

Gyógyszerhatóanyagok polimorfája komplex megközelítésben

DEMETER Ádám,* SZALAY Zsófia, JANKE Dénes és MAROSI Attila

Richter Gedeon Nyrt., Hatóanyag morfológiai osztály, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A polimorfia egzakt tudományos definíciója korántsem egyértelmű,¹ a leginkább elterjedt definíció szerint a polimorf módosulatok egy- vagy többkomponensű rendszerek lehetnek, de csak az azonos kémiai tartalommal rendelkező, kristályszerkezetében eltérő formákat tekintjük egymás polimorfjainak. A gyógyszeripari gyakorlatban, és jelen közleményben, a jelentést gyakran kibővítve, mintegy gyűjtőfogalomként használjuk, egy adott gyógyszervegyület különböző szilárd formáira utalva,² beleértve a vegyület szabályos polimorf módosulatait, különböző szolvátjait és hidrátjait (szolvatomorf formák), továbbá a vegyület amorf formáját, illetve újabban a kokristályait is. Közleményünkben áttekintést kívánunk nyújtani a polimorfia gyógyszeripari fontosságáról, a szilárdfázisú analitika szerepéről, a tervezett és robusztus kristályosítás jelentőségéről. A hatóanyagra fókuszálva mutatjuk be a polimorfia kutatási-fejlesztési tevékenységet a Richterben, melyet szemléletes példákkal illusztrálunk.

1.1. A polimorfia gyógyszeripari jelentősége

A polimorfia gyógyszeripari jelentősége két szempontból is kiemelendő: egyrészt a hatóanyag polimorfája a termék hatékonyságához és biztonságosságához kapcsolódó minőségügyi kérdés. A polimorfia technológiai és analitikai kontrollja ma már a gyógyszergyártás és minőségellenőrzés megkerülhetetlen részévé vált hatóanyag és készítmény szintén egyaránt. Másrészt, a különböző szilárd formák eltérő fizikai-kémiai sajátosságai miatt különbözőképpen lehetnek előnyösek a hatóanyag és a készítmény előállítására szempontjából, ezért termékszabadalmi oltalommal védhetők, ami iparjogvédelmi kérdés. A hatóanyag polimorf módosulatainak eltérő fizikai-kémiai sajátosságai (pl. olvadáspont, sűrűség, higroszkóposság, elektrosztatikus tulajdonságok, szemcseméret és habitus, folyási jellemző, tömörödési készség, tablettázhatóság, oldhatóság, oldódási sebesség, stb.) miatt a különböző szilárd formák fizikai és kémiai stabilitása, formulálási és egyéb technológiai viselkedése, továbbá kioldódása és biológiai hasznosíthatósága jelentősen különbözhet egymástól. A hatóanyagok polimorfája és az ahhoz kapcsolódó minőségügyi szempontok az 1960-as évektől kezdődően kerültek a kutatások fókuszába,³ azonban a kérdéskör gyógyszerhatósági kezelése és szabályozása csak a 2000-es évekre „kristályosodott ki”.^{2,4,5} Mindezt olyan esetek váltották ki, mint pl. az Abbott cég Ritonavir⁶ és a UCB gyógyszergyár Rotigotine⁷ készítményeinek minőségi problémái, amely végső soron a termék piacról való átmeneti kivonását, újrakezlesztését vonta maga után, a komoly gazdasági hatásról nem is beszélve.

A polimorfia az originális és generikus termékek esetében is meghatározó jelentőséggel bír az innováció, a szellemi

tulajdonjogok tekintetében, továbbá hatással van a termék életciklus menedzsmentjére is.⁸ A polimorfia kutatás napjainkra a piaci verseny egyik offenzív/defenzív stratégiai eszközévé vált, amit egyértelműen jelez a polimorfiai és kapcsolódó morfológiai szabadalmak számának töretlen növekedése. Az originátor egy jól időzített polimorfiai szabadalma a generikus versenytársak piacra lépését gátolhatja az alapszabadalom lejáratán és piaci exkluzivitási időn túl. A generikus gyártók ezért megpróbálnak saját innovatív só és/vagy polimorf formával szabadalmilag független úton előbb piacra kerülni. A gyártók közötti versenyben a polimorfia könnyen a szabadalmi jogviták színterévé válhat, amelyet a bitorlási perek egész sora kísérhet.⁹

1.2. Szilárdfázisú gyógyszeranalízis

A műszeres gyógyszeranalitikai vizsgálatok döntő többsége, a mérések számosságát tekintve, oldatfázisú mintából történik (HPLC, GC, CE, NMR, MS, titrimetria, ICP-OES, stb.). Talán kevésbé általánosan ismert, hogy a gyógyszeranalízisben számos olyan technikát alkalmazunk, amelyek a hatóanyag/segédanyag/készítmény szilárdfázisú jellemzőinek meghatározására irányulnak, ebből adódóan az analízis szilárdfázisú mintán történik. A hatóanyag szilárdfázisú jellemzőinek meghatározása, a polimorfia minőségi és mennyiségi analízise hatóanyagban és készítményben, a polimorf rendszerek stabilitási viszonyainak feltérképezése elképzelhetetlen korszerű szilárdfázisú analitikai háttér nélkül, amely számos analitikai technika és mérési módszer (1. táblázat) komplex alkalmazását követeli meg.^{10,11} A komplex szilárdfázisú analízis különösképpen hangsúlyossá válik összetett gyógyszerhordozó rendszerek, pl. nanokompozitok szerkezeti jellemzésében és viselkedésének megértésében, ami akár kisszögű röntgenszórás mérést is szükségessé tehet nemzetközi együttműködésben, szinkrotron állomáson. A bitorlás vagy függetlenség tényének bizonyítása szempontjából a szilárdfázisú analitikának szintén perdöntő szerepe van.

1.3. Sókiválasztás, polimorfiaszűrés, kokristályok

Az originális és generikus gyártók igyekeznek egy gyógyszervegyület minél több szilárd formáját felfedezni és jellemezni sókiválasztás, polimorfia- és kokristálysűrés keretében, az előnyös módosulatokat pedig megpróbálják szabadalmaztatni így teremtve versenyelőnyt maguknak. Az originális gyártók fontos feladata, hogy a klinikai jelölt vegyületnek a fejlesztésre legalkalmasabb szilárd formáját válasszák ki. Ez lehet a vegyület neutrális vagy só formája, kristályos vagy amorf, anhidrát vagy hidrát, esetleg kokristály formája.^{12,13} A kiválasztás szempontjából meghatározó jellemzők: a tervezett gyógyszerforma, az

* Tel.: 431-5922 ; fax: 432-6006 ; e-mail: a.demeter@richter.hu

1. Táblázat. Leggyakoribb szilárdfázisú analitikai módszerek a gyógyszerhatóanyagok analizisében

Technika	Módszer
Mikroszkópia	polarizált fény mikroszkópia, pásztázó (SEM) ill. transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), atomi erő mikroszkópia (AFM)
Termikus analízis	termogravimetria (TGA), differenciális pásztázó kalorimetria (DSC), modulált hőmérsékletű DSC, izotermális mikroklorimetria, fejlődő gáz analízis (TGA-MS, TGA-IR)
Diffrakció	egy kristály röntgendiffrakció (SCXRD), röntgen pordiffrakció (XRPD/PXRD), neutron pordiffrakció (NPD), kisszögű röntgen-szórás (SAXS)
Spektroszkópia	rezgési spektroszkópia (IR, RAMAN, NIR, terahertz), szilárdfázisú NMR spektroszkópia, termikusan stimulált áram spektroszkópia (TSC), dielektromos spektroszkópia
Szemcseméret analízis	mikroszkópos képanalízis, szitaanalízis, lézerdiffrakciós szemcseméret-meghatározás, fényszórásos szemcseméret-meghatározás
Kémiai térképezés	IR/ diszperzív Raman / NIR, mikro röntgenfluoreszcencia
Képkötés	NIR, terahertz pulsed imaging, röntgen mikrotomográfia
Egyéb technikák	dinamikus gőzszorpció, inverz gázkromatográfia, dinamikus mechanikus analízis, porozimetria, fajlagos felület gázadszorpció vizsgálata
Kapcsolt technikák	fűthető tárgyasztal (HS-XRPD, HS-IR/Raman/NIR), változtatható páratér (VH-XRPD, VH-IR/RAMAN/NIR)

alkalmazás módja, a hatóanyag sav-bázis tulajdonságai, lipofilitása, oldhatósági profilja, farmakokinetikai viselkedése, a szilárd forma fizikai és kémiai stabilitása, termikus jellemzői, szorpció viselkedése, kompatibilitása segédanyagokkal, technológiai jellemzői (habitus, szemcseméret, szűrési, folyási tulajdonságok, apríthatóság) továbbá az előállítás technológiai reproduktibilitása és kontrollja. A screening fázisban a szilárd formák előállításának leghatékonyabb megoldása a nagy áteresztőképességű kristályosítás (High-Throughput Crystallization, HTC), amely a kristályosítás paraméterterében (oldószer, hőmérséklet, koncentráció, stb.) nagyszámú kísérletet végez el plate-en szubmikrogrammos anyagigénnyel.¹⁴ Hátránya viszont, hogy számos esetben produkál metastabil formákat, amelyek későbbi méretnövelés során nem reprodukálhatóak. Az adott közegben és hőmérsékleten termodinamikailag legstabilabb forma megtalálásának leghatékonyabb módja a szuszpenzióban végzett hosszú idejű (hetek, hónapok) kevertetés, amely végeredményben egy stabilabb polimorf, esetleg hidrát, vagy szolvát forma megjelenéséhez vezethet.

1.4. Kristályosítás

A hatóanyagokat szilárd formában leginkább kristályosítással állítjuk elő, mely az egyik leggyakrabban alkalmazott tisztítási művelet a gyógyszeriparban. A kristályosítás módja kritikus lehet az izolálhatóság, a kémiai tisztaság, a kihozatal és a gazdaságos gyártás szempontjából. Mindezen túl a kristályosításnak robusztus módon kell biztosítania a megfelelő kristályformát, a szemcsék kívánt habitusát és szemcseméreteloszlását, amelyek a szilárd gyógyszerformák előállítása szempontjából kritikus minőségi paraméterek (CQA, Critical Quality Attribute).

A kristályosítás egyszerre mérnöki tudomány¹⁵ és művészet. Mérnöki tudomány, aminek alapja az oldhatósági viszonyok, a fázisdiagramok, fázisegyensúlyok valamint, a kristályosodás metastabil zónájának, a gócképződésre (primer és szekunder, homogén és heterogén nukleáció) és növekedésre ható kritikus faktorok ismerete, a kristályosítási technikák (reaktív, hűtéses, kicsapásos, bepárlásos, olvadákból történő kristályosítás, stb.) és azokat megvalósító ipari készülékek megfelelő alkalmazása. Művészet abban a tekintetben, hogy egy új módosulat megtalálása, egy kevésbé

tiszta anyag kristályosodásra bírása, az olajosodás és amorf leválás elkerülése igényel egyfajta ráérzést, gyakorlatot, ami inkább művészet, mint tudomány. Továbbá művészet abban a tekintetben is, hogy a mikroszkóp tárgyasztalán varázslatos formájú és színvilágú művészi hatást keltő kristályformák keletkezhetnek. A kristályosítás technológiájának kidolgozása és optimalizálása először laboratóriumban grammos méretben történik, de félüzemben kilogrammos, végül üzemi méretben (több száz kg) is megbízhatóan robusztusnak kell lennie. A kémiai tisztaság, kihozatal, kristályforma, habitus, és a szemcseméret minőségi követelményeknek (CQA) való megfeleléshez ismerni és optimalizálni kell a kristályosítási folyamat kritikus paramétereit (CPP, Critical Process Parameters), meg kell határozni a folyamat ún. tervezési terét (DS, Design Space) amelynek legbiztosabb és leghatékonyabb módja kísérlettervezés (DoE, Design of Experiments). A hatékony kísérlettervezést nagyban segíti az in-line mérőszondák alkalmazása, amelyekkel mintegy „belelátva” a reaktorba, a kristályosodási folyamat mélyebb megértéséhez jutunk. Mindez lehetővé teszi a kristályok és a kristályosítás minőségi tervezését (Crystallization by Design).

2. Polimorfiakutatás a Richterben

A morfológiai vizsgálatok kezdete a Richterben az 1970-es évekre nyúlik vissza. A tevékenység az 1980-as évektől kezdődően vált a K+F integráns részévé. Az időszak talán legfontosabb eredményét a famotidin tiszta A és B módosulatainak felfedezése és a vonatkozó szabadalom jelentik.¹⁶ 1981-ben alakult meg a Morfológiai és Biofarmáciai Csoport a készítményfejlesztési területen, ahol 1988-ban került beszerzésre az első Philips röntgen-pordiffrakciós készülék. A 90-es évektől a hatóanyagok polimorfijára és kristályosítása egyre nagyobb hangsúlyt kapott, ezért megkezdődött a tevékenység műveléséhez szükséges eszközpark kialakítása a hatóanyagfejlesztési területen is. A kristályosítás kutatásában és technológiai fejlesztésében jelentős előrelépést jelentett az 1998-ban beszerzett Mettler-Toledo LabMax laboratóriumi reaktor. 2000-től önálló szervezeti keretek között a Hatóanyag morfológiai csoportban folytatódott a hatóanyagok polimorfiakutatói, kristályosítási és szilárdfázisú analitikai tevékenysége. 2002-

ben a készítményfejlesztésen megalakult a Gyógyszerfizikai osztály, ahol a preformulációs vizsgálatokhoz, a különböző gyógyszerformákkal kapcsolatos morfológiai kérdésekre fókuszálnak, valamint a készítményfejlesztéshez kapcsolódóan végeznek kioldódásvizsgálatokat. Az 1990-es évek végétől kezdődött az originális kutatási projektekből preklinikai fejlesztésre jelölt ún. RGH-számos vegyületek célzott polimorfiaszűrése és sókiválasztási folyamata. Az új originális kihívások és a generikus fejlesztésekben egyre nehezedő morfológiai szabadalmi helyzet, valamint a hatósági követelmények szigorodása miatt a terület műszeres és személyi megerősítése vált szükségessé. 2006-ban megalakult a Hatóanyag morfológiai osztály (HMO), amely komplex módon képes a hatóanyagok morfológiai és polimorfiai jellemzőivel kapcsolatos iparjogvédelmi, minőségügyi, kristályosítási és szilárdfázisú analitikai kérdések megoldására.

2.1. Hatóanyag morfológiai osztály feladatai

A HMO speciális műszerparkjával kiterjedt szilárdfázisú analitikai és kristályosítási tevékenységet végez, amely a kutatás, a fejlesztés, a gyártás és a minőségbiztosítás során felvetődő, a hatóanyagok és részben a készítmények morfológiai jellemzőihez köthető kérdések megválaszolását támogatja. Tevékenysége széles spektrumot fog át mind szakmai tekintetben (komplex szilárdfázisú analitika, só- és polimorfiaszűrés, kristályosítási eljárások fejlesztése), mind pedig a Richter tevékenységi köréhez kapcsolódóan. Egy K+F téma morfológiai vetülete az iparjogvédelmi helyzetértékelésétől kezdődően, a laboratóriumi, félüzemi eljárásfejlesztésen keresztül az üzemi validációs fázisig, majd az azt követő törzskönyvi adatszolgáltatásig és hatósági válaszadásig tart. Az osztály termoanalitikai tevékenysége, pl. az illékony komponensek, az olvadáspont, bomlási hőmérséklet, a fázisátalakulások meghatározása a hatóanyag, üzemi intermedierek, bomlástermek és egyéb standardok minősítésében, továbbá laboratóriumi K+F minták termikus jellemzésében elengedhetetlen. Üzemi technológia problémáknál, OOS (Out of Specification) kivizsgálásokban a gyökérokok azonosításában gyakran merül fel, hogy a probléma háttérében esetleg valamilyen morfológiai jellegű eltérés áll. Ilyen esetekben a kivizsgálási folyamatban veszünk részt különböző mérésekkel, vagy végzünk kristályosítási kísérleteket. Kiemelt jelentősége van a Richter originális kutatásából fejlesztésre jelölt klinikai kandidátus molekulák (RGH számos vegyületek) sókiválasztási és polimorfiaszűrési folyamatának. Ebben a HMO intenzív preparatív tevékenységet végez, az előállt szilárd formák analitikai és fizikai-kémiai jellemzését, valamint a társosztályokkal közösen a fejlesztésre alkalmas szilárd forma kiválasztását, szabadalmi jellemzését végzi.¹⁷ Számos esetben van szükség polimorf keverékek mennyiségi analízisére alkalmas módszerek fejlesztésére, bizonyos minőségi vagy iparjogvédelmi szempontok szerint a módszer validálására és átadására a minőségellenőrző laboratóriumok felé.¹⁸⁻²⁰ A Készítményfejlesztési főosztály Gyógyszerfizikai osztályával együttműködésben végezzük a referens készítmények analízisét, ahol a hatóanyag polimorf módosulatának és szemcseméret eloszlásának meghatározása a kristályosítási eljárásfejlesztés kiindulópontjává szolgál. A kristályosítási eljárások kidolgozásában és optimalizálásában, üzemelésében is aktívan részt vállal a HMO. Mindez

a centralizált tevékenység elképzelhetetlen lenne egy kiváló felkészültséggel rendelkező hatékony csapat nélkül. Hiszen egyszerre kell szilárdfázisú analitikai tudással és gondolkodással rendelkezni, a sokféle műszert mikroszkópi precizitással használni, az eredményeket komplex módon értékelni. Értetni kell az iparjogvédelmi és törzskönyvezési folyamatokat és elvárásokat, innovatívnak kell lenni a polimorfia kutatásban, és mérnöki gondolkodással kell megalkotni egy kristályosítási eljárást, ami üzemi körülmények között is az elvárt polimorfit adja a kívánt habitussal és szemcseméret eloszlásban. A HMO csapata mindezen feladatoknak egyszerre kell, hogy megfeleljen, ami komoly kihívást és leterheltséget jelent, de egyben biztosítja a munka változatosságát és sokszínűségét, az állandó szakmai fejlődés lehetőségét.

2.2. Hatóanyag morfológiai osztály eszközparkja

A HMO spektroszkópiai méréseire Nicolet 6700 FT-IR, Nicolet NXR-9650 FT-Raman és 1.6, 3.2 és 5.0MM MAS mérőfejekkel felszerelt Varian NMR 600 MHz szilárdfázisú NMR készülék áll rendelkezésre. A morfológiai vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen röntgendiffrakciós felvételeket PANanalytical X'Pert PRO MPD diffraktométerrel, transzmissziós vagy reflexiós mintatartóban készítjük. A szemcseméret meghatározáshoz száraz (RODOS/M) vagy nedves (CUVETTE) diszpergálású módszereket fejlesztünk a Sympatec HELOS/BF lézerdiffrakciós készüléken. A mikroszkópos elemzésre Carl Zeiss Axio Imager M2 fénymikroszkóp ad lehetőséget. A termoanalitikai méréseket TA Instruments TGA Q5000 IR és Q50 termogravimetriás készüléken, valamint TA Instruments DSC Q1000 és Q10 differenciális pásztázó kaloriméterekkel végezzük. A hőmérsékletfüggő vizsgálatokra a Linkam fűthető tárgyasztallal végzett mikroszkópos vagy IR/Raman vizsgálat, illetve a fűthető tárgyasztalú XRPD használható. A kristályosítási technológiai fejlesztést Mettler-Toledo EasyMax 100 ml-es reaktorokban, valamint RC1e reakciókaloriméter 0,5 l és 2 l-es reaktorokban végezzük.

3. Esettanulmányok

Az alábbiakban szemléletes példákon keresztül adunk ízelítőt az előzőekben tárgyalt tevékenységekről.

3.1. Iparjogvédelmi tevékenység

A distroncium-ranelát (továbbiakban stroncium-ranelát) csontritkulás kezelésére használt hatóanyag.²¹ A hatóanyag 1989-es elsőbbségű kémiai alapszabadalma²² a sav kétértékű fémionokkal (stroncium, kalcium, magnézium) alkotott sóit és azok hidrátjait, ezen belül a distroncium-ranelát okta-, hepta- és tetrahidrát formáját védi. Az originátor 2004-es elsőbbséggel utalnom alá helyezte a stroncium-ranelát α kristályformáját, az igénypontban röntgen-pordiffrakciós (XRPD, *X-ray Powder Diffraction*) jellemzést és víztartalmat adott meg.²³ A szabadalom amerikai és eurázsiai ekvivalensének igénypontjában 22-24% víztartalom szerepel, mely 8,1-9 mol sztöchiometrikus víznek felel meg. Az európai szabadalom a víztartalmat 24%-ra korlátozta az igénypontban, ezáltal szigorúan véve nonahidráttal véd. Az originátor Protelos 2 g készítményéről az EMA (European Medicinal Agency) honlapján található ún. Scientific Discussion-ben is nonahidráttal formát nevesítenek

aktív hatóanyagként. Egykristály röntgendiffrakciós vizsgálatok szerint a stroncium-ranelát elemi cellájában két ranelinsav distroncium sója található ($Z=2$) közel nonahidrát összetétellel: $[\text{Sr}_2(\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{S})(\text{H}_2\text{O})_5] \times 3,8 \text{ H}_2\text{O}$.²⁴

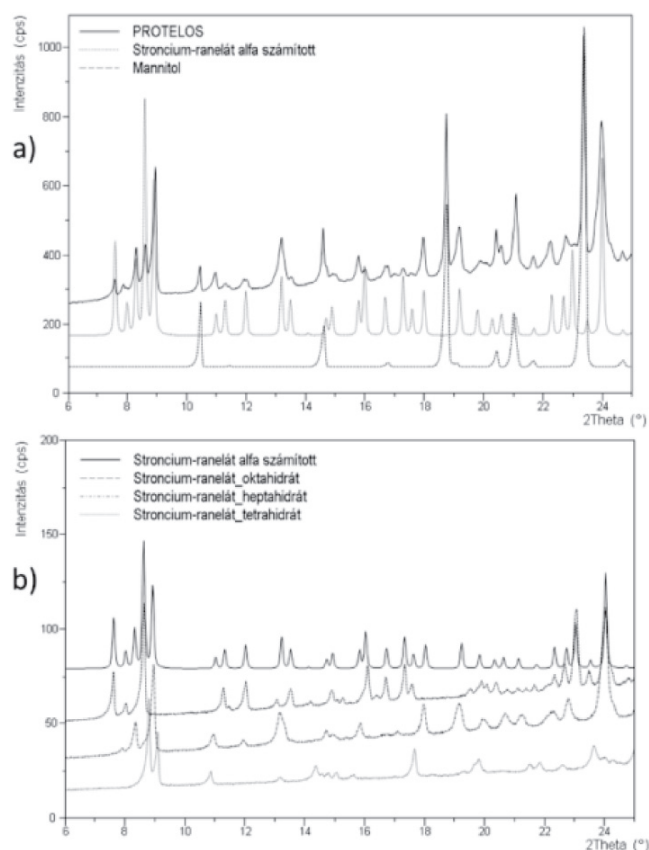
A fejlesztés kezdetén a referens készítményt (Protelos 2 g granulátum) vizsgáltuk. A szabadalom igénypontjában megadott XRPD csúcspozíció és relatív csúcsintenzitások alapján szimulált diffraktogramot hasonlítottuk a készítmény mért diffraktogramjához (1.a ábra). Az α kristályforma egyértelműen azonosítható a készítményben. Mivel az α forma az alapszabadalom lejárata után is oltalom alatt állt, ezért kerülése tűnt indokoltnak. A fejlesztés során tiszta fázisként előállítottunk nona-, hepta- és tetrahidrátoknak megfelelő víztartalmú kristályformákat. Az oktahidrátoknak megfelelő víztartalmú anyag minden esetben a nona- és heptahidrát fázisok keverékének adódott XRPD alapján. A referencia módosulatok alapján egyértelművé vált, hogy az alfa kristályforma valójában szintén a nonahidrát/heptahidrát fázisok keveréke, tehát nem önállóan létező módosulat (1.b ábra). Továbbá dinamikus gőzszorpciós vizsgálatokkal a vegyületről az is megállapítható volt, hogy a heptahidrát és nonahidrát állapotok a környezeti páratartalomtól függően könnyen egymásba alakulhatnak. A fenti információk alapvetően fontosak voltak a szabadalmilag független fejlesztési stratégia megalkotásában.

3.2. Sókiválasztás, polimorfiaszűrés

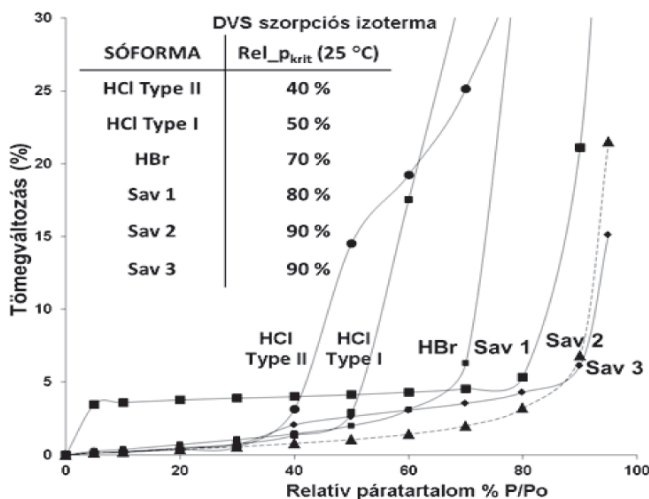
Egy fejlesztett hatóanyag esetében sókiválasztási tevékenységet indítottunk, mivel a HCl só (Type I) erősen higroszkóposnak bizonyult (2. ábra). Már a kristályosítási folyamatban is olajosodás volt jellemző, a szűrés során pedig elfolyósodott az anyag. Ezért elsődleges cél volt egy nem higroszkópos, előnyösen legalább 80-90 % relatív páratartalomig stabil sóforma előállítása, amiben a DVS szorpciós vizsgálatoknak kitüntetett szerepük volt. A sóképzési kísérletekben először a HCl sóból igyekeztünk eltérő polimorf módosulatot előállítani, abban a reményben, hogy másik HCl módosulat nem lesz higroszkópos. Sajnos azonban az előállított új Type II HCl még inkább higroszkópos volt. Ezért újabb sókat készítettünk, melyek közül sikerült megfelelő fizikai stabilitású sóformát ($p_{\text{krit}} > 90\% \text{ RH}$) találni (2. ábra), ami egyéb szempontok (megfelelő stabilitás, jól tisztul, jó termeléssel reprodukálhatóan előállítható) alapján is fejlesztésre alkalmasnak bizonyult.

3.3. Szilárdfázisú analízis: termoanalitikai vizsgálat

Ebben a példában egy szteroid vegyület intermedierjének, amely a 6-os pozícióban exociklusos kettőskötést tartalmaz, termikus analízis eredményeit mutatjuk be. A vegyület illékony komponens meghatározása céljából érkezett az osztályra, intermedier standard minősítéséhez. A 3. ábra felső részén láthatók a vegyület termogravimetriás (TG), derivált TG (DTG) és differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) görbéi. A TG görbén látható, hogy a vegyület 150 és 180 °C között 0,2%-os, jól elkülönülő, éles tömegvesztési lépcsőt mutat, amely során a tömegcsökkenés a maximális sebességét 167 °C körül éri el (ld. DTG görbe), majd kb. 227 °C felett újra felgyorsul a tömegvesztés, feltehetően az anyag párolgásához/bomlásához köthetően. A TG görbét vizsgálva felmerült a gyanú, hogy a 150-180 °C közötti tartományban tapasztalt tömegcsökkenés esetleg zárvány



1. Ábra. a) A Protelos készítmény röntgen-pordiffrakciós felvétele összehasonlítva a EP 1642897 B1 szabadalom alfa kristályformára megadott adatokból számított diffraktogrammal, valamint a mannit segédanyag felvételével (fentről lefelé). b) Az α forma számított diffraktogramja összehasonlítva a nonahidrát, heptahidrát és tetrahidrát referencia módosulatok felvételével (fentről lefelé).



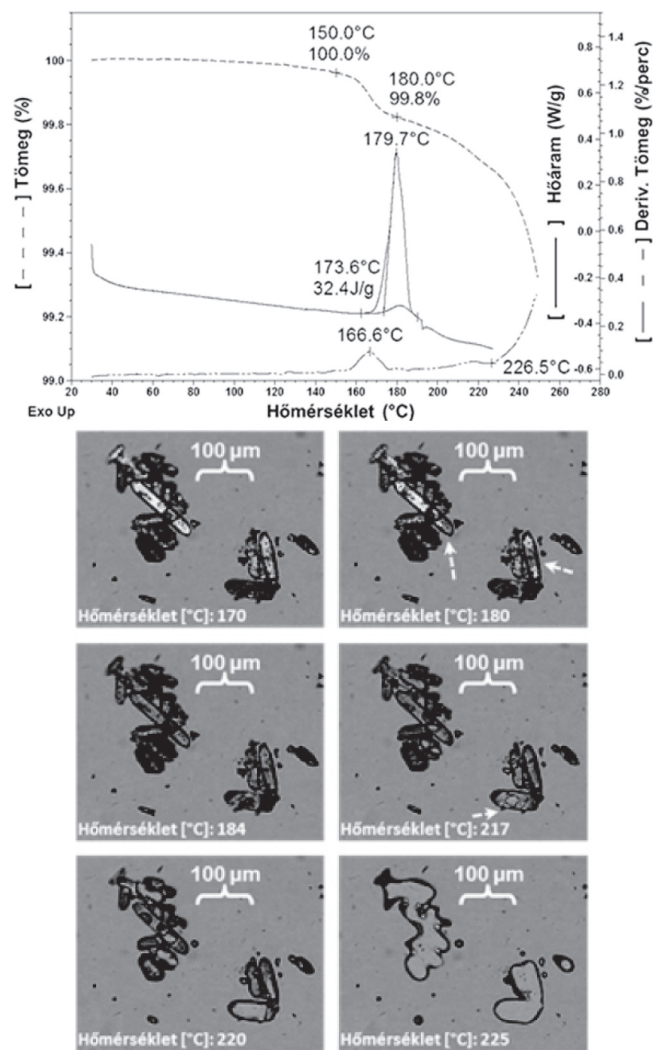
2. Ábra. A sókiválasztási folyamatban előállított különböző sóformák DVS szorpciós izotermái 25 °C-on. Az egyes sók kritikus relatív páratartalom ($\text{Rel}_p_{\text{krit}}$) értékeit, amely felett már higroszkópos a vegyület táblázatban tüntettük fel.

oldószer távozásához köthető, ezért DSC felvételt is készítettünk. A DSC görbén azt láthatjuk, hogy a tömegvesztési lépcsővel párhuzamosan, 170 °C felett egy éles exoterm csúcs jelenik meg. Ezt követően 230 °C-ig a DSC görbén más hőeffektus nem figyelhető meg;

az anyag termogramján olvadási endoterm nem látható. Ezek alapján az exoterm folyamat kétféle értelmezése kézenfekvő. Egyik lehetőség, hogy polimorf átalakulás történik (pl. kevésbé stabil polimorf átalakulása monotróp rendszer esetén a stabilabb formává), ez esetben még mindig számolhatunk zárványoldószer távozásával is. A másik lehetőség, hogy termokémiai reakció történik (pl. bomlás), mely esetben a tömegvesztés nem bizonylatolandó. A folyamat értelmezéséhez támogató termomikroszkópos vizsgálatot is végeztünk. A 3. ábra alsó részén látható polarizációs mikroszkópos képeket a mintáról fűthető tárgyasztal segítségével készült vizsgálat során nyertük. A mikroszkópi fotókon jól látható, hogy a vizsgált vegyület kristályai 170 °C-on egyértelműen egy kristályos anyag jelenlétét mutatják: kettőtörésük miatt a háttérnél sokkal fényesebbek és attól különböző színt is mutatnak polarizált fényben. A 180 °C-on készült fotón már látszik (ld. az ábrán fehér nyilakkal jelölve), hogy a kristályok szerkezetében valamilyen változás kezdődött meg, a szemcsék kezdik elveszíteni a kettőtörésüket, azonban az alakjuk változatlan. A 184 °C-os hőmérsékletet elérve a változás teljesen lezajlott, és a szemcsék – változatlan alak mellett – teljesen elvesztették a kettőtörésüket: a háttérrel megegyező (szürke) színt mutatnak. A jelenség azt jelzi, hogy a kristály átalakult, ez lehet makroszkopikus roncsolódás nélküli oldószeresztés/bomlás vagy fázisátalakulás is. A DSC exoterm csúcsa és a kettőtörés elvesztése inkább bomlási folyamatra utal. A szemcsék ezt követően 217 °C-ig nem mutatnak változást, amikor az ábra legalsó kristályában láthatóan elkezd kialakulni egy folyadéksepp (ld. fehér nyíl); megindul a minta átmenete folyékony (olvadék) állapotba. Ennek során 220 °C-nál a szemcsék lekerekedését tapasztaljuk, majd a 225 °C-os fotón már egyértelműen egy folyadék képe tárul a szemünk elé. A társosztálytól kapott reaktivitási információkat a fentiekkel összevetve a folyamat jól értelmezhetővé vált: a vegyület a 6-es pozícióban található exociklusos kettőskötés miatt dimerizációra hajlamos, amely reakcióhoz kötetően hidrogént veszít. A mért 0,2%-os tömegvesztés összhangban van a folyamathoz rendelhető kb. 0,3%-os elméleti tömegvesztéssel. Tehát a 150-185 °C körül lezajló termokémiai folyamatban az anyag kristályrácsa felbomlik, ezt mutatják a termomikroszkópos fotók, ahol az átalakulás során a kristályok anizotrópiája megszűnik. Ezt követően az anyag 217 és 225 °C között folyékony állapotba kerül, amihez nem tartozik olvadási endoterm, mivel a kémiai bomlás következtében a jól definiált kristályszerkezet már megbomlott. Végül az olvadék párolgása/bomlása okozza a TG/DTG görbén 227 °C felett elinduló gyorsuló ütemű tömegvesztést.

3.4. Szilárdfázisú analízis: kristályos fázisok mennyiségi meghatározása

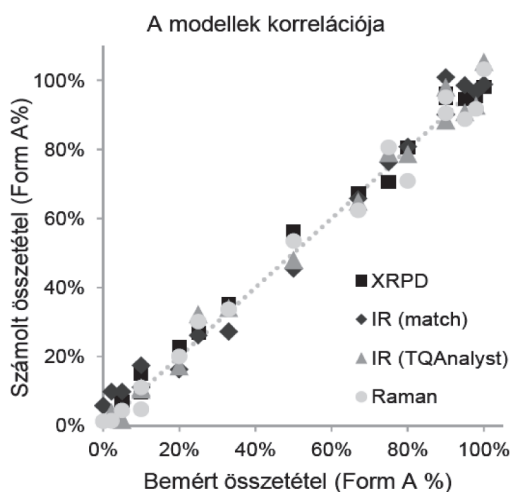
Egy generikus hatóanyag kristályosítási eljárásának vizsgálata azt mutatta, hogy a kristályforma keletkezése kinetikai hatások által kontrollált folyamat. A kristályosodás során, a gócképződés megindulásakor Form A (hidrát) vagy Form C (szolvát) módosulat keletkezik, ami a kristályosodás végére vagy az egyik tiszta módosulatot, vagy a két forma fizikai keverékét eredményezte. A kristályforma kialakulására ható kritikus folyamatparaméterek azonosításához kvantitatív módszert fejlesztettünk a keverékek összetételének meghatározására. Háromféle mérési módszer (IR, Raman és



3. Ábra. A dimerizációra hajlamos szteroid típusú vegyület TG, DTG, ill. DSC görbéi az ábra felső részén láthatók, rendre szaggatott, kettős szaggatott, ill. sima vonallal jelölve. Az ábra alsó része a minta termomikroszkópos vizsgálata során polarizált fényben készült fotókat mutatja be.

XRPD) eredményeit hasonlítottuk össze kvalitatív és kvantitatív szempontok alapján. Mindhárom módszert ismert összetételű porkeverékekkel kalibráltuk ($R^2 \sim 3-4\%$), és ezekről független, ismert összetételű mintákkal validáltuk (RMSEP $\sim 4\%$), valamint 90%-os keverékeken meghatároztuk a kimutatási határukat (DL $\sim 10\%$ a Form C módosulatra). A két módosulat legjobban röntgen-pordiffraktogramjuk alapján különböztethető meg. A diffraktogramokon jól elkülönülő csúcsokkal azonosítható a módosulatok jelenléte. Ugyanakkor, a Form C módosulat változó oldószer tartalma kismértékű eltérést okoz a csúcspozíciókban és relatív csúcsintenzitásokban, ami a kvantitatív meghatározás bizonytalanságát növeli. A mennyiségi meghatározáshoz a PANalytical HighScore Plus szoftver AutoScaler modulját használtuk megfelelő referencia diffraktogramokkal. A program által becsült fázisösszetételt kalibráltuk az ismert összetételű porkeverékeken (RMSEC – Root Mean Square Error of Calibration: a kalibráció négyzetes középérték hibája – 3,2%, RMSEP – Root Mean Square Error of Prediction: a predikció négyzetes középérték hibája – 3,5%). Az optikai spektroszkópiai módszereknél a Form C oldószer tartalom

változása nem okoz különbséget a spektrumban. Ugyanakkor a két módosulat felvétele nagyon hasonló, elsősorban intenzitásbeli különbségek alapján különböztethetők meg. Ennek ellenére a kvantitatív kemometriai módszerek mindkét mérési módszer esetében jól kalibrálhatóknak bizonyultak, a legjobb eredményeket PLS (Partial Least-Squares: részleges legkisebb négyzetek módszere) alapú modellekkel érték el (RMSEC 4,0% ill. 4,1%, RMSEP 3,7 ill. 4,0%). Így a kifejlesztett FT-IR módszer gyors rutinmódszer keverékek összetételének becslésére, míg az FT-Raman spektrumok értékelése készítmények esetében kerülhet előtérbe. A három módszer által adott eredmények hibahatáron belül egyeznek egymással a kalibráló sor elemeire és ismeretlen összetételű labormintákra egyaránt (4. ábra).

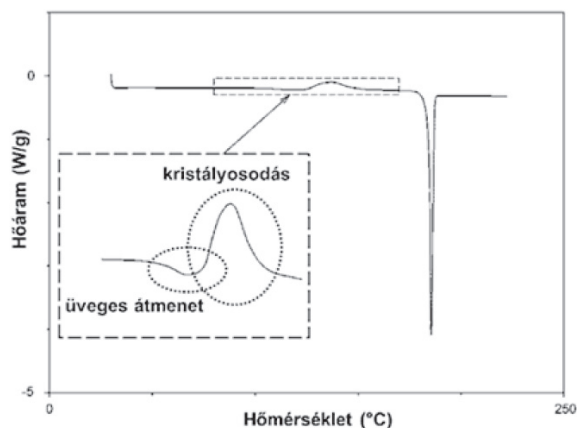


4. Ábra. A kvantitatív meghatározási módszerek korrelációja a kalibráló és validáló keverékekre.

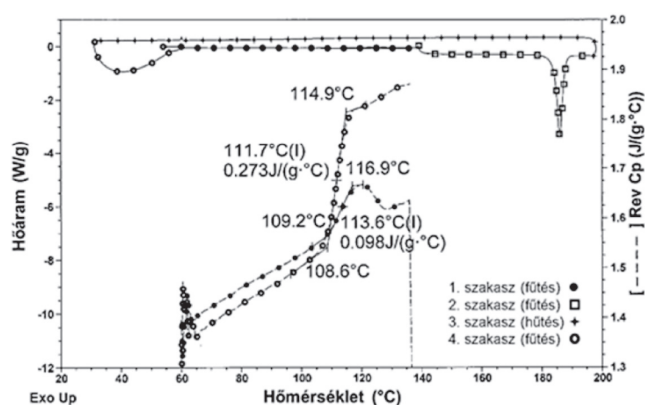
3.5. Szilárdfázisú analízis: amorf hányad mennyiségi meghatározása

A mennyiségi meghatározás lényegesen nehezebb kristályos és amorf fázisok keveréke esetén, mivel az amorf forma a spektrumokban jelentős csúcsszélesedést okoz, míg a diffraktogramban háttérként jelentkezik, ami specifikussági és érzékenységi korlátot is jelent. Azonban a hőmérséklet-modulált DSC (MDSC) technika, egy hőstabil hatóanyag kristályos-amorf hányadának meghatározására egyszerű rutin megoldást nyújthat, ami nem igényel nehezen előállítható kalibrációs keverékeket, ill. referencia fázisokat. A módszert egy amorf fázist is tartalmazó kristályos vegyület példáján mutatjuk be; ennek DSC görbáját a 5. ábra mutatja, ahol kb. 110 °C-nál az amorf fázis üveges átmenete figyelhető meg (hőkapacitás-változás miatti alapvonal eltolódás), majd ez után a jelenlévő kristályos fázis göcképző hatására az olvadék kristályosodni kezd, melynek exoterm hőárama nem válik el teljesen az előtte bekövetkező folyamatból. Végül, kb. 190 °C körül a kristályos fázis megolvad.

A modulált DSC technika²⁵ lehetővé teszi az átlapoló termikus folyamatok, így pl. az üveges átmenet és kristályosodás szétválasztását,²⁶ amivel lehetőség nyílik az amorf hányad *in situ* meghatározására. A 6. ábrán látható MDSC termogramok közül a felső a mért teljes hőáramot mutatja, amelyen az alkalmazott mérési módszer látható ciklusokra bontva. A modulált DSC technika²⁵ lehetővé



5. Ábra. A részlegesen amorf vegyület DSC termogramja, melynél az amorf hányad üveges átmenete átlapol az olvadékból történő kristályosodással.



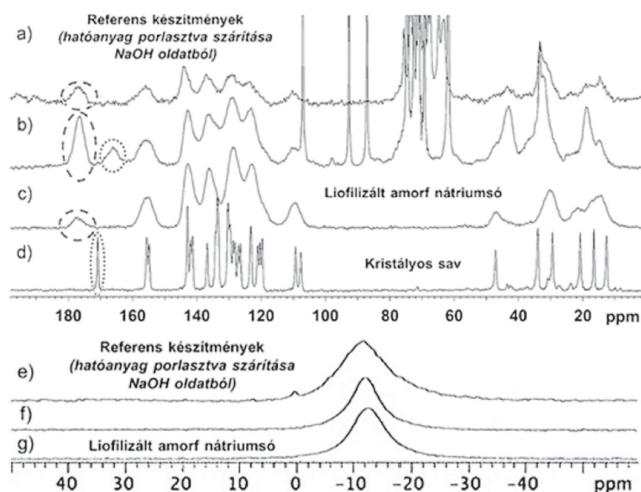
6. Ábra. A részlegesen amorf vegyület MDSC termogramja a mért teljes hőáram-jel (az ábra felső részén) és a mért reverzibilis hőkapacitás-jel (az ábra alsó részén) feltűntetésével. A görbéken látható szimbólumok a mérés különböző szakaszait jelölik: az első és a negyedik szakaszban hőmérséklet-moduláció mellett, lassú ütemű felfűtés történt; a második szakasz egy gyors ütemű normál felfűtést, a harmadik szakasz pedig egy még gyorsabb ütemű lehűtést (ún. „quench-cooling”) jelöl, amelynek során az anyag olvadékát túlhűtjük és az üveges állapotba kerül.

teszi az átlapoló termikus folyamatok, így pl. az üveges átmenet és kristályosodás szétválasztását,²⁶ amivel lehetőség nyílik az amorf hányad *in situ* meghatározására. A 6. ábrán látható MDSC termogramok közül a felső a mért teljes hőáramot mutatja, amelyen az alkalmazott mérési módszer látható ciklusokra bontva. Az ábra alsó részén látható két görberészlet a reverzibilis hőkapacitás jelet mutatja a fűtési program két szakaszában. A mért hőkapacitás-változás arányos az átmenet által érintett (amorf) anyag mennyiségével, így amorf-kristályos keverék esetén nagysága felhasználható az amorf hányad meghatározására. A bemutatott példában a kísérletet négy szakaszra osztottuk. Az első, az ábrán teli fekete karikákkal jelölt szakaszon a mintát kb. 60 °C-ról 135 °C-ig fűtöttük fel, hőmérséklet-moduláció mellett, amely során az amorf fázis ~109 és 117 °C között, üveges átmenetben megfolyt. Ezt követte a második (az ábrán üres négyzetekkel jelölt) szakasz, ahol a felfűtés – moduláció nélkül – tovább zajlott kb. 195 °C-ig, és ennek során a minta teljes tömege megolvadt. Ezt az olvadékot a harmadik (az ábrán csillagokkal jelölt) szakaszban nagy sebességgel lehűtöttük, így az anyag teljes tömege üveges

(amorf) állapotba került. A negyedik szakaszban – amelyet az ábrán üres körök jelölnek – ismételten modulálva felfűtöttük, kb. 135 °C-ig, ennek során ~109 és 115 °C között már a minta teljes mennyisége megfolyt. Az anyag amorf hányadát az első és a negyedik fűtés során az üveges átmenet szakaszára kimért hőkapacitás-változás értékek aránya adja meg, amely a bemutatott példában 36% körüli.

3.6. Szilárdfázisú analízis: készítmény vizsgálata

Készítmények vizsgálata és az amorf állapotú hatóanyagok szilárdfázisú analitikája két olyan terület, ahol a szilárdfázisú mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia alkalmazása szelektivitása miatt előnyösebb lehet más technikákkal szemben.²⁷



7. Ábra. A vizsgált vegyület szilárdfázisú NMR spektrumai. Az ábra felső része a ^{13}C CP/MAS spektrumokat mutatja, az anyag lúgos oldatából a segédanyagokra történő porlasztást követően formulált referens készítményekét (originátor tabletta a, licencadó tabletta b), a vegyület NaOH oldatból előállított liofilizált amorf nátriumsóját (c) és a tiszta, kristályos savét (d). A hatóanyag karboxilcsoportjának jelét protonált, ill. deprotonált formájában pontozott, ill. szaggatott ellipszis jelöli. Az ábra alsó részén referens készítményeknek (e, f), ill. az anyag NaOH oldatból előállított liofilizált amorf nátriumsójának (g) a ^{23}Na MAS szilárdfázisú NMR spektrumai láthatók.

Következő példánkban gyenge sav típusú hatóanyagot tartalmazó licenc készítményeket vizsgáltunk, ahol feladatunk a hatóanyag polimorf módosulatának azonosítása volt a tablettában. A vizsgálatokhoz a licencadó referens kristályos hatóanyagot (sav), valamint az originátor referens termékét is mellékelte. A referens termék segédanyagai povidone (K25), meglumine, nátrium-hidroxid, szorbitol (E420), magnézium-sztearát. A licencadó készítményében továbbá részben térhálósított PVP (crospovidon), valamint szorbitol helyett laktóz-monohidrát található. A referens készítmények alkalmazási előírataiban a hatóanyag savként van feltüntetve. A 110 ppm feletti tartományban a tabletták segédanyagai közül csak a K-25 típusú polivinil-pirrolidont (PVP) és a magnézium-sztearát, illetve a 7. ábrán b)-vel jelölt licencadó tablettában lévő a crospovidon ad jelet. A sztearát karboxilát csúcsa 180 ppm felett várható (kis intenzitású, nem detektálható), míg a PVP-k jelének eltolódása 175 ppm. Az elporított készítményekről felvett ^{13}C CP/MAS NMR spektrumokat összevetve a tiszta kristályos sav spektrumával (ld. 7. ábra a), b), ill. d) spektruma) megállapítható, hogy a

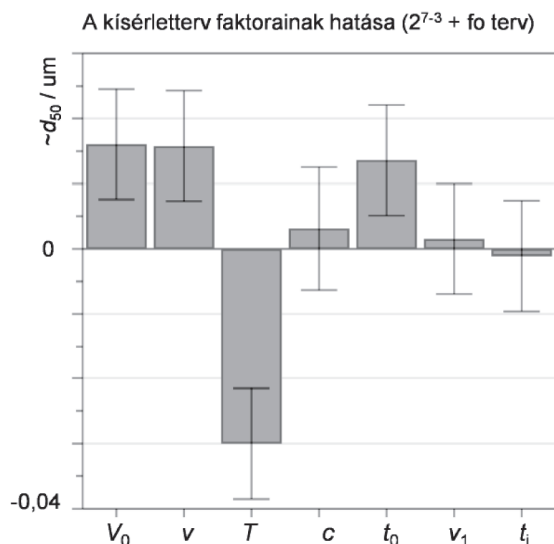
spektrum 110 és 170 ppm közötti tartománya a hatóanyag jeleire szelektív. Látható, hogy a hatóanyag jelei a kristályos sav referenciához képest jelentősen kiszélesedtek, azaz a vegyület a készítményben amorf formában van jelen. Ezen felül a hatóanyag karboxilcsoportja a készítményekben 6 ppm-mel nagyobb eltolódásnál van, mint a szabad savban (az ábrán b)-vel jelölt készítményben egy második, kisebb intenzitású jel is detektálható, ~166 ppm, eltolódásnál).

A továbbiakban informálódunk a készítmény gyártási technológiájáról, amely alapján a kristályos hatóanyagot NaOH-os oldatból juttatják a tabletta segédanyagaira. Összehasonlítás céljából NaOH oldatból liofilizálással előállítottuk a vegyület amorf nátriumsóját is. A ^{13}C CP/MAS NMR spektrumban az amorf nátriumsó jelei a készítményekben mért csúcsokkal megegyező pozíciókban voltak detektálhatók, azaz a 177 ppm körüli csúcs valóban az amorf nátriumsó karboxilátcsoportjának ^{13}C jele (ami a PVP segédanyagok jelével együtt jelentkezik). A 166 ppm körüli csúcs a szabad amorf sav karboxilcsoportjának jele lehet, tehát az ábrán a)-val jelölt készítmény csak az amorf nátriumsót, míg a b) jelű készítmény a sót és vélhetően a savat egyaránt tartalmazza amorf formában. Mindezt megerősítették a 7. ábra alsó részén látható ^{23}Na MAS spektrumok is. Az ábrán látható, hogy az amorf nátriumsó és a referens készítmények spektrumában megfigyelhető a -12 ppm eltolódású nátrium jel, ami alátámasztja, hogy a készítményekben a hatóanyag (legalább részben) amorf nátriumsó formában van jelen.

3.7. Kristályosítás: kísérlettervezés és tervezési tér

3.7.1. Laborfejlesztés

Egy kristályosítási technológia ICH Q8 és Q11 irányelveinek megfelelő fejlesztési folyamatát a következő példán mutatjuk be. Egy generikus hatóanyag esetében a készítmény kioldódási vizsgálatok alapján a szemcseméret szigorú kontrolljára volt szükség. A meghatározott szemcseméret kritériumnak alapvetően csak monomodális, szűk eloszlású hatóanyag felelhetett meg. Az előzetesen felvázolt kristályosítási módszer paramétereinek hatását emiatt alaposan meg kellett vizsgálni. A kristályosítási módszer alapvetően egy kicsapószer kristályosítás, amely két adagolási lépést tartalmaz: először a hatóanyag oldatát adagoljuk a kicsapószerhez, majd egy érlelési periódust követően további kicsapószerrel fejezzük be a kristályosítást. Az előkísérletek során kiválasztottuk az oldószert, a kicsapószert és a szárítási körülményeket, valamint megállapítottuk, hogy a második adagolási lépést követő utókevertetésnek nincs hatása a szemcseméretre. A faktorok számának csökkentése érdekében a keverési sebességet és a reaktor hőmérsékletét egy-egy kísérlet során állandó értéken tartottuk. Így végül hét paraméter hatását vizsgáltuk meg: a két adagolási idő (t_0 , t_1), az ezek közötti érlelési idő (t_i), a kicsapószer és az oldószert mennyisége (V_0 , V_1), a reaktorhőmérséklet (T) és a keverési sebesség (v). Ezekre a faktorokra hétfaktoros kísérlettervet írtunk fel ($2^{7-4} + \text{foldover}$, 19 kísérlet). A kísérleteket kitermelés és szemcseméret alapján értékeltük: száraz diszpergálásos lézerdiffrakciós szemcseméreteloszlás paraméterei (d_{10} , d_{50} , d_{90}) és alakja (monomodális vagy nem) valamint mikroszkópi felvételek (tús/lemezes szemcsealak elkerülése) alapján. A kísérletek statisztikai értékelése alapján a kristályosított

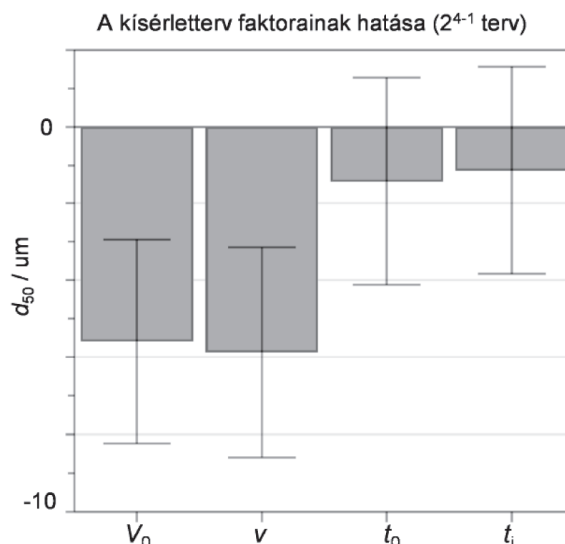


8. Ábra. A kristályosítási paraméterek hatásának vizsgálata 2^{7-3} + foldover tervvel: eredmények (d_{50}).

termék szemcseméretére a vizsgált tartományokon négy faktor van hatással: a kicsapószer mennyisége, a keverés, a hőmérséklet és az oldat adagolása (8. ábra). Az eloszlásgörbe alakja és a mikroszkópi felvételek alapján nem megfelelő terméket kaptunk esetenként a V_0 nagyobb és a t_0 kisebb értékénél, ezért itt a tartomány szűkítése mellett döntöttünk. Ugyanakkor a t_1 hatását a vizsgált tartományon nem találtuk szignifikánsnak, ezért ott szélesebb tartományon folytattuk a kísérleteket. A következő kísérletsorozatban (2^{4-1} kísérletterv, 8 kísérlet) az új tartományok mellett a folyamat mélyebb megértésére koncentráltunk. Az első adagolás utáni mintavétellel, valamint turbiditásmérővel követtük a termék szemcseméretét illetve kristálykiválás folyamatát. Megállapítottuk, hogy az érlelési időnek a szélesebb tartományon sincs hatása a szemcseméretre, a t_0 adagolási idő hossza a leszűkített tartományon belül nem szignifikáns (9. ábra). A kicsapószer térfogatának és a keverési sebességnek a hatása nem változott. Az eloszlásgörbék alakja és a mikroszkópi felvételek alapján a keletkező kristályok habitusa megfelelő volt. A két kísérlet sor eredményei alapján három olyan paraméter maradt, amellyel a kristályosított hatóanyag szemcseméretét érdemben befolyásolni lehetett: a keverés, a hőmérséklet és a kicsapószer mennyisége. Erre a három faktorra csillagpontos kísérlettervet írtunk fel, amely alkalmas volt a paraméterek optimalizálására és a szemcseméret kritériumnak megfelelő anyagot adó kristályosítási tervezési tér (DS) meghatározására. A végső módszernél a paraméterek értékét a robusztus pontnak megfelelően választottuk, mivel ilyen beállításokkal a legkisebb a valószínűsége a nem megfelelő termék keletkezésének (10. ábra).

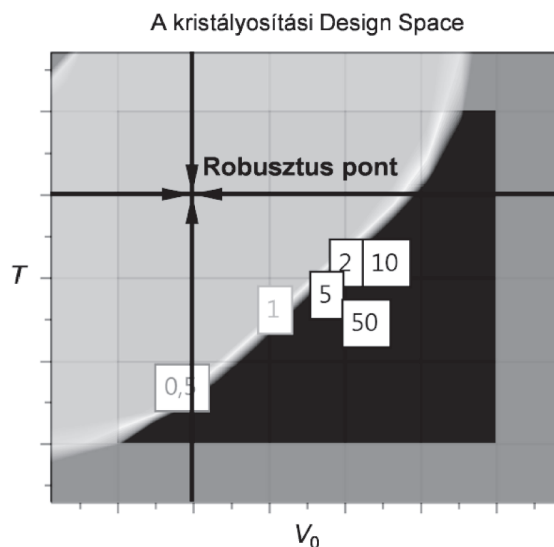
3.7.2. Üzemesítés

A hatóanyag kristályosításának üzemesítését a tervezési tér (Design Space, DS) és a kritikus paraméterek ismerete nagyban megkönnyítette. A termék szemcseméretét a nehezen átvihető paraméterek (idő/sebesség változók) közül csak a keverési sebesség befolyásolta. Ennek értékét modellezés segítségével állítottuk be. A másik két paraméter értéke jól szabályozható, így lehetőséget teremtettek a korrekcióra az első üzemesítés tapasztalatainak birtokában.



9. Ábra. A kristályosítási paraméterek hatásának pontosítása: eredmények (d_{50}).

Az első tétel szárítás előtt vett mintája a várakozásoknak megfelelő szemcseméretű lett, azonban a szárítás közben a szemcsék aprózódtak a szűrő-szárítóban. Ezen tapasztalatok fényében mindhárom paraméter értékén változtattunk azért, hogy a szűrő-szárító aprító hatását kompenzálva közelebb kerüljünk a szemcseméret-kritérium középhez: a reaktorhőmérsékletet a tervezési tér (DS) alapján számítottan kis mértékben megemeltük, a kicsapószer mennyiségét valamivel csökkentettük és a keverő fordulatszámát mérsékellettük. A három változtatás együttes hatása meghozta a kívánt eredményt, az üzemen szárított végeredmény szemcsemérete a kritérium közepére esett. A kristályosítási eljárás fejlesztésének eredménye egy robusztus, reprodukálható és kontrollálható eljárás, amelyet az első próbálkozásoktól a tervezési tér (Design Space) megadásáig, a fejlesztés során végig a QbD elveihez igazodva dolgoztunk ki. A technológiát sikeresen méretnöveltük és validáltuk, az üzemi mérethetben gyártott hatóanyagból készült készítmény megfelelt a kioldódás vizsgálatokon.



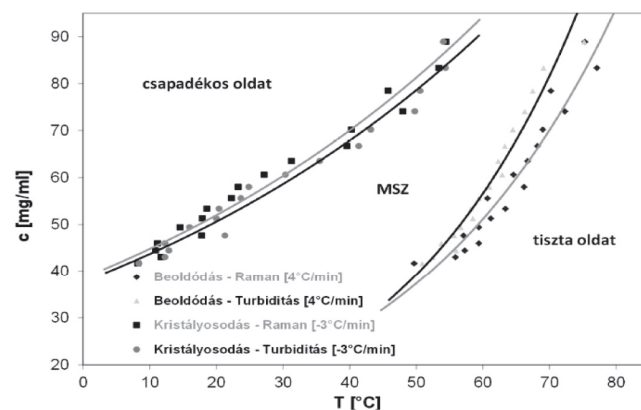
10. Ábra. A kristályosítási folyamat tervezési terének (DS) grafikus ábrázolása (hőmérséklet-kicsapószer felület). A robusztus pontban a keverési sebesség a vizsgált tartomány közepén helyezkedik el.

3.8. Kristályosítás: Metastabil zóna meghatározása

A kristályosodási folyamat megértéséhez és/vagy szabályozásához bizonyos esetekben elengedhetetlenek az in-line mérőszondák – turbiditás, FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurement*), PVM (*Particle Vision Measurement*), Raman, ATR-FTIR, ATR-UV/VIS – alkalmazása, amelyekkel folyamatos adatrögzítésre nyílik lehetőség. Így nem maradunk le például egy gőcképződésről, a szemcseméret változásáról, polimorf átalakulásról, vagy a kristályosítás érdemi végpontjáról. Alkalmazásukkal szükségtelemmé válnak az oly sokszor mind időzítésben, mind kivitelezésben komplikált mintázások és off-line mérések.

A kristályosítás technológiai optimalizálásához alapvetően fontos az ún. metastabil zóna (MSZ) ismerete, amely az oldhatósági görbe és spontán kiválás pontjait ábrázoló túltelítési görbe közötti tartomány (11. ábra). A megfelelő minőségű termék gyártásához a kristályosítást mindenképpen a metastabil zónán belül érdemes véghezvinni. Ezt elérhetjük a megfelelő ponton történő oltással, vagy a spontán gőcképződést követően a metastabil zónába történő visszatéréssel (*supersaturation control* ill. *direct nucleation control*). A MSZ kiméréséhez különböző koncentrációk mellett meghatározzuk a teljes beoldódás hőmérsékletét, illetve a kristályosodás megindulását, rögzített fűtési, illetve hűtési sebesség és keverési fordulatszám mellett. A beoldódást és kiválást detektálhatjuk a szilárd fázist mérő szondákkal (turbiditásmérő, FBRM, Raman) vagy az oldatkonzentráción keresztül (ATR-FTIR, ATR-UV/VIS). A

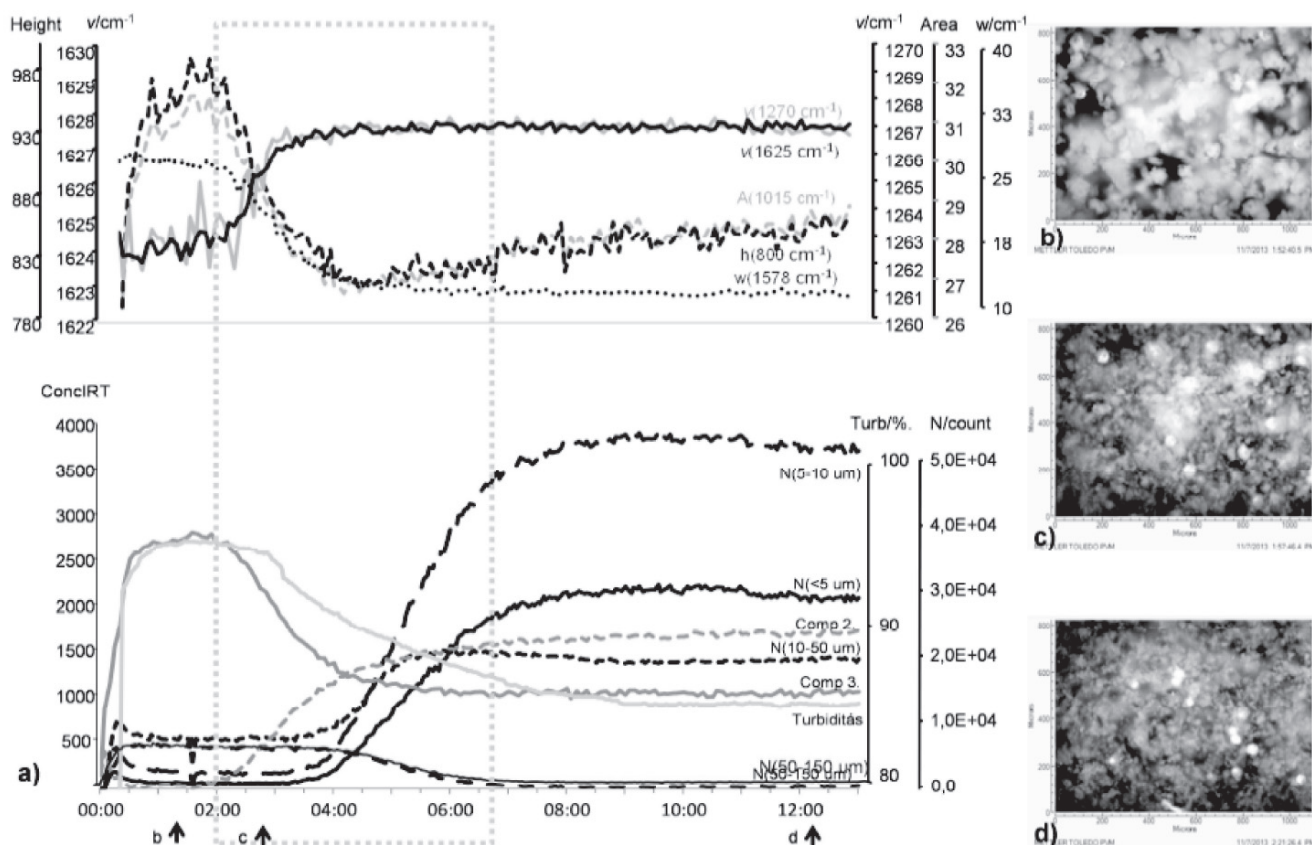
bemutatott példában (11. ábra) turbiditásmérővel és Raman szondával is kimértük a hatóanyag metastabil zónáját izopropanol:víz = 3:2 oldószerkeletben.



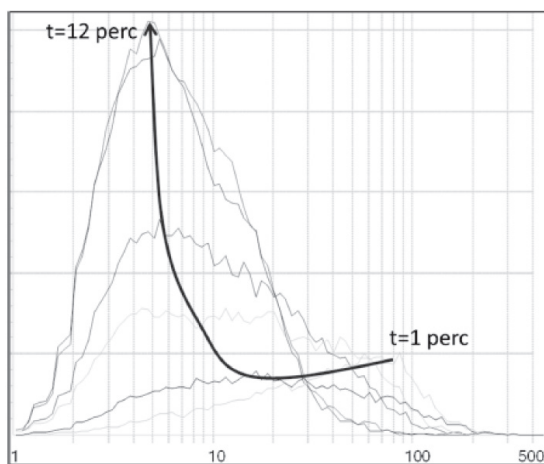
11. Ábra. Egy gyógyszerhatóanyag metastabil zónája (MSZ) izopropanol:víz = 3:2 oldószerkeletben Raman és turbiditásmérővel mérve (fűtési sebesség 4 °C/perc, hűtési sebesség 3 °C/min).

3.9. Kristályosítás: a folyamat megértése szondákkal támogatva

Az alábbi példában egy kicsapásos kristályosítás folyamatát vizsgáltuk PVM, FBRM és Raman szondák segítségével (12. ábra). Az in-line mérések alapján megállapítottuk, hogy a folyamat kétlépcsős. A PVM szonda által mutatott kép alapján (12. ábra b-d) a hatóanyag szerves oldatból vízbe történő kicsapásakor először nagyobb, pelyhes



12. Ábra. Az átkristályosodás detektálása turbiditásmérővel, FBRM, PVM és Raman-szondákkal. a) a szondák által rögzített jelek (fent Raman, lent: FBRM, Raman kemometria, turbiditás). b-d) az ábra a) részén nyílakkal jelölt időpontokban a PVM szondák által rögzített képek.



13. Ábra. Az FBRM szonda húrhossz eloszlásgörbe (szemcseméret eloszlással arányos) változása a kicsapásos kristályosítás folyamatában.

szemcsék keletkeznek, amelyek az utókevertetés során változó idő elteltével (1-10 perc) dezaggregálódnak. Eközben az FBRM szonda tanúsága szerint a kisebb méretű szemcsék száma megugrik (12.a ábra), a nagyobb szemcsék száma lecsökken, a szuszpenzió részecskeszáma is jelentősen megnő. A szemcseméret eloszlás változását kiválóan mutatja az FBRM szonda húrhossz eloszlásgörbéjének időfüggése (13. ábra) Ez a változás turbiditásmérővel is követhető: az

Hivatkozások

- Bernstein, J. *Polymorphism in Molecular Crystals*, Calendron Press: Oxford, Egyesült Királyság, **2002**.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Guidance on Q6A specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances*, **1999**. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf Hozzáférés: 2016.04.29.
- Haleblian, J. K., McCrone, W. C. *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 911–929.
- Raw, A. S., Furness, M. S., Gill, D. S., Adams, R. C., Holcombe Jr., F. O., Yu, L. X. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 397–414.
- Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for industry: ANDAs: pharmaceutical solid polymorphism: chemistry, manufacturing, and controls information*, **2007**. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf> Hozzáférés: 2016.04.29.
- Chemburkar, S. R., Bauer, J., Deming, K., Spiwek, H., Patel, K., Morris, J., Henry, R., Spanton, S., Dziki, W., Porter, W., Quick, J., Bauer, P., Donaubauer, J., Narayanan, B. A., Soldani, M., Riley, D., McFarland, K. *Org. Proc. Res. Dev.* **2000**, *4*, 413–417.
- Chaudhuri, K. R. *Exp. Opin. Drug. Deliv.* **2008**, *5*, 1169–1171.
- J. Lucas, P. Burgess, *PharmaVOICE* **2004** Február
- Mikó, K. *Iparjogvédelmi és szerzőijogi szemle*, **2008**, *3*, 63–83.
- Brittain, H. G. (Ed.) *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*, Marcel Dekker: New York, NY, Egyesült Államok **1995**.
- Zakrzewski, A., Zakrzewski M. (Eds.) *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*, Assa International Inc.: Danbury, CT, USA, **2006**.
- Stahl, P. H., Wermuth, C. G. (Eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use*, WILEY-VCH: Weinheim, Németország, **2002**.
- Wouters, J., Quéré L. (Eds.) *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*, RCS Publishing: Cambridge, Egyesült Királyság, **2012**.
- Morissette, S. L., Almarsson, Ö., Peterson, M. L., Remenar, J. F., Read, M. J., Lemmo, A. V., Ellis, S., Cima, M. J., Gardner, C. R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 275–300.
- Mullin, J. W. (Ed.) *Crystallization (4th Edition)*, Elsevier: Oxford, Egyesült Királyság, **2004**.
- Bod, P., Harsanyi, K., Hegedűs, B., Bogsch, E., Fekecs, E., Peter, I., Aracs, J., Miszori, S., Stiller, M. **EP 256747 B2** (priority: 1986.08.05 HU196775)
- Czibula, L., Demeter, Á., Nemes, A., Németh, Z., Sebők, F., Bartáné Szalai, G. **WO 2010100512** (elsőbbség: 2009. 03. 03 HU 0900130).
- Németh, Z., Demeter, Á., Pokol, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 18–25.
- Németh, Z., Csonka Kis, G., Pokol, G., Demeter, Á. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 338–346.
- Németh, Z., Sajó, I., Demeter, Á. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*(3), 572–6.
- Blake, G. M., Fogelman, I. *Clin. Interv. Aging.* **2006**, *1*(4), 367–375.
- Wierzbicki, M., Bonnet, J., Brisset, M., Tsouderos, Y. **EP 0415850 B1** $\equiv$ **US 5128367** (elsőbbség: 1989.09.01 FR 8911475).
- Horvath, S., Demuynck, I., Damien, G. **EP 1642897 B1** $\equiv$ **US 7459568 B2** $\equiv$ **WO 2006/035122** (elsőbbség: 2004.09.30 FR 10335).
- Stahl, K., Frankaer, C. G., Raffalt, A. C., Sørensen, S. R., Andersen, J. E. T. *Acta. Cryst. E* **2011** *67* 471–472.
- Seferis, J. C., Salin, I. M., Gill, P. S., Reading, M. *Proc. Acad. Greece* **1992** *67* 311.
- Thomas, L. C. *TA Instruments Technical Paper TP 012*, TA Instruments: New Castle, DE, Egyesült Államok, **2005**.
- Marosi, A., Szalay, Zs., Demeter, Á. *Acta Pharm. Hung.* **2010**, *80*, 18–45.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak a Hatóanyag morfológiai osztály volt és jelenlegi munkatársainak, a társosztályokon dolgozó kollégáknak, a Richter Gedeon Nyrt vezetésének, az egyetemi és akadémiai partnereknek, hogy együttműködésükkel az elmúlt évtizedben jelentős mértékben segítettek a polimorfiakutatás, a szilárdfázisú analízis, a kristályosítás területén való eredményes működést, a szükséges műszeres háttér megteremtését, és a kapcsolódó tudásbázis kiépítését.

Pharmaceutical polymorphism research in complex treatment

Polymorphism of an active substance is important from quality and legal point of view. Different solid forms possess diverse physicochemical properties (e.g. melting point, density, hygroscopicity, electrostatic properties, particle size and habit, flow characteristics, compaction, compressibility, solubility, intrinsic dissolution rate, etc.) distinct physical and chemical stability. Such differences in solid state properties of the active substance may have profound effect on the technological processability and drug product performance. Solid-state analysis and control strategy of polymorphism now become an indispensable part of the pharmaceutical drug development and quality control of production.

Polymorphism has determining significance in innovation and intellectual property rights concerning both original and generic product development. Due to favorable solid-state properties, different solid forms (polymorphs, salts, amorphous, cocrystal) and processes to them can be protected by patent. Polymorphism became an offensive/defensive strategic tool in the market competition which also impacts product life cycle management. The polymorphism issues can easily become a forum for patent disputes, which may be accompanied by a series of patent infringement lawsuits where solid-state analysis provides per-final results.

In polymorphism research the complex use of solid state techniques is required. The most frequently used analytical methods include microscopy, thermal analysis, diffraction techniques (especially X-ray diffraction), spectroscopy (IR, NIR, solid-state NMR) and size and shape analysis. These methods are essential in a polymorph or salt screening as well as in the development of crystallization processes.

In Gedeon Richter Plc. morphological studies date back to the 1970s growing in importance since the 1980s. The most important result of that period is the discovery of the pure A and B forms of famotidine. After several preludes the Drug Polymorphism Research Division (HMO) was established in 2006 as the department responsible for polymorph and salt screening, solid state analytical characterization and crystallization of APIs as well as a scientific support in registration and patenting issues.

The present paper gives account of the polymorphism research activities in Gedeon Richter Plc. focusing on the development of the active substance illustrating them by examples from real life cases.

Clearing up the patent situation around polymorphic forms of an API, in some cases, requires more experimental and analytical work than expected. For example in case of strontium ranelate it was proven that the patented Form α does not exist as an independent stable solid form. It is actually a mixture of hepta- and nonahydrate phases described previously in the base patent. These two forms are dynamically interconverting into each other as a function of the relative humidity. Moreover, we have shown that the so-called octahydrate form is non-existent as a separate crystalline phase. The information obtained was crucial for the decision of the development strategy of this generic product.

Salt and polymorph screen is another issue in the early phase of pharmaceutical development. The Type I HCl salt of an API was found to be extremely hygroscopic. The aim of the polymorph screen of the HCl salt and the following salt screen was to find a non-hygroscopic (i.e. stable up to 90% RH according to DVS) form eligible for further development.

In some cases simple routine volatile impurities determination carried out by thermogravimetric analysis might open up questions that can have complicated answers. As it is shown in the TGA measurement case study, answering the question of volatile impurity content of the sample required to understand decomposition which was proven by combining TG, DSC, hot-stage microscope results with reactivity information.

The determination of the polymorph composition is a key step in process development as well as for quality control in systems with multiple polymorphic modifications. XRPD, IR and Raman based chemometric models were developed, calibrated and compared for the determination of the ratio of Form A and C of an API. The three independent methods correlated well with each other and they have different fields of applicability: XRPD and IR for drug substance while Raman might be advantageous in drug products as well.

The measurement of amorphous phase in a crystalline API is even more challenging. A modulated DSC technique was developed with two heating cycles, and the heat capacity change associated with the glass transition was measured on the reversing heat flow. In the first MDSC heating step the signal proportional to the amorphous content is measured, than the whole sample is 'amorphized' by melting and quench-cooling the sample. In the second MDSC heating step the heat capacity change signal is related to the whole sample. The amorphous content is determined by the ratio of the two signals.

Solid state NMR is a technique capable of detecting an amorphous API in a drug product. In the presented example not only the drug substance was detected but it was proven that the products contain an amorphous sodium salt of the API instead of the free acid.

The development of a crystallization procedure according to the guidelines (ICH Q8 and Q11) is shown in the example of a generic API where the accurate and tight control of particle size distribution was required. The critical process parameters of the developed crystallization procedure were screened with respect to particle size distribution as critical quality attributes in DoE (Design of Experiments) series. Three significant factors were found for which an optimization DoE was performed and the Design Space was determined. The knowledge obtained was used in the scale-up of the procedure to select and to refine the parameters for the optimal product.

Process development can be boosted by the use of in-line techniques (FBRM, PVM, Raman, ATR-FTIR, ATR-UV/VIS). The automated measurement of the metastable zone of an API is presented above by the use of turbidimeter and Raman probe.

In-line probes can really add to the understanding of crystallization processes. By the combined use of PVM, FBRM and Raman probes it was proven that during a (presumed) one step crystallization a recrystallization occurs. PVM probe showed changes of the suspension visually, a shift in the particle size was detected by FBRM and an amorphous to crystalline transformation was observed by Raman spectroscopy.