

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológiai Ph.D program
Programvezető: Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktor

Gyógyszertechnológiai Intézet
Témavezető: Dr. Aigner Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Láng Péter

HATÓANYAG-JELÖLT POLIMORFIA SZŰRÉSE

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Erős István, MTA doktor, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet

Tagok: Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., DE Gyógyszertechnológiai Intézet

Dr. Zupkó István, Ph.D., SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Dombi György kandidátus, SZTE Gyógyszeranalitikai Intézet

Opponensek: Dr. Tombácz Etelka MTA doktor, SZTE Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék.

Dr. Markovits Imre Ph.D., Egis Gyógyszergyár Nyrt.

Tagok: Dr. Csóka Ildikó Ph.D., SZTE Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Dr. Doró Péter Ph.D., SZTE Klinikai Gyógyszerészeti Intézet

SZEGED

2016

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a hatóanyagok polimorfizmusának vizsgálata elengedhetetlen a gyógyszerkutatóban és a gyártás során. Ezt a folyamatot hívják „polimorfia szűrésnek”. A szerves anyagok polimorfia szűrése egy igencsak összetett és többrétű feladat, amely komoly kihívást jelent az innovátoroknak és a generikus gyógyszergyáraknak mind gyógyszerészeti, mind iparjogvédelmi szempontból.

A polimorfizmus egy régóta ismert jelenség. Egyes irodalmi adatok alapján a szilárd anyagok 32-51% -nál előfordul (Hilfiker, 2006), míg más források szerint a kristályos hatóanyagok ~90% -ának van polimorf módosulata (Theyer, 2007). Az egyes polimorfok fizikai-kémiai tulajdonságokban úgy, mint az olvadáspont, keménység, oldékonyság, kioldódási sebesség, stb. eltérhetnek a kristályszerkezetükből adódó különbözőségük miatt, ami hatással van a feldolgozhatóságra, a tárolásra, a felszívódásra, a toxicitásra, a hatékonyságra, illetve magára a hatóanyag biohasznosulására. A polimorfia szűrés kiemelkedően fontos, amióta a gyógyszerügyi hatóságok megkövetelik a szilárd fázisú hatóanyagok pontos karakterizálását és a hatóanyag-jelölt csak abban a formában hozható forgalomba, amelyre a drága biológiai, toxikológiai és klinikai vizsgálatokat elvégezték (Byrn et al., 1995, Huang et al., 2004, Raw et al. 2004).

Egy adott gyógyszerforma hatóanyag(ok)ból és segédanyagokból áll. Bár a segédanyagoknak inertnek kell lenniük, mégis befolyásolhatják a hatóanyag felszívódását és a biohasznosulását (Jackson et al., 2000). Az additívek és a különféle szennyezők befolyásolhatják a polimorf kinetikai stabilitását a göcképződésre és a kristály növekedésre kifejtett hatásuk révén (Gu et al., 2002, Hilfiker et al., 2006). Éppen ezért az additívek jelenlétében végzett polimorfia szűrés más eredményekhez vezethet, mint a nélkülük végzett tiszta minták esetében (Hilfiker et al., 2006). A gyógyszeriparban egyre többet használt additívek a cukorészterek, amelyek az élelmiszer- és kozmetikai iparban már régóta elterjedtek. Használják őket, mint emulgens, oldékonyság- és kioldódási sebesség növelők, gél-képzők és kristály növekedés gyorsítók, illetve kristályosodás-gátlók (Mitsubishi Co., 1982, Akoh, 1992, Mutoh et al., 2007, Oh et al., 2006, Garti et al. 2000, Kato et al. 1971, Awad et al., 2002). *Szűts* és munkatársai korábban leírták, hogy egy bizonyos típusú cukorészter befolyásolta egy modellanyag kristályosságának mértékét (Szűts et al., 2011). Ebből adódóan, ha a cukorészter befolyásolhatja egy hatóanyag kristályszerkezetét, hasznos lenne megvizsgálni a szerkezeti változásokat cukorészterek mint additívek jelenlétében is.

2. CÉLKITŰZÉS

A polimorfia szűrés folyamán nem elegendő csupán a szerves oldószerek és a hőmérséklet hatását vizsgálni. A különféle additívek jelenlétét, mint pl. a cukorészterek, is figyelembe kell venni. A cukorészterek, mint felületaktív anyagok, polimorf-váltást eredményezhetnek a kristályosítás folyamán, amely végső soron befolyásolhatja a hatóanyag biohasznosulását.

A Ph.D. munkám célja egy polimorfia szűrési módszer fejlesztése volt egy modell hatóanyagon, továbbá különféle cukorészterek hatásának tanulmányozása a kristályosítási folyamat alatt.

A. Fő célom egy polimorfia szűrési módszer fejlesztése volt egy fázis vizsgálaton megbukott hatóanyag-jelöltön. Különböző kristályosítási és transzformációs módszereket használtam a modell anyag polimorfjainak előállítására. Ily módon nyolc tiszta polimorfot kaptam, amelyeket fénymikroszkóppal, pásztázó elektronmikroszkóppal, porröntgennel, differenciális pásztázó kaloriméterrel és Raman spektroszkópiával azonosítottam. Egy speciális kioldó közeget is fejlesztettem, aminek a segítségével szintén jól elkülöníthető volt a nyolc polimorf.

B. A polimorfok karakterizálása után, a relatív stabilitásukat is vizsgáltuk szuszpenziós kevertetési módszerrel, páratartalom és hőmérsékletre beállítására alkalmas porröntgenés differenciális pásztázó kaloriméterrel.

C. Végezetül, különböző típusú cukorészterek (amelyek manapság széles körben használatosak) jelenlétében végeztem kristályosítást, hogy megállapítsam, van-e polimorf-módosító hatásuk ezeknek a segédanyagoknak.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

Ph.D. munkám során egy fázis vizsgálaton megbukott hatóanyag-jelölt polimorfizmusát tanulmányoztam, kémiai neve 3-[2-({[1-(2-ciklohexiletil)-5-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-1H-1,2,4-triazol-3-yl]amino}karbonil)-6-metoxi-4,5-dimetil-1H-indol-1-yl} propánsav (Sanofi Gyógyszergyár, Budapest).

Az első lépésben a polimorfok előállítását analitikai tisztaságú, különféle szerves oldószerből történő kristályosítással végeztem.

A tiszta oldószerből történő kristályosítás után megismételtem a kísérletet, ugyanazt a módszert alkalmazva, de ezúttal különböző, alacsony (S 370 és L 595) illetve magas HLB-értékkel (S 1570, O 1570 and D 1216) rendelkező cukorészterek jelenlétében (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Japán).

3.2. Minták előállítása

Kristályosítással történő polimorf előállítás

A polimorfok előállítására különböző technikákat alkalmaztam (**1. táblázat**).

Sokk hűtéssel történő kristályosítás: a modell anyag ~100 mg-ját feloldottam az adott oldószer forráspontján, így egy túltelített oldatot kaptam, amelyet aztán tovább hígítottam egy kevés mennyiségű oldószerrel. Az oldatot még melegen leszűrtem 10 µm-es Canula szűrőn keresztül egy jeges fürdőbe állított kémcsőbe.

Lassú hűtéssel történő kristályosítás: Az előző módszert alkalmaztam, de a meleg oldatot lassan hűtöttem (-3 °C/h).

Lassú elpárologtatással történő kristályosítás: Az így kapott termékek a sokk hűtéssel előállított tiszta filtrátumok beszáradt maradékai voltak.

Melegítéses transzformációval történő polimorf előállítás:

A hatóanyag-jelölt két polimorfját (II-es és IVb forma) a kristályosítással kapott polimorfok különböző hőmérsékleten történő melegítésével sikerült előállítani. Amikor az I-es formát 160 °C-on, 6 órán keresztül melegítettem II-es formába alakult. A IVb forma esetében ugyanez a folyamat játszódott le csak magasabb hőmérsékletet kellett alkalmazni (205 °C).

1. táblázat: az egyes polimorfok előállítására használt módszerek

Forma	Módszer	Oldószer	Körülmények
I	kristályosítás	96 %, abs. etanol	sokk hűtés
II	melegítés	-	160 °C/6 óra (I-es formából)
III	kristályosítás	izopropanol, 2-butanon, butilacetát, etilacetát, toluol	sokk hűtés
IVa	kristályosítás	metanol	sokk hűtés
IVb	melegítés	-	205 °C/6 óra (Iva formából)
V	kristályosítás	kloroform	sokk hűtés, lassú hűtés, lassú bepárlás
VI	kristályosítás	acetone, metanol, diklórmétán, 1,4-dioxán	sokk hűtés, lassú hűtés, lassú bepárlás
VII	kristályosítás	acetonitril	sokk hűtés

Cukorészterek jelenlétében kristályosítással történő polimorf előállítás

A polimorfok különféle analitikai vizsgálatokkal történő megkülönböztetése után, megismételtem az oldószeres átkristályosítást különböző cukorészterek jelenlétében. A cukorészterek a HLB-értékük alapján lettek kiválasztva (2. táblázat).

2. táblázat: az felhasznált cukorészterek (CÉ) és oldószeres az additív-indukálta kristályosításhoz

CÉ	Oldószer	HLB	HA:CÉ tömegarány
S 370	kloroform, diklórometán	3	1:1
S 1570	kloroform	15	1:1
O 1570*	96%, abs. etanol, butilacetát, metanol, kloroform, diklórometán, 2-butanon, izopropanol	15	1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1
L 595*	96%, abs. etanol, butilacetát, metanol, kloroform, diklórometán, 2-butanon, izopropanol, etilacetát, toluol, aceton	5	1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1 1:1
D 1216	96%, abs. etanol, 2-butanon, izopropanol, metanol, kloroform, aceton	16	

* Az O 1570 and L 595 cukorészterek esetében, amelyeknél tapasztaltunk polimorf-módosító hatást, további tömegarányokban is vizsgáltuk őket.

3.3. Polimorfia vizsgáló módszerek

A hatóanyag-jelölt részecskeméret eloszlását **fénymikroszkóp** segítségével határoztuk meg, LEICA Image Processing and Analysis System (LEICA Q500MC, LEICA Cambridge Ltd., Cambridge, Egyesült Királyság) műszert használva.

A részecskék morfológiáját **pásztázó elektronmikroszkóppal** vizsgáltuk (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokió, Japán), 1000 x-es nagyobbitást alkalmazva. A minta elektromos vezetőképességének biztosításához Bio-Rad SC 502, VG Microtech készüléket (Uckfield, Egyesült Királyság) használtunk. A légnyomás 1,3 -3,0 mPa volt.

A **Raman** spektrumok szobahőmérsékleten lettek felvéve, Nd-YAG (532 nm) és dióda (785 nm) gerjesztésű lézerrel, valamint hűtött CCD detektorral felszerelt Bruker SENTERRA Dispersive Raman Microscope (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Németország) készülék segítségével.

A **porröntgen** spektrumok Cu K α 1 sugárzású ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) BRUKER D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) lettek rögzítve 2,5 - 40 °/2 θ tartományban.

A **differenciális pásztázó kalorimetrikus** görbéket Mettler Toledo DSC27HP készülék (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Svájc) segítségével kaptuk meg, 10 °C/perc fűtési sebességet használva, 25 °C-ról indulva 250 °C-ig.

A **kioldódási sebességet** szintén tanulmányoztuk módosított lapátos kioldóberendezés alkalmazásával (Pharmatest, Hainburg, Németország). Egy megfelelő kioldó közeget kellett előzetesen kifejleszteni a model anyag rossz vízoldékonysága miatt. Az egyes polimorfokat tartalmazó oldatok koncentrációit spektrofotometriásan határoztuk meg 324 nm-en (Unicam UV/vis spektrofotométer, Unicam Limited, Cambridge, Egyesült Királyság).

3.4 A polimorfok relatív stabilitás vizsgálata

Szuszpenziós kevertetési módszer

Automata laborreaktor rendszert (Avantium Crystal 16, Amszterdam, Hollandia) használtunk a különböző polimorfok szuszpenzióban történő relatív stabilitás vizsgálatánál. Az egyes polimorfok 96 %-os etanolban, illetve szilikon olajban voltak kevertetve. A polimorfok maximum 130 napig voltak vizsgálva szobahőmérsékleten, 50 vagy 70 °C-on (etanol esetében) vagy 200 °C-on (szilikon olaj esetében). A szuszpenzióból időről időre mintát vettünk és az így kapott kristályokat porröntgen vizsgálattal azonosítottuk.

Páratartalom és hőmérsékletre beállítására alkalmas porröntgen

A páratartalom és hőmérsékletre beállítására alkalmas porröntgen diffraktogramokat Cu K α 1 ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) sugárzású, Bruker D8 Advance diffraktométer (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) segítségével rögzítettük 2,5 - 40 °/2 θ tartományban. A páratartalom vizsgálat esetén a következők voltak a paraméterek: 20 és 80% közötti relatív páratartalom, 10 RH% lépésekkel, és a megismételt mérés 20 RH%-on történt. A hőmérséklet 30 °C volt. A hőmérséklet függő porröntgen vizsgálatok 30 és 230 °C között végeztük el, 5 °C-os lépésenként. A sorozat mérések után, a mintákat visszahűtöttük 30 °C-ra és azonnal, illetve egy nap elteltével is megmértük.

Differenciális pásztázó kaloriméter

A differenciális pásztázó kaloriméter vizsgálatokat egy 821e típusú, 9.30 szoftver verziójú Mettler Toledo STARe thermal analysis system készülék (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Svájc) segítségével végeztük el 1, 10 vagy 30 °C/perc lineáris fűtési sebességet alkalmazva. A vizsgálatok 25-250 °C hőmérsékleti tartományban történtek. A modulált hőmérsékletű differenciális pásztázó kaloriméterrel végzett vizsgálat paramétereit a következők voltak: hőmérsékleti tartomány: 25-250 °C; fűtési sebesség: 10 °C/perc; amplitúdó: 0,5 vagy 1 °C; period: 0.5 or 1 min.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A polimorfok azonosítása

Fénymikroszkóp

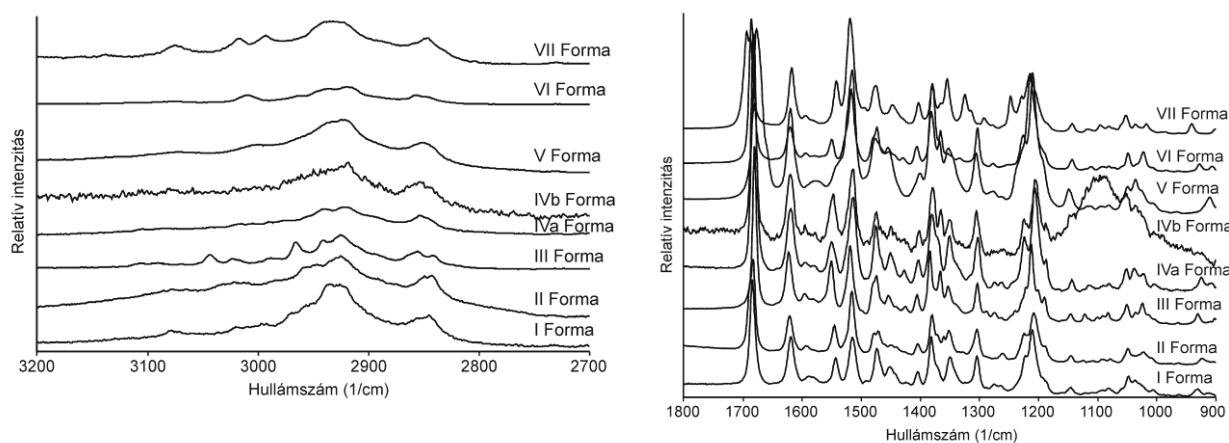
A részecskék legtöbbje a 10-25 µm-es mérettartományba esett. A legkisebb részecskéi a IVa Formának, míg a legnagyobbak a VI-os Formának voltak. Az I-es és II-es Formák átlageredményei nagyon hasonlóak voltak. Az V-ös Forma rendelkezett a legkerekdedebb formával, ezáltal a legnagyobb felülettel, ami magyarázat a legjobb kioldódási sebesség profilra. A II-es és IVb Formák melegítéssel lettek előállítva, egyik polimorf másikba történő átalakításával, és nem volt szignifikáns különbség a részecskeméretükben.

Pásztázó elektronmikroszkóp

A pásztázó elektronmikroszkópos képek alátámasztották, hogy a polimorfok kristályai különbséget mutatnak mind méretükben, morfológiájukban és felszínükben. Az I-es Forma hosszú, tűs kristályos megjelenésű. Amikor az I-es Formát 160 °C-ig melegítettük, az átalakulás egy új szerkezetet eredményezett. A II-es Formát 25-60 µm-es prizma alakú kristályok jellemzik. A III-as Forma főleg szabálytalan alakú, sima felszínű, 50 µm-es trapézoid kristályokból áll. Az V-ös Forma kristályai ~25 µm-esek, közel ditrigonális morfológiával. A IVa Forma és a IVb Forma (amit a IVa Formából melegítéssel kaptunk) nagyon hasonlítottak egymásra, amelyeket karcsú ditrigonális és ditetragonális prizmák jellemzik. IVa Forma kristályai kisebbek voltak, mint a IVb Formáé. A VI-os és VII-es Forma kristályai nagyon szabálytalan alakúak és változatos méretűek voltak.

Raman spektroszkópia

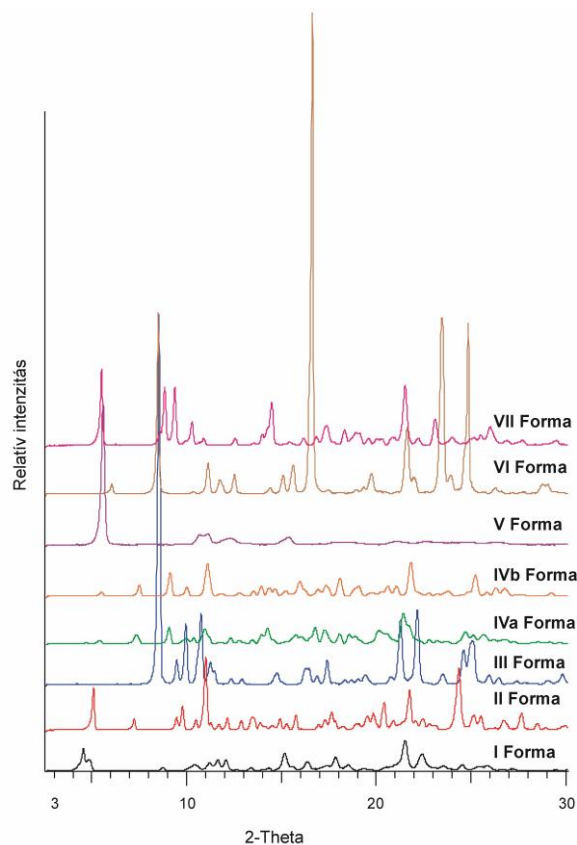
A model anyag Raman-szenzitív C-O-C, C=O, C-N(-N-), metil és karboxil csoportokat, valamint ciklohexán, triazol, aromás és indol gyűrűket tartalmaz. Jól látható különbségek vannak a Raman spektrumokban a 3200-2800 cm^{-1} , és különösen a 1800-900 cm^{-1} tartományokban (1. ábra). Az I-es és IVb Formák Raman spektrumai alacsony Raman intenzitásokat mutattak (5000 és 900) a többi formához viszonyítva (16000-40000). Ráadásul a IVb Forma kedvezőtlen jel-zaj arányt mutat és enyhe fluoreszcenciával is bír.



1. ábra: A nyolc polimorf Raman spektruma

Porröntgen

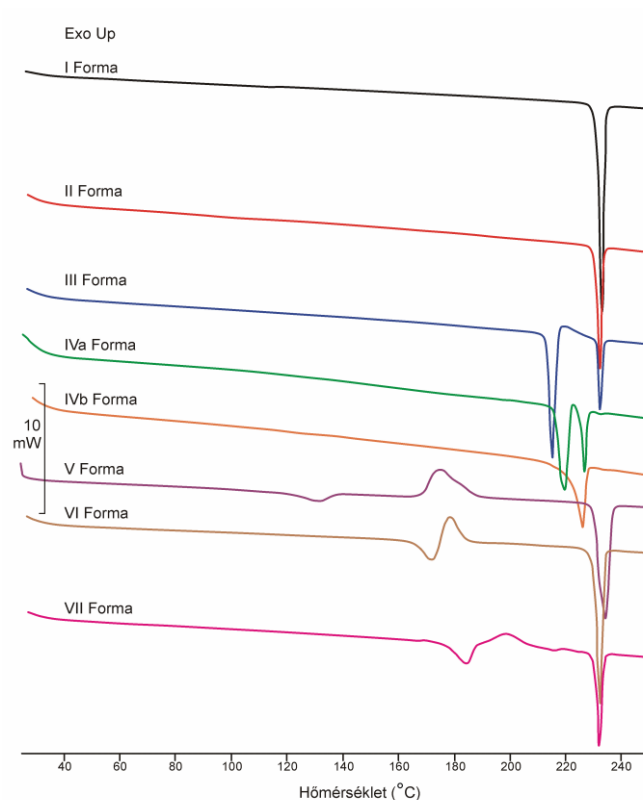
A nyolc polimorf porröntgen diffraktogramját a 2. ábra mutatja. A karakterisztikus csúcsok 4 és 26° 2 θ között helyezkednek el. Mind a nyolc polimorf esetében jól látható különbségek jelennek meg a porröntgen vizsgálatuk folyamán, kivéve IVa és IVb Formánál, de ez a két polimorf más analitikai módszerekkel jól megkülönböztethető, habár kristályszerkezetük nagyon hasonló.



2. ábra: A nyolc polimorf porröntgen diffraktogramjai

Differenciális pásztázó kaloriméter (DSC)

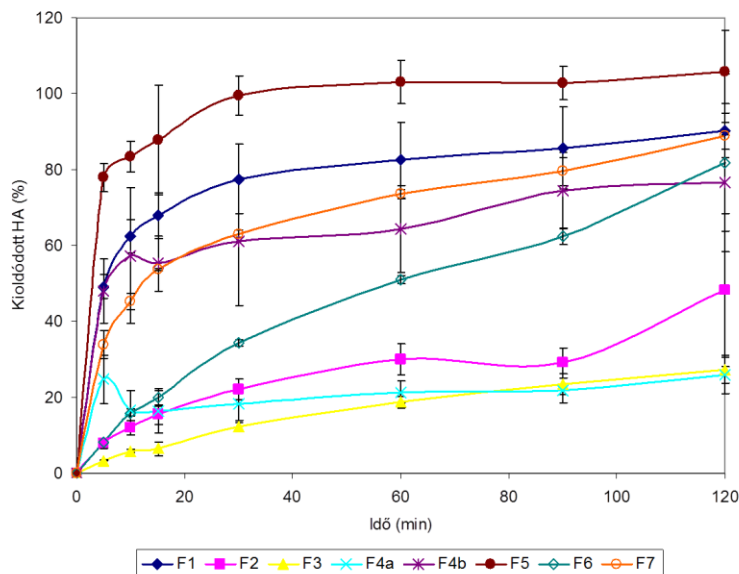
A nyolc polimorfot különböző DSC csúcsok jellemzik, kivéve az I-es és a II-es Formát, amelyeknek csak egy endoterm csúcsa van $\sim 232\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál (a DSC körülmények alatt, az I-es Forma átalakul II-es Formává). A III-as, V-ös, VI-os, és VII-es Formák több csúccsal is rendelkeznek (endoterm és exoterm), amelyek a melegítésen keresztüli megolvadást mutatják. Ennek a négy polimorfnak egy közös csúcsa van $\sim 232\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál, amely megfelel a II-es Formának. Következésképpen a nyolcból öt polimorf II-es Formába alakul melegítésen keresztül megolvadva (monotrópia) vagy anélkül (enantiotrópia). A IVa Forma esetében, két endoterm csúcs figyelhető meg $219\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $227\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál, míg a IVb Forma csupán egy endoterm csúcsot ad $227\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál, ami a IVa Forma melegítés hatására IVb Formává való átalakulását jelzi.



3. ábra: A nyolc polimorf DSC görbéje

Kioldódási sebesség vizsgálat

A kioldódási sebesség vizsgálat egy további kiegészítő analitikai eljárás volt a kapott polimorfok megkülönböztetésére. A kifejlesztett kioldó közegben, a kioldódási görbék jól elkülöníthetők egymástól (4. ábra). A leggyorsabb kioldódást és a legtöbb kioldódott anyagot az V-ös Forma esetében tapasztaltuk, míg a III-as Forma mutatta a leglassabb kioldódást, de a legkevesebb kioldódott mennyiség a IVa Formához tartozott. A IVa és IVb Forma esetében, az ún. “burst effect” jelenség figyelhető meg a kioldódási görbe elején. Ez a két polimorf kicsi részecskeméretével magyarázható.



4. ábra: A nyolc polimorf kioldódási görbéje

4.2. Relatív stabilitás vizsgálat

A kapott polimorfok relatív stabilitását három különböző analitikai módszerrel vizsgáltuk. A polimorfok 2 éves tárolás alatt is stabilak maradtak és semmilyen morfológiai változás nem mutatkozott.

Szuszpenziós kevertetési módszer

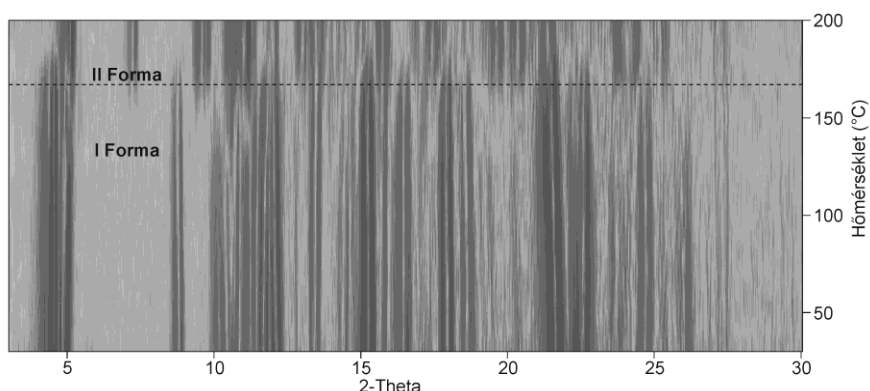
Az etanolos szuszpenziók szobahőmérsékleten való kevertetési vizsgálatakor az I-es, V-ös, VI-os és VII-es Formák III-as Formába alakultak át, míg a II-es, III-as, IVa és IVb Formák semmilyen változáson nem mentek át a 130 napos vizsgálat alatt. 50 °C-on, az I-es Forma átalakult III-as Formába és a III-as Forma pedig IVb-be. A többi vizsgált forma (II-es, IVa és IVb) változatlanul maradtak a vizsgált időtartamban. 70 °C-on, az I-es Forma II-es Formába, a III-as Forma IVb Formába, és a IVa Forma szintén IVb Formába, míg a II-es és a IVb Forma nem változott semmit a vizsgált periódusban.

A polimorfok szilikonolajban való kevertetésekor 200 °C-on, csak az I-es és a III-as Forma alakult át II-es Formába. Ahogyan várható volt, a IVa Forma átalakult IVb Formába. A többi forma nem volt vizsgálva. A II-es és a IVb Forma nem alakultak át egymásba.

Páratartalom és hőmérsékletre beállítására alkalmas porröntgen

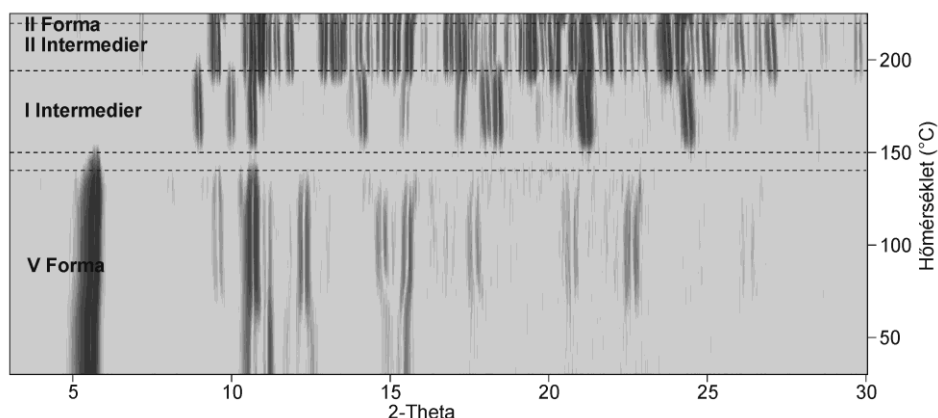
Az *in situ* páratartalom beállítására alkalmas porröntgen analízis nem tárt fel változásokat a nyolc polimorfnál. Mindegyik stabil maradt a 20-80 RH%-os tartományban és a 20 RH%-on megismételt mérésnél is.

Ezzel szemben, az *in situ* hőmérséklet beállítására alkalmas porröntgen analízis már érdekesebb eredményeket adott a polimorf átalakulás vizsgálat alatt egyes formáknál. Az I-es Forma diffrakciós csúcsainak intenzitása folyamatosan csökkent a melegítés alatt. Az I-es Forma átalakulása 155 °C-nál kezdődött és ~ 190 °C-nál fejeződött be (5. ábra).



5. ábra: Az I-es Forma 2 dimenziós hőmérséklet beállítására alkalmas porröntgen diffraktogramja 30-200 °C tartományban

A hőmérséklet beállításra alkalmas porröntgen vizsgálatok azt mutatták, hogy a II-es Forma a legstabilabb és ezt a DSC vizsgálatok is megerősítették. A III-as Forma átalakulása ~ 215 °C-on kezdődött és visszahűlés után a II-es Formát kaptuk. A hőmérséklet növelése 225 °C-ig nem okozott semmilyen változást IVa és IVb Formák esetében, de 30 °C-ra történő visszahűlésük után amorffá váltak. Az V-ös Forma melegítése egy új forma (I-es Intermedier) megjelenését eredményezte ~ 150 °C-nál, amely különbözött az összes eddig kapott polimorfától. Az anyag további melegítésével, egy másik fázis átalakulás indult meg ~ 190 °C-nál, amely egy második új formát eredményezett (II-es Intermedier), és végül a II-es Forma kristályosodott ki (6. ábra).



6. ábra: Az V-ös Forma 2 dimenziós hőmérséklet beállítására alkalmas porröntgen diffraktogramja 30-230 °C tartományban

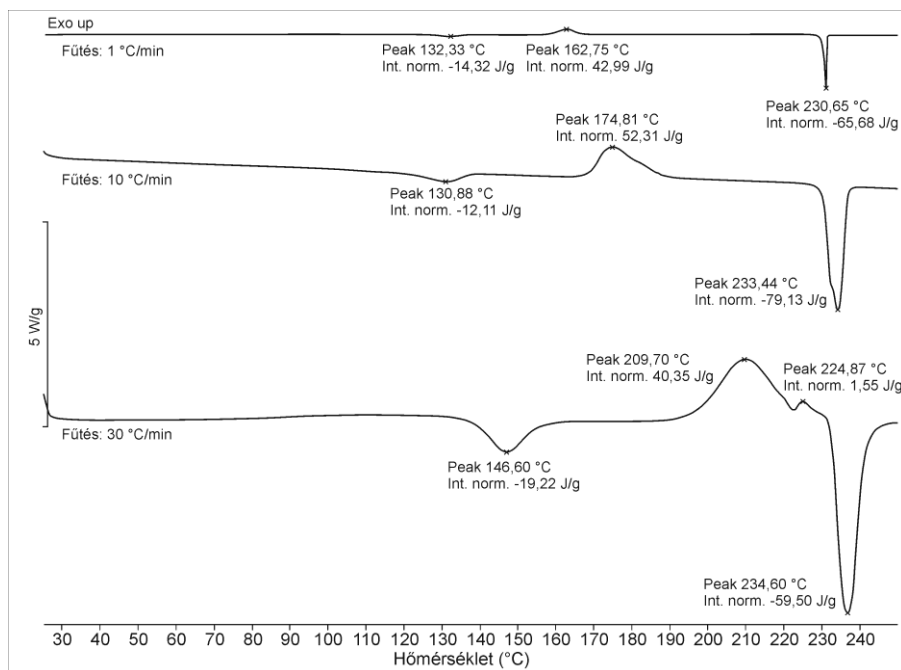
A VI-os Forma melegítése során, két fázis átalakulási folyamat is tapasztalható volt (I-es Intermedier és II-es Forma). Végül, az I-es Formához hasonlóan, a VII-es Forma is II-es Formába alakult.

Az I-es és II-es Intermediereket nem tudtuk előállítani a vizsgálat során: habár a melegítést adott hőmérsékleten felfüggesztettük, az átalakulási folyamat folytatódott. Ez a két forma instabil módosulatok; minden kísérlet az előállításukra, II-es Formát eredményezett.

Differenciális pásztázó kaloriméter

A DSC vizsgálatokat az összes polimorf esetében számos fűtési sebességgel végeztük el (1, 10 és 30 °C perc⁻¹). Az eredmények megerősítették a porröntgen vizsgálat eredményeit. A különböző fűtési sebességgel végzett DSC vizsgálatokat, különböző eredményekhez vezettek. Mind az alacsony, mind a magas fűtési sebesség – bizonyos esetekben – többlet információval szolgált a fázis átalakulási folyamatokról.

Az V-ös Forma két Intermedier formája szintén látszódott a DSC görbén is, de csak magasabb fűtési sebesség esetén (7. ábra).



7. ábra: Az V-ös Forma DSC görbéi különböző fűtési sebességnél

A VI-os Forma fázis átalakulása szintén jól látható volt a DSC görbén 10 °C perc⁻¹ fűtési sebességnél. A 178 és 186 °C-nál jelentkező endoterm és exoterm pár megfelel az I-es Intermedier megjelenésének.

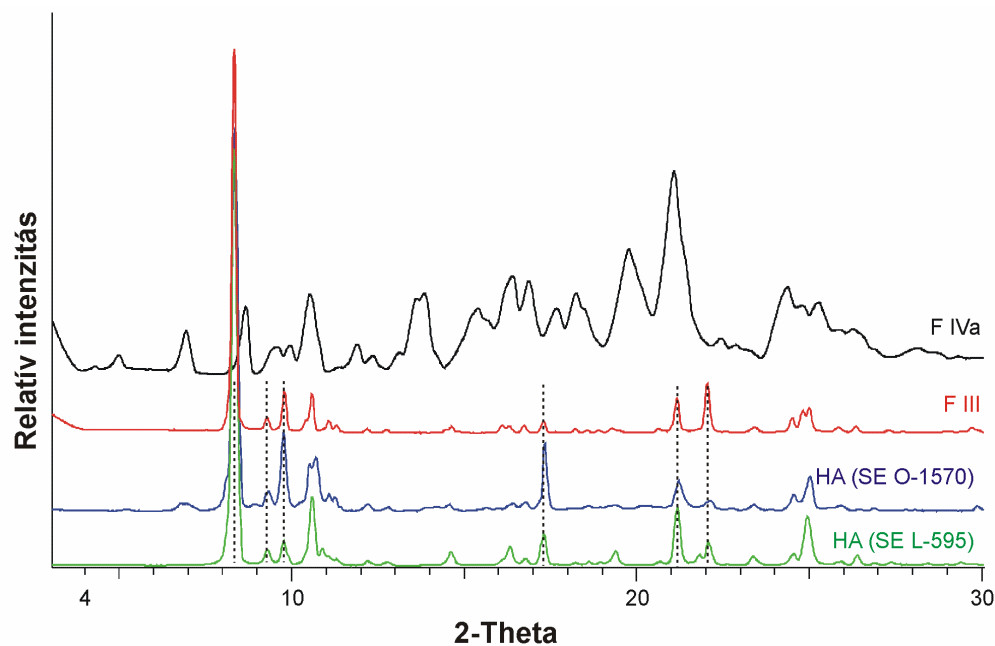
A modulált hőmérsékletű differenciális pásztázó kaloriméter vizsgálatok nem adtak a mi esetünkben többlet információt, ezért az eredményeket nem jelenítem meg a Ph.D. munkámban.

A II-es formához tartozó endoterm olvadási entalpia érték bizonyult a legmagasabbnak, míg az V-ös Formáé a legalacsonyabb.

4.3. A cukorészter hatása a model anyag polimorfizmusára

Az első öt kiértékelt mintában, a model anyag és a cukorészter aránya 1:1 volt. Minden esetben, porröntgennel azonosítottuk a formákat és hasonlítottuk össze a cukorésztert tartalmazó mintákat a tiszta polimorfokkal. Két cukorészter, az L 595-es szacharóz-laurát (HLB 5) és az O 1570-es szacharóz-oleát (HLB 15), esetében azt találtuk, hogy az eredeti IVa Forma helyett a III-as Forma kristályosodott ki a jelenlétükben (8. ábra). A másik három kiválasztott cukorészternek (S 370, S 1570 and D 1216) nem volt polimorfia-módosító hatása.

A második lépésben, az L 595 és az O 1570 cukorészter polimorfia-módosító hatását vizsgáltuk négy további koncentrációban. Mind a kettő cukorészter ugyanazt az eredményt hozta: a IVa Forma helyett a III-as Forma jelent meg, kivéve, amikor a cukorészter mennyisége 4x annyi volt, mint a model anyagé a mintában. Ebben az esetben, semmilyen karakterisztikus csúcsok nem voltak láthatóak a porröntgen diffraktogramokon, ami a cukorészterek kristályosodás-gátló tulajdonságával magyarázható.



8. ábra: Az O-1570 és az L-595 cukorészter jelenlétében kristályosított minták porröntgen diffraktogramjai összehasonlítva az eredeti III-as és IVa Formákkal

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Ph.D. munkám fő célja egy modell anyagon kifejlesztett polimorfia szűrési módszer volt, továbbá különböző cukorészterek hatásának vizsgálata a kristályosítási folyamat alatt.

A. Polimorfok előállítása és azonosítása

Egy, a Sanofi (Magyarország) gyógyszergyártól kapott, fázis vizsgálaton megbukott hatóanyag-jelöltet vizsgáltuk, hogy különféle analitikai vizsgálatok útján megvizsgáljuk annak polimorfizmusát. Az elsődleges cél egy polimorfia szűrési protokoll kifejlesztése volt. Kristályosítási és transzformációs módszerekkel, nyolc polimorfot sikerült előállítani és azonosítani fénymikroszkóppal, pásztázó elektronmikroszkóppal, porröntgennel,

differenciális pásztázó kaloriméterrel és Raman spektroszkópiával. Az egyes polimorfok különböző oldékonysággal rendelkeznek, ami befolyásolja a hatóanyag biohasznosulását, éppen ezért fontos megvizsgálni a különböző polimorfok kioldódását. A modell anyag rossz vízoldékonysága miatt, egy speciális kioldó közeget kellett fejleszteni, amelyben a nyolc tiszta polimorf kioldódási görbéje jól elkülöníthető.

A porröntgen mindig a döntő vizsgáló módszer a polimorfok azonosításánál, habár bizonyos esetekben (lásd: IVa és IVb Forma) egyéb analitikai vizsgálatok is kellettek az egyes önálló formák beazonosításához.

B. Polimorf átalakulások vizsgálata

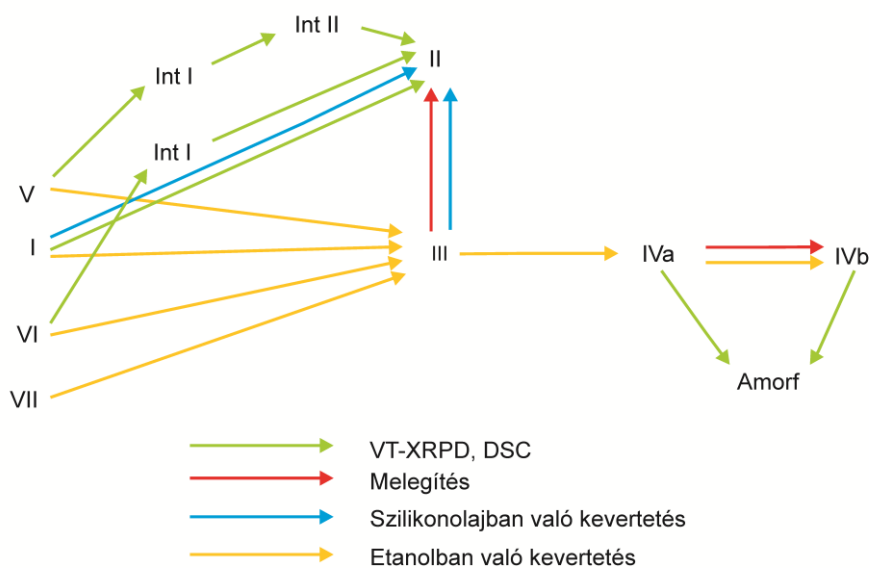
A polimorfok előállítása és azonosítása után, a relatív stabilitásukat is vizsgáltuk szuszpenziós kevertetési módszerrel, páratartalom és hőmérsékletre beállítására alkalmas porröntgennel, valamint differenciális pásztázó kaloriméterrel.

A szuszpenziós kevertetési módszert Avantium Crystal 16 automata laborreaktor rendszerrel végeztük, porröntgen vizsgálattal kiegészítve a polimorfok morfológiájának meghatározásához. A legfőbb előnye ennek a módszernek, hogy az oldószer és a hőmérséklet-közvetített polimorfia átalakulást lehet vele vizsgálni.

A DSC vizsgálatnál, különböző fűtési sebességek használata javasolt, hogy megfelelő információt kapjunk a fázis-átalakulási folyamatok részleteiről. Irodalmi adatok alapján a modulált fűtési sebességű DSC több adattal szolgálhat, viszont a mi esetünkben nem nyújtott plusz információt.

A modell anyagunk nem volt érzékeny a páratartalomra és ebből kifolyólag a relatív páratartalom változtatásának sem volt hatása a polimorfok átalakulására.

Az *in situ* hőmérséklet beállítására alkalmas porröntgen vizsgálatok új utakat tártak fel a polimorfok átalakulási folyamataiban. Két új instabil intermedier forma jelent meg az V-ös és VI-os Forma melegítése során, ugyanakkor ezt a két instabil formát nem sikerült kristályosítással előállítani. Összefoglalva, a hőmérséklet beállítására alkalmas porröntgen egy nagyon hasznos *in situ* technika a fázis-átalakulások nyomonkövetésénél. A relatív stabilitás vizsgálat eredményét egy átalakulási folyamatábrán mutatjuk be (9. ábra).



9. ábra: A fázis-átalakulások folyamatábrája

C. A cukorészterek hatása a polimorfizmusra

HLB értékük alapján kiválasztott, különböző cukorészterek jelenlétében végzett kristályosítással tanulmányoztuk azok polimorf-módosító hatását. A felhasznált cukorészterek közül kettő módosította az eredeti formát és ez a módosító hatás különböző koncentrációkban is igazolva volt. Ez a tulajdonság nem függött azok HLB értékétől.

6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI VONATKOZÁSAI

Ebben a tézisben bemutatott eredmények hasznos információval szolgálnak hatóanyag-jelölt polimorfia szűrési vizsgálata esetében. Gyógyszerek fejlesztése során, nélkülözhetetlen a polimorfia vizsgálat mind gazdasági, mind terápiás szempontból. A termodinamikai stabilitás pontos meghatározása azért nagyon lényeges, mert nem várt polimorfok jelenhetnek meg a gyártás során. Ilyen relatív stabilitás meghatározásra nagyon hasznos technika a hőmérséklet beállítására alkalmas porröntgen.

A polimorfia szűrés folyamán, nem elegendő csupán hagyományos kristályosítási módszereket alkalmazni, ahol az oldószer és a hőmérséklet befolyásolja a kristály kialakulását. A gyógyszergyártás során alkalmazott különböző aditívek, különösen a felületaktív anyagok, mint pl. a cukorészterek hatását is számításba kell venni. A

cukorészterek alkalmazása a gyógyszeriparban is egyre növekszik a kedvező tulajdonságaik miatt úgy, mint az oldékonyság-növelés vagy az emulgeálás. Ahogy arra ez a Ph.D. munka is rávilágít, ezeknek a gyakran használt aditíveknek polimorfia-módosító hatásával is számolni kell, mivel nemkívánt változásokat idézhetnek elő a termékben.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÖZLEMÉNYEK

1. Szűts, A.; **Láng, P.**; Ambrus, R.; Kiss, L.; Deli, M. A.; Szabó-Révész, P.: Applicability of sucrose laurate as surfactant in solid dispersions prepared by melt technology Int. J. Pharm., 410 (2011) 107-110.

IF: 3.650

2. **Láng, P.**; Kiss, V.; Ambrus, R.; Farkas, G.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z.; Várkonyi, E.: Polymorph screening of an active material J. Pharm. Biomed. Anal., 84 (2013) 177–183.

IF: 2.979

3. **Láng, P.**; Várkonyi, E.; Ulrich, J.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z.: Analysis of the polymorph changes of a drug candidate J. Pharm. Biomed. Anal., 102 (2015) 229-235.

IF: 2.979 (2014)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

Verbális előadások

1. **Láng, P.;** Kiss, V.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z., Várkonyi, E., Potenciális farmakon-jelölt polimorfia szűrése:

MKE Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály Kerekasztal Konferenciája, Balatonszemes, 2012. október 26-28.

Aigner, Z., **Láng, P.;** Szabó-Révész, P.; Várkonyi, E.: Polimorf származékok relatív stabilitás vizsgálata különböző fűtési sebességű DSC és hőmérséklet + páratartalom beállítására alkalmas porröntgen berendezéssel, MKE Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály Kerekasztal Konferenciája, Balatonszemes, 2012. október 26-28.

2. **Láng, P.;** Várkonyi, E.; Ulrich, J.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z.: Hatóanyag-jelölt polimorf módosulatainak vizsgálata, MKE Termoanalitikai Szakcsoport Termoanalitikai Szemináriuma, Szeged, 2014. november 21.

Poszter prezentációk

1. **Láng, P.;** Kiss, V.; Ambrus, R.; Farkas, G.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z.; Várkonyi, E., Screening of polymorph forms of a former drug candidate: 8th Word Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey, 19-22. March 2012., Solid State Characterisation /P-184/

2. **Láng, P.;** Várkonyi, E.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z.: Relative stability of a former-drug candidate's polymorphs, 9th Word Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon, Portugal, 31 March-3 April 2014., Starting materials /P-254/