



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
  
ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 310 056**

(51) Int. Cl.:

**C07D 233/54** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99968148 .9**

(96) Fecha de presentación : **20.12.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1140857**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

(54) Título: **Síntesis de dihidrocloruro de histamina.**

(30) Prioridad: **23.12.1998 US 113933 P**

(73) Titular/es: **MAXIM PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**Suite 400, 8899 University Center Lane**  
**San Diego, California 92122, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2008**

(72) Inventor/es: **Yeh, Wen-Lung;**  
**Antczak, Casimir;**  
**McGolrick, Jeffry, David;**  
**Roth, Michael, Joseph y**  
**Wrona, Mark**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2008**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 310 056 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**

Síntesis de dihidrocloruro de histamina.

**5 Antecedentes de la invención**

La histamina es un compuesto que posee una actividad biológica importante, mediada por receptores farmacológicos. Desde hace tiempo, la histamina se contempla como una molécula que tiene, principalmente, efectos biológicos negativos. Recientemente, sin embargo, se han puesto de manifiesto nuevos usos de la histamina como potente agente farmacéutico. Por ejemplo, se ha usado histamina junto con interferón-alfa para activar células NK en presencia de monocitos. Véase la Patente de EE.UU. N° 5.728.378. Para poder beneficiarse de las propiedades terapéuticas de la histamina, es necesario obtener grandes cantidades del compuesto de grado farmacéutico.

La histamina está presente extensamente en la naturaleza como resultado de procesos de putrefacción y un derivado de la misma, dihidrocloruro de histamina, se vende en el comercio como sustancia estándar para ensayos y como componente en ciertos kits de diagnóstico de alergias. Con frecuencia, la fuente de esta histamina es de origen natural y, como tal, contiene una variedad de contaminantes que la hacen inapropiada para su uso farmacéutico. Se conocen en la técnica también protocolos sintéticos para la síntesis de dihidrocloruro de histamina.

El dihidrocloruro de histamina se puede sintetizar, de manera conveniente, usando la descarboxilación de histidina. Empleando esta vía de síntesis, la histidina se descarboxila y, subsiguientemente, se trata para formar la forma de sal dihidrocloruro de la molécula. Por ejemplo, Hashimoto y col. han analizado la preparación de histamina usando ciclohexanona como catalizador para la descarboxilación de la histidina (Hashimoto y col., *Chemistry Letters*, 893-896 (1986)). El estudio de Hashimoto y col. informa sobre el aislamiento de dihidrocloruro de histamina con un rendimiento de 95%, usando 2-ciclohexen-1-ona como catalizador, a partir de la reacción en la que interviene la histidina y 2-ciclohexen-1-ona al 1% en volumen en 10 partes de ciclohexanol a reflujo (26 horas). El método de Hashimoto preconiza también el uso de tolueno y HCl gaseoso que se hace burbujejar a través de la solución descarboxilada resultante para hacer precipitar y recoger el producto final de dihidrocloruro de histamina.

Los intentos de reproducir el procedimiento de Hashimoto para producir cantidades farmacéuticamente puras de histamina han fracasado. Fueron necesarias cantidades adicionales del catalizador para hacer el procedimiento operativo y en el producto final hubo una cantidad sustancial de impurezas. Además, estas impurezas fueron difíciles de eliminar. A la vista de estos resultados, se encontró que el procedimiento de Hashimoto es un método no apropiado para generar grandes cantidades de histamina farmacéuticamente aceptable.

También se ha informado sobre el uso de acetofenona como catalizador para la descarboxilación de histamina. Los presentes inventores reprodujeron el método descrito en la patente japonesa concedida a Akimasa y col. (Patente Japonesa N° 05.255.204 (1983)) y usaron 0,26 equivalente de acetofenona y 10 partes de dietilenglicol como disolvente para la reacción de descarboxilación. Aun cuando el método de Akimasa y col. fue mucho más eficaz para la conversión de histidina en histamina, fracasó en cuanto a proporcionar de manera consistente un producto de grado farmacéutico. Al igual que el producto final obtenido con el método de Hashimoto, durante el análisis de HPLC se observaron impurezas en el producto final preparado según el método de Akimasa.

Aunque las condiciones con acetofenona y dietilenglicol parecían prometedoras, se observó un problema relacionado con el procesamiento. Tanto la base libre de histamina como la sal dihidrocloruro son fácilmente solubles en agua y, por lo tanto, resultó difícil utilizar cualquier técnica de extracción para separar el producto del disolvente de dietilenglicol que, normalmente, se retiraba con extracción con agua. Adicionalmente, el dihidrocloruro de histamina también fue fácilmente soluble en dietilenglicol, por lo que también es imposible el aislamiento directo por filtración.

Igualmente, se reprodujeron las condiciones de reacción de Takano y col., en las que interviene la pentan-3-ona (*Heterocycles*, 6:1167).

Los resultados de estos experimentos no mostraron ninguna mejoría con respecto a las condiciones de acetofenona descritas anteriormente.

Se requiere una fuente consistente de histamina de grado farmacéutico, en especial considerando las aplicaciones farmacéuticas recientemente encontradas para la histamina. Los métodos convencionales usados en la técnica, en los que la histamina se purifica a partir de fuentes naturales, no son capaces de proporcionar histamina en un grado suficientemente alto para los usos farmacéuticos. Además, los métodos de síntesis que se llevan a cabo en la técnica tampoco son capaces de lograr histamina con un grado suficientemente alto. En consecuencia, existe en la técnica la necesidad de un método optimizado mediante el cual se pueda producir dihidrocloruro de histamina de grado farmacéutico.

**Resumen de la invención**

La invención que se describe en este documento se refiere a la preparación de grados farmacéuticos de dihidrocloruro de histamina usando un método de síntesis no enzimático de dos etapas. Una realización de la invención es un método para la síntesis de dihidrocloruro de histamina que comprende: descarboxilar una solución que contiene L-

# ES 2 310 056 T3

histidina, con lo cual se forma una solución que contiene histamina, en ausencia de una enzima de descarboxilación; formación de una solución que contiene monohidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene histamina; y formar una solución que contiene dihidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene monohidrocloruro de histamina.

5 Un aspecto de esta realización comprende, además, triturar la solución que contiene histamina; por ejemplo, la solución que contiene histamina se puede triturar con una solución de cloruro de metíleno. En otro aspecto de esta realización, la solución que contiene monohidrocloruro de histamina se forma por la adición de una cantidad efectiva de ácido clorhídrico en una solución de isopropanol. Por ejemplo, la cantidad efectiva de ácido clorhídrico es de  
10 aproximadamente 0,1 a 0,9 equivalentes molares de ácido clorhídrico con respecto a la base libre de histamina. En otro ejemplo, la cantidad efectiva de ácido clorhídrico es de aproximadamente 0,6 equivalentes molares con respecto a la base libre de histamina. Todavía otro aspecto de esta realización comprende, además, la etapa de aislar un grado farmacéutico de dihidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene dihidrocloruro de histamina.

15 Otra realización de la invención que se describe en este documento es un método para sintetizar un grado farmacéutico de dihidrocloruro de histamina, que comprende: descarboxilar una solución que contiene L-histidina, con lo que se forma una solución que contiene histamina en ausencia de una enzima de descarboxilación; formar una solución que contiene monohidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene histamina; formar una solución que contiene dihidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene monohidrocloruro de histamina; y aislar el  
20 dihidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene dihidrocloruro de histamina.

En un aspecto de esta realización, el dihidrocloruro de histamina contiene cantidades iguales o inferiores a las siguientes: 0,8% de hidrocloruro de histidina monohidrato, 0,1% de impurezas cromatográficas individuales, y 2% de impurezas totales.

## 25 Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra el método de reacción según la técnica anterior.

30 Figura 2 muestra el método según la invención que se describe en este documento, y que se analiza en los Ejemplos 5 y 6.

## Descripción detallada de la invención

35 La invención que se describe en este documento se refiere a la preparación de grados farmacéuticos de dihidrocloruro de histamina, utilizando un método de síntesis no enzimática de dos etapas, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención a la que se refiere este documento describe la síntesis de dihidrocloruro de histamina por medio de la descarboxilación no enzimática de histidina y la conversión por etapas del producto descarboxilado en la forma de sal dihidrocloruro. La invención que se describe en este documento considera que un producto final  
40 de dihidrocloruro de histamina que contiene una cantidad menor que cada una de las siguientes sustancias: 0,8% de HCl de histidina monohidrato, 0,1% de impurezas cromatográficas (que se definen más adelante) y 2% de impurezas totales, es aceptable para su uso farmacéutico.

45 Los métodos sintéticos conocidos en la técnica para sintetizar dihidrocloruro de histamina no son capaces de generar un producto de pureza suficiente para ser usado como compuesto farmacéutico. La Figura 1 muestra un método de descarboxilación conocido de la técnica anterior. Las etapas del método según la invención que se describe en este documento aparecen en la Figura 2.

50 Se utilizaron métodos de la técnica anterior para producir dihidrocloruro de histamina a partir de L-histidina como material de partida, en un intento de generar grados farmacéuticos de dihidrocloruro de histamina sintético. El material de partida se hizo reaccionar con el catalizador de la técnica anterior,  $\alpha$ -tetralona y ciclohexano. Después de finalizar la reacción, la muestra se enfrió y se burbujeó ácido clorhídrico en la solución para convertir la base libre de histamina en su forma de sal dihidrocloruro. El precipitado logrado se filtró, se lavó y se secó. El producto final obtenido por el método de la técnica anterior demostró contener un número inaceptablemente alto de contaminantes.

55 El material bruto producido usando el método de la técnica anterior tuvo una pureza de 02-94%, con una impureza importante del orden de 3-5% y cinco a ocho otras impurezas de =0,1%. Se llevaron a cabo etapas de purificación adicionales, o recristalización, que fueron sustancialmente eficaces para retirar la mayor parte de estos contaminantes. No obstante, dos impurezas no identificadas permanecieron a niveles mayores que 0,1%. Estas impurezas eluyeron después del producto de dihidrocloruro de histamina, y se hace referencia a ellas como impurezas o contaminantes cromatográficos. De esta forma, el producto preparado por este método fue inaceptable para el uso farmacéutico.

60 En vista de estos resultados, se diseñó un nuevo procedimiento para sintetizar dihidrocloruro de histamina de la pureza deseada. Este nuevo procedimiento implicó la descarboxilación de L-histidina (ácido ( $\alpha$ -amino-4-(ó 5)-imidazol propiónico) ( $C_6H_9N_3O_2$ ) para dar histamina. Tras la descarboxilación, la solución que contiene la base libre de histamina se trituró con cloruro de metíleno para precipitar el producto. A continuación, el producto se filtró y lavó. El producto filtrado se trató, subsiguientemente, con ácido clorhídrico en isopropanol para precipitar una sal de monohidrocloruro de histamina bruta. Este producto se filtró y aisló. La sal bruta se purificó seguidamente por técnicas de

## ES 2 310 056 T3

recristalización. A continuación, la sal monohidrocloruro de histamina se trató nuevamente con una solución de ácido clorhídrico/isopropanol para generar la forma dihidrocloruro de histamina de la molécula. Por último, la forma final del producto se decoloró y lavó. Estas etapas, conocidas como recristalización, se pueden repetir de forma extensiva para dar dihidrocloruro de histamina de pureza farmacéutica.

5 Todas las etapas se llevaron a cabo bajo una atmósfera de gas nitrógeno. La pureza del producto final se analizó por una serie de métodos analíticos, incluido el análisis de HPLC.

10 La invención que se describe en este documento contempla el uso de una serie de catalizadores o iniciadores de radicales para facilitar la reacción de descarboxilación. Un catalizador apropiado es aquel es capaz de catalizar eficazmente la descarboxilación de histidina, cuando este compuesto precursor se encuentra en un disolvente neutro y se calienta durante un número determinado de horas para dar un producto final de pureza aceptable. Se utilizan las siguientes cetonas enriquecidas con electrones, ya que tienden a reducir el número de impurezas presentes en el producto final: peróxido de benzoilo, 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), 2-ciclohexen-1-ona, acetofenona, 4'-bromoacetofenona, benzofenona, p-nitroacetofenona, p-metilacetofenona, p-metoxiacetofenona, p-metilacetofenona/1-metil-4-piperidona, y p-metil-acetofenona/AcOH.

15 Las condiciones de la reacción de descarboxilación estimulan la descarboxilación de los materiales de partida, mientras minimizan la formación de contaminantes no deseados. Las condiciones de reacción incluyen la realización de varias etapas del método en presencia de un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno. Las condiciones de reacción incluyen, adicionalmente, llevar a cabo la etapa de descarboxilación en un intervalo de temperaturas entre aproximadamente 145 a 170°C. Preferentemente, la reacción se efectúa en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 150 a 165°C, o en un intervalo de temperaturas desde aproximadamente 160 a 165°C.

20 25 En la invención que se describe en este documento, se contempla el uso de una serie de disolventes. Los disolventes en los que se llevan a cabo algunas etapas de la reacción pueden afectar al tiempo de reacción necesario para catalizar la descarboxilación de la histidina. Disolventes utilizables en la invención que se describe en este documento incluyen: ciclohexanol, n-metilpirrolidinona (NMP), di(etilenglicol), éter metílico de di(etilenglicol), 2-metiloxietil éter, 1-butanol, metoxietanol, ciclohexanona/NMP (en una relación de 3:1), dimetilformamida, y tetrametilensulfona.

30 35 Un parámetro adicional de la reacción descrita en este documento es el método de crear la forma salina de histamina por medio del tratamiento de la mezcla de reacción con cloruro de hidrógeno. El perfil de impurezas del producto final demostró estar afectado por la equivalencia molar del ácido agregado durante la precipitación de la sal bruta monohidrocloruro. Es posible controlar el grado de la formación de impurezas preparando una solución de cloruro de hidrógeno de una concentración conocida en isopropanol, y tratar la mezcla de reacción con ella.

40 45 Se puede utilizar una gama de equivalentes molares de cloruro de hidrógeno (HCl) en isopropanol (IPA) para llevar a cabo el método de la invención que se describe en este documento. Se puede utilizar una gama de aproximadamente 0,01 hasta 2 equivalentes molares para crear la forma salina de histamina. De manera alternativa, se puede usar una gama de aproximadamente 0,05 hasta 1,4 equivalentes molares. En otra alternativa, se puede utilizar una gama de aproximadamente 0,1 a 0,9 equivalentes molares. La relación seleccionada para llevar a la práctica la invención que se describe en este documento debe resultar en la generación última de un producto final con un nivel aceptable de impurezas, de modo que el producto final pueda ser usado como composición farmacéutica.

50 55 60 La concentración de la solución ácida usada para crear la forma salina no fue crítica. Por ejemplo, la concentración de HCl en IPA puede estar dentro de un intervalo de aproximadamente 6 a 9N. Sin embargo, el número de moles de ácido introducido resulta crucial para aislar un grado farmacéuticamente aceptable del producto final. La adición de un exceso de ácido hace que precipiten impurezas con la sal monohidrocloruro que son extremadamente difíciles de eliminar durante la formación subsiguiente de la sal de dihidrocloruro de histamina. La relación entre el método de formación de la sal y la generación de contaminantes no se apreció en la técnica.

Durante la adición de HCl en isopropanol para lograr la precipitación de la forma de sal monohidrocloruro de la molécula (precipitación de la sal) se pueden utilizar diversos codisolvientes. Codisolvientes que se pueden usar en la invención que se describe en este documento incluyen: cloruro de metileno, ciclohexanol, tolueno y éter metílico de terc-butilo (TBME).

65 Es de especial interés la pureza última del producto final. También se contemplan etapas adicionales del método para purificar el producto final. Por ejemplo, la recristalización es un procedimiento de cristalización repetida destinado a purificar una sustancia. En este procedimiento de purificación, se contempla el uso de una serie de disolventes. Estos disolventes incluyen: cloruro de metileno, 2-propanol, metanol, etanol (EtOH), metanol/acetona, agua, metanol/acetato de etilo, agua/acetona, metanol/etanol, agua/metanol, metanol/hexano, agua/metanol/acetona, metanol/cloruro de metileno, 2-propanol/etanol, metanol/2-propanol, acetona/2-propanol, acetona/etanol. Desde el punto de vista de la toxicología, se prefiere un disolvente atóxico tal como EtOH.

65 Se ha observado presencia de color en las diversas soluciones obtenidas durante la vía de síntesis. Se puede agregar carbón activado para eliminar parte del color con anterioridad, o como una etapa del procedimiento de recristalización.

# ES 2 310 056 T3

Los ejemplos siguientes analizan los métodos destinados a la descarboxilación de histidina, así como al aislamiento del producto de histamina. También se analizan los métodos de purificación del producto de dihidrocloruro de histamina bruto, usando múltiples etapas de recristalización. Igualmente, se discute la decoloración mediada por carbón.

- 5 La eficacia de las diversas etapas del método, así como la pureza del producto final, se puede analizar usando los métodos descritos más adelante. Se puede usar una o múltiples etapas de monitorización para ensayar la eficacia de la etapa de descarboxilación. De manera alternativa, se pueden utilizar distintos métodos de ensayo bien conocidos en la técnica para analizar la pureza del producto final. Un ejemplo de una etapa de monitorización de este tipo es  
10 la realización de una cromatografía de capa fina (TLC), un procedimiento bien conocido en la técnica, de diversos productos de reacción. Por ejemplo, la reacción se podría monitorizar usando TLC (fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH; 7,5:2,0:0,5; y nebulización de ninhidrina). Esta etapa de monitorización se puede llevar a cabo en cualquier momento después de la etapa de descarboxilación.  
15 Más adelante se analizan en detalle realizaciones particulares de la invención. Los siguientes ejemplos tienen únicamente valor ilustrativo y no se deben interpretar como limitaciones de la invención reivindicada. Existe una variedad de técnicas y procedimientos alternativos a disposición de los expertos en la técnica, que permiten de igual forma la realización exitosa de la invención prevista.

## 20 Ejemplos

### *Preparación de Dihidrocloruro de Histamina*

Los Ejemplos siguientes discuten la síntesis de dihidrocloruro de histamina a partir de compuesto precursor L-histidina. Los protocolos existentes de síntesis de histamina, aunque son capaces de proporcionar dihidrocloruro de histamina, adolecen de la limitación de producir un producto final impuro. Los Ejemplos siguientes discuten las diversas mejoras en la síntesis de dihidrocloruro de histamina y enseñan la preparación de un grado farmacéuticamente aceptable de dihidrocloruro de histamina.

30 **Ejemplo de Referencia 1**

### *Preparación de 500 gramos de Dihidrocloruro de Histamina Bruto*

35 A continuación, se describe un método para la síntesis de una muestra de 500 g de dihidrocloruro de histamina.

En un matraz de doce litros de capacidad (12 l), de 4 bocas y de fondo redondo, equipado con un termómetro, agitador mecánico, condensador y burbujeador de nitrógeno, se depositaron 7,5 l de ciclohexanol (disolvente), 750 gramos de L-histidina (sustrato), y 113 ml de acetofenona (catalizador). La suspensión se agitó en atmósfera de 40 nitrógeno, que se mantuvo durante toda la reacción.

La suspensión se calentó a refluo y se mantuvo a esa temperatura (150-165°C) durante un mínimo de 40 horas. Se retiró una pequeña muestra para un ensayo durante el proceso, para determinar el grado de descarboxilación de la histidina. La suspensión se enfrió a menos de 80°C y se agregaron 1.875 ml de tolueno. La mezcla se enfrió adicionalmente a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un embudo de Buchner en un nuevo matraz de 12 l, 4 bocas y fondo redondo.

El matraz nuevo que contiene el filtrado estuvo equipado con un termómetro, agitador mecánico, trampa de cloruro de hidrógeno y trampa de vacío, y se preparó para la adición de cloruro de hidrógeno gaseoso. Bajo agitación, la 50 solución se enfrió a menos de 10°C. Manteniendo la temperatura del lote por debajo de 20°C, se cargó un mínimo de 441 gramos (2,5 equivalentes) de cloruro de hidrógeno gaseoso. Después de finalizar la adición de cloruro de hidrógeno, la suspensión amarillenta espesa resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora.

La suspensión se filtró nuevamente a través de un embudo de Buchner. La torta de filtración se enjuagó con una 55 mezcla de 375 ml de ciclohexanol y 375 ml de tolueno, seguido de dos lavados con 750 ml de tolueno y dos enjuagues con 750 ml de hexanos. La torta se secó en el filtro con succión durante un mínimo de 30 minutos. La torta de filtración contuvo una cantidad sustancial de ciclohexanol que se retiró por trituración.

La torta de filtración húmeda se cargó en un matraz de 12 l y 4 bocas, de fondo redondo, equipado con un agitador 60 mecánico y burbujeador de nitrógeno. Se agregó también etanol (EtOH) en un volumen de 7,5 l. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La suspensión se filtró a través de un embudo de Buchner y la torta de filtración se enjuagó con 400 ml de hexanos. La torta de filtración se secó en un horno de vacío a 60-65°C durante la noche. El producto de este método proporcionó 504 gramos de dihidrocloruro de histamina bruto (rendimiento de 56,6%), con una pureza de 94,4% a/a, determinada por el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).  
65 El producto se recristalizó para mejorar la pureza del producto final.

Un matraz de 12 l, 4 bocas y fondo redondo, equipado con un termómetro, agitador mecánico, condensador, embudo de adición y burbujeador de nitrógeno, se cargó con 503 gramos del producto de dihidrocloruro de histamina

# ES 2 310 056 T3

bruto sintetizado anteriormente. Se agregaron, además, 4,5 l de EtOH y 200 ml de agua al matraz de reacción, para disolver la torta de filtración. La suspensión se agitó bajo atmósfera de nitrógeno.

La suspensión se calentó a reflujo. Manteniendo la suspensión bajo reflujo, se agregó agua gota a gota a la suspensión, hasta la disolución de la mayor parte de los sólidos. La solución se enfrió a menos de 75°C. La solución se cargó con una mezcla de 50 gramos de NUCCHAR SA (Westvaco, Nueva York, NY) y 50 gramos de CELITE (J.T. Baker, Hayward, CA). Esta suspensión se calentó entonces a reflujo y se mantuvo a esa temperatura durante 0,5 horas. La suspensión se enfrió a 65-75°C y seguidamente, se filtró a través de un lecho de CELITE en un matraz de 12 l, 4 bocas y fondo redondo, limpio y seco. La torta de filtración se enjuagó con una mezcla de 450 ml de EtOH y 50 ml de agua.

La solución filtrada se enfrió lentamente a temperatura ambiente, bajo agitación, durante la noche. La solución se enfrió, adicionalmente, a 0-5°C durante 2 horas. A 0-5°C, la suspensión se filtró a través de un embudo de Buchner. La torta de filtración se lavó tres veces con 200 ml de EtOH helado a 0-5°C. La torta de filtración se secó en un horno de vacío a 60-65°C.

Después de la recristalización, el producto final fueron 299 gramos (un rendimiento de 59,4%), con una pureza HPLC a/a de 99,1%. El protocolo de HPLC se analiza en el Ejemplo 7 más adelante. Se llevaron a cabo ciclos adicionales de recristalización para aumentar la pureza del producto final. Sin embargo, siguieron estando presentes dos impurezas desconocidas (RRt 1,3, 1,5) por encima del umbral del 0,1% después de la recristalización.

De manera típica, la primera impureza (RRt 1,3) estuvo presente a un nivel de 0,2-0,4% a/a, y la segunda impureza (RRt 1,5), al nivel de 0,5-0,6%. Una segunda recristalización de la muestra discutida anteriormente redujo los niveles de impurezas a 0,1-0,2% y 0,4-0,5%, respectivamente. Las impurezas parecieron volver a aumentar al analizar nuevamente la muestra después de algunos días, lo que despierta preocupación acerca de la estabilidad del producto final. La inestabilidad del producto podría explicar la razón por la que la torta de filtración húmeda citada anteriormente mostró una pureza HPLC de 99,9% a/a, pero sólo se obtuvo un 99,1% después de secar el lote. Los tratamientos subsiguientes con diclorometano o tratamientos químicos no fueron capaces de eliminar las impurezas.

## 30 Ejemplo de Referencia 2

### *Catalizadores para la Descarboxilación de L-Histidina*

35 A la vista de los resultados que se discuten más arriba, se emprendió una serie de modificaciones del método de síntesis. Estas modificaciones buscaron reducir los niveles de impurezas desconocidas a un nivel aceptable. Una variable examinó con preocupación la naturaleza del catalizador usado en la reacción de descarboxilación. Se analizó una variedad de otros catalizadores, incluida acetofenona, para determinar el papel que juegan, de hacerlo, en la formación de las impurezas cromatográficas. La Tabla 1 muestra los catalizadores usados en este estudio. Los catalizadores se 40 utilizaron a una concentración de 0,3 equivalentes.

TABLA 1

| 45 <u>Estudio de los Catalizadores de Descarboxilación</u> |                        |                     |                |
|--|------------------------|---------------------|----------------|
| Catalizador  | Tiempo de Reacción (h) | Pureza HPLC (% a/a) |                |
|  |                        | Impureza nº 1       | Impureza nº 2  |
| Acetofenona (control)                                      | 21                     | 4,5                 | 4,0            |
| 4'-bromoacetofenona  | 21                     | 7,0                 | 3,4            |
| Benzofenona  | 21                     | 14,5                | 2,9            |
| p-nitroacetofenona   | 17                     | Descomposición      | Descomposición |
| p-metilacetofenona   | 16                     | 1,65                | 0,71           |
| p-metiloxiacetofenona                                      | 16                     | 1,9                 | 2,9            |
| p-metilacetofenona/1-metil-4-piperidona                    | 7,5                    | 3,0                 | 2,4            |
| p-metilacetofenona/AcOH                                    | 7,5                    | 9,6                 | 3,5            |

## ES 2 310 056 T3

Los resultados de la Tabla 1 indican que p-metilacetofenona fue superior a acetofenona en reducir el nivel de impurezas halladas en el producto final. Por el contrario, el uso de p-metilacetofenona junto con una base (1-metil-4-piperidona) no mostró una mejora del nivel de impurezas generadas, en tanto que la introducción de un ácido (ácido acético) elevó considerablemente las impurezas presentes en el producto final. Adicionalmente, p-metoxiacetofenona ofreció una ventaja con respecto a acetofenona en lo relativo a la generación de contaminantes, pero no logró una potenciación significativa frente a p-metilacetofenona en cuanto al aislamiento de la sal monohidrocloruro. Los datos señalan que los catalizadores con una cetona deficitaria en electrones exhiben un incremento de la generación de impurezas halladas en el producto final, en tanto que las cetonas enriquecidas con electrones mostraron una reducción de la misma. Basándose en estos resultados, se sustituyó acetofenona con p-metilacetofenona como catalizador usado en la reacción de descarboxilación de la invención que se describe en este documento.

### Ejemplo de Referencia 3

#### 15 *Métodos para Producir Formas Salinas de Histamina*

Otro parámetro analizado, referido a la generación de dihidrocloruro de histamina aceptablemente puro, implicó la equivalencia molar del ácido agregado durante la precipitación de la sal bruta. Uno de los sorprendentes descubrimientos de la invención que se describe en este documento es que la reducción de la cantidad de contaminantes presentes en el producto final está relacionada con la cantidad de ácido usado para crear la sal a partir de la molécula. En procedimientos de la técnica anterior, se introdujo una cantidad de 2,5 equivalentes molares de cloruro de hidrógeno (Cl) en gas en una solución que contiene la histidina descarboxilada (base libre de histamina), para generar una sal dihidrocloruro bruta. El presente Ejemplo examina el efecto de agregar una variedad de equivalentes molares de ácido clorhídrico a la solución de base libre de histamina, mediante la introducción del ácido disuelto en isopropanol (IPA).

25 Se disolvió una variedad de concentraciones de HCl en IPA y se analizaron sus efectos sobre la producción de impurezas. Se siguió el protocolo de síntesis según se ha descrito anteriormente, con la excepción de que se usaron 0,3 equivalentes de p-metilacetofenona con tolueno como codisolvente para la adición de HCl. Se empleó el protocolo HPLC del Ejemplo 7 más adelante para determinar la presencia de impurezas. En la siguiente Tabla 2 se exponen los 30 resultados de esta gama de concentraciones de ácido.

TABLA 2

| 35 <u>Equivalentes de HCl y su Efecto sobre la Generación de Impurezas</u> |                     |               |               |  |
|--|---------------------|---------------|---------------|--|
| 40 Equivalentes Molares de HCl/IPA   | Pureza HPLC (% a/a) |               |               |  |
|  | Impureza nº 1       | Impureza nº 2 | Impureza nº 3 |  |
| 45 2 (control)   | 2,5                 | 2,35          | 22,0          |  |
| 1,4  | 2,0                 | 2,1           | 6,5           |  |
| 0,9  | 0,55                | 1,15          | 2,1           |  |
| 0,5  | 0,06                | 0,83          | 0,45          |  |

50 Los resultados que se muestran en la Tabla 2 ilustran la forma en que la cantidad de ácido cargada en la solución que contiene la base libre de histamina alteró de manera llamativa el nivel de las dos impurezas presentes en el producto. El descenso observado fue atribuible, probablemente, a las impurezas que poseen menor carácter básico que la base libre de histamina. En consecuencia, es probable que la base libre de histamina experimente inicialmente una protonación, seguida por las impurezas.

55 El uso de 0,5 equivalentes molares de HCl proporcionó los resultados más favorables en lo referente a limitar los niveles de impurezas halladas en el producto. Bajo estas condiciones, el producto bruto aislado fue la sal monohidrocloruro, según se determinó por titulación del contenido de cloruro. Por lo tanto, para sintetizar la forma dihidrocloruro de histamina con una pureza aceptablemente alta, se incorporó una etapa intermedia de purificación, consistente en la generación intencionada de la sal monohidrocloruro. Sin embargo, utilizando este método, sería necesario agregar un equivalente adicional de HCl en una etapa posterior de la síntesis, al objeto de producir la forma dihidrocloruro de la molécula.

65 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para examinar el efecto de pequeñas variaciones de, la concentración del ácido sobre la pureza y el rendimiento del producto. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 3. Estos resultados se tomaron de productos formados a partir de una mezcla de reacción de 100 ml con 0,3 equivalentes de p-metilacetofenona y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como codisolvente. En el Ejemplo 4 se analiza de forma detallada la elección de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

## ES 2 310 056 T3

TABLA 3

| <u>Pequeñas Variaciones de Equivalentes de Ácido y sus Efectos sobre la Formación del Producto</u> |                    |                      |                |            |                    |                      |
|--|--------------------|----------------------|----------------|------------|--------------------|----------------------|
| SAL BRUTA  |                    |                      | PRODUCTO FINAL |            |                    |                      |
| HCl<br>(eq.)   | Rendimiento<br>(%) | Pureza HPLC (% a/a ) |                |            | Rendimiento<br>(%) | Pureza HPLC (% a/a ) |
|  |                    |                      | Impureza 1     | Impureza 2 |                    |                      |
| 0,57   | 43,3               | 0,05                 | 0,14           |            | 57,7               | 0,03                 |
| 0,67   | 50,6               | 0,06                 | 0,17           |            | 61                 | 0,05                 |
| 0,76   | 53,5               | 0,09                 | 0,20           |            | 59                 | 0,05                 |
|  |                    |                      |                |            |                    | 0,1                  |

El intervalo de equivalencia se estrechó para determinar el efecto que tiene una variación relativamente pequeña de la cantidad de ácido sobre el nivel de impurezas en la sal bruta. Los datos que se muestran en la Tabla 3 confirman la observación anterior de que un descenso de la cantidad de ácido incorporada da como resultado una reducción de la cantidad de impurezas halladas en el producto final, así como un descenso del rendimiento. En experimentos posteriores, se usaron 0,6 equivalentes molares de HCl con respecto al material de partida. Para cantidades mayores de producto, para las que se usan cantidades también mayores de material de partida, la cantidad de ácido necesaria es de 0,85 equivalentes molares de HCl por mol de base libre, tal como lo determinan los ensayos. Esta cantidad de HCl calculada representa aproximadamente 0,6 equivalentes molares frente al material de partida de L-histidina.

## Ejemplo de Referencia 4

*Codisolventes Utilizados Durante la Formación de la Sal*

La siguiente variable analizada para mejorar la síntesis de dihidrocloruro de histamina concernió al codisolvente utilizado durante la etapa de adición de ácido del procedimiento. Anteriormente, se utilizó tolueno como codisolvente. Para estudiar el posible efecto del codisolvente sobre la pureza del producto final, se utilizó una variedad de codisolventes en la etapa de precipitación. Como se ha mencionado anteriormente, la pureza de las muestras resultantes se analizó usando el método HPLC descrito en el Ejemplo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

| <u>Efecto del Cloruro de Metileno y Otros Codisolventes sobre la Pureza del Producto Final</u> |               |                     |            |
|--|---------------|---------------------|------------|
| Codisolvente   | Rendimiento % | Pureza HPLC (% a/a) |            |
|  |               | Impureza 1          | Impureza 2 |
| Tolueno (control)  | 49,5          | 0,13                | 0,31       |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>  | 45,9          | 0,10                | 0,15       |
| TBME   | 51,9          | 0,33                | 0,51       |
| Ninguno  | 43,5          | 0,12                | 0,18       |

Las condiciones de reacción para los resultados obtenidos en la Tabla 4 fueron: p-metilacetofenona, presente en 0,3 equivalentes, 0,6 equivalentes de HCl/IPA y 5 partes de codisolvente para la precipitación. Los resultados de la Tabla 4 demuestran que el cloruro de metileno ofrece resultados superiores con respecto a la formación de impurezas, en comparación con otros codisolventes.

## Ejemplo 1a

*Preparación de Monohidrocloruro de Histamina Bruto*

El procedimiento que se describe a continuación especifica la preparación de monohidrocloruro de histamina. Un matraz de dos litros (2 l) y 3 bocas, de fondo redondo (reactor) se equipó con un termómetro, agitador mecánico, condensador y sistema de purga de nitrógeno, se cargó con 1 l de ciclohexanol, 100 g de L-histidina y 25,9 ml de p-metilacetofenona. El ciclohexanol tiene un punto de fusión de 22-22°C y puede requerir calentamiento para generar

## ES 2 310 056 T3

un líquido que se pueda transferir al reactor. La suspensión tuvo una coloración blanca, con una temperatura entre 20 y 25°C, y un volumen de 1050 ml. La suspensión se agitó en presencia de una atmósfera de nitrógeno, que se mantuvo durante toda la reacción.

5 La suspensión se calentó a reflujo (160-165°C) y se mantuvo bajo reflujo durante 30 horas. Se retiró una pequeña muestra para determinar el porcentaje de material de partida que se había descarboxilado. La suspensión debe contener ≈1% a/a de L-histidina. En caso de una reacción incompleta, se debe continuar calentando la suspensión a reflujo durante 3,5 horas adicionales y, a continuación, volver a extraer una muestra. La formación de una solución homogénea y transparente indica que se ha consumido el material de partida y el final de la reacción de descarboxilación.

10 Una vez terminada la reacción, la suspensión se enfrió a aproximadamente 20-25°C. A continuación, el reactor se cargó con 300 ml de cloruro de metileno. Esta mezcla se enfrió, adicionalmente, a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un embudo de Buchner en otro matraz de 2 1 y 3 bocas, de fondo redondo. Seguidamente, se lavó el primer reactor dos veces con 100 ml de cloruro de metileno, que se utilizó para enjuagar el filtro. Esta etapa de 15 filtración eliminó todo residuo de L-histidina.

20 El segundo reactor que contiene el filtrado se equipó con un termómetro, un agitador mecánico, un embudo de adición y un sistema de purga del nitrógeno. Despues de la etapa de lavado y el restablecimiento de la atmósfera de nitrógeno en el reactor, el reactor se calentó a 30-35°C. Se retiró una parte alícuota de la solución y se analizó el 25 contenido de base libre de histamina. Los resultados del ensayo se usaron para calcular la cantidad de ácido necesaria para generar la sal monohidrocloruro. La cantidad requerida de ácido fue de 0,85 equivalentes molares de HCl por mol de base libre de histamina.

30 Con agitación intensa, se agregaron, gota a gota, 50,5 ml de una solución 7,65 M de HCl-isopropanol (HCl/IPA), a una velocidad a la que la temperatura de la solución no pasara de 40°C. Dada la naturaleza exotérmica de esta etapa del método, la adición de la solución de HCl/IPA tuvo lugar durante el período de una hora. La suspensión de color beige claro resultante se dejó enfriar a 20-25°C durante 1 hora, y se agitó durante un mínimo de 2 horas. La solución 7,65 M de HCl en isopropanol se preparó haciendo burbujear 27,9 g de HCl gaseoso en 100 ml de isopropanol enfriado a 5-10°C.

35 La suspensión enfriada se filtró a través de un embudo de Buchner bajo una corriente de nitrógeno, y la torta de filtración se enjuagó tres veces con 100 ml de una solución 1:1 de cloruro de metileno/ciclohexanol. La torta de filtración se lavó, entonces, tres veces con 100 ml de cloruro de metileno. Dado que la sal monohidrocloruro fue fácilmente soluble en agua, la humedad del laboratorio pudo ejercer alguna influencia sobre el rendimiento del producto. Por lo tanto, la exposición de la torta de filtración a la humedad durante la etapa de filtración se redujo al mínimo, realizando la operación bajo una corriente de nitrógeno.

40 A continuación, la torta de filtración húmeda se cargó en un matraz de 1 1 y 3 bocas, de fondo redondo, equipado con un termómetro, un agitador mecánico y un sistema de purga de nitrógeno para la trituración con metileno. El sólido se suspendió en 500 ml de cloruro de metileno, y se agitó durante 1 hora bajo nitrógeno. La trituración con metileno contribuyó a la eliminación del ciclohexanol residual y permitió secar el producto de manera más eficaz, tal como se vio en las etapas subsiguientes que se describen a continuación.

45 La suspensión, bajo una corriente de nitrógeno, se filtró y el material sólido se lavó dos veces con 75 ml de cloruro de metileno. La torta de filtración se secó en un horno de vacío a 55-60°C durante 16 horas.

La Tabla 5 siguiente muestra los resultados del método descrito en este Ejemplo. Este método se llevó a la práctica tres veces y se compararon los rendimientos de producto de cada uno de ellos.

50

TABLA 5

| Rendimientos Brutos de Monohidrocloruro de Histamina   |               |                            |                            |
|--|---------------|----------------------------|----------------------------|
|  | Experimento 1 | Experimento 2 <sup>f</sup> | Experimento 3 <sup>f</sup> |
| Peso de Sólido Seco <sup>t</sup>   | 50,28         | 52,29                      | 50,28                      |
| Rendimiento Bruto %  | 52,9          | 55,0                       | 52,9                       |
| <sup>t</sup> El peso de los sólidos y los correspondientes rendimientos porcentuales se corrigieron de acuerdo con el contenido en disolvente. |               |                            |                            |
| <sup>f</sup> En los Experimentos 2 y 3, la torta de filtración se secó durante 8 en lugar de 16 horas.   |               |                            |                            |

# ES 2 310 056 T3

## Ejemplo 1b

### *Preparación de Dihidrocloruro de Histamina por Descarboxilación de L-Histidina*

5 El Ejemplo 1b muestra un procedimiento para sintetizar dihidrocloruro de histamina a partir del producto precursor monohidrocloruro, preparado con el método del Ejemplo 1a.

10 Un matraz de un litro (1 l) y tres bocas, de fondo redondo (reactor), equipado con una barra agitadora mecánica, un embudo de adición, un sistema de purga de nitrógeno y termómetro se depositó en una camisa calefactora. El reactor se cargó con 40 gramos de monohidrocloruro de histamina, 32 ml de H<sub>2</sub>O (destilada), y 280 ml de una solución de 1 x EtOH consistente en 99,5% de EtOH y 0,5% de tolueno. Se mantuvo una atmósfera de nitrógeno durante toda la reacción, dado que la sal monohidrocloruro de histamina fue altamente higroscópica.

15 La siguiente etapa del método comprendió la adición de una solución de HCl/IPA para convertir la sal monohidrocloruro de histamina en la forma dihidrocloruro. Se agregaron al reactor 41,5 ml de una solución 6,85 M de HCl/IPA (1,05 equivalentes). Tal como se ha discutido anteriormente, la adición de la solución ácida fue exotérmica, por lo que el ácido se agregó durante un período de tiempo de 15 minutos. Durante las etapas iniciales de la adición de ácido, se generó una solución transparente que, sin embargo, recuperó su forma de suspensión blanquecina y espesa después de haber introducido aproximadamente 75% del ácido.

20 25 Después de completar la adición del ácido, la suspensión blanquecina y espesa resultante se calentó a refluo (78-80°C) en un baño de aceite. La sustancia sólida de la suspensión se disolvió gradualmente para formar una solución de color ámbar. Una vez que la sustancia sólida se disolvió por completo, se retiró el reactor del baño de aceite. A continuación, el reactor se cargó con carbón Nuchar SA (2 gramos) y CELITE (2 gramos). Esta suspensión se calentó a refluo durante 25 minutos. El mantenimiento de la temperatura fue importante, dado que el producto precipitaría a aproximadamente 60°C.

30 La suspensión de color negro y caliente se filtró a través de un lecho de CELITE en un nuevo matraz de 1 l, de 3 bocas y fondo redondo, equipado con un agitador mecánico y termómetro. El lecho de CELITE sirvió como barrera para impedir el flujo del carbón a través de la unidad de filtración. El nuevo reactor había sido precalentado en un baño de aceite, y su carga tuvo lugar también en dicho baño de aceite.

35 El primer reactor que contuvo la mezcla de reacción se enjuagó dos veces con 40 ml de una solución 1 X de EtOH a una temperatura de 60-65°C. Esta solución se filtró y se agregó al filtrado obtenido más arriba. La adición del volumen de enjuague produjo un cierto precipitado en el filtrado. Seguidamente, se agitó el volumen total de la solución durante 30 minutos a 60-65°C.

40 Entonces, se enfrió lentamente la suspensión (dihidrocloruro de histamina) a 25°C durante 1 hora, y se agitó a 20-25°C durante 2 horas, enfriándola a continuación a 0,5°C durante 2 horas más. A continuación, la suspensión se filtró bajo una corriente de nitrógeno y la torta de filtración se lavó tres veces con 40 ml de EtOH 1 X frío. Se pesó, seguidamente, la torta de filtración y se secó en un horno de vacío a 55-60°C durante 16 horas. En la Tabla 6 se muestran los resultados de tres experimentos diferentes de conversión de monohidrocloruro de histamina en la sal dihidrocloruro.

45 TABLA 6

| Rendimientos de Dihidrocloruro de Histamina |               |               |               |
|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Experimento 4 | Experimento 5 | Experimento 6 |
| Peso Torta Húmeda (gramos)                  | 48,8          | 45,6          | 46,4          |
| Peso Sólido Seco (gramos)                   | 34,9          | 33,3          | 33,6          |
| Rendimiento %                               | 70            | 86,7          | 67,4          |

\*El valor de rendimiento porcentual se basó en el monohidrocloruro de histamina corregido según el contenido en disolvente.

## Ejemplo 2

### *Método HPLC para Analizar, Identificar y Determinar la Pureza de Dihidrocloruro de Histamina*

60 65 El presente ejemplo discute el uso de HPLC para cuantificar e identificar el dihidrocloruro de histamina y cuantificar las sustancias y degradantes relacionados en el producto final. El método empleó un sistema completo de HPLC con capacidades de gradiente y detección UV. Para las determinaciones cromatográficas de pureza, se utilizó un sistema que contuvo un sistema de adquisición de datos computadorizados. El equipo adicional usado incluyó: una columna Waters Symmetry C-18, 5 μm, 4,6: 350 mm; una balanza analítica con resolución de 0,01 mg ó 0,01 mg;

## ES 2 310 056 T3

utilaje de vidrio volumétrico; y un calefactor de columna. Los reactivos y estándares usados incluyeron: un estándar de referencia o equivalente para dihidrocloruro de histamina; metanol de grado HPLC; acetonitrilo de grado HPLC; ácido 1-heptano-sulfónico, sal sódica; fosfato sódico de grado HPLC o equivalente de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA), monobásico, monohidrato, grado de reactivo ACS; monohidrocloruro de D-, L-histidina, monohidrato (Sigma, St. Louis, MO); solución 1N de hidróxido sódico; solución 1N de ácido clorhídrico; agua purificada; y alcohol bencílico, de grado reactivo ACS o equivalente.

Se prepararon dos tampones de fase móvil. La Fase Móvil A (MPA) contuvo fosfato sódico 0,02 M monobásico y ácido heptano-sulfónico 0,005 M, pH ajustado a 3,0. La Fase Móvil B (MPB) contuvo acetonitrilo (ACN)/metanol (MeOH): 20/15 (en volumen).

Los estándares y muestras se prepararon para el ensayo y las determinaciones cromatográficas de pureza. Los estándares de ensayo comprendieron la preparación de soluciones estándares de dihidrocloruro de histamina en tres concentraciones. Se prepararon estándares de monohidrocloruro de DL-histidina, monohidrato de 0,88 mg/ml, 0,80 mg/ml y 0,72 mg/ml a 0,008 mg/ml. De la misma forma, se prepararon muestras de ensayo por duplicado, que contuvieron 0,8 mg/ml de dihidrocloruro de histamina producido de manera sintética, mientras se preparó una solución para determinar el límite de cuantificación (LOQ) con 0,0006 mg/ml de dihidrocloruro de histamina. La sensibilidad del método para Histamina se ha determinado en 0,07% para el límite de cuantificación y 0,03% para el límite de detección. Estudios de pureza máxima realizados con disposiciones de fotodiodos han demostrado la especificidad para histamina.

Tras la preparación de los diversos estándares y muestras, se equilibró el sistema HPLC. Una vez equilibrado, se comprobó el caudal de la línea residual bajo las condiciones iniciales de ajuste (es decir, 10% de MPB a 1,5 ml/min). El caudal fue de 1,5 ml/minuto  $\pm$  0,15 ml/minuto. Se llevó a cabo una inyección de agua en blanco después de equilibrar el sistema para acondicionar la columna antes de iniciar el ensayo.

Después de finalizar estos preparativos, se injectó la solución de resolución de 0,7 mg/ml  $\pm$  0,1 mg/ml de dihidrocloruro de histamina. Se calculó la resolución "R" entre un pico de solución de alcohol bencílico de 1 mg/ml y los picos de histamina. Además, este proceso se repitió cinco (5) veces y se calculó la desviación estándar.

Para el ensayo, se generó una curva estándar. La comprobación estándar se llevó a cabo cada cuatro a seis inyecciones de muestra y se encontró dentro de los siguientes parámetros: el factor de cola no fue  $>$ 2,0%; y el coeficiente de correlación de la curva estándar no fue menor que 0,995.

Para calibrar la pureza cromatográfica, se efectuó una única inyección de la solución de resolución. Se calculó la resolución "R" entre los picos de alcohol bencílico y de histamina, al igual que el factor de cola del pico de histamina. Dado que la resolución y los factores de cola satisficieron las especificaciones, se realizaron tres inyecciones consecutivas de la muestra LOQ.

Se calcularon las desviaciones estándares relativas para las tres respuestas pico de histamina. En general, el factor de cola no fue  $>$ 2,0, la resolución fue mayor que 1,5, y la desviación estándar relativa de las respuestas pico de histamina no fue mayor que 10%.

Dado que se satisficieron los parámetros citados, se analizaron las muestras finales de dihidrocloruro de histamina. Los parámetros operativos para HPLC aparecen enumerados en la Tabla 7. Los parámetros de gradiente se muestran en la Tabla 8.

TABLA 7

| Parámetros Operativos    |   |
|--------------------------|---|
| Caudal:                  | 1,5 ml/minuto                                   |
| Volumen de Inyección:    | 20 $\mu$ l                                      |
| Detección:               | 212 nm  |
| Columna:                 | Waters Symmetry C-18,5 $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm |
| Temperatura de Columna:  | 50°C  |
| Concentración de Ensayo: | 0,8 mg/ml de dihidrocloruro de histamina        |
| Tiempo de Recorrido:     | Aproximadamente 30 minutos                      |
| Fase Móvil A:            | Solución tampón                                 |
| Fase Móvil B:            | ACN/MeOH 20/15 (en volumen)                     |

## ES 2 310 056 T3

TABLA 8

| <u>Parámetros de Gradiente</u> |                   |                 |
|--------------------------------|-------------------|-----------------|
| Tiempo (min)                   | % de Fase Móvil B | Caudal (ml/min) |
| 0                              | 10                | 1,5             |
| 20                             | 30                | 1,5             |
| 21                             | 10                | 1,5             |
| 30                             | 10                | 1,5             |

Tiempos de retención: histidina = aproximadamente 3 minutos  
Histamina = aproximadamente 12 minutos

El uso de este sistema analítico proporcionó el método necesario para determinar la pureza de la muestra de dihidrocloruro de histamina producido en los ejemplos mencionados anteriormente.

## Ejemplo 3

*Análisis HPLC del Producto Dihidrocloruro de Histamina*

Los productos de dihidrocloruro de histamina del Ejemplo 1b se sometieron al análisis HPLC descrito en el Ejemplo 2 para determinar la pureza de las muestras, y establecer si los productos finales satisfacen los criterios de pureza fijados para el método de la invención que se describe en este documento. Para ser usado como agente farmacéutico, el dihidrocloruro de histamina debe poseer mínimas impurezas cromatográficas. Las impurezas individuales halladas a niveles mayores que 0,1% a/a requieren, normalmente, cualificación toxicológica. Se generaron tres lotes de dihidrocloruro de histamina usando los métodos de los Ejemplos 1a y 1b. Su pureza se describe en la Tabla 9.

TABLA 9

| <u>Resultados del Análisis HPLC</u> |  |  |
|-------------------------------------|--|--|
| Experimento                         | Descripción de Impurezas   | Especificación / Hallado                         |
| Experimento 1                       | L-histidina HCl, monohidrato   | <0,8% en peso;<br>No detectada                   |
|                                     | Impurezas cromatográficas individuales<br>Impureza nº 1, impureza nº 2 | <0,1% en peso<br><0,05% en peso<br>0,13% en peso |
|                                     | Impurezas cromatográficas totales                                      | <2,0% en peso;<br>0,2% en peso                   |
| Experimento 2                       | L-histidina HCl, monohidrato   | <0,8% en peso<br>No detectada                    |
|                                     | Impurezas cromatográficas individuales<br>Impureza nº 1, impureza nº 2 | <0,1% en peso<br><0,05% en peso<br>0,10% en peso |
|                                     | Impurezas cromatográficas totales                                      | <2,0% en peso;<br>0,2% en peso                   |
| Experimento 3                       | L-histidina HCl, monohidrato   | <0,8% en peso<br>No detectada                    |
|                                     | Impurezas cromatográficas individuales<br>Impureza nº 1, impureza nº 2 | <0,1% en peso<br><0,05% en peso<br>0,06% en peso |
|                                     | Impurezas cromatográficas totales                                      | <2,0% en peso;<br>0,1% en peso                   |

# ES 2 310 056 T3

Los resultados descritos en la Tabla 9 demuestran que el producto final de dihidrocloruro de histamina se encuentra dentro de los estándares aceptables establecidos para la invención que se describe en este documento. En primer lugar, el nivel de la impureza nº 1 demostró ser menor que el límite de cuantificación fijado para el ensayo. En segundo lugar, la impureza nº 2 estuvo presente en niveles ligeramente mayores que el umbral de 0,1% y, por lo tanto, se 5 cualificará por ensayos toxicológicos. El nivel de especificación para impurezas se ha establecido en <0,2% en peso. Estos resultados demuestran que el método de síntesis de la invención que se describe en este documento ofrece un medio de síntesis de una forma farmacéuticamente aceptable de dihidrocloruro de histamina.

## Conclusión

10

La invención que se presenta en este documento describe un nuevo método no enzimático para producir dihidrocloruro de histamina de grado farmacéutico. Una ventaja importante del método descrito en este documento es que proporciona dihidrocloruro de histamina con un nivel de pureza superior al disponible en la actualidad por otros medios.

15

Por último, los ejemplos precedentes no pretenden limitar el alcance de la presente invención, que se expone en las siguientes reivindicaciones. En particular, los expertos en la técnica podrán reconocer diversos e iguales y sustituciones a la vista de la descripción anterior, que se consideran incluidos dentro del alcance de la invención descrita.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 310 056 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis de dihidrocloruro de histamina que comprende:

5       descarboxilar una solución que contiene L-histidina, utilizando un catalizador seleccionado de: peróxido de benzoilo, 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), 2-ciclohexen-1-ona, acetofenona, 4'-bromoacetofenona, benzofenona, p-nitroacetofenona, p-metilacetofenona, p-metoxiacetofenona, p-metilacetofenona/1-metil-4-piperidona, y p-metilacetofenona/AcOH, con lo que se forma una solución que contiene histamina;

10      formar una sal de monohidrocloruro de histamina a partir de la solución que contiene histamina, mediante tratamiento con una cantidad efectiva de ácido clorhídrico en isopropanol, y purificar la sal de monohidrocloruro de histamina por recristalización; y

15      formar una solución que contiene dihidrocloruro de histamina a partir de la sal de monohidrocloruro de histamina, mediante tratamiento con ácido clorhídrico en isopropanol.

2. El método según la reivindicación 1, que comprende, adicionalmente, triturar la solución que contiene histamina.

3. El método según la reivindicación 2, en el que la solución que contiene histamina se tritura con una solución de cloruro de metileno.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad efectiva de ácido clorhídrico es de aproximadamente 0,1 a 0,9 equivalentes molares de ácido clorhídrico frente a la base libre de histamina.

5. El método según la reivindicación 4, en el que la cantidad efectiva de ácido clorhídrico es de aproximadamente 0,6 equivalentes molares de ácido clorhídrico frente a la base libre de histamina.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el dihidrocloruro de histamina contiene una cantidad igual o menor que cada una de las siguientes: 0,8% de L-histidina HCl, monohidrato, 0,1% de impurezas cromatográficas individuales, y 2% de impurezas totales.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución que contiene dihidrocloruro de histamina resultante comprende menos de 2% de impurezas totales, según se mide por análisis HPLC.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, adicionalmente, agregar un codisolvente durante el tratamiento con ácido clorhídrico en isopropanol, para formar la sal monohidrocloruro de histamina, en donde dicho codisolvente se selecciona de cloruro de metileno, ciclohexanol, tolueno y éter metílico de terc-butilo.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, adicionalmente, recristalizar el dihidrocloruro de histamina con un disolvente para dar una forma farmacéuticamente pura de dihidrocloruro de histamina.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el disolvente utilizado para la recristalización se selecciona de cloruro de metileno, 2-propanol, metanol, etanol, metanol/acetona, agua, metanol/acetato de etilo, agua/acetona, metanol/etanol, agua/metanol, metanol/hexano, agua/metanol/acetona, metanol/cloruro de metileno, 2-propanol/etanol, metanol/2-propanol, acetona/2-propanol, y acetona/etanol.

50

55

60

65

FIGURA 1

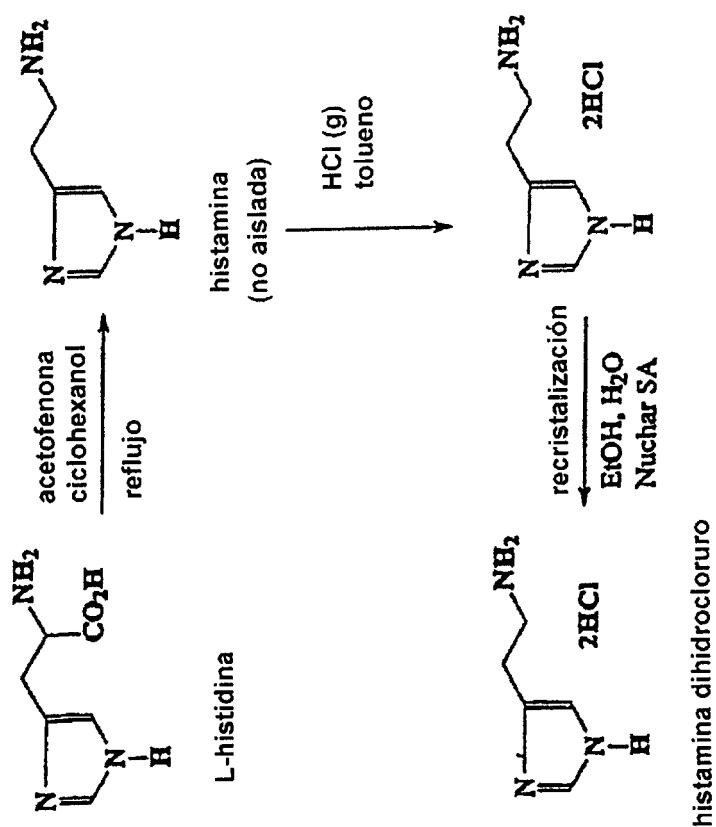


FIGURA 2

