Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny

Patrycja Garbacz

Otrzymywanie i właściwości ko-kryształów wybranych substancji leczniczych

Promotor pracy:

prof. dr hab. Marek Wesołowski

Praca wykonana w
Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
w celu uzyskania stopnia doktora
nauk farmaceutycznych

Gdańsk, 2020

Streszczenie

Poszukiwanie nowych, alternatywnych form substancji czynnych farmaceutycznie (*Active Pharmaceutical Ingredients*, APIs) wynika z problemów z ich rozpuszczalnością, biodostępnością oraz przechowywaniem. Szacuje się, że około 40 % substancji czynnych dostępnych jako leki o niemodyfikowanym uwalnianiu jest kategoryzowana jako praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, natomiast nawet 70 % APIs, kandydatów na leki, cechuje słaba rozpuszczalność w wodzie. Jedną z wartościowych metod modyfikacji właściwości fizykochemicznych i biofarmaceutycznych substancji czynnych jest ko-krystalizacja. Utworzenie nowej struktury w wyniku ko-krystalizacji API z obojętną substancją – koformerem może powodować szereg zmian w właściwościach substancji czynnej m.in. zwiększyć rozpuszczalność, szybkość rozpuszczania, poprawić stabilność, czy też biodostępność.

W związku z powyższym celem pracy było otrzymanie ko-kryształów pochodnych 1,4-benzodiazepiny, substancji słabo rozpuszczalnych lub praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie. Do badań użyto ośmiu benzodiazepin: chlordiazepoksyd, diazepam, estazolam, lorazepam, lormetazepam, klonazepam, oksazepam i temazepam oraz dziewięciu koformerów: kwas bursztynowy, kwas cytrynowy, kwas fumarowy, kwas glutarowy, kwas *p*-aminobenzoesowy, kofeinę, nikotynamid, mocznik i sacharynę, które tworzą łącznie 72 pary substancji benzodiazepina-koformer. W związku z generowaniem wielowymiarowych zbiorów danych opisujących wynik procesu ko-krystalizacji, dodatkowym założeniem pracy była próba weryfikacji przydatności metod chemometrycznych: analizy głównych składowych (*Principal Component Analysis*, PCA) i analizy skupień (*Cluster Analysis*, CA) jako narzędzi wspomagających interpretację widm spektroskopowych: spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (*Fourier Transform Infrared*, FTIR) i spektroskopii Ramana oraz krzywych różnicowej kalorymetrii skaningowej (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) w celu potwierdzenia faktu otrzymania ko-kryształów.

Realizując cel pracy, badania przeprowadzono w kilku etapach. W pierwszym etapie badano możliwość ko-krystalizacji benzodiazepin z zastosowaniem dwóch metod badań przesiewowych. Pierwsza, wstępna metoda termiczna polegała na predykcji ko-krystalizacji na podstawie efektów DSC rejestrowanych podczas ogrzewania mieszaniny fizycznej benzodiazepiny z koformerem z szybkością 10 °C/min. Wykazano, iż w przypadku 15 mieszanin fizycznych: oksazepamu z kwasem fumarowym, kwasem cytrynowym, kwasem glutarowym, kwasem *p*-aminobenzoesowym i mocznikiem, lorazepamu z kwasem

fumarowym, nikotynamidem, sacharyną, kwasem glutarowym i kwasem cytrynowym, diazepamu z kwasem bursztynowym i kwasem cytrynowym, temazepamu z kwasem glutarowym i mocznikiem, oraz klonazepam z mocznikiem istnieje możliwość ko-krystalizacji pomiędzy składnikami. W kolejnym etapie, weryfikując wyniki analizy DSC ko-krystalizowano 72 mieszaniny benzodiazepin z koformerami metodą ucierania z dodatkiem niewielkiej objętości rozpuszczalnika. O możliwości ko-krystalizacji wnioskowano na podstawie widm FTIR i Ramana oraz krzywych DSC jako metody wspomagającej. Na tym etapie badań wytypowano cztery pary substancji zdolnych do utworzenia ko-kryształów: chlordiazepoksyd z kwasem *p*-aminobenzoesowym, chlordiazepoksyd z sacharyną, lorazepam z nikotynamidem oraz estazolam z kwasem fumarowym. Obie metody badań przesiewowych wskazały na możliwość ko-krystalizacji w układzie lorazepam-nikotynamid.

Powyższe cztery pary substancji wybrano do dalszych prób stosując różne metody ko-krystalizacji i różne rozpuszczalniki. Ostatecznie otrzymano dwa nowe ko-kryształy: chlordiazepoksydu z kwasem *p*-aminobenzoesowym i lorazepamu z nikotynamidem metodą odparowania rozpuszczalnika z zawiesiny benzodiazepiny z koformerem oraz metodą ucierania z niewielką objętością rozpuszczalnika. Potwierdzono fakt otrzymania oraz opisano strukturę ko-kryształów i ich podstawowe właściwości za pomocą proszkowej i monokrystalicznej dyfrakcji rentgenowskiej, spektroskopii FTIR i Ramana oraz DSC.

Badania przeprowadzone z użyciem opisanych w literaturze ko-kryształów furosemidu z kofeiną, indometacyny z sacharyną oraz furosemidu z kwasem *p*-aminobenzoesowym posłużyły do weryfikacji przydatności PCA i CA jako narzędzi wspomagających potwierdzenie faktu otrzymania ko-kryształu. Podjęto próbę ko-krystalizacji wyżej wymienionych substancji w stosunkach molowych 1:1, 1:2 oraz 2:1. W celach porównawczych przygotowano mieszaniny fizyczne substancji wyjściowych w stosunkach molowych 1:1. 1:2 oraz 2:1. Wszystkie próbki badano za pomocą DSC oraz metod spektroskopowych: FTIR i Ramana.

W przypadku ko-kryształów i mieszanin fizycznych furosemidu z kofeiną utworzono trzy macierze bazujące na danych zebranych z krzywych DSC oraz widm FTIR i Ramana. Wygenerowano wykresy w układzie pierwszej głównej składowej (PC1) i drugiej głównej składowej (PC2) oraz PC1 i trzeciej głównej składowej (PC3) oraz dendrogramy CA. Analiza wykresów potwierdziła możliwość utworzenia ko-kryształów w stosunku molowym 1:1. Z kolei w przypadku próbek furosemidu z kwasem *p*-aminobenzoesowym oraz indometacyny z sacharyną z wygenerowano 3 macierze. Wiersze pierwszej macierzy obejmowały potencjalne ko-kryształy i substancje wyjściowe, drugiej potencjalne ko-kryształy i mieszaniny fizyczne,

natomiast wiersze ostatniej macierzy zawierały ko-kryształy, mieszaniny fizyczne oraz substancje wyjściowe. Wygenerowano wykresy w układzie PC1 i PC2 oraz dendrogramy CA, które wykazały, iż największą użytecznością w identyfikacji ko-kryształów odznaczały się matryce złożone z potencjalnych ko-kryształów oraz mieszanin fizycznych.

Podsumowując, efektem badań przeprowadzonych w pracy doktorskiej są dwa nowe, nieopisane w piśmiennictwie ko-kryształy, pochodne 1,4-benzodiazepiny: chlordiazepoksydu z kwasem *p*-aminobenzoesowym oraz lorazepamu z nikotynamidem. Określono ich strukturę krystaliczną oraz podstawowe właściwości fizykochemiczne. Dodatkowo, badania potwierdziły przydatność metod analizy wielowymiarowej: PCA i CA jako narzędzi ułatwiających identyfikację ko-kryształów.

Abstract

Unfavorable physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients (APIs) such as poor water solubility, slow dissolution rate and instability are the most challenging issues to overcome. It is well-known that about 40 % of APIs marketed as drugs of unmodified release are classified as practically water insoluble, whereas even 70 % of APIs – drug candidates, are characterized by low water solubility. Hence, co-crystallization is proposed as one of approach towards improving physicochemical and biopharmaceutical properties of APIs. A new crystal structure created as a result of API co-crystallization with neutral ingredient – coformer may contribute to improve key physicochemical properties of active substance, for instance solubility, dissolution rate and stability.

For this reason, the aim of PhD thesis was to prepare new co-crystals of 1,4-benzodiazepine derivatives. Benzodiazepines are poor or practically insoluble in water. A total set of 72 benzodiazepine-coformer configurations were prepared in this study using eight benzodiazepines: chlordiazepoxide, diazepam, estazolam, lorazepam, lormetazepam, clonazepam, oxazepam and temazepam, and nine coformers: succinic acid, citric acid, fumaric acid, glutaric acid, *p*-aminobenzoic acid, caffeine, nicotinamide, urea, and saccharin. In order to extract the maximum knowledge from spectral data (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR, and Raman spectroscopy) and thermal data (differential scanning calorimetry, DSC), advanced multivariate statistical approaches such as principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were used. These supporting tools enabled interpretation of FTIR and Raman spectra, and DSC scans, to confirm that co-crystals were prepared.

In the first stage of the study, possibility of benzodiazepines co-crystallization using two screening methods was investigated. The first screening method enables prediction of co-crystallization on the basis of DSC effects registered during heating of binary physical mixtures of APIs with coformers at a rate of 10 °C/min. This preliminary thermal approach showed that 15 physical mixtures: oxazepam with fumaric acid, citric acid, glutaric acid, *p*-aminobenzoic acid and urea, lorazepam with fumaric acid, nicotinamide, saccharin, glutaric acid and citric acid, diazepam with succinic acid and citric acid, temazepam with glutaric acid and urea, and clonazepam with urea can be able to form co-crystals. To verify the results obtained by the DSC, 72 benzodiazepines mixtures with coformers were co-crystalized using grinding method with addition of small volume of solvent. The ability for co-crystallization was confirmed using FTIR and Raman spectra, and DSC scans as supporting tool. This

second screening approach revealed that four configurations of ingredients: chlordiazepoxide and *p*-aminobenzoic acid, chlordiazepoxide and saccharin, lorazepam and nicotinamide, and estazolam and fumaric acid can be capable of co-crystals formation. Only co-crystallization between lorazepam and nicotinamide has been identified by both screening methods.

Taking all above into consideration, four configurations of ingredients were selected for further study. Different co-crystallization approaches and solvents were used. Finally, two new co-crystals, not described in the literature so far were obtained, that is chlordiazepoxide with *p*-aminobenzoic acid and lorazepam with nicotinamide by slurry evaporation and grinding methods. Creation of new co-crystals were confirmed by powder X-ray diffraction, single-crystal X-ray diffraction, FTIR and Raman spectroscopy and DSC. Moreover, their crystal structures and basic physicochemical properties were also described in detail.

In the second stage of the study, investigations were also carried out to show to what extent the PCA and CA multivariate methods can be used as tools supporting interpretation of the DSC, FTIR and Raman data in order to develop a simple approach towards co-crystal detection. Described in the literature co-crystals of furosemide with caffeine, indomethacin with saccharin and furosemide with *p*-aminobenzoic acid were used as model substances. Potential co-crystals and physical mixtures of above mentioned ingredients were prepared at molar ratio 1:1, 1:2 and 2:1 and examined by DSC, FTIR and Raman techniques.

Three matrices for the data acquired from DSC scans, and FTIR and Raman spectra were created for co-crystals and physical mixtures of furosemide with caffeine. PCA score scatter plots of the first principal component (PC1) and the second principal component (PC2), PC1 and the third principal component (PC3), as well as CA tree diagrams revealed that co-crystals at the molar ratio 1:1 can be created. Three different matrices were also generated for furosemide and *p*-aminobenzoic acid, and indomethacin and saccharin, but the rows of first matrix included potential co-crystals and starting components, the second comprised potential co-crystals and physical mixtures and the last matrix contained co-crystals, physical mixtures and starting components. The score scatter plots for PC1 and PC2, and CA tree diagrams revealed that the most useful in co-crystals identifying are matrices consisted of potential co-crystals and physical mixtures.

To conclude, two new co-crystals of 1,4-benzodiazepine derivatives: chlordiazepoxide with *p*-aminobenzoic acid and lorazepam with nicotinamide were obtained for the first time. Their crystal structures and basic physicochemical properties were described. Additionally the study confirmed that PCA and CA can be used as supporting tools towards co-crystals detection.