



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**KRISTÁLY HABITUS OPTIMALIZÁLÁSA IMPINGING JET
KRISTÁLYOSÍTÁSI MÓDSZERREL**

Tari Tímea

gyógyszerész

Témavezető:

Dr. habil. Aigner Zoltán

**SZEGED
2019**

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Program
Programvezető: *Dr. habil. Csóka Ildikó*, intézetvezető egyetemi docens

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Témavezető: *Dr. habil. Aigner Zoltán*, egyetemi docens

Tari Tímea

KRISTÁLY HABITUS OPTIMALIZÁLÁSA IMPINGING JET KRISTÁLYOSÍTÁSI MÓDSZERREL

Szigorlati bizottság:

- Elnök:** *Dr. Csóka Ildikó Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
- Tagok:** *Dr. Vecsernyés Miklós Ph.D.*, Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai
Tanszék, Debrecen
Dr. Gáspár Róbert Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani
és Biofarmáciai Intézet

Bíráló bizottság:

- Elnök:** *Prof. Dr. Dombi György*, Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai
Intézet
- Opponensek:** *Dr. Markovits Imre Ph.D.*, Egis Gyógyszergyár Zrt., Budapest
Dr. Bombicz Petra Ph.D., MTA Természettudományi Kutatóközpont,
Szerves Kémiai Intézet, Budapest
- Tag:** *Dr. László Lázár Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai
Intézet
- Titkár:** *Dr. Csupor Dezső Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziái
Intézet

SZEGED

2019

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben rendkívüli módon megnőtt a rossz vízoldékonysággal rendelkező hatóanyagjelöltek száma a gyógyszerkutatás és -fejlesztés területeken. A legutóbbi értékelések alapján az új gyógyszerjelölt molekulák közel 75 %-a a BCS II (rossz oldhatóság, jó permeabilitás) és a BCS IV (rossz oldhatóság, rossz permeabilitás) osztályokba tartoznak. Ezek a molekulák számos nehézséget rejtenek magukban, mint például rossz oldhatóság, lassú oldódási sebesség és alacsony orális biohasznosíthatóság, így elengedhetetlen az újabb és újabb technológiai módszerek kidolgozása és alkalmazása ennek javítására. Számos ilyen, jelenleg is alkalmazott eljárás fellelhető a gyógyszeriparban, mint például szemcseméret-csökkentés, mikronizáció, ciklodextrines komplexálás, ko-kristályosítás, szilárd diszperzió készítés, szilárd lipid nanorészecskék, polimer micellák, fagyasztva szárított liposzómák, különböző só formák, aditívek, ko-szolvensek vagy szolubilizáló anyagok használata.

A ható- és segédanyagok többsége kristályosítással előállítható, így nélkülözhetetlenné vált a kristályosítási folyamatok kontrollálásában is a fejlődés, hogy a megfelelő tulajdonságú kristályos termékek előállítása lehetővé váljon. Ugyanis a különböző kristályosítási módszerek agglomerált szemcséket, instabil polimorf formákat, rossz folyási tulajdonsággal rendelkező tús kristályokat, vagy magas koncentrációjú szennyezőket tartalmazó terméket eredményezhetnek, amelyek csökkenthetik a stabilitást és a hatásosságot. Ezért fontos, hogy már a fejlesztés korai fázisában az ideális kristályosítási módszer legyen kiválasztva az adott molekulához és a kristályosítási paraméterek optimalizálásával magas minőségű kristályos termék készülhessen.

A gyógyszeriparban gyakran alkalmazott konvencionális kristályosítási módszerek – hűtéses, antiszolvens és precipitációs – a szemcseméretet csak bizonyos határok között képesek befolyásolni, ezért manapság továbbfejlesztett kristályosítási eljárások alkalmazásával törekednek a szemcseméret csökkentésére, és a magas kitermelés elérésére. Ilyen új módszernek számít az impinging jet kristályosítási módszer is, avagy a többszörös bemeneti ággal rendelkező örvényáramú keverő berendezések használata. Leggyakrabban szakaszos eljárásként valósulnak meg a fent említett kristályosítási folyamatok, de a szaksok közötti variabilitási és kitermelési problémák miatt a folyamatos technológia egyre inkább teret hódít. Habár a folyamatos mód potencióális gazdasági előnyöket és magas hatékonyságot jelenthet, nem minden szakaszos módszer alakítható át folyamatos technológiává.

2. CÉLKITÚZÉS

A gyógyszertechnológiában rendkívüli erőfeszítéseket tesznek az idő- és költséghatékony szemcseméret-csökkentő kristályosítási módszerek fejlesztésére, amelyek alkalmasak lehetnek a megfelelő minőségű és egységes kristályos termék előállítására, és beépíthetők a különböző gyógyszerformák gyártási folyamatába.

Ph.D. munkám fókuszában egy robusztus és gyors kristályosítási technológia kidolgozása állt, amely alkalmas lehet megfelelő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező, magas minőségű kristályos termék előállítására, nagy produktivitás és stabilitás mellett. Célunk volt a folyamatparaméterek és kristályosítási körülmények optimalizálása szakaszos eljárásként, majd a paraméterek konvertálása és alkalmazása folyamatos technológiában. Egy modell anyag és egy rossz vízoldékonyságú hatóanyag esetében törekedtünk a szignifikáns szemcseméret-csökkentés elérésére, illetve a szűk szemcseméret-eloszlás, az optimális kristály alak és a stabil polimorf forma létrehozására. Továbbá különböző hagyományos kristályosítási eljárások szemcseméret-csökkentő hatékonyságát vizsgáltuk és hasonlítottuk össze az impinging jet módszerrel.

A kutatómunkám főbb lépései az alábbiakban foglalható össze:

- A A saját fejlesztésű impinging jet antisolvens kristályosítási módszer szemcseméret-csökkentő hatékonyságának vizsgálata és a kristály habitusra gyakorolt hatás összehasonlítása konvencionális kristályosítási módszerekkel glicin, mint modell anyag esetében.
- B Kristály habitus optimalizálása innovatív megoldásokkal teljes faktoriális terv alkalmazásával az impinging jet kristályosítás során.
- C A fejlesztett impinging jet módszer szemcseméret-csökkentő hatásának meghatározása rossz vízoldékonyságú hatóanyag, cilosztazol esetben faktoriális tervet alkalmazva.
- D Folyamatos kristályosítási módszer kidolgozása a saját fejlesztésű impinging jet egységet alkalmazva egy modell anyag és egy rossz vízoldékonyságú hatóanyag esetében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

Munkánk során a glicint, mint modell anyagot alkalmaztuk, melyet a VWR International Ltd. forgalmaz (Debrecen, Magyarország). A cilosztazol hatóanyag az Egis Gyógyszergyár Zrt.-től (Budapest, Magyarország) származott. Az alkalmazott oldószerek mindegyike analitikai tisztaságú volt.

3.2. Módszerek

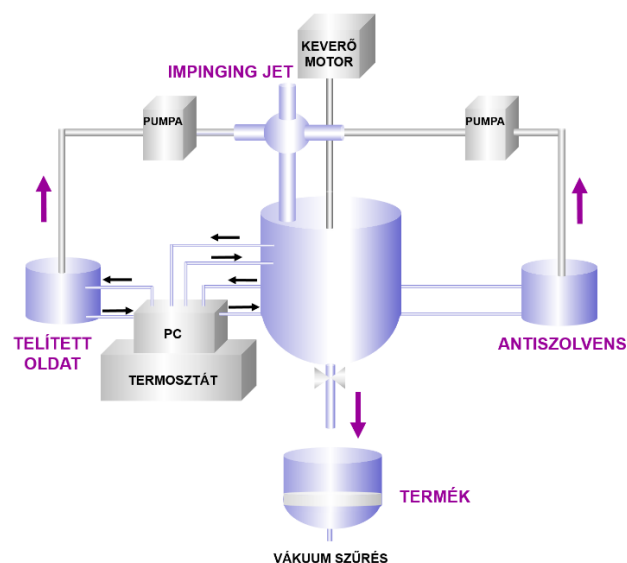
3.2.1. *Kristályosítási eljárások*

3.2.1.1. *Konvencionális kristályosítási módszerek*

A konvencionális kristályosítási kísérleteket 250 ml-es duplafalú, lapos aljú kristályosító reaktorban végeztük állandó hőmérsékleten, amelyet a Julabo F32 kriotermostát (Julabo GmbH, Seelbach, Németország) biztosított Julabo EasyTemp 2.3e software vezérléssel. A nagyhatékonyságú ultrahang (UH) készülék típusa: Hielscher UP 200S Ultrasonic Processor (Németország). Az antiszolvens rendszer (ASZ) esetében a túltelítettség elérésére a telített oldat adagolása nagy sebességgel történt az antiszolvensbe szobahőmérsékleten. Az oldatok fordított adagolása valósult meg a reverz antiszolvens módszernél (REV).

3.2.1.2. *Impinging jet kristályosítás*

Az impinging jet (IJ) egység külső elemként („non-submerged”) volt alkalmazva a duplafalú, kerekített aljú Schmizo kristályosító reaktorral (Schmizo AG, Oftringen, Svájc), amelyben a folyamatos keverést egy IKA Eurostar digitális motorral meghajtott anker-típusú keverő biztosította 250 rpm fordulatszámmal (IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Németország). A folyadékok adagolását két azonos típusú kalibrált perisztaltikus pumpa végezte (Rollpump Type 5198, MTA Kutesz, Budapest, Magyarország). A kísérletek során a hőmérsékletet Julabo F32 (Julabo GmbH, Seelbach, Németország) kriotermostáttal biztosítottuk, Julabo EasyTemp 2.3e software vezérlésével. A kristályosítás során keletkezett szuszpenzió szűrése szűrőnucson történt. A minták 40 °C-on, 24 óráig történő vákuum szárítása után zárt edényekben voltak tárolva. A teljes berendezés felépítése az 1. ábrán látható.



1. ábra: A saját fejlesztésű impinging jet kristályosítási rendszer sematikus felépítése.

3.2.1.3. Folyamatos kristályosítás

Folyamatos kristályosítás során a saját fejlesztésű IJ egység külső elemként („non-submerged”) volt alkalmazva a duplafalú, kerekített aljú kristályosító reaktorban folyamatos keverés mellett állandó fordulatszámmal (IKA Eurostar digitális motorral meghajtott anker-típusú keverő. A telített oldat és az antiszolvens állandó hőmérsékletét Thermo Haake P5/C10 termosztáttal és Julabo F32 kriotermostáttal biztosítottuk, utóbbit Julabo EasyTemp 2.3e software vezérlésével. A folyadékok nagy térfogatú adagolását két kalibrált perisztaltikus pumpa végezte. A kristályosítás során keletkezett szuszpenzió szűrése szűrőnucson folyamatosan történt utókeverés nélkül. A kristályosítás során percenként különítettük el a frakciókat, hogy a folyamat-paramétereket monitorozni tudjuk a teljes kristályosítási időtartam alatt. A minták 40 °C-on, 24 óráig történő vákuum szárítása után zárt edényekben voltak tárolva szobahőmérsékleten.

3.2.2. Oldékonyság meghatározása

A glicin és cilosztazol oldékonyságának meghatározása gravimetriás módszer segítségével történt tisztított vízben, etanolban, metanolban, dimetil-szulfoxidban, dimetilformamidban, acetonban és a különböző térfogatarányú oldószer-keverékek felhasználásával normál körülmények között. Az additívként különböző koncentrációkban alkalmazott NaCl és KCl hatása a glicin oldékonyságára szintén vizsgálva volt.

3.2.3. Termék karakterizálás

3.2.3.1. Kristály morfológia vizsgálata

Fénymikroszkóp

A kristályosított termékek kerekdedségének és szemcseméretének meghatározását LEICA fénymikroszkópos képanalizátorral (Leica LEICA Q500MC, LEICA Cambridge Ltd., Cambridge, UK) végeztük. Kb. 1000 szemcse volt vizsgálva mintánként és legfőképpen a kerekdedség érték meghatározása volt a cél ennél a módszernél.

Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)

Pásztázó elektronmikroszkóppal (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokyo, Japán) vizsgáltuk a termékek kristályhabitusát. A SEM minták felületét arany-palládium bevonattal láttuk el a megfelelő elektromos vezetőképesség biztosítása céljából, Bio-Rad SC 502 készülék (VG Microtech, Uckfield, UK) alkalmazásával.

Szemcseméret-eloszlás (PSD) analízis

A minták szemcseméret-eloszlását Malvern Mastersizer 2000 lézerdiffrakciós szemcseméret analízáló berendezéssel (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) határoztuk meg, száraz módszerrel Scirocco száraz poradagoló segítségével a glicin minták esetében. A cilosztazol mintákat nedves módszerrel vizsgáltuk a Hydro S diszperziós egységet alkalmazva.

3.2.3.2. Polimorfia meghatározása

A termékek polimorfiáját porröntgen diffrakciós (XRPD) készülék és differenciáló pásztázó kaloriméter (DSC) segítségével vizsgáltuk. Az XRPD mérésekhez Bruker D8 Advance diffraktométert (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk. A kristályosított termékek diffraktogramjait a Cambridge Szerkezeti Adatbázis (CSD) adataival hasonlítottuk össze (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK).

A DSC analízis Mettler Toledo DSC 821e (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Svájc) berendezéssel történt. Az adatok értékelését STARe ver. 9.30 software-rel végeztük.

3.2.3.3. Folyási tulajdonság

Az eszközt a Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország ajánlotta fel kutatási céljainkra. A Brookfield Powder Flow Tester-t (PFT; PFT230, Brookfield Engineering Labs, Inc., Middleboro, USA) alkalmaztuk a glicin minták folyási tulajdonságainak meghatározására, standard 'Flow Function Test'-et futtatva a Powder Flow Pro software-rel (Powder Flow Pro V1.3 Build 23, Brookfield Engineering Labs, Inc., Middleboro, USA).

3.2.3.4. Nedvesedési peremszög meghatározása

A nedvesedési peremszöget DataPhysics Contact Angle System OCA 20 (DataPhysics Instruments, Filderstadt, Németország) készülékkel vizsgáltuk, magától lecseppenő cseppek

alkalmazásával. A CIL préselt pasztillákat hidraulikus prés segítségével állítottuk elő (Specac Ltd., Orpington, UK).

3.2.3.5. Maradék oldószer-tartalom

A minták maradék oldószer-tartalmának meghatározása headspace gázkromatográfiás (hGC) módszerrel történt, vizsgálatainkat Varian CP-3800 gázkromatográf (Varian, Inc., Walnut Creek, CA, USA) végeztük a glicin minták esetében, és Perkin Elmer Clarus gázkromatográfot alkalmaztuk a CIL minták során.

3.2.3.6. Maradék additív-tartalom analízise

Additív tartalom kvalitatív meghatározása

SEM (Hitachi S-4700 cold field emission microscope type II) energia diszperzív röntgen spektroszkópia (EDS, Röntec XFlash, Berlin, Németország) alkalmazásával vizsgáltuk a minták összetételét, az elemi térképet és az additív pontos elhelyezkedését.

Additív tartalom kvantitatív meghatározása

A kristályosítási additívként alkalmazott kálium maradék koncentrációjának pontos mérésére Perkin Elmer 4100 ZL (Überlingen, Németország) atomabszorpciós lángspektrométert alkalmaztunk (FAAS), deutérium háttér korrekciós rendszerrel és levegő-acetilén láng alkalmazásával.

3.2.3.7. Oldódási sebesség vizsgálata

A CIL minták oldódási sebességét módosított forgólapátos eljárással határoztuk meg a Ph.Eur.-ban leírtak szerint (PharmaTest PTW II, PharmaTest Apparatebau AG, Hainburg, Németország). 100 ml mesterséges gyomornedvben (SGF), pH $1,2 \pm 0,1$ értéken. Szűrést és hígítást követően a minták hatóanyagtartalmát UV-spektrofotométerrel határoztuk meg ($\lambda_{SGF} = 260 \text{ nm}$).

3.2.4. Faktoriális kísérlettervezés és statisztikai analízis

Az IJ kísérleteket 3^2 teljes faktoriális terv alapján építettük fel, hogy meghatározzuk a kristályosítási paramétereknek a szilárd termékekre gyakorolt befolyásoló hatását. Az alábbi egyenlet írja le a faktorok közötti összefüggést, amely alapján meghatároztuk minden egyes faktor relatív hatását és a válaszfelszínt: $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_1^2 + b_4x_2^2 + b_5x_1x_2$

Statistica for Windows 12 AGA software (StatSoft Inc., Tulsa, USA) és GraphPad Prism 5 Portable statisztikai software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) volt alkalmazva számításainkhoz.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Glicin szemcseméret-csökkentése

4.1.1. Faktoriális kísérletterv

Az 'A sorozat' esetében az áramlási sebesség (1,41; 2,77; 4,06 m s⁻¹) és az utókeverési idő (0; 5; 10 perc) hatását vizsgáltuk három szinten. A 'B sorozat'-ban a hőmérséklet különbség (0; 12,5; 25 °C) és az utókeverési idő (0; 5; 10 perc) függő változók kerekdedségre és szemcseméretre (d (0.5) és D [4,3]) gyakorolt hatásukat tanulmányoztuk.

4.1.2. A kristályosított termékek kristály habitusa

Az 'A sorozat'-ban 1:1 víz:etanol oldószer arányt alkalmaztunk és jelentős szemcseméret-csökkentést értünk el a kiindulási anyaghoz képest. A hosszabb utókeverés kedvezően befolyásolta a kerekdedséget, de szignifikánsan növelte a szemcseméretet. A 'B sorozat'-ban 1:2 arányra módosítottuk a víz:etanol térfogatokat és minden egyes beállítási paraméterrel szignifikáns szemcseméret-csökkentést értünk el az 'A sorozat' eredményeivel összehasonlítva (lásd 2. ábra).



2. ábra: SEM felvételek: a kiindulási glicin (A); az 'A sorozat' terméke (B); és a 'B sorozat' terméke (C).

4.1.3. A kristályosított termékek polimorfia vizsgálata

4.1.3.1. XRPD és DSC analízis

Az XRPD vizsgálatok eredményei alapján a kiindulási anyag és az 'A sorozat' termékei tiszta, stabil α -polimorfot tartalmaztak. Ezzel szemben a 'B sorozat'-ból származó termékek főként az instabil β -polimorfot tartalmazták, és kis mennyiségben az α -polimorf is jelen volt a termékekben. A DSC eredmények alátámasztották az XRPD analízis megfigyeléseit.

4.1.3.2. A polimorf formák átalakulásának vizsgálata

A β -polimorf átalakulása α -polimorffá normál körülmények közötti tárolás során megfigyelhető. A jelenség monitorozására kidolgoztunk egy XRPD kalibrációs eljárást. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a kiindulási 'B sorozat' termékeinek β -polimorf tartalma 72 és 96 % között volt. Majd 1 év normál körülmények közötti tárolást követően 13-17 %-ra

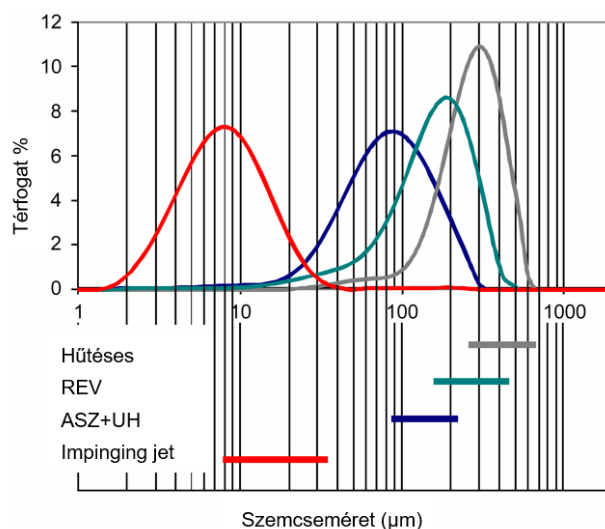
csökkent. Az 'A sorozat' termékei nem változtak ezen tárolási periódusban. Ezen vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az 1:1 oldószer arány kritikus a stabil forma képződése esetében.

4.1.4. Maradék oldószer-tartalom

Az antiszolvensként alkalmazott etanol az ICH Q3C(R7) irányelv szerint a 3. osztályba tartozik, ahol a maradék oldószer koncentráció maximum 5000 ppm lehet. Az 'A sorozat'-ban a legmagasabb hGC-fal mért koncentráció 9 ppm volt, míg a 'B sorozat' termékei maximum 145 ppm maradék etanolt tartalmaztak.

4.1.5. Összehasonlítás konvencionális kristályosítási eljárásokkal

Az IJ kristályosítási módszer szignifikánsan kisebb szemcseméretet eredményezett a korábban vizsgált hagyományos eljárásokhoz képest. A konvencionális hűtési kristályosítás eredményezte a legnagyobb szemcseméretet. A REV és ASZ módszerek esetében az ultrahang együttes alkalmazásával kismértékű szemcseméret-csökkenés megfigyelhető volt. Az IJ módszer további egy nagyságrendnyi csökkentést eredményezett glicin esetében (lásd 3. ábra).



3. ábra: Szemcseméret-eloszlás és a különböző kristályosítási eljárásokkal elérhető átlagos szemcseméret tartományok (felül: PSD az adott módszer legkisebb átlagos szemcseméretet eredményező beállításával; alul: az adott módszerrel elérhető szemcseméret-tartomány).

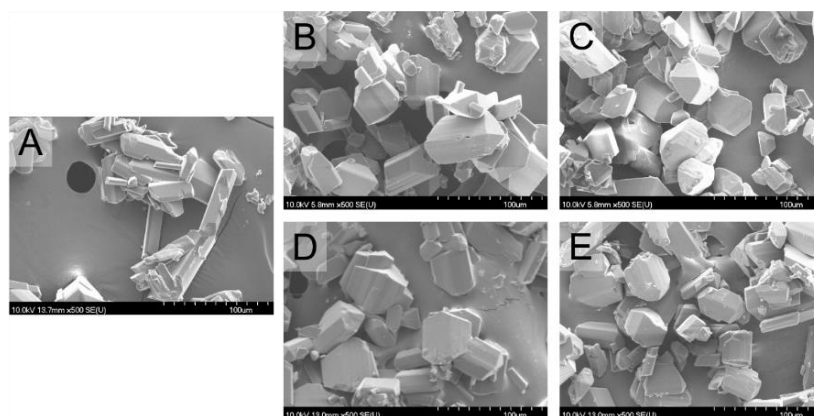
4.2. Glicin kristályok habitusának optimalizálása additív alkalmazásával

Korábbi IJ kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a magas koncentrációjú (5000-8000 ppm) KCl alkalmazása kedvezően befolyásolta a glicin kristályok morfológiáját. Az alacsonyabb, 2000 ppm KCl additív koncentráció még inkább kedvezett a szemcsék kerekdedségének. Így az I. sorozatban csökkentettük az additív koncentrációt és 1000-

2000 ppm KCl-dal a kívánt hatást érték el. A II. sorozatban további additív csökkentést alkalmaztunk (100-200 ppm KCl), hogy a legalacsonyabb effektív additív koncentrációt meghatározzuk, és hogy a maradék KCl mennyiségét is minimalizáljuk.

4.2.1. Különböző koncentrációjú KCl additív hatása a glicin kristályok morfológiájára IJ kristályosítás során

Az I. sorozatban alkalmazott 1000-2000 ppm KCl javította a kristályok kerekdedségét és az IJ kristályosítás során csökkent a szemcsék mérete. Az utókeverési idő növelése ellentétesen hatott az előbbi tulajdonságokra. A II. sorozatban az additív koncentrációt egy nagyságrenddel tovább csökkentettük. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az alacsonyabb koncentrációban alkalmazott additív még kedvezőbb hatást gyakorolt a kristályok habitusára. Már 100 ppm KCl jelentősen javította a kristályok kerekdedségét. 200 ppm KCl és 0 perc utókeverés eredményezte a legkisebb átlagos szemcseméretet megfelelő kerekdedség mellett (lásd 4. ábra).



4. ábra: Glicin kristályok SEM felvételei. A: additív nélküli IJ termék; B: 1000 ppm KCl additívvel; C: 2000 ppm KCl additívvel; D: 100 ppm KCl additívvel; E: 200 ppm KCl additívvel.

4.2.2. Polimorfia

A kiindulási anyag és a termékek polimorfiája közvetlenül a vákuum szárítás után XRPD és DSC készülékkel volt vizsgálva. Az XRPD eredmények szerint a kiindulási és a kristályosított termékek is a stabil α -módosulatot tartalmazták. Korábbi tapasztalataink alapján a DSC módszer érzékenyebb a kisebb koncentrációban jelenlévő β -glicinre. A kiindulási anyag és a termékek termogramjain is két endoterm csúcs figyelhető meg 251 °C és 254 °C hőmérsékleteken. Az első csúcs megfelel az instabil β -formának, a második csúcs pedig a stabil α -formának.

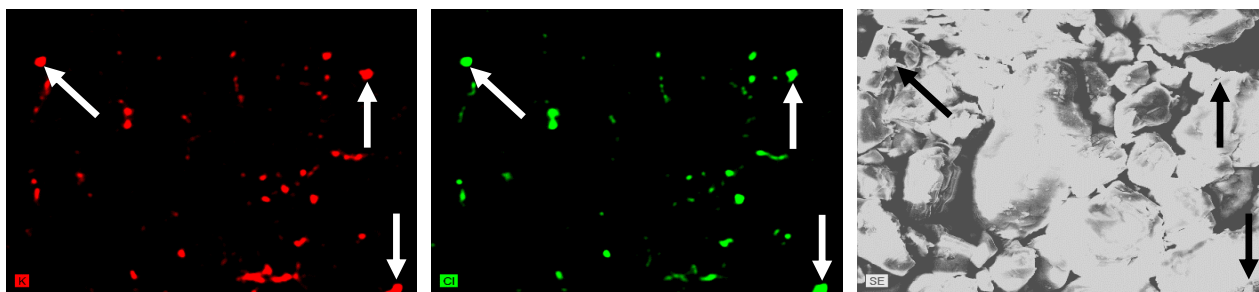
4.2.3. Maradék oldószer-tartalom

A hGC mérések alapján meghatároztuk a termékek maradék oldószer-tartalmát. Az I. és a II. sorozat termékeiben 38 ppm és 80 ppm közötti maradék etanol koncentráció volt mérhető, így ez megfelelt az előírt követelményeknek (maximum 5000 ppm, ICH).

4.2.4. Maradék kálium-tartalom

4.2.4.1. Kálium-klorid kvalitatív analízise

A mintákban lévő maradék KCl pontos elhelyezkedését SEM-EDS módszerrel határoztuk meg. A magas additív koncentrációval (5000 ppm) elvégzett IJ kísérletek termékeiben a KCl különálló kristályokként a glicin szemcsék felszínén helyezkedtek el (lásd 5. ábra). Alacsony koncentrációnál (100-200 ppm) pedig az additív diffúz eloszlása figyelhető meg a glicin szemcsék felszínén.



5. ábra: SEM felvétel (jobb); és a kálium (piros) és a klór (zöld) EDS elemi térképei a KCl kristályok elhelyezkedésének meghatározására az IJ Gly mintákban.

4.2.4.2. Maradék kálium kvantitatív analízise

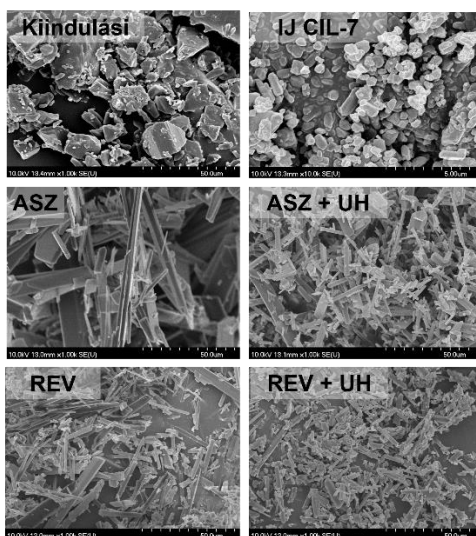
A habitus javítása céljából alkalmazott kálium mennyiségét a termékekben FAAS mérések alapján határoztuk meg. Az I. sorozat termékeinek maradék kálium koncentrációja 123-364 ppm közé esett, és mennyisége összefüggést mutatott az utókeverés idejével. A hosszabb utókeverés magasabb maradék additív koncentrációt eredményezett. A II. sorozatban egy nagyságrenddel alacsonyabb volt a maradék kálium, 22-48 ppm közé esett a mintákban, amely nem jelent nagymértékű szennyezettséget.

4.3. A rossz vízdékonyságú cilosztazol szemcseméretének csökkentése

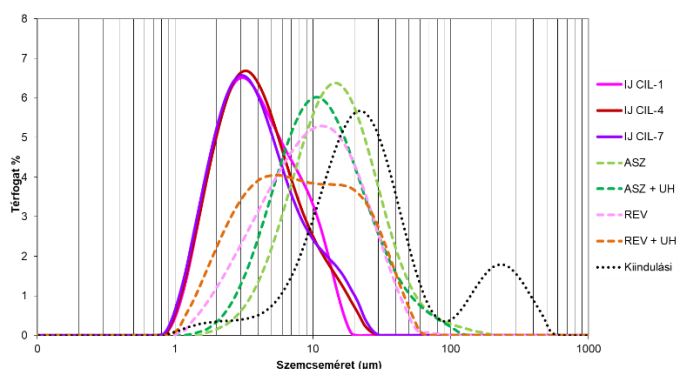
Ezen hatóanyag esetében ez az első tanulmány, amelyben az impinging jet kristályosítás hatását vizsgálták és paramétereit optimalizálták. Korábbi vizsgálatainkban a befolyásoló folyamat-paraméterek feltérképezésre kerültek, és a glicin modell anyag esetében optimalizáltuk ezen faktorokat. Az észrevételeket beépítettük jelen vizsgálatainkba, és specifikusan a BCS II hatóanyagra, a cilosztazolra fejlesztettük tovább a kristályosítási körülményeket.

4.3.1. Kristály morfológia

Az utókeverési idő és a hőmérséklet különbség az antiszolvens és szolvens között befolyásolták leginkább a CIL kristály morfológiáját, így az IJ módszert hűtési kristályosítással kombinálva alkalmaztuk kísérleteinkben. Az utókeverési idő növelése szisztematikusan nagyobb átlagos szemcseméretet eredményezett, illetve növelte a kitermelési százalékot, de a kerekdedségre nem volt jelentős hatása. Az IJ CIL-1; 4 és 7 minták rendelkeztek a legmegfelelőbb kristály habitussal. A gyógyszeriparban általánosan alkalmazott szemcseméret-csökkentő kristályosítási módszerekkel hasonlítottuk össze az IJ eredményeket, hogy a módszerek hatékonyságát meghatározzuk (lásd 6. ábra).



6. ábra: SEM felvételek: kiindulási őrlt CIL kristályok (Kiindulási); legmegfelelőbb morfológiai tulajdonságokkal rendelkező IJ minta (IJ CIL-7); és konvencionális kristályosítási módszerek termékei (ASZ; ASZ + UH; REV; REV+ UH).



7. ábra: A különböző kristályosítási eljárásokkal előállított termékek szemcseméret-eloszlásának összehasonlítása.

Az IJ módszer monodiszperz PSD-t eredményezett a lézerdiffrakciós analízis alapján. A kiindulási anyag és a REV termék UH-gal kombinálva polidiszperz eloszlást mutatott (lásd 7. ábra). Összességében elmondható, hogy az IJ módszer, UH használata nélkül is

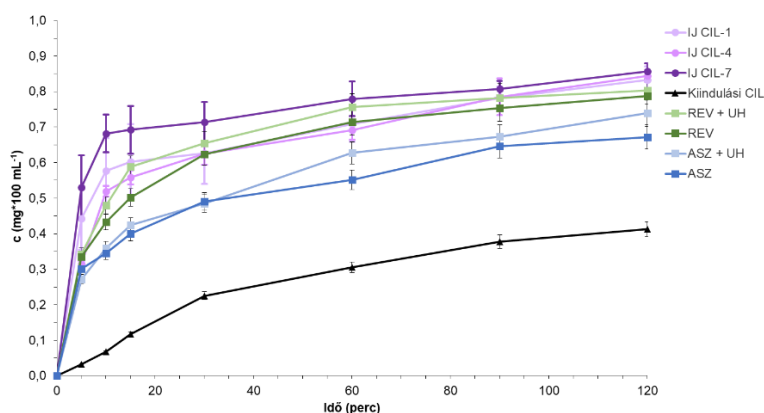
szignifikánsan csökkentette a szemcseméretet és javította a kerekdedséget a konvencionális kristályosítási módszerekhez képest.

4.3.2. Polimorfia

Az XRPD és DSC analízis szerint a kiindulási anyag kristályszerkezete az ortorombos A forma, amely normál körülmények között a legstabilabb polimorf. A kiértékelések alapján az összes vizsgált kristályosítási módszerrel a stabil ortorombos A polimorf keletkezett, és egyéb módosulat nem volt detektálható.

4.3.3. Oldódási sebesség

A CIL termékek oldódási profilját 120 perc időtartamú in vitro vizsgálattal határoztuk meg enzimek nélküli SGF-ben ($\text{pH} = 2,0 \pm 0,1$). 120 percnél a legkisebb szemcseméretű minta (IJ CIL-7) esetében volt mérhető a legmagasabb oldódott mennyiség (lásd 8. ábra). Eredményeink szerint egyértelmű korreláció van az oldódási sebesség és a szemcseméret között, a kisebb szemcseméret magasabb oldódási sebességet eredményez. Amennyiben az egyedi, kis szemcsék megmaradnak jelen állapotukban a végső gyógyszerformában is, a kezdeti periódusban magasabb kioldódott hatóanyag mennyiség várható, amely a biohasznosíthatóságot kedvezően befolyásolhatja.



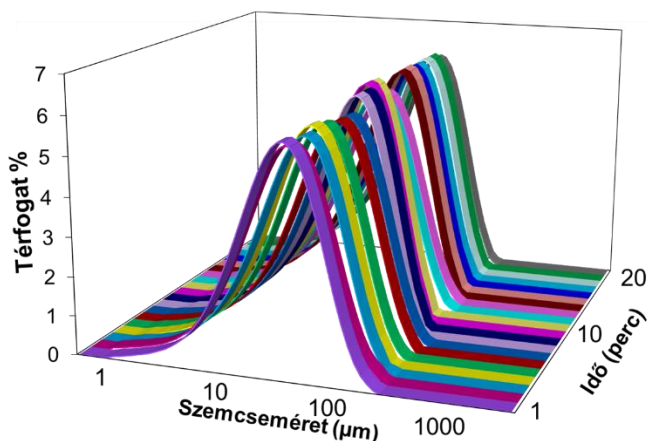
8. ábra: A kristályosított CIL minták oldódási sebessége.

4.4. Folyamatos kristályosítási eljárás fejlesztése glicin esetében

A korábbi szakaszos kísérletek alapján optimalizált paramétereket konvertáltuk az új folyamatos IJ kristályosítási eljárás fejlesztésénél, glicin modell anyag esetében. Méretnövelés kivitelezése is megtörtént, a szakaszos módszerhez képest 20-szoros térfogatokkal dolgoztunk. Folyamatos mintavételezéssel („in-process-monitoring”) ellenőriztük a kristályosított termék minőségének állandóságát és a teljes folyamat során vizsgáltuk a kritikus termék paramétereket, mint például az átlagos szemcseméretet és a kerekdedséget.

4.4.1. Kristály habitus és szemcseméret-eloszlás

Nem történt jelentős változás a kristály morfológiában a kristályosítás teljes időtartama alatt (lásd 9. ábra). A folyamatos technológia kisméretű, bipiramidális, sima felszínű kristályokat eredményezett. A mikrometriás adatokat vizsgálva megállapítható, hogy az átlagos szemcseméret ($d(0.5) = 25,899 \mu\text{m}$ - $34,313 \mu\text{m}$) alacsony szórással rendelkezik ($SD = 2,54$; $CV = 0,08$). Ez a folyamat kiindulási és végpontja közötti kis varianciát jelenti, amelyet alátámasztanak a SEM felvételek alapján tett vizuális megfigyelések is.



9. ábra: A folyamatos IJ kristályosítás termékeinek szemcseméret-eloszlása.

4.4.2. Folyási tulajdonság

PFT eredmények alapján a kiindulási anyag egy szabadon folyó por („free flowing”), ahogy az izodimenziós, nagy szemcsék alapján ez előre jelezhető volt. Az additívvel együtt alkalmazott szakaszos és a folyamatos eljárás termékei is könnyen folyó („easy flowing”) kategóriába esnek, és a lefutási görbék hasonlósága megfigyelhető. Ezen termékek használata megfelelő lehet további tablettázási folyamatokban.

4.4.3. Polimorfia

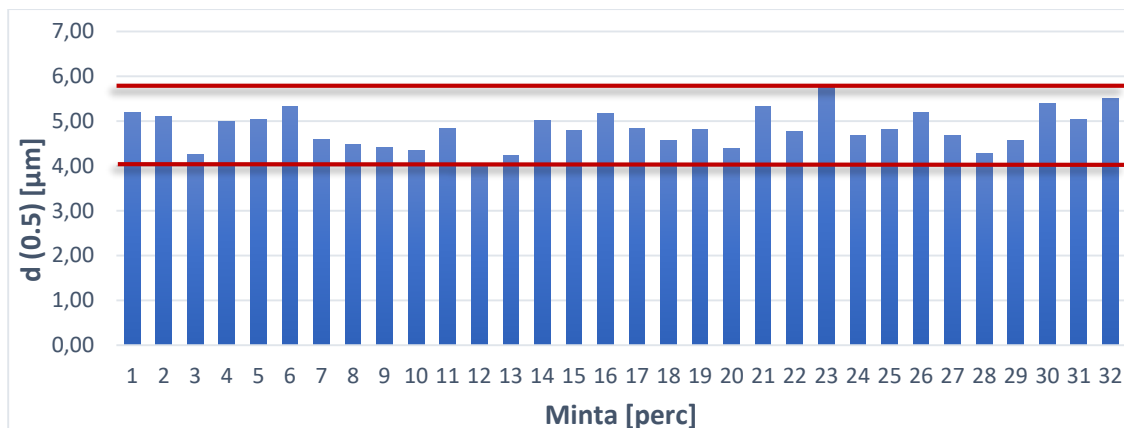
Az XRPD eredmények alapján az összes minta a legstabilabb α -glicint tartalmazta, a kristályszerkezet nem változott sem a folyamat során, sem a kiindulási anyaghoz képest. Ezzel szemben a β -formára érzékenyebb DSC módszerrel a β -polimorf is detektálható volt az α -forma mellett.

4.5. Folyamatos IJ kristályosítási eljárás fejlesztése cilosztazol esetében

A glicin modell anyag esetében a szakaszos IJ kristályosítás paramétereinek sikeres implementálását követően, a rossz vízdékonyságú CIL esetében is teszteltük a módszert. A korábbi CIL szakaszos kísérletekben optimalizált paramétereket (IJ CIL-7 faktorokat) méretnövelés mellett konvertáltuk folyamatos technológiává.

4.5.1. Kristály morfológia

A teljes folyamat során monodiszperz szemcseméret-eloszlással rendelkező minták keletkeztek. A 10. ábrán a $d(0.5)$ eredményeket szemléltettük. A szakaszos eljáráshoz képest a kitermelési százalék nem növekedett, 80,19-86,52 % tartományban változott a mennyisége.



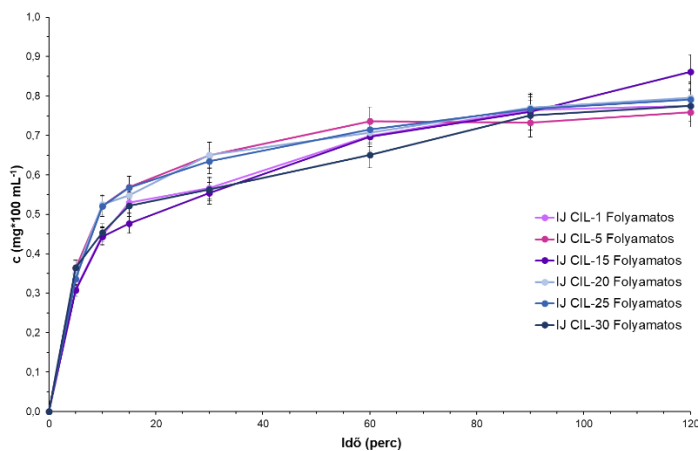
10. ábra: Folyamatos IJ módszer CIL mintáinak átlagos szemcsemérete ($d(0.5)$) a teljes folyamat során.

4.5.2. Polimorfia

Az XRPD diffraktogramjainak és a DSC termogramjainak értékelését követően megállapítható a CIL minták kristályszerkezetének állandósága a teljes folyamat során, ortorombos A stabil polimorf keletkezett.

4.5.3. Oldódási sebesség

Megállapítható, hogy a szakaszos módszer termékeinek oldódási profilja hasonló a folyamatos kristályosítás termékeinek profiljához. A folyamat elején és végén vett minták oldódási sebessége közötti különbség elhanyagolható (lásd 11. ábra), amely visszavezethető a szűk tartományban mozgó átlagos szemcseméretre.



11. ábra: Folyamatos IJ módszer termékeinek oldódási sebessége különböző időpontokban vett mintákból meghatározva.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓ

Jelen értekezésben a saját fejlesztésű impinging jet kristályosítási módszer hatékonyságát vizsgáltuk a kristály habitusra gyakorolt hatásának szempontjából, egy modell anyag és egy rossz vízoldékonyságú hatóanyag esetében. A kritikus folyamat-paramétereket optimalizáltuk mind szakaszos, mind folyamatos technológia során, stabil és egységes kristályos termék elérésének céljából.

Ph.D. munkám kísérleti eredményei, az újdonságok és gyakorlati jelentőségük az alábbiakban foglalható össze:

- A** A fejlesztett impinging jet antiszolvens kristályosítási módszer hatékonynak bizonyult a gyors és reprodukálható szemcseméret-csökkentésben, glicin modell anyag esetében. A folyamatot befolyásoló releváns faktorokat teljes faktoriális terv alapján határoztuk meg.
- Az instabil β -glicin polimorf átalakulásának monitorozására egy új porröntgen diffrakciós kalibrálási eljárást dolgoztunk ki, amely korábban még nem került publikálásra.
 - A fejlesztett impinging jet módszer egy nagyságrenddel kisebb átlagos szemcseméretet eredményezett az általánosan használt konvencionális kristályosítási eljárásokhoz képest, amely módszerek csak bizonyos határok között képesek a szemcseméretet csökkenteni.
 - A fejlesztett impinging jet kristályosítási eljárás alkalmas a stabil polimorf forma előállítására alacsony maradék oldószer-tartalom mellett.
- B** Elsőként kombináltuk az impinging jet kristályosítási módszert különböző koncentrációjú kálium-klorid additívvel a glicin kristályok habitusának módosítására.
- A szemcsék kerekdedségét sikeresen javítottuk alacsony (100-200 ppm) kálium-klorid additív koncentráció alkalmazásával.
 - Az additív pontos elhelyezkedését meghatároztuk a végső termékben és a maradék additív-tartalmat optimális szintre állítottuk.
 - A kristályosítás kritikus paramétereit optimalizáltuk a kívánt kristály habitus eléréséhez, megfelelő folyási tulajdonság és alacsony maradék oldószer-tartalom mellett.

- C** A fejlesztett impinging jet módszer lehetővé tette a rossz vízdékonyságú cilosztazol jelentős szemcseméret-csökkentését és reprodukálhatóan biztosította a kristályosított termék magas minőségét.
- A cilosztazol kristály habitusának szignifikáns javulását érték el a kombinált impinging jet és hűtéses módszer kidolgozásával.
 - Meghatároztuk a kritikus folyamatparamétereket teljes faktoriális terv alkalmazásával, amely alapján az utókeverési idő és a hőmérsékleti beállítások bizonyultak szignifikáns faktoroknak.
 - Az oldódási sebesség jelentősen gyorsult és a kristály habitus szignifikánsan javult a konvencionális kristályosítási eljárások alkalmazásával készült termékekhez képest.
- D** A fejlesztett szakaszos impinging jet módszer a glicin modell anyag és a rossz vízdékonyságú cilosztazol esetében is alkalmasnak bizonyult a folyamatos kristályosítás kivitelezésére a paraméterek konvertálásával.
- A fejlesztett folyamatos technológia egyszerű és hatékony módszer, amellyel elérhető a kristályosítási folyamat idejének nagymértékű lerövidítése a kristályosított termék minőségének megtartása mellett.
 - A méretnövelés kivitelezése sikeresen megtörtént, és a szakaszos eljáráshoz képest a kitermelési százalék emelkedett.
 - A kristályosítási paramétereket az adott hatóanyagra optimalizáltuk, továbbá a kritikus termék paraméterek, mint például a szemcseméret, szemcseméret-eloszlás és kerekdedség folyamatos monitorozásával igazoltuk az eljárás robusztusságát és a változatlan termék minőséget.

Összességében elmondható, hogy a fejlesztett szakaszos és folyamatos eljárások lehetővé teszik az optimalizált porreológiai tulajdonságokkal rendelkező kristályos termékek előállítását, amely termékek közvetlenül alkalmazhatóak lehetnek a tablettázási folyamatokban minden további változtatás nélkül, továbbá a fejlesztett kristályosítási eljárás beépíthető az adott gyógyszerforma gyártási folyamatába számottevőbb beruházás nélkül. A különböző konvencionális kristályosítási módszerek összehasonlításával megállapítottuk a szemcseméret-csökkentő kapacitásukat, továbbá eredményeink megkönnyíthetik a döntést, hogy melyik módszer alkalmas az adott gyógyszerformánál a kívánt szemcseméret-tartomány eléréséhez. Eredményeink további rossz vízdékonyságú hatóanyagok kristályosítási folyamatának fejlesztésénél is alapul szolgálhatnak a kritikus folyamat-paraméterek meghatározásában.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I.** **Tímea Tari**, Zoltán Fekete, Piroska Szabó-Révész, Zoltán Aigner: Reduction of glycine particle size by impinging jet crystallization. *International Journal of Pharmaceutics*, 478 (1) (2015) 96-102.
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.11.021

IF (2015): 3,994
Független idézők: 3

- II.** **Tímea Tari**, Rita Ambrus, Gerda Szakonyi, Dániel Madarász, Patrick Frohberg, Ildikó Csóka, Piroska Szabó-Révész, Joachim Ulrich, Zoltán Aigner: Optimizing the crystal habit of glycine by using additive for impinging jet crystallization. *Chemical Engineering and Technology*, 40 (2017) 1323-1331.
DOI: 10.1002/ceat.201600634

IF (2017): 1,588
Független idézők: 3

- III.** **Tímea Tari**, Piroska Szabó-Révész, Zoltán Aigner: Effect of additive on glycine crystal habit by impinging jet crystallization. *BIWIC 2016 - 23rd International Workshop on Industrial Crystallization, Conference Proceedings*, pp. 40-45, Magdeburg, Germany, 06-08. 09. 2016
ISBN: 978-3-7369-9322-8

- IV.** **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Folyamatos kristályosítási eljárás fejlesztése impinging jet módszerrel. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 87 (043) (2017) 69-75.
ISSN: 001-6659

- V.** **Tímea Tari**, Piroska Szabó-Révész, Zoltán Aigner: Comparative study of different crystallization methods in the case of cilostazol crystal habit optimization. *Crystals – Special issue: Antisolvent crystallization* – bírálat alatt

(IF (2017): 2,144)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

1. **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Impinging jet kristályosítási eljárás alkalmazása glicin szemcseméret-csökkentésében.
Tudományos Diákköri Konferencia, Szeged, Magyarország, p. 180, 2013. 02. 14.
2. **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Impinging jet kristályosítási eljárás alkalmazása glicin szemcseméret-csökkentésében.
Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Szeged, Magyarország, p. 374, 2013. 04. 02 - 05.
3. **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Impinging jet kristályosítási eljárás alkalmazása glicin szemcseméret-csökkentésében.
Magyar Kémikusok Egyesülete – Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 6. Kerekasztal Konferenciája, Balatonszemes, Magyarország, p. 27, 2013. 09. 06 - 07.
4. Zoltán Aigner, **Tímea Tari**, Zoltán Fekete, Piroska Szabó-Révész: Particle size reduction by impinging jet crystallization.
9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisboa, Portugal, p. 73, 31. 03 - 04. 03. 2014
5. **Tari Tímea**, Fekete Zoltán, Szabó-Révész Piroska, Aigner Zoltán: Szemcseméret csökkentése impinging jet kristályosítással.
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, Magyarország, p. 49, 2014. 04. 10 - 12.
6. **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Additívek alkalmazása impinging jet kristályosítási eljárás során.
Magyar Kémikusok Egyesülete – Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 8. Kerekasztal Konferenciája, Balatonszemes, Magyarország, p. 11, 2015. 05. 15 - 16.
7. **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Kálium-klorid hatása glicin szemcsék habitusára impinging jet kristályosítás során.
Magyar Kémikusok Egyesülete – Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 9. Kerekasztal Konferenciája, Balatonszemes, Magyarország, p. 11, 2016. 05. 06 - 07.
8. **Tímea Tari**, Piroska Szabó-Révész, Zoltán Aigner: Effect of KCl additive on glycine crystal habit by impinging jet crystallization.
5th International School of Crystallization, Granada, Spain, p. 116, 03 - 05. 06. 2016

9. **Tari Tímea:** Glicin kristályok habitusának optimalizálása impinging jet kristályosítással.
XII. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, Magyarország, p. 34, 2016. 10. 20 - 21.
10. **Tímea Tari**, Zoltán Aigner: Development of continuous antisolvent crystallization process of glycine using impinging jet method.
6th FIP Pharmaceutical World Congress, Stockholm, Sweden, p. 1, 21 - 24. 05. 2017
11. **Tímea Tari**, Zoltán Aigner: Optimization of cilostazol crystal habit by impinging jet crystallization.
4th European Crystallography School, Warsaw, Poland, pp. 102–103, 02 - 07. 07. 2017
12. **Tari Tímea**, Aigner Zoltán: Folyamatos kristályosítási eljárás fejlesztése impinging jet módszerrel.
Magyar Kémikusok Egyesülete – Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 11. Kerekasztal Konferenciája, Balatonszemes, Magyarország, p. 18, 2018. 05. 04 - 05.

EGYÉB ELŐADÁSKIVONAT

1. **Tari Tímea:** Bioszimiláris gyógyszerkészítmények liofilizálási ciklusának fejlesztése.
XIII. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, Magyarország, p. 48, 2018. 11. 22 - 23.