KRYSTALICKÉ SOLI KYSELINY OBETICHOLOVÉ

EVA OTYEPKOVÁ a ROMAN GABRIEL

Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci,
17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
eva.otyepkova@upol.cz

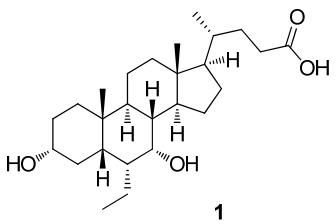
Došlo 2.5.19, přijato 13.6.19.
Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: kyselina obeticholová, aminy, 3-pentylamin, soli, krystalizace, RTG prášková difraktometrie

Úvod

Kyselina obeticholová **1** (6α-ethyl-3α,7α-dihydroxy-5β-cholan-24-ová kyselina, obr. 1) je semisyntetický analog žlučových kyselin, který se pod názvem Ocaliva používá při léčbě biliární cholangitidy a je v současné době testován pro léčbu dalších nemocí jater[1]. Kyselina obeticholová je v lékové formě Ocaliva přítomna v amorfní fázi[2], ale pro čištění kyseliny obeticholové při její přípravě se využívá krystalizace[3]. Medicinální potenciál kyseliny obeticholové vybízí ke zkoumání nových krystalových modifikací kyseliny[4] a jejich solí[5–8], fází, které by mohly být využity při čistících procesech nebo při přípravě nových lékových forem. Literární data naznačují, že většina solí obeticholové kyseliny obtížně krystalizuje a jejich izolace poskytuje převážně amorfní nebo nedokonale krystalický materiál. Vznik krystalických solí kyseliny obeticholové byl dosud popsán pouze při neutralizaci kyseliny obeticholové amoniakem[5], diethylaminem a (*S*)-α-methylbenzylaminem[6].

Cílem této studie bylo zkoumání schopnosti dalších organických bází, především aminů, vytvářet krystalické soli s kyselinou obeticholovou.



1

Obr. 1. **Strukturní vzorec kyseliny obeticholové**

Experimentální část

Příprava krystalických solí kyseliny obeticholové

Soli kyseliny obeticholové s aminy nebo jinými organickými bázemi byly připraveny rozpuštěním 4,75 mmol obeticholové kyseliny ve vhodném rozpouštědle, které bylo zvoleno s ohledem na rozpustnost báze (směs propan-2-ol – voda 20 ml + 40 ml nebo 20 ml ethyl-acetátu, případně 30 ml butyl-acetátu). K roztoku bylo následně přidáno 4,87 mmol organické báze. Odpařením roztoku do sucha byla získána amoniová sůl ve formě odparku, který byl v naprosté většině případů amorfní. K odparku bylo přidáno malé množství butyl-acetátu. Vzniklá směs byla uchovávána v chladničce při teplotě 0 až 5 °C po dobu, dokud odparek neprokrystaloval, maximálně však 4 měsíce. Krystalický stav byl potvrzen vždy měřením RTG práškové difrakce. Jakmile byla jednou sůl připravena v krystalickém stavu, tj. získán očkovací materiál pro krystalizaci, další příprava této soli mohla proběhnout už podstatně rychleji.

RTG prášková difrakce (XRPD)

Práškové difraktogramy byly měřeny na přístroji X'Pert Pro (Panalytical) s detektorem X'Celerator. Pro měření bylo použito záření CuKα o vlnové délce λ = 1,541874 Å. Další parametry měření: rozsah 3 až 40° 2Θ; krok 0,0167° 2Θ; délka kroku 42 s; kontinuální mód.

Metody termické analýzy (DSC a TGA)

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) i termogravimetrická analýza (TGA) byly měřeny na přístroji DSC/TGA Discovery (TA Instruments). Pro přípravu vzorků na DSC byly použity hliníkové Tzero kelímky 40 µl s propíchnutým víčkem. Obvyklá váha vzorku byla 2 až 4 mg. TGA bylo měřeno v hliníkových kelímcích 100 µl s propíchnutým víčkem. Obvyklá navážka vzorku byla 4 až 6 mg. Podmínky měření byly pro DSC i TGA nastaveny následovně: teplotní rozsah 25 až 250 °C, vyhřívací rychlost 10 °C min^{-1}.

Výsledky a diskuse

Krystalizace solí kyseliny obeticholové s organickými dusíkatými bázemi

V rámci studie problematiky solí kyseliny obeticholové bylo testováno 39 různých dusíkatých bází zahrnující aminy primární, sekundární, terciární, alifatické cyklické i acyklické, aromatické, chirální i achirální, aminokyseliny, kvartérní amoniové soli, metformin a imidazol. Kromě L-histidinu a difenylaminu všechny testované báze poskytly s obeticholovou kyselinou odpovídající sůl. Z připravených solí bylo schopno krystalizace pouze několik málo amoniových solí; již dříve popsané soli (*S*)-α-

-methylbenzylaminu a diethylaminu, a dále pak soli tetrabutylamonium-hydroxidu, 3-pentylaminu, (*S*)-aminochinuklidinu a methylpropylaminu. Souhrn všech testovaných organických dusíkatých bází a jejich schopnosti vytvářet krystalické fáze je uveden v tab. I.

Tabulka I
Souhrn všech testovaných organických dusíkatých bází a jejich schopnosti vytvářet krystalické soli s kyselinou obeticholovou

Dusíkatá báze	Forma soli
(*S*)-α-Methylbenzylamin	krystalická
(*R*)-α-Methylbenzylamin	amorfní
N-Methylbenzylamin	amorfní
Morfolin	amorfní
Diethylamin	krystalická
Difenylamin	netvoří sůl
Tromethamin	amorfní
(*S*)-Aminochinuklidin	krystalická
(*R*)-Aminochinuklidin	amorfní
(*S*)-2-Methylpiperazin	amorfní
(*R*)-2-Methylpiperazin	amorfní
(*S*)-*sek*-Butylamin	amorfní
(*R*)-*sek*-Butylamin	amorfní
L-Arginin	amorfní
L-Histidin	netvoří sůl
L-Lysin	amorfní
Cholin	amorfní
Diisopropylamin	amorfní
Dimethylamin	amorfní
Ethanolamin	amorfní
Diethanolamin	amorfní
Pyrrolidin	amorfní
Isopropylamin	amorfní
(*S*)-1,2-Diaminopropan	amorfní
(*R*)-1,2-Diaminopropan	amorfní
Tetrabutylamonium-hydroxid	krystalická
3-Pentylamin	krystalická
Dipropylamin	amorfní
Methylpropylamin	krystalická
Piperidin	amorfní
N,*N*-Dimethylethanolamin	amorfní
N-Ethylpiperidin	amorfní
N,*N*-Dimethyltetramethylendiamin	amorfní
Imidazol	amorfní
Trimethylbenzylamonium-hydroxid	amorfní
N,*N*-Diethylethylendiamin	amorfní
N,*N*-Dibenzylethylendiamin	amorfní
N,*N*-Dimethylbiguanidin (metformin)	amorfní
DABCO	amorfní

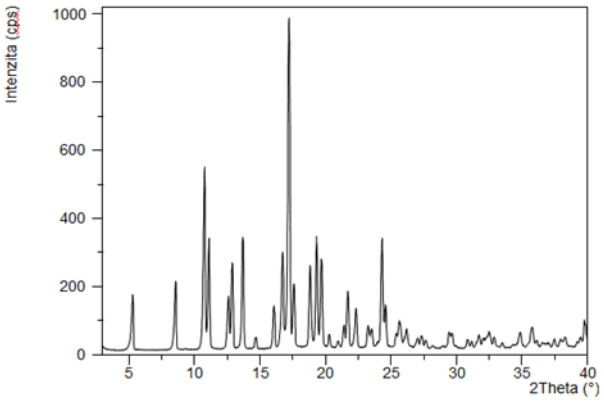
Krystalické soli neposkytly terciární aminy, hydroxyalkylaminy a aminokyseliny. U krystalizace byla pozorována (*S*)-enantioselektivita, krystalickou sůl neposkytl (*R*)-α-methylbenzylamin ani (*R*)-aminochinuklidin, enantiomery aminů, jejichž soli úspěšně krystalizovaly. U krystalických solí byly dále pozorovány velké rozdíly v rychlosti krystalizace a schopnosti krystalovat i při silném znečištění výchozí obeticholové kyseliny. Tyto rozdíly jsou dány vesměs typem použitého aminu. Nejlepší vlastnosti v tomto směru vykazovala 3-pentylamoniová sůl, která krystalizovala v řádu minut až desítek minut (u ostatních solí trvala často indukce krystalizace i po naočkování až 1 den) a její nukleace nebyla inhibována ani vyšším obsahem (20–30 %) nečistot ve vstupní obeticholové kyselině, tak jak bylo pozorováno u ostatních krystalických solí.

Charakterizace soli obeticholové kyseliny a 3-pentylaminu

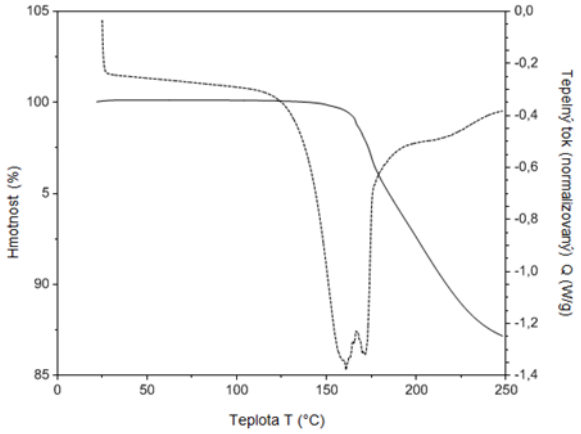
Typický RTG práškový difraktogram této soli je uveden níže na obr. 2 a ukazuje na velice dobře krystalickou látku. Do současné doby nebyl nalezen žádný jiný polymorf této soli. RTG difraktogram soli obeticholové kyseliny a 3-pentylaminu vykazuje charakteristické difrakce na pozicích 5,3; 8,5; 10,8; 11,1; 12,6; 12,9; 13,7; 16,1; 16,7; 17,2; 17,6; 18,8; 19,3; 19,7° 2Θ ± 0,2° 2Θ.

Sůl kyseliny obeticholové a 3-pentylaminu taje při teplotě okolo 139 °C, jak je možno stanovit z „onsetu“ endotermního píku na záznamu DSC (obr. 3), který odpovídá právě procesu tání. TGA křivka ukazuje na váhovou ztrátu počínající při teplotě zhruba 150 °C, která se vztahuje k dekompozici soli. Oba děje se překrývají, tání soli je tedy postupně doprovázeno jejím rozkladem. Z obou termických záznamů je dále patrné, že sůl netvoří hydráty nebo solváty.

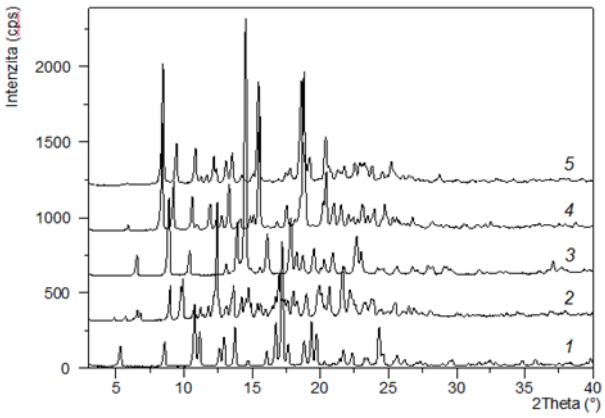
Na obr. 4 je porovnán RTG difraktogram soli obeticholové kyseliny a 3-pentylaminu s difraktogramy ostatních solí, které byly připraveny v rámci této studie.



Obr. 2. **RTG difraktogram soli kyseliny obeticholové a 3-pentylaminu**



Obr. 3. **DSC (přerušovaná čára) a TGA (plná čára) termogramy soli kyseliny obeticholové a 3-pentylaminu**



Obr. 4. **Srovnání RTG difraktogramů solí kyseliny obeticholové s jednotlivými aminy:** 1) 3-pentylamin, 2) **methylpropylamin, 3) (*S*)-aminochinuklidin, 4) tetrabutylamonium-hydroxid forma A, 5) tetrabutylamonium-hydroxid forma B**

Závěr

Kyselina obeticholová je schopna s dostatečně silnými bázemi (typicky např. s aminy) tvořit soli, které lze snadno izolovat jako amorfní látky. Pouze některé soli jsme však byli schopni vykrystalovat. Podařilo se připravit krystalické soli pouze s tetrabutylamonium-hydroxidem, 3-pentylaminem, (*S*)-aminochinuklidinem a *N*,*N*-methylpropylaminem. Schopnost přecházet na krystalický stav a rychlost tohoto přechodu záleží na struktuře báze. Tuto vlastnost nelze zatím plně teoreticky předpovědět, ale dosažené výsledky naznačují, že při selekci by měly být testovány symetrické nebo téměř symetrické menší alifatické primární nebo sekundární aminy.

Nejlepší vlastnosti prokázala sůl kyseliny obeticholové s 3-pentylaminem, která krystalizovala relativně rychle i ze znečištěného roztoku. Tato sůl je navíc velmi dobře krystalická. Jak ukázala termická analýza, nevytváří hydrát ani jiný solvát.

LITERATURA

1. Papazyan R., Liu X., Liu J., Dong B., Plummer E. M., Lewis R. D. II, Roth J. D., Young M. A.: J. Lipid Res. *59*, 982 (2018).
2. European Medicines Agency: Ocaliva - Assessment report, EMEA/H/C/004093/0000 (2016). https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/ocaliva-epar-public-assessment-report_en.pdf, staženo 22. 2. 2017.
3. Steiner A., Waenerlund Poulsen H., Jolibois E., Rewolinsky M., Gross R., Sharp E., Dubas-Fisher F., Eberlin A. (Intercept Pharmaceuticals, Inc.): US 2016/0176913.
4. Pathivada D., Mudapaka V. K., Gupta A. (Dr. Reddy's Laboratories Limited): PCT Int. Appl. WO 2018/211413.
5. Galvin G. M., Rewolinski M. (Intercept Pharmaceuticals, Inc.): PCT Int. Appl. WO 2018/165269.
6. Satishbhai S. M., Vikas S. G., Sandip R. K., Krishna Mohan N. R. T., Vilas H. D., Shirshendu D. G. (Dr. Reddy's Laboratories Limited): PCT Int. Appl. WO 2017/137931.
7. Sanphui P., Shivdavkar R. B., Vyas R., Bhise N. B., Singh G. (Lupin Limited): EP 3305799.
8. Obdalová I., Dammer O., Krejčík L., Hert J. (Zentiva): PCT Int. Appl. WO 2017/008773.

E. Otyepková and R. Gabriel *(Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc):* **Crystalline Salts of Obeticholic Acid**

Obeticholic acid is a semi-synthetic bile acid indicated for primary biliary cholangitis/cirrhosis (PBC) and developed for the treatment of other liver conditions such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The final drug product marketed under the name Ocaliva comprises amorphous obeticholic acid. There is a need for a crystalline salt of obeticholic acid, useful in purification of this acid and suitable for industrial process. So far only few crystalline salts have been found. Set of organic bases, especially amines, were tested in order to obtain a crystal-

line salt. Out of 39 tested counter-ions, only few provided crystalline salt with obeticholic acid: tetrabutylamonium hydroxide, 3-pentylamine, (*S*)-aminoquinuclidine a *N*,*N*--methylpropylamine. In particular, the salt of obeticholic acid and 3-pentylamine exhibited interesting properties such as a relatively rapid crystallization from chemically impure solution, high degree of crystallinity and solvent-free structure.

Keywords: obeticholic acid, amines, 3-pentylamine, salts, crystallization, RTG powder diffractometry