis séptica, espondiloartritis, artritis reumática aguda, artritis enteropática, artritis neuropática y artritis piogénica.

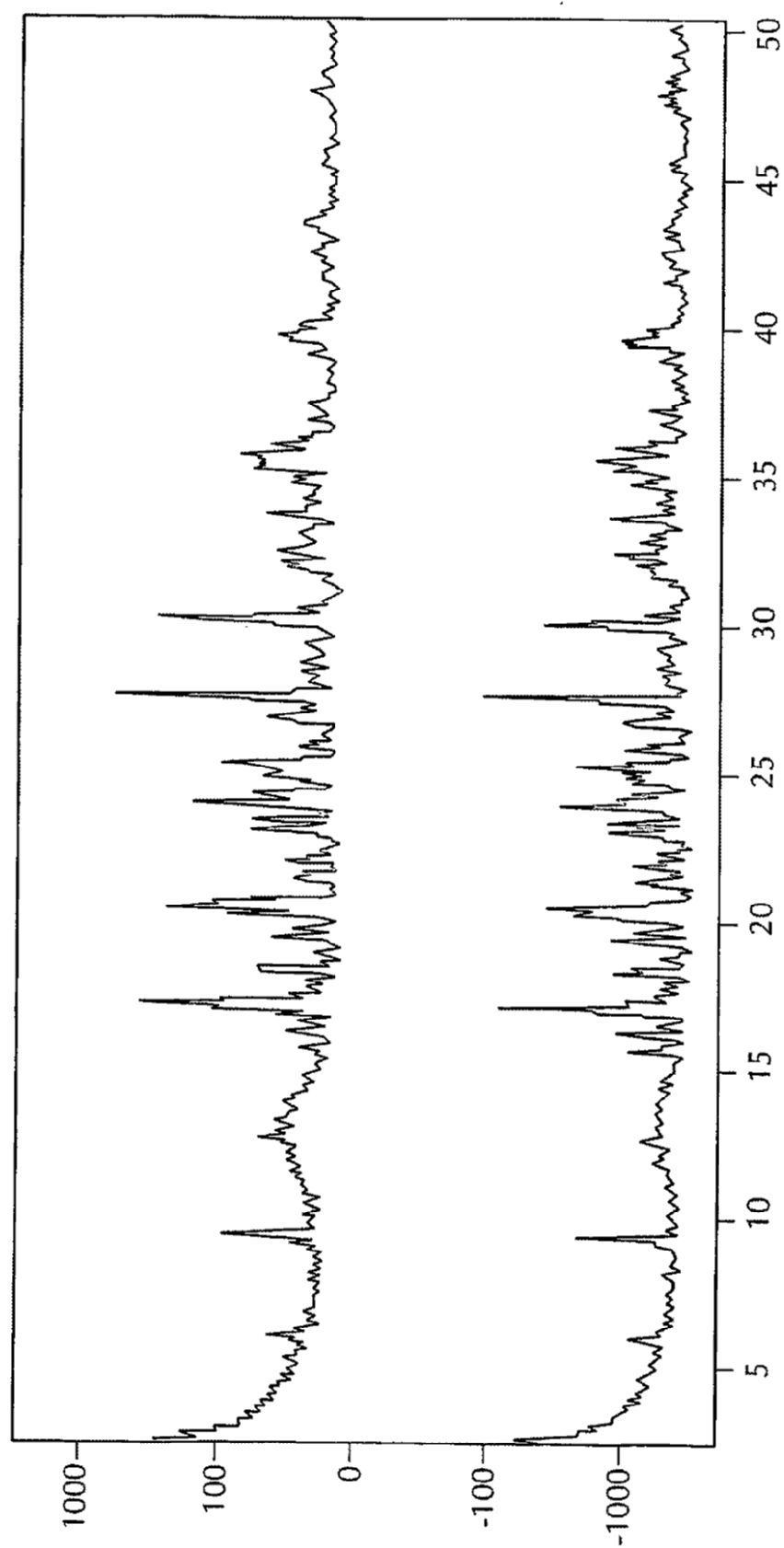
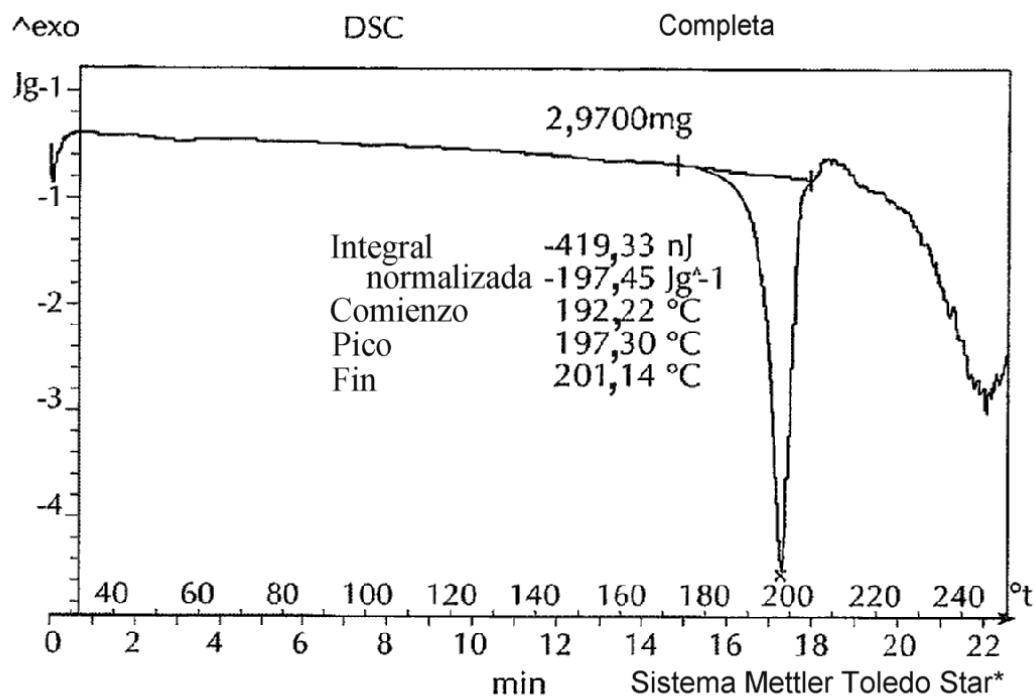
FIG. 1

FIG. 2**FIG. 3**

TGA

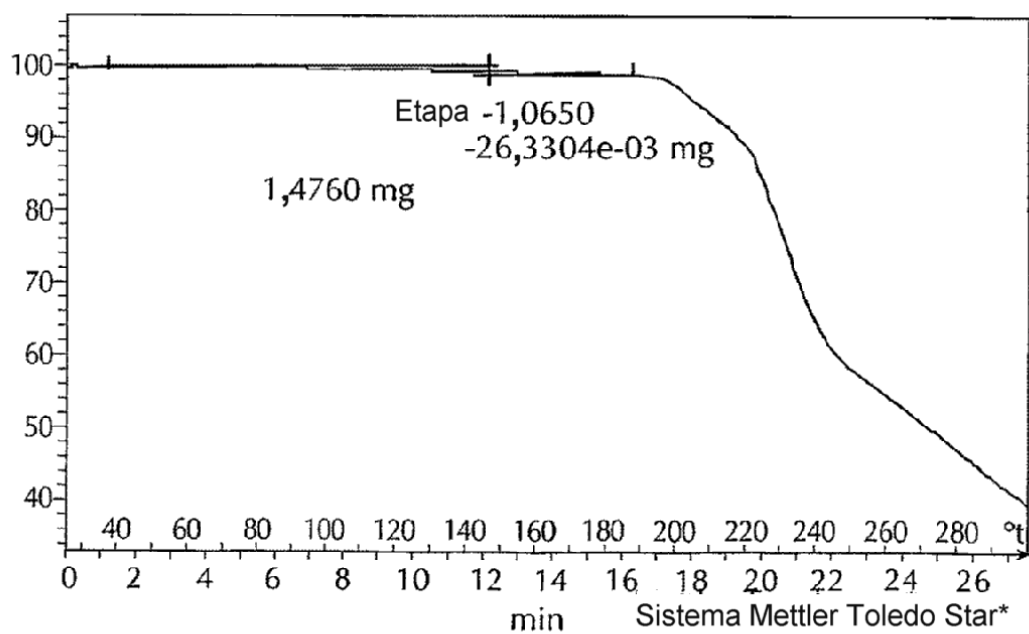


FIG. 4

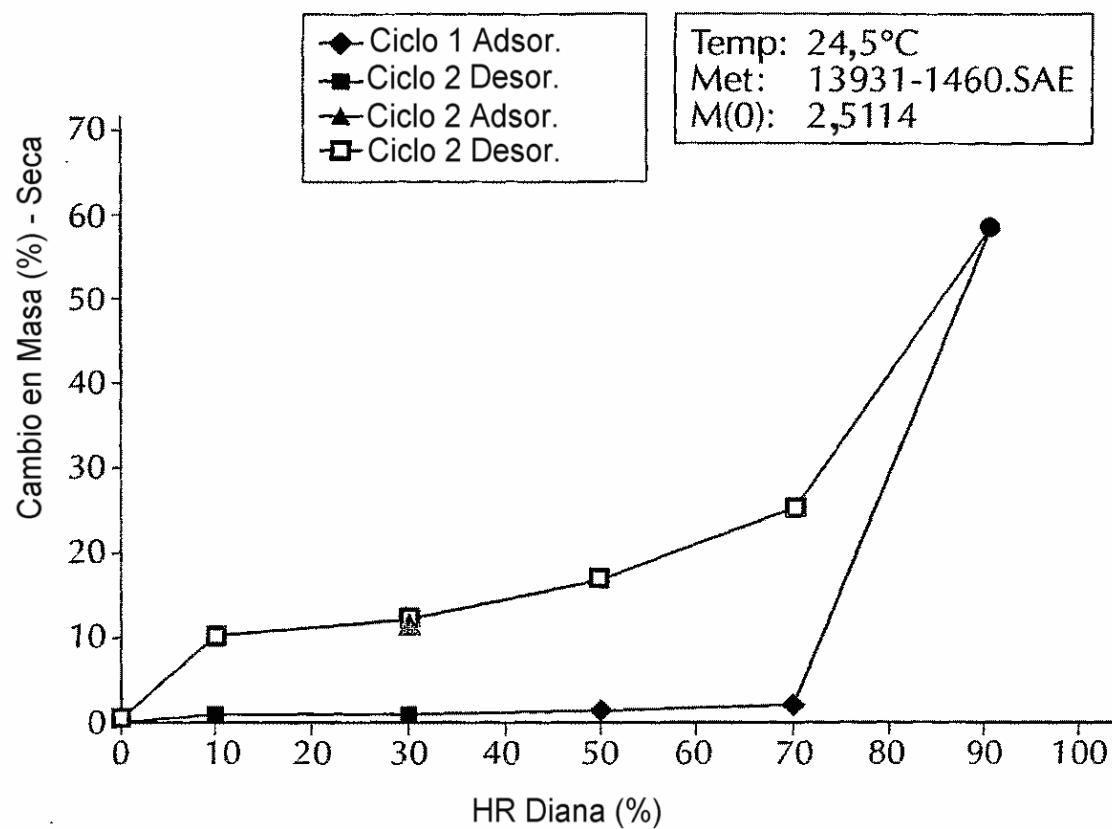


FIG. 5

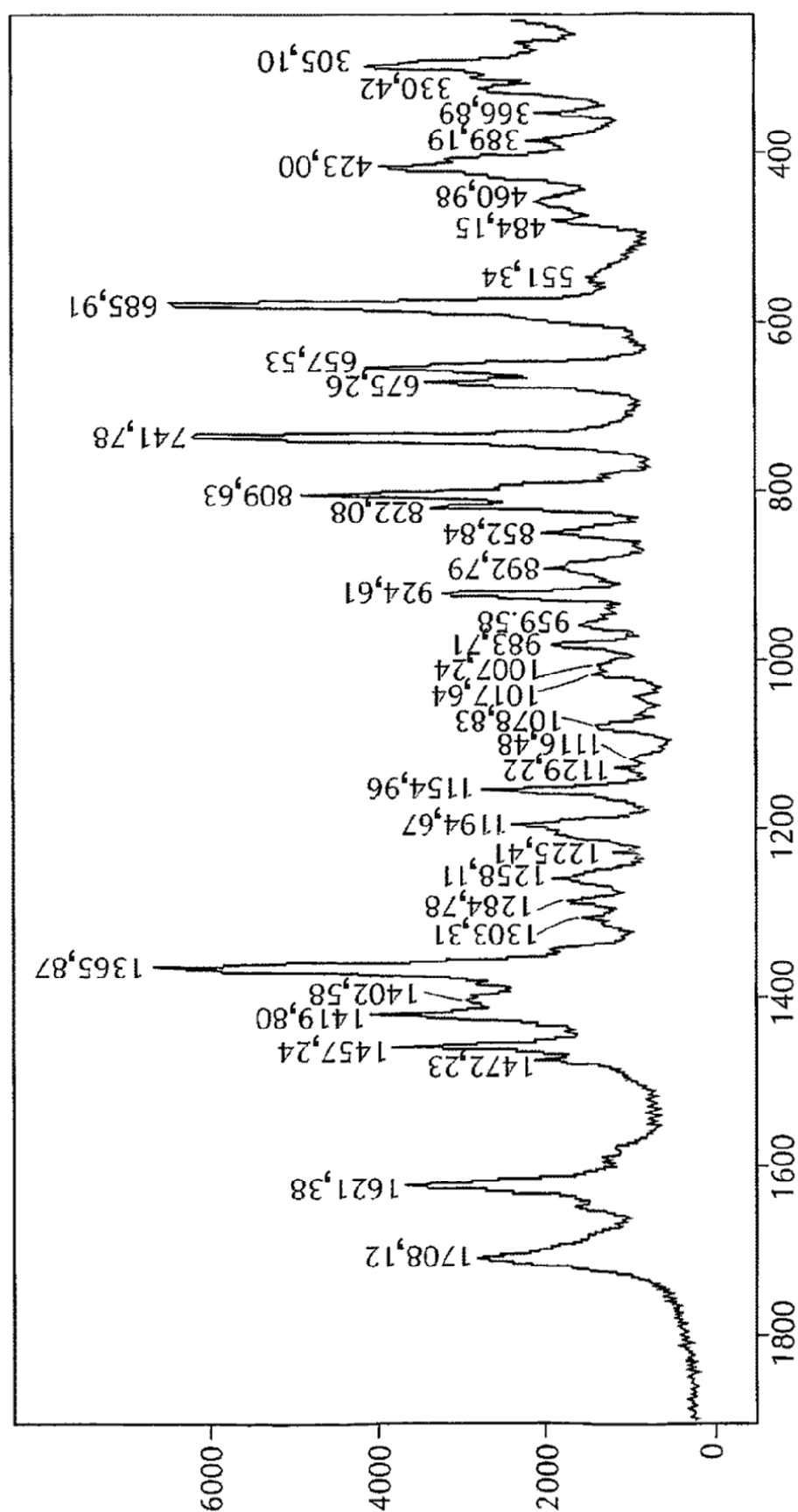


FIG. 6

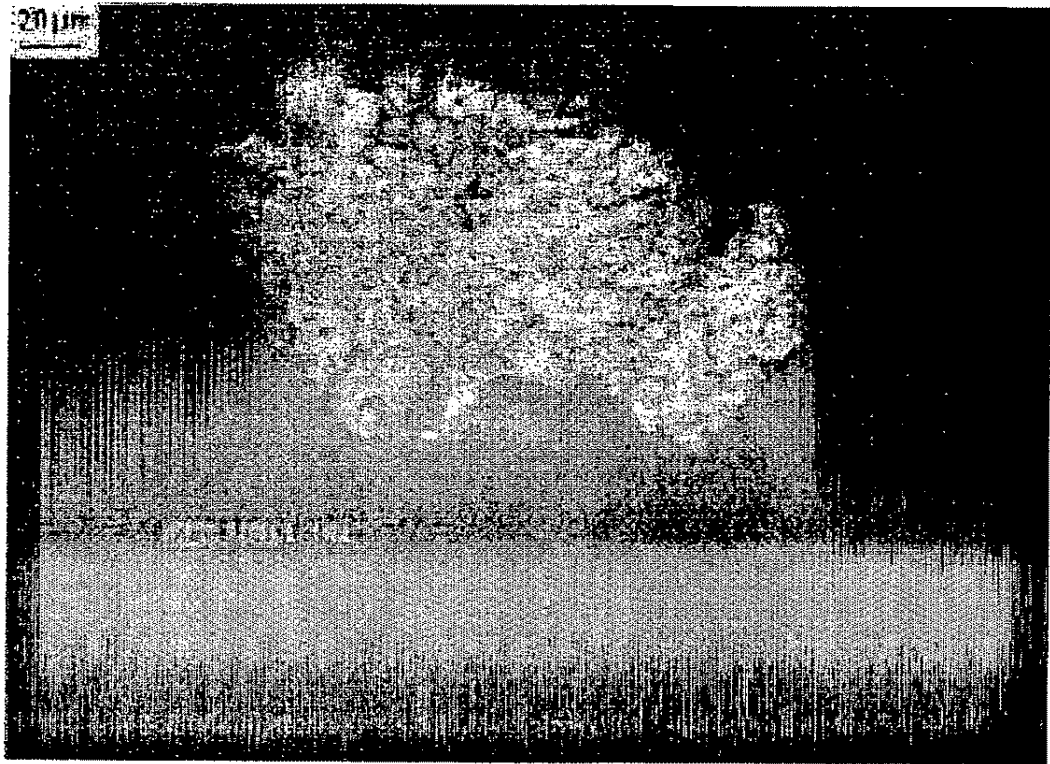


FIG. 7A

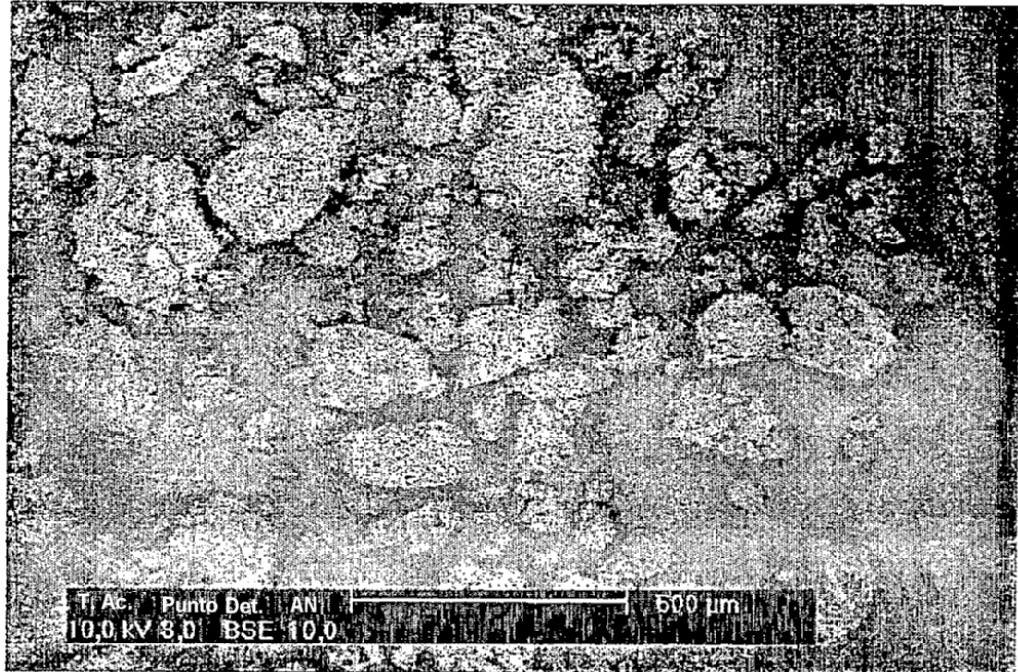


FIG. 7B

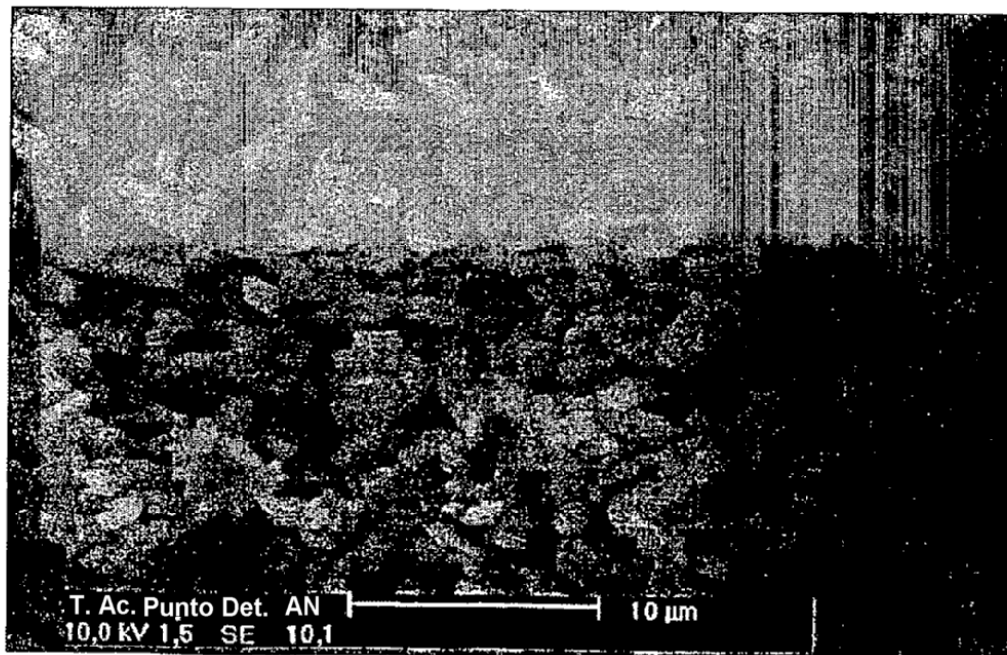


FIG. 8

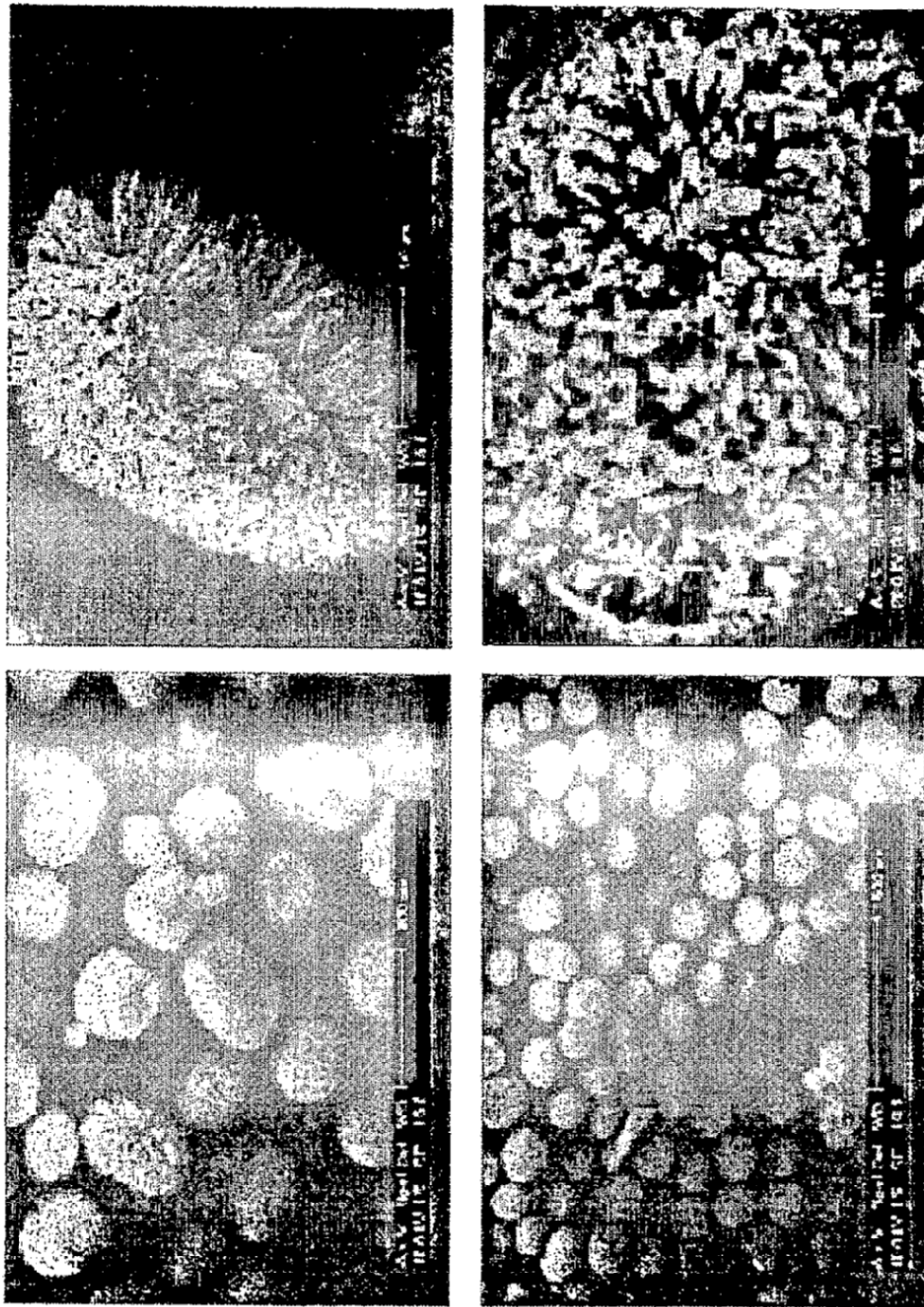


FIG. 9A

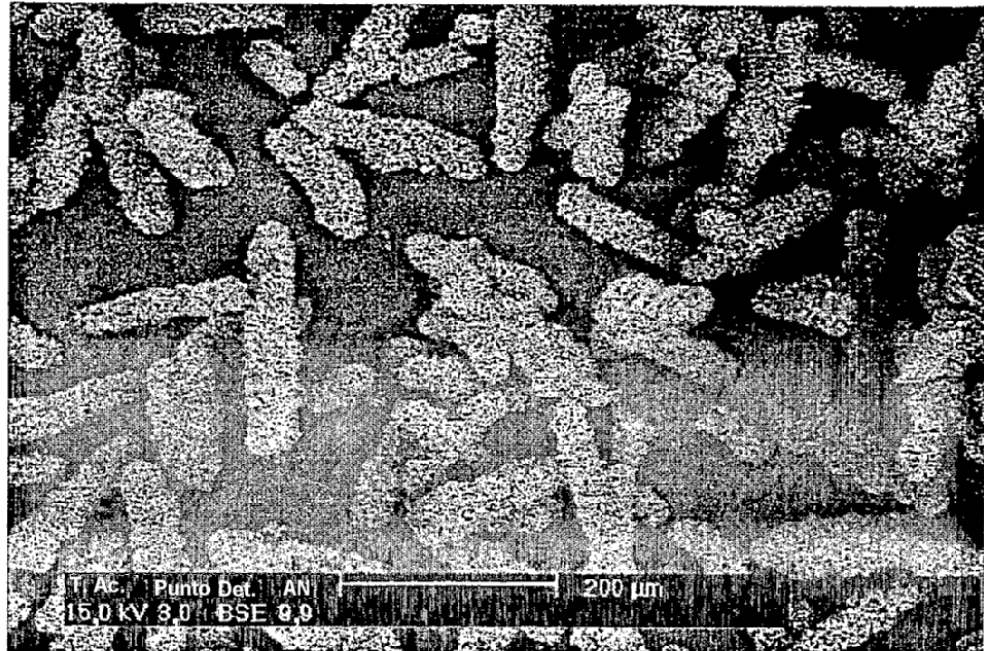


FIG. 9B

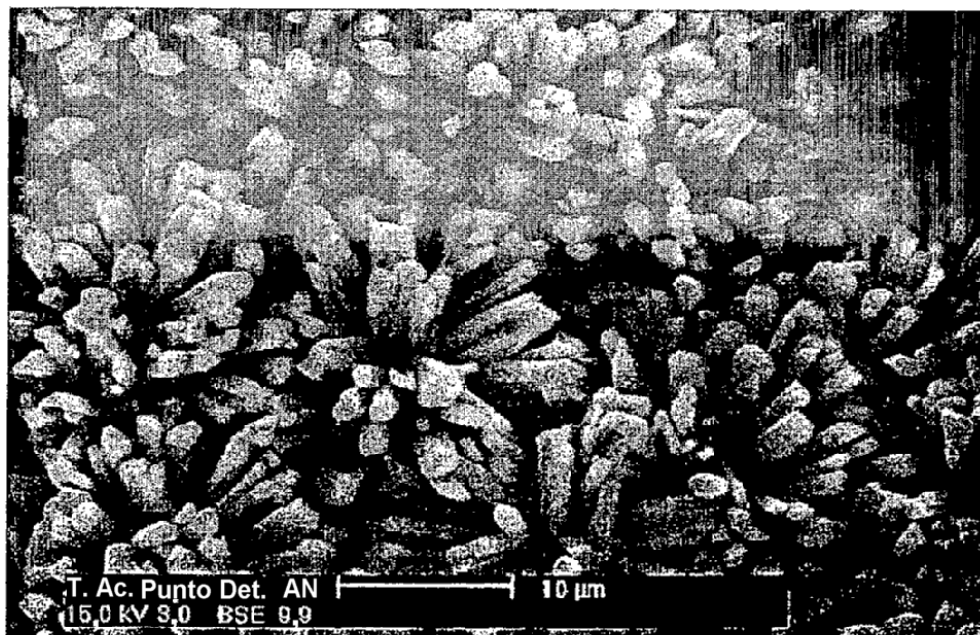


FIG. 10

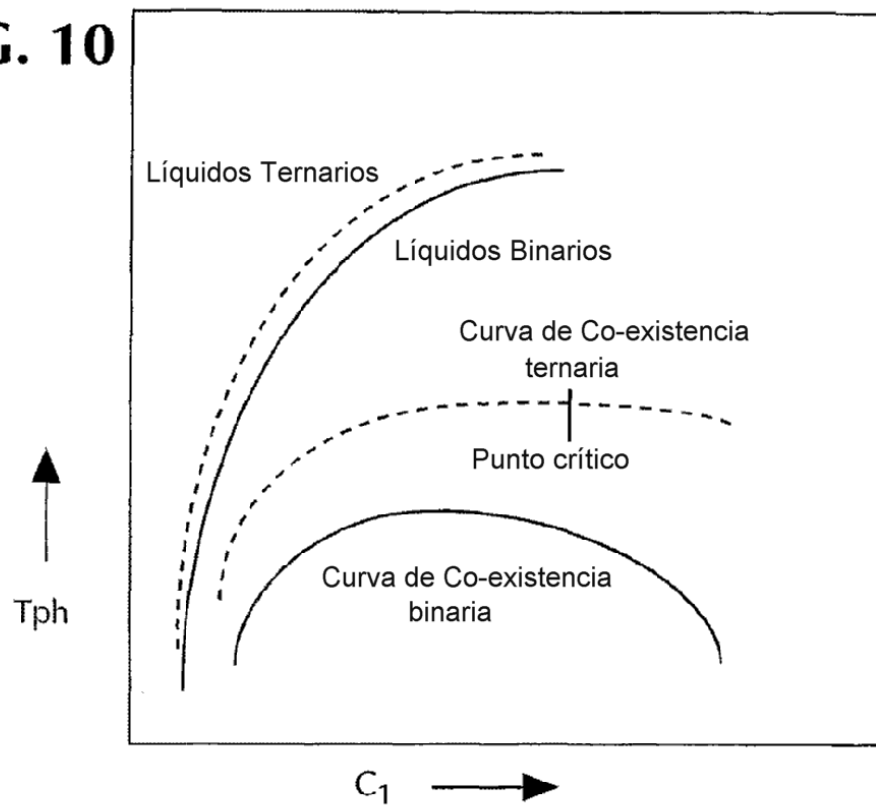


FIG. 11

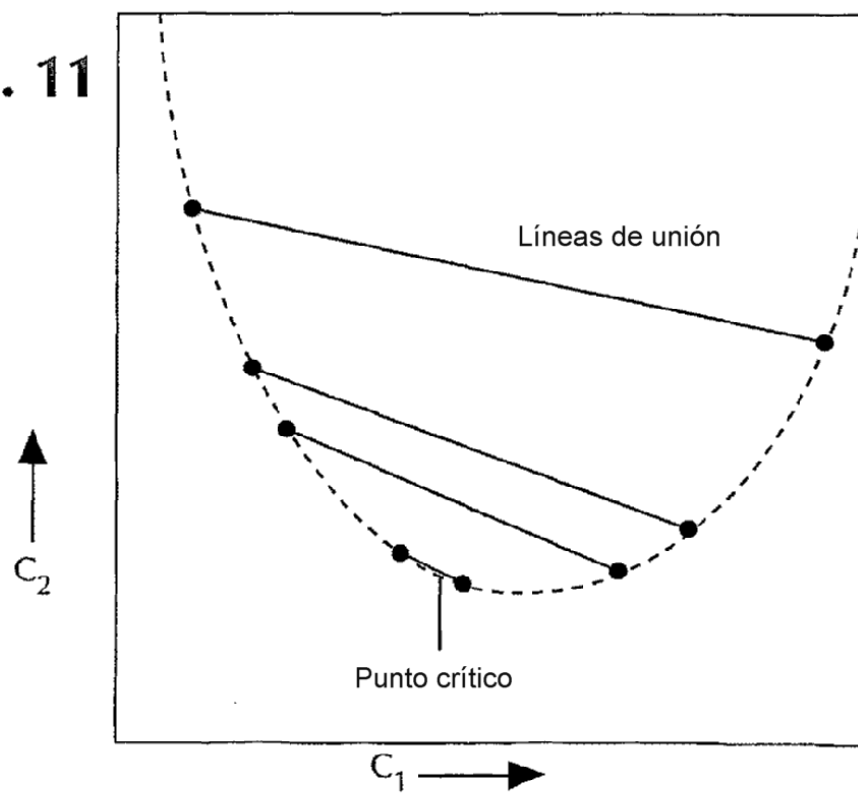


FIG. 12

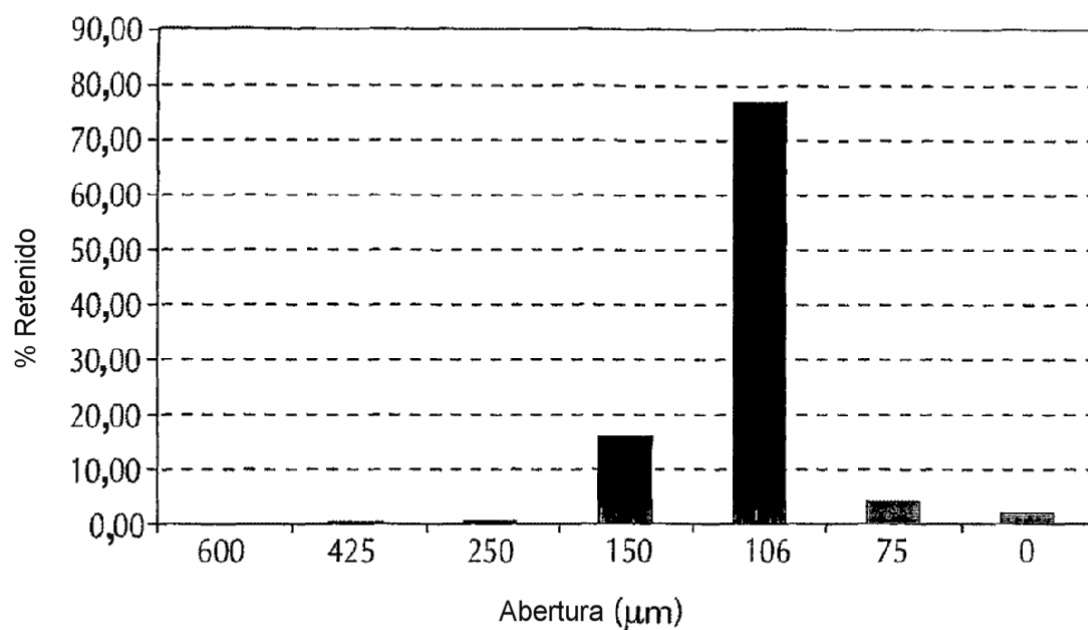


FIG. 13

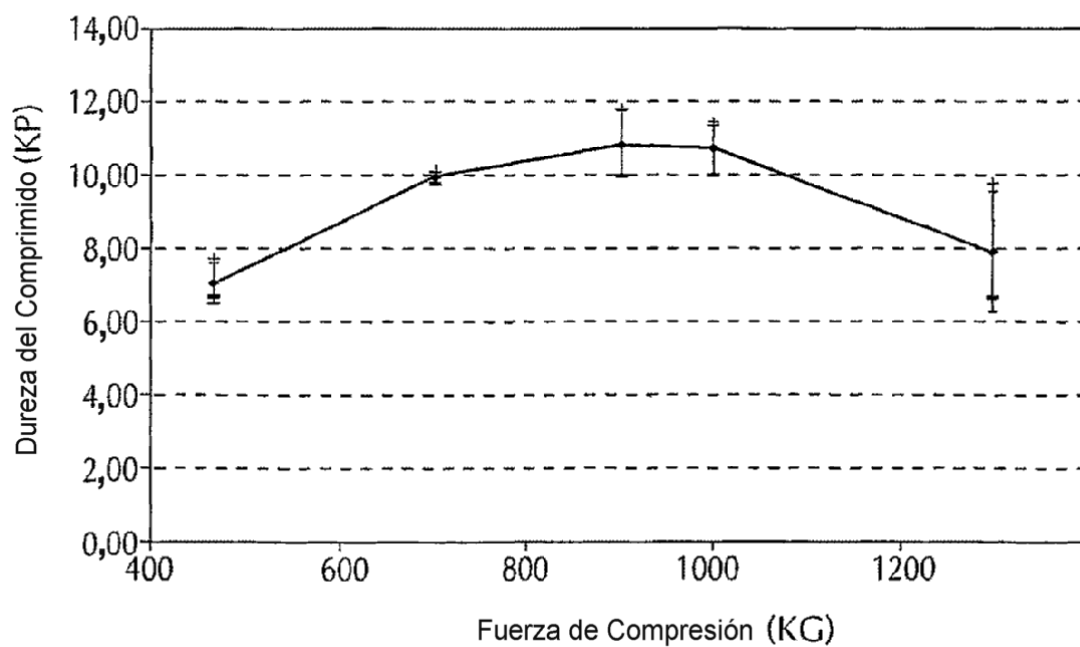


FIG. 14

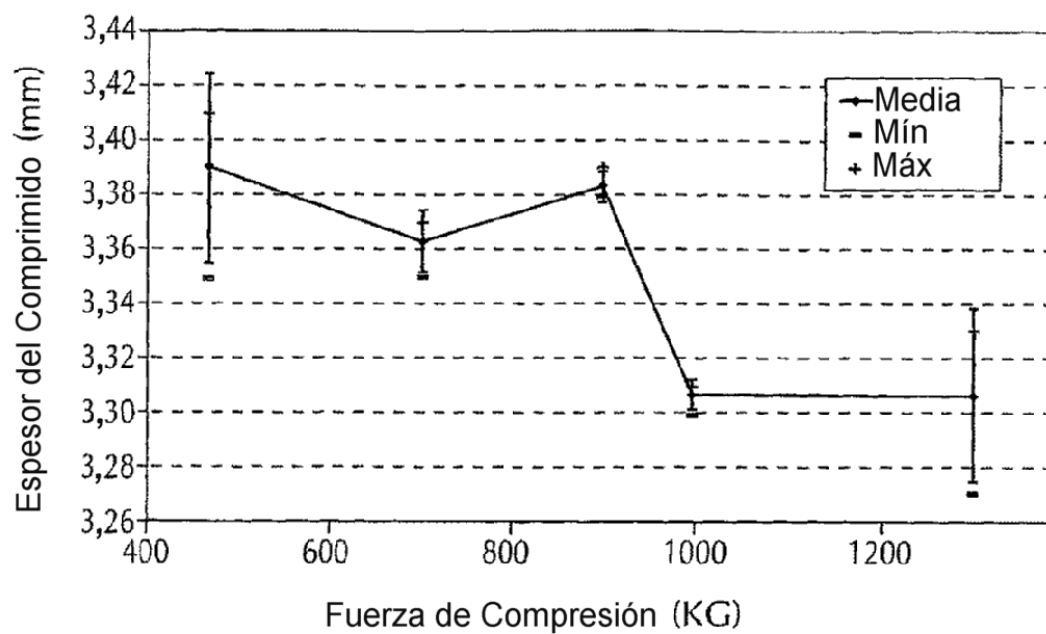


FIG. 15

