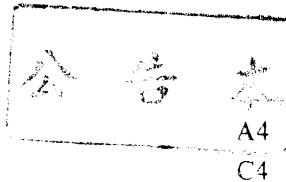


申請日期	8/2/97
案 號	881228201
類 別	009023/50



(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	組織胺二氯化物的合成方法
	英 文	SYNTHESIS OF HISTAMINE DIHYDROCHLORIDE
二、發明 人	姓 名	1. 葉溫倫 2. 卡西麥安薩克 3. 傑佛利大衛 MC 高瑞克 4. 麥克喬瑟夫羅斯 5. 馬克羅那
	國 籍	1. 加拿大 2. 加拿大 3. 加拿大 4. 加拿大 5. 加拿大
	住、居所	1. 加拿大安大略棘山卻伍得大道 120 號 2. 加拿大安大略奧羅拉提普森大道 103 號 3. 加拿大安大略新市皮喀林克里聖特 540 號 4. 加拿大安大略波爾頓斯加法廣場 44 號 5. 加拿大安大略史東尼克里克戴威特路 282 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商·馬克斯姆製藥公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國加州聖地牙哥 400 室大學中心大道 8899 號
	代 表 人 姓 名	(容後補呈)

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ☒有 ☐無主張優先權

本案已向美國申請專利；申請日：1998 年 12 月 23 日 案號：60/113,933 號

有關微生物已寄存於： 寄存日期： 寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明()

發明背景：

組織胺是一種具有明顯生物活性的化合物，這些活性係由體內的藥學受體來媒介。長久以來，組織胺都被認為是一種具有為負生物活性的分子。但是近年來，以組織胺作為一種強效藥學試劑的應用也漸漸開始受到重視。舉例來說，曾有人在單核白血球存在下，合併使用組織胺與 α -干擾素來活化NK細胞。參見美國專利第5,728,378號。為能充分利用組織胺的各種治療效果，必須能大量製備藥學級的組織胺化合物。

因天然界腐化作用之故，使組織胺廣泛存在於各處，而組織胺的衍生物 - 組織胺二氯化物則可在市面上購得，其一般係作為分析標準物或某些過敏性診斷試劑盒中的成分之一。這類組織胺通常來自天然來源，因此經常含有許多污染物，致使其無法作為藥劑使用。而組織胺二氯化物的合成方法亦是習知的。

組織胺二氯化物可很方便的藉由將組織胺酸去羧化來製造。使用此種合成途徑，先是將組織胺酸去羧化，接著讓它形成二氯化物鹽類形式的分子。舉例來說，Hashimoto 等人，討論了以環己酮作為催化劑，來催化組織胺酸去羧化以製備組織胺。(Hashimoto, M., et al., Chemistry letters, 893-896 (1986))。在 Hashimoto 等人的論文中，報導了95%的產率；其係以2-環己烯-1-酮作為催化劑，來催化組織胺酸及1% v/v之2-環己烯-1-酮溶液間的反應，溶於10份迴流的環己醇中(26小時)。

五、發明說明()

Hashimoto 的方法也教導了在所獲得的去羧化溶液中通入甲苯及 HCl 氣體，以將終產物組織胺二氯化物沉澱析出。

但是，很不幸的，試圖以 Hashimoto 的方法來製造藥學級的組織胺卻宣告失敗。需加入許多額外的催化劑才能使整個方法變得可操作，且終產物中含有大量的雜質，而且非常難去除。基於這樣的結果，因此吾人認為 Hashimoto 的方法並不適於用來大量製備藥學可接受之組織胺。

也曾有人提出以乙醯苯作為催化劑，來催化組織胺酸去羧化的反應。吾人也重複了核准予 Akimasa 等人之日本專利第 05,255,204 號專利(1983)，並使用 0.26 當量的乙醯苯及 10 份的乙二醇作為去羧化反應溶劑。雖然 Akimasa 等人之方法，在將組織胺酸轉化成組織胺上較有效，但是卻無法一致地、有再現性地來製造出一種藥學級產品。一如 Hashimoto 方法中的終產物一樣，使用 Akimasa 等人之方法，在以 HPLC 分析其終產物時亦同樣發現有雜質存在。

雖然以乙醯苯及二乙醚進行製備的條件看起來似乎可行，但大量製造時卻會出現問題。組織胺之自由鹼基態及其二氯化物鹽類均非常易溶於水，因此很難以任何現行萃取技術將此兩種化合物自二乙醚溶劑中分開，該二乙醚溶劑通常是藉助於水來進行萃取。再者，組織胺二氯化物亦非常易溶於此二乙醚溶劑中，因此也無法以過濾法直接過濾分離。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

Takano 等人提出一種涉及戊-3-酮的反應條件 (Heterocycles, 6:1167 (1977))。這些實驗的結果並未比上述乙醯苯方法來得更好。

由於藥學級組織胺的需求量相當大，特別是近來又發現許多組織胺的新的藥學應用。目前業界的標準製法是自天然來源中將組織胺純化，但卻無法產生純度足夠作為藥學應用的組織胺。再者，業界所用的合成法也無法產生藥學級的組織胺。因此，亟需一種可產生藥學級組織胺的改良方法。

發明概述：

本發明揭露了一種藥學級組織胺二氯化物的製備方法，其係兩步驟的非-酵素性合成方法。本發明實施例之一係組織胺二氯化物的合成方法，該方法包含：將一 L-組織胺酸溶液去羧化，因此可在沒有去羧化酵素存在的情況下，形成一種內含組織胺的溶液；由該內含組織胺的溶液中形成組織胺單氯化物；並由該內含組織胺單氯化物的溶液中形成組織胺二氯化物。

本實施例更包含在該內含組織胺的溶液中通入其他溶液 (trituration)，舉例來說，可在該內含組織胺的溶液中通入二氯甲烷溶液。在本實施例的另一目的中，該內含組織胺單氯化物的溶液是藉由在異丙醇溶液中添加入有效量之氫氯酸所形成的。例如，該有效量之氫氯酸是由約 0.1 莫耳當量的氫氯酸加上 0.9 莫耳當量自由鹼基態的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明()

組織胺所形成的。在另一個例子中，該有效量之氫氯酸是由約 0.6 莫耳當量的氫氯酸加上自由鹼基態的組織胺所形成的。本發明的另一項目的更包含自該內含組織胺二氯化物的溶液中分離出藥學級組織胺二氯化物。

在本發明的另一實施例中揭露了一種藥學級組織胺二氯化物的製備方法，該方法包含：將一 L-組織胺酸溶液去羧化，因此可在沒有去羧化酵素存在的情況下，形成一種內含組織胺的溶液；由該內含組織胺的溶液中形成組織胺單氯化物；由該內含組織胺單氯化物的溶液中形成組織胺二氯化物；以及自該內含組織胺二氯化物的溶液中分離出藥學級組織胺二氯化物。

本實施例目的之一，組織胺二氯化物中含有等於或少於下列之其他組成物：0.8% L-組織胺酸 HCl 單水合物，0.1% 色層層析雜質，及 2% 總雜質。

圖示簡單說明：

第 1 圖示出習知的反應方法。

第 2 圖示出實施例 5 及 6 中所揭露的本發明方法。

發明詳述：

本發明揭露了一種關於藥學級組織胺二氯化物的製備方法，其係兩步驟的非-酵素性合成方法。本發明所揭露組織胺二氯化物的合成方法，是藉由非-酵素性法將 L-組織胺酸去羧化，然後步進式地將去羧化的產物轉變成二

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

氯化物的鹽類型式。本發明所揭露之方法，其組織胺二氯化物終產物內含有等於或少於下列之其他組成物：0.8% L-組織胺酸 HCl 單水合物，0.1% 色層層析雜質（詳述於下），及 2% 總雜質，因此可供藥學應用。

習知之組織胺二氯化物的合成方法並無法產生純度足夠供藥學應用的化合物。第 1 圖示出習知的去羧化方法。本發明所揭露的方法步驟則示於第 2 圖中。

習知的方法係企圖自 L-組織胺酸起始物中製備藥學級的組織胺二氯化物。該起始物係與諸如 α -四龍酮 (α -tetralone) 及環己酮這些前技催化劑反應。反應完成後，將樣品冷卻後通入氫氯酸氣體，以便將自由鹼基態的組織胺轉變成二氯化物鹽類。將所形成的沉澱過濾、清洗後乾燥。發現由前技方法中所獲得的終產物中含有大量的雜質。

以前技方法所產生的粗產物，其純度約為 92-94%，其中一項主要雜質約佔 3-5%，其他 5-8 種雜質量則約佔 $\geq 0.1\%$ 。繼續以其他純化方法及再結晶法進行純化，可有效的去除大部分雜質。但是，仍留下兩種無法鑑別的雜質，約佔 0.1%。這些雜質係在組織胺二氯化物後流出層析管柱，因此稱其為色層層析雜質。因此，以此法所製備的產物並不合乎藥學應用要求。

基於上述結果，設計出一種可製備出合乎欲求純度之組織胺二氯化物的合成方法。此新程序涉及將 L-組織胺酸 (α -氨基-4(或 5)-咪唑丙酸) ($C_6H_9N_3O_2$) 去羧化以獲得組

五、發明說明()

織胺。去羧化後，在該內含自由鹼基態組織胺的溶液通入二氯甲烷將產物沉澱出來。過濾產物並清洗。之後以溶於異丙醇的氫氯酸溶液來處理該過濾後產物，並可沉澱出組織胺單氯化物沉澱。過濾產物。以再結晶法來純化此粗產物鹽類，或直接進入本發明最終的改良步驟。將著，再次以溶於異丙醇的氫氯酸溶液來處理此單氯化物鹽類，以產生二氯化物產物。之後將終產物去色、清洗。這些步驟，係一般熟知之再結晶步驟，可一再重複這些步驟直到獲得藥學級純度的組織胺二氯化物為止。所有步驟均係在氮氣下進行。以一系列分析方法(包括HPLC法)來分析終產物純度。

在此所揭露的本發明方法中使用了許多催化劑或自由基起始物來促進去羧化反應。適當的催化劑是當溶於中性溶劑的前驅物被加熱數小時以產生終產物過程中能有效催化組織胺去羧化。較好是使用富含電子的丙酮，因其能降低終產物中的雜質數目。舉例來說，一組適當的催化劑包括：苯甲基過氧化物、2,2'-偶氮雙異丁腈(AIBN)、2-環己烯-1-酮、乙醯苯、4'-溴乙醯苯、二苯甲酮、對-硝基乙醯苯、對-甲基乙醯苯、對-甲氧乙醯苯、對-甲基乙醯苯/1-甲基-4-哌啶酮、及對-甲基乙醯苯/AcOH。

去羧化反應的條件可促進去羧化反應，同時並使不欲求的雜質減至最少。反應條件包括在諸如氮氣的惰性氣體下，進行數種方法步驟。反應條件更包括在溫度約為

五、發明說明()

145°C 至 170°C 間進去羧化步驟。反應溫和較好是在約 150°C 至 165°C 間，或是在約 160°C 至 165°C 間。

本發明方法亦使用了數種溶劑。某特定步驟所用的溶劑會影響催化組織胺酸去羧化的反應時間。可用於本發明的溶劑包括：環己醇、n-甲基吡咯烷酮(NMP)、二(乙二醇)、二(乙二醇)甲醚、2-甲氧基乙醚、1-丁醇、甲氧乙醇、環己醇/NMP(3:1)、二甲基甲醯胺及四甲基砵。

在此所揭露之另一項反應因素乃是以氯化氫處理反應混合物來製造組織胺鹽類的方法。吾人發現，在沉積單氯化物鹽類時所加入的酸當量數會影響終產物內的雜質模式。因此可藉由製備一已知濃度的異丙醇氫氯酸溶液來處理反應混合物，而達到控制所形成雜質的程度。

可使用一定莫耳當量數範圍之異丙醇(IPA)氫氯酸(HCl)溶液來實施所揭露之方法。可使用約 0.01 至約 2 莫耳當量來生成組織胺鹽類。或者也可使用約 0.05 至約 1.4 莫耳當量。亦可使用約 0.1 至約 0.9 莫耳當量。另外，亦可使用約 0.5 莫耳當量。選用來實施本發明的比例應可使終產量達最大，且雜質量在可接受的範圍內，以使該終產得以被應用在藥學組成物中。

用來產生鹽類的酸濃度並不需非常精確。舉例來說，IPA 中的酸濃度可介於 6 至 9N。但是，對於要分離出藥學可接受之終產物而言，所引入之酸的莫耳數卻需非常精確。加入太多酸，會使雜質與單氯化物鹽類一起沉澱出來，此雜質將很難由後續的步驟中分離出來。業界尚不了解

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

形成鹽類的方法與生成污染物間的關係。

在添加異丙醇氫氯酸溶液，將單氯化物鹽類沉澱出來時，可使用數種共溶劑。可用於本發明中的共溶劑包括：二氯甲烷、環己醇、甲苯及三級丁基甲基醚(TBME)。

最需關注的是終產物的純度。也可使用額外的方法來純化終產物。例如，可使用能將產物重複一再結晶的再結晶步驟來純化產物。在此步驟中可使用數種溶劑。這些溶劑包括：氯化甲烷、2-丙醇、甲醇、乙醇、甲醇/丙酮、水、甲醇/乙酸乙酯、水/丙酮、甲醇/乙醇、水/甲醇、甲醇/己烷、水/甲醇/丙酮、甲醇/2-丙醇、丙酮/2-丙醇、丙酮/乙醇。但從毒理學的觀點來看，最好是使用乙醇。

在合成過程中亦觀察到各種所得溶液的顏色。可在再結晶步驟前或於再結晶步驟時加入活性碳來去除顏色。

在此所揭露的本發明更包括使用衍生的化學反應來幫助純化組織胺二氯化物。因此，可在所揭露本發明組織胺二氯化物製造過程中，製造各種雜質衍生物來幫助去除雜質。製造這類雜質方法之一係將三級-丁氧羰基加到有興趣的分子上。也可使用諸如苯甲氧羰基(CBZ)這類修飾基。

下列實施例中討論了將組織胺酸去羧化的方法及分離組織胺產物的方法。同時也討論了以多種再結晶步驟來純化組織胺二氯化物粗產物的方法。

以下列所述方法來分析各種方法的效率及終產物純度。可以一或多種監測方法來監控去羧化步驟的效率。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

註

訂

線

五、發明說明()

或是，以各種習知的方法來分析終產物的純度。這類監測方法的例子之一即為薄層色層層析法(TLC)，此乃是一種習知的方法。舉例來說，可以 TLC 來監控反應(移動相： $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_4\text{OH} = 7.5 : 2.0 : 0.5$ ；及水合茚三酮噴霧)。

本發明的特定實施例詳述於下。下列實施例僅係作為闡述本發明之用，但本發明範圍並不僅限於所述實施例。習知技藝者需知本發明可有許多變化。

實施例

製備組織胺二氯化物

下列實施例討論了自 L-組織胺酸前驅物中合成組織胺二氯化物的步驟。現存的組織胺合成方法，雖然也可產生組織胺二氯化物，但終產物卻有許多雜質。下列實施例討論了組織胺二氯化物的改良方法，並教導了如何製備藥學可接受的組織胺二氯化物。

實施例 1

製備 500 克的組織胺二氯化物粗產物

合成 500 克組織胺二氯化物粗產物的方法詳述於下。

在配備有溫度計、攪拌子、冷凝器及氮氣管線的 12 升四頸圓底燒瓶中，裝入 7.5 升環己醇(溶劑)、750 克 L-組織胺酸(受質)及 113 毫升乙醯苯(催化劑)。

迴流加熱此懸浮液，並保持其在 $150-165^\circ\text{C}$ 溫度間至少

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

40 小時。抽出小量樣品測定以決定組織胺酸去羧化的程度。將懸浮液冷卻至 80℃ 以下，並加入 1875 毫升甲苯。將反應混合物進一步冷卻至室溫。以布式漏斗過濾產物至另一新的 12 升(12-L)四頸圓底燒瓶中。

以配備有溫度計、攪拌子、可留置氯化氫的設計及真空設計，並含有濾液的新燒瓶準備好，保持在可隨時加入氯化氫氣體的狀態下。一邊攪拌，一邊將溶液冷卻至 10℃。保持溫度在 20℃ 以下，並加入至少 441 克氯化氫氣體(2.5 當量)。在完成添加氯化氫之後，在室溫下攪拌所得濃稠的黃色懸浮液 1 小時。

再次以布式漏斗過濾產物，以 375 毫升環己醇及 375 毫升甲苯來清洗留在濾紙中的濾渣，接著再以兩次 750 毫升的甲苯及兩次 750 毫升的己烷清洗。將濾紙上的濾渣抽真空至少 30 分鐘。該濾紙中的濾渣含有大量的環己醇，這些環己醇可以溶劑清洗加以去除。

將上面仍然潮濕的濾渣放入配備有攪拌子及氮氣管線的 12 升(12-L)四頸圓底燒瓶中，加入 7.5 升的乙醇。在室溫下攪拌懸浮液 4 小時。以布式漏斗過濾產物，並以 400 毫升己烷清洗留在濾紙中的濾渣。將該濾渣於 60-65℃ 的烤箱中真空乾燥一整夜。此方法可產生 504 克組織胺二氯化物粗產物(產率 56.6%)，經 HPLC 測定可知其純度則為 94.4%。將產物再結晶以改善終產物純度。

在配備有溫度計、攪拌子、冷凝器、額外漏斗及氮氣管線的 12 升四頸圓底燒瓶中，裝入上述 504 克所合成的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

組織胺二氯化物粗產物。此外，並加入 4.5 升乙醇及 200 毫升水來將濾渣溶解。在氮氣下攪拌該懸浮液。

將懸浮液加熱迴流。保持懸浮液於迴流狀態下，一滴一滴加入水直到所有固體都溶解為止。將溶液冷卻至 75°C 以下。在溶液中加入 50 克 NUCHAR SA(westvaco, New York, NY)及 50 克 CELITE(J.T. Baker, Hayward, CA)混合物。將懸浮液加熱迴流，並維持在該溫度 0.5 小時。將懸浮液冷卻至 65-75°C，並以 CELITE 過濾至一乾淨、乾燥的 12 升四頸圓底燒瓶中。以 450 毫升乙醇及 50 毫升水清洗濾渣。

將濾液慢慢的冷卻至室溫並攪拌隔夜。將溶液進一步冷卻至 0-5°C 約 2 小時。在 0-5°C 時，以布式漏斗過濾懸浮液。以冷卻至 0-5°C 之 200 毫升的乙醇清洗濾渣三次。將該濾渣於 60-65°C 的烤箱中真空乾燥一整夜。

再結晶後，終產物為 299 克(產率 59.4%)，經 HPLC 分析，純度為 99.1%。該 HPLC 方法詳述於實施例 7。可進行數次額外的再結晶步驟，以增加終產物純度。但是，經再結晶後仍然有兩種未知的雜質(RRt 1.3、1.5)存在，約佔 0.1%。

一般來說，第一種雜質(RRt 1.3)比例約為 0.2-0.4%，而第二種雜質(RRt 1.5)比例約為 0.5-0.6%。經第二次再結晶後，該雜質可分別被降低至約 0.1-0.2%及 0.4-0.5%。而且，如果在數天後再次分析樣品時，雜質量還會再上升，顯示終產物並不安定。產物不安定這點或許可以解

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

釋為什麼上述濕濾渣在 HPLC 分析時表現出 99.9%的純度，但待乾燥後純度卻反而下降到 99.1%。後續即使再以二氯甲烷或碳來進行處理，也無法將這些雜質排除。

實施例 2

組織胺酸去羧化反應之催化劑

基於上述的結果，因此對上述合成方法作了數種改良。所作的改良是希望能將未知的雜質量降至最低。其中一項檢驗的變數，即去羧化反應時所使用的催化劑。試驗了許多種包括乙醯苯在內的其他催化劑，希望能知道其是否在色層層析雜質的形成上扮演了任何角色。表 1 顯示此研究中所用的催化劑。所使用催化劑量為 0.3 當量。

表 1
去羧化反應催化劑探討

催化劑	反應時間 (小時)	HPLC 純度 (%)	
		雜質 #1	雜質 #2
乙醯苯(控制組)	21	4.5	4.0
4'-溴乙醯苯	21	7.0	3.4
二苯甲酮	21	14.5	2.9
對-硝基乙醯苯	17	分解	分解
對-甲基乙醯苯	16	1.65	0.71
對-甲氧乙醯苯	16	1.9	2.9
對-甲基乙醯苯/1-甲基-4-吡啶酮	7.5	3.0	2.4
對-甲基乙醯苯/AcOH	7.5	9.6	3.5

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明()

表 1 結果顯示對-甲基乙醯苯在減低終產物雜質量上較乙醯苯來得好。相反的，合併使用對-甲基乙醯苯與一種鹼(1-甲基-4-吡啶酮)對降低雜質量並無助益，反而是引入一種酸(醋酸)會大幅提供終產物中的雜質量。再者，以污染物的生成而言，對-甲基乙醯苯也明顯較優於乙醯苯，但在單氯化物鹽類的分離上，對-甲基乙醯苯則未有可促進分離的效果。這些數據顯示缺電子之酮類催化劑會促使終產物雜質量上升，而富含電子之酮類催化劑則會降低終產物雜質量。基於這樣的結果，因此以對-甲基乙醯苯來取代乙醯苯作為本發明去羧化反應的催化劑。

實施例 3

產生組織胺鹽類的方法

另一項探討的參數，係有關製造出具可接受純度的組織胺二氯化物，其中涉及在將粗產物沉澱時所加入之酸的當量數。在本發明揭露範圍中，令人相當驚訝的一項發現是，終產物中污染物的降低與所加入用來產生該分子鹽類的酸的用量有關。在前技步驟中，係將 2.5 莫耳當量的氫氯酸氣體引入內含去羧化之組織胺酸(自由鹼基態之組織胺)溶液中，以產生氯化氫鹽類粗產物。本實施例檢視了藉由添加溶於異丙醇(IPA)之酸溶液於自由鹼基態之組織胺溶液中，來測定數種不同當量氫氯酸氣體的效果。

將數種濃度的 HCl 溶於 IPA 中，並檢測其對所生成雜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

質量的影響。依上述合成步驟進行合成，但在添加 HCl 時採用 0.3 當量之對-甲基乙醯苯與甲苯共溶劑。以下列實施例 7 之方來檢視雜質。結果示於下列表 2 中。

表 2
HCl 當量數及其對雜質生成的影響

HCl 之莫耳當 量數 /IPA	HPLC 純度 (%)		
	雜質 #1	雜質 #2	凝結產物
2(控制組)	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

表 2 結果顯示所加入酸的量，可大幅改變內含自由鹼基態組織胺溶液中終產物內兩種雜質含量。上述結果可能是因雜質本身的鹼性性質較自由鹼基態組織胺的鹼性來得弱之故。因此，自由鹼基態組織胺較雜質更優先被質子化。

以雜質量而，使用 0.5 莫耳當量的 HCl 時可獲致最佳結果。在這種條件下，所分離出的粗產物是單氯化氫鹽類，此係由氯化物的滴定結果推知。因此，欲合成具可接受高純度的組織胺二氯化物，因此故意採用一種涉及製造單氯化物鹽類的中間純化步驟。但是使用此方法需在稍後的合成步驟中添加額外的 HCl，以製造出二氯化物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

以額外實驗來檢視當微幅改變酸濃度時，其對產物純度及產率的影響。這些實驗結果示於表 3。這些結果是 100 毫升反應混合物與 0.3 當量的對-甲基乙醯苯與共溶劑二氯甲烷一起產生的產物中所獲得的。選擇使用二氯甲烷的理由詳述於實施例 4 中。

表 3

微幅改變酸濃度對產物純度及產率的影響

粗產物鹽類				終產物		
HCl (當量)	產率 (%)	HPLC 純度 (% a/a)		產率 (%)	HPLC 純度 (% a/a)	
		雜質#1	雜質#2		雜質#1	雜質#2
0.57	43.3	0.05	0.14	57.7	0.03	0.07
0.67	50.6	0.06	0.17	61	0.05	0.10
0.76	53.5	0.09	0.20	59	0.05	0.10

縮小所使用當量範圍以定出酸濃度微幅改變量對粗產物純度的影響。表 3 的數據更支持前述結論，即降低酸當量會降低終產物中雜質量，同時也會降低產率。在更進一步的實驗中，則使用了相對於起始物而言，0.6 莫耳當量的 HCl。欲得更大量的產物，需使用更高量的起始物，而所需酸量則為每莫耳自由態鹼需 0.85 莫耳當量的酸。此計算出的酸當量數約相當於起始物 L-組織胺酸當量數的 0.6 莫耳當量數。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

實施例 4生成鹽類過程中所使用的共-溶劑

下一個欲檢視、以改善組織胺二氯化物合成程序的變數是在添加酸程序中所使用的共溶劑。為探索共溶劑對終產物純度的影響，挑選了數種可沉澱過程中使用的共溶劑進行試驗。如上述，以實施例 7 所述之 HPLC 法來分析所得樣品純度。結果示於表 4 中。

表 4二氯甲烷及其他共溶劑對終產物純度的影響

共溶劑	產率 (%)	HPLC 純度 (% a/a)	
		雜質#1	雜質#2
甲苯(控制組)	49.5	0.13	0.31
二氯甲烷	45.9	0.10	0.15
TBME	51.9	0.33	0.51
無	43.5	0.12	0.18

表 4 結果所使用的沉澱反應條件為 0.3 當量之對-甲基乙醯苯、0.6 當量之 HCl/IPA 及 5 份的共溶劑。表 4 結果顯示相對於控制組而言，使用二氯甲烷時所得雜質量最少。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

實施例 5

組織胺單氯化物粗產物的製備

下述程序係有關如何製備組織胺單氯化物的教示。在配備有溫度計、攪拌子、冷凝器及氮氣管線的 2 升三頸圓底燒瓶中(反應器)，裝入 1 升環己醇(溶劑)、100 克 L-組織胺酸(受質)及 25.9 毫升乙醯苯(催化劑)。環己醇融點在 22-25°C，且可能需加熱才能產生能轉移至反應器中的液體。懸浮液呈白色，溫度約在 20-25°C，體積則為 1050 毫升。在氮氣下攪拌該懸浮液。

將懸浮液保持加熱迴流(160-165°C)30 小時。取出少量樣品測試起始物中已被去羧化的百分比。該懸浮液應含 ≤ 1% 的 L-組織胺酸。若反應尚未完成，則繼續加熱 3-5 小時後再重複取樣測試。當溶液變得澄清均勻時，表示起始物完全被耗盡且去羧化反應已完成。

反應完成後，將懸浮液冷卻至約 22-25°C。之後在反應器內加入 300 毫升二氯甲烷。將此混合物進一步冷卻至室溫。以布氏漏斗將溶液過濾至 2-L 的三頸圓底燒瓶中。以 100 毫升二氯甲烷清洗第一個反應器兩次，再用洗液清洗濾紙。此過濾步驟可將任何殘存的 L-組織胺酸除去。

第二個反應器中含有濾液，此第二反應器也配備有溫度計、攪拌子、額外的漏斗及氮氣管線。在清洗步驟後，將氮氣再次引入反應器中，並將濾液加熱到 30-35°C。取少量溶液並分析其中自由鹼基態組織胺含量。以該分析結果來計算產生單氯化物鹽類所需之酸量。所需酸量為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

每莫耳自由鹼基態組織胺需 0.85 莫耳當量 HCl。

在劇烈攪拌下，以不致使溶液溫度上升超過 40°C 的速度，一滴滴加入 50.5 毫升之 7.65M HCl 異丙醇溶液 (HCl/IPA)。此步驟係放熱反應，因此此添加 HCl/IPA 溶液步驟需費時約 1 小時才能完成。讓所得淡棕色懸浮液於 1 小時期間冷卻至 20-25°C，並至少攪拌 2 小時。該 7.65M HCl 異丙醇溶液係藉由在 100 毫升異丙醇中通入 27.9 克的 HCl 氣體，並冷卻至 5-10°C 下所製備而成的。

在氮氣下，將冷卻了的懸浮液由布氏漏斗中過濾，並以 100 毫升 1:1 之二氯甲烷/環己醇溶液清洗濾渣。再以 100 毫升之二氯甲烷溶液清洗濾渣三次。由於單氯化物鹽類極易溶於水，因此實驗室中的濕度可能會影響產物產率。因此，可藉由在氮氣下進行過濾步驟，以將濾渣可能曝露在潮濕環境下的機會降至最少。

之後將潮濕的濾渣放到 1 升的三頸圓底燒瓶中，該燒瓶亦配備有溫度計、攪拌子、及氮氣管線，以便通入二氯甲烷。將固體懸浮於 500 毫升二氯甲烷中，並在氮氣下攪拌 1 小時。通入二氯甲烷有助於去除殘餘的環己醇，並使產物更有效的被乾燥，此詳述於後述步驟。

將氮氣下的懸浮液過濾，並以 75 毫升二氯甲烷清洗兩次。將濾渣在 55-60°C 下真空乾燥 16 小時。

結果示於表 5 中。重複進行此法 3 次，並比較每次結果的產率。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

表 5

組織胺單氯化物粗產物產率

	實施例 1	實施例 2 ⁺⁺	實施例 3 ⁺⁺
固體乾重 ⁺	50.28	52.59	50.28
粗產物產率%	52.9	55.0	52.9

+ 固體重量，其相對應百分比中已對溶劑量進行過校正。

++ 實施例 2 及 3 中，濾渣係被乾燥了 8 小時，而非 16 小時。

實施例 6藉由將 L-組織胺酸去羧化來製備組織胺二氯化物

實施例 6 示出自實施例 5 之單氯化物前驅物中製備組織胺二氯化物的步驟。

將配備有溫度計、攪拌子、漏斗、冷凝器及氮氣管線的 1 升三頸圓底燒瓶(反應器)置於加熱台上。在反應器中裝入 40 克組織胺單氯化物、32 毫升蒸餾水、280 毫升 1 倍的乙醇溶液(由 99.5%酒精及 0.5%甲苯組成)。由於組織胺單氯化物吸溼性非常高，因此整個反應過程均需在氮氣下進行。

下一步驟係加入 HCl/IPA 溶液，將組織胺單氯化物轉變成二氯化物鹽類。在反應器中加入 41.5 毫升之 6.85M 的 HCl/IPA 溶液(1.05 當量)。如上述，此反應為放熱反應，因此此添加酸步驟費時約 15 分鐘。在添加酸初期，可得一澄清溶液。但是，溶液會漸漸變稠，並在約添加了 75%的酸時，出現白色懸浮液。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

添加酸步驟完成後，將所得白色黏稠懸浮液於油浴下加熱迴流(70-80℃)。懸浮液中的固體會漸漸融化形成琥珀色溶液。一旦懸浮液中的固體完全融化後，即可將反應器由油浴中移出。在反應器中加入 NUCAR SA 碳(2克)及 CELITE(2克)。將懸浮液加熱迴流 25 分鐘。此階段溫度的維持相當重要，因為低於 60℃ 時就會出現沉澱。

經由 CELITE，將此黑色的熱溶液過濾至另一配備有溫度計及攪拌子的乾淨燒瓶內。該 CELITE 可防止破屑在過濾時流進燒瓶中。將此反應器係先於油浴中預熱過。

將內含反應混合物的第一反應器以 400 毫升、60-65℃ 的 1 倍乙醇液清洗兩次。將溶液過濾並加至上述濾液中。此新加入的濾液會造成些許沉澱。之後將所有溶液在 60-65℃ 下攪拌 30 分鐘。

將懸浮液(組織胺二氯化物)於 1 小時期間緩緩冷卻至 25℃，並於 20-25℃ 攪拌 2 小時，之後再於 2 小時期間冷卻至 0-5℃。在氮氣下過濾該懸浮液，並以 400 毫升冰冷的乙醇清洗三次。將濾渣在 55-65℃ 下真空乾燥 16 小時後稱重。將此三種實驗結果總結於表 6 中。

表 6

組織胺二氯化物產率

	實施例 4	實施例 5	實施例 6
溼重(克)	48.8	45.6	46.4
乾重(克)	34.9	33.3	33.6
產率(%)	70	66.7	67.4

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明()

實施例 7

可分析、鑑別及測定組織胺二氯化物之 HPLC 方法

本實施例中討論了以 HPLC 來定量及鑑別終產物中組織胺二氯化物及其相關化合物與降解物。本方法係使用具有梯度及 UV 偵測器的 HPLC 系統。並以內含電腦數據截取系統的 HPLC 系統來進行純度測定。其他設備還包括：水系統 C-18、5 μm 、4.6x350 mm 管柱；解析度在 0.01 毫克及 0.01 克的分析天平；量瓶；及管柱加熱器。所使用之試劑及標準物包括：USP 組織胺二氯化物參考標準物或相當於此之化合物；甲醇，HPLC 級；乙腈，HPLC 級；1-庚烷磺酸鈉鹽，單鹼型，單水合物，ACS 試劑級；D-、L-組織胺單氯化物、單水合物 (Sigma, St. Louis, MO)；1N 氫氧化鈉溶液；1N 氯化氫溶液；純水；及苯甲醇，ACS 試劑級。

製備兩種移動相緩衝液。移動相 A(MPA)內含 0.02M 磷酸鈉及 0.05M 庚烷磺酸，pH 值為 3.0。移動相 B(MPB)內含乙腈/甲醇：20/15。

分別準備標準物及樣品做純度鑑定。分析標準物包含製備三種不同濃度的二氯化物溶液，分別為 0.88 mg/ml、0.80 mg/ml、及 0.72 mg/ml。DL-組織胺單氯化物、單水合物濃度為 0.008 mg/ml。同樣的，製備二分內含 0.8 mg/ml 合成之組織胺二氯化物的分析樣品，並製備內含 0.0006 mg/ml 組織胺二氯化物之定量限制溶液 (LOQ)。對 LOQ 而言，本組織胺方法的敏感性為 0.07%，而偵測敏感性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

為 0.03%。

準備好樣品及標準物後，讓 HPLC 系統開始平衡。平衡好後，由廢棄物管線來測試流速(即，10%之 MPB 以每分鐘 1.5 毫升的速率流出管柱)。流速則是 1.5 毫升/分鐘 ± 0.15 毫升/分鐘。管柱平衡好後，在開始分析樣品前先以水注入管柱中進行測試。

準備好後，即將 $0.7 \text{ mg/ml} \pm 0.1 \text{ mg/ml}$ 之組織胺二氯化物注入。計算界於 1 mg/ml 苯甲醇溶液高峰及組織胺高峰間的解析度 "R"。重複 5 次此步驟，然後計算出標準偏差。

做出一標準物校準曲線。每隔 4-6 個樣品即做一次標準物，並確定其落在下列參數間：尾部因子 > 2.0 ；解析度 > 1.5 ，組織胺高峰的標準偏差不超過 2.0%；且標準物校準曲線的相關係數不可低於 0.995。

以注射一次解析度溶液來校正色層層析純度。計算界於苯甲醇溶液高峰及組織胺高峰間的解析度 "R"，以及組織胺高峰的尾部因子。由於解析度及尾部因子合乎要求，因此連續注射三次 LOQ 樣品。

計算三次組織胺高峰間的標準偏差。一般來說，尾部因子 > 2.0 ；解析度 > 1.5 ，組織胺高峰的相對標準偏差不超過 10%。

由於合乎上述因子，因此開始測試組織胺二氯化物終產物。HPLC 的操作條件詳述於表 7。梯度因子則詳述於表 8 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

表 7

操作因子

流速：	1.5 毫升/分鐘
注射體積：	20 μ l
偵測：	212 nm
管柱：	水系統 C-18、5 μ m、 4.6x250 mm 管柱
管柱溫度：	50℃
分析濃度：	0.8 mg/ml 之組織胺二氯化物
時間：	約 30 分鐘
移動相 A：	緩衝液
移動相 B：	ACN/MeOH 20/15 (v/v)

表 8

梯度因子

時間(分鐘)	移動相 B %	流速 (毫升/分鐘)
0	10	1.5
20	30	1.5
21	10	1.5
30	10	1.5

滯留時間：組織胺酸 = 約 3 分鐘

組織胺 = 約 12 分鐘

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

實施例 8組織胺二氯化物之 HPLC 分析

以實施例 7 所述 HPLC 方法來分析實施例 6 所得之組織胺二氯化物，以決定出樣品純度是否符合本發明方法所設定的純度要求標準。該組織胺二氯化物若欲功藥學使用，其所含色層層析雜質量需極少。若個別雜質量超過 0.1%，將會造成毒性。以實施例 5 及 6 分別製備出 3 批組織胺二氯化物。其純度結果詳述於表 9 中。

表 9HPLC 分析結果

實驗	雜質之說明	規格 / 結果
實驗 1	L-組織胺酸 HCl 單水合物	<0.8% w/w ; 未測出
	各色層層析雜質	< 0.1% w/w
	雜質 #1	< 0.05% w/w
	雜質 #2	0.13% w/w
實驗 2	總色層層析雜質	< 0.2% w/w ; 0.2% w/w
	L-組織胺酸 HCl 單水合物	<0.8% w/w ; 未測出
	各色層層析雜質	< 0.1% w/w
	雜質 #1	< 0.05% w/w
實驗 3	雜質 #2	0.10% w/w
	總色層層析雜質	< 0.2% w/w ; 0.2% w/w
	L-組織胺酸 HCl 單水合物	<0.8% w/w ; 未測出
	各色層層析雜質	< 0.1% w/w
	雜質 #1	< 0.05% w/w
	雜質 #2	0.06% w/w
	總色層層析雜質	< 0.2% w/w ; 0.1% w/w

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

表 9 結果顯示組織胺二氯化物終產物符合所揭露之標準。首先，雜質 #1 量低於分析定量分析界限。其次，雜質 #2 量稍高於 0.1% 閾值，因此符合毒性要求標準。雜質的明確量已知為 $<0.2\%$ w/w。這些結果顯示本發明方法可提供可供藥學使用的組織胺二氯化物。

結論

本發明揭露了一種製造藥學級組織胺二氯化物的新穎、非酵素式方法。所揭露方法之一明顯優點乃是其可產生較現存方法純度更高的組織胺二氯化物。

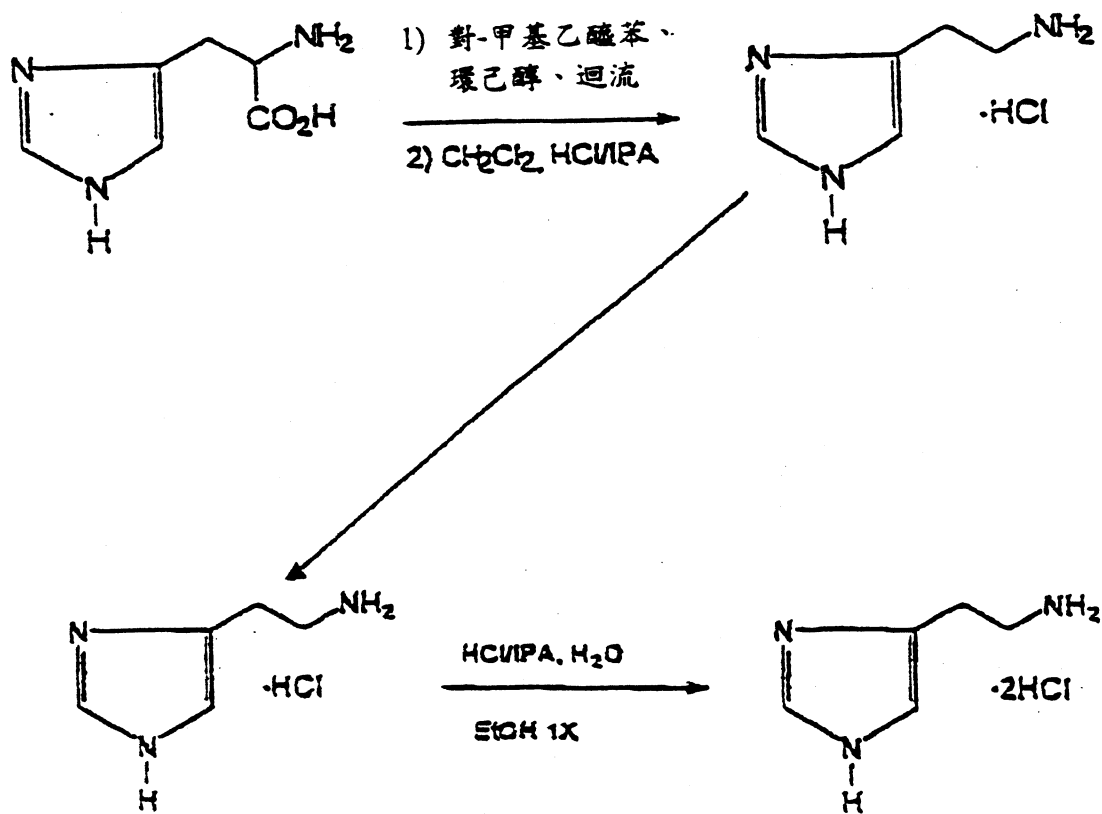
最後，上級實施例僅為例示性質，本發明之範疇並不僅限於這些實施例中。如上已將本發明作了詳盡的描述，但需知本發明可有許多變化。這類變化應仍視為未脫離如以下申請專利範圍所定義的本發明之精神範疇中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

第 2 圖



四、中文發明摘要(發明之名稱：

修正
補充 本3年5月6日

組織胺二氯化物的合成方法

本發明係關於一種以兩步驟非酵素式合成法來製備藥學級組織胺二氯化物的方法。本發明所揭露的組織胺二氯化物的合成方法，係以非酵素式方式將組織胺酸去羧化，及步進式地將此去羧化產物轉變成二氯化物鹽類。本發明所揭露能作為藥物使用之終產物內含有等於或小於下列量之物質：0.8%之 L-組織胺酸單水合物、0.1%之各個色層層析雜質、及 0.2%總雜質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

英文發明摘要(發明之名稱：

SYNTHESIS OF HISTAMINE DIHYDROCHLORIDE

The invention disclosed herein relates to the preparation of pharmaceutical grades of histamine dihydrochloride using a two step non-enzymatic synthetic method. The invention disclosed herein describes the synthesis of histamine dihydrochloride by the non-enzymatic decarboxylation of histidine and the step-wise conversion of the decarboxylated product to the dihydrochloride salt form. The invention disclosed herein considers a final product of histamine dihydrochloride containing less than each of the following: 0.8% L-histidine HCl monohydrate, 0.1% individual chromatographic impurities, and 2% total impurities, to be acceptable for pharmaceutical use.

六、申請專利範圍

補充 94-5

1. 一種組織胺二氯化物的合成方法，該方法包含：

以富含電子的酮類將內含 L-組織胺酸的溶液去羧化，藉以在沒有去羧化酵素存在的情況下形成一內含組織胺的溶液，其中該富含電子的酮類係選自下列化合物所組成之群組中，包括苯甲基過氧化物、2,2'-偶氮雙異丁腈(AIBN)、2-環己烯-1-酮、乙醯苯、4'-溴乙醯苯、二苯甲酮、對-硝基乙醯苯、對-甲基乙醯苯、對-甲氧乙醯苯、對-甲基乙醯苯及 1-甲基-4-哌啶酮；

由該內含組織胺的溶液中形成一內含組織胺單氯化物的溶液；及

藉由添加異丙醇-氫氯酸溶液而自該內含組織胺單氯化物的溶液中形成一內含組織胺二氯化物之溶液。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中更包含在該內含組織胺的溶液中 通入二氯甲烷溶液。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該氫氯酸係約為自由鹼基態組織胺之 0.1 至 0.9 莫耳當量的氫氯酸。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該氫氯酸係約為自由鹼基態組織胺之 0.6 莫耳當量的氫氯酸。

六、申請專利範圍

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其更包含自該內含組織胺二氯化物溶液中分離出一藥學級組織胺二氯化物。

6. 一種藥學級組織胺二氯化物的合成方法，該方法包含：

以富含電子的酮類將一內含 L-組織胺酸的溶液去羧化，藉以在沒有去羧化酵素存在的情況下形成一種內含組織胺的溶液，其中該富含電子的酮類係選自下列化合物所組成之群組中，包括苯甲基過氧化物、2,2'-偶氮雙異丁腈(AIBN)、2-環己烯-1-酮、乙醯苯、4'-溴乙醯苯、二苯甲酮、對-硝基乙醯苯、對-甲基乙醯苯、對-甲氧乙醯苯、對-甲基乙醯苯及 1-甲基-4-哌啶酮；

藉由添加氯化氫而由該內含組織胺的溶液中形成一內含組織胺單氯化物的溶液；

藉由添加氯化氫而由該內含組織胺單氯化物的溶液中形成一內含組織胺二氯化物的溶液；及

自該內含組織胺二氯化物的溶液中分離出該組織胺二氯化物，其中該內含組織胺二氯化物的溶液至少包含 0.8% 之 L-組織胺酸單水合物、0.1% 之各個色層層析雜質及由 HPLC 分析測定之少於 2% 總雜質。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該內含組織

六、申請專利範圍

胺二氯化物溶液至少包含由 HPLC 分析測定之少於 2 % 總雜質。

8. 如申請專利範圍第 1 或 6 項所述之方法，其中該去羧化的步驟係於介於 145°C 至 170°C 間的溫度下執行。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中該去羧化的步驟係於介於 150°C 至 165°C 間的溫度下執行。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該去羧化的步驟係於介於 160°C 至 165°C 間的溫度下執行。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線