

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Studium chování amorfních účinných látek  
Disertační práce

2022

Ing. Jana Romanová

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Study of behaviour of amorphous drugs  
Dissertation thesis

2022

Ing. Jana Romanová

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28.01.2022

Jana Romanová

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. Ing. Jiřímu Málkovi, DrSc a školitelům specialistům doc. Ing. Aleně Komersové, PhD a Ing. Romanovi Svobodovi, PhD. za jejich ochotu, podporu a pomoc při výzkumu v rámci mého doktorského studia. Během své výzkumné činnosti jsem spolupracovala s farmaceutickou společností Zentiva k.s., která mi poskytla materiály a přístrojové vybavení potřebné k mé vědecké práci. Chtěla bych poděkovat mým konzultantům, specialistům ze zmíněné společnosti, kteří mi po celou dobu mého studia předávali cenné zkušenosti a rady. Jmenovitě děkuji Ing. Tomáši Pekárkovi, Ph.D, Ing. Ivě Obadalové a Ing. Lukáši Krejčíkovi. Chtěla bych rovněž poděkovat Ing. Michalu Šimkovi, PhD a Ing. Ondřeji Dammerovi Ph.D., za měření a pomoc s vyhodnocením práškové rentgenové difrakce a Ing. Jaroslavu Havlíčkovi, CSc., za měření a vyhodnocení pevnofázové nukleární magnetické resonance. Velmi oceňuji možnost být členem Centra pro aplikovaný farmaceutický výzkum (The Parc), které mi umožnilo zajímavou stáž ve farmaceutickém výzkumném ústavu ve Varšavě.

Chtěla bych poděkovat spolupracovníkům z výzkumných skupin profesora Jiřího Mála a docentky Aleny Komersové a kolegům z oddělení Preformulace a biofarmacie Zentiva k.s. za jejich spolupráci a cenné rady. Chtěla bych rovněž poděkovat své kamarádce Ing. Dítě Spálovské za její podporu, cenné rady a jazykovou korekturu této disertační práce.

Část této práce byla financována grantovou agenturou české republiky pod projektem č. 17-11753S a projekty LM2015082 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001829. V neposlední řadě chci poděkovat Centru materiálů a nanotechnologií (projekt LM2018103) za měření skenovací elektronové mikroskopie. Část práce během doktorského studia byla prováděna v zahraničí během 11 měsíční stáže v Japonsku, která byla financována prostřednictvím programu (International Cooperative Graduate Program) založeného na mezinárodní spolupráci mezi Univerzitou Pardubice a NIMS, Japonsko. Chtěla bych tedy rovněž poděkovat prof. Kohsaku Kawakami za odborné vedení během mé stáže v NIMS.

## SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Romanová, J.; Svoboda, R.; Obadalová, I.; Beneš, L.; Pekárek, T.; Krejčík, L.; Komersová, A. Amorphous Enzalutamide – Non-Isothermal Recrystallization Kinetics and Thermal Stability. *Thermochimica Acta* **2018**, *665*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.05.020>.

Svoboda, R.; Romanová, J.; Šlang, S.; Obadalová, I.; Komersová, A. Influence of Particle Size and Manufacturing Conditions on the Recrystallization of Amorphous Enzalutamide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *153*, 105468. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105468>.

Brandová, D.; Svoboda, R.; Zmrhalová, Z. O.; Chovanec, J.; Bulánek, R.; Romanová, J. Crystallization Kinetics of Glassy Materials: The Ultimate Kinetic Complexity? *J Therm Anal Calorim* **2018**, *134* (1), 825–834. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7078-1>.

Knapik-Kowalczyk, J.; Kramarczyk, D.; Chmiel, K.; Romanova, J.; Kawakami, K.; Paluch, M. Importance of Mesoporous Silica Particle Size in the Stabilization of Amorphous Pharmaceuticals—The Case of Simvastatin. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (4), 384. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040384>.

## ANOTACE

Nízká rozpustnost farmakologicky účinných látek (API) je jedním z největších problémů, kterým v současnosti čelí farmaceutický průmysl. Téměř 40 % API uvedených na trh a 90 % API nacházejících se ve výzkumu je téměř nerozpustných ve vodě. Mnohonásobného zvýšení rozpustnosti je možno dosáhnout převedením krystalické API na amorfni formu. Toto zvýšení může až 1000krát převyšovat termodynamickou rozpustnost zkoumané API. Během PhD studia bylo řešeno chování několika amorfni API. Předložená disertační práce se zabývá chováním amorfniho enzalutamidu, který byl zde použit jako modelové léčivo. Kapitola Výsledky a Diskuze je rozdělena do dvou kapitol. V první kapitole je řešena příprava amorfniho enzalutamidu a jeho pevnofázová stabilita. Předmětem uvedené kapitoly je kinetický popis krystalizace pomocí diferenční skenovací kalorimetrie. Predikované krystalizační chování připraveného amorfniho materiálu bylo korelováno s výsledky krátkodobých a dlouhodobých stabilitních testů. Nejdůležitějším přínosem této disertační práce je optimalizace predikčních výpočtů a posléze možnost velmi přesné predikce krystalizace vybrané API. Neméně důležité je chování amorfni API během jejího rozpouštění, proto druhá podkapitola kapitoly Výsledky a Diskuze se věnuje disolučnímu chování amorfniho enzalutamidu a možnostmi udržení jeho přesyceného stavu. Amorfni enzalutamid byl shledán jako velmi rychle krystalizující API, a to jak v pevné fázi, tak během disoluce. V této disertační práci byly identifikovány vlivy, které nejvíce ovlivňují krystalizační chování amorfniho enzalutamidu, a možnosti jakými se jeho krystalizaci vyhnout či ji zpomalit.

## KLÍČOVÁ SLOVA

amorfni enzalutamid, fyzikální stabilita amorfni API, predikce krystalizace, disoluční chování enzalutamidu

## TITLE

Study of behaviour of amorphous drugs

## ANNOTATION

Nowadays, the low water solubility of active pharmaceutical ingredients (API) is one of the biggest challenges of the pharmaceutical industry. Almost 40 % of the marketed APIs and 90 % of the APIs being developed are nearly insoluble in water. A multifold increase in solubility might be achieved by the conversion of crystalline API to amorphous form. The increase can be up to 1000 times higher than the thermodynamic solubility of the API. The behaviour of several amorphous drugs was investigated during my PhD study. Presented dissertation theses deal with the behaviour of amorphous enzalutamide, which was used as the model drug. The chapter of Results and Discussion is divided into two subchapters. The first subchapter deal with the preparation of the amorphous form and its solid-state stability. The subject matter of this subchapter is a kinetic description using differential scanning calorimetry. The crystallization behaviour has been correlated with the results of short-term and long-term stability testing. The big benefit of the dissertation for the future is the optimization of the prediction crystallization and the possibility to accurately predict crystallization. Equally important is the behaviour of the amorphous API during its dissolution; therefore, the second subchapter of chapter Results and Discussion is devoted to the dissolution behaviour of the amorphous enzalutamide and its ability to maintain oversaturated state. Amorphous enzalutamide was found to crystallize very rapidly, both in solid-state and during dissolution. This dissertation identifies the most important factors influencing the crystallization of amorphous enzalutamide and possibilities to avoid or slow down its crystallization.

## KEYWORDS

amorphous enzalutamide, the physical stability of amorphous API, prediction of the crystallization, dissolution behaviour of enzalutamide

## OBSAH

ÚVOD .....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1.1. Léčiva a lékové formy.....	16
1.2. Biodostupnost API .....	17
1.2.1. Rozpustnost.....	17
1.2.2. Permeabilita.....	19
1.2.3. Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS) .....	20
1.2.4. Zvýšení rozpustnosti API.....	21
1.3. Amorfnní systémy .....	23
1.3.1. Amorfnní API.....	23
1.3.2. Příprava amorfnních systémů.....	27
1.3.2.1. Příprava amorfnních systémů: Termodynamický pohled .....	27
1.3.2.2. Příprava amorfnních systémů: Metody vycházející z taveniny .....	29
1.3.2.3. Příprava amorfnních systémů: Metody vycházející z roztoku.....	31
1.3.2.4. Příprava amorfnních systémů: Metody vycházející z krystalického materiálu .....	32
1.4. Fyzikální stabilita amorfnních látek.....	32
1.5. Pozice amorfnních API na trhu .....	38
1.6. Enzalutamid - API studovaná v rámci disertační práce .....	39
1.7. Experimentální metody použité k charakterizaci API .....	41
1.7.1. Diferenční skenovací kalorimetrie .....	41
1.7.2. Disoluční testy.....	46
1.7.2.1. Historický vývoj disolučního testování.....	47
1.7.2.2. Experimentální podmínky disoluce.....	47
1.7.2.3. Analýza a kvantitativní popis disolučních profilů API .....	49
1.7.2.4. Další kritéria používaná pro vyhodnocování disolučních profilů .....	51
1.7.2.5. Ovlivnění disoluční rychlosti .....	52
1.7.2.6. Disoluce amorfnních API.....	53
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	54
2.1. Materiály .....	54
2.1.1. API .....	54
2.1.2. Polymery a další excipienty .....	54
2.1.3. Rozpouštědla a soli .....	54

2.2.	Metody použité při studiu pevnofázové stability amorfních API .....	54
2.2.1.	Příprava amorfního enzalutamidu .....	54
2.2.1.1.	Příprava amorfního enzalutamidu: Extruzí taveniny (HME).....	54
2.2.1.2.	Příprava amorfního enzalutamidu: Příprava na vakuové odparce (TE).....	55
2.2.1.3.	Příprava amorfního enzalutamidu: Sprejové sušení (SD).....	55
2.2.2.	Zrychlené stabilitní testy .....	56
2.2.3.	Dlouhodobé stabilitní testy .....	56
2.2.4.	Stabilita amorfního materiálu v průběhu stárnutí.....	57
2.2.5.	Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC).....	57
2.2.6.	Modulovaná diferenční skenovací kalorimetrie.....	57
2.2.7.	Optická mikroskopie .....	57
2.2.8.	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) .....	58
2.2.9.	Termogravimetrická analýza (TGA).....	58
2.2.10.	Prášková rentgenová difrakce (XRPD).....	58
2.2.11.	Pevnofázová nukleární magnetická rezonance ( <i>ss</i> -NMR) .....	58
2.2.12.	Infračervená spektroskopie (IČ).....	58
2.2.13.	Ramanova spektroskopie .....	59
2.2.14.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	59
2.2.14.1.	Metoda HPLC pro stanovení čistoty enzalutamidu .....	59
2.3.	Metody použité při studiu disoluční kinetiky amorfní a krystalické API .....	60
2.3.1.	API testovaná v této studii .....	60
2.3.2.	Příprava granulátu .....	60
2.3.3.	Příprava tablet .....	61
2.3.4.	Příprava disolučního média.....	61
2.3.4.1.	Příprava fosfátového pufru s přídavkem SLS (0,2 %).....	61
2.3.4.2.	Příprava fosfátového pufru s přídavkem TWEEN <sup>®</sup> 20 (0,005 %).....	61
2.3.4.3.	Příprava kalibračního roztoku pro metodu UV-VIS u pravé disoluce .....	61
2.3.4.4.	Příprava kalibračních roztoků pro metodu UV-VIS u disoluce API v práškové formě. .....	62
2.3.5.	Pravá disoluce (Apparent intrinsic dissolution) .....	62
2.3.6.	Disoluce API v práškové formě .....	63
2.3.7.	Klasická disoluce .....	64
2.3.8.	SEM.....	64
2.3.9.	Infračervená spektroskopie .....	64

2.3.10.	Ramanova spektroskopie .....	64
2.3.11.	Prášková rentgenová difrakce .....	65
2.3.12.	Diferenční skenovací kalorimetrie .....	65
3.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	66
3.1.	Pevnofázová stabilita amorfního enzalutamidu .....	67
3.1.1.	Příprava amorfního enzalutamidu pomocí DSC .....	67
3.1.2.	Pevnofázová forma enzalutamidu připravená na vakuové odparce .....	70
3.1.3.	Pevnofázová forma enzalutamidu připravená extruzí.....	77
3.1.4.	Pevnofázová forma připravená sprejovým sušením .....	84
3.1.5.	Další výsledky charakterizačních technik připravených forem enzalutamidu.....	85
3.1.6.	Porovnání kinetiky krystalizace amorfního enzalutamidu připraveného dvěma metodami .....	92
3.1.7.	Porovnání kinetiky krystalizace amorfního enzalutamidu s různou velikostí částic	101
3.1.8.	Amorfní enzalutamid pro stabilitní testování.....	111
3.1.9.	Výsledky krátkodobých a dlouhodobých stabilitních testů amorfního enzalutamidu .....	115
3.1.9.1.	Diferenční skenovací kalorimetrie .....	115
3.1.9.2.	Skenovací elektronová mikroskopie .....	118
3.1.9.3.	XRPD .....	123
3.1.9.4.	<i>ss</i> -NMR .....	123
3.1.9.5.	Infračervená spektroskopie .....	125
3.1.9.6.	HPLC.....	127
3.1.10.	Shrnutí chování amorfního enzalutamidu .....	127
3.2.	Benefity plynoucí z použití amorfní formy v lékové formě .....	129
3.2.1.	Studium disolučního chování enzalutamidu během pravé disoluce .....	129
3.2.2.	Studium disolučního chování enzalutamidu během disoluce API v práškové formě....	133
3.2.3.	Disoluční chování enzalutamidu v přítomnosti HPMC AS .....	143
3.2.3.1.	Disoluce granulátů enzalutamidu s HPMC AS.....	143
3.2.3.2.	Charakterizace připravených materiálů a disolučních zbytků .....	152
3.2.3.3.	Disoluce tablet.....	164
3.2.4.	Shrnutí výsledků.....	166
4.	ZÁVĚR .....	167
5.	CITACE .....	171

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

$\alpha$	stupeň přeměny
A	množství API uvolněné do disolučního média (může být označeno také jako $\alpha$ )
API ( <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> )	účinná látka
ATR ( <i>Attenuated Total Reflectance</i> )	infračervená spektroskopie využívající techniku zeslabeného úplného odrazu
B	parametr statistického modelu Weibull
BCS ( <i>Biopharmaceutical Classification System</i> )	biofarmaceutický klasifikační systém
Caco-2	buněčná linie lidských epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu vhodná k pokusům <i>in vitro</i> zaměřeným na absorpci léčiv
D.E.	disoluční účinnost
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
F	formulace
$\varphi$	tepelný tok
$f_2$	faktor podobnosti
$f(\alpha)$	obecné označení kinetického modelu v DSC rovnici, který popisuje krystalizaci
FT	Fourierova transformace
$\Delta G_{c \rightarrow a}$	změna Gibbsovy energie při přechodu API z krystalické do amorfni fáze
GFA ( <i>Glass Forming Ability</i> )	sklotvornost
GIT	gastrointestinální trakt
GS ( <i>Glass Stability</i> )	fyzikální stabilita skla
H	tloušťka difuzní vrstvy
$\Delta H$	entalpie procesu
HME ( <i>Hot Melt Extrusion</i> )	extruze taveniny
HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPMC	hydroxypropylmethylcelulóza
HPMC AS	hydroxypropylmethylcelulóza acetylsukcinát
IČ	infračervená spektroskopie
k	rychlostní konstanta
K	konstanta
$K_{\alpha}$	disociační konstanta
KAS	Kissinger-Akahira-Sunose
$K_H$	kritérium Hrubého
$K_{LL}$	kritérium Lu a Liu
$k_{KP}$	konstanta v modelu Korsmeyer–Peppas
$K_{SP}$	kritérium Saada a Poulaina
$k_w$	konstanta ve statistickém modelu Weibull
$\lambda$	vlnová délka
m	parametr JMA modelu
M	parametr Šesták-Berggrenova modelu
MDSC	modulovaná diferenční skenovací kalorimetrie
N	parametr Šesták–Berggrenova modelu
$N_{KP}$	release exponent v modelu Korsmeyer- Peppas
p	parametr JMA kinetického modelu
P	rozdělovací koeficient
PCA	statistická analýza hlavních komponent
pKa	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PVP	polyvinylpyrrolidon
Q	parametr JMA modelu
$q^+$	rychlost ohřevu v DSC
$R_i$	reference
R	univerzální plynová konstanta
$R_{Crit.}$	minimální rychlost chlazení potřebná k vytvoření skla

RH	relativní vlhkost
R <sub>j</sub>	množství API uvolněné z referenčního přípravku
R <sub>s</sub>	poměr rozpustností amorfni a krystalické API
S <sub>i</sub>	označení zkoumaného materiálu v diferenční skenovací kalorimetrii
SD	sprejové sušení
SDDS (Supersaturation Drug Delivery Systems)	lékové formy obsahující API v přesyceném stavu
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SLS	laurylsulfát sodný
ss-NMR	pevnofázová nukleární magnetická rezonance
T <sub>α</sub>	teplota při které je dosaženo určitého stupně konverze
T <sub>c</sub>	teplota krystalizace
TE ( <i>Thermal Evaporation</i> )	označuje vzorek připravený na vakuové odparce
T <sub>g</sub>	teplota skelného přechodu
T <sub>m</sub>	teplota tání
T <sub>p</sub>	teplota maxima krystalizačního píku
T <sub>red</sub>	redukovaná teplota
T <sub>rg</sub>	redukovaná teplota skelné transformace
TGA	termogravimetrická analýza
UV-VIS	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
XRPD	prášková rentgenová difrakce

## ÚVOD

Limitujícím faktorem řady farmakologicky účinných látek je jejich velmi nízká rozpustnost. Tento problém se týká až 90 % léčiv ve výzkumu a 40 % léčiv na trhu. Rozpustnost léčiv lze do jisté míry zvýšit například zmenšením velikosti částic nebo převedením na sůl, ale zvýšení rozpustnosti není u těchto způsobů ve většině případů nijak převratné. V uplynulých letech byla značná část výzkumů zaměřena na amorfnní účinné látky a vývoj amorfnních forem. Amorfnní látky jsou látky mající uspořádání atomů pouze na kratší vzdálenost. V průběhu rozpouštění takové látky není potřeba dodávat energii na rozbití krystalové mřížky, proto dojde ke zvýšení zdánlivé rozpustnosti a vznikne přesycený stav (*angl.* supersaturation). Tento stav je metastabilní, takže může dojít ke krystalizaci, nebo při velkém stupni přesycení k fázové separaci. Fázová separace je stav, kdy dojde k precipitaci amorfnního léčiva, a tyto koncentrované shluky o velikosti nanometrů fungují jako rezervoáry léčiva dostupné pro absorpci léčiva do systémového oběhu. Přesycený stav lze udržet použitím surfaktantů či polymerů.

Amorfnní fáze je charakterizována vyšší Gibbsovou energií, proto vykazuje značnou nestabilitu. Riziko krystalizace hrozí během přípravy léčiva, skladování či následně během disoluce. Z tohoto důvodu je velmi důležité studium krystalizace amorfnních látek a faktorů, jež jejich fyzikální stabilitu ovlivňují. V posledních letech stoupl zájem o výzkum chování amorfnních API i přesto, že jsou jak v pevné fázi, tak v roztoku nestabilní. Nicméně benefit získaný zvýšenou rozpustností je daleko vyšší.

V rámci mého doktorského studia byla řešena následující témata zabývající se chováním amorfnních léčiv:

1. Kinetický popis makroskopicky sledovaného krystalizačního chování amorfnního enzalutamidu, dabigatran etexilát mesylátu a ivakaftoru. Předmětem studia byla krystalizace těchto amorfnních API a pokus o korelaci termického chování připravené API (nezatížené) s chováním amorfnní API po vystavení zvýšené teplotě a vlhkosti během stabilitních testů. Cílem byla predikce krystalizace amorfnní API na základě DSC dat, na základě kinetiky krystalizace. Predikce krystalizace na základě neizotermních dat je velmi důležitou disciplínou, neboť izotermní experimenty jsou často velmi zdlouhavé a predikce na základě neizotermních dat by ušetřila čas i náklady spojené s vývojem stabilních amorfnních forem.

2. Disoluční chování amorfního a krystalického enzalutamidu - převedením enzalutamidu do amorfní formy je možné výrazně zvýšit jeho rozpustnost.
3. Krystalizační chování amorfního ketokonazolu ve vodě a v roztocích polymerů. Na základě těchto experimentů bylo možné předpovědět, který polymer bude vhodný k udržení přesyceného stavu, a to bylo rovněž dokázáno na základě disolučního testu. Studie byla prováděna během 11měsíční zahraniční stáže v institutu NIMS (Japonsko)
4. Studium interakcí kyseliny salicylové s Kollidonem<sup>®</sup> SR. Konkrétně byla ověřována možnost samovolného převedení kyseliny salicylové do amorfní formy a udržení API v amorfní formě pomocí interakcí s polyvinylpyrrolidonem v pevné fázi. Studie byla iniciována na základě spolupráce s Farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Jelikož se v souhrnu jedná o velmi rozsáhlé množství experimentálních výsledků a z nich plynoucích závěrů, byla do disertační práce předkládané k obhajobě vybrána jen první dvě témata, kde navíc studovanou látkou je pouze enzalutamid. Ostatní témata jsou v předkládané disertační práci reflektována pouze formou závěrů. Rozšířený soubor komentovaných výsledků (375 stran včetně příloh) je k disertační práci přiložen na nosiči jako zdroj informací pro případné zájemce z řad studentů i akademiků o další výše uvedená témata, jež nebyla do disertační práce zahrnuta.

Osnova předložené práce má klasické členění: Teoretická část, Experimentální část, Výsledky a diskuse, Závěr. Teoretická část byla zpracována jako přehled základní problematiky související s předloženou disertační prací - pojednává především o amorfních API a jejich biodostupnosti, přípravě a stabilitě. Konkrétněji se pak věnuje studované API, základům nejdůležitějších použitých experimentálních technik a kinetických výpočtů. Experimentální část a Výsledky a Diskuze jsou pro přehlednost vždy rozděleny do dvou podkapitol odpovídajících dvěma prezentovaným tématům: pevnofázová stabilita enzalutamidu, disoluční chování enzalutamidu. Každá z obou podkapitol v části Výsledky a Diskuze je zakončena dílčím závěrem shrnujícím danou podkapitolu. Kapitola Závěr taktéž obsahuje dvě podkapitoly – první shrnuje a propojuje závěry obou témat diskutovaných v předkládané práci, druhá pak představuje hlavní závěry dalších témat studovaných v rámci doktorského studia.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Léčiva a lékové formy

**Léčivo nebo léčivý přípravek** je definován zákonem (odstavec 2 § 2 Zákon č. 378/2007 Sb. - Zákon o léčivech) jako látka nebo kombinace látek podávané člověku (humánní léčivé přípravky) nebo zvířeti (veterinární léčivé přípravky) k profylaxi, diagnóze, ovlivnění fyziologických funkcí či léčení<sup>1</sup>.

**Léčivem** rozumíme samotnou léčivou látku (API) minerálního, živočišného, rostlinného nebo syntetického původu disponující farmakologickým či imunologickým účinkem. Léčiva se mohou podávat v účinné formě anebo jako tzv. **proléčiva** neboli prekurzory. Tyto prekurzory vznikají malými změnami ve struktuře léčiva, například ochráněním (přeměna hydroxyly v esterovou skupinu atd.) vybraných funkčních skupin. Zmíněné změny struktury jsou následně přeměněny metabolickými pochody v organismu na aktivní metabolit. Proléčivo může být vytvořeno za účelem úpravy rozpustnosti, permeability, specifického účinku, stability či z důvodu zápachu nebo nepříjemné chuti původního léčiva. **Léčivý přípravek** je již léčivo v kombinaci s pomocnými látkami upravené do určité lékové formy (tablety, tobolky, dražé atd.). Termínem **lék** se označují léčiva a léčivé přípravky upravené do formy, která se aplikuje pacientovi. Je zde zahrnuto i vhodné balení a označení léčiva<sup>2</sup>. Léčivo či léčivá látka bude v této disertační práci dále označována jako API (*Active Pharmaceutical Ingredient*).

Lékovou formou se označuje forma/specifický tvar, do které je upravena směs API s pomocnými látkami. V této lékové formě se pak API podává pacientovi. Pomocné látky nemají zpravidla žádný farmakologický účinek. Rozlišujeme pomocné látky (excipienty) technické a farmaceutické. Technické excipienty jsou například rozpouštědla, která napomáhají vytvořit lékovou formu, avšak nejsou přítomna (mohou být přítomna pouze v povolené koncentraci dle českého nebo evropského lékopisu) v konečné formě, která se podává pacientovi. Farmaceutické excipienty ovlivňují vlastnosti API nebo lékové formy a zůstávají ve finální podobě léčivého přípravku. Lékové formy jsou rozlišovány dle způsobu podání, konsistence či rychlosti uvolňování API z lékové formy<sup>2,3</sup>.

## 1.2. Biodostupnost API

Biodostupnost označuje procentuální podíl podané dávky, která dosáhla systémového oběhu. Téměř 100% biodostupnosti je možno dosáhnout intravenózním podáním, tj. vpravením API přímo do systémového oběhu. Většina ostatních typů podání vede k nižší biodostupnosti, která závisí zejména na typu membrány, přes kterou dochází k absorpci (střevní sliznice, oční sliznice, stěna krevních kapilár v kůži atd.), na rychlosti metabolické přeměny atd. Navíc zde významnou roli hraje tzv. FIRST PASS EFFECT, kdy při průchodu přes vybraný orgán (např. játra, plíce) dochází k metabolizaci API dříve, než dosáhne systémového oběhu, čímž dojde ke snížení její biodostupnosti. Biodostupnost se samozřejmě liší u různých API<sup>4,5</sup>. Snížená biodostupnost může být spojená s nedostatečnou rozpustností účinné látky či s nízkou permeabilitou účinné látky při průchodu specifickou membránou.

### 1.2.1. Rozpustnost

Rozpustnost účinné látky rozhoduje o množství API, která bude následně v kontaktu s biologickou membránou, přes kterou dochází k absorpci do systémového oběhu. Rozpustnost API je důležitá také během její přípravy, při volbě vhodných excipientů či tvorbě lékové formy. Během výše zmíněných jsou rozhodující zejména tyto vlastnosti API<sup>5,6</sup>:

- *rozpustnost API ve vodě* – v závislosti na pH a teplotě (zpravidla při 25 a 37 °C)
- *disociační konstanta API* – je závislá na stupni disociace (většina API jsou slabé zásady a slabé kyseliny).
- *rozpustnost API v tucích* – je důležitá pro průchod API přes membrány. Pomocí rozdělovacího koeficientu API mezi polárním (voda) a nepolárním rozpouštědlem se predikuje průchod API přes biomembrány.
- *rozpustnost účinné látky v nevodných rozpouštědlech* – nevodná rozpouštědla mohou být použita přímo v lékové formě (ethanol, glycerín, propylenglykol, parafin atd.) nebo během její výroby či přípravy API (isopropylalkohol, benzylalkohol, polyethylenglykol atd.).

Rozpustnost API ve vodě limituje množství API jež může být uvolněno z lékové formy a následně absorbováno. Nicméně samotná rychlost uvolňování je ovlivňována excipienty použitými v lékové formě. S rozvojem nových technologií a poznatků v oblasti organické syntézy bylo připraveno mnoho nových API s nízkou rozpustností ve vodném prostředí. Je tedy pochopitelné, že se kritéria rozpustnosti rozlišující rozpustné a nerozpustné API

v průběhu času změnila. Zatímco v minulosti se nízká rozpustnost pohybovala v jednotkách miligramů na mililitr, v nynější době jsou to stovky mikrogramů na mililitr<sup>7,8</sup>. Tabulka 1 uvádí klasifikaci API dle kritérií rozpustnosti z roku 2015 a rozděluje je do několika skupin. Problémy s rozpustností nastávají u API, které mají rozpustnost nižší než 10 mg·ml<sup>-1</sup><sup>7</sup>. Naproti tomu kritéria uveřejněná v roce 2011 uváděla jako mezní hodnotu 20 mg·ml<sup>-1</sup> cit.<sup>8</sup>.

Tabulka 1. Klasifikace rozpustnosti API<sup>7</sup>

Klasifikace	Rozpustnost (mg·ml <sup>-1</sup> )
velmi snadno rozpustné	> 1000
snadno rozpustné	100 – 1000
dobře rozpustné	33 – 100
mírně rozpustné	10 – 33
těžce rozpustné	1 – 10
velmi těžce rozpustné	0,1 – 1
prakticky nerozpustné	≤ 0,1

Rozpustnost API se může výrazně měnit vlivem pH či obsahem žlučových kyselin v žaludku. Hodnota pH žaludečních či střevních šťáv hraje významnou roli, zejména v případě slabě zásaditých API. Tyto se rozpouští v kyselém prostředí žaludku a část, která se nestihne vstřebat žaludeční sliznicí, se může vysrážet v neutrálním prostředí střevního traktu. Vliv těchto faktorů je možno ověřit použitím simulovaných žaludečních či střevních šťáv jako disolučního média<sup>5,9</sup>.

### Stanovení termodynamické rozpustnosti

Termodynamickou rovnovážnou rozpustnost API můžeme stanovit dvěma způsoby. Nejpoužívanější je tzv. shake-flask metoda<sup>10</sup>. Do připravené baňky je předloženo množství API několikrát převyšující její teoretickou rozpustnost. Poté je přidán předem určený objem rozpouštědla a nádobka je umístěna do rotačního zařízení umístěného v temperované komoře či sušárně. Roztok se nechá míchat při konstantní teplotě po dobu minimálně 24 hodin. Poté se pomocí odstředivky oddělí roztok od pevného podílu. Roztok se odebere stříkačkou a přefiltruje přes filtr o velikosti pórů 45 μm. Stříkačkový filtr může být z různých materiálů, jako je nylon, teflon, celulóza, acetát celulózy. Jeho materiál se vybírá cíleně pro danou

účinnou látku, aby nedocházelo k přednostní afinitě API k materiálu filtru a následnému zkreslení výsledků. K analýze koncentrace se používá až druhý přefiltrovaný mililitr<sup>10</sup>.

Druhým způsobem stanovení rozpustnosti je rozpuštění API v daném rozpouštědle při vyšší teplotě. Poté je roztok za stálého míchání chlazen na teplotu, při které potřebujeme stanovit rozpustnost. Dojde ke krystalizaci přebytečného podílu API a stanoví se koncentrace API ve zbylém roztoku<sup>10</sup>.

### **Stanovení kinetické rozpustnosti neboli zdánlivé rozpustnosti**

Kinetická rozpustnost je obecně vyšší než termodynamická, nevýhodou je velmi nízká reprodukovatelnost, kdy jen malá změna experimentálních podmínek vede k rozdílné hodnotě. Hodnotu kinetické rozpustnosti je možno stanovit na základě jednoduchého experimentu, kdy API rozpustíme v malém množství organického rozpouštědla, ve kterém je však velmi dobře rozpustná. Následně roztok převedeme do vodného roztoku, kde je rozpustnost API daleko nižší. Dojde k precipitaci API, ale rozpuštěné množství API bude odpovídat kinetické rozpustnosti. Kinetickou rozpustnost lze zaznamenat i v případě amorfních API, které nepotřebují tolik energie na rozpuštění jako krystalické API. Kinetická rozpustnost však není stabilní a vede k následné krystalizaci, kterou lze inhibovat přítomností polymerů<sup>10</sup>.

### **1.2.2. Permeabilita**

Permeabilita je schopnost API procházet přes membrány a tento transport může být pasivní (difuzí) nebo aktivní (prostřednictvím přenašečů). Permeabilita závisí na rozpustnosti API, rozdělovacím koeficientu, difuzním koeficientu a vlastnostech membrány. API může být absorbována pouze v nedisociované formě (na rozhraní membrány vzniká rovnováha mezi disociovanou a nedisociovanou formou API).

Permeabilita může být stanovena na základě měření koncentrace API prošlé přes umělou membránu či monovrstvu buněk Caco-2 za konstantní teploty. Na jedné straně je roztok API a na straně druhé je čistý fyziologický roztok. Množství API prošlé přes membránu se měří v několika časových intervalech<sup>5,6,9</sup>.

Mimo to se permeabilita či míra absorpce stanovuje na základě pokusů na zvířatech. Nejčastěji se tyto pokusy provádějí na psech plemena bígl<sup>9</sup>.

Nejjednodušším způsobem jak odhadnout permeabilitu je rozdělovací koeficient API v nedisociovaném stavu mezi oktanolem a vodou. Na základě hodnoty  $\log P$  ( $P$  je označení pro rozdělovací koeficient) pro danou API je možno odhadnout její permeabilitu. Hodnota  $\log P$  dané API se porovnává s hodnotou 1,72; což je hodnota  $\log P$  pro referenční materiál. Referenčním materiálem je metoprolol. Je-li hodnota  $\log P$  dané API vyšší než 1,72; pak je API považována za vysoce permeabilní, neboť je známo, že 95 % metoprololu je absorbováno v gastrointestinálním traktu<sup>8</sup>.

V případě orálních lékových forem s řízeným uvolňováním dochází k absorpci většinou ve střevním traktu. Největší plochu k absorpci poskytují *jejunum* (česky označovaný jako lačník) a *illeum* (česky označovaný jako kyčelník), které jsou součástí tenkého střeva. Zde by potenciálně mělo docházet k nejrychlejší absorpci API, přičemž se rychlost absorpce s postupem střevním traktem zpravidla snižuje<sup>6,9,11</sup>.

### 1.2.3. Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS)

Dle BCS systému se API rozdělují do čtyř skupin (viz Tabulka 2) na základě jejich rozpustnosti ve vodě a permeability. Rozpustnost a permeabilita API je hodnocena jako vysoká či nízká. Na základě těchto vlastností je predikováno chování API *in vivo*. Odhad chování *in vivo* umožňuje volit správnou lékovou formu, která bude zajišťovat spolehlivé dosažení biodostupnosti dané API<sup>12-15</sup>.

Tabulka 2. Biofarmaceutický klasifikační systém (angl. *Biopharmaceutics Classification System*).

BCS třída	Rozpustnost	permeabilita	příklady API
I.	vysoká	vysoká	metoprolol, propranolol, acetylsalicylová kyselina
II.	nízká	vysoká	nifedipin, dabigatran etexilát mesylát, ketokonazol, enzalutamid
III.	vysoká	nízká	cimetidin, ranitidin
IV.	nízká	nízká	furosemid

Míra rozpustnosti/permeability se hodnotí na základě metodiky deklarované FDA<sup>14,16</sup>.

### Hodnocení rozpustnosti

API je hodnocena jako vysoce rozpustná, rozpustí-li se nejvyšší dávka API, jež může být obsažena v léčivém přípravku pro okamžité uvolnění (85 hm. % API se uvolní nejpozději do 30 minut), ve 250 ml vodného roztoku v rozmezí pH 1.0–6.8 při teplotě  $37 \pm 0,5$  °C. V opačném případě se jedná o API s nízkou rozpustností. Objem kapaliny pro stanovení rozpustnosti odpovídá standardnímu množství tekutiny sloužící k zapití léku. Rozpouštěcí experimenty v podmínkách *in vitro* se provádějí v disoluční aparatuře za lékopisně definovaných podmínek<sup>17–19</sup>.

### Hodnocení permeability

Prostupnost přes biomembrány se stanovuje nepřímo (rozdělovací koeficient) nebo přímo prostřednictvím přestupu hmoty přes lidskou intestinální (střevní) membránu. Alternativně se používají údaje získané z pokusů na zvířatech nebo z *in vitro* experimentů na buňkách epitelální tkáně. Vysoce permeabilní API je ta, která dosáhne přestupu z více než 85 hm. %<sup>17,20</sup>.

### 1.2.4. Zvýšení rozpustnosti API

Farmaceutický průmysl a výzkum se neustále potýká s limitovanou rozpustností API ve vodných roztocích. Tato skutečnost znesnadňuje použití řady API (téměř 40 % API na trhu a 70–90 % API ve vývoji je málo rozpustných ve vodě<sup>21,22</sup>). Vyvinout nové API s lepšími vlastnostmi je velmi obtížné, proto byl v posledních dekáдах kladen velký důraz na vývoj nových lékových forem či fyzikálně-chemické modifikace API s cílem zvýšit jejich rozpustnost<sup>8,21</sup>.

#### **Rozpustnost API můžeme zvýšit následujícími způsoby:**

- *zmenšením velikosti částic* – Rozpustnost API velmi často souvisí s velikostí částic. Zmenšením velikosti částic se dosáhne zvýšení specifického povrchu materiálu, což zlepší rozpouštěcí vlastnosti API, neboť se zvýší plocha omývaná disolučním médiem. Zmenšení velikosti částic se nejčastěji provádí mletím, ale i tato metoda má své limity. Vlivem velkého množství mechanické energie může dojít k narušení krystalové mřížky a ke vzniku neuspořádané struktury (amorfní struktury), což následně způsobuje problémy s fyzikální stabilitou a například změny v rozpustnosti jednotlivých šarží API<sup>23</sup>. I přes tento problém patří mletí stále mezi jednu z nejpopulárnějších metod zvýšení specifického povrchu.

Chu a kol. publikovali článek zaměřený na posouzení vlivu velikosti částic na rozpustnost. Dokázali, že velikost částic má vliv na rychlost rozpouštění ibuprofenu, cyklofenaku a hydrochlorothiazidu<sup>24</sup>.

- *tvorbou amorfni formy* – Převedením API na formu s vysokou hodnotou Gibbsovy energie můžeme docílit až 1000násobného zvýšení rozpustnosti. Amorfni forma je však z fyzikálního hlediska nestabilní, a proto se často připravují tuhé disperze amorfni API s vhodným polymerem, které zajistí stabilitu API v amorfni fázi a zachovají výhodu vyšší rozpustnosti amorfni API oproti API krystalické<sup>22,25</sup>. Více informací viz kapitola 1.3 a 1.7.2.6.
- *tvorbou soli* (téměř 50 % API se podává ve formě jejich soli) – Je to jedna z nejpoužívanějších metod zvýšení rozpustnosti málo rozpustné API. Tento přístup však není vhodný pro API neobsahující ionizovatelné skupiny nebo ionizovatelné látky, u kterých existuje riziko rozkladu či racemizace<sup>26,27</sup>.
- *změnou polymorfní formy* – Rozpustnost polymorfních forem se liší v důsledku rozdílné energie krystalové mřížky. Je téměř pravidlem, že méně stabilní polymorfní forma, forma s vyšší hodnotou Gibbsovy energie, dosahuje vyšší rozpustnosti. Ve většině případů změnou polymorfní formy dosáhneme maximálně dvojnásobného zvýšení rozpustnosti oproti rozpustnosti nejméně rozpustné polymorfní formy. Platí to například u nifedipinu, piroxikamu a dalších<sup>28</sup>.
- *tvorbou kokryystalu* – Kokryystal je homogenní krystalická fáze dvou látek, málo rozpustné API a dobře rozpustné látky označované jako koformer, v definovaném stechiometrickém poměru. Obě komponenty jsou v pevném stavu. Tyto látky jsou mezi sebou propojeny mezimolekulárními interakcemi (zpravidla vodíkovými vazbami). Během disoluce kokryystalu dochází k disociaci těchto komponent a následné precipitaci hydrofobní API, která tvoří klastry náhodně uspořádaných molekul jako v případě amorfni fáze. Dochází tedy ke vzniku přesyceného stavu, stejně jako v případě amorfni látky. Doba trvání přesyceného stavu je závislá na schopnosti API krystalizovat z přesyceného stavu, případně přítomnosti látek udržujících API v rozpuštěném stavu (polymery, surfaktanty). Během rozpouštění kokryystalu však může namísto vzniku přesyceného stavu dojít ke vzniku krystalických částic o velikosti nanometrů, ale ty budou stále díky své malé velikosti vykazovat vyšší rozpustnost než původní krystalická API<sup>8,26,29</sup>. Perlovich a kol. se zabývali výhodami plynoucími z tvorby kokryystalu málo rozpustné API, přičemž analyzovali soubor 80 kokryystalů. Porovnávali

rozpustnost kokystalů a k nim ekvivalentních málo rozpustných API. Zjistili, že poměr rozpustnosti kokystalu a samotné API je ve 40 % v rozmezí 1–5, v dalších 40 % nad 5, ze 31 % nad 10, pro 8 % kokystalů je poměr vyšší než 100 a u 4 % kokystalů (z výše uvedeného souboru) nad 630<sup>30</sup>. Konkrétně v případě agomelatinu je možné dosáhnout tvorbou kokystalu s isonikotinamidem až 8-násobného zvýšení rozpustnosti oproti samotné API<sup>31</sup>.

- *přídavkem vhodných excipientů* – surfaktanty, cyklodextriny atd. Chu a kol. prokázali vzrůstající rozpustnost ibuprofenu a aceklofenacu se vzrůstajícím množstvím surfaktantu (TWEEN<sup>®</sup> 80, sodium dodecylsulfát – SLS). Použitím SLS jako surfaktantu došlo u ibuprofenu ke zvýšení rozpustnosti 84krát a u aceklofenacu 33krát oproti rozpustnosti API ve vodě<sup>24</sup>.

### 1.3. Amorfní systémy

Tato kapitola se zabývá amorfními API, jejichž příprava a popis krystalizačního chování je primárním cílem předložené disertační práce. Amorfní API mohou být součástí lékových forem označovaných jako SDDS (z angl. *Supersaturation Drug Delivery Systems*). Kromě amorfních API sem patří lipidové formulace. V obou případech je API obsažená v SDDS v pevnofázovém uspořádání, které vykazuje rysy pravidelnosti pouze na krátkou vzdálenost. Rozpouštění takové API je pak spojeno s tvorbou přesyceného stavu, z kterého má API vysokou pravděpodobnost absorpce do systémového oběhu. Míra absorpce závisí na permeabilitě API.

API může být v amorfní formě samotná či ve formě tuhé disperze s polymerem. Výhodou amorfního systému je zvýšení rozpustnosti (v důsledku absence krystalové mřížky) a rychlosti rozpouštění (díky vyšší Gibbsově energii). Nevýhodou amorfních API je jejich nízká fyzikální stabilita<sup>14</sup>.

#### 1.3.1. Amorfní API

Amorfní API se vyznačují absencí krystalové mřížky (vykazují uspořádanost pouze na krátkou vzdálenost) a přebytkem volné energie v porovnání s krystalickou formou. Neobsahuje-li API krystalickou část, není potřeba energie na rozbití krystalové mřížky a rozpustnost API je několikanásobně vyšší. Převedení API do amorfního stavu je výhodné zejména pro ty látky, jež řadíme do II. či IV. třídy BCS systému<sup>32–37</sup>. Amorfní API mohou být připravené roztavením krystalické fáze s následným ochlazením, tzv. quench-cooling, které

může být provedeno v malém měřítku přímo v diferenčním skenovacím kalorimetru (DSC) nebo ve větším měřítku s použitím extrudéru. Dalším možným způsobem přípravy amorfni API je rychlé odstranění rozpouštědla z roztoku API, například lyofilizací či sprejovým sušením<sup>22</sup>. Tyto metody budou detailněji popsány v kapitole 1.3.2.

**Pokud má být krystalická API převedena na amorfni a jako amorfni je použita v lékové formě, je důležité stanovit<sup>38</sup>:**

1. schopnost API vytvořit amorfni látku,
2. stabilitu připravené amorfni látky během zpracování, balení, transportu a skladování,
3. stabilitu amorfni látky v přesyceném stavu během disoluce.

### Rozpustnost amorfni API

Ačkoli je rozpustnost amorfni API vyšší než u API krystalické, skutečnou výzvou je určit její přesnou hodnotu. Závisí totiž na mnoha faktorech. Rozpustností amorfni formy se rozumí nejvyšší koncentrace API, jež je zpravidla zaznamenána během 10–15 minut disolučního experimentu, následně může docházet k precipitaci (tvorba amorfni shluků či krystalizace) API<sup>39</sup>. Namísto přesné koncentrace se určuje stupeň zvýšení rozpustnosti označovaný jako  $R_S$ , tedy poměr rozpustnosti amorfni a krystalické API. Tento poměr se určuje experimentálně pomocí disoluce, ale také teoreticky. Existují dva způsoby. Prvním je určení na základě rozdílu Gibbsovy energie mezi amorfni a krystalickou API viz. rovnice (1), druhým způsobem je modelování fázových interakcí mezi API a rozpouštědlem pomocí statistické asociační teorie tekutin. Zde bude nastíněn pouze první způsob<sup>40</sup>. Parcks a kol. v roce 1928 publikovali metodu stanovení poměru  $R_S$  na základě znalosti rozdílu Gibbsovy energie mezi amorfni a krystalickou fází  $\Delta G_{c \rightarrow a}$ <sup>41</sup>:

$$\Delta G_{c \rightarrow a} = -RT \ln \frac{a_{amorf}}{a_{krystal}} \quad (1)$$

Rozdíl Gibbsovy energie mezi amorfni a krystalickou fází  $\Delta G_{c \rightarrow a}$  je přímo úměrný poměru  $R_S$  a tedy poměru aktivit amorfni a krystalické fáze. Pokud je roztok dostatečně zředěný mohou se aktivity nahradit látkovými koncentracemi, které odpovídají rozpustnosti daných fází. Hancock a Parks v roce 2000 využili zmíněný vztah a určili  $\Delta G_{c \rightarrow a}$  na základě měření termických vlastností amorfni a krystalických forem API. K určení rozdílu Gibbsovy energie je potřeba znalost rozdílu tepelné kapacity mezi amorfni a krystalickou fází ( $\Delta C_{p,c \rightarrow a}$ ), teploty tání ( $T_m$ ) a teploty skelného přechodu ( $T_g$ ). Hancock a Parks použili různá

zjednodušení pro hodnotu  $\Delta c_{p,c \rightarrow a}$ : 1. Předpokládali, že se její hodnota blíží nule, 2. Odpovídá změně tepelné kapacity v oblasti skelného přechodu, 3. Je rovna změně entropie rozpuštěné krystalické látky. Ani jedno z těchto zjednodušení nevede ke zcela přesným hodnotám. Přesnější je změřit hodnotu  $\Delta c_p$  za pomoci např. modulované diferenční skenovací kalorimetrie (MDSC)<sup>39</sup>.

Výpočet hodnoty  $R_S$  (stupeň zvýšení rozpustnosti amorfni formy v porovnání s krystalickou formou) se zabývala řada autorů a bylo zjištěno, že přesný výpočet se skládá ze 3 členů vyjádřených v rovnici (2).

První člen popisuje nárůst rozpustnosti díky volné  $\Delta G_{c \rightarrow a}$ , druhý člen odpovídá snížení aktivity amorfni rozpuštěné látky vlivem adsorpce vody na povrchu amorfniho materiálu a třetí člen odpovídá snížení stupně disociace v koncentrovanějším roztoku vzniklým vlivem vyšší rozpustnosti amorfni látky. Výpočet poměru  $R_S$  je následující<sup>34,40</sup>:

$$R_S = \underbrace{e^{\left[\frac{\Delta G_{c \rightarrow a}}{RT}\right]}}_{1.\text{člen}} \cdot \underbrace{a_{2,a_1=1}^S}_{2.\text{člen}} \cdot \underbrace{\frac{1-a^c}{1-a^a}}_{3.\text{člen}} \quad (2)$$

K určení druhého členu je potřeba změřit adsorpční izotermu za požadované teploty. Amorfni vzorek je vystavován během měření relativní vlhkosti ve dvou krocích. Nejdříve je vlhkost zvyšována po 2 % v intervalu 0–10 % RH a poté je vlhkost zvyšována po 5 % v intervalu 10–95 % RH. Poté je hodnota snížení aktivity amorfni látky díky adsorbované vlhkosti vypočítaná na základě Gibbs-Duhemovy rovnice a extrapolována na hodnotu odpovídající 100 % RH. Tento postup byl publikován Murdandem a kol. v roce 2010<sup>34</sup>. Třetí člen odpovídá snížení stupně disociace a je potřeba stanovit ionizované množství v roztoku vzniklém rozpuštěním krystalické a amorfni API. Stupeň disociace je nižší v nasyceném roztoku v rovnováze s amorfni látkou než v rovnováze s krystalickou látkou, přičemž v případě amorfni látky je experimentální stanovení disociované frakce složitější, proto se určuje teoreticky.

Disociovaná frakce v roztoku vzniklém rozpuštěním krystalické API se určí z rovnice (3):

$$\frac{\alpha^2}{(1-\alpha)} = \frac{K_a}{c_T} \quad (3)$$

kde  $\alpha$  je disociovaná frakce dané látky,  $c_T$  je celková koncentrace rozpuštěné látky (zahrnující ionizovanou i neionizovanou část) a  $K_a$  je disociační konstanta v případě kyseliny.

Pro tento účel je potřeba stanovit disociační konstantu. Nejdříve se tedy určí rozpustnost API při různém  $pH$ . Z těchto hodnot se následně stanoví  $pK_a$  dle rovnice (4):

$$S_t = S_0(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (4)$$

kde  $S_t$  je rozpustnost látky při daném  $pH$ ,  $pK_a$  je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty a  $S_0$  je rozpustnost neionizované kyseliny.

Ionizovaná frakce amorfni API nemůže být určena pomocí vztahu (3), neboť celková koncentrace rozpuštěné amorfni látky je hledána při výpočtu  $R_s$ . Je ji možno však určit pomocí vztahů (5) a (6):

$$\alpha^a = \frac{\sqrt{\frac{K_a}{c_T^c \cdot B}}}{1 + \sqrt{\frac{K_a}{c_T^c \cdot B}}} \quad (5)$$

kde  $\alpha^a$  je disociovaná frakce amorfni API,  $K_a$  je disociační konstanta kyselin,  $c_T^c$  je celková koncentrace krystalické API a  $B$  je hodnota vypočítána na základě vztahu (6):

$$B = e^{\left[\frac{\Delta G_{c \rightarrow a}}{RT}\right]} \cdot a_{2,a_1=1}^s \cdot (1 - \alpha^c) \quad (6)$$

kde první člen rovnice (6) odpovídá zvýšení rozpustnosti, druhý člen snížení aktivity hydratované části amorfni API a třetí člen odpovídá redukcii aktivity v důsledku disociace<sup>40</sup>.

Výpočet stupně zvýšení rozpustnosti amorfni API je daleko složitější než je uvedeno výše. Cílem výše uvedeného textu bylo poukázat na řadu parametrů, které ovlivňují a limitují možné zvýšení rozpustnosti amorfni API. Následující Tabulka 3, publikována Murdandem a kol. uvádí, jak se liší hodnoty poměru  $R_s$  při zohlednění/nezohlednění zmíněných tří členů rovnice (2).

Tabulka 3. Experimentálně a teoreticky stanovený poměr  $R_S$  pro indometacín. Data převzata z:<sup>34</sup>

Parametry amorfni a krystalické látky zahrnuty do výpočtu dle rovnice (15)	Poměr $R_S$
Všechny členy	7.0
Zvýšení rozpustnosti (1. člen – přesné určení $\Delta c_p^{c \rightarrow a}$ )	29.0
Zvýšení rozpustnosti, sorpce vody (1. a 2. člen)	20.8
Zvýšení rozpustnosti, stupeň ionizace (1. a 3. člen)	9.9
<b>Experimentálně stanovený poměr <math>R_S</math></b>	<b>4.9</b>

### 1.3.2. Příprava amorfniích systémů

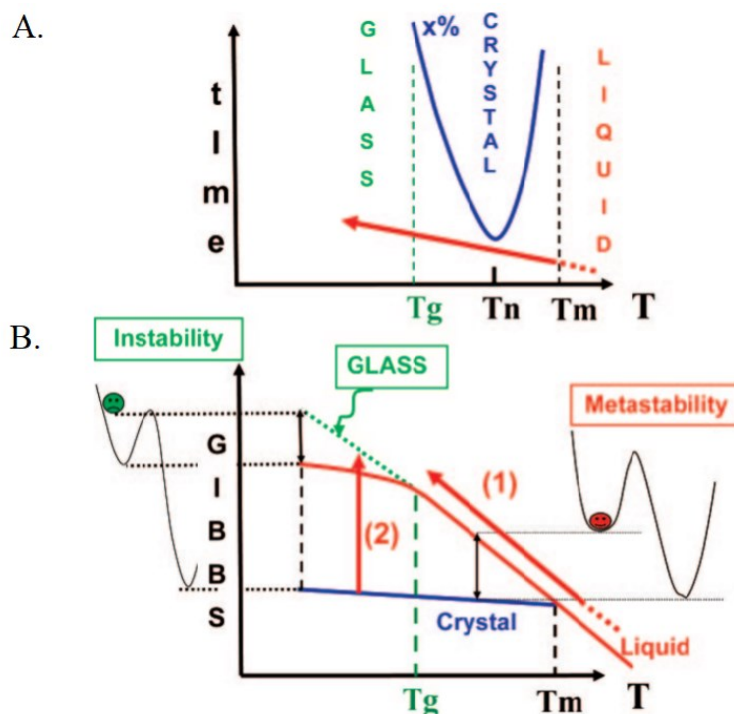
Amorfni API lze připravit různými způsoby a každá z metod má svá úskalí. Tyto metody lze rozdělit na dvě skupiny - termodynamické a kinetické metody přípravy. U termodynamických metod přípravy vycházíme z látky v neuspořádaném stavu, např. taveniny, která je stabilizována dostatečnou rychlostí chlazení, čímž se vyhneme krystalizaci a vznikne amorfni fáze. Kinetická metoda přípravy vychází z krystalického podílu, který je již stabilní. Mechanickou aktivací se indukují defekty v krystalové mřížce, dojde k nárůstu entropie, dokud nevznikne amorfni fáze<sup>42</sup>.

Obvykle metody amorfizace rozdělujeme na základě fyzikální formy výchozího materiálu. Výchozím materiálem může být roztok, tavenina či krystalická fáze<sup>22</sup>.

#### 1.3.2.1. Příprava amorfniích systémů: Termodynamický pohled

Jak již bylo zmíněno, amorfni látky se nejčastěji připravují chlazením taveniny (podchlazené kapaliny). Krystalický materiál se nejdříve zahřeje pár stupňů nad teplotu tání, vznikne tavenina. Tato „kapalina“ se pod teplotou tání ( $T_m$ ) stává metastabilní díky existenci termodynamické síly vedoucí k nukleaci, tvorbě kritických nukleí (nuklea o kritické velikosti, která se již nerozpouští) a růstu krystalů. Tento proces je zobrazen na Obrázku 1A, který představuje tzv. TTT diagram (z angl. *Time-Temperature-Transformation*). Tato křivka (tzv. „nosová křivka“) je výsledkem kompetice mezi termodynamickou hnací silou transformace (která s klesající teplotou roste) a molekulární mobilitou (která s klesající teplotou klesá). Vzniku skla lze dosáhnout kineticky, tj. zvýšením rychlosti chlazení a vyhnutím se krystalizaci. Dostatečně rychlým chlazením dojde ke skokové změně vlastností a vzniku amorfni látky. To se projeví na DSC křivce poklesem tepelné kapacity. Atomy jsou tzv. zmrazeny na svých pozicích vycházejících z neuspořádané struktury

taveniny/podchlazené kapaliny. Pod teplotou skelného přechodu vykazuje materiál viskozitu vyšší než  $10^{12}$  Pa·s. Skelná fáze je charakteristická tuhostí pevné látky a strukturou připomínající kapalinu, tedy látku postrádající uspořádání na dlouhou vzdálenost. Z pohledu fyzikální stability je důležitý Obrázek 1B zobrazující závislost Gibbsovy energie na teplotě pro krystalickou, kapalnou a amorfní látku. Šipka označená číslem 1 znázorňuje klasickou metodu přípravy amorfního materiálu vycházející z kapaliny/taveniny. Vzniku amorfní látky lze dosáhnout použitím optimální rychlosti chlazení, kterou se vyhneme rychlé krystalizaci v maximu „nosové křivky“. Rychlostí chlazení ovlivníme molekulární strukturu amorfní látky, hodnotu teploty skelné transformace a relaxační čas, který je důležitý pro stabilitu materiálu. Krystalizace se projeví v záznamu DSC jako exotermní pík, zatímco teplota skelného přechodu jako schod v tepelné kapacitě. Na Obrázku 1B je navíc zobrazena druhá cesta přípravy amorfní API, a to transformací z termodynamicky stabilní krystalické fáze. Je znázorněna šipkou označenou číslem 2. K této transformaci dochází například mletím, kdy za pomoci kinetické energie dojde k narušení krystalové mřížky látky a vzniku amorfní fáze<sup>43</sup>.



Obrázek 1. A. (horní obrázek) TTT diagram tvorby amorfní látky chlazením taveniny (podchlazené kapaliny), B. (spodní obrázek) Gibbsova energie a její závislost na teplotě pro krystalickou, kapalnou (stabilní i metastabilní), amorfní fázi při termodynamické (obvyklá metoda, tj. chlazení taveniny) či kinetické (vycházející z krystalické fáze, tj. mletí) tvorbě amorfní látky. Převzato z cit.:<sup>43</sup>.

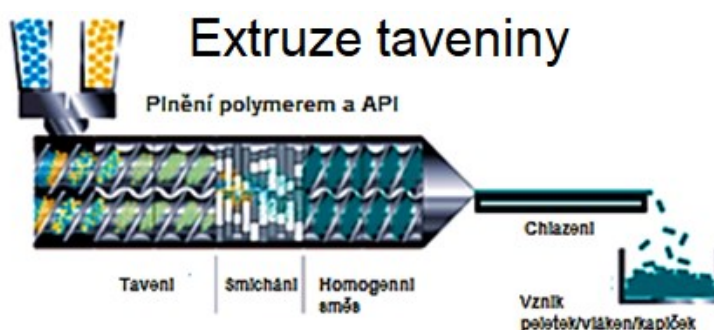
### 1.3.2.2. Příprava amorfních systémů: Metody vycházející z taveniny

Principem je roztavení krystalického materiálu za vzniku taveniny, která je poté chlazená dostatečnou rychlostí s cílem zamezit krystalizaci a dosáhnout vzniku amorfni látky. Důležitým parametrem je kritická rychlost chlazení, což je minimální rychlost chlazení potřebná pro přípravu konkrétní amorfni API. V menším měřítku může být amorfni materiál připraven v diferenčním skenovacím kalorimetru, ale v případě přípravy většího množství je používán extrudér. Úskalím těchto metod je teplota, neboť API je potřeba většinou zahřát nad její teplotu tání. V některých případech hrozí dekompozice, jak bylo ukázáno například u abendazolu<sup>22,42,44</sup>.

#### **Extruze taveniny**

Jedním ze způsobu přípravy amorfni API je extruze taveniny označovaná jako HME (z angl. *Hot Melt Extrusion*), kde je materiál ve vyhříváných zónách extrudéru (s možností regulovatelné teploty) postupně roztaven a po vytlačení přes trysku extrudéru může být chlazen různými způsoby. Rychlost chlazení významně ovlivňuje kvalitu připraveného materiálu. U některých API je potřeba zvolit rychlejší chlazení, aby nedošlo k rekrystalizaci. Vhodnou volbou rychlosti otáček a teploty v jednotlivých zónách extrudéru získáme amorfni materiál ve formě dlouhého vlákna o požadovaném průměru (daném průměrem trysky). Takový materiál se zpravidla rozdrťí do formy prášku či použije k 3D tisku. Proces extruze některých API se usnadňuje přidavkem polymeru, který stabilizuje API v amorfni formě. Výsledkem je poté amorfni tuhá disperze či tuhý roztok. Nejčastěji se HME využívá k přípravě různých lékových forem (například pelety atd.) a k tvorbě disperzí s polymery, jejichž účelem je řízené uvolňování. Mimo to se HME používá pro přípravu vláken vhodných k 3D tisku, které se využívají pro přípravu formulací s cílem řízeného či okamžitého uvolňování. Polymerem vhodným k extruzi z taveniny je například Kollidon<sup>®</sup> VA64. Celulózoové polymery kvůli své vysoké viskozitě vhodné nejsou, výjimku tvoří upravené celulózoové polymery (amorfni s nízkou  $T_g \sim 98\text{--}108\text{ }^\circ\text{C}$ ) firmy Dow Chemical Co. označované jako Affinisol<sup>™</sup> HPMC HME<sup>45–49</sup>.

Obrázek 2 znázorňuje schéma extrudéru s dvěma ko-rotujícími šrouby. Toto uspořádání není jediné možné (může být jiný počet šroubů, proti rotující šrouby atd.), ale extrudér s tímto uspořádáním byl použit v této disertační práci, proto zde bude vysvětlen jeho princip. Násypkou je přiváděn materiál, který je v tomto případě za pomoci otáčejících se ko-rotujících šroubů roztaven ve vyhřívaných zónách extrudéru. Vinutí šroubů není po celé délce stejné, je koncipováno tak, aby na počátku došlo k rovnoměrnému a dokonalému roztavení komponent, poté k jejich smíchání, přičemž v poslední zóně dostaneme dokonale homogenizovaný materiál, který je ochlazován a vytlačován z extrudéru. V některých případech není zařazena chladicí zóna a materiál je v okamžiku vytlačení samovolně ochlazen na laboratorní teplotu<sup>22,50</sup>.



Obrázek 2. Schéma extrudéru. Převzato z cit.:<sup>22</sup>

Stabilita připravených amorfních API či tuhých disperzí může výrazně záviset na procesních podmínkách během extruze. Mechanické namáhání a procesní teplota během extruze má velký vliv na výsledný materiál, neboť rozhoduje o kvalitě promísení obou složek tuhého roztoku. Mechanické namáhání je ovlivněno rychlostí otáček šroubů a rychlostí plnění materiálem, naopak zanedbatelný vliv má design šroubů. Vyššího mechanického namáhání se docílí zvýšením otáček a snížením rychlosti plnění<sup>51</sup>. Ma a kol<sup>51</sup>. se zabývali vlivem mechanického namáhání a teploty během extruze taveniny na stabilitu amorfní tuhé disperze/tuhého roztoku nifedipinu s vybranými polymery. Ve zmíněném případě vyšší teplota a vyšší mechanické namáhání vedlo k dobrému promísení obou komponent a vyšší stabilitě než u materiálu připraveného při nižší teplotě a nižším mechanickém namáhání (nižší otáčky). Nicméně, existuje kritická teplota i kritické namáhání, kde už efekt není příznivý<sup>51</sup>.

Výhodou extruze taveniny je nulové použití rozpouštědel, což je pravděpodobně v některých případech vysvětlením vyšší stability látek připravených HME ve srovnání se sprejovým sušením. Mahmad a kol. připravili tuhý roztok felodipinu s HPMC AS LF a PVPK30 dvojím způsobem, extruzí z taveniny a sprejovým sušením. Extruze taveniny vedla v

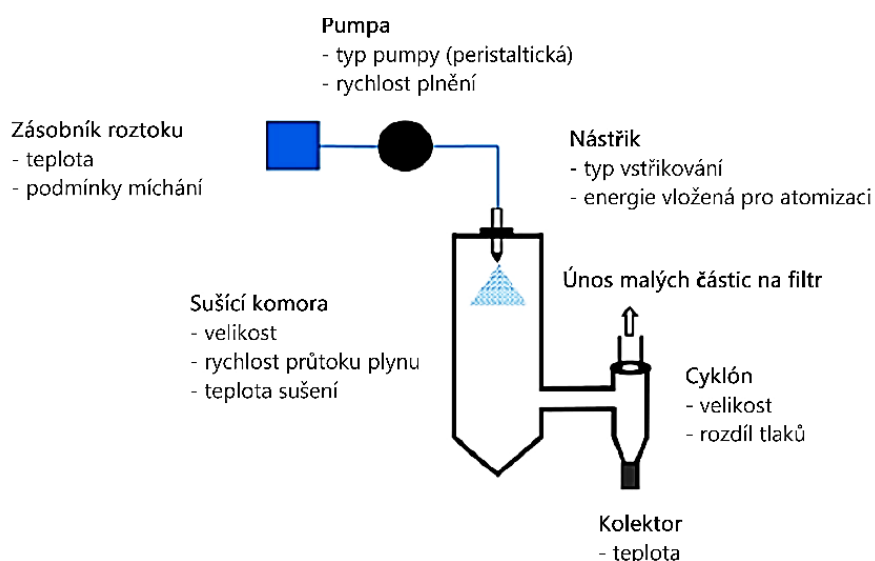
tomto případě k vyšší stabilitě vzniklého materiálu během skladování, ale sprejové sušení vedlo zase k rychlejšímu uvolnění API během disoluce<sup>52</sup>.

### 1.3.2.3. Příprava amorfních systémů: Metody vycházející z roztoku

Krystalický materiál je nejdříve rozpustěn ve vhodném rozpouštědle a následně je rozpouštědlo rychle a efektivně odstraněno. V tomto případě odpadá vysoká teplota, ale díky vzrůstající viskozitě v průběhu odpařování může rozpouštědlo zůstat uzavřeno v amorfním materiálu. Pro termolabilní látky je tento způsob přípravy amorfni formy vhodnější než příprava extruzí z taveniny<sup>22,44</sup>.

### Sprejové sušení

Sprejové sušení je proces, při kterém je roztok API nebo roztok polymeru s aktivní látkou ve vhodném organickém rozpouštědle rozstříkovan do proudu horkého sušícího plynu (vzduch nebo dusík). Tímto procesem vznikají kulaté duté částice o velikosti nano- až mikrometrů s úzkou distribucí velikostí částic. Jedná se o velmi rychlý proces. Velikost částic je řízena koncentrací (viskozitou) vstupního roztoku, rychlostí rozstříkování, teplotou nebo typem rozstříkovacího systému. Velmi důležitá je teplota vzduchu na výstupu ze sušící komory do cyklónu. Je-li hodnota teploty vzduchu vyšší než teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) vznikajícího materiálu, pak většinou obdržíme krystalický materiál. V případě, že je teplota vzduchu blízko  $T_g$ , obdržíme směs krystalické a amorfni fáze. V případě, že je  $T_g$  vyšší než teplota vzduchu na výstupu, získáme plně amorfni materiál. Výše uvedená souvislost teploty vzduchu a  $T_g$  se vznikem amorfni látky je obecný předpoklad, který v některých případech neplatí a výsledek může být ovlivněn také použitým rozpouštědlem. Schéma procesu je znázorněno na Obrázku 3<sup>22,38,53</sup>.



Obrázek 3. Schéma sprejového sušení a důležitých parametrů. Převzato z cit.:<sup>22</sup>.

#### 1.3.2.4. Příprava amorfních systémů: Metody vycházející z krystalického materiálu

Mletí, drcení či míchání krystalické API s excipienty může vést k úplné či částečné amorfizaci látky. Je-li amorfizace žádaná, pak musí být dodrženy přesné mlecí podmínky a zajištěna kontrolovaná teplota při mletí. Amorfizace mechanickou aktivací je nejčastěji prováděna mletím (důležitý je minimální čas mletí, typ mlecího zařízení, frekvence mletí, nejvyšší teplota dosažená při mletí atd.) či opakovanou kompresí krystalické API v tabletovacím lisu (počet stlačení 100–200, lisovací tlak: 15–300 MPa). Amorfizace může být také nežádoucí jev, který se může projevit okamžitě anebo až v průběhu skladování, kdy se mění vlastnosti léčivého přípravku v důsledku rekrystalizace. Částečná amorfizace vlivem mechanického opracování vedoucí k následné nestabilitě přípravku byla pozorována u piroxicamu, budesonidu, sacharózy a trehalózy atd.<sup>22,42,43,54</sup>.

#### 1.4. Fyzikální stabilita amorfních látek

Mluvíme-li o fyzikální stabilitě v souvislosti s amorfními API, jedná se především o tendenci krystalizovat, kdy API ztrácí vlastnosti amorfní látky, tj. vyšší rozpustnost, schopnost tvorby přesyceného stavu atd. Modelování krystalizačního chování je obvyklé u anorganických látek (anorganických skel), ale organické látky jsou v krystalizačním chování zcela odlišné. Důvodem je existence slabých mezimolekulových interakcí. Je proto pochopitelné, že stabilitní kritéria, jež se hodí pro posuzování anorganických skel, jsou méně použitelná v případě organických skel, tj. amorfních API. Například kritérium Hrubého  $K_H$  (7) silně koreluje se stabilitou anorganických skel, to však neplatí u organických skel<sup>55,56</sup>.

$$K_H = \frac{T_c - T_g}{T_m - T_c} \quad (7)$$

kde  $T_c$  je teplota krystalizace,  $T_g$  je teplota skelného přechodu a  $T_m$  je teplota tání.

Přibližně do roku 2010 byla znalost krystalizační tendence ve vztahu k dlouhodobé stabilitě amorfních API spíše okrajová. Poté se pozornost upřela na větší celky molekul a byl statisticky hodnocen vliv fyzikálně-chemických charakteristik látek na sklotvornost a stabilitu skel. Toto se týká sklotvornosti a stability skel ve vztahu k amorfním API, neboť tyto termíny a kritéria byly historicky nejdříve zavedeny u anorganických skel. Mluvíme-li o sklotvornosti či stabilitě skel, pak mluvíme o schopnosti tvořit amorfní látku a o její stabilitě. Baird a kol.<sup>57</sup> zkoumali chování 52 API pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Každá krystalická API byla podrobena cyklu ohřevu ( $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )/chlazení ( $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )/ohřevu ( $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )

a na základě výsledků byly API rozděleny do tří tříd (uvedených níže) dle tendence krystalizovat v jednotlivých fázích tohoto cyklu. Hlavním cílem Baird a kol. bylo určení kritérií sklotvornosti *GFA* (z angl. *Glass Forming Ability*), stability skla *GS* (z angl. *Glass Stability*) a jejich korelace s dlouhodobou stabilitou. *GFA* souvisí s minimální rychlostí chlazení nutnou pro tvorbu skla (amorfní API). Tato minimální rychlost chlazení se označuje jako  $R_{Crit}$  a přímo se určuje velmi složitě. K nepřímému určení potřebujeme teplotu krystalizace API při chlazení taveniny získanou různými rychlostmi chlazení. Následnou lineární regresí získáme  $R_{Crit}$ . Tento nepřímý způsob je možný pouze u API, které jsou schopny krystalizovat během chlazení, a těch je omezené množství. Avšak i při aplikaci této metody na vhodné API byla shledána nevhodnost používaných modelů. Důvodem je stochastická a heterogenní nukleace amorfních API (organických skel). Baird a kol. se proto rozhodli charakterizovat *GFA* a *GS* jinými parametry (hojně používanými u anorganických skel): redukováná teplota skelného přechodu  $T_{rg}$ . Hrubého kritérium  $K_H$ , kritérium Lu a Lia  $K_{LL}$ , kritérium Saada a Poulaina  $K_{SP}$ , redukováná teplota  $T_{red}$ , fragilita atd. Silná korelace mezi sklotvorností a těmito parametry nebyla nalezena u žádného z nich<sup>56,57</sup>.

Proto byla hledána korelace mezi *GFA*, *GS* a vlastnostmi API (teplota tání, teplota skelného přechodu, entalpie tání, entropie a Gibbsova energie přechodu mezi krystalickou a amorfní fází, molekulová hmotnost, počet rotačních vazeb) pomocí statistické analýzy hlavních komponent (PCA). Bylo nalezeno, že největší vliv na *GFA*, *GS* má molekulová hmotnost API, počet rotačních vazeb a hodnota rozdílu Gibbsovy energie mezi krystalickou a amorfní fází<sup>57</sup>.

API byly na základě DSC měření (určené na základě chlazení taveniny a následného ohřevu v DSC) rozděleny do tří tříd dle *GFA*, každá tato třída API je spojena s vlastnostmi ovlivňující *GFA*. Tyto vlastnosti byly zmíněny v předchozím odstavci. API tedy rozdělujeme dle *GFA* do 3 tříd specifikovaných níže<sup>56,57</sup>. Stejně faktory, které mají vliv na schopnost vytvářet amorfní látku, mají vliv i na její stabilitu<sup>58</sup>.

## ROZDĚLENÍ API DLE GFA:

### API I. třídy

Tato skupina API se vyznačuje nízkou schopností tvořit sklo a nízkou stabilitou v amorfním stavu. Molekuly patřící do této skupiny mají malý počet rotačních vazeb a nízkou molekulovou hmotnost. Molekulová hmotnost látek, které velmi těžko tvoří sklo, se pohybuje kolem 200 g/mol a méně. Tyto API krystalizují během chlazení a dělí se na dvě podskupiny:

I.A a I.B. API spadající do I.A třídy krystalizují během pomalého chlazení (v DSC při chlazení rychlostí  $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), ale i během rychlého chlazení (chlazení kapalným dusíkem). API třídy I.B krystalizují pouze, jsou-li připravovány nízkou rychlostí chlazení ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), tzn. že rychlým chlazením je možno připravit amorfnní API z této třídy. Nevýhodou je, že následuje rychlá rekrystalizace i při skladování pod teplotou skelného přechodu. Například indoprofen (I.B třída,  $T_g = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) začíná krystalizovat při  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  již po 5 minutách. Během chlazení těchto API, však nemusí dojít ke krystalizaci ze 100 %, ale část API může zůstat v amorfnní formě, která rekrystalizuje během druhého ohřevu. Mezi API I. třídy patří 4-bifenylykarboxylová kyselina, 4-bifenylymethanol, antranilová kyselina, benzamid, benzokain, kofein, chlorpropamid, griseofulvin, haloperidol, indoprofen, theofylin, tolbutamid a tolfenamová kyselina atd<sup>56,57</sup>.

### API II. třídy

Tyto API vykazují vyšší sklotvornost a vyšší stabilitu než API I. třídy, ale jsou stále považovány spíše za nestabilní. Patří sem API, které lze amorfnní připravit i nízkou rychlostí chlazení ( $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a krystalizují až při druhém ohřevu. Tyto API mají vyšší molekulovou hmotnost a větší počet rotačních vazeb než API I. třídy. Baird a kol.<sup>57</sup> testovali stabilitu nifedipinu ( $T_g = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a felodipinu ( $T_g = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) při teplotě  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tedy nižší, než je jejich skelný přechod. Nifedipin začal krystalizovat na okrajích již po 1 dni a felodipin po 3 měsících, což jen dokazuje, že látky mající stejnou hodnotu skelného přechodu, nemusí nutně vykazovat stejnou stabilitu. Do této skupiny patří nifedipin, felodipin, acetaminofen, bifonazol, celekoxib, cinnarizin, droperidol, flurbiprofen, D-salicin, tolazamid ad<sup>56,57</sup>.

### API III. třídy

API patřící do III. třídy dle Bairda a kol.<sup>57</sup> by měla být nejstabilnější, nicméně i zde existují výjimky (například celekoxib). Tyto API nekrystalizují ani během chlazení taveniny ani během sekundárního ohřevu. Vyznačují se největší molekulovou hmotností s nejvyšším počtem rotačních vazeb. Molekulová hmotnost API vykazujících vysokou sklotvornost je zpravidla vyšší než  $300\text{ g/mol}$ . Nicméně, podobná struktura dvou API nezaručuje, že budou vykazovat stejnou stabilitu v amorfnní fázi. Svou roli hraje i mechanické namáhání. Například indometacin patří do III. třídy, ale jakmile je jeho povrch mechanicky narušen, vzniknou nuklea, která se projeví tzv. studenou krystalizací na DSC křivce (studená krystalizace = krystalizace na DSC křivce během ohřevu). Mezi API této třídy patří indometacin, itrakonazol, celekoxib, ketokonazol, ketoprofen, pimozin a ritonavir<sup>56,57,59</sup>.

Baird a kol.<sup>57</sup> v roce 2010 navrhli výše zmíněné rozdělení na základě chování API během cyklu ohřevu/chlazení/ohřevu v DSC<sup>57</sup> a v další publikaci<sup>58</sup> se pokusili podobnou klasifikaci použít na stejné látky připravené pomocí spin-coatingu. Spin-coating je zcela odlišná metoda v porovnání s chlazením taveniny. Výchozím materiálem je roztok API ve vhodném organickém rozpouštědle, stejně jako u sprejového sušení či lyofilizace, které je velmi rychle odpařeno za vzniku amorfnní látky. Obdobně jako v případě přípravy amorfnních látek v DSC, Baird. a kol.<sup>58</sup>, rozdělili látky připravené pomocí spin-coatingu dle *GFA* pomocí statistické analýzy do třech skupin. První skupina látek krystalizovala již během přípravy. DSC křivka připravených látek (spin-coating) obsahovala pouze tání (zcela krystalické vzorky) nebo skelný přechod následovaný rychlou krystalizací zbytku amorfnní API (byla to tedy směs amorfnní API s krystalickou). Druhá skupina látek se vyznačovala středně rychlou krystalizací (začaly krystalizovat do 7 dnů po přípravě) a třetí skupina látek krystalizovala pomalu (látky byly dlouhou dobu amorfnní). Rozdělení látek připravených spin-coatingem do I. II. a III. třídy dle *GFA* bylo s výjimkou čtyř látek totožné s rozdělením látek připravených chlazením taveniny v DSC, a to i přesto, že u spin-coatingu byla použita 3 různá rozpouštědla. Druh rozpouštědla nemá vliv na tendenci krystalizovat, pokud dojde k jeho velmi rychlému odpaření (jako v případě sprejového sušení)<sup>58</sup>. Edueng a kol.<sup>38</sup> (2019) otestovali klasifikační systém na látkách přímo připravených sprejovým sušením. Vybrali 26 látek, které nejdříve v amorfnní formě připravili v DSC. Na základě chování látek v DSC byly tyto látky zařazeny do II. (10 API) a III. třídy (16 API) dle *GFA*. Ty samé látky (26 API) byly připraveny sprejovým sušením. Pouze jedna API (Indapamid) zůstala podle výše zmíněné klasifikace v III třídě a byla stabilní po dobu 6 měsíců v 25 °C/5 %RH a 25 °C/75% RH. Naopak ostatní látky původně zařazené do III třídy (dle přípravy v DSC) a připravené sprejovým sušením odpovídaly svým chováním II. třídě dle *GFA* nebo byly krystalické ihned po přípravě. Krystalizace během přípravy byla většinou způsobena tím, že teplota na výstupu ze sprejové sušárny byla vyšší než  $T_g$  daných látek, takže došlo k rekrystalizaci. Fyzikální stabilita látek zařazených do II. třídy závisela na hydrofilicitě, hodnotě  $T_c$  (teplota krystalizace) a interakcích s vodou. Ve většině případů došlo k rekrystalizaci v 75% vlhkosti během 6 měsíců. V případě 5% vlhkosti rozhodovala teplota krystalizace, pokud byla vyšší než 120 °C, pak API zůstala amorfnní po dobu 6 měsíců v 5% vlhkosti. Míra sorpce vody a citlivost na vlhkost je velmi důležitá v případě amorfnních API, pokud je API hydrofobní a nedochází k hydroplastifikaci, pak se dá očekávat vyšší stabilita v amorfnní formě<sup>38</sup>. Předložené studie poukazují na to, že ne každá technika je vhodná k přípravě konkrétní API a je třeba zohlednit především její vlastnosti (hygroskopicitu, vliv plastifikace). Později (2016) se Blaajabjerg a kol.<sup>60</sup> pokusili o

upřesnění klasifikačního systému pro přípravu chlazením taveniny. Podle těchto autorů, API náležící do I. třídy nemohou být převedeny na amorfni ani s použitím rychlosti chlazení vyšší než  $750\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Naopak amorfni API II. třídy mohou být připraveny rychlostí  $10\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , zatímco k přípravě amorfni API III. třídy postačí rychlost chlazení  $\leq 2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  cit.<sup>60</sup>. Toto tvrzení bylo potvrzeno v jejich dalším článku (2017) zaměřeném na vliv metody přípravy na sklotvornost vybraných API.

Blaajbjerg a kol.<sup>60</sup> (2016) navíc poukázali na spojitost mezi termodynamickou a kinetickou metodou přípravy amorfni API. Testovali 18 API, které byly připraveny dvojím způsobem. Prvním způsobem přípravy byla metoda rychlého zchlazení taveniny v DSC a druhým mletí. Na základě přípravy v DSC byly API zařazeny do jedné ze tří tříd dle klasifikačního systému amorfni látek (dle Bairda a kol.<sup>57</sup>). Zajímavým zjištěním bylo, že látky patřící dle přípravy v DSC do I. třídy nebylo možné převést do amorfni podoby pomocí mletí bez ohledu na hodnotu teploty skelného přechodu dané API. API II. třídy klasifikovány dle přípravy v DSC byly pomocí mletí amorfizovány po 270 minutách, pokud byla jejich obvyklá teplota skelného přechodu vyšší než teplota při mletí. Stejný závěr byl obdržen v případě API III. třídy, kterým stačila nižší mlecí doba, tj. 90 minut<sup>42</sup>. Nutnost zajištění nižší teploty při mletí, než je predikovaná teplota skelné transformace, byla potvrzena i dalšími autory<sup>61</sup>.

Amorfni API produkované metodami založenými na odlišném postupu mohou vykazovat odlišný stupeň amorfности (stupeň neuspořádanosti). Amorfni sloučenina v různých stavech neuspořádanosti může vykazovat různou fyzikální stabilitu,  $T_g$ ,  $T_c$  či tvar halo efektu v záznamu z práškové rentgenové difrakci (XRPD)<sup>38</sup>.

Blaajbjerg a kol.<sup>42</sup> (2017) dokázali, že API připravené chlazením taveniny (extruzí z taveniny) a mletím mají odlišné molekulární uspořádání, a z toho vyplývající různou stabilitu. Stabilita amorfni fáze je dána mobilitou molekul, která stoupá nad teplotou skelného přechodu a hrozí rekrystalizace. Blaajbjerg a kol.<sup>42</sup> dokázali, že amorfni API připravené chlazením taveniny (termodynamickou metodou) jsou i v přítomnosti vlhkosti a vyšší teploty stabilnější než API připravené mletím (kinetickou metodou)<sup>42</sup>. Ke stejnému závěru dospěl v minulosti (2008) Graeser a kol.<sup>62</sup>, kteří se zabývali amorfni simvastatinem připraveným chlazením taveniny a kryomletím. Připravené vzorky se lišily ve fyzikální stabilitě, kdy vzorek získaný kryomletím byl výrazně nestabilní. Rozdílnost mezi oběma vzorky byla identifikována pomocí Ramanovy spektroskopie. Hlubší analýza termodynamických

parametrů naznačila, že vzorek připravený kryomletím vykazuje vyšší uspořádanost než vzorek získaný chlazením taveniny. Mletím zůstává nebo je formováno větší množství nukleí, které mají za následek rychlejší rekrytalizaci<sup>62</sup>.

Co se týče stability amorfních API v souvislosti s klasifikačním systémem amorfních látek (rozdělení dle *GFA*), existují zde další zobecnění. Alhalaweh a kol.<sup>63</sup> (2015) testovali 18 API připravených chlazením taveniny a vztah mezi jejich teplotou skelného přechodu a fyzikální stabilitou. Dle jejich názoru fyzikální stabilita nezávisí na  $T_g$ , ale nad touto teplotou dochází k rychlejší rekrytalizaci. Patří-li API do II. třídy dle *GFA*, pak je stabilní při teplotě 20 °C pod skelným přechodem, ale 20 °C nad  $T_g$  rekrytalizuje. API III. třídy jsou stabilní nad i pod skelným přechodem. Závěrem bylo, že *GFA* (charakteristické pro jednotlivé třídy) může být použito k predikci fyzikální stability<sup>63</sup>. V souvislosti s *GFA* existuje obecné pravidlo, které říká, že API vykazující molekulovou hmotnost ( $M_r$ ) vyšší než 300 g·mol<sup>-1</sup>, jsou snadněji transformovatelné do amorfni formy. Tato myšlenka byla ověřena Bairdem a kol.<sup>57</sup> (2010), Mahlinem a kol.<sup>59</sup> (2013) a dalšími autory<sup>57,59</sup>. Mahlin a kol.<sup>59</sup> studovali fyzikální stabilitu API ve vztahu k jejich různým vlastnostem ( $T_g$ ,  $T_c$ ,  $M_r$  atd.). Studovali pestrou škálu API, které byly dle termického chování zastoupeny ve všech tří třídách a vyznačovaly se teplotou tání vyšší než 140 °C. API byly připraveny dvojím způsobem, přičemž ke stabilitnímu testování byly vybrány pouze API, u kterých různá příprava vedla ke stejnému zařazení dle *GFA*. Stabilita API připravených sprejovým sušením byla zkoumána po dobu 1 měsíce při teplotě nižší než jejich  $T_g$ , tj. při 22 °C. Krystalinita API byla stanovena pomocí DSC a vynesena v závislosti na jejich vlastnostech ( $T_g$ ,  $T_c$ ,  $M_w$ ), všechny závislosti vedly k sigmoidálnímu průběhu a byl navržen predikční model na základě  $T_g$  a  $M_w$ . Ze zmíněných závislostí však bylo opět potvrzeno, že API s teplotou krystalizace nad 120 °C a molekulovou hmotností nad 300 g·mol<sup>-1</sup> jsou stabilnější<sup>56,59</sup>.

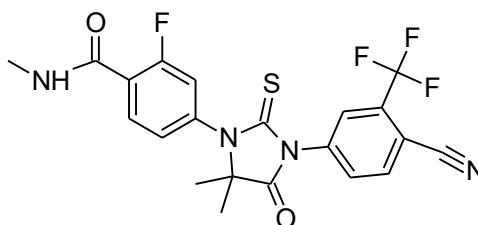
### 1.5. Pozice amorfních API na trhu

I přes nižší stabilitu amorfních API ve srovnání s API krystalickými jsou tyto součásti mnohých léků uvedených na trh. V roce 2017 bylo celosvětově evidováno 16 přípravků obsahujících API ve formě tuhé disperze a 5 přípravků obsahujících amorfní API v čisté formě. API byly převážně součástí tablet, ale i kapslí. V případě tuhých disperzí byla termická povaha API různá. Nejméně 9 API odpovídalo III. třídě dle GFA, tedy té nejstabilnější. Další dvě API patřily mezi API schopné tvořit sklo, ale spadaly do méně stabilní II. třídy. Jeden přípravek, uvedený na trh firmou Roche, obsahoval API, která velmi obtížně tvoří sklo (API I. třídy). Za použití vhodných excipientů je tedy možno vytvořit stabilní formulaci i s API, která má nízkou schopnost tvořit amorfní fázi<sup>64</sup>.

API použité v komerčních přípravcích jako čisté amorfní API (ne tuhé disperze) byly cefuroxim axetil, nelfinavir mesylát, chinapril hydrochlorid, rosuvastatin vápenatý a zafirkulast. Pouze u dvou z těchto API byla stanovena III. třída dle GFA. U zbylých API zařazení pomocí přípravy v DSC nebylo možné, neboť během tání dochází k dekompozici. Z uvedeného a z předešlých kapitol je tedy zřejmé, že použitím vhodných excipientů, vhodné metody amorfizace, typu lékové formy a volbou vhodného balení či skladovací podmínek, můžeme dosáhnout stabilní amorfní formulace<sup>64</sup>.

## 1.6. Enzalutamid - API studovaná v rámci disertační práce

Enzalutamid (Obrázek 4) je součástí tzv. hormonální antiandrogenní deprivace terapie, což je jedna z možností léčby metastatického kastrocařně-rezistentního karcinomu prostaty (mCRPC)<sup>65</sup>. Jedná se o nesteroidní antiandrogen, jenž je aplikován před i po chemoterapii. Léčba je založena na principu inhibice vazby androgenu (testosterenu) na specifické místo (receptor), kde se místo něj naváže API. Enzalutamid působí v několika stádiích signální dráhy. Je schopen jak inhibice vazby androgenu na receptor, tak inhibice jaderné translokace androgenního receptoru a následné interakce s DNA. Dojde ke snížení rychlosti růstu rakovinotvorných buněk, následné apoptóze (řizená buněčná smrt) a snížení velikosti nádoru<sup>66,67</sup>.



Obrázek 4. Chemická struktura enzalutamidu

### BIODOSTUPNOST

Enzalutamid patří do druhé třídy BCS, vykazuje nízkou rozpustnost a vysokou permeabilitu. Farmakokinetika enzalutamidu (*S*-enzalutamid) je řizena lineárním dvou-kompartmentovým modelem (disoluce a jednokroková absorpce). Limitující krokem je disoluce díky nízké rozpustnosti enzalutamidu. Doporučené dávkování enzalutamidu je 160 mg jako jednorázová denní dávka. Stále častěji se objevují vedlejší účinky spojené s vyšší dávkou enzalutamidu, proto je v takovém případě denní dávka snížena na 80 mg<sup>68-71</sup>. Enzalutamid je účinnou látkou přípravku XTANDI (Astellas Pharma) komerčně dostupného od roku 2012. XTANDI je dostupný ve formě měkkých želatinových tobolek (40 mg enzalutamidu) nebo potahovaných tablet (40 a 80 mg enzalutamidu)<sup>68</sup>. Biodostupnost enzalutamidu lze zvýšit převedením na rozpustnější formu (amorfní, tuhá disperze)<sup>72</sup>.

### FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI ENZALUTAMIDU

Enzalutamid je hydrofobní API s molekulovou hmotností 464,4 g·mol<sup>-1</sup>. Wilson a kol.<sup>72</sup> stanovili rozpustnost amorfního enzalutamidu ve fosfátovém pufru (*pH* = 6.5) při teplotě 37 °C na 42 µg·ml<sup>-1</sup> a krystalické formy na 2,9 µg·ml<sup>-1</sup>. Volkova a kol.<sup>73</sup> stanovili rozpustnost

krystalického enzalutamidu při teplotě 25 °C ve fosfátovém pufru ( $pH = 7.4$ ) a zředěném roztoku kyseliny chlorovodíkové ( $pH = 1.7$ ) na 1,6  $\mu\text{g/ml}$ . Rozpustnost enzalutamidu není závislá na  $pH$ , ale lineárně stoupá s koncentrací polyethylenglykolu nebo cyklodextrínů v roztoku. Nejstabilnější forma enzalutamidu je forma R1 s onsetem teploty tání na 196 °C. Teplota skelného přechodu amorfního enzalutamidu se pohybuje kolem 89 °C. Amorfní forma je schopna absorbovat 0,5 molů vody na 1 mol enzalutamidu při 100 % RH, přičemž  $T_g$  může klesnout přibližně o 10 °C. Amorfní enzalutamid poměrně rychle rekrystalizuje, proto se řada publikací zabývá tvorbou tuhých disperzí<sup>72,73</sup>.

Wilson a kol.<sup>72</sup> připravili tuhé disperze enzalutamidu s hydrofilními polymery (hydroxypropylmethyl celulóza, kopovidon) a zdůraznili důležitost tvorby amorfních agregátů během rozpouštění namísto jednoduchého rozpuštění a tvorby přesyceného roztoku. Vznikne-li přesycený roztok spolu s amorfními agregáty (amorfní nanočástice), pak tyto fungují jako rezervoáry API, která může být snadno absorbována. K tvorbě amorfních agregátů docházelo během disoluce tuhé disperze obsahující 10 % enzalutamidu a 90 % kopovidonu (Kollidon<sup>®</sup> VA64). HPMC AS vede k tvorbě přesyceného roztoku s minimálním množstvím amorfních shluků, tedy k jednoduchému rozpuštění a udržení API v přesyceném stavu<sup>72</sup>.

Aoki a kol.<sup>74</sup> a Everett a kol.<sup>75</sup> uvedli patenty související s udržením přesyceného stavu enzalutamidu pomocí polymerů. K udržení přesyceného stavu byl použit Kollidon VA64, Kollidon<sup>®</sup> 30, polyvinylalkohol, hydroxylpropylmethylcelulóza acetylsukcinát atd. Rovněž v těchto případech byly připraveny tuhé roztoky enzalutamidu s uvedenými polymery. Navíc, za účelem dosažení co nejrychlejšího rozpadu formulací, bylo v některých případech použito 2 % rozvolňovačů<sup>74,75</sup>. Polymery velmi často vytvářejí s API struktury za pomoci interakcí ionizovatelných skupin, např. tvorba micel. V některých případech nedošlo tedy pouze k jednoduchému rozpuštění enzalutamidu, ale k vytvoření agregátů s polymerem<sup>75</sup>.

## POLYMORFNÍ FORMY ENZALUTAMIDU

V nehydratované formě je známá pouze jedna polymorfni forma enzalutamidu označovaná jako R1 a dvě hydratované formy R2, R3 (označovaná také jako forma B). Výše uvedený strukturní vzorec (Obrázek 4) je tzv *S*-enzalutamid, neboť obsahuje síru. Pokud dojde k záměně síry (sulfanylové skupiny) v poloze 2 imidazolového kruhu za karbonylovou skupinu, vzniká nečistota tzv. *O*-enzalutamid. Tato nečistota vzniká během syntézy enzalutamidu. *O*-enzalutamid tvoří dvě nehydratované formy, formu I a II. Všechny

polymorfni formy mají monoklinickou základní buňku krystalové mřížky, liší se hlavně jejími rozměry a některé prostorovou grupou<sup>76</sup>.

*S*-enzalutamid, žádoucí účinná forma API, vytváří nejstabilnější polymorfni formu R1 s onsetem tání u 196 °C a entalpií kolem 73 J·g<sup>-1</sup>. Ostatní dvě polymorfni formy (hydráty), uvolňují nejdříve rozpouštědlo a poté endotermně přecházejí na stabilnější krystalickou formu (cca u 170 °C)<sup>76</sup>.

V této disertační práci byl použit *S*-enzalutamid nejstabilnější polymorfni formy R1.

## 1.7. Experimentální metody použité k charakterizaci API

V této kapitole budou uvedeny základní informace ke dvěma nejdůležitějším experimentálním metodikám použitým v disertační práci – měření kinetiky krystalizace pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a měření disoluční kinetiky metodou disolučního testu. Ostatní techniky použité v této práci (prášková rentgenová difrakce, pevnofázová nukleární magnetická rezonance, infračervená spektroskopie, Ramanova spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a UV-VIS spektroskopie) byly využity buď k pevnofázové charakterizaci nebo ke stanovení koncentrace API uvolněné během disolučního testování.

### 1.7.1. Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie je založena na analýze rozdílu tepelného toku mezi referencí ( $R_i$ ) a zkoumaným materiálem ( $S_i$ ) v závislosti na čase nebo na teplotě. V předkládané práci byl použit **tepelně vodivostní typ DSC** (Heat Flux). Princip tohoto přístroje je založen na přímém měření rozdílu teploty mezi referencí a vzorkem, který je přímo úměrný rozdílu teplotního toku. Signál může být sbírán ze dna kelímku se vzorkem prostřednictvím disku s teplotními sensory (diskový systém, modifikovaný diskový systém) nebo ze stran prostřednictvím termočlánků (cylindrický systém tzv. Calvetův systém). DSC je jednou s nejpoužívanějších technik k charakterizaci farmaceutických látek a má širokou aplikaci. Používá se k identifikaci pevnofázové formy vzorku (amorfní, polymorfni atd.). Mimo to se používá ke kvantifikaci obsahu krystalické a amorfní fáze, charakterizaci tuhých disperzí, stanovení jejich stability atd<sup>77</sup>.

## Analýza DSC záznamu

Během analýzy krystalických API můžeme očekávat tání krystalické formy. U některých API můžeme narazit na nestabilní polymorfní formu rekrystalizující do stabilnější formy, která následně taje. Během analýzy DSC křivky se tedy můžeme setkat s táním nebo reverzibilním či nereverzibilním přechodem do stabilnější formy. U amorfních API se můžeme setkat se skelným přechodem, krystalizací a následným táním. Jsou-li amorfní API připravovány v DSC, dle standardní metody použití cyklu ohřevu/chlazení/ohřevu rychlostí  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  nebo  $20\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ , můžeme se setkat se třemi typy chování popsanými v kapitole 1.4<sup>57</sup>. Mohou být použity různé navážky vzorku, různé typy kelímků (otevřené, hermeticky uzavřené, pin-hole kelímky), různá atmosféra v cele DSC (nejčastěji dusík, ale může být použit kyslík, vzduch atd.), různé rychlosti chlazení či ohřevu, a to vše má vliv na výsledný záznam z DSC<sup>78</sup>.

*Teplota skelného přechodu*  $T_g$  charakterizuje reverzibilní přechod mezi sklovitým stavem a podchlazenou kapalinou. Během rychlého chlazení podchlazené kapaliny/taveniny dochází v určitém okamžiku k odchýlení od rovnovážné křivky podchlazené kapaliny a vzniku skla/amorfni látky. Toto odchýlení čili skelný přechod, je charakterizované změnou směrnice závislosti sledované vlastnosti na teplotě a v DSC záznamu se projeví jako schod v tepelné kapacitě.  $T_g$  může být vyhodnocováno jako inflex, výška v polovině schodu či onset. Ke snížení teploty skelného přechodu dochází v přítomnosti plastifikátorů, což může být vlhkost či jiné malé molekuly (např. ibuprofen)<sup>78</sup>.

*Oblast nad teplotou skelného přechodu* je charakterizovaná značnou pohyblivostí atomů a se zvyšováním teploty dochází k jejich přeuspořádání a ke krystalizaci. Krystalizace je ireverzibilní exotermní přechod, charakterizovaný v DSC záznamu exotermním píkem. U krystalizace vyhodnocujeme entalpii krystalizace, teplotu maxima krystalizačního píku a počátek (onset) krystalizace. U krystalizace, ale i u tání, je důležité při integraci plochy píku (entalpie krystalizace) zvolit vhodnou základní linii (lineární, sigmoidní)<sup>78</sup>.

*Tání* je reverzibilním přechodem, který se v DSC záznamu projevuje jako endotermní pík. Nejčastěji se vyhodnocuje extrapolovaný onset nebo maximum teploty tání. Tání má obvykle ostrý náběh, ale v případě přítomnosti nečistot může mít jiný tvar a být širší<sup>78</sup>.

## Kinetická analýza krystalizace amorfních látek

Predikce krystalizace je velmi obtížnou disciplínou, neboť závisí na podmínkách prostředí určeného ke skladování API (teplota, vlhkost, mechanický stres), metodě přípravy (odpařování rozpouštědla, chlazení taveniny či mletí) a v neposlední řadě na vlastnostech API (molekulová hmotnost, počet rotačních vazeb, teplota skelného přechodu, teplota krystalizace, počet heterogenních atomů). Sledování krystalizace pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je založeno na měření uvolněného tepla během krystalizačního procesu<sup>38</sup>. Následující postup je využíván zejména u anorganických skel, v našem případě bude ověřena jeho aplikace na API II. třídy dle *GFA*. Krystalizaci lze popsat na základě vyčíslení jednotlivých členů základní DSC rovnice (8):

$$\varphi = \frac{dQ}{dt} = \Delta H \cdot A_f \cdot e^{-\frac{E}{R \cdot T}} \cdot f(\alpha) \quad (8)$$

kde  $\varphi$  je tepelný tok v  $\text{J} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\Delta H$  je entalpie procesu v  $\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $A_f$  je frekvenční faktor v  $\text{s}^{-1}$ ,  $E$  je aktivační energie daného procesu v  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $R$  je univerzální plynová konstanta v  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $T$  je teplota v K a  $f(\alpha)$  je kinetický model popisující probíhající proces.

Entalpie procesu se získá integrací plochy krystalizačního píku, přičemž její hodnota je závislá na zvoleném typu základní linie (lineární, B-spline atd.). Dále je potřeba stanovit aktivační energii a kinetický model:

### 1) Stanovení aktivační energie

Aktivační energii je možno určit různými způsoby v závislosti na podmínkách procesu (izotermní, neizotermní). Velkou nevýhodou izotermních experimentů je teplotní rozsah. U nízkých teplot může být obtížné zachytit celý proces v rozumném čase, zatímco u vysokých teplot může proces proběhnout dříve, než dosáhneme izotermního režimu. Následující neizotermní metody také označujeme jako „Model free“ metody, neboť nepotřebujeme znát kinetický model pro určení aktivační energie. Ke stanovení aktivační energie krystalizace je nutné aplikovat několik různých rychlostí ohřevu  $q^+$  během DSC měření. Obvyklým principem následujících metod je posun maxima krystalizačního píku nebo teploty odpovídající určitému stupni konverze s rychlostí ohřevu. Následující metody se dělí na dvě skupiny. První předpokládají, že se mechanismus krystalizace během procesu nemění a stupeň konverze dosažený v maximu krystalizačního píku je pro všechny rychlosti ohřevu

stejný. Princip druhé skupiny metod je ve stanovení aktivační energie jednotlivě pro různé stupně konverze a vynesení závislosti aktivační energie na konverzi.

### 1a) Metody předpokládající stejnou hodnotu konverze v maximu krystalizačního píku při různých rychlostech ohřevu

Tyto metody předpokládají, že se v průběhu teplotního či časového rozmezí mechanismus krystalizace nemění. Experimentální data se získají aplikací různých lineárních rychlostí ohřevu  $q^+$  na krystalizační proces daného materiálu<sup>79,80</sup>. Jedním ze zástupců těchto metod je Kissingerova metoda (9).

Aktivační energie se získá ve směrnici přímkové závislosti levého členu rovnice na  $\frac{1}{T_p}$  nebo  $\frac{1000}{T_p}$ .

#### Kissingerova metoda<sup>79</sup>

$$\ln \frac{q^+}{T_p^2} = -\frac{E}{R \cdot T_p} + K \quad (9)$$

kde  $T_p$  je teplota v maximu krystalizačního píku (v Kelvinech),  $K$  je konstanta.

### 1b) Metody umožňující stanovit aktivační energii pro určitý stupeň konverze tzv. izokonverzní metody

I v tomto případě je zapotřebí získat sadu krystalizačních křivek různými lineárními rychlostmi ohřevu. Na tomto místě je zapotřebí definovat konverzi  $\alpha$ . Konverze představuje množství zakrystalizovaného materiálu. V tomto případě se jedná o konverzi dosaženou během neizotermního experimentu. Celková plocha krystalizačního píku představuje 100 % a je potřeba určit teploty  $T_\alpha$ , při které dochází ke zvolené konverzi  $\alpha$  a to pro každou rychlost ohřevu<sup>81</sup>. Zástupcem těchto metod je metoda Kissinger–Akahira–Sunose (10).

#### Kissinger-Akahira-Sunose<sup>81</sup> (tzv. zobecněná Kissingerova metoda, zkráceně KAS)

$$\ln \left( \frac{q^+}{T_\alpha^{1,92}} \right) = -1,0008 \cdot \frac{E\alpha}{R \cdot T_\alpha} + K'' \quad (10)$$

kde  $E_\alpha$  je aktivační energie krystalizace pro zvolený stupeň konverze.

## 2) Určení modelu krystalizace

Dalším krokem kinetické analýzy je stanovení kinetického modelu a jeho parametrů. Vhodný kinetický model pro popis experimentálních dat může být vybrán na základě tvaru a hodnoty maxima charakteristických funkcí  $z(\alpha)$  a  $y(\alpha)$ , které jsou získány vhodnou transformací experimentálních DSC dat. Funkce  $z(\alpha)$  má následující tvar pro neizotermní měření (11) a pro izotermní měření (12)<sup>82</sup>:

$$z(\alpha) = \varphi \cdot T^2 \quad (11)$$

$$z(\alpha) = \varphi \cdot t \quad (12)$$

kde  $\varphi$  je tepelný tok v  $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $T$  je teplota v Kelvinech a  $t$  je čas v sekundách. Maximum funkce  $z(\alpha)_{max}$  odpovídá maximální rychlosti děje. Dále se zavádí funkce  $y(\alpha)$ , jež je při použití izotermních podmínek (13) srovnatelná s tepelným tokem a za neizotermních podmínek (14) je závislá na aktivační energii procesu (krystalizace):

$$y(\alpha) = \varphi \quad (13)$$

$$y(\alpha) = \varphi \cdot e^{\frac{E}{RT}} \quad (14)$$

kde  $\varphi$  je tepelný tok v  $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $E$  je aktivační energie v  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ .  $R$  je univerzální plynová konstanta v  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  a  $T$  je teplota v Kelvinech.

Oba parametry ( $z$ ,  $y$ ) mohou být normovány, aby nabývaly hodnot v intervalu od 0–1. Tvary těchto funkcí jsou charakteristické pro daný kinetický model. Maximum  $z(\alpha)$  v případě JMA modelu je 0,632<sup>82</sup>. V této disertační práci byl použit Johnson-Mehl-Avrami (JMA) model, Šesták-Berggrenův (AC) model a model  $n$ -tého řádu, proto budou popsány pouze tyto kinetické modely. V následujících rovnicích  $\alpha$  označuje stupeň konverze.

Šesták-Berggrenův (AC) model je univerzální dvouparametrový model, formulovaný rovnicí (15). Parametry tohoto modelu ( $M$ ,  $N$ ) nemají fyzikální smysl, ale i přesto patří tento model mezi nejpoužívanější modely sloužící k popisu složitějších kinetických dějů. Speciálním případem tohoto modelu je JMA model<sup>83</sup>.

$$f(\alpha) = \alpha^M \cdot (1 - \alpha)^N \quad (15)$$

Johnson-Mehl-Avrami je jednoparametrový model, který je hojně používán pro popis kinetiky krystalizace ve sklotvorných materiálech. Rovnice (16) uvádí matematickou formulaci JMA modelu.

$$f(\alpha) = m \cdot (1 - \alpha) \cdot [-\ln(1 - \alpha)]^{1 - \frac{1}{m}} \quad (16)$$

Je známý také jako Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorovův model. Parametr  $m$  je charakteristický pro určitý mechanismus nukleace a růstu krystalů. Skládá se ze dvou členů, jednoho pro nukleaci a druhého pro růst krystalů dle následující rovnice (17)<sup>84</sup>.

$$m = p + q \quad (17)$$

$p = 0$  pro homogenní nukleaci,  $p = 1$  pro heterogenní nukleaci

$q$  charakterizuje dimenzionalitu krystalů,  $q = 3$  pro 3D sférické částice,  $q = 2$  pro destičky nebo ploché disky,  $q = 1$  pro tyčinky.

Posledním použitým kinetickým modelem v této práci byl model  $n$ -tého řádu (18). Stejně jako v případě Šesták–Berggrenova modelu se jedná o autokatalytický model<sup>85</sup>.

$$f(\alpha) = (1 - \alpha)^n \cdot (1 + K\alpha) \quad (18)$$

kde  $n$ ,  $K$  jsou kinetické exponenty/parametry kinetického autokatalytického modelu  $n$ -tého řádu.

### 1.7.2. Disoluční testy

Disoluční testování je mnoho let nedílnou součástí farmaceutického vývoje i kontroly kvality. Provedení disolučních testů je dáno platným lékopisem (ČL – Český Lékopis<sup>18</sup>, Ph. Eur. – *European Pharmacopeia*<sup>19</sup>, USP – *The United States Pharmacopeia*<sup>86</sup>) a příslušnými regulačními autoritami (SUKL – *Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv Česká Republika*<sup>87</sup>, EMA – *European Medicines Agency*<sup>88</sup>, FDA – *Food and Drug Administration*<sup>89</sup>). Z disolučního profilu lze určit typ uvolňování API (okamžité, řízené), typ řízeného uvolňování (prodloužené, zpožděné a pulzní) nebo mechanismus uvolňování (bobtnání, difuze atd.). Z vizuálních změn (desintegrace, bobtnání, plování tablety) během disoluce je možno objasnit některé jevy v průběhu disolučního profilu. Desintegrace a disoluční chování dané formulace jsou faktory, které významně ovlivňují biodostupnost API, neboť definují množství API dostupné pro absorpci.

### 1.7.2.1. Historický vývoj disolučního testování

Historie disolucí sahá zhruba do doby před 120 lety, avšak jejich intenzivní vývoj začal až kolem roku 1950. Zhruba od zmíněného roku se začalo uvolňené množství API během disolucí spojovat s množstvím API, jež může být fyziologicky dostupné v lidském organismu pro vyvolání požadovaného účinku. V polovině 60.let vzrostl zájem o disoluce jako reakce na zjištění, že léky různých výrobců obsahující stejnou účinnou látku vykazují velké rozdíly v biodostupnosti, v nástupu, intenzitě či trvání účinku. Nejznámějšími případy, u kterých byly odhaleny rozdíly v biodostupnosti, byl například digoxin (antiarytmikum) v Austrálii 1971<sup>90</sup> nebo fenytoin (antiepileptikum) na Novém Zélandě 1968<sup>91</sup>. V roce 1970 byly disoluční testy oficiálně zařazeny do Amerického lékopisu, kde byla jako první popsána košíčková metoda USP I. V 80. letech 20. stol. se disoluce stala důležitým nástrojem při vývoji a kontrole lékových forem s řízeným uvolňováním<sup>92</sup>.

### 1.7.2.2. Experimentální podmínky disoluce

Disoluční testování se nejčastěji provádí ve skleněných nádobách opatřených míchadlem/košíčkem, ze kterých se v průběhu disolučního testu odebírá určitý objem disolučního média v daných časových intervalech. V odebraných vzorcích se stanovuje množství uvolněné/rozpuštěné API. Příkladem takového přístroje je disoluční přístroj firmy Sotax uvedený na Obrázku 5. Odebrané množství disolučního média může být nahrazováno čerstvým disolučním médiem, pak se jedná o otevřený systém anebo se odebrané množství nenahrazuje (uzavřený systém), ale je nutné uplatnit korekci objemu během disoluční výpočtů. Speciálním uspořádáním disolučního testu je pak průtočný systém, kdy se uvolněné množství stanovuje *in situ*<sup>17</sup>.



Obrázek 5. Disoluční aparatura firmy Sotax používaná na katedře fyzikální chemie.

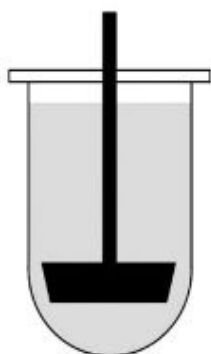
Americký lékopis udává 7 disolučních metod<sup>86,93–95</sup>:

1. Košíčková metoda – USP I
2. Pádelková metoda – USP II
3. Metoda vratného válce – USP III
4. Průtočná cela – USP IV
5. Pádelková metoda s diskem – USP V
6. Metoda rotujícího válce – USP VI
7. Metoda vratného disku – USP VII

V této práci byla nejčastěji používaná pádelková metoda, proto zde bude blíže popsána. Další metodou, která zde byla použita byla pádelková metoda s diskem, a to v rámci pravé disoluce. Pravá disoluce bude vysvětlena níže.

### **Pádelková metoda – USP II.**

Pádelková metoda je obvykle první volbou během disolučního testování. Přístroj obsahuje skleněné (borosilikátové sklo) válcovité nádoby s kulatým dnem o objemu 1 litr. Víko nádoby zamezuje vypařování média. Ve víku je umístěna hřídel. Na konci hřídele je nasazeno pádlo (Obrázek 6). V případě plování tablet na hladině či lepení na stěny nádoby je zapotřebí použít tzv. sinkery. Sinkery představují držáky, do kterých se vloží tableta (tobolka)



a sinker se pak umístí na dno disoluční nádoby. Disoluční nádoby jsou umístěny v temperované lázni (voda), která zajišťuje vyhřátí média na teplotu  $37 \pm 0,5$  °C. Nevýhodou pádelkové metody je tvorba kónického kuželu v ose míchání vlivem hydrodynamických parametrů. Disoluční test v pádelkovém uspořádání se používá pro formulace s okamžitým i řízeným uvolňováním, potahované tablety atd<sup>14</sup>.

Obrázek 6. Schéma pádelkové disoluční metody. Převzato z:<sup>252</sup>.

### **Pravá disoluce**

Během tzv. pravé disoluce (angl. *apparent intrinsic dissolution*) je cílem stanovit rychlost rozpouštění tzv. *intrinsic dissolution rate*. Touto disoluční rychlostí se rozumí rychlost uvolňování čisté API z konstantního povrchu, kdy výsledná rychlost může být vyjádřena jako množství API rozpuštěné za čas s definovaného povrchu ( $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Prášková API je zpracována potřebnou lisovací silou do formy disku s hladkým povrchem o

přesně definované velikosti. Důvodem zpracování API do formy disku je eliminace závislosti rychlosti rozpouštění na velikosti povrchu API. Pravá disoluce podléhá dle USP disoluční metodě VI. Může být realizována jako metoda s rotujícím diskem či se stacionárním diskem. Experimentální podmínky musí být zvoleny tak, aby byly dodrženy „*sink podmínky*“, což je možné volbou vhodného disolučního média. Teplota během disolučního experimentu je stejně jako v předchozím případě dána fyziologickými podmínkami, tj.  $37 \pm 0,5$  °C. V případě této disertační práce byla používána metoda se stacionárním diskem, kdy je disk s API umístěn do disoluční nádoby a míchání média je zajištěno pádelkem nad ním. Množství rozpuštěného léčiva je stanovováno v definovaných časových intervalech. Výsledkem je závislost kumulativního množství rozpuštěné API na čase. Lineární regrese je aplikována na počáteční lineární úsek disoluční křivky. Směrnice přímky pak odpovídá disoluční rychlosti (množství uvolněné API·čas<sup>-1</sup>). Závislost kumulativního množství na čase nemusí být lineární v celkém rozsahu, proto je disoluční rychlost vyhodnocována pouze z počátečního úseku. To, že poté není disoluční křivka lineární může být signál několika jevů. Pokud je zakřivení pozitivní (směrem nahoru) – zvýšení rozpuštěného množství API, pak se může jednat o fyzikální degradaci disku API (prasklina na povrchu, odlupování vrstev, desintegrace). V případě, že je zakřivení negativní (směrem dolů) – pokles rozpuštěného množství API, pak tento disoluční profil indikuje pevnofázovou transformaci API (přechod jedné krystalické formy na stabilnější, přechod z amorfní formy na krystalickou, přechod z anhydrátu na hydrát atd.) nebo dosažení nasyceného stavu. Proto je důležité po provedení experimentu sledovat změny disku a analyzovat formu API po provedení disolučního testu<sup>95</sup>.

### 1.7.2.3. Analýza a kvantitativní popis disolučních profilů API

Výsledkem disolučního testu je závislost uvolněného/rozpuštěného množství léčiva na čase, která umožňuje kvantitativně popsat mechanismus uvolňování léčiva z lékové formy. V současnosti existuje řada matematických modelů používaných k popisu disolučních profilů. Některé jsou odvozeny na kinetickém základě (model kinetiky 0. řádu, model kinetiky I. řádu) nebo na základě popisu děje řídicího uvolnění léčiva (např. model Higuchi), další jsou empirické, resp. statistické (model Weibull atd.). V následujícím textu budou blíže popsány modely použité v této práci.

#### **Kinetika 0. řádu**

API se uvolňuje z lékové formy konstantní rychlostí nezávisle na počátečním množství API v lékové formě. Kinetika 0. řádu je ideální případ chování lékových forem

s prodlouženým uvolňováním vedoucí ke stabilní plazmatické koncentraci (potřebná např. v případě léků na tlak či antibiotik). Kinetika 0.řádu se řídí rovnicí (19)<sup>96,97</sup>:

$$A_t = k_0 t \quad (19)$$

kde  $A_t$  je množství API uvolněné v čase  $t$ ,  $k_0$  je rychlostní konstanta 0. řádu s rozměrem množství API · čas<sup>-1</sup> a  $t$  je čas.

### Kinetika I. řádu

U kinetického modelu prvního řádu je rychlost uvolňování API závislá na množství API v lékové formě a klesá v průběhu času. Nejvyšší rychlosti uvolňování API je dosaženo bezprostředně po aplikaci léčivého přípravku a poté uvolněné množství API s časem klesá. Tento typ uvolňování je ve srovnání s kinetickým modelem 0. řádu méně vhodný pro léčiva s prodlouženým uvolňováním, kdy požadujeme stálou koncentraci API v plazmě. Kinetika I. řádu se řídí rovnicí (20)<sup>97,98</sup>:

$$A_t = A_\infty (1 - \exp(-k_1 t)) \quad (20)$$

kde  $A_t$  je množství API uvolněné v čase  $t$ ,  $A_\infty$  je maximální uvolnitelné množství API,  $k_1$  je rychlostní konstanta I. řádu s rozměrem čas<sup>-1</sup>.

### Model Weibull

Jedná se o statistický model, jehož parametry  $k_w$  a  $\beta$  nemají fyzikální smysl. Tento model lze vyjádřit rovnicí (21)<sup>97,99</sup>:

$$A_t = A_\infty (1 - \exp(-k_w (t - T_t)^\beta)) \quad (21)$$

kde  $A_t$  je množství API uvolněné v čase  $t$ ,  $A_\infty$  je maximální uvolnitelné množství API,  $k_w$  je konstanta s rozměrem čas<sup>- $\beta$</sup> ,  $T_t$  je prodleva („lag time“) v uvolnění API na počátku disoluce a  $\beta$  charakterizuje tvar exponenciální křivky.

Pokud je „lag time“ roven 0 a parametr  $\beta$  roven 1, pak model Weibull přechází formálně na kinetický model I. řádu.

## Model Korsmeyer-Peppas

Model umožňuje určení mechanismu uvolňování z polymerních systémů různé geometrie. Model vyjadřuje rovnice (22), která platí v uvedeném tvaru v případě, že uvolněné množství API nepřesáhne 60 %<sup>100</sup>:

$$\frac{A_t}{A_\infty} = k_{KP} t^{n_{KP}} \quad (22)$$

V rovnici (22)  $A_t$  vyjadřuje množství API uvolněné v čase  $t$ ,  $A_\infty$  je maximální uvolnitelné množství API,  $k_{KP}$  je konstanta s rozměrem čas<sup>-n</sup> a  $n_{KP}$  je tzv. release exponent, který charakterizuje mechanismus transportu API z lékové formy, zejména z polymerních nosičů<sup>100</sup>.

Na základě hodnoty parametru  $n$  je možno určit, zda se uvolňování API řídí difuzním mechanismem na základě Fickova zákona nebo zda se jedná o jiné transportní mechanismy (Case II transport či Super Case II transport). Je-li parametr  $n_{KP}$  roven 1 (polymerní filmy), resp. 0,89 a 0,85 u cylindrické a kulové geometrie, je rychlost uvolňování nezávislá na čase a API se uvolňuje kinetikou 0. řádu. V polymerní chemii se tento druh transportu označuje jako tzv. Case-II transport. Tento mechanismus je charakterizovaný bobtnáním polymeru a relaxací jeho řetězců. Je-li parametr  $n_{KP}$  roven 0,5 (v případě tenké vrstvy 0,5; cylindrické geometrie 0,45 a kulové geometrie 0,43) je uvolňování řízeno čistě difuzí. Rychlost transportu rozpouštědla či difuze je v tomto případě daleko vyšší než proces relaxace polymerních řetězců. Pokud je hodnota parametru  $n_{KP}$  v rozmezí 0,5 – 1,0; pak se jedná o superpozici těchto dvou dějů<sup>100</sup>. Existuje navíc ještě jeden extrémní případ, tzv. Super Case II transport, kdy parametr  $n_{KP}$  je vyšší než hodnota 1. V takovém případě dochází k absorpci extrémního množství rozpouštědla, ke vzniku velké tenze uvnitř jádra, která zamezí bobtnání v axiálním směru. S posunem rozhraní polymerního gelu a suchého jádra dochází k nárůstu tenze a k rozpadu jádra<sup>101</sup>.

### 1.7.2.4. Další kritéria používaná pro vyhodnocování disolučních profilů

V této kapitole budou vysvětlena další kritéria používaná k hodnocení disolučních profilů.

## Faktor podobnosti ( $f_2$ )

Faktor podobnosti  $f_2$  je základní kritérium pro hodnocení podobnosti disolučních profilů, deklarovaný FDA (z angl. *Food and Drug Administration*) a EMA (z angl. *European Medicine Agency*). Faktor podobnosti představuje logaritmičnou transformaci převrácené hodnoty sumy čtverců odchylek reference a vzorku aplikovanou přes všechny disoluční body.

Matematicky jej lze vyjádřit rovnicí (23)<sup>97,102</sup>:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (23)$$

kde  $n$  je počet disolučních bodů,  $R_j$  je uvolněné množství API z referenčního přípravku a  $T_j$  je uvolněné množství API z testovaného přípravku v disolučním médiu.

Blížili se výsledek hodnotě 100, pak jsou disoluční profily reference a vzorku identické. Čím víc se však hodnota blíží nule, tím jsou zkoumané disoluční profily odlišnější. FDA a EMA shledává disoluční profily být podobnými, pokud je hodnota  $f_2$  v intervalu  $\langle 50; 100 \rangle$ .

### Disoluční účinnost (D.E.)

Pojem disoluční účinnost byl zaveden v roce 1972 Khanem a Rhodesem. Tento parametr představuje poměr mezi plochou pod experimentální disoluční křivkou porovnanou s plochou čtverce odpovídajícího 100 % disolučního času. D.E. je vyjádřena rovnicí (24)<sup>103</sup>:

$$D.E. = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \cdot 100\% \quad (24)$$

kde  $y$  představuje procento uvolněného množství API za čas  $t$  a  $y_{100}$  je popsán jako 100 % disoluce ve stejném čase.

#### 1.7.2.5. Ovlivnění disoluční rychlosti

Rychlost disoluce ovlivňuje biodostupnost málo rozpustných API. Způsoby pro zvýšení disoluční rychlosti vyplývají z Nerst–Brunnerovy rovnice (25)<sup>21</sup>:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D}{V \cdot h} S(c_s - c_t) \quad (25)$$

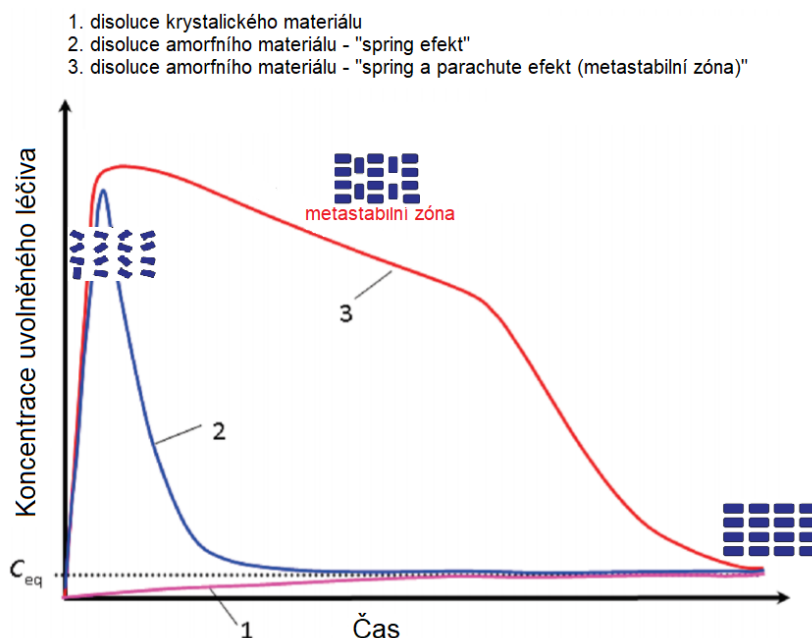
kde  $S$  je povrch částice/tablety;  $V$  je objem disolučního média;  $h$  je tloušťka difuzní vrstvy (nemíchaného disolučního média kolem částice/tablety);  $c_s$  je rozpustnost API;  $c_t$  je koncentrace API obsažené v disolučním médiu v čase  $t$ .

#### Způsoby zvýšení rozpustnosti jsou následující:

- zvětšení povrchu zkoumaného materiálu<sup>104</sup>
- snížení koncentrace API rozpuštěné v objemu<sup>21</sup>
- zvýšení zdánlivé rozpustnosti<sup>21</sup>
- snížení tloušťky difuzní vrstvy<sup>21</sup>
- zvýšení difuzního koeficientu<sup>21</sup>

## 1.7.2.6. Disoluce amorfních API

Amorfní API vykazují daleko vyšší rozpustnost než látky krystalické, a to z důvodu vysoké volné energie ( $\Delta G_{a \rightarrow c}$ ), vysoké entropie ( $S$ ), většího povrchu, vyšší smáčivosti atd. Zpravidla do 10–15 minut disolučního *in vitro* experimentu s amorfní API vzroste skokově koncentrace API v disolučním médiu. Okamžitý nárůst koncentrace se označuje jako tzv. „Spring effect“. Poté může dojít k poklesu koncentrace až k hodnotě termodynamické rozpustnosti krystalické formy. Druhou možností je, že dojde k udržení vyšší koncentrace, která je označována jako „Parachute effect“. Tento jev je odrazem vzniku metastabilního polymorfu, jenž vykazuje vyšší rozpustnost nebo jsou klastry amorfní fáze stabilizovány aditivy, tj. polymery, surfaktanty atd.<sup>8,22</sup>. Disoluční křivky odpovídající zmiňovaným jevům jsou zobrazeny na Obrázku 7.



Obrázek 7. „Spring“ a „Parachute“ effect vznikající po rozpuštění amorfní látky či kokryystalu. Převzato a upraveno z: <sup>8</sup>.

Disoluční chování amorfních API či tuhých disperzí se testuje různými způsoby s ohledem na rozpustnost, chování použitých látek a polymerů, a hlavně cíl studie.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1. Materiály

#### 2.1.1. API

API enzalutamid (Polymorfní forma R1) byla použita ze zdrojů společnosti Zentiva, k.s.

#### 2.1.2. Polymery a další excipienty

HPMC AS-MG byla zakoupena od firmy Shin-Etsu AQOAR® (Japonsko). Kroskarmelóza sodná byla použita ze zdrojů Zentivy k.s.

#### 2.1.3. Rozpouštědla a soli

Acetonitril p.a., HPLC Grade byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich Co. (USA). Methanol p.a a methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph Eur byl zakoupen od Sigma Aldrich (USA). Acetát amonný p.a. byl zakoupen od firmy POCH Professional Chemicals (Polsko). Dihydrogenfosforečnan amonný (Bio Ultra  $\geq 99\%$ ) byl zakoupen od firmy Fischer Scientific (USA). Dimethylsulfoxid, TWEEN® 20, konc. kyselina fosforečná byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co. (USA). Hydroxid sodný, dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. byly zakoupen od firmy Penta s.r.o. (Česká republika). Všechny vodné roztoky a disoluční médium byly připraveny s použitím redestilované vody.

### 2.2. Metody použité při studiu pevnofázové stability amorfních API

Stěžejním tématem této disertační práce jsou amorfní API. V této kapitole je popsána příprava amorfního enzalutamidu, který byl následně podroben stabilitním studiím ve zvolených podmínkách (teplota, vlhkost, obalový materiál). Tato kapitola zároveň uvádí všechny metody, kterými byl materiál před a po stabilitních zátěžových testech charakterizován.

#### 2.2.1. Příprava amorfního enzalutamidu

##### 2.2.1.1. Příprava amorfního enzalutamidu: Extruzí taveniny (HME)

Extruze taveniny byla provedena pomocí extrudéru (Three-Tec, GmbH, Švýcarsko) se dvěma ko-rotujícími šrouby. Výchozím materiálem byl krystalický enzalutamid polymorfní formy R1, který byl nejdříve přesítován a k extruzi byla použita frakce s velikostí částic nižší než 500  $\mu\text{m}$ . Extrudér obsahuje 4 teplotní zóny, přičemž vstup do těla extrudéru byl chlazen vodou. Zmiňované teplotní zóny jsou označovány jako F1, F2, F3, F4. Sypký materiál byl

přiváděn automatickou násypkou a rychlost plnění extrudéru materiálem byla nastavena na hodnotu  $20 \text{ g}\cdot\text{hod}^{-1}$ . Materiál vstupoval chlazeným otvorem do těla extrudéru a poté procházel segmenty F1, F2, F3 a F4, přičemž rychlost otáčení šroubů byla  $100 \text{ min}^{-1}$ . Extruze materiálu byla prováděna při maximální teplotě  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nastavená a skutečná teplota v jednotlivých teplotních segmentech je uvedena v Tabulce 4. Za uvedených podmínek byl torzní moment v rozmezí  $0,68\text{--}0,8 \text{ N}\cdot\text{m}$ .

Jelikož se jednalo o extruzi samotné účinné látky, která má v porovnání s polymery nízkou viskozitu, docházelo na výstupu z extrudéru spíše k vytékání látky než ke tvorbě pevného vlákna. Materiál byl chlazen dvěma způsoby:

1. Samovolné chlazení – na teplotu okolí ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) – šarže HME A1, HME A2
2. Chlazení na desce chlazené kapalným dusíkem ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) – šarže HME B1, HME B2

Materiál chlazený dusíkem byl opakní a materiál chlazený na teplotu okolí byl čirý.

Tabulka 4. Nastavená a skutečná teplota v jednotlivých segmentech extrudéru Three-Tec při extruzi taveniny enzalutamidu.

Zóna	Nastavená teplota ( $^\circ\text{C}$ )	Skutečná teplota ( $^\circ\text{C}$ )
F1	150	151,0
F2	230	228,9
F3	230	231,6
F4	230	228,4

#### 2.2.1.2. Příprava amorfního enzalutamidu: Příprava na vakuové odparce (TE)

Do kulaté varné baňky byl předložen 1 gram polymorfní formy R1 a rozpuštěn v 50 ml acetonu p.a. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce (Hei-VAP, Heildoph, Schwabach, Německo) při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a sníženém tlaku na 1000 Pa. Produkt byl homogenizován a přesítován pomocí síta o velikosti ok  $500 \mu\text{m}$ . Materiál byl dále sušen ve vakuové sušárně při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  tlaku 20000 Pa po dobu 2 dní. Takto připravený materiál je v této práci označován TE.

#### 2.2.1.3. Příprava amorfního enzalutamidu: Sprejové sušení (SD)

Přibližně 15 mg vstupního materiálu (krystalická forma R1,  $d < 500 \mu\text{m}$ ) bylo naváženo do Erlenmayerovy baňky a rozpuštěno za stálého míchání ( $1200 \text{ otáček}\cdot\text{min}^{-1}$ ) při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  v 500 ml methanolu p.a. Sprejové sušení bylo realizováno na zařízení Buchi-Mini Spray Dryer B-290 (Flawil, Švýcarsko). Atomizace byla nastavena na 100 % a průtok dusíku byl  $40 \text{ m}^3\cdot\text{hod}^{-1}$  (čistota dusíku 99,5 %). Dávkování materiálu peristaltickou pumpou odpovídalo  $800 \text{ ml}\cdot\text{hod}^{-1}$ . Teplota nástřiku byla  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Za uvedených podmínek byla výstupní teplota ze

sušící komory těsně před vstupem do cyklónu 54 °C. Výsledný odsprejovaný materiál byl následně sušen po dobu 5 dní ve vakuové sušárně při 40 °C a tlaku 20000 Pa. Vysušen byl již po 24 hodinách a poté se obsah rozpouštědel měnil jen nepatrně. Sprejově sušený materiál před dosušením ve vakuové sušárně je označován jako SD A, a sprejově sušený materiál po dosušení je označován jako SD B.

### 2.2.2. Zrychlené stabilitní testy

Zrychlené stabilitní testy byly provedeny u extrudovaného enzalutamidu HME A2 (příprava extruzí se samovolným chlazením na teplotu okolí) a HME B2 (příprava extruzí s chlazením kapalným dusíkem). Přibližně 250 mg amorfni API bylo vystaveno jedné kombinaci podmínek (teplota a vlhkost) v otevřených skleněných vialkách se širokým dnem. Podmínky zátěžového testu byly následující:

- **40 °C/11 % RH** po dobu 14, 30 dní
- **40 °C/75 % RH** po dobu 14, 30 dní
- **60 °C/11 % RH** po dobu 7, 14 dní
- **60 °C/75 % RH** po dobu 7, 14 dní

Nižší relativní vlhkost, tj. 11 % RH byla realizována prostřednictvím přesyceného roztoku LiCl (hodnota RH byla ověřena vlhkoměrem vloženým do eksikátorů). Tento roztok byl umístěn do exsikátoru, kde byly následně vloženy vzorky. Relativní vlhkost 75 % byla zprostředkována vlhkostními komorami s možností přednastavené vlhkosti.

### 2.2.3. Dlouhodobé stabilitní testy

Dlouhodobé stabilitní testy byly provedeny u extrudovaného enzalutamidu HME A2 (samovolné chlazení na teplotu okolí) a HME B2 (chlazení kapalným dusíkem). Přibližně 400 mg amorfni API zabalené v konkrétním obalovém materiálu (popsáno níže) bylo vystaveno jedné kombinaci podmínek (teplota a vlhkost). Vzorky byly uloženy v komorách s kontrolovanou vlhkostí i teplotou, přičemž podmínky zátěžového testu byly následující:

- **25 °C/60 %RH** ve dvou polyethylenových sáčcích (označováno jako PE-PE) po dobu 1, 3, 6 měsíců
- **25 °C/60 %RH** v polyethylenovém sáčku, jenž byl následně zataven v hliníkovém obalu (označováno jako Al-PE-Al) po dobu 1, 3, 6 měsíců
- **40 °C/75 %RH** ve dvou polyethylenových sáčcích (označováno jako PE-PE) po dobu 1, 3, 6 měsíců

- **40 °C/75 %RH** v polyethylenovém sáčku, jenž byl následně zataven v hliníkovém obalu (označováno jako Al-PE-Al) po dobu 1, 3, 6 měsíců

#### 2.2.4. Stabilita amorfního materiálu v průběhu stárnutí

Stárnutí materiálu byla pomocná studie založená zejména na diferenční skenovací kalorimetrii. Tato studie byla aplikována na sprejově sušený enzalutamid, kdy bylo zkoumáno krystalizační chování nedosušeného a dosušeného vzorku skladovaného v 5 °C (lednice). Vzorky byly skladovány ve skleněných vialkách obalených Parafilmem® (Sigma-Aldrich, USA). Vzorky nedosušeného (SD A) a dosušeného enzalutamidu (SD B) se lišily obsahem zbytkových rozpouštědel (voda, org. rozpouštědlo), které v nich zbyly po sprejovém sušení. DSC sken byl měřen po uplynutí určitého časového intervalu (např. 0, 7, 16, 42 a 124 dní).

#### 2.2.5. Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

Krystalizační chování amorfních látek či stresovaných materiálů bylo studováno teplotně-vodivostním diferenčním skenovacím kalorimetrem DSC Q2000 (TA Instruments, USA) se zabudovaným chladícím zařízením. Přístroj byl kalibrován použitím standardů indiu a zinku. DSC měřící celou procházel dusík (čistota 99,999 %) konstantní rychlostí 30 ml·min<sup>-1</sup>, jehož účelem bylo zajistit konstantní teplotní gradient v měřící cele. Měřené vzorky (kolem 1–2 mg) byly hermeticky uzavřeny v DSC „low-mass“ T-Zero aluminiových kelímcích. Základním teplotním programem byl ohřev různými rychlostmi ohřevu (tj. 0,5; 1; 2; 5; 10 a 20 °C·min<sup>-1</sup>) v rozmezí teplot zasahujících minimálně 50 °C pod skelný přechod a 10 °C nad teplotu tání enzalutamidu.

#### 2.2.6. Modulovaná diferenční skenovací kalorimetrie

Modulace rychlosti ohřevu byla využita k měření vybraných vzorků za účelem ověření identity zkoumaných efektů. K měření byl použit diferenční skenovací kalorimetr DISCOVERY DSC1-0125 (TA Instruments, USA). Lineární rychlost 5 °C·min<sup>-1</sup> byla modulovaná sinusoidou odpovídající amplitudě 0,8 °C a periodě 60 sekund. Měřené vzorky (2–5 mg) byly hermeticky uzavřeny a měřeny v rozmezí teplot 0–300 °C. DSC celou protékal dusík (čistota 99,999 %) konstantní rychlostí 50 ml·min<sup>-1</sup>.

#### 2.2.7. Optická mikroskopie

Snímky z optického mikroskopu byly pořízeny na mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, USA) s kamerou DP72.

### 2.2.8. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Snímky materiálů byly pořízeny skenovacím elektronovým mikroskopem Tescan Lyra 3 (Tescan, Česká republika). Vzorky byly před měřením pokryty vrstvou uhlíku o velikosti 18 nm. Snímky byly pořízeny při urychlovacím napětí 5 kV a velikosti strany snímaného pole 5, 20 a 100  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.9. Termogravimetrická analýza (TGA)

Termogravimetrická analýza byla použita zejména ke stanovení zbytkového množství rozpouštědla či vody ve vzorcích po sprejovém sušení. TGA křivky byly pořízeny použitím přístroje Perkin-Elmer TGA 4000 (100-240 V/50-60 Hz). Vzorky (15–20 mg) byly zahřívány v keramických kelímech rychlostí  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  v teplotním intervalu 15–300  $^{\circ}\text{C}$ . Měření bylo realizováno za inertní atmosféry, tj. konstantního průtoku dusíku.

### 2.2.10. Prášková rentgenová difrakce (XRPD)

Záznamy z práškové rentgenové difrakce byly pořízeny na zařízení PANalytical X'PERT PRO MPD X-ray difraktometr (Malvern PANalytical, Velká Británie) se zdrojem rentgenového záření  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,542\text{ \AA}$ ), excitačním napětím 45 kV a anodickým proudem 40 mA. Měření bylo provedeno v rozsahu  $2\text{--}40^{\circ} 2\theta$  s krokem  $0,02^{\circ} 2\theta$ , který trval 200 sekund. Součástí primární optiky byly programovatelné divergenční clonky s ozářenou plochou  $10\text{ mm}^2$ , Sollerovy clonky  $0,02\text{ rad}$  a protirozptylová clonka  $\frac{1}{4}^{\circ}$ . Byl použit detektor X'Celerator s aktivní délkou  $2,122^{\circ}$  a sekundární optikou se Sollerovými clonkami  $0,02\text{ rad}$  a protirozptylovou clonkou  $5,0\text{ mm}$ . Měření probíhalo na plochém práškovém vzorku umístěném na Si destičce.

### 2.2.11. Pevnofázová nukleární magnetická rezonance (*ss*-NMR)

NMR spektra v pevné fázi byla změřena na zařízení Bruker Avance III 400WB (Bruker, Německo). Vzorky byly umístěny do rotoru o velikosti 2,5 mm, rychlost otáčení během měření byla 30 kHz. Byla měřena  $^{19}\text{F}$  spektra.

### 2.2.12. Infračervená spektroskopie (IČ)

Vzorky byly měřeny spektrometrem Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) s ZnSe ATR krystalem. Rozsah měření byl  $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$  při počtu skenů 64 s rozlišením  $2\text{ cm}^{-1}$ . Výsledné spektrum je průměrem nejméně tří měření.

### 2.2.13. Ramanova spektroskopie

Vzorky byly měřeny na spektrometru RFS 100/S (Bruker, Německo) s laserem Nd-YAG s excitační délkou 1064 nm. Každé měření bylo provedeno s rozlišením  $2 \text{ cm}^{-1}$  a 64 skeny.

### 2.2.14. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie byla použita ke stanovení čistoty připravených a stresovaných materiálů. Měření bylo provedeno u vybraných vzorků s cílem ověřit či vyvrátit možný rozklad během stabilitních studií. Stanovení čistoty vzorku na základě HPLC dat se provádí metodou vnitřní normalizace (27). Vnitřní normalizace je založena na znalosti ploch jednotlivých elučních píků charakterizovaných retenčními či relativními retenčními časy. Procentuální zastoupení čisté nerozložené látky se vypočítá dle vztahu (27), jako poměr plochy píku čisté látky a celkové plochy všech píků.

$$\% (\text{čisté látky}) = \frac{A_{RRT=1}}{A_{celk}} \quad (26)$$

kde  $A_{RRT=1}$  je plocha píku příslušejícího čisté látce,  $A_{celk}$  je celková plocha všech píků, včetně čisté látky, nacházejících se v chromatogramu a nepatřících k šumu.

#### 2.2.14.1. Metoda HPLC pro stanovení čistoty enzalutamidu

HPLC měření bylo provedeno na Gradient HPLC systému Agilent 1200 Series (Agilent, USA). Přístroj byl vybaven čtyřmi binárními gradientními pumpami INFINITY bin pump DE92900430 se zabudovanou odplyňovací jednotkou, komorou s termostatem na chromatografické kolony TCC DE93000484, detektorem INFINITY DAD EE93000416, automatickým podavačem vzorků INFINITY SAMPLER DE930000398 s termostatem FC/ALS Therm DE84969629. Všechny součásti jsou od firmy Agilent (USA).

Vzorky byly rozpuštěny ve směsi acetonitrilu a vody (1:1), přičemž požadovaná koncentrace byla přibližně  $0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Účinné separace bylo dosaženo pomocí chromatografické kolony Kinetex Phenyl-Hexyl (100 x 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA) a binární mobilní fáze s gradientovou elucí: 0 min – 10 % B, 3,0 min - 60 % B, 10,0 min – 90 % B, 12,0 min – 90 % B, 12,5 min – 10 % B, 14,0 min – 10 % B. Zbytek mobilní fáze byl tvořen rozpouštědlem A. Jako rozpouštědlo A byl označen 10mM roztok acetátu amonného o pH 4,2. Rozpouštědlem B byl methanol. Průtok mobilní fáze byl  $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , přičemž objem nástřiku vzorku byl 0,3  $\mu\text{L}$ . Teplota chromatografické kolony byla udržována na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  a teplota vzorků na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 270 nm.

### 2.3. Metody použité při studiu disoluční kinetiky amorfni a krystalické API

V této kapitole je popsáno disoluční testování amorfniho a krystalického enzalutamidu slisovaného do formy disku (pravá disoluce), v práškové formě, ve formě granulátu a tablety. V této kapitole jsou představeny různé disoluční metody, které byly použity k porovnání disolučního chování amorfniho a krystalického enzalutamidu.

#### 2.3.1. API testovaná v této studii

Zkoumanými vzorky byl krystalický enzalutamid formy R1 a amorfni enzalutamid připravený extruzí s pomalým chlazením (viz kapitola 2.2.1.1, chlazení na teplotu vzduchu). Tyto materiály byly přesítovány a byla použita frakce s velikostí částic nižší než 250  $\mu\text{m}$ .

#### 2.3.2. Příprava granulátu

Za účelem objasnění mechanismu rozpouštění amorfni API a vlivu polymeru na udržitelnost přesyceného stavu byl připraven „granulát“ složený z API, polymeru (HPMC AS MF) a 2 hm. % rozvolňovadla (kroskarmelóza sodná). Formulace byly připraveny s použitím amorfniho enzalutamidu (F1–F5) připraveného extruzí (HME) a krystalického enzalutamidu (F6–F10) formy R1. Složení jednotlivých formulací je uvedeno v Tabulce 5. Jednotlivé komponenty byly naváženy, míchány na Turbule<sup>®</sup> (Glen Mills Inc., USA) po dobu 10 minut rychlostí 49  $\text{min}^{-1}$  a stlačeny lisovací silou 5 kN na ručním lisu Trystom (Olomouc). Takto připravené tablety byly jemně rozetřeny a vystaveny disolučnímu testu (pH 6.8 fosfátový pufr bez surfaktantu, pádelková metoda,  $37 \pm 0.5$  °C, 100  $\text{min}^{-1}$ ).

Tabulka 5. Složení granulátů (v mg)

formulace	poměr enzalutamid:HPMC AS MF	amorfni enzalutamid (mg)	krystalický enzalutamid (mg)	HPMC AS MF (mg)	kroskarmelóza sodná (mg)	$m_{\text{celk.}}$ (mg)
F1	1:2	40	–	80	2,45	122,5
F2	1:3	40	–	120	3,27	163,3
F3	1:4	40	–	160	4,08	204,1
F4	1:5	40	–	200	4,9	244,9
F5	1:6	40	–	240	5,7	285,7
F6	1:2	–	40	80	2,45	122,5
F7	1:3	–	40	120	3,27	163,3
F8	1:4	–	40	160	4,08	204,1
F9	1:5	–	40	200	4,9	244,9
F10	1:6	–	40	240	5,7	285,7

### 2.3.3. Příprava tablet

Tablety byly připraveny dle složení uvedeného v Tabulce 6. Všechny komponenty byly míchány na Turbule® (Glen Mills Inc., USA) rychlostí otáček  $49 \text{ min}^{-1}$  po dobu 10 minut. Připravená tabletovina byla slisována rázem pomocí ručního lisu Trystom (Olomouc) lisovací silou 5 kN. Byly připraveny dva druhy tablet stejného složení. V prvním případě byly použity polymery s velikostí částic deklarovanou výrobcem. V druhém případě byly polymery předem slisovány lisovací silou 10 kN a poté nastrouhány s použitím síta o velikosti ok  $500 \mu\text{m}$ . Tento laboratorní proces simuloval suchou granulaci.

Tabulka 6. Složení tablet (v mg) připravených s použitím granulované a negranulované HPMC AS MF.

formulace	amorfní enzalutamid (HME)	krystalický enzalutamid (polymorfni forma R1)	HPMC AS MF (dodaná Shin- Etsu AQOAR®)	HPMC AS MF (granulovaná)	kroskarmelóza sodná
F11	40	–	240	–	5,7
F12	–	40	240	–	5,7
F13	40	–	–	240	5,7
F14	–	40	–	240	5,7

### 2.3.4. Příprava disolučního média

#### 2.3.4.1. Příprava fosfátového pufru s přidavkem SLS (0,2 %)

Bylo naváženo přibližně 0,9 g NaOH (pecky), 7,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 2 g dodecylsulfátu sodného (SLS) a rozpuštěno v 1 litru destilované vody. Hodnota pH byla upravena na hodnotu 6.8 – 6.84 pomocí konc.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

#### 2.3.4.2. Příprava fosfátového pufru s přidavkem TWEEN®20 (0,005 %)

Bylo naváženo přibližně 0,9 g NaOH (pecky), 7,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,06 g TWEEN® 20 a rozpuštěno v 1 litru destilované vody. Hodnota pH byla upravena pomocí konc.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

#### 2.3.4.3. Příprava kalibračního roztoku pro metodu UV-VIS u pravé disoluce

Ke kalibraci byl použit 12,92 mM roztok enzalutamidu v dimethylsulfoxidu p.a. Bylo naváženo 120,01 mg enzalutamidu, převedeno do 20ml odměrné baňky, rozpuštěno v uvedeném rozpouštědle a doplněno po rysku. Tento zásobní roztok byl přidán ve třech 20 $\mu\text{l}$  přidavcích do 40 ml 72,4 mM fosfátového pufru s 0,2 w/V % SLS. Po každém přidavku byl roztok po dobu 10 sekund promícháván, poté byla změřena absorbance a byl přidán další díl

zásobního roztoku enzalutamidu (120 mg v 20 ml dimethylsulfoxidu). Na základě této kalibrační řady byl softwarem vypočten molární absorpční koeficient, jenž byl následně použit k výpočtu koncentrace uvolněného množství enzalutamidu během pravé disoluce.

#### 2.3.4.4. Příprava kalibračních roztoků pro metodu UV-VIS u disoluce API v práškové formě

Byly připraveny kalibrační roztoky odpovídající rozpuštění 100 %, 75 %, 50 %, 32,5 %, 20 % a 2 % ze 40mg dávky enzalutamidu v 900 ml disolučního média. Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky enzalutamidu v acetonitrilu, tj.  $446 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $168,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tyto roztoky byly 10x a 20x naředěny disolučním médiem. Výsledkem byly roztoky o koncentraci 44,6 (100 % dávky); 33,66 (75 % dávky); 22,3 (50 % dávky) a  $16,83 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (32,5 % dávky). Za účelem pokrytí potřebného rozsahu absorbancí byly připraveny další dva roztoky ze zásobního roztoku se  $446 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  acetonitrilu, a to zředěním 50x a 500x. Výsledné roztoky obsahovaly  $8,92 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (20 % dávky) a  $0,0892 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (2 % dávky). Připravené kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát na UV-VIS při vlnové délce 270 nm.

#### 2.3.5. Pravá disoluce (Apparent intrinsic dissolution)

Rychlost rozpouštění amorfni a krystalické účinné látky byla sledována prostřednictvím pravé disoluce. Práškový materiál byl lisován silou 110 N po dobu 2 minut do formy disku o průměru 8 mm. Cílem bylo vytvořit dokonale hladký povrch bez jakéhokoliv narušení. Rozpouštění bylo prováděno z přesně definované plochy disku ( $50,24 \text{ mm}^2$ ). Na opačnou stranu disku bylo umístěno těsnění, jež zajistilo rozpouštění pouze z jedné strany. Z každého vzorku byly připraveny 3 disky. Takto připravené vzorky byly testovány na disolučním přístroji/automatickém titrátoru Sirius typ in Form v.č. 1501013 (Sirius Analytical Instruments Ltd., Velká Británie). Hmotnosti jednotlivých disků účinné látky spolu s přesnými lisovacími tlaky jsou uvedeny v Tabulce 7. Disolučním médiem byl 72,4 mM fosfátový pufr o  $\text{pH} = 6,8$  s 0,2 w/V % SLS o objemu 40 ml. Teplota disolučního média byla  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Disoluční experiment byly proveden při rotaci míchadla rychlostí  $100 \text{ otáček}\cdot\text{min}^{-1}$ , přičemž doba trvání experimentu byla 40 minut. Detekce účinné látky byla realizována online UV-VIS sondou při 270 nm v 30-ti sekundovém intervalu. K sestavení kalibrační křivky byl použit 12,920 mM zásobní roztok enzalutamidu v DMSO (dimethylsulfoxid). Tento roztok byl dávkován ve čtyřech 20 $\mu\text{l}$  přídavicích do disolučního média, kdy po každém přídávku byla zaznamenána jeho koncentrace.

Tabulka 7. Hmotnosti vzorků a podmínky lisování vzorků do formy disku s použitím ručního lisu.

forma vzorku	pokus	navážka API (mg)	lisovací tlak (N)	doba lisování (min)
Krystalická forma R1	1	119,85	110,4	2
	2	103,41	110,2	2
	3	96,58	110,5	2
Amorfní forma, HME	1	89,23	110,4	2
	2	93,33	110,4	2
	3	95,91	110,7	2

### 2.3.6. Disoluce API v práškové formě

Rychlost rozpouštění práškové amorfni a krystalické API byla sledována na disolučním přístroji DS-11 SOTAX (SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o., Česká republika) s online UV-VIS detekcí na přístroji SPECORD® 200 Plus (Analytik Jena GmbH, Německo). Přibližně 40 mg API bylo dispergováno v 900 ml 72,4mM fosfátového pufru o pH 6,8 s 0,005 w/V % surfaktantu TWEEN® 20. Přesné navážky API jsou uvedeny v Tabulkách 8 a 9. Byla použita pádelková metoda (USP II) s rychlostí otáček 50 a 100 min<sup>-1</sup> po dobu 45 minut a poté bylo aplikováno vymíchání API, tj. 150 min<sup>-1</sup> po dobu 15 minut. Detekce API byla provedena při vlnové délce 270 nm, kdy byla absorbance API měřena proti fosfátovému pufru o pH 6.8. Byly provedeny dva experimenty, dále označovány jako disoluční metoda 1 a disoluční metoda 2, lišící se rychlostí otáček míchadla a velikostí optické dráhy kyvet použitých k UV-VIS detekci. V případě disoluční metody 1 byla použita rychlost otáček 50 min<sup>-1</sup> a detekce byla provedena v křemenných kyvetách s velikostí optické dráhy 5 mm. Disoluční metoda 2 byla provedena s rychlostí otáček 100 min<sup>-1</sup>, kdy byla citlivost detekce zvýšena použitím křemenných kyvet s větší optickou dráhou, tj. 10 mm. Absorbance byla měřena po 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 50 a 60 minutách disolučního experimentu.

Tabulka 8. Přesné navážky vzorku při aplikaci disoluční metody 1 (50 min<sup>-1</sup> po dobu 45 minut, 150 min<sup>-1</sup> po dobu 15 minut)

Forma vzorku	Pokus	Navážka práškové API (mg)
Krystalická forma R1	1	40,08
	2	40,06
	3	40,06
Amorfní forma, HME	1	40,04
	2	40,02
	3	40,02

Tabulka 9. Přesné navážky vzorku při aplikaci disoluční metody 2 ( $100 \text{ min}^{-1}$  po dobu 45 minut,  $150 \text{ min}^{-1}$  po dobu 15 minut)

Forma vzorku	Pokus	Navážka práškové API (mg)
Krystalická forma R1	1	40,04
	2	40,06
	3	40,04
Amorfní forma, HME	1	39,97
	2	40,04
	3	39,83

### 2.3.7. Klasická disoluce

Rychlost uvolňování API z granulátu či tablety byla sledována na disolučním přístroji DS–11 SOTAX (SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o., Česká republika) s online UV–VIS detekcí na přístroji SPECORD® 200 Plus (Analytik Jena GmbH, Německo). Binární matricové tablety obsahovaly přibližně 40 mg enzalutamidu. Přesné složení granulátů a tablet je uvedeno v Tabulkách 5 a 6. Disoluce byla provedena v 900 ml 72,4 mM fosfátového pufru o pH 6,8 bez použití surfaktantu. Byla použita pádelková metoda (USP II.) s rychlostí  $100 \text{ min}^{-1}$ . Doba trvání disolučního experimentu byla maximálně 220 minut, kdy byly odběry realizovány 1krát po 2 minutách, 1krát po 3 minutách, 31krát po 5 minutách a 6krát po 10 minutách. Detekce API byla provedena při 270 nm s použitím křemenných kyvet s optickou dráhou 10 mm.

### 2.3.8. SEM

Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu byly pořízeny skenovacím elektronovým mikroskopem Tescan MiraTC (Tescan, Česká republika). Materiál byl rozprostřen na karbonové pásce a pokryt uhlíkem (tloušťka pokrytí nebyla měřena). Urychlovací napětí bylo 7 kV a velikost strany zobrazeného pole byla 1,08 mm.

### 2.3.9. Infračervená spektroskopie

Vzorky byly měřeny spektrometrem Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) s ZnSe ATR krystalem. Rozsah měření byl  $4000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$  při počtu skenů 64 s rozlišením  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Výsledné spektrum je průměrem nejméně tří měření.

### 2.3.10. Ramanova spektroskopie

Vzorky byly měřeny na spektrometru RFS 100/S (Bruker, Německo) s laserem Nd-YAG s excitační délkou 1064 nm. Každé měření bylo provedeno s rozlišením  $2 \text{ cm}^{-1}$  a 64 skeny.

### 2.3.11. Prášková rentgenová difrakce

Záznamy z práškové rentgenové difrakce byly pořízeny na zařízení PANalytical X'PERT PRO MPD X-ray difraktometr (Malvern PANalytical, Velká Británie) se zdrojem rentgenového záření  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$ ), excitačním napětím 45 kV a anodickým proudem 40 mA. Měření bylo provedeno v rozsahu  $2\text{--}40^\circ 2\theta$  s krokem  $0,02^\circ 2\theta$ , který trval 200 sekund. Součástí primární optiky byly programovatelné divergenční clonky s ozářenou plochou  $10 \text{ mm}^2$ , Sollerovy clonky  $0,02 \text{ rad}$  a protirozptylová clonka  $\frac{1}{4}^\circ$ . Byl použit detektor X'Celerator s aktivní délkou  $2,122^\circ$  a sekundární optikou se Sollerovými clonkami  $0,02 \text{ rad}$  a protirozptylovou clonkou  $5,0 \text{ mm}$ . Měření probíhalo na plochém práškovém vzorku umístěném na Si destičce.

### 2.3.12. Diferenční skenovací kalorimetrie

K potvrzení fyzikální formy vzorků před a po disoluci byl použit teplotně-vodivostní diferenční skenovací kalorimetr DISCOVERY DSC1-0125 (TA Instruments, USA) se zabudovaným chladícím zařízením. DSC měřící celou procházel dusík (čistota 99,999 %) konstantní rychlostí  $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , jehož účelem je zajistit konstantní teplotní gradient teploty. Měřené vzorky (kolem  $2\text{--}5 \text{ mg}$ ) byly hermeticky uzavřeny v DSC T-Zero aluminiových kelímcích. Vzorky byly měřeny klasicky, tj. lineární rychlostí ohřevu ( $5$  a  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), ale i modulovaně ( $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $A = 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $f = 60 \text{ s}$ ). Vzorky byly měřeny v teplotním intervalu  $0\text{--}250 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

V této kapitole jsou uvedeny a diskutovány výsledky spojené s dvěma hlavními tématy této disertační práce. První podkapitola je věnována vztahu mezi přípravou a stabilitou amorfního enzalutamidu. Testované a diskutované způsoby přípravy zahrnují přípravu v DSC, přípravu na vakuové odparce, přípravu extruzí a přípravu sprejovým sušením. Způsoby přípravy jsou primárně diskutovány s ohledem na kinetiku krystalizačního procesu studovanou na DSC datech čerstvě připravených vzorků enzalutamidu. Dále jsou zde prezentována kinetická data vzorků enzalutamidu vystavených krátkodobým a dlouhodobým stabilitním testům – zde je hlavním aspektem studie obalových materiálů a jejich zhodnocení vzhledem k udržení nízké úrovně vlhkosti. Jednotlivé aspekty skladování amorfního enzalutamidu, teplota a vlhkost, jsou zde diskutovány spolu s vlivem způsobu přípravy; rovněž je zde doporučen optimální způsob zpracování a nakládání s touto API.

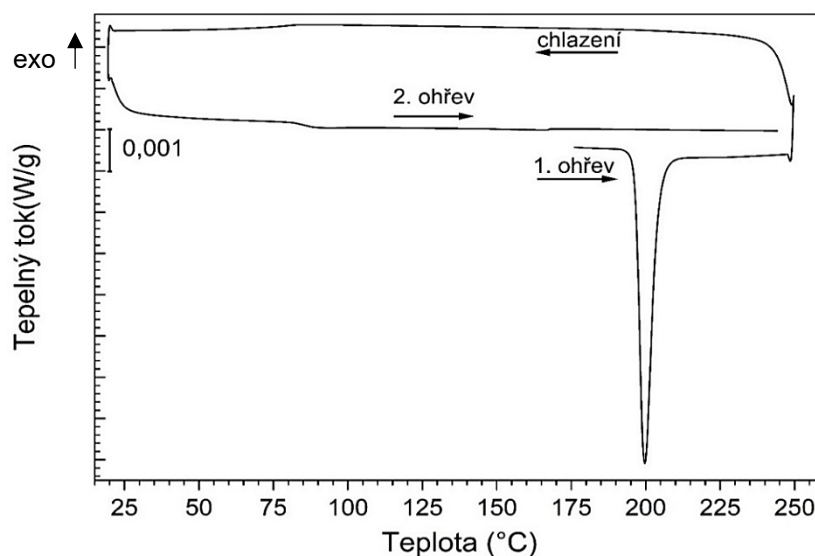
Druhá podkapitola je věnována srovnání disolučních charakteristik krystalického a amorfního enzalutamidu. Je zde prokázán rozdíl v rozpustnosti amorfní a krystalické fáze a diskutován vliv precipitace krystalické fáze podpořené přítomností disolučního média. Jako řešení je zde představen přídavek vhodného excipientu, konkrétně dobře rozpustného polymeru, za účelem udržení přesyceného stavu původně amorfního enzalutamidu. Dále je zde diskutován návrh nejvhodnější lékové formy pro amorfní enzalutamid, a to jak z pohledu technologického tak z pohledu fyzikálně-chemického.

### 3.1. Pevnofázová stabilita amorfního enzalutamidu

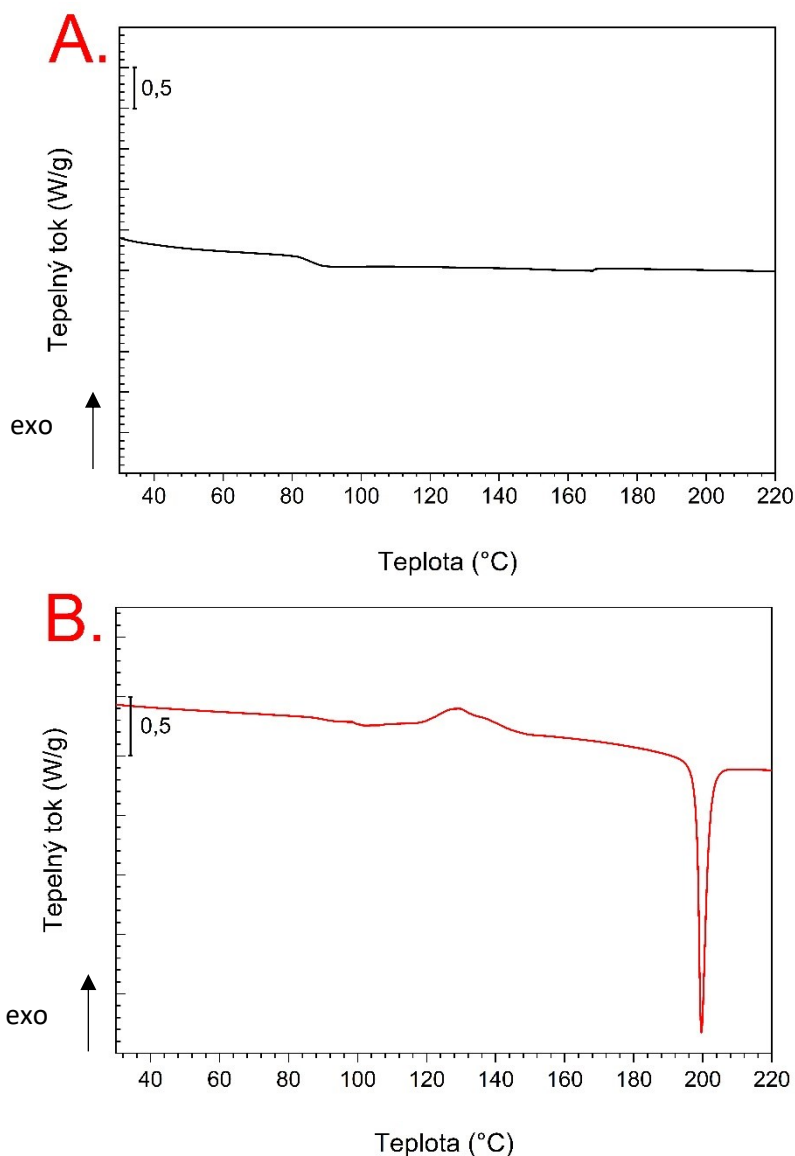
V této kapitole je diskutováno chování amorfního enzalutamidu v pevné fázi. Kapitoly 3.1.1–3.1.5 se zabývají amorfními formami enzalutamidu připravenými v DSC, na vakuové odparce, extruzí a sprejovým sušením. Kapitoly 3.1.6 a 3.1.7 shrnují závěry z publikovaných článků zabývajících se kinetikou krystalizace amorfního enzalutamidu. Kapitola 3.1.8 se zabývá kinetikou krystalizace materiálů, které byly vystaveny krátkodobým a dlouhodobým stabilitním testům. Kapitola 3.1.9 uvádí výsledky stabilitních testů amorfního enzalutamidu připraveného extruzí.

#### 3.1.1. Příprava amorfního enzalutamidu pomocí DSC

Schopnost sklotvornosti enzalutamidu byla ověřena diferenční skenovací kalorimetrií. Enzalutamid patří do III. třídy dle GFA, což dokazuje DSC křivka uvedená na Obrázku 8. Obrázek 8 zobrazuje DSC křivku obdrženu na základě metodiky používané ke klasifikaci léčiv dle GFA, tj. ohřev/chlazení/ohřev. Uvedená křivka potvrzuje schopnost enzalutamidu tvořit sklo, zároveň je zde ukázáno, že nekystalizuje ani při ohřevu amorfní fáze, čímž by se mohlo zdát, že je velmi stabilní. Obrázek 9 však popírá tento zdánlivý fakt. Obrázek 9A zobrazuje materiál připravený v DSC, který nebyl mechanicky narušen, naproti tomu Obrázek 9B zobrazuje amorfní materiál, který byl okamžitě po přípravě rozetřen v achátové misce. Znamená to tedy, že amorfni enzalutamid je velmi stabilní, pokud není mechanicky narušen. Pokud však amorfni materiál připravený v DSC rozetřeme v achátové misce, pak mechanicky vygenerujeme krystalizační centra. Toto se projeví během měření DSC, kdy dojde ke krystalizaci reprezentované exotermním efektem.



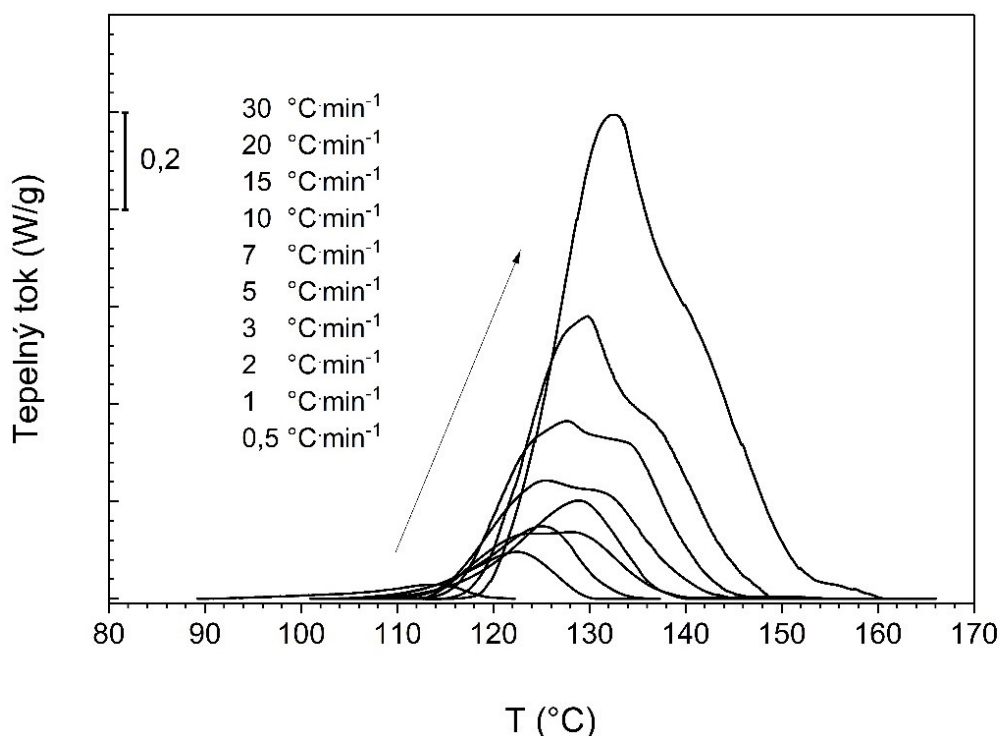
Obrázek 8. Příprava amorfního enzalutamidu v DSC. Původně krystalický enzalutamid byl zahříván rychlostí  $30\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  přes teplotu tání, poté chlazen rychlostí  $30\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  a znovu zahříván rychlostí  $30\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .



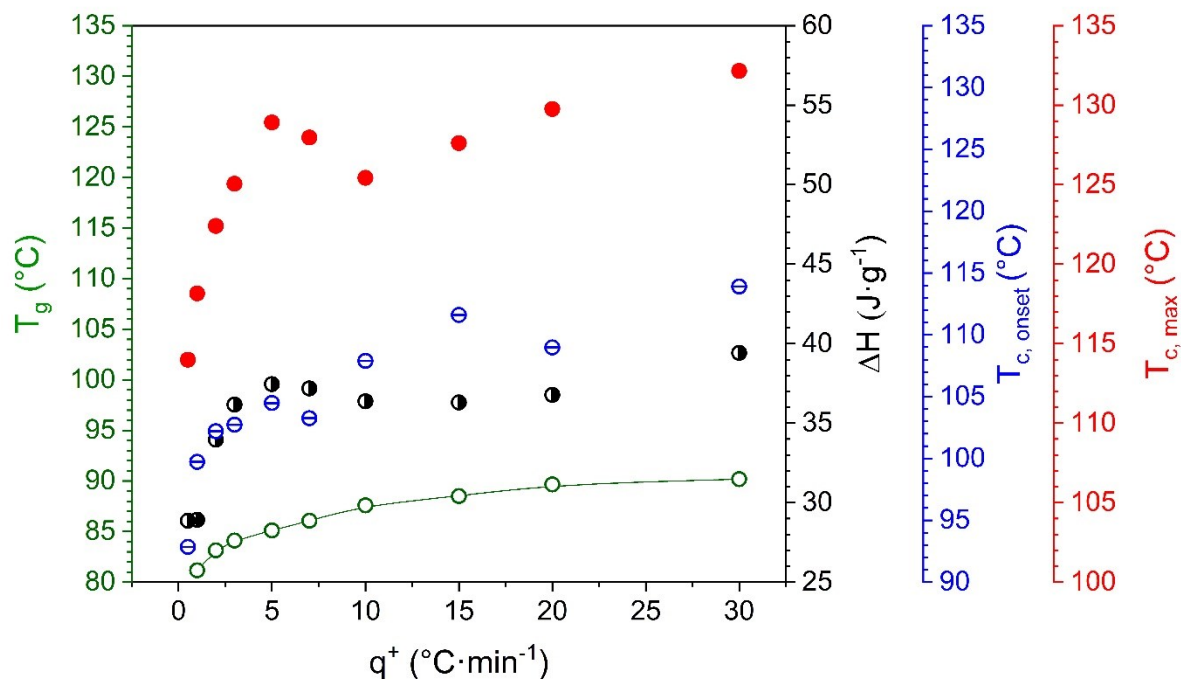
Obrázek 9. DSC křivky amorfního enzalutamidu: A. amorfní enzalutamid připravený v DSC, tedy bez jakéhokoliv mechanického opracování; B. amorfní enzalutamid připravený v DSC, který byl po přípravě rozetřen v achátové misce.

Při měření rozetřeného materiálu byly použity různé rychlosti ohřevu. Výsledné DSC křivky jsou zobrazeny v Obrázku 10. U nižších rychlostí ohřevu je krystalizační pík jednoduchý a s rychlostí ohřevu se jeho složitost zvyšuje (pravděpodobně více krystalizačních procesů). Obrázek 11 zobrazuje hodnoty vyhodnocených parametrů připravené amorfní formy, tj. teploty skelného přechodu, onsetu teploty krystalizace, maxima teploty krystalizace a entalpie krystalizace. Efekt krystalizace a teplota skelné transformace se se zvyšující rychlostí ohřevu posouvá k vyšším teplotám. Následující hodnoty jsou průměry hodnot stanovených z DSC křivek jednotlivých rychlostí ohřevu.

Průměrná teplota skelného přechodu tohoto materiálu je  $86,2 \pm 3 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ , onset teploty krystalizace je  $104,8 \pm 6 \text{ }^\circ\text{C}$  a maximum teploty krystalizace je  $125,1 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jak je vidět z obrázku 11, průměrné hodnoty související s teplotou krystalizace nejsou vypovídajícím parametrem pro porovnávání materiálů, neboť teplota krystalizace prokazatelně závisí na rychlosti ohřevu. Přesnější je porovnávat hodnoty získané stejnou rychlostí ohřevu. V případě, že se v dané sadě parametrů získaných různou rychlostí ohřevu nacházejí odlehlé body a reprodukovatelnost dat je spíše horší, je spolehlivější pracovat s průměrem těchto hodnot. Co se týče entalpie krystalizace tohoto materiálu, entalpie krystalizace stoupá se zvyšující se rychlostí ohřevu v rozmezí  $0,5$  až  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , při dalším zvýšení rychlosti ohřevu se její hodnota příliš nemění. Průměrná hodnota entalpie krystalizace toho materiálu je  $35,1 \pm 3 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ . Z výše uvedeného (především z Obr.10) vyplývá, že v případě krystalizace enzalutamidu se jedná o výrazně komplexní proces, jehož kinetika závisí na rychlosti ohřevu. Tento poznatek bude zcela zásadní pro pozdější popis tohoto procesu a predikci jeho kinetiky.



Obrázek 10. DSC křivky amorfního enzalutamidu připraveného v DSC, který byl po přípravě rozdrcen. DSC křivky byly získány následujícími rychlostmi ohřevu:  $0,5$ ;  $1$ ;  $2$ ;  $3$ ;  $5$ ;  $7$ ;  $10$ ;  $15$ ;  $20$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .



Obrázek 11. Termické charakteristiky amorfního enzalutamidu připraveného v DSC, který byl po přípravě rozdrcen. Hodnota entalpie krystalizace  $\Delta H_c$  (černé poloprázdné body), onsetu teploty krystalizace  $T_{c,onset}$  (modré poškrtnuté body), maxima teploty krystalizace  $T_{c,max}$  (červené plné body) a teploty skelného přechodu (zelené prázdné body) v závislosti na rychlosti ohřevu.

### 3.1.2. Pevnofázová forma enzalutamidu připravená na vakuové odparce

Amorfni enzalutamid byl připraven v malém množství na vakuové odparce pro potřeby screeningu. XRPD ani *ss*-NMR nebylo v tomto případě měřeno. Materiál připravený na odparce bude dále označován jako TE. Chování této formy bylo studováno pomocí diferenční skenovací kalorimetrie. Zároveň jsou v této kapitole uvedeny SEM snímky materiálu po přípravě (Obrázek 12) a po rekrytalizaci v DSC (Obrázek 15). Obrázek 12 zobrazuje enzalutamid TE po přípravě, rozdrcení a přesítování přes síto o velikosti ok 500  $\mu\text{m}$ . Enzalutamid TE je ve formě tenkých plátek (Obrázek 12A), které jsou na povrchu pokryty tenkými destičkami a jehličkami. Jak bude ukázáno v dalších kapitolách, zejména v kapitole 3.1.9.2, krystalizace enzalutamidu na povrchu je provázána právě vznikem těchto jehlicovitých a destičkových krystalů. Takže pomocí skenovacího elektronového mikroskopu lze určit, který materiál je plně amorfni a který obsahuje krystaly na povrchu již po přípravě.

Přítomnost krystalů v tomto materiálu byla prokázána pomocí DSC. Krystalinita připraveného materiálu byla vypočtena na základě rovnic (27) a (28) za předpokladu, že rozdíl v tepelné kapacitě mezi amorfni a krystalickou látkou je roven změně tepelné kapacity v oblasti skelného přechodu. Změna v tepelné kapacitě v oblasti skelného přechodu  $\Delta c_p$  byla

stanovena u plně amorfního materiálu (HME A2 a HME B2, viz kapitola 3.1.3) na  $0,4 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$ . K výpočtu množství krystalické fáze byla použita entalpie tání plně krystalického materiálu, která odpovídá  $74 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Toto zjednodušení použili také Hancock a Parks při výpočtu  $\Delta G_{c\rightarrow a}$  (viz kapitola 1.3.1). Výpočet sloužící ke stanovení množství krystalů v amorfni fázi je pouze orientační a slouží pouze k odhadu množství krystalické fáze. Krystalinita bude dále označována jako stupeň přeměny  $\alpha$ . Následují rovnice (27) a (28) slouží pro výpočet 100%-ní entalpie krystalizace a množství krystalické fáze v amorfni materiálu:

$$\Delta H_{c,100\%} = \Delta H_{m,100\%} - \Delta c_p \cdot (T_{m,max} - T_{c,max}) \quad (27)$$

kde  $\Delta H_{c,100\%}$  je entalpie odpovídající krystalizaci amorfniho materiálu ze 100 %,  $\Delta H_{m,100\%}$  odpovídá entalpii tání plně krystalického materiálu,  $\Delta c_p$  je změna tepelné kapacity v oblasti skelného přechodu stanovena u plně amorfniho materiálu,  $T_{m,max}$  je teplota tání stanovena v maximu píku tání,  $T_{c,max}$  je teplota krystalizace stanovena v maximu píku krystalizace.

$$\alpha (\%) = \left( \frac{\Delta H_{m,i}}{\Delta H_{m,100\%}} - \frac{\Delta H_{c,i}}{\Delta H_{c,100\%}} \right) \cdot 100 \quad (28)$$

kde  $\Delta H_{m,i}$  je entalpie tání měřeného materiálu,  $\Delta H_{m,100\%}$  je entalpie tání plně krystalického materiálu,  $\Delta H_{c,i}$  je entalpie krystalizace měřeného materiálu a  $\Delta H_{c,100\%}$  je entalpie krystalizace odpovídající krystalizaci amorfniho materiálu ze 100 %, přičemž je stanovena na základě rovnice (27).

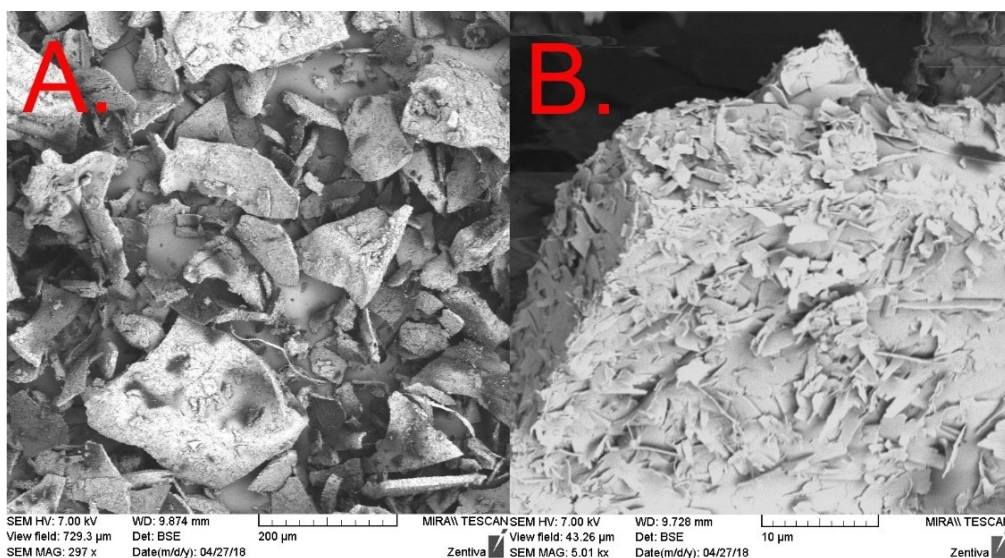
Průměrná (průměr hodnot z DSC křivek měřených různou rychlostí ohřevu) hodnota entalpie krystalizace materiálu TE byla  $34,2\pm 8,1 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , průměrná hodnota onsetu krystalizace byla  $100,3\pm 13,1 \text{ °C}$  a průměrná hodnota maxima krystalizace byla  $116,1\pm 14,1 \text{ °C}$ . Už z průměrných hodnot a zejména z obrázku 14 je vidět, že teplota krystalizace výrazně závisí na rychlosti ohřevu. Hodnota krystalinity byla vypočtena dle rovnic (27) a (28) pro jednotlivé rychlosti ohřevu a průměr těchto hodnot je  $19,2\pm 3,7 \%$  krystalické fáze. Pokud by byla krystalinita vypočtena jen na základě porovnání entalpie krystalizace plně amorfniho enzalutamidu a vzorku TE pro každou rychlost ohřevu, pak by hodnota krystalinity (vypočtená jako průměr krystalinit stanovených pro každou rychlost ohřevu zvlášť) měla odpovídat  $34,4\pm 5,6 \%$ . Krystalinita byla stanovena na základě hodnot získaných z DSC křivek (Obrázek 13) měřených následujícími rychlostmi ohřevu: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 30;

50 °C·min<sup>-1</sup>. Přítomnost krystalů v materiálu TE byla potvrzena rovněž infračervenou a Ramanovou spektroskopií, jejichž výsledky jsou uvedeny v kapitole 3.1.5. V předchozí kapitole byl studován materiál připravený v DSC. Jeho entalpie krystalizace při rychlosti ohřevu 10 °C·min<sup>-1</sup> byla 36,4 J·g<sup>-1</sup>, onset krystalizace byl 107,9 °C a maximum krystalizace 125,4 °C. Uvedené hodnoty jsou velmi podobné materiálu připravenému na vakuové odparce (DSC křivka získaná rychlostí ohřevu 10 °C·min<sup>-1</sup>: entalpie krystalizace 38,3 J·g<sup>-1</sup>, onset krystalizace 103,7 °C, maximum krystalizace 118,5 °C), z čehož plyne, že i tento materiál obsahuje určité množství krystalické fáze. Krystalinita materiálu připraveného v DSC s následným rozdrčením v achátové misce odpovídá dle rovnice (27) a (28) 25,9±4,6 %, přičemž tento průměr odpovídá průměru hodnot krystalinity stanovených u jednotlivých rychlostí ohřevu. Pokud je krystalinita vypočtena prostým porovnáním entalpie plně amorfního materiálu (materiál připravený extruzí s rychlým chlazením, entalpie plně amorfního materiálu odpovídá 51,9±8,9 J·g<sup>-1</sup>) a vzorku připraveného v DSC, pak vzorek připravený v DSC obsahuje 24,2±7,8 % krystalické fáze. I když by se na první pohled mohlo zdát, že množství krystalické fáze v materiálu připraveném v DSC je nesprávné, existuje rozumné vysvětlení. Příprava materiálu v DSC byla provedena následujícím způsobem: 20–22 mg polymorfní formy R1 bylo naváženo do DSC kelímku o větším objemu, následně byl vzorek ohříván rychlostí ohřevu 30 °C·min<sup>-1</sup> v rozmezí teplot 70–220 °C, poté byl ochlazen stejnou rychlostí na teplotu 150 °C a znovu ohřát na 220 °C, následně byl vzorek ochlazen stejnou rychlostí na 0 °C. Větší množství materiálu k přípravě tj. 20 mg bylo použito za účelem získání dostatečného množství vzorku k experimentům různými rychlostmi ohřevu. Takto připravený materiál byl po vyjmutí z kelímku rozdrčen v achátové misce a použit k experimentům. Jedním z vysvětlení velkého množství krystalické fáze v materiálu připraveném v DSC je, že vlivem vyšší navážky nedošlo k úplnému roztavení materiálu. Zpětnou analýzou DSC křivky bylo potvrzeno, že při prvním cyklu ohřevu, bylo dosaženo maxima tání, avšak ne endsetu tání. Při druhém ohřevu již tání nebylo zaznamenáno. Druhou možností je, že v materiálu zůstalo residuální množství krystalické fáze. Při podrcení v achátové misce došlo k nukleaci v amorfním materiálu a vlivem přítomnosti krystalických zárodků došlo během stání vzorku v DSC ke krystalizaci. Nicméně existence více než 20 % krystalické fáze ve vzorku připraveném v DSC je velmi pravděpodobně způsobena nedokonalým přetavením krystalického materiálu při přípravě.

S ohledem na stanovení množství krystalické fáze v amorfním vzorku je nutné diskutovat spolehlivost metody založené na rovnicích (27) a (28). Tato metoda byla použita

namísto prostého podělení entalpie krystalizace vzorku a entalpie plně amorfního materiálu. Spolehlivost metody s ohledem na všechny materiály bude diskutována v kapitole 3.1.10.

Z průměrných hodnot uvedených výše je patrné, že dochází ke značným odchylkám ve výsledcích s použitím různé rychlosti ohřevu. Rychlost ohřevu má prokazatelně vliv na kinetiku krystalizace, což bude doloženo v následujících kapitolách. Pokud je potřeba posoudit dva amorfní materiály, je nutné porovnávat hodnoty získané stejnou rychlostí ohřevu. Na tomto místě budou srovnány termické charakteristiky získané rychlostí ohřevu  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Materiál TE začíná krystalizovat u  $98,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (onset krystalizace) s maximem krystalizace u  $114,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a entalpií krystalizace  $31,0\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Na základě výpočtu (rovnice 27, 28) bylo stanoveno, že materiál pravděpodobně obsahuje přibližně 24,6 % krystalické fáze. Materiál připravený v DSC rychlostí chlazení  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  s následným drcením začíná krystalizovat u  $104,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  s maximem krystalizace u  $128,9\text{ }^{\circ}\text{C}$  s entalpií krystalizace  $37,5\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Na základě těchto hodnot bylo vypočteno, že materiál obsahuje přibližně 18 % krystalické fáze. Z těchto hodnot opět vyplývá, že materiál TE je více zakrystalizovaný, což se odráží v posunu teploty krystalizace k nižším teplotám a ve snížení entalpie krystalizace. Jak bude ukázáno v následujících kapitolách, plně amorfní vzorek je možné připravit extruzí či sprejovým sušením, což bude potvrzeno i dalšími charakterizačními technikami. V tomto odstavci bylo také ukázáno, že v průměrné výsledné hodnotě jsou značné odchylky plynoucí z použití různých rychlostí ohřevu.

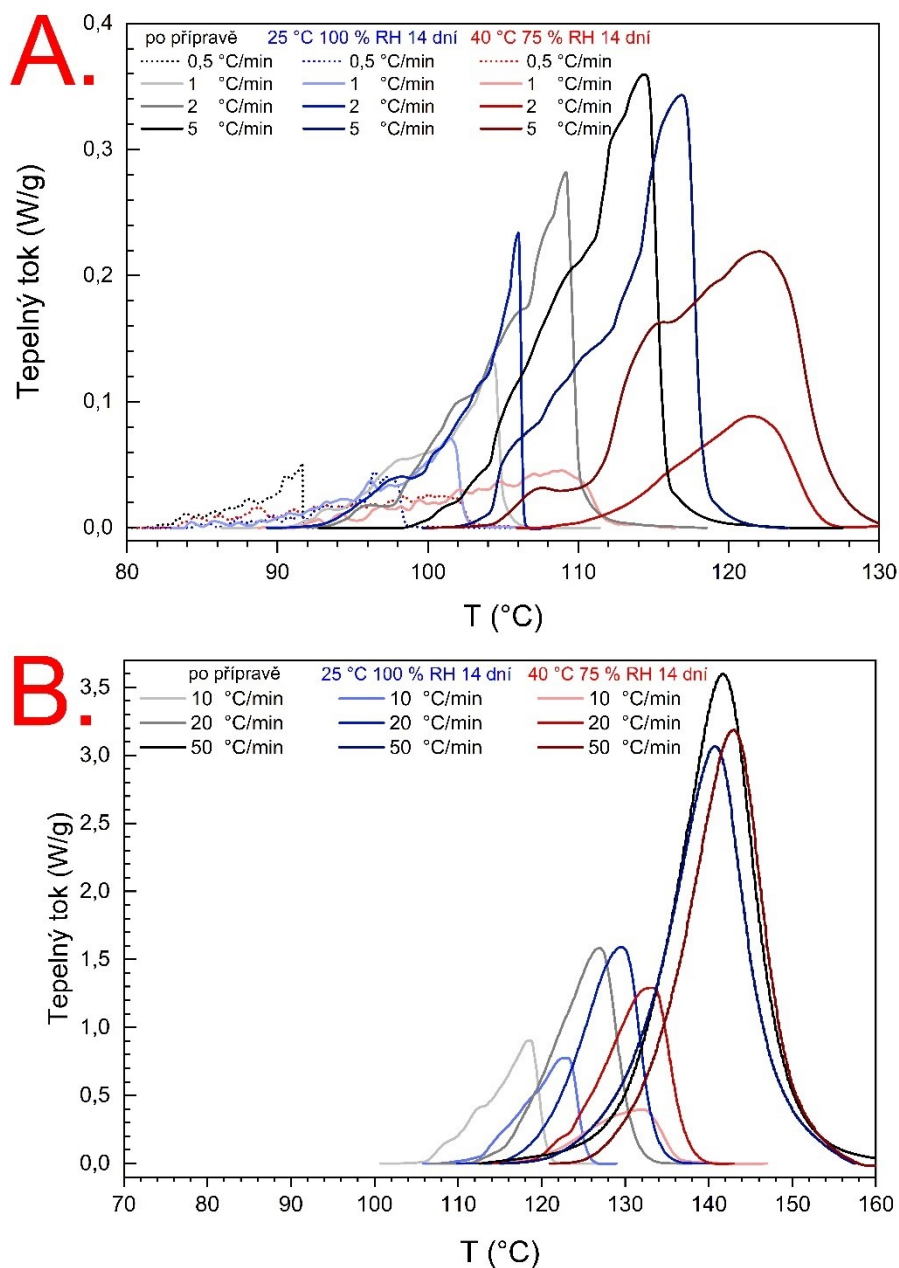


Obrázek 12. SEM snímky pevnofázové formy enzalutamidu připravené na vakuové odparce:

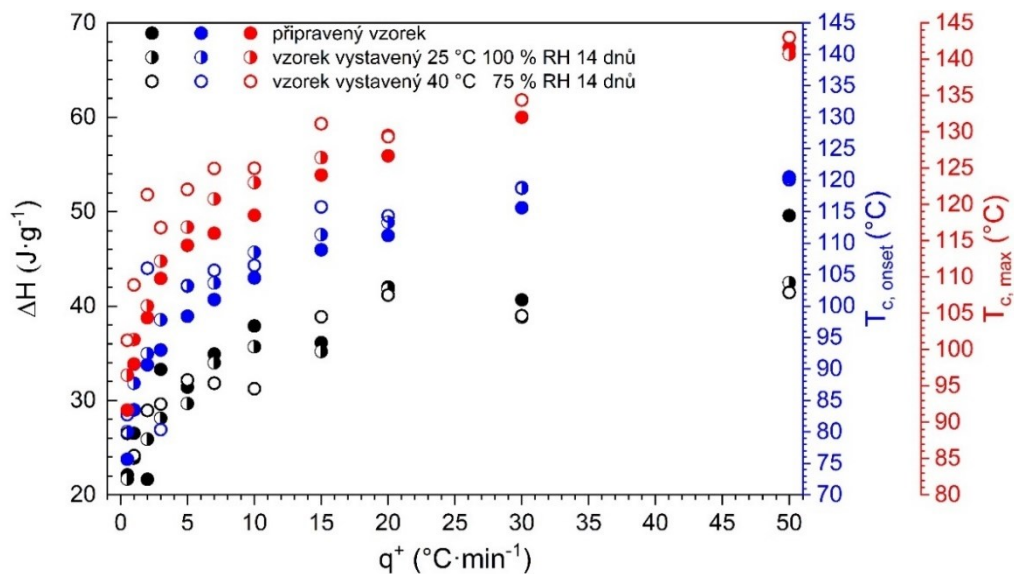
A. snímek s velikostí měřítka 200  $\mu\text{m}$ , B. snímek s velikostí měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

Připravený Enzalutamid TE byl vystaven následujícím podmínkám:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  100 % RH a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  75 % RH po dobu 14 dní. Tyto materiály byly měřeny stejně jako v případě

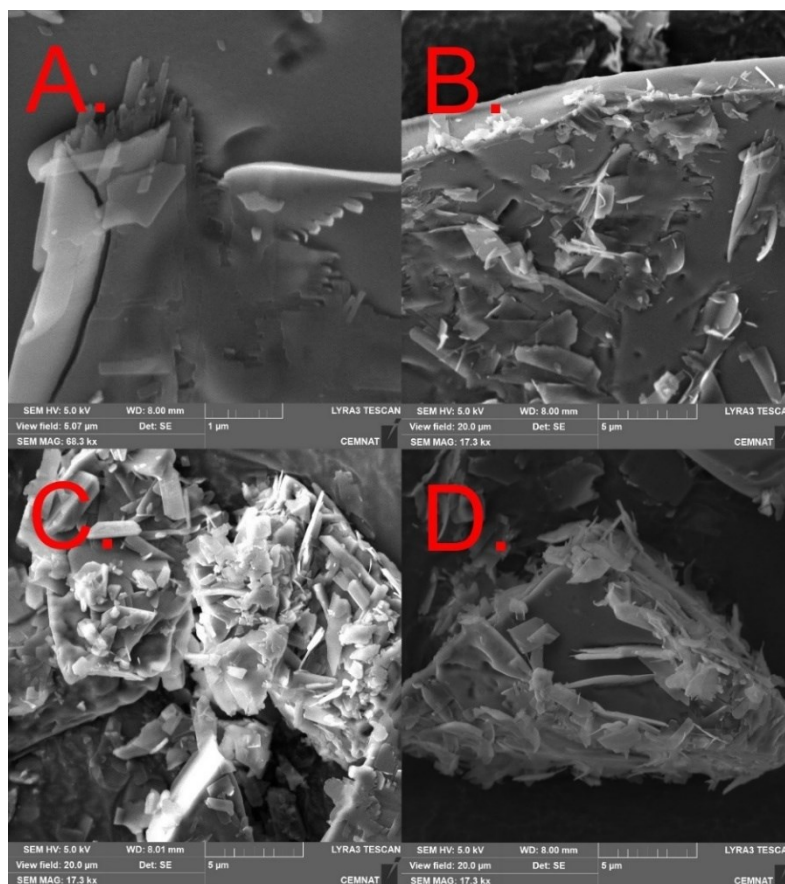
připraveného materiálu následujícími rychlostmi ohřevu: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 30; 50 °C·min<sup>-1</sup>. Krystalinita amorfního materiálu TE vystaveného 25 °C 100 % RH po dobu 14 dní byla stanovena na 27,3±5 % a u materiálu vystaveného 60 °C 75 % RH 14 dní na 29,9±8 %. Krystalizační píky těchto materiálu získané několika rychlostmi ohřevu jsou zobrazeny na Obrázku 13. Z Obrázku 13 je patrné, že dochází k posunu krystalizačních píků směrem k vyšším teplotám s narůstajícím množstvím krystalické fáze, což znamená, že je krystalizace pravděpodobně ve zbytku materiálu náročnější. To by mohlo odpovídat situaci, kdy je povrch částic již zcela pokryt krystalickou fází, zbývá pouze kompaktní amorfni objem vzorku s minimem interních defektů a krystalizace postupuje pouze z rozhraní obou fází směrem dovnitř jednotlivých zrn. Závislost  $T_{c,max}$ ,  $T_{c,onset}$ ,  $\Delta H_c$  na rychlosti ohřevu pro všechny tyto materiály je zobrazena na Obrázku 14. I zde je vidět, že dochází k posunu teploty krystalizace směrem k vyšším teplotám s větším podílem krystalů ve vzorku a zároveň dochází ke snižování entalpie krystalizace. Vzhledem k velkému rozptylu stanovení krystalinity pomocí rovnic (27) a (28) je pravděpodobně nejspolehlivějším prostředkem interpretace těchto výsledků přímé srovnání dat z obrázků 13 a 14. Data pro nižší rychlosti ohřevu jsou obecně méně spolehlivá, neboť ke krystalizaci dochází dominantně z energeticky preferovaných krystalizačních center a celkový proces je tak zdánlivě překryvem řady nezávislých sub-procesů. Při vyšších rychlostech ohřevu, cca. od 5 °C·min<sup>-1</sup> a výš se již, ale díky nadbytku energie, krystalizace uskutečňuje v rámci celého povrchu a krystalizační píky jsou tak více reprezentativní a reprodukovatelné. Z těchto dat získaných pro vyšší rychlosti ohřevu jasně vyplývá výše zmíněný kontra-intuitivní pokles krystalizační rychlosti pro enzalutamid s vyšším obsahem krystalické fáze zformované v důsledku vystavení vysoké vlhkosti a teplotě. Zároveň je zřejmé, že teplota hraje pro iniciaci krystalizace významnější roli v porovnání s úrovní vlhkosti. Pokud jde o krystalizační entalpii, horší reprodukovatelnost procesu má za následek spíše nejasný závěr, lze se však přiklonit spíše ke snižujícím se hodnotám  $\Delta H_c$  se vzrůstající teplotou. V kapitole 3.1.9.2 je prokázáno, že u enzalutamidu dochází ke krystalizaci na povrchu a z povrchu směrem dovnitř. Vzhledem k tomu, že je materiál TE ve formě tenkých plátků, je zde krystalizace do hloubky materiálu značně omezená, a může docházet k další krystalizaci pouze na povrchu. Obrázek 15 zobrazuje materiál TE, který byl zakrystalizovaný v DSC. Z obrázku je vidět, že dochází pouze k růstu krystalů na povrchu.



Obrázek 13. DSC křivky enzalutamidu TE po přípravě (černé křivky), vystavenému podmínkám 25 °C 100 % RH po dobu 14 dní (modré křivky), vystavenému podmínkám 40 °C 75 % RH po dobu 14 dní. DSC křivky byly získány rychlostí ohřevu 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 a 50 °C·min<sup>-1</sup>.



Obrázek 14. Termické charakteristiky amorfního enzalutamidu připraveného na vakuové odparce – materiál TE. Hodnota entalpie krystalizace  $\Delta H_c$  (černé body), onsetu teploty krystalizace  $T_{c, \text{onset}}$  (modré body) a maxima teploty krystalizace  $T_{c, \text{max}}$  (červené body) v závislosti na rychlosti ohřevu. Plné body odpovídají enzalutamidu TE měřenému po přípravě, poloprázdné body odpovídají enzalutamidu TE vystavenému 25 °C 100 % RH po dobu 14 dní, prázdné body odpovídají enzalutamidu TE vystavenému 40 °C 75 % RH po dobu 14 dní.



Obrázek 15. SEM snímky enzalutamidu TE zakrystalizovaného v DSC:

A. snímek s velikostí měřítka 1  $\mu\text{m}$ , B. snímek s velikostí měřítka 5  $\mu\text{m}$ , C. snímek s velikostí měřítka 5  $\mu\text{m}$ , D. snímek s velikostí měřítka 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3. Pevnofázová forma enzalutamidu připravená extruzí

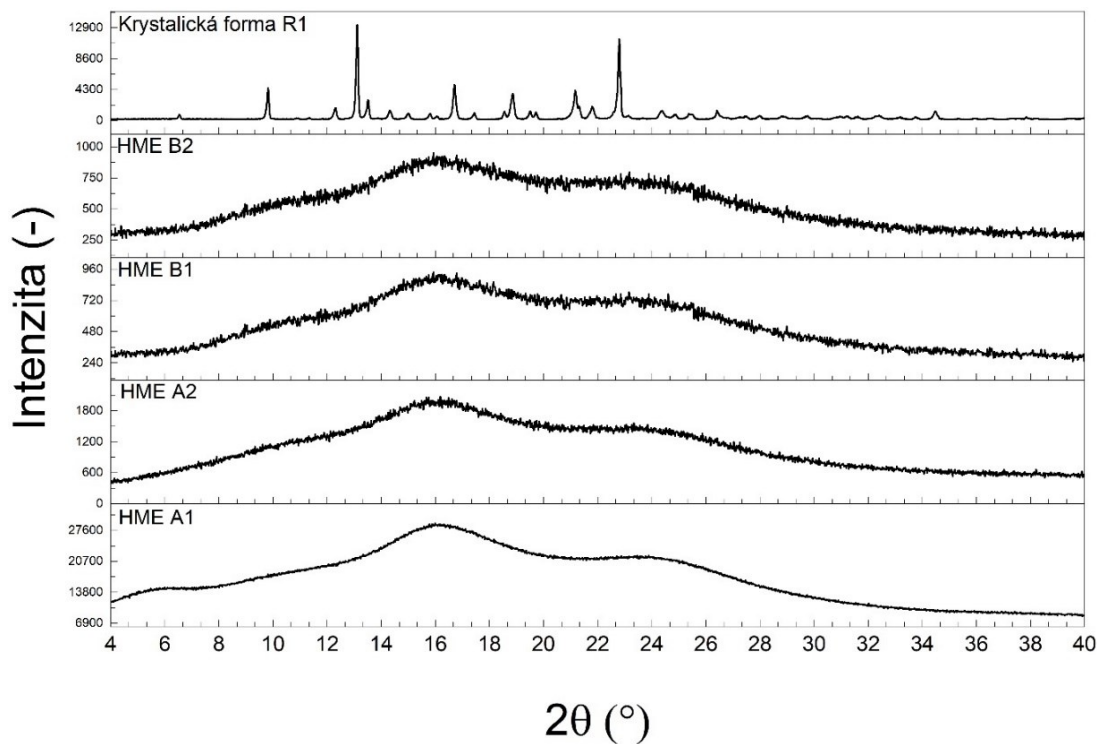
Amorfní enzalutamid byl připraven extruzí krystalické formy R1 za použití různé rychlosti chlazení, tj. chlazením na teplotu vzduchu (materiál bude označován jako HME A) a chlazením na teplotu kapalného dusíku (materiál bude označován jako HME B). První větší šarže (desítky gramů) připravených materiálů (HME A1, HME B1) byly použity ke kinetickým výpočtům aplikovaným na jejich krystalizaci. Tyto šarže byly rozšířovány na jednotlivé frakce velikostí částic, pro které byla na základě výpočtů predikována krystalizace. Poté byl navrhnout výpočet, jakým způsobem vypočítat predikci krystalizace vstupního materiálu (amorfní enzalutamid s velikostí částic pod 500  $\mu\text{m}$ ) u něhož budeme znát distribuční křivku velikosti částic. Toto téma je popsáno v kapitole 3.1.7. Poté byla připravena druhá větší šarže (HME A2, HME B2) těchto materiálů, která byla vystavena zrychleným (krátkodobým) a přirozeným (dlouhodobým) stabilitním testům (kapitola 3.1.9). Popis kinetiky krystalizace nezátížených materiálů HME A2 a HME B2 je uveden v kapitole 3.1.8. U amorfních látek je totiž důležité predikovat krystalizaci aktuální šarže, neboť téměř každá změna podmínek přípravy má vliv na jejich stabilitu.

Vzorky všech materiálů (HME A1, HME A2, HME B1, HME B2) byly charakterizovány hned po přípravě. Dle práškové rentgenové difrakce byly připravené materiály zcela amorfní. Difraktogramy těchto látek jsou uvedeny v Obrázku 16. Rovněž byla měřena  $^{19}\text{F}$  ss-NMR spektra všech připravených materiálů (viz Obrázek 17). Amorfní látky mají v ss-NMR širší signály, naproti tomu signály krystalické formy jsou užší a ostré. Byl sledován signál  $\text{CF}_3$  skupiny s chemickým posunem cca 60 ppm, který je nejintenzivnější. Byl porovnáván tvar píku vzorku s tvarem píku směsi obsahující 1 % krystalické fáze. Bylo potvrzeno, že druhé šarže materiálů HME A, HME B (tedy HME A2, HME B2) jsou zcela amorfní. Avšak co se týče prvních šarží, HME A1 obsahoval pravděpodobně méně než 1 % krystalické fáze a HME B1 byl amorfní dle ss-NMR. V případě enzalutamidu je měření  $^{19}\text{F}$  ss-NMR citlivější než XRPD, je možné takto identifikovat přítomnost malého množství krystalů v amorfní fázi. Tento poznatek byl stanoven experimentálně, jak bylo výše uvedeno, neboť v literatuře byl k hodnocení amorfности enzalutamidu výhradně používán rentgen, který je v případě enzalutamidu nedostačující ke stanovení minoritního množství krystalické fáze v amorfním enzalutamidu. Obrázek 16 zobrazuje difraktogramy všech materiálů (HME A1, HME A2, HME B1, HME B2) a na základě těchto výsledků jsou všechny vzorky amorfní. Ale, jak již bylo uvedeno, ss-NMR odhalilo méně než 1 % krystalické fáze v amorfním vzorku HME A1 (Obrázek 17). Samozřejmě se jedná o vyšší citlivost ss-NMR a není

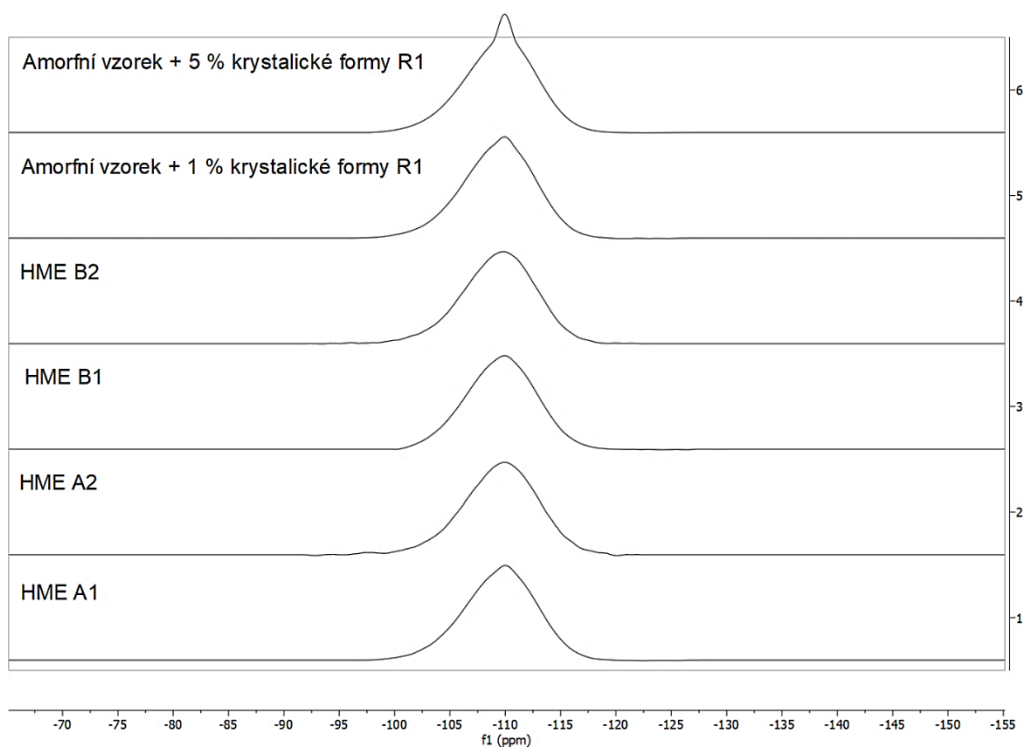
zaručeno, že v plně amorfních vzorcích nejsou minoritní zárodky krystalické fáze, které neodhalí ani tato technika. Rozdílnost v krystalinitě připravených HME A1 a HME A2 stanovená na základě  $ss$ -NMR může signalizovat to, že pomalá rychlost chlazení je nedostatečná pro tvorbu amorfního enzalutamidu a výsledek je proto nereprodukovatelný; HME techniku lze tedy označit jako hraniční vzhledem k jejím možnostem produkovat amorfní materiál. V případě druhé šarže však byly připraveny plně amorfní materiály oběma rychlostmi chlazení, proto byly oba tyto materiály použity pro studium stability v amorfní fázi (kapitola 3.1.8 a 3.1.9). K potvrzení amorfности vzorků byly použity vždy i další techniky, jejichž výsledky budou následovat.

Amorfность obou vzorků byla ověřena také infračervenou a Ramanovou spektroskopií. U všech materiálů připravených extruzí (HME A1, HME A2, HME B1, HME B2) nebyla identifikována přítomnost krystalické fáze. IČ a Ramanova spektra jsou uvedena v kapitole 3.1.5.

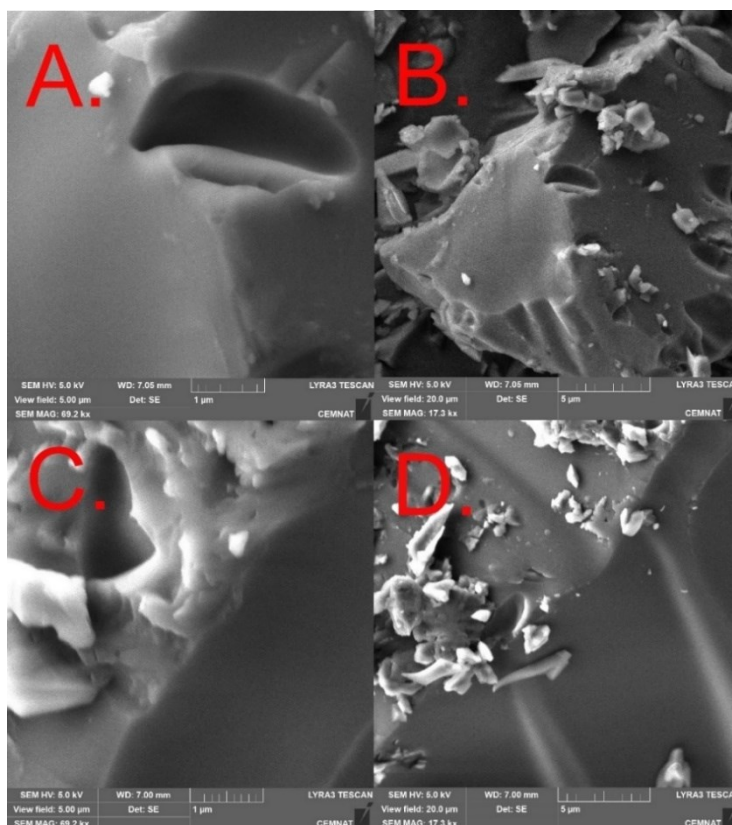
U amorfních léčiv dochází primárně ke krystalizaci na povrchu, proto byla použita skenovací elektronová mikroskopie ke zmapování struktury povrchu, případně řezů materiálu za účelem odhalení byť malého množství krystalické fáze či potvrzení amorfности zkoumaných materiálů. Na Obrázcích 18 a 19 jsou zobrazeny snímky výše zmíněných materiálů. SEM snímky materiálů HME A2, HME B2 byly měřeny ihned po přípravě. SEM snímky materiálů HME A1, HME B1 byly měřeny až po 4 měsících. Obrázek 18 zobrazuje snímky plně amorfních materiálů HME A2 a HME B2, zobrazují čtvercový výřez o velikosti 1 – 5  $\mu\text{m}$ . Extrudovaný materiál má většinou nepravidelný tvar, záleží na technice mletí. Amorfní materiál lze rozeznat tak, že po drcení můžeme nalézt lasturový lom. U obou materiálů (HME A2 a HME B2) nebyla pomocí SEM nalezena krystalická fáze. Obrázek 19 zobrazuje materiál HME A1 a HME B1 po 4 měsících skladování v 5  $^{\circ}\text{C}$ , materiál byl skladován ve skleněných lékovkách obalených Parafilmem<sup>®</sup>. Obrázek 19 zobrazuje řezy materiálem, kdy tmavé části obrázku pocházejí z hloubky materiálu a světlé části zobrazují povrch. Na povrchu jsou evidentně krystaly. Po 4 měsících došlo ke krystalizaci v 5  $^{\circ}\text{C}$ , i když byly vzorky chráněny před vlhkostí a vizuálně nebyla pozorována změna formy vzorku (lepení, roztečení do skelné fáze). To může být způsobeno přítomností nukleí z přípravy, které byly generovány mechanicky. Z toho plyne, že v případě amorfního enzalutamidu pravděpodobně probíhá krystalizace i hluboko pod teplotou skelného přechodu a to bez ohledu na vlhkost. Krystalizace je důsledkem narušení povrchu materiálu.



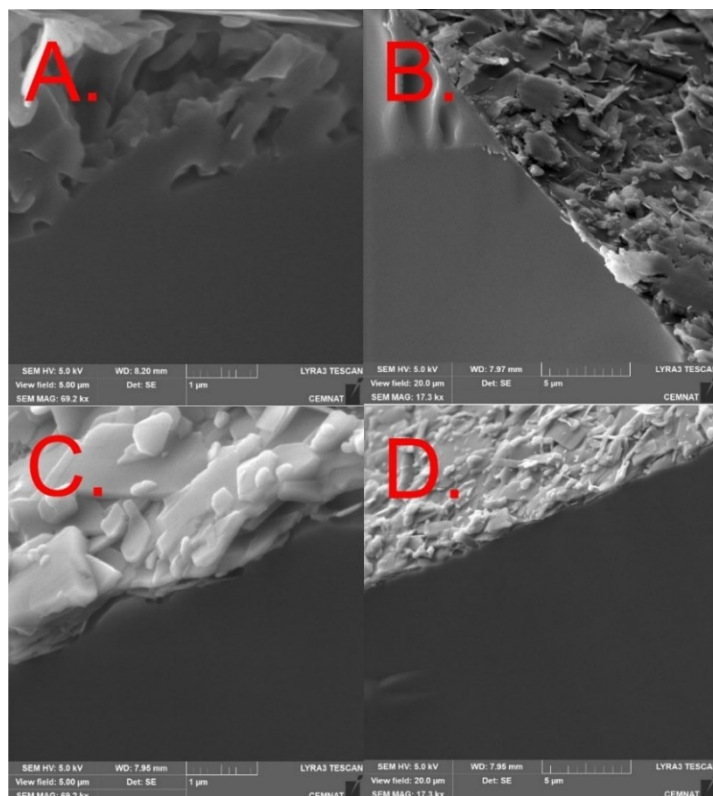
Obrázek 16. Výsledky práškové rentgenové difrakce následujících forem enzalutamidu: polymorfní formy R1, HME A1, HME A2, HME B1 a HME B2.



Obrázek 17.  $^{19}\text{F}$  *ss*-NMR spektra amorfního vzorku s příměsí 1 % krystalické fáze R1, amorfního vzorku s příměsí 5 % krystalické fáze R1, materiálů HME A1, HME A2, HME B1, HME B2. Spektra byla posunuta.



Obrázek 18. SEM snímky čerstvě připravených materiálů HME A2 a HME B2: A. snímek HME A2 (měřítko 1 μm), B. snímek HME A2 (měřítko 5 μm), C. snímek HME B2 (měřítko 1 μm), D. snímek HME B2 (měřítko 5 μm).



Obrázek 19. SEM snímky materiálů HME A1 a HME B1, které byly měřeny po 4 měsících od přípravy: A. snímek HME A1 (měřítko 1 μm), B. snímek HME A1 (měřítko 5 μm), C. snímek HME B1 (měřítko 1 μm), D. snímek HME B1 (měřítko 5 μm).

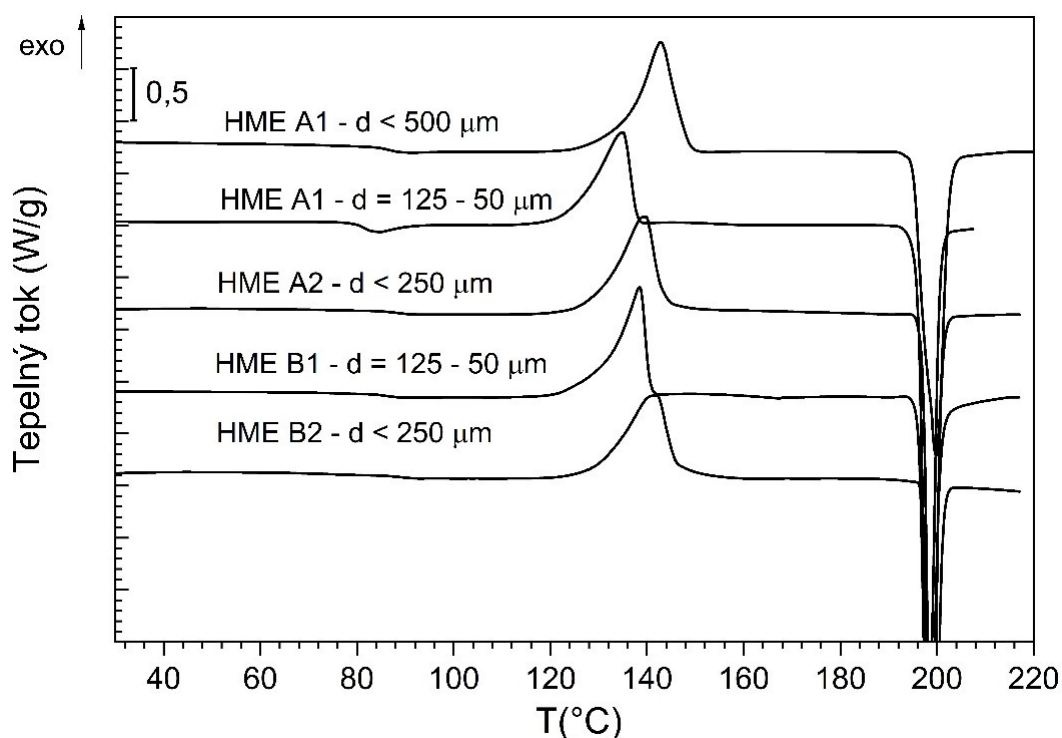
Všechny čtyři šarže připraveného enzalutamidu byly měřeny pomocí DSC a ani u jednoho materiálu nebyly po přípravě prokázány krystaly na základě rovnic (27) a (28) (kapitola 3.1.2). Obrázek 20 zobrazuje DSC křivky materiálu HME A1 obsahujícího částice o velikosti nižší než 500  $\mu\text{m}$ , HME A1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$ , HME A2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$ , HME B1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$ , HME B1 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$ .

Obecné poznatky jsou shrnuty v následujícím odstavci. Posun pozice krystalizačního píku ( $T_{c,onset}$ ;  $T_{c,max}$ ) směrem k nižším teplotám může znamenat snížení stability. Pokud by došlo ke snížení hodnoty entalpie u stejného materiálu (stejně rozmezí velikosti částic), pak to znamená, že je materiál před měřením částečně zakrystalizovaný. Všechny DSC křivky zobrazené na Obrázku 20 byly získány jednou rychlostí ohřevu, tj. 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Z tohoto Obrázku jsou zjevné tři věci: 1) čím nižší (toto bude specifikováno blíže v kapitole 3.1.7) hodnota velikosti částic, tím je nižší teplota onsetu krystalizace, popř. maxima krystalizace a zároveň se snižuje entalpie krystalizace; 2) krystalizační pík materiálu připraveného vyšší rychlostí chlazení (HME B1, HME B2) je posunut k vyšším teplotám v porovnání s materiálem připraveným nižší rychlostí ohřevu (HME A1, HME A2). Pokud porovnáme materiály se stejnou velikostí částic či rozmezím velikostí částic (HME B1 125 – 50  $\mu\text{m}$  s HME A1 125 – 50  $\mu\text{m}$ ; HME B2  $d < 250 \mu\text{m}$  s HME A1  $d < 250 \mu\text{m}$ ); 3), u materiálů HME A1, HME A2 je tvar píku asymetrický, sledující pravděpodobně kinetiku 0. řádu, to může být způsobeno tím, že jsou už v materiálu přítomny zárodky krystalické fáze, což bylo potvrzeno *ss*-NMR.

Hodnoty  $T_{c,onset}$ ,  $T_{c,max}$  a  $\Delta H_c$  získané z DSC křivek měřených rychlostí 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jsou uvedeny v Tabulce 10. V případě těchto hodnot  $\Delta H_c$  byla při zpracování dat použita lineární základní linie (baseline), v případě kinetických výpočtů dále byl použit kubický spline pro zpřesnění výsledků. Snížení hodnoty  $\Delta H_c$  nemusí vždy znamenat přítomnost krystalické fáze, ale tato hodnota se snižuje s velikostí částic a může být různá pro materiály připravené jiným způsobem.

Tabulka 10. Hodnoty ( $T_{c,onset}$ ,  $T_{c,max}$ ,  $\Delta H_c$ ) získané z DSC křivky vzorků připravených extruzí, tj. HME A1, HME A2, HME B1, HME B2. DSC křivka byla měřená rychlostí ohřevu  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

<b>Materiál</b>	<b>frakce částic (mm)</b>	<b><math>T_{c,onset}</math> (°C)</b>	<b><math>T_{c,max}</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_c</math> (J·g<sup>-1</sup>)</b>
HME A1	< 500 $\mu\text{m}$	123,5	124,9	56,7
HME A1	125 – 50 $\mu\text{m}$	118,4	135,0	42,1
HME A2	< 250 $\mu\text{m}$	120,8	139,4	49,6
HME B1	125 – 50 $\mu\text{m}$	119,5	138,5	43,5
HME B2	< 250 $\mu\text{m}$	121,7	141,8	51,9



Obrázek 20. DSC křivky následujících materiálů: nerozsívaného materiálu HME A1 s velikostí pod 500  $\mu\text{m}$ , materiálu HME A1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$ , materiálu HME A2 s velikostí částic v rozmezí pod 250  $\mu\text{m}$ , materiálu HME B1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$ , materiálu HME B2 s velikostí částic v rozmezí pod 250  $\mu\text{m}$ . DSC křivky byly posunuty. DSC křivky byly změřeny rychlostí ohřevu  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Všechny uvedené materiály byly ve stejném teplotním rozsahu (0 – 220 °C) měřeny sadou různých rychlostí ohřevu tj. 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50  $\text{°C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Průměrná hodnota teploty skelné transformace (vypočtené jako průměr hodnot stanovených z DSC křivek měřených různou rychlostí ohřevu) u materiálů HME A1 s velikostí částic pod 500  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $85,3\pm 1,8\text{ °C}$ , HME A1 s velikostí částic v rozmezí 125–50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $80,4\pm 2,3\text{ °C}$ , HME A2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $87,0\pm 5,0\text{ °C}$ , HME B1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $83,5\pm 5,4\text{ °C}$  a HME B2 s velikostí

částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla  $86,2\pm 4,4$   $^{\circ}\text{C}$ . Teplota skelné transformace tedy není ovlivněna velikostí částic, rozdíly v hodnotách jsou dány subjektivní povahou vyhodnocení.

Průměrná hodnota entalpie krystalizace (vypočtena jako průměr hodnot stanovených z DSC křivek měřených různou rychlostí ohřevu) u materiálů HME A1 s velikostí částic pod 500  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $56,7\pm 4,6$   $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ , HME A1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $35,2\pm 2,6$   $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ , HME A2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $48,0\pm 7,8$   $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ; HME B1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $50,5\pm 6,8$   $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$  a HME B2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $51,9\pm 8,9$   $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Z těchto hodnot plyne, že entalpie krystalizace materiálů připravených různou rychlostí chlazení je srovnatelná, ale její hodnota je silně závislá na velikosti částic. Jedním z vysvětlení je, že částice o výrazně odlišné velikosti částic krystalizují jiným krystalizačním mechanismem.

Průměrná hodnota onsetu teploty krystalizace (vypočtena jako průměr ze všech rychlostí ohřevu) u materiálů HME A1 s velikostí částic pod 500  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $118,3\pm 8,4$   $^{\circ}\text{C}$ , HME A1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $111,2\pm 8,7$   $^{\circ}\text{C}$ , HME A2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $119,5\pm 12,7$   $^{\circ}\text{C}$ ; HME B1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $117,5\pm 9,2$   $^{\circ}\text{C}$  a HME B2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $116,9\pm 10,3$   $^{\circ}\text{C}$ . Průměrná pozice onsetů krystalizace HME A2 a HME B2 není významně odlišná.

Průměrná hodnota maxima teploty krystalizace (vypočtena jako průměr ze všech rychlostí ohřevu) u materiálů HME A1 s velikostí částic pod 500  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $138,7\pm 10,7$   $^{\circ}\text{C}$ , HME A1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $126,9\pm 10,2$   $^{\circ}\text{C}$ , HME A2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $134,8\pm 13,2$   $^{\circ}\text{C}$ ; HME B1 s velikostí částic v rozmezí 125 – 50  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $129,1\pm 12,6$   $^{\circ}\text{C}$  a HME B2 s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$  byla stanovena na  $136,0\pm 13,4$   $^{\circ}\text{C}$ . Z uvedených výsledků vyplývá, že maximum krystalizace HME B2 je oproti HME A2 posunuto k vyšším teplotám, zdálo by se tedy, že je tento materiál více stabilní, ale to bude více objasněno v kapitole 3.1.6 a 3.1.7. I přesto, že se krystalizace se vzrůstající rychlostí ohřevu posouvá k vyšším teplotám, jsou z průměrných hodnot patrné stejné trendy, které byly popsány na předcházející stránce v bodech 1) a 2). Jasně je, že v tomto případě, kdy se jedná o plně amorfní vzorky, je posun píku k nižším teplotám dán nižší stabilitou, ale ne přítomností krystalické fáze. Neboť, v předchozí kapitole na materiálu TE bylo ukázáno, že přítomnost

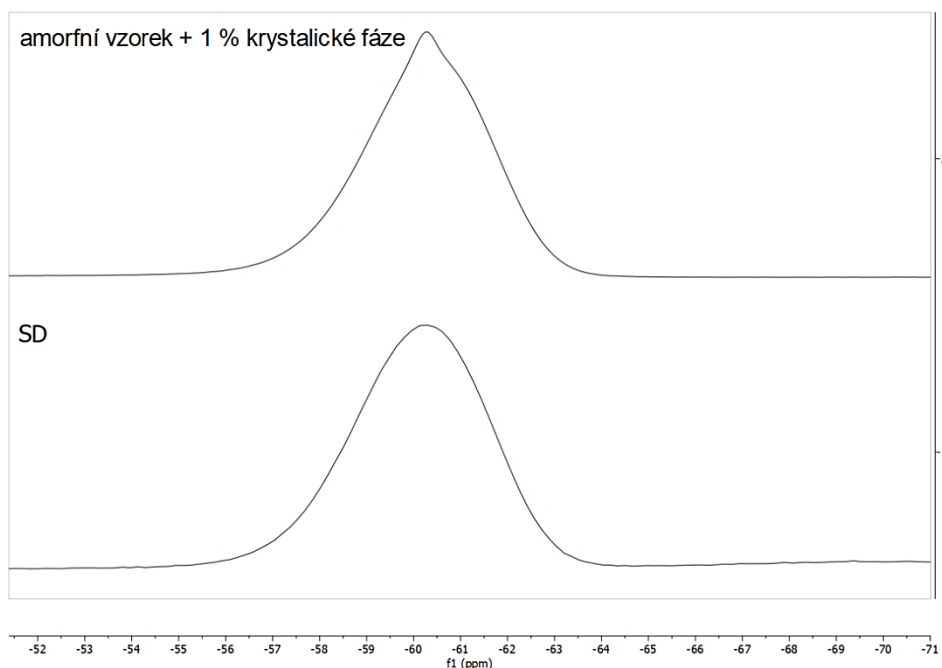
krystalické fáze posouvá krystalizaci k vyšším teplotám, neboť se nejdříve pokrývá povrch materiálu a poté může krystalizace probíhat v objemu a tam je buď nepravděpodobná anebo energeticky náročná.

#### 3.1.4. Pevnofázová forma připravená sprejovým sušením

Sprejovým sušením byl připraven plně amorfní vzorek, což je potvrzeno tvarem signálu skupiny  $\text{CF}_3$  v  $^{19}\text{F}$  ss-NMR spektru (viz Obrázek 21). Amorfní vzorek připravený sprejovým sušením bude dále označován jako SD. Amorfní povaha vzorku byla také potvrzena IČ a Ramanovými spektry, která jsou uvedena v kapitole 3.1.5. SD vzorek byl po přípravě rozdělen na dvě frakce, jedna frakce byla ponechána bez dosušení a druhá frakce byla sušena ve vakuové sušárně. Nedosušený vzorek (dále označován jako SD A) obsahoval 0,44 % zbytkového rozpouštědla a dosušený vzorek (dále označován jako SD B) 0,18 hm. %. Oba vzorky byly skladovány po dobu 7, 14, 21, 42, 102 a 156 dnů v 5 °C (ve skleněných lahvičkách utěsněných proti vlhkosti). Po každém odběru vzorku byly vzorky podrobeny analýze diferenční skenovací kalorimetrií. Mezi vzorky nebyl pozorován rozdíl. Nedošlo ani ke změně vzhledu vzorku (viz Příloha obrázek P 1). SD vzorek je po přípravě ve formě kulatých hladkých částic o velikosti v jednotkách  $\mu\text{m}$ , a to se nezměnilo ani po 156 dnech skladování (viz Příloha obrázek P 1). Pomocí SEM nebyly nalezeny žádné známky krystalické fáze (viz Příloha obrázek P 1). Průměrná hodnota entalpie (průměr hodnot získaných z DSC křivek měřených různou rychlostí ohřevu) krystalizace materiálu SD A (vzorek po přípravě) byla  $49,4 \pm 5,7 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$  a materiálu SD B (vzorek po dosušení ve vakuové sušárně)  $52,4 \pm 3,5 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ . Materiál SD B má mírně vyšší hodnotu entalpie krystalizace, což může být způsobeno tím, že během odpařování byla vygenerována další nuklea. V případě sprejově sušeného materiálu není používána žádná technika sloužící k mechanickému opracování vzorku, tedy technika, která by generovala nuklea a následně by došlo k jejich krystalizaci během ohřevu v DSC (kapitola 3.1.1). Krystalizace je tím pádem pravděpodobně důsledek způsobu přípravy. Nuklea na povrchu mohla být generována kontaktem sušícího plynu a kapky roztoku, kdy po odpaření vzniká pevná amorfní částice. Další termické charakteristiky vzorků jsou uvedeny v Tabulce 11. Pozice krystalizace a entalpie krystalizace je na úrovni extrudovaného materiálu (viz Tabulka 10) i přesto, že je velikost částic mnohonásobně nižší. Toto je velmi důležitý výsledek, který jen dokládá to, že hlavním faktorem ovlivňujícím krystalizaci je mechanický stres, což bude dokázáno v kapitole 3.1.7.

Tabulka 11. Průměrné hodnoty termických charakteristik ( $T_g$ ,  $T_{c,onset}$ ,  $T_{c,max}$ ,  $\Delta H_c$ ) získané z DSC křivek vzorků SD A a SD B. Hodnoty jsou průměrem hodnot získaných z DSC křivek měřených různou rychlostí ohřevu.

materiál	$T_g$ (°C)	$T_{c,onset}$ (°C)	$T_{c,max}$ (°C)	$\Delta H_c$ (J·g <sup>-1</sup> )
SD A	84,4±4,1	128,9±14,9	144,9±15,2	49,4±5,7
SD B	84,1±4,4	124,2±13,5	137,7±15,8	52,4±3,5



Obrázek 21. <sup>19</sup>F *ss*-NMR spektra vzorku připraveného sprejovým sušením (SD) a amorfní vzorek s příměsí 1 % krystalické fáze.

### 3.1.5. Další výsledky charakterizačních technik připravených forem enzalutamidu

V předcházejících kapitolách (3.1.1–3.1.4) byly předloženy výsledky charakterizačních technik jako XRPD, *ss*-NMR, SEM pro každý vzorek zvlášť. V této kapitole budou kvůli názornosti uvedeny výsledky spektroskopických technik pro všechny připravené vzorky. Nejdříve však zde budou stručně shrnuty výsledky DSC všech plně amorfních vzorků. Nejvyšší hodnoty onsetu čili počátku krystalizace bylo dosaženo u vzorků připravených sprejovým sušením. Hodnota entalpie krystalizace byla nejvyšší u sprejovaných vzorků a vzorku HME A1 s velikostí částic menší než 500 μm. Rozdíl v těchto hodnotách byl řádově jednotky J·g<sup>-1</sup>. Dle polohy krystalizačního píku by měl být sprejově sušený materiál nejstabilnější.

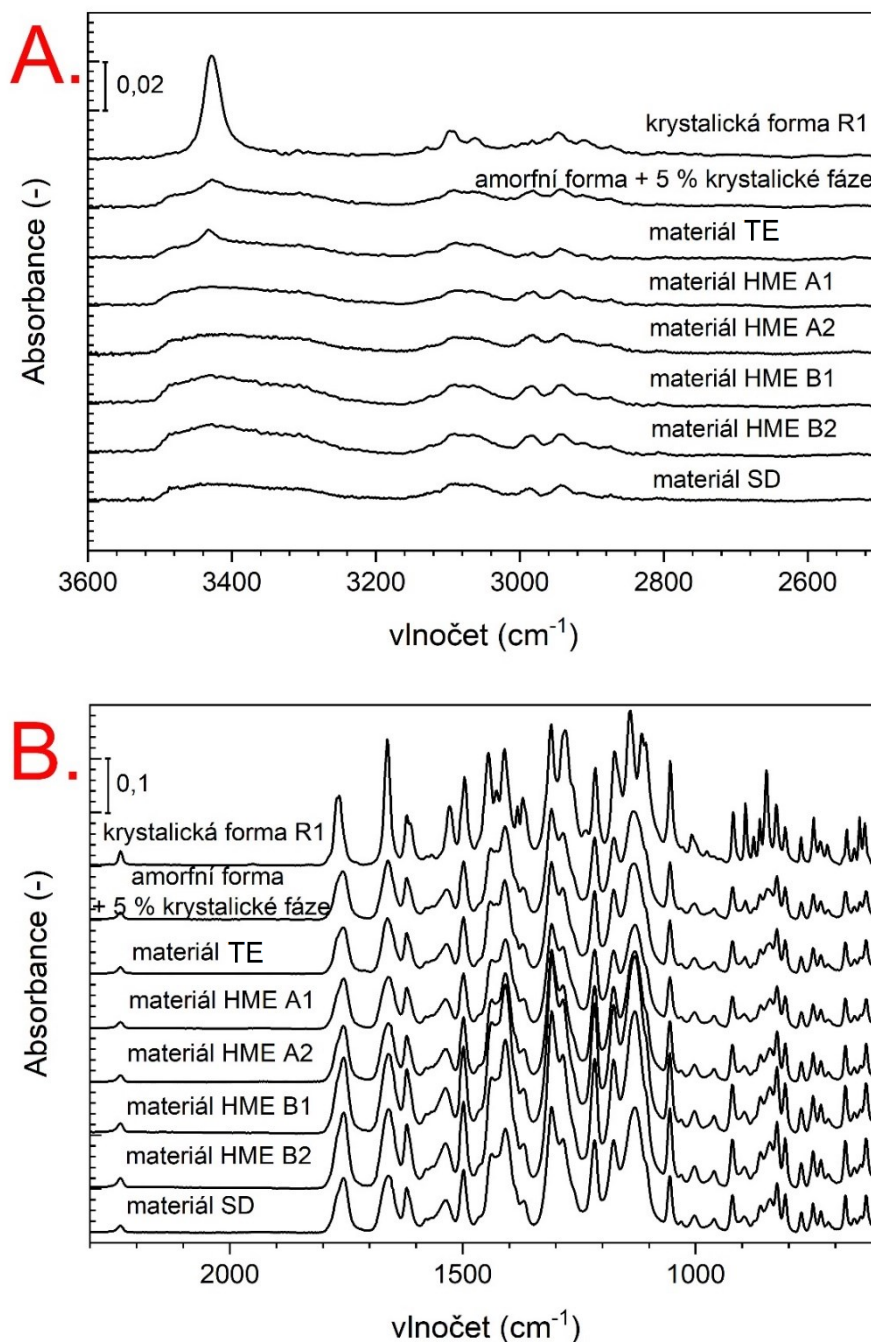
Spektroskopické techniky byly použity jako další metodika k potvrzení či vyvrácení přítomnosti krystalické fáze v amorfních vzorcích. Obrázek 22 zobrazuje IČ spektra krystalické formy R1, amorfní formy s příměsí 5 % krystalické fáze, pevnofázové formy

připravené na vakuové odparce (označeno jako TE, další informace viz kapitola 3.1.2), pevnofázové formy připravené extruzí s pomalým chlazením (označeno HME A1, HME A2, další informace viz kapitola 3.1.3), pevnofázové formy připravené extruzí s rychlým chlazením (označeno HME B1, HME B2, další informace viz kapitola 3.1.3), pevnofázové formy připravené sprejovým sušením (označeno SD, viz kapitola 3.1.4).

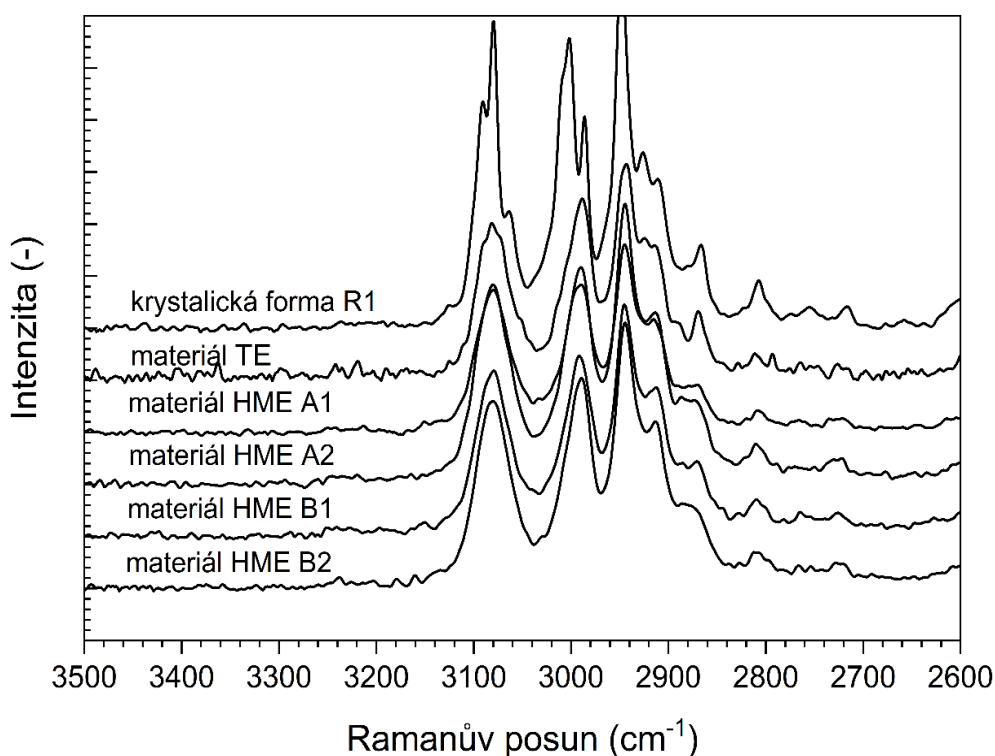
Absorpční pásy amorfního enzalutamidu jsou spíše širší, zatímco pásy krystalické formy jsou užší. Krystalická forma R1 je charakterizovaná polohou následujících pásů: 3429 (w), 1764 (m); 1662 (s); dublet s maximy při 1620 (m) a 1611 (m); 1528 (m); 1497 (s); triplet s maximy při 1445 (s), 1426 (m) a 1411 (s); 1382 (s); 1370 (m); 1311 (s); 1281 (s); 1264 (m), 1215 (s), 1174 (s), 1141 (s), 1116 (s), 1108 (s), 1054 (s), 1009 (w), 975 (w); 919 (m); 919 (m); 891 (m); 876 (m); 861 (m); 848 (s); 827 (m); 808 (m); 774 (w); 746 (m); 732 (w); 716 (w); 676 (m); 666 (w); 648 (m) a 636 (m)  $\text{cm}^{-1}$ . Amorfni forma je charakteristická polohou následujících absorpčních pásů: 1756 (m); 1659 (m); 1620 (m); 1537 (m); 1498 (m); dublet s maximy při 1440 (m) a 1408 (s); 1368 (w); dublet s maximy při 1309 (s) a 1283 (m); 1218 (m); 1176 (m); 1130 (s); 1054 (m); 1000 (w); 959 (w); 922 (w); 894 (w); 861 (w); 841 (w); 824 (w); 806 (w); 773 (w); 848 (w); 733 (w); 712 (w); 677 (w); 659 (w) a 634 (w).

U vzorků s malým množstvím krystalické fáze je tuto příměs možno identifikovat pouze pásem s maximem 3429  $\text{cm}^{-1}$  (Obrázek 22A). Tento pás pravděpodobně náleží valenčním vibracím  $\nu(\text{N-H})$ . Ostatní pásy u vzorků s převažujícím množstvím amorfni fáze zůstaly nezměněné (Obrázek 22B). Příměs krystalů byla pomocí IČ potvrzena u směsi s 5 % krystalické fáze a vzorku TE. V předchozí kapitole 3.1.3 bylo potvrzeno 1 % krystalické fáze i u vzorku HME A1, tento vzorek je však dle IČ plně amorfni. 1 % krystalické fáze je tedy v tomto případě již pod detekčním limitem IČ.

Připravené materiály byly měřeny také Ramanovou spektroskopií (Obrázek 23) a přítomnost malého množství krystalů byla potvrzena pouze u vzorku TE. Přítomnost krystalů byla vidět pouze na vznikajícím ostrém pásu u vlnočtu 3081  $\text{cm}^{-1}$  a u slabého pásu při 2924  $\text{cm}^{-1}$ . Tyto pásy přísluší pravděpodobně valenčním vibracím  $\nu(\text{C-H})$ .



Obrázek 22. Infračervená absorpční spektra enzalutamidu: polymorfni formy R1, amorfni formy s příměsí 5 % krystalické fáze, pevnofázové formy připravené na vakuové odparce (označeno TE), pevnofázové formy připravené extruzí s pomalým chlazením (označeno HME A1, HME A2, další informace viz kapitola 3.1.3), pevnofázové formy připravené extruzí s rychlým chlazením (označeno HME B1, HME B2, další informace viz kapitola 3.1.3), pevnofázové formy připravené sprejovým sušením (označeno SD, viz kapitola 3.1.4). A. oblast vlnčetů  $3600\text{--}2685\text{ cm}^{-1}$ , B. oblast vlnčetů  $2300\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ .



Obrázek 23. Ramanova spektra enzalutamidu: polymorfní formy R1, pevnofázové formy připravené na vakuové odparce (označení TE), pevnofázové formy připravené extruzí s pomalým chlazením (označeno HME A1, HME A2, další informace viz kapitola 3.1.3), pevnofázové formy připravené extruzí s rychlým chlazením (označeno HME B1, HME B2, další informace viz kapitola 3.1.3), pevnofázové formy připravené sprejovým sušením (označeno SD, viz kapitola 3.1.4).

Na závěr této kapitoly bude zhodnocena metoda stanovení krystalinity z DSC dat u všech připravených materiálů. Krystalinita vzorků byla stanovena na základě rovnice (27) a (28) uvedené v kapitole 3.1.1. K výpočtu krystalinity je potřeba entalpie tání a maximum tání plně krystalického materiálu, které činily:  $\Delta H_{m,100\%} = 74,1 \pm 1,2 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $T_{m,\max} = 200,6 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Dále entalpie krystalizace plně amorfního materiálu a změna tepelné kapacity u plně amorfního materiálu. Změna v tepelné kapacitě činila  $0,4 \pm 0,07 \text{ J} \cdot \text{g} \cdot \text{K}^{-1}$ , ale co se týče entalpie krystalizace, byla vždy použita hodnota odpovídající rychlosti ohřevu, pro kterou byla krystalinita stanovována. Termické charakteristiky materiálu HME B2 pro jednotlivé rychlosti ohřevu jsou uvedeny v Tabulce 12. Z tabulky opět vyplývá, že teplota krystalizace a entalpie krystalizace silně závisí na rychlosti ohřevu. Na základě těchto uvedených hodnot byla stanovena krystalinita měřených vzorků. V Tabulkách 13–17 jsou uvedeny hodnoty důležitých termických parametrů vzorků HME A2, HME A1, TE, vzorku enzalutamidu připraveného v DSC (s následným rozdrcením v achátové misce) a materiálu SD. V těchto

tabulkách jsou uvedené rovněž hodnoty vypočtené krystalinity na základě rovnic (27) a (28). Jako srovnávací plně amorfni vzorek byl použit HME B2, který byl dle všech charakterizačních technik plně amorfni. Dalším plně amorfni vzorkem byl materiál HME A1, jehož krystalinita byla na základě uvedených rovnic stanovena na  $1,2 \pm 7,9$  % krystalické fáze. Dalším plně amorfni vzorkem byl materiál SD, jehož krystalinita byla stanovena na  $-1,07 \pm 7,9$  %. Záporné hodnoty krystalinity v tabulkách (Tabulka 13 a Tabulka 17), které náležejí těmto materiálům jsou způsobeny značnou variabilitou v krystalizaci amorfniho enzalutamidu. Minoritní množství krystalické fáze obsahoval dle ostatních charakterizačních technik materiál HME A1, konkrétně obsahoval méně než 1 % krystalů. Na základě DSC, dle uvedených rovnic byla krystalinita opět v záporných hodnotách, z čehož plyne, že rovnice (27) a (28) nejsou tolik spolehlivé v případě nízké krystalinity, což je způsobeno značnými odchylkami v krystalizačním chování amorfniho enzalutamidu připraveného různými metodami. Naopak uvedené rovnice jsou spolehlivější v případě existence vyššího množství krystalické fáze, jak je patrné z relativně nižších odchylek krystalinity materiálu TE a vzorku připraveného přetavením v DSC, viz Tabulky 14 a 18. Krystalinita vzorku TE byla stanovena na  $19,2 \pm 3,7$  a vzorku připraveného v DSC na  $25,9 \pm 4,7$  %. Uvedené hodnoty jsou průměrem hodnot stanovených z jednotlivých rychlostí ohřevu.

Tabulka 12. Termické charakteristiky materiálu HME B2

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta c_p$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$ )	$T_{c,\text{onset}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
0,5	74,93	0,67	100,49	116,21	37,00	197,61	73,29
1	82,43	0,32	106,85	124,11	37,34	198,61	76,59
2	81,66	0,53	113,09	127,40	36,51	198,30	74,88
5	85,02	0,31	113,10	137,00	49,43	198,66	74,88
10	88,76	0,35	121,35	141,84	51,86	199,10	74,12
20	91,73	0,47	128,74	148,10	60,72	199,97	72,34
<b>průměr</b>	<b>84,09</b>	<b>0,39</b>	<b>113,94</b>	<b>132,44</b>	<b>49,63</b>	<b>198,71</b>	<b>74,35</b>
<b>odchylka</b>	<b>5,38</b>	<b>0,07</b>	<b>9,19</b>	<b>10,90</b>	<b>8,66</b>	<b>0,72</b>	<b>1,34</b>

Tabulka 13. Termické charakteristiky materiálu HME A2 a vypočtené hodnoty krystalinity

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta c_p$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$ )	$T_{c,\text{onset}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta H_{c,100\%}$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\alpha$ (%)
0,5			103,38	118,08	39,43	198,22	78,07	41,58	5,17

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta c_p$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$ )	$T_{c,onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta H_{c,100\%}$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\alpha$ (%)
1			106,03	121,83	39,34	198,23	78,52	43,06	8,64
2	82,05	0,59	110,26	126,70	40,89	198,23	78,61	44,98	9,09
5	85,20	0,37	116,14	134,53	49,55	197,97	76,01	48,07	-3,09
10	88,66	0,39	120,81	136,36	49,55	198,58	80,44	48,79	-1,56
20	89,51	0,28	126,24	147,89	59,24	198,98	72,61	53,33	- 11,08
<b>průměr</b>	<b>86,36</b>	<b>0,41</b>	<b>113,81</b>	<b>130,90</b>	<b>46,33</b>	<b>198,37</b>	<b>77,38</b>	<b>46,63</b>	<b>1,20</b>
<b>odchylka</b>	<b>2,96</b>	<b>0,12</b>	<b>8,07</b>	<b>9,97</b>	<b>7,23</b>	<b>0,33</b>	<b>2,49</b>	<b>3,93</b>	<b>7,19</b>

Tabulka 14. Termické charakteristiky materiálu TE a vypočtené hodnoty krystalinity

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_{c,onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta H_{c,100\%}$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\alpha$ (%)
0,5	194,90	197,54	66,62	91,67	22,12	31,40	19,16
1	194,44	197,45	78,37	98,03	25,99	33,91	28,76
2	194,17	197,47	56,70	104,39	21,43	36,42	17,41
5	194,52	198,11	76,00	114,36	31,03	40,35	25,31
10	193,94	198,29	81,63	118,50	38,25	41,98	18,68
20	194,31	199,06	79,98	126,87	41,75	45,28	15,37
<b>průměr</b>	<b>198,23</b>	<b>73,58</b>	<b>101,10</b>	<b>116,03</b>	<b>33,12</b>	<b>41,01</b>	<b>19,19</b>
<b>odchylka</b>	<b>0,57</b>	<b>9,96</b>	<b>7,55</b>	<b>8,09</b>	<b>7,78</b>	<b>3,19</b>	<b>3,73</b>

Tabulka 15. Termické charakteristiky vzorku připraveného v DSC a vypočtené hodnoty krystalinity

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_{c,onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta H_{c,100\%}$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\alpha$ (%)
0,5	92,85	113,99	28,86	198,31	64,87	40,20	15,46
1	99,73	118,16	28,92	198,29	72,58	41,85	28,51
2	102,2	122,41	33,96	198,48	77,78	43,52	26,58
5	104,49	128,92	37,45	198,72	74,19	46,09	18,53
10	107,9	125,43	36,37	199,08	83,81	44,71	31,38
20	108,98	129,76	36,78	199,58	79,12	46,42	27,18
<b>průměr</b>	<b>105,89</b>	<b>126,63</b>	<b>36,14</b>	<b>198,97</b>	<b>78,73</b>	<b>45,18</b>	<b>25,92</b>
<b>odchylka</b>	<b>2,70</b>	<b>2,93</b>	<b>1,32</b>	<b>0,41</b>	<b>3,45</b>	<b>1,15</b>	<b>4,65</b>

Tabulka 16. Termické charakteristiky materiálu HME A1 a vypočtené hodnoty krystalinity

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_{c,\text{onset}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta H_{c,100\%}$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\alpha$ (%)
1	100,70	126,35	51,43	197,88	73,28	45,07	-15,54
2	109,11	131,18	61,59	198,42	76,91	46,98	-27,66
5	113,06	137,21	55,46	198,48	77,24	49,36	-8,48
10	119,55	142,86	58,11	199,82	80,20	51,58	-4,79
20	126,32	150,31	61,77	200,70	78,29	54,52	-8,00
<b>průměr</b>	<b>117,01</b>	<b>140,39</b>	<b>59,23</b>	<b>199,36</b>	<b>78,16</b>	<b>50,61</b>	<b>-12,23</b>
<b>odchylka</b>	<b>6,54</b>	<b>7,06</b>	<b>2,62</b>	<b>0,96</b>	<b>1,28</b>	<b>2,78</b>	<b>9,02</b>

Tabulka 17. Termické charakteristiky materiálu SD a vypočtené hodnoty krystalinity

$q^+$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$T_{c,\text{onset}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{m,\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta H_{c,100\%}$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\alpha$ (%)
1	106,28	123,47	49,73	197,67	73,45	44,28	-13,51
2	110,81	131,01	47,9	198,39	74,56	47,22	-1,15
5	122,07	138,45	52,41	198,41	77,54	50,12	-0,27
20	139,5	152,39	58,09	199,71	74,73	55,56	-4,05
50	142,63	163,11	55,51	200,53	79,25	59,73	13,66
<b>průměr</b>	<b>124,26</b>	<b>141,69</b>	<b>52,73</b>	<b>198,94</b>	<b>75,91</b>	<b>51,38</b>	<b>-1,07</b>
<b>odchylka</b>	<b>14,69</b>	<b>14,35</b>	<b>3,71</b>	<b>1,03</b>	<b>2,15</b>	<b>5,59</b>	<b>6,85</b>

### 3.1.6. Porovnání kinetiky krystalizace amorfního enzalutamidu připraveného dvěma metodami

K dnešnímu datu neexistuje metodologie, která by přesně predikovala krystalizaci amorfních léčiv. Součástí této disertační práce bylo studium krystalizace amorfních léčiv pomocí neizotermních experimentů, jejichž hlavním benefitem je značné urychlení vzhledem k trvání klasických izotermních experimentů. Během mého doktorského studia byl studován vliv metody přípravy amorfni API na kinetiku krystalizace. Tomuto tématu se věnuje následující publikace:

*Jana Romanová, Roman Svoboda, Iva Obadalová, Ludvík Beneš, Tomáš Pekárek, Lukáš Krejčík, Alena Komersová, Amorphous Enzalutamide – Non-isothermal recrystallization kinetics and thermal stability, Thermochemica Acta, 665, 134-141, 2018.*

Zmíněná publikace se zabývá kinetikou krystalizace formy enzalutamidu připravené na vakuové odparce (označeného jako TE, viz kapitola 3.1.2) a materiálu připraveného extruzí s pomalým chlazením (označeného jako HME A1, viz kapitola 3.1.3). Vzorek HME A1 je ve zmíněné publikaci označován jako plně amorfni, což dokládá difraktogram zobrazený v Obrázku 24A. Všechny obrázky uvedené v této kapitole budou původní obrázky z uvedené publikace, a tedy v anglickém jazyce. Na základě dalšího zkoumání bylo odhaleno, že HME A1 obsahuje krystalickou fázi, a to méně než 1 hm. % (kapitola 3.1.3). Krystalická fáze v amorfni vzorku byla stanovena pomocí ss-NMR. Vzorek TE (kapitola 3.1.2) obsahoval dle XRPD krystalickou příměs v převážně amorfni vzorku, v publikaci byl obsah krystalické fáze v TE odhadnut na základě porovnání entalpie krystalizace TE s entalpií krystalizace zdánlivě plně amorfniho materiálu na přibližně 34 hm. %. V kapitole 3.1.2 je obsah krystalické fáze v TE upřesněn na cca 17 hm. %. Oba vstupní materiály tedy obsahovaly krystalickou fázi, a to HME A1 méně než 1 hm. % a TE kolem 17 %. Obrázek 24A rovněž zobrazuje difraktogramy vzorků TE a HME A1 zakrystalizovaných v DSC. Tyto difraktogramy jsou záměrně zobrazeny přes sebe a potvrzují, že dochází ke krystalizaci do stejné polymorfni formy, tj. polymorfni formy R1. Chemická identita enzalutamidu po přípravě, a i po rekrystalizaci byla u obou vzorků potvrzena pomocí infračervené a Ramanovy spektroskopie.

Obrázek 24B zobrazuje DSC křivky připravených vzorků TE a HME A1 měřené rychlostí ohřevu  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Na základě výrazně rozdílných hodnot  $T_g$  byly pravděpodobně různou cestou přípravy připraveny dvě rozdílné amorfni fáze. Vzorek HME A1 má  $T_g$   $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  a

vzorek TE 72 °C (obě  $T_g$  byly vyhodnoceny v polovině výšky schodu v oblasti skelného přechodu). Na základě TGA-GC bylo zjištěno, že materiál TE obsahuje přibližně 0,7 hm. % acetonu. Přítomnost acetonu může způsobit plastifikaci (rozvolnění molekulární struktury díky inkluzi molekul rozpouštědla mezi řetězci API), jejímž důsledkem je snížení  $T_g$ <sup>22</sup>.

Na DSC křivkách je také vidět výrazný rozdíl v onsetu krystalizace vzorku TE a HME A1. Onset krystalizace materiálu TE, který obsahuje větší množství krystalické fáze je posunut o 20 °C níže než onset krystalizace materiálu HME A1. Tato skutečnost naznačuje, že v případě materiálu TE existuje nižší energetická bariéra pro transformaci z amorfni do krystalické fáze než v případě materiálu HME A1, což je pochopitelné z hlediska kvality vstupního materiálu (vyšší obsah krystalické fáze v případě TE). Tání krystalické fáze v obou případech odpovídá tání 100 % krystalického materiálu (oba vzorky: entalpie tání  $77,6 \pm 0,6 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ , teplota tání  $196 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ), což znamená, že během ohřevu dochází ke krystalizaci ze 100 %. Vložený obrázek v obrázku 24B znázorňuje typickou reprodukovatelnost měřených dat. Obě křivky náležící HME A1 vzorku (černá a červená křivka) byly měřeny rychlostí ohřevu  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Modrá křivka zobrazuje DSC křivku HME A1 vzorku, který byl podroben tříkrokovému cyklu tj. ohřevu rychlostí  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  na 130 °C (znázorněno modrou čárkovanou čarou), následnému okamžitému ochlazení na teplotu 10 °C a poté opět ohřevu rychlostí  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  až na 170 °C. Porovnáním entalpie původního materiálu HME A1 obsahujícího méně než 1 % krystalické fáze s entalpií vzorku po ohřátí na 130 °C, bylo zjištěno, že tímto ohřevem došlo k přeměně 25 % amorfniho vzorku na krystalickou fázi. Nicméně onset krystalizace zůstal i po této změně na stejné pozici jako u čerstvě připraveného materiálu, přičemž kinetika krystalizace byla pouze jemně pozměněna. Tato skutečnost znamená, že takový rozdíl mezi TE a HME nemůže být způsoben pouze jen přítomností krystalické fáze.

Kinetika krystalizace obou šarží enzalutamidu byla studována různými rychlostmi ohřevu v DSC. Na Obrázcích 24C a D jsou uvedeny DSC křivky zobrazující krystalizační chování materiálu HME A1 a TE. Uvedené DSC křivky byly měřeny následujícími rychlostmi ohřevu: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 30 a  $50 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Na zmíněných obrázcích je prokazatelně vidět rozdíl v pozici krystalizačního píku u HME A1 a TE, přičemž v obou grafech má x-ová osa stejný rozsah. U obou materiálů (HME A1, TE) se tvar krystalizačního píku mění stejným způsobem, tj. při vyšších rychlostech ohřevu je na DSC křivkách téměř symetrický krystalizační pík, avšak u nízkých rychlostí ohřevu vykazuje tento pík negativní

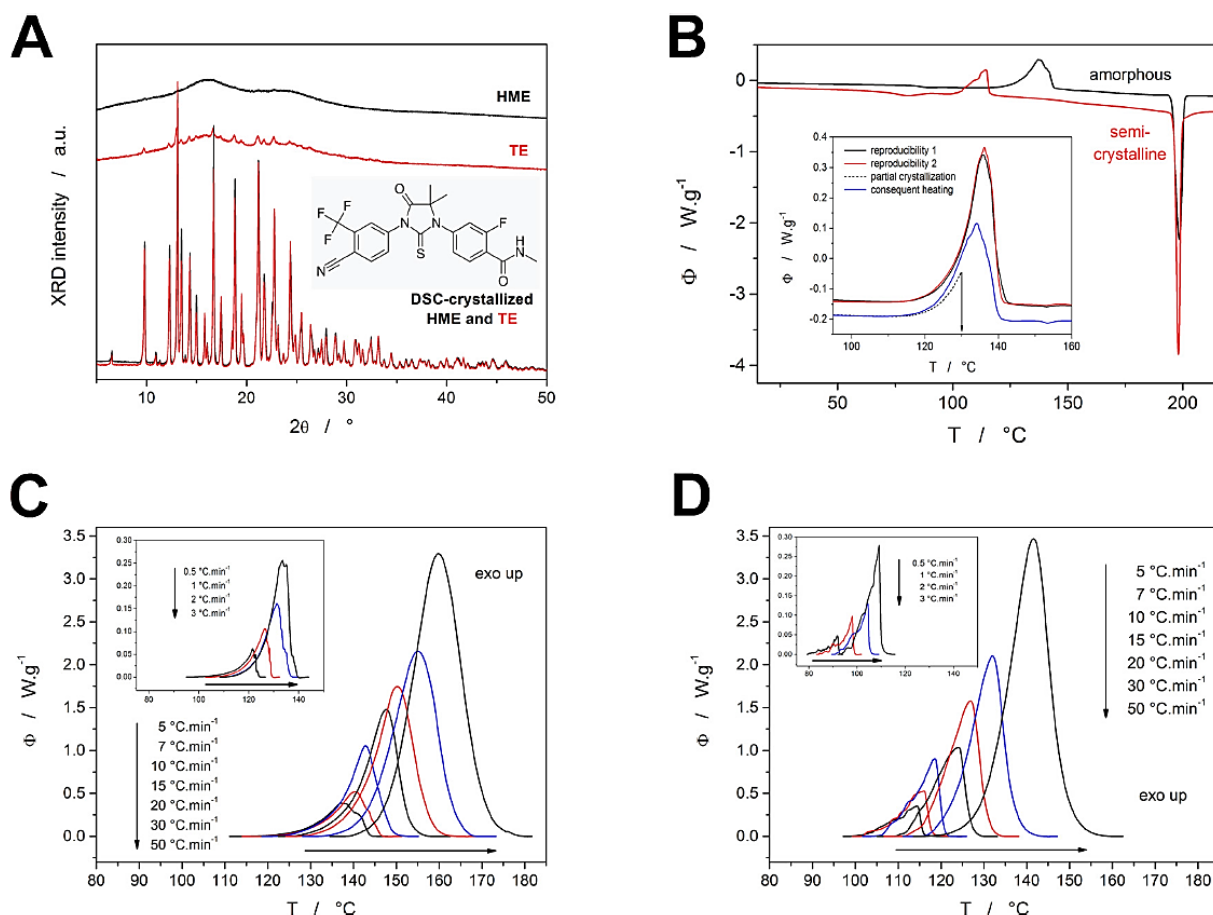
asymetrii (pík je nakloněný k vyšším teplotám). K popisu krystalizace byla použita DSC rovnice (kapitola 1.7.1, rovnice 8). Prvním krokem nutným k vyčíslení této rovnice je stanovení aktivační energie krystalizace. Ke stanovení aktivační energie krystalizace byla použita Kissingerova metoda (kapitola 1.7.1, rovnice 9) a metoda Kissinger-Akahira-Sunose (kapitola 1.7.1, rovnice 10)<sup>81,105</sup>. Obrázek 25A zobrazuje vyhodnocení Kissingerovy metody (černá část grafu) a výsledky obou metod (červená část grafu). Černé body (plné i prázdné) zobrazují Kissingerovu závislost pro materiál TE (černé plné body) a materiál HME A1 (prázdné černé body). Obě závislosti jsou lineární a vedou k relativně přesným hodnotám energie ( $E^{\text{HME}} = 163 \pm 5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $E^{\text{TE}} = 115 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), které jsou v Obrázku 25A znázorněny červenou čárkovanou čarou. V červené části grafu jsou znázorněny výsledky obou metod, jak již bylo uvedeno, červená čárkovaná čára znázorňuje hodnotu energie pro TE a HME A1 získanou z Kissingerovy metody. Červené body uvádějí výsledky energií v závislosti na stupni konverze získané z izokonverzní metody Kissinger-Akahira-Sunose (KAS). Výsledky KAS metody jsou ve shodě s výsledky Kissingerovy metody, rozdíl je kolem  $10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Druhým parametrem DSC rovnice, který musí být vyčíslen je entalpie krystalizace. Obrázek 25B zobrazuje hodnoty entalpií krystalizace v závislosti na aplikované rychlosti ohřevu. Vývoj entalpie s rychlostí ohřevu může být důsledkem závislosti tepelné kapacity na teplotě v Kirchhoffově zákoně. Druhým možným vysvětlením pro masivně klesající entalpii s klesající rychlostí ohřevu je existence dvou krystalizačních procesů, které jsou kompetitivní. Avšak v takovém případě by se výrazně měnila energie krystalizace s konverzí, což nebylo patrné ze závislosti energie na stupni přeměny (Obrázek 25 A). Jiným vysvětlením by mohla být také kompetice nukleačních mechanismů, což by nezpůsobilo výrazné změny v aktivační energii.

Posledním krokem kinetické analýzy je volba kinetického modelu a stanovení jeho parametrů. Tato část byla provedena pomocí multivariační kinetické analýzy (MKA). Byly použity dva kinetické modely, které jsou považovány za velmi flexibilní. Tyto modely jsou založeny na autokatalýze a jsou to Šesták-Berggrenův (označený jako AC, viz kapitola 1.7.1) model a autokatalytický model n-tého řádu (označený jako NC model, viz kapitola 1.7.1).

Jelikož se uvedená data mění s rychlostí ohřevu, byla každá DSC křivka fitována zvlášť s fixní hodnotou aktivační energie procesu. Byla použita hodnota  $E$  stanovená na základě Kissingerovy metody (energie stanovená při maximální rychlosti konverze). Stanovené kinetické parametry obou modelů u obou materiálů (index  $a$  znamená amorfní a označuje

materiál HME A1, index  $s$  znamená semi-krystalický a označuje TE) jsou uvedeny v Obrázku 25C–D. Reakční řád (označený u AC modelu jako  $N$  a u NC modelu jako  $n$ ) se u obou modelů mění s rychlostí ohřevu stejným způsobem, tj. roste s rychlostí ohřevu. Stejně trendy obdržené u parametrů  $N$  a  $n$  jen potvrzují vhodnost autokatalytických modelů pro popis tohoto typu kinetických dat. Pro predikci krystalizace je vhodnější AC model, neboť jak je vidět z Obrázku 25C, autokatalytický exponent  $M$  je nezávislý na rychlosti ohřevu. V takovém případě je nutná pouze extrapolace závislosti  $N-q^+$  na hodnotu při nulové rychlosti ohřevu, která by měla odpovídat reálným izotermním podmínkám. Model  $NC$  je pro predikční výpočty spíše nevhodný, neboť se oba parametry ( $n$ ,  $K$ ) mění v závislosti na rychlosti ohřevu a musela by se provést extrapolace obou parametrů, což by mohlo do výpočtu zanést značné chyby.

Korelační koeficienty získané během multivariační kinetické analýzy jsou zobrazeny na Obrázcích 25E a F jako závislost na rychlosti ohřevu. Výraz  $(1-r^2)$  je použit s cílem zdůraznit rozdíl ve vysokých hodnotách korelačního koeficientu  $r^2$ . Pokles  $r^2$  u nižších rychlostí ohřevu je způsoben značným rozptylem DSC dat. Data obdržená u nižších rychlostí ohřevu jsou blízka kinetice 0. řádu, což potvrzují hodnoty řádu reakce (parametry  $n$  a  $N$ ) zobrazené v Obrázku 25C. Kinetika 0. řádu charakterizuje růst kontinuální a jednotné vrstvy na povrchu materiálu, která roste směrem dovnitř. Takový typ růstu krystalů závisí značně na kvalitě povrchu. Příprava amorfni formy odpařením rozpouštědla je známá tím, že vede ke značně rozvolněné amorfni struktuře na rozdíl od metody extruze<sup>106</sup>, což bylo potvrzeno i v předložené studii chování enzalutamidu. Taková rozvolněná struktura je pak přirozeně více aktivní a nestabilní, což vede k dřívější nukleaci a růstu krystalů v případě TE.

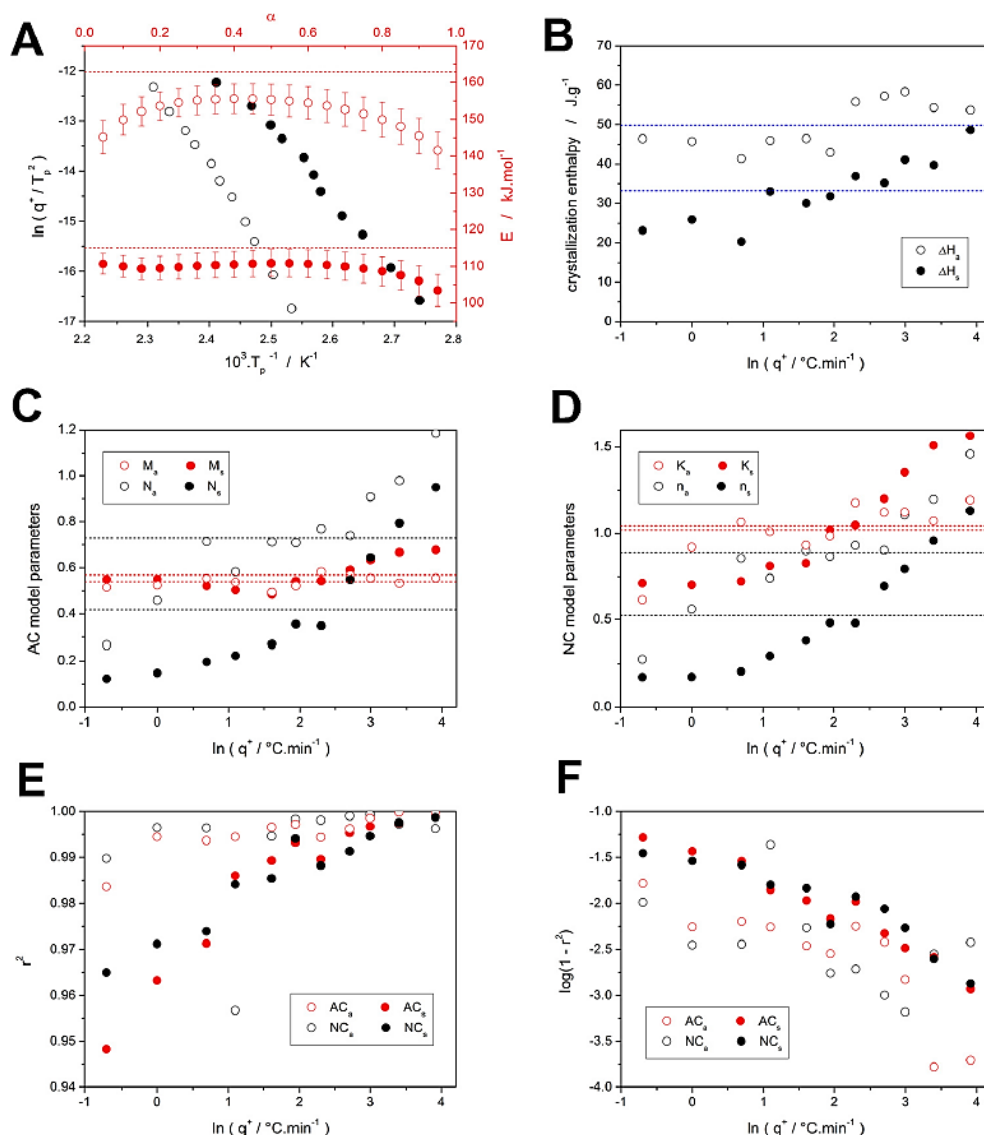


Obrázek 24. A. Difraktogramy připravených vzorků HME (černá) a TE (červená) a stejných vzorků zakrytalizovaných v DSC. Difraktogramy zakrytalizovaných vzorků jsou záměrně překryty, aby bylo vidět jejich shodu.

B. Typické DSC křivky obou šarží připravených materiálů (HME-černá, TE-červená). DSC křivky byly měřeny rychlostí ohřevu  $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vložený obrázek zobrazuje dva reprodukováná měření vzorku HME realizovaná rychlostí ohřevu  $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (černá a červená křivka) a tří-krokový experiment, kdy byl vzorek HME zahříván rychlostí  $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (modrá čárkovaná křivka) na  $130\text{ }^\circ\text{C}$  a poté byl okamžitě ochlazen na  $10\text{ }^\circ\text{C}$  a opět zahříván  $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  na  $170\text{ }^\circ\text{C}$  (modrá křivka). Exotermní efekty jsou vyznačeny ve směru nahoru v ose y.

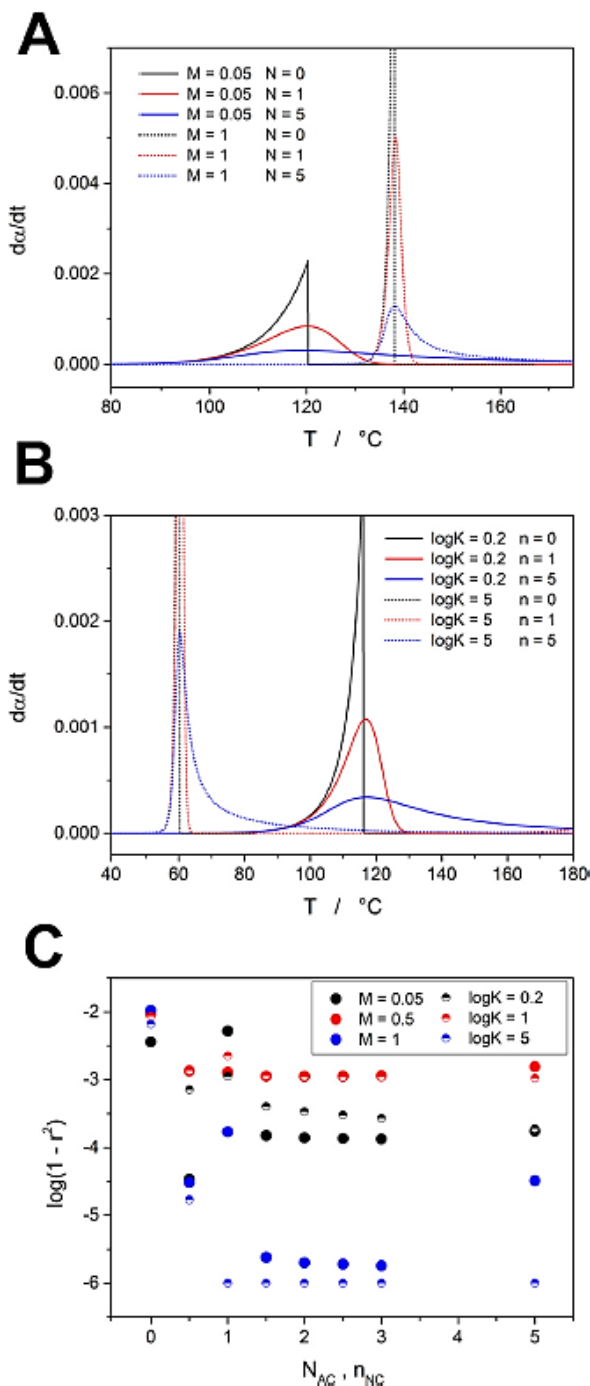
C. Set kinetických dat (DSC křivky po odečtu termokinetického pozadí, k odečtu byla použita tangenciální plošně–proporční základní linie) pro materiál HME. Exotermní efekty jsou vyznačeny ve směru nahoru v ose y.

D. Set kinetických dat (DSC křivky po odečtu termokinetického pozadí, k odečtu byla použita tangenciální plošně–proporční základní linie) pro materiál TE. Exotermní efekty jsou vyznačeny ve směru nahoru v ose y.



Obrázek 25. A. Kissingerova závislost pro enzalutamid šarže HME (černé prázdné body) a TE (černé plné body) – data patří k levé (y-ová) a spodní ose (x-ová). Červené body (patřící k horní x-ové ose a pravé y-ové ose) zobrazují závislost  $E-\alpha$  stanovené na základě KAS metody. Červené čárkované linie zobrazují hodnotu aktivační energie stanovenou na základě Kissingerovy metody/závislosti. U bodů, u kterých nejsou zobrazeny chybové úsečky, tam je jejich rozsah nižší než velikost bodu. B. Krystalizační entalpie odpovídající dvou šaržím enzalutamidu (index  $a$ –amorfní označuje HME A1, index  $s$ –semikrystalický označuje TE) zobrazené v závislosti na rychlosti ohřevu. Modré linie odpovídají průměrné hodnotě entalpií krystalizace. Chybové úsečky jsou nižší než velikost bodu. C. Kinetické exponenty AC (Šesták–Berggrenova) modelu odpovídající dvou šaržím enzalutamidu (index  $a$ –amorfní označuje HME A1, index  $s$ –semikrystalický označuje TE), které byly stanoveny multivariační kinetickou analýzou s fixní hodnotou energie. Čárkované linie odpovídají hodnotám stanoveným simultánní nelineární optimalizací parametrů 11-sti DSC křivek. Chybové úsečky jsou menší než velikost bodu. D. Kinetické exponenty NC modelu odpovídající dvou šaržím enzalutamidu (index  $a$ –amorfní označuje HME A1, index  $s$ –semikrystalický označuje TE), které byly stanoveny multivariační kinetickou analýzou s fixní hodnotou energie. Čárkované linie odpovídají hodnotám stanoveným simultánní nelineární optimalizací parametrů 11-sti DSC křivek. Chybové úsečky jsou menší než velikost bodu. E a F. Korelační koeficienty obdržené během MKA optimalizace křivky po křivce. Použitými kinetickými modely byl AC a NC model. Graf F zobrazuje korelační koeficient v upravené formě.

Obrázek 26 uvádí výsledky kinetické analýzy. Nicméně za účelem vypracování spolehlivé predikce je však nutno ověřit flexibilitu obou modelů a určit parametry pro správnou predikci. S cílem ověřit vzájemnou flexibilitu obou modelů byly provedeny teoretické simulace. Byly nasimulovány dvě sady dat, každá z nich obsahovala 18 kinetických



píků simulovaných pro různé kombinace kinetických parametrů. První sada dat obsahovala píky nasimulované na základě AC modelu, fixní hodnoty  $E = 163 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log(A/\text{s}^{-1}) = 19$  a kombinace následujících parametrů –  $M$ : 0,05; 0,5 a 1;  $N$ : 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a 5. Druhá sada dat obsahovala píky nasimulované na základě NC modelu,  $E = 163 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log(A/\text{s}^{-1}) = 19$  a kombinace následujících parametrů –  $\log K$ : 0,2; 1 a 5;  $n$ : 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a 5. Data odpovídající hraničním kombinacím uvedených parametrů jsou zobrazeny v Obrázku 26A, B. Data pro každou sadu zvlášť byla fitována opačným kinetickým modelem než pro který byla nasimulována. Výsledná kvalita fitů je vyjádřena formou korelačních koeficientů a je zobrazena v Obrázku 26C. Výsledky potvrzující, že oba kinetické modely jsou jedinečné a nemohou být volně zaměněny. Jinak by se kinetické predikce mohly lišit s ohledem na volbu kinetického modelu, což je demonstrováno v Obrázku 27.

Obrázek 26. A. Teoreticky simulovaná data pro  $E = 163 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log(A/\text{s}^{-1}) = 19$  a zobrazené parametry AC modelu. B. Teoreticky simulovaná data pro  $E = 163 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log(A/\text{s}^{-1}) = 19$  a zobrazené parametry NC modelu. C. Korelační koeficienty koeficienty obdženy na základě fitu simulovaných dat opačným modelem. Teoretická data odpovídající AC modelu byly fitovány NC modelem a naopak.

Obrázek 27 zobrazuje vývoj krystalinity (v %) v závislosti na čase. Predikce byly simulovány pro TE a HME A1 na základě parametrů získaných rychlostí ohřevu 0,5 a 50 °C·min<sup>-1</sup>. V Obrázku 27 jsou zobrazeny predikce na základě obou modelů, AC i NC a to pro teplotu 35, 50 a 100 °C. Je vidět, že se predikce liší v závislosti na použitém kinetickém modelu, ale i na volbě experimentálních podmínek.

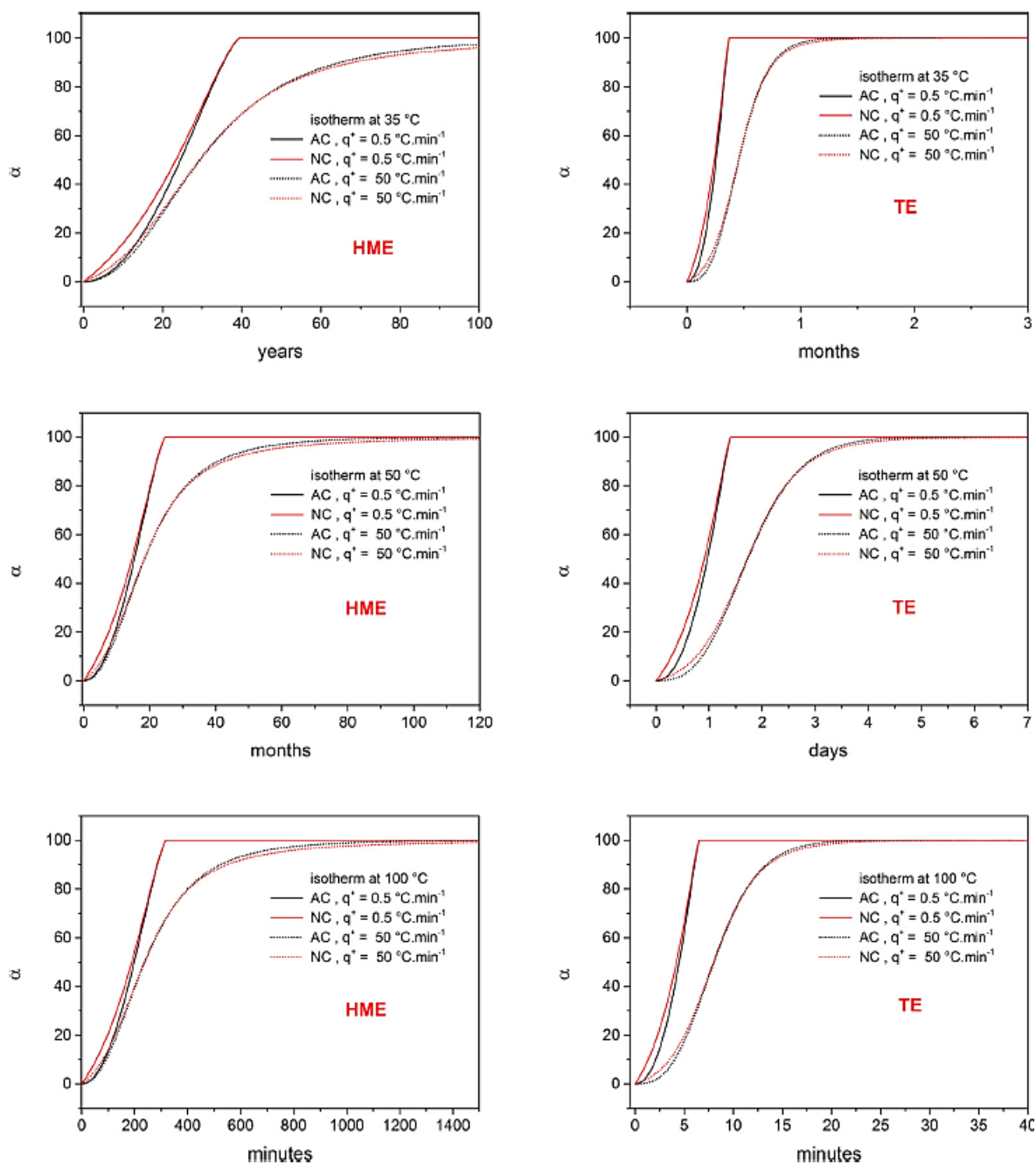
Z této studie vyplynuly následující zásady pro správnou predikci krystalizace:

1. Je důležité znát počáteční stav zkoumaného amorfního materiálu (morfologii, kvalitu amorfního materiálu), který může mít dopad až několik řádů v predikované hodnotě  $\alpha$ .
2. Je důležité zvolit nejvhodnější sadu parametrů pro simulaci, což je vidět z rozdílů predikcí na základě parametrů stanovených z DSC křivky měřené rychlostí ohřevu 0,5 °C·min<sup>-1</sup> vs 50 °C·min<sup>-1</sup>. V tomto případě je nejvhodnější použít hodnoty získané na základě nejnižší rychlosti ohřevu (0,5 °C·min<sup>-1</sup>), neboť tato rychlost je nejbližší podmínkám izotermních experimentů.
3. Třetím důležitým faktorem je volba kinetického modelu. Odchytky v krystalinitě predikované na základě obou modelů se snižují s rostoucí krystalinitou. Avšak v případě stability amorfních léčiv je velmi důležitý počátek krystalizace, tedy první % krystalinity. Správná volba kinetického modelu je tedy klíčová.

Vliv těchto faktorů na správnou predikci klesá v následujícím pořadí:

Vliv kvality amorfního materiálu (morfologie atd.) → extrapolace parametrů na nejvhodnější experimentální podmínky → správná volba kinetického modelu

Teoretické predikce byly ověřeny na základě izotermních experimentů viz. publikovaná práce.



Obrázek 27. Predikce krystalizačního chování ezalutamidu (vyjádřená jako stupeň konverze v závislosti na čase) na základě kinetických parametrů získaných pro HME A1 a TE z DSC křivek změřených rychlostí ohřevu 0,5 a 50 °C·min<sup>-1</sup>. Predikce byly provedeny s použitím modelů AC a NC. Každý řádek grafu odpovídá jedné izotermní teplotě (35, 50 a 100 °C), v levém sloupci jsou uvedeny výsledky pro HME A1 a v pravém sloupci pro TE.

### 3.1.7. Porovnání kinetiky krystalizace amorfního enzalutamidu s různou velikostí částic

V rámci této disertační práce byl studován vliv metody přípravy amorfního enzalutamidu, i vliv velikosti částic na kinetiku krystalizace. Tato problematika je popsána v publikovaném článku:

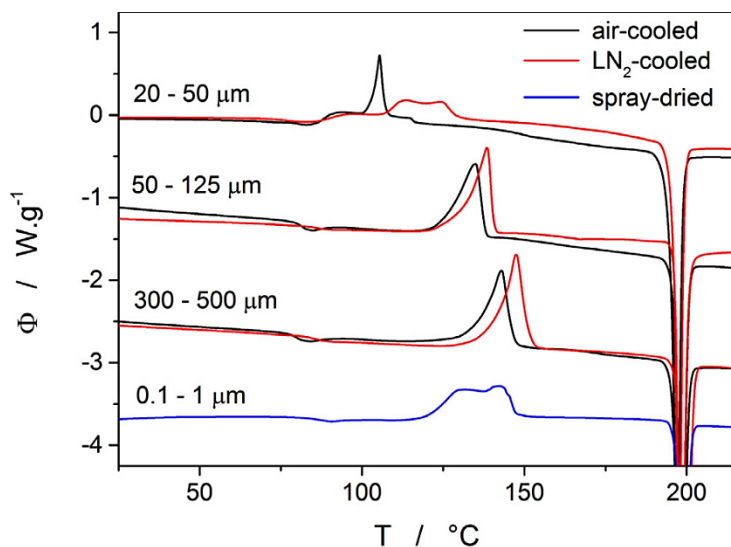
*Svoboda, R.; Romanová, J.; Šlang, S.; Obadalová, I.; Komersová, A. Influence of Particle Size and Manufacturing Conditions on the Recrystallization of Amorphous Enzalutamide. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 153, 105468. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105468>.*

V rámci uvedené publikace byla studována kinetika krystalizace amorfního enzalutamidu připraveného extruzí s pomalým chlazením (materiál označovaný v této disertační práci jako HME A1 a v publikaci jako air-cooled HME) a rychlým chlazením (materiál označovaný v této disertační práci jako HME B1 a v publikaci jako LN<sub>2</sub>-cooled HME) s ohledem na velikost částic. Extrudované materiály byly rozděleny na frakce obsahující částice v následujícím rozmezí velikostí: 20–50, 50–125, 300–500 μm. Kinetika krystalizace těchto materiálů byla porovnávána s materiálem připraveným sprejovým sušením (SD) o velikosti částic 0,1–1 μm. Všechny obrázky uvedené v této kapitole budou původní obrázky z publikace, a tedy v anglickém jazyce. Obrázek 28 zobrazuje příklady DSC křivek zkoumaných materiálů (viz výše), které byly měřeny rychlostí ohřevu 10 °C·min<sup>-1</sup>. Z uvedených křivek je patrné, že velikost částic nemá vliv na teplotu skelného přechodu, nicméně metoda přípravy určitý vliv má. Materiály připravené extruzí s nižší rychlostí chlazení (chlazení na teplotu vzduchu) mají  $T_g$  kolem 80 °C, zatímco materiály připravené vyšší rychlostí chlazení (chlazení kapalným dusíkem) a sprejovým sušením mají o něco vyšší teplotu skelného přechodu tj. 85 °C. Vyšší hodnota  $T_g$  u HME B1 a SD je způsobena dřívějším odchýlením od rovnovážné křivky podchlazené kapaliny, tzn. materiál zůstal ve více neuspořádaném stavu než v případě pomalého chlazení, kdy mají atomy delší čas na přeuspořádání. Srovnatelná hodnota  $T_g$  sprejově sušeného materiálu s extrudovaným materiálem je důkazem toho, že došlo k úspěšnému odstranění rozpouštědla a nedošlo k plastifikaci (snížení  $T_g$  materiálu vlivem inkluze molekul rozpouštědla mezi molekulami materiálu). Druhým efektem na DSC křivce po skelném přechodu je exotermní krystalizace, která může být ovlivněna velikostí částic a jejich morfologií. Obecně může růst krystalů začít ze tří typů krystalizačních center: 1. nukleí vytvořených během tvorby amorfní fáze, 2. nukleí

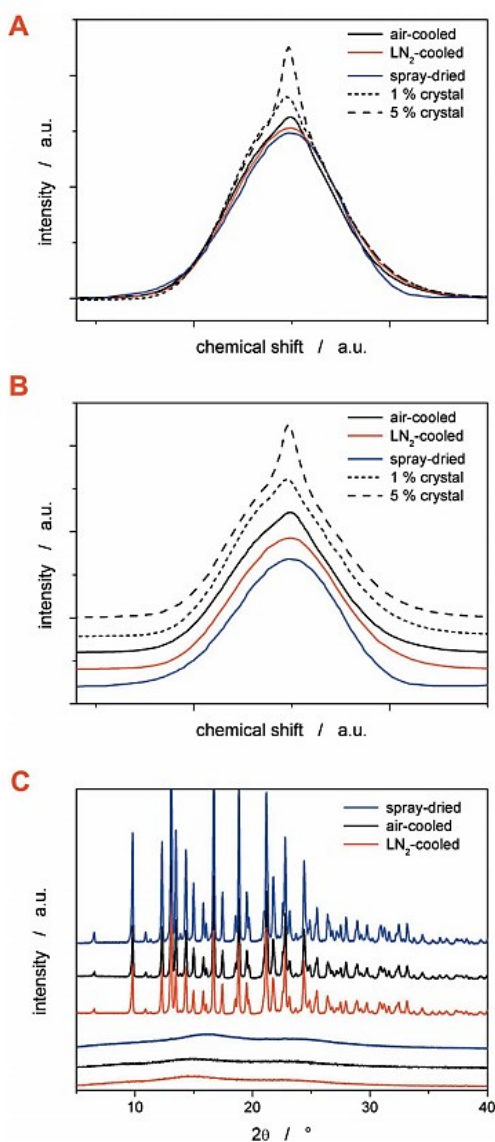
vzniklých na rovném povrchu vlivem ohřevu materiálu, 3. z nukleí vytvořených vlivem ohřevu na defektech vytvořených mikronizací. Defekty jsou zde označena amorfni místa s vyšší energií, jako jsou mikrotrhliny, ostré hrany, vnitřní pnutí materiálu atd. Z Obrázku 28 je vidět, že větší extrudované částice mají jednoduchou krystalizaci charakterizovanou jedním krystalizačním píkem. S klesající velikostí částic se onset krystalizačního píku posouvá k nižším teplotám a zvyšuje se jeho složitost. V případě nejmenších částic je onset krystalizace v bezprostřední blízkosti skelného přechodu. Klíčovou rolu v krystalizačním procesu hrají především mechanické defekty, jak již bylo ukázáno v kapitole 3.1.1. Zde zmiňovaná publikace dokládá vliv mechanického stresu na krystalizaci. Nejvyšší množství mechanických defektů se pravděpodobně nachází na povrchu nejmenších částic (frakce 20–50  $\mu\text{m}$ ). Tato skutečnost vede k urychlení růstu krystalů a rovněž vzniku krystalů různé morfologie, jak bude ukázáno na SEM snímcích. V Obrázku 28 je zobrazena také DSC křivka sprejově sušeného materiálu. I přesto, že má sprejově sušený materiál daleko menší částice než nejnižší frakce extrudovaného materiálu, je poloha jejich onsetů krystalizace srovnatelná. To pouze dokládá, že v případě krystalizace amorfniho enzalutamidu jsou mechanicky vytvořené defekty důležité pro iniciaci nukleace a růstu krystalů. U tohoto sprejovaného materiálu je krystalizace složitější, neboť u něj existuje také určitá dávka mechanického stresu, která do něj byla vnesena síťováním. Materiál byl stále zcela amorfni, ale jeho původní dokonale hladký povrch byl narušen. Sprejově sušený materiál, který nebyl podroben síťování, vykazuje vždy jednoduchý krystalizační pík u teploty krystalizace blízké extrudovanému materiálu s největšími částicemi. Toto je uvedeno v kapitole 3.1.4.

Amorfni charakter připravených enzalutamidů byl studován ss-NMR a bylo potvrzeno, že materiály SD a HME B1 jsou zcela amorfni, zatímco materiál HME A1 obsahuje méně než 1 % krystalické fáze. Spektra jsou zobrazena na Obrázcích 29A, B. Zároveň bylo prostřednictvím XRPD potvrzeno, že všechny připravené šarže krystalizují do stejné polymorfni formy, a to polymorfni formy R1. Difraktogramy připravených vzorků a vzorků zakrystalizovaných v DSC jsou zobrazeny v Obrázku 30C. Amorfni enzalutamid krystalizuje na povrchu, což bylo doloženo SEM snímky. U menších velikostí extrudovaných částic byly nalezeny krystaly ve formě destiček či jehliček. U větších extrudovaných částic byl nalezen lamelární růst krystalů směrem z povrchu dovnitř. Částice sprejově sušeného materiálu krystalizují ve formě kvádrů. Snímky těchto materiálů jsou uvedeny v dané publikaci.

Cílem publikace bylo identifikovat iniciační faktor nukleace a následného růstu, čímž jsou mechanické defekty. K demonstraci vlivu tohoto efektu byla provedena kinetická analýza všech frakcí materiálů.

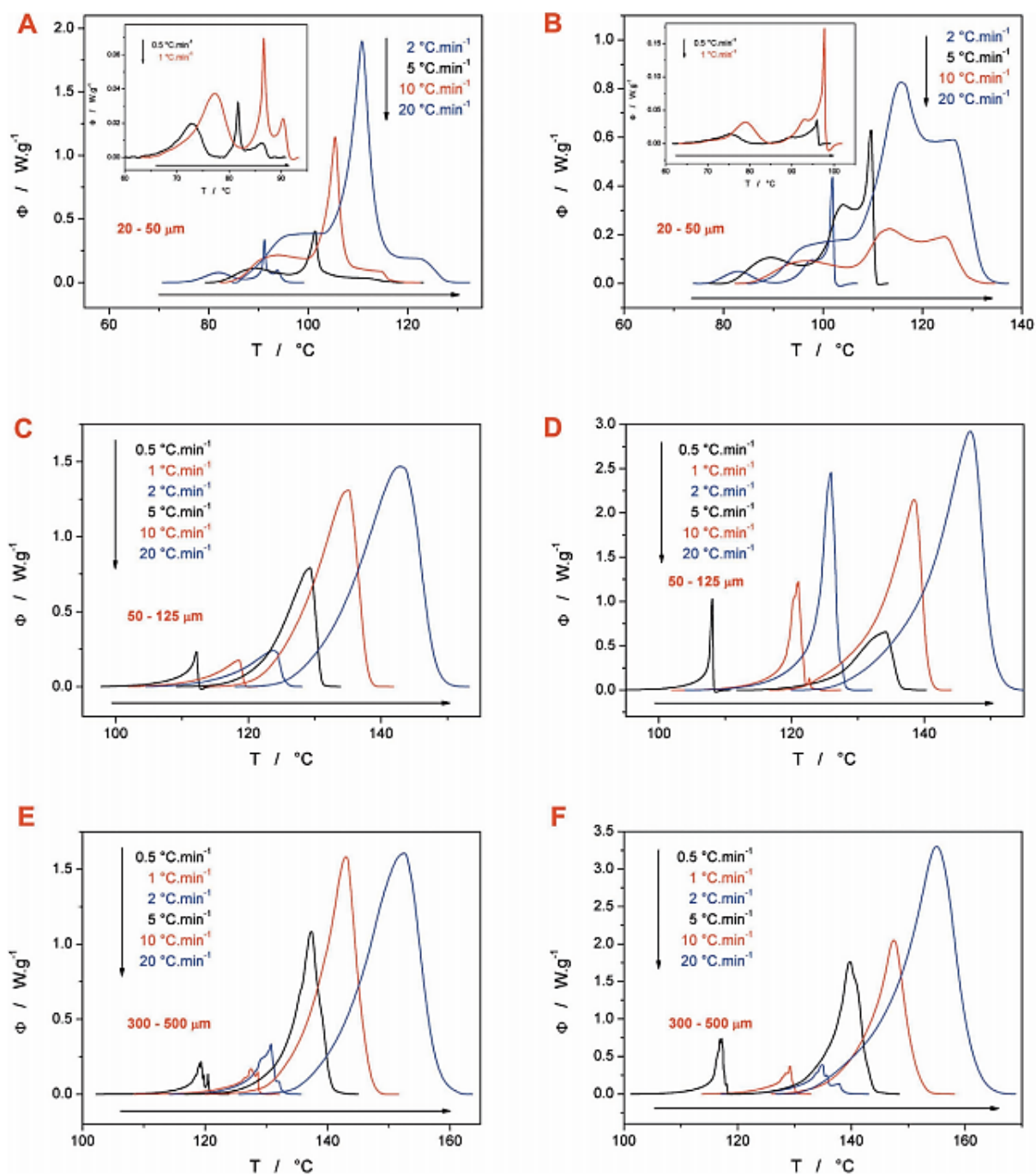


Obrázek 28. DSC křivky materiálu HME A1 (černé křivky), HME B1 (červené křivky), SD (modrá křivka) měřené rychlostí  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Rozměry velikostí částic je uvedeno vždy nad danými DSC křivkami.



Obrázek 29. A., B. ss-NMR spektra materiálu HME A1, HME B1 a SD spolu se spektry materiálu obsahujících známé množství krystalické fáze tj. 1, 5 %. Spektra v obrázku B byla posunuta. Obrázek C obsahuje difraktogramy připravených vzorků HME A1, HME B1 a SD a stejných vzorků zakrystalizovaných v DSC. Difraktogramy potvrzují, že dochází ke krystalizaci do polymorfni formy R1.

V Obrázku 30 jsou zobrazeny DSC křivky extrudovaných materiálů změřené různými rychlostmi ohřevu. Krystalizační chování (spojené s tvarem krystalizačního píku) se výrazně mění s rychlostí ohřevu  $q^+$ . Pro frakce 300–500  $\mu\text{m}$ , klesající rychlost ohřevu vede k prodloužení náběhové hrany krystalizace (prodloužení onsetu), přičemž po dosažení maxima krystalizace dojde k ostrému poklesu krystalizačního signálu. Toto jsou typické rysy (autokatalyzované) kinetiky 0. řádu, která je obvyklá pro organická skla (amorfní API). Při vyšších rychlostech ohřevu přechází kinetika 0.řádu na tzv. nukleačně–růstový kinetický model. V případě frakce nižších velikostí částic je krystalizační chování složitější. První krystalizační pík odpovídá JMA (Johnson–Mehl–Avrami) kinetice (viz kapitola 1.7.1). Klesající rychlost ohřevu vede k separaci prvního krystalizačního píku, která se děje díky rozdílu v aktivačních energiích probíhajících subprocesů. Tyto sady DSC křivek byly vyhodnocovány ve smyslu kinetické analýzy.



Obrázek 30. DSC křivky odpovídající amorfnímu enzalutamidu HME A1 (obrázek A, C, E) a HME B1 (obrázek B, D a F). Exotermní efekty na těchto DSC křivkách probíhají směrem nahoru. Šipky a barvy označují DSC křivky ve směru rostoucí rychlosti ohřevu. Obrázek A a B zobrazuje data pro frakce o velikosti částic 20–50  $\mu\text{m}$ , obrázek C a D zobrazuje data pro frakce 50–125  $\mu\text{m}$ , obrázek E a F zobrazuje data pro

V Tabulce 18 jsou zobrazeny výsledky kinetické analýzy. Jsou zde uvedeny hodnoty zdánlivé aktivační energie stanovené na základě Kissingerovy metody a další kinetické parametry získané proložením DSC křivky měřené rychlostí ohřevu  $0,5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Více informací k jednotlivým výsledkům je uvedeno ve zmiňované publikaci. Nejdůležitější informací ze standardní kinetické analýzy je hodnota zdánlivé aktivační energie. Výrazně nejvyšší aktivační energii krystalizace má amorfni enzalutamid připravený sprejovým sušením. Tento amorfni enzalutamid se dá pokládat za nejstabilnější, což lze dovodit i z polohy krystalizačního píku, který se nachází u vyšších teplot v porovnání s frakcí extrudovaného materiálu s velikostí částic 20–50  $\mu\text{m}$ . Termická stabilita skla je z kinetického pohledu řízena zdánlivou aktivační energií a preexponenciálním faktorem. Preexponenciální faktor udává polohu krystalizačního píku na měřené DSC křivce. Z praktického hlediska je pro stabilitu amorfni API důležitá pozice krystalizačního píku na DSC křivce při nízké rychlosti ohřevu.

Tabulka 18. Výsledky kinetické analýzy. Zdánlivá aktivační energie byla stanovena na základě klasické Kissingerovy metody. Další kinetické parametry byly získány na základě fitování DSC křivky změřené rychlostí ohřevu  $0,5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , přičemž u frakce 20–50  $\mu\text{m}$  byl vyhodnocován pouze první krystalizační pík. Použitým kinetickým modelem byl Šesták–Berggrenův model, jehož vhodnost byla ověřena v článku uvedeném v kapitole 3.1.6.

Označení	HME A1			HME B1			SD
d ( $\mu\text{m}$ )	20–50	50–125	300–500	20–50	50–125	300–500	0,1–1
E (kJ/mol)	163,1	159,8	162,6	144,7	133,2	139,5	187,0
log(A/s)	22,28	19,06	19,26	19,21	15,87	16,13	24,26
M	0,612	0,538	0,757	0,530	0,791	0,701	0,568
N	0,727	0	0	0,797	0	0	1

Na základě kinetických parametrů stanovených metodami multivariační kinetické analýzy byla simulována izotermní krystalizace zkoumaných materiálů. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.1.6, přesnost predikce ( $\alpha$ -t) závisí na správné volbě kinetických parametrů, které by zejména měly přesně popisovat počátek (náběh) krystalizace. Jak bylo zjištěno, přesná predikce by měla být založena na DSC datech získaných co nejnižší rychlostí ohřevu, která se nejvíce blíží izotermním podmínkám. Obrázky 31A–D zobrazují predikci krystalizace zkoumaných materiálů při teplotě 50 a 100  $^\circ\text{C}$ . V případě frakce 20–50  $\mu\text{m}$  je predikce stanovena pouze na základě kinetických parametrů odpovídajících prvnímu krystalizačnímu

píku. Ze zobrazených predikcí vyplývá výrazný vliv velikosti částic a přítomnosti či absence mechanicky indukovaných defektů na termickou stabilitu amorfního enzalutamidu. Z predikcí vyplývá, že nejméně stabilní jsou částice o velikosti 20–50  $\mu\text{m}$ . Navíc, materiál HME B1 je zjevně méně stabilnější než materiál HME A1, což je překvapivý výsledek, neboť při pomalém chlazení taveniny zpravidla vzniká vyšší množství nukleí a zároveň HME A1 po přípravě obsahoval již méně než 1 % krystalické fáze. Překvapivý výsledek (vyšší stabilita HME A1 v porovnání HME B1) může být vysvětlen přítomností objemových krystalitů, jejichž existence byla u větších částic potvrzena na základě SEM snímků (viz publikace). DSC křivky měřené vyšší rychlostí ohřevu naznačovaly opačný výsledek (vyšší stabilitu HME B1), takže toto opět dokládá důležitost správné volby kinetických parametrů a posuzování stability na základě DSC křivek získaných nízkou rychlostí ohřevu. Tato studie potvrdila následující: krystalizační rychlost je primárně řízena mechanicky indukovanými defekty. Vyplývá to z faktu, že sprejově sušený materiál o velikosti 0,1–1  $\mu\text{m}$  je daleko stabilnější než extrudovaný materiál o velikosti částic 20–50  $\mu\text{m}$ .

Krystalizační kinetika závisí na velikosti částic, jak bylo demonstrováno u extrudovaného materiálu. Z tohoto důvodu byla zkoumána možnost kombinace predikcí náležící jednotlivým frakcím (Obrázek 31A–D) s cílem popsat krystalizační signál nerozsítovaného materiálu. V první řadě byl proveden izotermní experiment při teplotě 100 °C pro nerozsítovaný materiál šarže HME A1. DSC záznam je zobrazen jako vložený Obrázek v Obrázku 31F, přičemž závislost  $\alpha$ – $t$  pro tento experiment (černá křivka) je zobrazena v hlavním Obrázku 31F. Cílem bylo popsat experimentální data použitím predikcí. V první aproximaci (29) byly použity hodnoty z predikcí vypočtených na základě neizotermních experimentů (pro frakce 20–50, 50–125, 300–500  $\mu\text{m}$ ), proměnnou veličinou byl váhový koeficient (zastoupení jednotlivých frakcí):

$$\alpha_{exp} = \sum w_i \cdot \alpha_{pi} \quad (29)$$

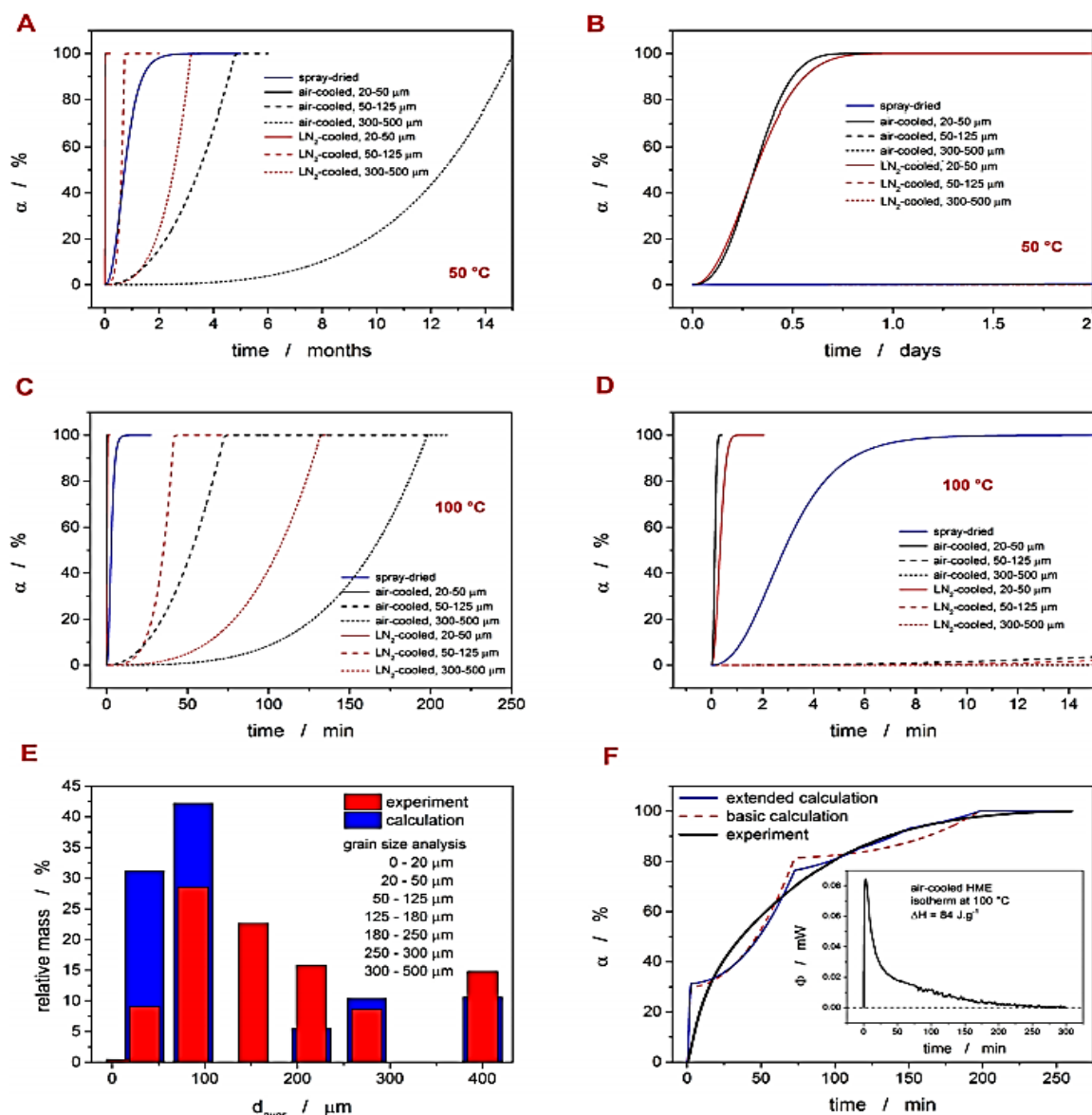
$$\sum w_i = 1 \quad (30)$$

kde  $\alpha_{exp}$  představuje experimentálně stanovenou krystalinitu,  $\alpha_{pi}$  jsou jednotlivé teoretické predikce pro průměrnou hodnotu velikosti částic v dané frakci,  $w_i$  je váhový koeficient. Výsledek nejlepšího proložení je zobrazen v Obrázku 31F jako červená čárkovaná čára. Poté byla provedena druhá aproximace (31), byly přidány predikce pro další frakce velikostí částic: 125–180, 180–250, 250–300  $\mu\text{m}$ . Predikce byly vypočteny na základě interpolace kinetických parametrů obdržných pro hraniční hodnoty (50–125 a 300–500  $\mu\text{m}$ ):

$$P_i = \frac{k_i}{4} \cdot (P_{300-500} - P_{50-125}) + P_{50-125} \quad (31)$$

kde  $P_i$  je hodnota kinetických parametrů (E, A, M nebo N) pro každou frakci,  $P_{300-500}$  a  $P_{50-125}$  jsou hodnoty parametrů pro frakce o velikosti částic uvedené v dolním indexu a  $k_i$  je 1, 2 a 3 pro frakce 125–180, 180–250 a 250–300  $\mu\text{m}$ . Proložení odpovídající zohlednění i těchto frakcí je zobrazeno v Obrázku 31F jako modrá čára. U šarže HME A1 bylo síťovou analýzou stanoveno rozložení částic v podobě frakcí uvedené v Obrázku 31E (červené sloupce). Na základě proložení dat bylo teoreticky vypočteno rozložení částic, které je v Obrázku 31E znázorněno v podobě modrých sloupců. Experimentální a teoretické hodnoty byly srovnány a největší odchylky byly nalezeny u frakcí s nižší velikostí částic tj. 20–50, 50–125 a 125–180  $\mu\text{m}$ . Hlavním důvodem těchto odchylek bylo, že mají experimentální data konkávní tvar a jsou prokládány konvexními predikcemi. Konvexní tvar predikcí vyplývá se surových experimentálních DSC dat zobrazených v Obrázku 31.

Uvedená studie dokázala, že přítomnost mechanicky aktivovaných defektů hraje klíčovou roli v termické stabilitě účinných API. Prevencí tohoto efektu může být zahřívání připraveného materiálu v bodě měknutí a z toho plynoucí redukce množství defektů. Vhodnější metodou pro přípravu termálně stabilních API, které jsou citlivé na mechanické stres, může být sprejově sušení.



Obrázek 31. A. Predikce krystalizace (závislost  $\alpha$ -T) amorfního enzalutamidu při 50 °C. Predikce byla stanovena na základě kinetických parametrů získaných multivariační kinetickou analýzou DSC křivky změřené rychlostí 0,5 °C·min<sup>-1</sup>. B. Data z Obrázku A přibližně v x-ové ose. C. Predikce krystalizace amorfního enzalutamidu při 100 °C. Predikce byla stanovena na základě kinetických parametrů získaných multivariační kinetickou analýzou DSC křivky změřené rychlostí 0,5 °C·min<sup>-1</sup>. D. Data z Obrázku C přibližně v x-ové ose. E. Výsledky síťové analýzy velikosti částic materiálu HME A1 (červené sloupce). Teoretické zastoupení velikostí částic (modré sloupce) vypočtené na základě nelineární regrese isothermních dat pro nerozsítovaný materiál. K fitu byly použity kinetické predikce pro průměrnou velikost částic obsažených ve zkoumaných frakcích (modrá čára v Obrázku F). F. Černá křivka zobrazuje experimentální výsledek isothermní krystalizace při 100 °C (detaily experimentu a DSC záznam je zobrazen ve vloženém obrázku). Červená čárkovaná čára odpovídá proložení experimentálních dat třemi základními kinetickými predikcemi odpovídajícími kinetickým výsledkům pro frakce o velikosti částic 20–50, 50–125, 300–500  $\mu\text{m}$ ). Modrá čára odpovídá fitu experimentálních dat kinetickými predikcemi odpovídajícími třem experimentálně obdrženým kinetickým sadám dat (pro 20–50, 50–125 a 300–500  $\mu\text{m}$ ) a třemi dalšími sadami dat, které byly teoreticky vypočteny pro frakce o velikosti částic 125–180, 180–250 a 250–300  $\mu\text{m}$ ).

Ze zmíněné studie plynou následující závěry:

1. Krystalizační rychlost ( $\frac{d\alpha}{dt}$ ) je primárně řízena mechanickou aktivací povrchu (během mletí, drcení) než velikostí částic.
2. Materiál připravený sprejovým sušením je výrazně stabilnější než frakce s nejnižší velikostí částic extrudovaných materiálů.
3. Materiál připravený rychlým chlazením je méně stabilní než materiál připravený pomalým chlazením, i když maximum krystalizačního píku HME B1 je posunuto k vyšším teplotám v porovnání s materiálem HME A1 (viz kapitola 3.1.3). Rozdíl ve stabilitě byl určen na základě porovnání aktivačních energií. Fakt, že je stabilnější materiál připravený rychlejší rychlostí chlazení může být překvapující, neboť pomalejším chlazením by mělo docházet ke vzniku většího množství nukleí. V tomto případě, v oblasti, kde by mělo docházet k nukleaci je pravděpodobně dominantnější rychlost růstu krystalů.

Významným přínosem této publikace je ověření, že na základě znalosti predikce krystalizace pro jednotlivé šarže velikostí částic jsme poměrně přesně schopni predikovat krystalizaci připraveného materiálu obsahující částice různé velikosti. Fakticky lze tedy předpokládat aditivitu krystalizačním signálu s jen minimálním vzájemným ovlivněním efekty na rozhraní jednotlivých zrn (slinování, očkování, ...). Zároveň je zřejmý i zanedbatelný efekt lokálních teplotních výkyvů v důsledku dříve probíhající exotermní transformace v případě menších částic.

### 3.1.8. Amorfni enzalutamid pro stabilitni testovani

Stabilitni testy byly provadeny pouze s amorfni enzalutamidem bez prokazatelného množství krystalické fáze, tedy s materiálem HME A2 a HME B2. Byly provadeny zrychlené stabilitni testy (tedy krátkodobé) a přirozené stabilitni testy (tedy dlouhodobé). Cílem těchto experimentů bylo ověřit krystalizaci plně amorfni materiálů a ověřit rozdíly mezi materiálem HME A2 a HME B2. U připravených amorfni materiálů byla provedena také standardni kinetická analýza. Byly vyčísleny parametry DSC rovnice pro každou DSC křivku (Obrázek 32A–32D), viz rovnice (8) v kapitole 1.7.1. Zdánlivá aktivační energie krystalizace byla stanovena na základě metody Kissinger (kapitola 1.7.1, rovnice 9) a Kissinger-Akahira-Sunose (KAS, kapitola 1.7.1, rovnice 10). V obou případech je zdánlivá aktivační energie vyhodnocována ze směrnice přímky, u obou materiálů byly tyto závislosti lineární. U Kissingerovy metody byla získána průměrná hodnota zdánlivé aktivační energie (určená v maximu stupně přeměny) a u KAS metody byla výsledkem závislost zdánlivé aktivační energie na stupni přeměny. Výsledky jsou uvedeny v Obrázku 32E. Entalpie krystalizace (Obrázek 32F) byla určena integrací plochy krystalizačního píku, přičemž k odečtu skutečného signálu vzorku byl jako základní linie použit kubický spline. K popisu kinetiky krystalizace byl použit Šesták-Berggrenův model, jehož vhodnost k popisu kinetiky krystalizace enzalutamidu byla potvrzena v publikaci zmíněné v kapitole 1.7.1.

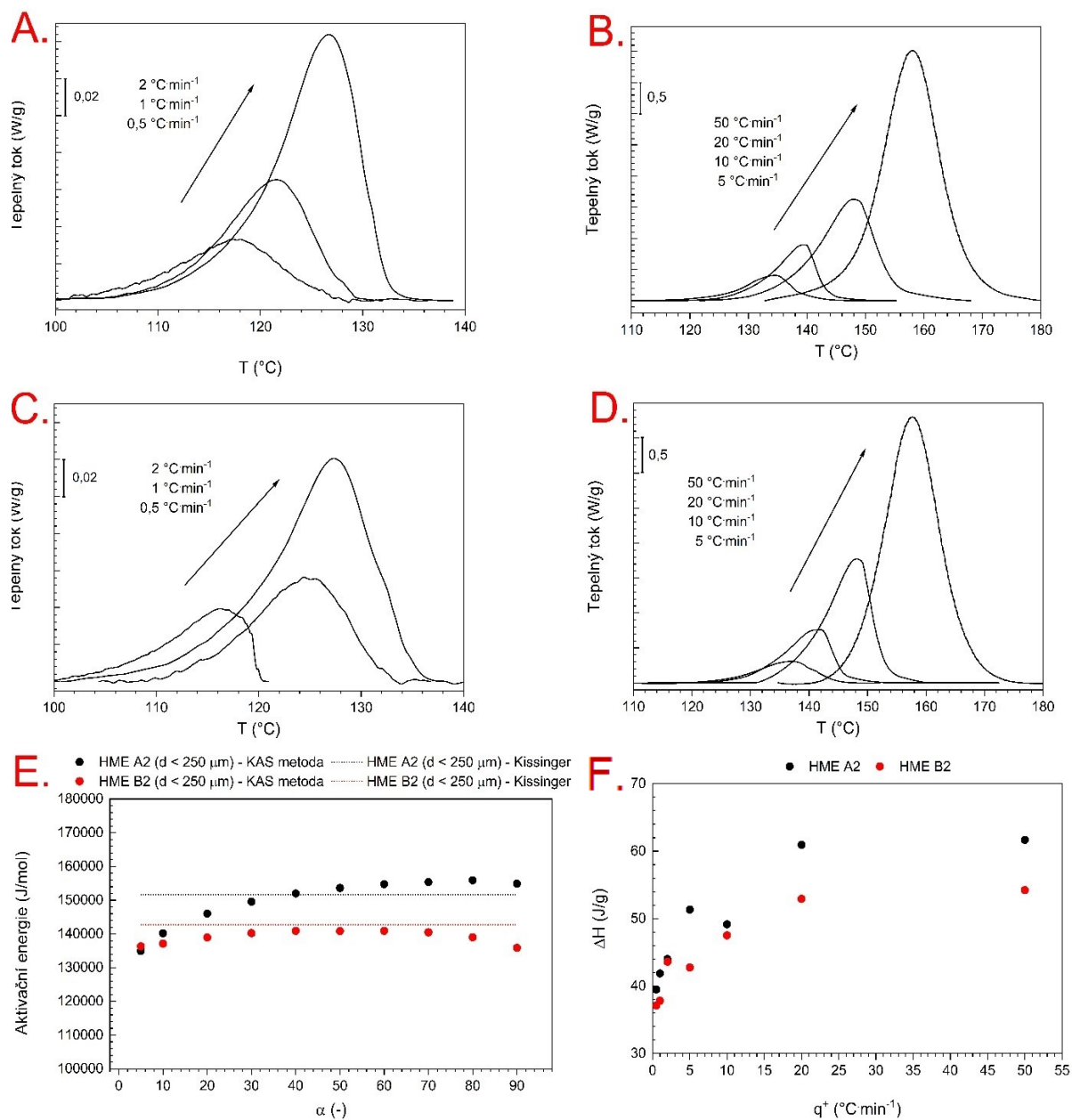
Zdánlivá aktivační energie materiálu HME A2 (velikost částic pod 250  $\mu\text{m}$ ) je cca  $179 \pm 5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , což je více než u materiálu HME A1 (velikost částic 500–300  $\mu\text{m}$ ), jehož zdánlivá aktivační energie pro krystalizaci byla cca  $160 \pm 2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Tento rozdíl je způsoben přítomností krystalů v materiálu HME A1, které fungují jako krystalizační zárodky a snižují energetickou bariéru. Zdánlivá aktivační energie materiálu HME B2 (velikost částic pod 250  $\mu\text{m}$ ) je nižší než u materiálu HME A1, tj.  $149 \pm 2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Podobná hodnota zdánlivé aktivační energie byla stanovena i u materiálu HME B1 (velikost částic 500–300  $\mu\text{m}$ ), viz publikace uvedená v kapitole 3.1.7. V této publikaci bylo potvrzeno, že materiál HME A1 je stabilnější než HME B1. Uvedené hodnoty zdánlivé aktivační energie jsou průměrem hodnot zdánlivé aktivační energie v rozmezí stupně přeměny 0,3–0,7 (aktivační energie určené pomocí metody KAS). Znovu bylo potvrzeno, že materiál připravený extruzí s nižší rychlostí chlazení HME A2 je stabilnější než materiál připravený vyšší rychlostí chlazení HME B2. Stejného závěru bylo dosaženo u materiálů HME A1, HME B1, a to bez ohledu na to, že materiál HME A1 obsahoval téměř 1 % krystalické fáze. Výsledky týkající se materiálu HME A1 a HME B1 jsou uvedeny v publikované práci a v kapitole 3.1.7. Hodnoty zdánlivé

aktivační energie plně amorfních materiálů HME A2 a HME B2 jsou uvedeny v závislosti na stupni přeměny v Obrázku 32E.

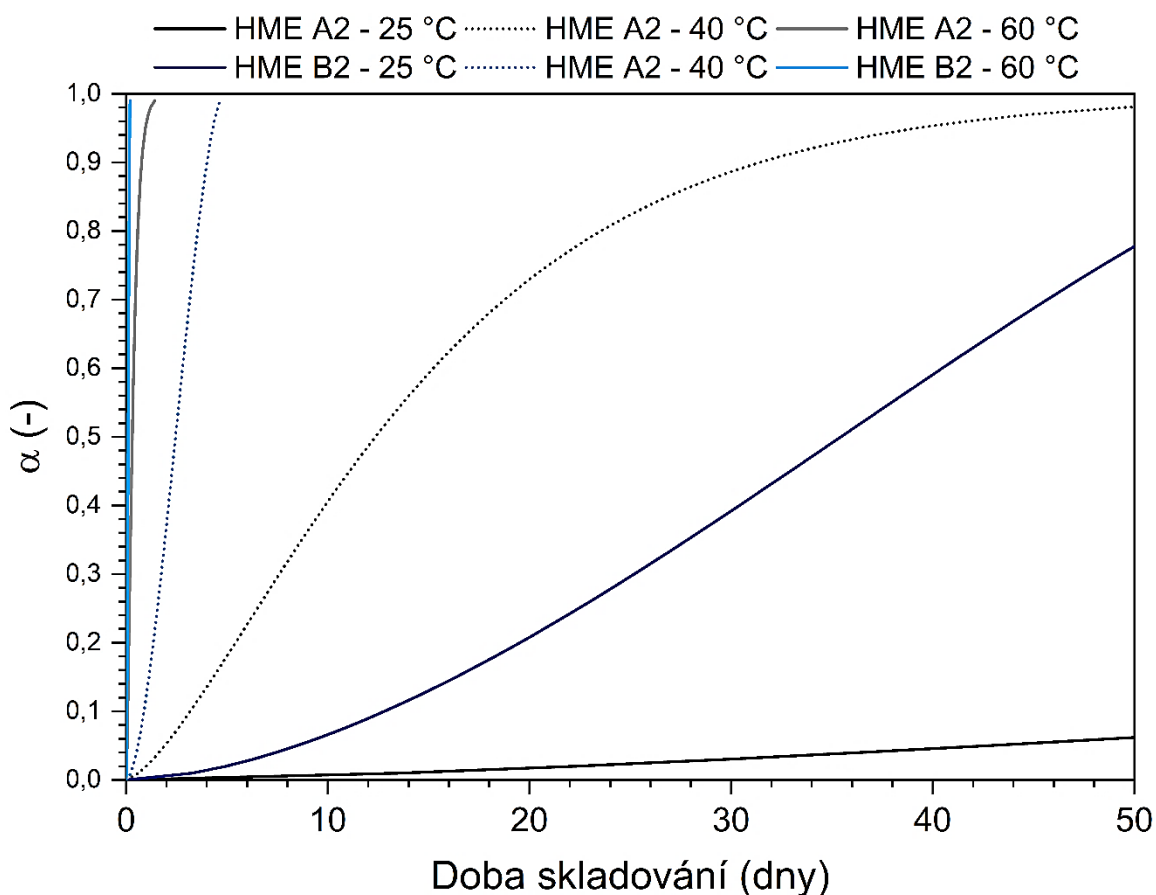
Entalpie krystalizace se v případě HME A2, B2 výrazně mění s rychlostí ohřevu, což by mohlo naznačovat změnu mechanismu krystalizace. Na základě tvaru píku můžeme usuzovat, že u nižších rychlostí ohřevu se krystalizace řídí kinetikou 0. řádu, poté se krystalizační pík stává symetrickým. Výjimkou je však krystalizace enzalutamidu HME A2 u rychlosti ohřevu  $0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Kinetika krystalizace je zde bližší JMA modelu, zatímco krystalizace materiálu HME B2 odpovídá 0. řádu. Na všechny DSC křivky, tedy na DSC křivky získané různou rychlostí ohřevu, byl aplikován pro popis krystalizační kinetiky Šesták-Berggrenův model (kapitola 1.7.1, rovnice 15). Hodnota parametru N materiálu HME A2 při rychlosti ohřevu  $0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  byla 1 a M 0,3. Hodnota parametru N materiálu HME B2 při rychlosti ohřevu  $0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  byla 0,4 a M 0,4.

Na základě výše zmíněných parametrů Šesták-Berggrenova modelu pro rychlost ohřevu  $0,5\cdot\text{min}^{-1}$  a dalších parametrů DSC rovnice byla vypočtena predikce krystalizace při teplotě 25, 40 a 60 °C. Závislosti stupně přeměny  $\alpha$  (krystalinity vzorku) na čase jsou uvedeny pro materiály HME A2 a HME B2 v Obrázku 33. Tabulka 19 navíc uvádí doby skladování potřebné k dosažení určitého stupně krystalinity při uvedených teplotách, kterým byl materiál vystaven během stabilitních testů. Uvedené doby skladování jsou spíše orientační, neboť zde je počítáno s tím, že je materiál ve stejném stavu, v jakém byl na počátku experimentu (takový materiál, který byl použit k DSC experimentům vedoucím k výpočtu předložené predikce). Není zde počítáno například s vlhkostí. Nicméně pokud je materiál nestabilní za těchto “suchých” podmínek, stabilita se bude s vlhkostí spíše dále snižovat, samozřejmě závisí také na hygroskopicitě dané API.

Krystalizace materiálů HME A2 a HME B2 při teplotě 40 a 60 °C by měla být téměř okamžitá. Při teplotě 25 °C je u materiálu HME A2 dosaženo 1 % krystalické fáze během 13 dnů a u materiálu HME B2 během 3 dnů. Už z těchto predikcí vyplývá, že krystalizace není příliš řízena teplotou, ale jiným faktorem (mechanický stres). Tato predikce je velmi spolehlivá, neboť se dle výsledků stability přibližně shoduje s realitou. V experimentech byly použity klasické doby stabilitních studií a neupravovali jsme jejich čas s ohledem na predikci. Predikční výpočty byly totiž stále ještě optimalizovány i v době, kdy už stabilitní testy probíhaly.



Obrázek 32. A. DSC křivky enzalutamidu HME A2 získané rychlostí ohřevu 0,5; 1; 2 °C·min<sup>-1</sup>, B. DSC křivky enzalutamidu HME A2 získané rychlostí ohřevu 5, 10, 20 a 50 °C·min<sup>-1</sup>, C. DSC křivky enzalutamidu HME B2 získané rychlostí ohřevu 0,5; 1; 2 °C·min<sup>-1</sup>; D. DSC křivky enzalutamidu HME B2 získané rychlostí ohřevu 5; 10; 20 a 50 °C·min<sup>-1</sup>, E. Aktivační energie enzalutamidů HME A2 a HME B2 stanovená pomocí metody Kissinger-Akahira-Sunose vynesena v závislosti na stupni přeměny  $\alpha$  (čárkované linie zobrazují hodnotu energie stanovenou pomocí klasické Kissingerovy metody), F. entalpie krystalizace (k odečtení čistého signálu vzorku byl použit kubický spline) enzalutamidů HME A2 a HME B2 v závislosti na rychlosti ohřevu.



Obrázek 33. Predikce krystalizace enzalutamidu HME A2 a HME B2 při teplotě 25, 40 a 60 °C. Krystalizace byla vypočítaná na základě parametrů Šesták-Berggrenova modelu stanovených z DSC křivky získané rychlostí ohřevu  $0,5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Tabulka 19. Predikované hodnoty krystalinity enzalutamidu HME A2 a HME B2. Jsou zde uvedeny vypočítané doby skladování, při kterých dojde k dosažení 1, 5, 10 či 20 % krystalické fáze v 25, 40, 60 °C.

$\alpha$ (%)	Doba skladování k dosažení uvedené krystalinity (dny)					
	HME A2			HME B2		
	25 °C	40 °C	60 °C	25 °C	40 °C	60 °C
1	13,0	0,6	0,01	3,3	0,2	0,01
5	42,8	1,9	0,04	8,5	0,6	0,02
10	71,2	3,2	0,08	12,8	0,9	0,04
20	121,4	5,4	0,10	19,5	1,3	0,06

### 3.1.9. Výsledky krátkodobých a dlouhodobých stabilitních testů amorfního enzalutamidu

V této kapitole jsou představeny výsledky krátkodobých a dlouhodobých stabilit amorfního enzalutamidu připraveného extruzí. K charakterizaci stresovaných vzorků bylo použito několik technik. Cílem bylo prokázat v jakých podmínkách enzalutamid krystalizuje, případně v jakých podmínkách je stabilní.

Během krátkodobých stabilit byl amorfní vzorek vystaven teplotám 40 a 60 °C v kombinaci s 10 % RH či 75 % RH. Doba stabilitního testu byla 14 a 30 dní. V případě dlouhodobých stabilit byly vzorky vystaveny 25 °C s 60 % RH a 40 °C s 75 % RH, přičemž bylo použito dvojí balení. Jedna část vzorků byla zabalena ve dvou vrstvách polyethylenové fólie (označeno dále PE-PE) a druhá část vzorků byla nejdříve zabalena v polyethylenové fólii, která byla poté vložena do hliníkové fólie a ta byla posléze zatavena (označeno dále Al-PE-Al). V kapitole 3.1.9.1 jsou stručně shrnuty výsledky diferenční skenovací kalorimetrie, kdy na základě DSC dat bylo vypočteno přibližné množství krystalické fáze v amorfním vzorku. V kapitole 3.1.9.2 jsou předloženy snímky vzorků ze SEM, kdy bylo možné stanovit i malé množství krystalické fáze. Přítomnost krystalů v amorfním vzorku byla potvrzena pomocí XRPD (kapitola 3.1.9.3) a *ss*-NMR (kapitola 3.1.9.4), kdy měření <sup>19</sup>F *ss*-NMR bylo citlivější než měření XRPD. V kapitole 3.1.9.5 jsou uvedeny výsledky infračervené spektroskopie, která byla rovněž použita pro potvrzení přítomnosti krystalů ve vzorku. Uvedené charakterizační techniky byly použity pro potvrzení přítomnosti krystalů ve vzorku, ale nebyly použity ke kvantifikaci krystalické fáze. Kromě infračervených spekter byla měřena i Ramanova spektra, ale přítomnost krystalické fáze v amorfním vzorku zde nebyla prokazatelná, proto tato spektra nebudou zobrazena. Kapitola 3.1.9.6 předkládá výsledky HPLC použité za účelem stanovení množství degradované API.

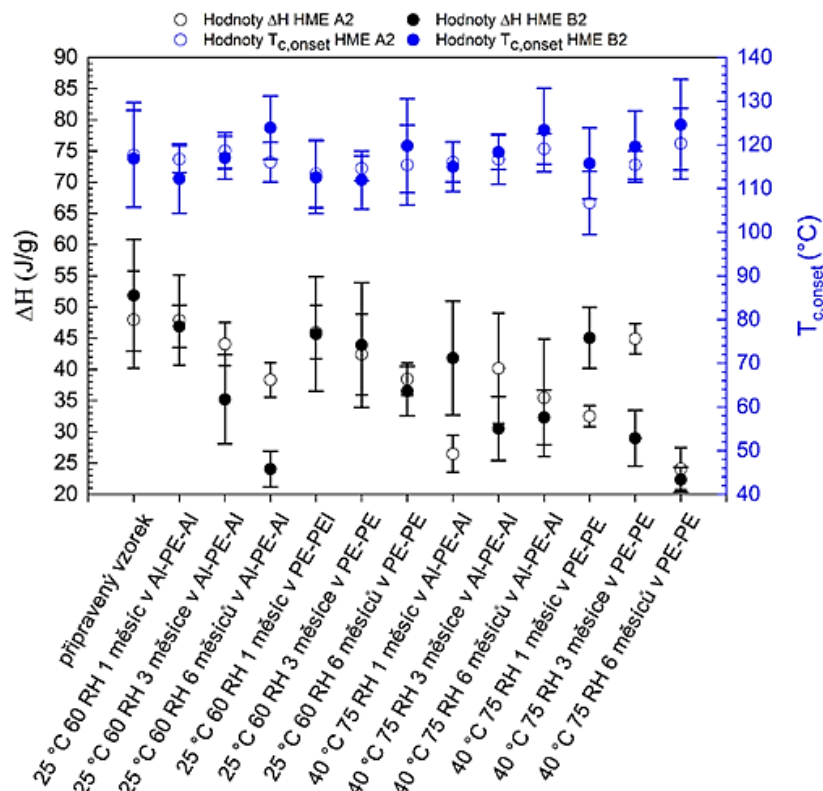
#### 3.1.9.1. Diferenční skenovací kalorimetrie

Vzorky z krátkodobých i dlouhodobých stabilit byly měřeny metodou DSC při různých rychlostech ohřevu (1, 5, 10, 20, 50 °C·min<sup>-1</sup>). S rychlostí ohřevu docházelo ke změně kinetiky krystalizace i u stresovaných vzorků. Platilo, že vzorky, které nebyly dle SEM na povrchu zcela zakrystalizovány, vykazovaly při nižších rychlostech ohřevu v DSC kinetiku krystalizace řízenou 0. řádem. Čím déle byly vzorky vystaveny vyšším teplotám a vyšší vlhkosti, tím se kinetika krystalizace při nižších rychlostech ohřevu spíše blížila kinetice JMA. Co se týče teploty skelného přechodu, pokud byl vzorek bez obalu vystaven 75 % RH,

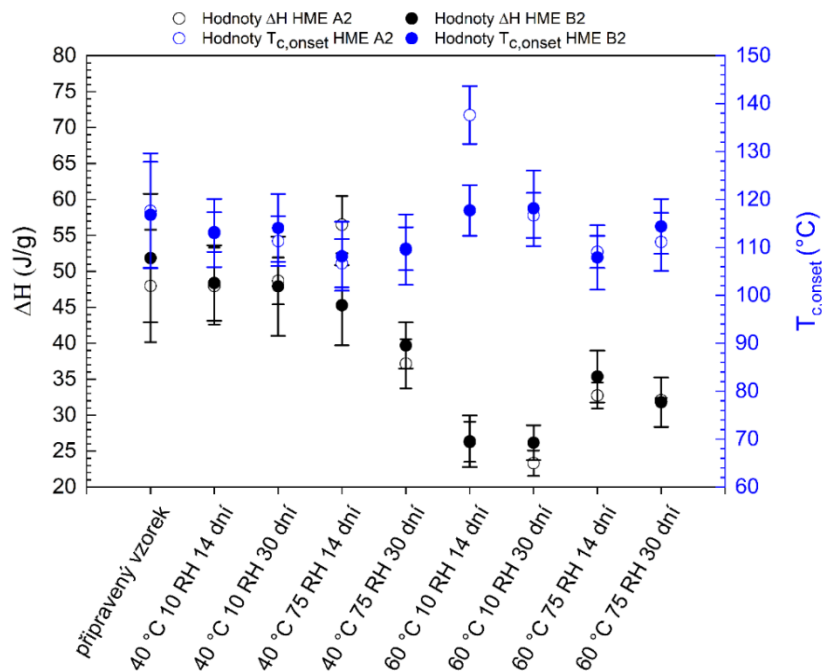
pak se hodnota  $T_g$  snížila na hodnotu 80 °C. Z toho vyplývá, že enzalutamid v těchto podmínkách nepodlehл výrazné plastifikaci.

Hodnoty entalpie krystalizace vzorků vystavených jednotlivým podmínkám krátkodobých stabilitních testů jsou zobrazeny v Obrázku 34. Chybové úsečky představují standartní směrodatnou odchylku od hodnot získaných jako průměr entalpií stanovených z různých rychlostí ohřevu. Ze zobrazených výsledků jsou patrné následující trendy. Entalpie krystalizace vzorků skladovaných ve 40 °C 10 % RH se s časem nemění a je téměř totožná s entalpií nestresovaných vzorků. Průměrná entalpie vzorku HME A2 vystaveného těmto podmínkám je 48 J·g<sup>-1</sup>, v případě HME B2 je to 49 J·g<sup>-1</sup>. Pokud se ke zmíněné teplotě přidá vlhkost, tj. podmínky 40 °C 75 % RH, pak entalpie krystalizace s časem klesá. Po 30 dnech v 40 °C 75 % RH byla entalpie změřených vzorků HME A2 37 J·g<sup>-1</sup> a HME B2 39 J·g<sup>-1</sup>. Entalpie poklesne také v 60 °C 10 % RH, se skladovacím časem se pak už hodnota entalpie příliš nemění. Průměrná hodnota entalpie vzorků skladovaných 30 dnů v 60 °C 10 % RH byla v případě HME A1 25 J·g<sup>-1</sup> a v případě HME B2 26 J·g<sup>-1</sup>. Pokud je vzorek skladován v 60 °C v kombinaci 75 % RH pak je paradoxně entalpie krystalizace o něco vyšší než v případě 10 % RH, tj. u HME A2 32 J·g<sup>-1</sup> a HME B2 33 J·g<sup>-1</sup>. V případě dlouhodobých stabilit (Obrázek 35) entalpie klesá ve všech podmínkách se skladovacím časem. V 25 °C 60 % RH v balení Al-PE-Al klesne entalpie krystalizace po 6 měsících stabilitních testů u HME A2 na 38 J·g<sup>-1</sup> a u HME B2 na 24 J·g<sup>-1</sup>. V 25 °C 60 % RH v balení PE-PE po 6 měsících klesne entalpie krystalizace HME A2 na 38 J·g<sup>-1</sup> a u HME B2 na 36 J·g<sup>-1</sup>. Ve 40 °C 75 % RH v balení Al-PE-Al po 6 měsících klesne entalpie krystalizace u HME A2 na 35 J·g<sup>-1</sup> a u HME B2 na 32 J·g<sup>-1</sup>. Ve 40 °C 75 % RH v balení PE-PE po 6 měsících klesne entalpie krystalizace u HME A2 na 24 J·g<sup>-1</sup> a u HME B2 na 22 J·g<sup>-1</sup>. Vzhledem k tomu, že entalpie tání vzorků se příliš nemění a odpovídá tání plně krystalického materiálu, pak poklesy entalpie krystalizace vzorků po krátkodobých stabilitních testech odpovídají nárůstu krystalinity vzorků. Amorfni enzalutamid tedy rekrystalizuje a už ze zmíněných hodnot je vidět, že obsah krystalů v HME B2 je trochu vyšší než v případě HME A2. Na základě znalosti výše zmíněných entalpií krystalizace a entalpie tání enzalutamidu byla krystalinita vzorků vypočtena na základě rovnic (27) a (28) uvedených v kapitole 3.1.2. Vypočtené hodnoty krystalinity jsou uvedeny v Tabulce 20. Nulová krystalinita byla stanovena u vzorku HME A2 vystavenému podmínkám 40 °C 10 %, 40 °C 75 % RH po dobu 14 dní a 25 °C 60 % RH v balení Al-PE-Al po dobu 1 měsíce. V případě HME B2 nebyla krystalická fáze nalezena u vzorků vystavených podmínkám 40 °C 10 % RH a 40 °C 75 % RH po dobu 14 dní. V případě hodnot krystalinity

zobrazených v Tabulce 20 není možné stanovit, že je materiál HME B2 méně stabilní, na to jsou doby příliš krátké.



Obrázek 34. Hodnoty entalpie krystalizace (modrá barva) a onsetu krystalizace (černá barva) enzalutamidů HME A2 (poloprázdné body) a HME B2 (plné body) vystaveným podmínkám dlouhodobých stabilitních testů. Entalpie krystalizace byla stanovena s použitím lineární základní linie.



Obrázek 35. Hodnoty entalpie krystalizace (modrá barva) a onsetu krystalizace (černá barva) enzalutamidů HME A2 (poloprázdné body) a HME B2 (plné body) vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů. Entalpie krystalizace byla stanovena s použitím lineární základní linie.

Tabulka 20. Množství krystalické fáze v amorfních vzorcích vystavených stabilitním testům. Krystalinita byla stanovena u každého vzorku ze sady DSC křivek změřených rychlostí ohřevu 1, 2, 5, 10, 20, 50 °C·min<sup>-1</sup>. Krystalinita byla vypočtena na základě rovnice (27) a (28) v kapitole 3.1.2.

Podmínky stabilitního testu (teplota, % relativní vlhkosti, doba trvání)	HME A2 $\alpha \pm \text{SD}$ (%)	HME B2 $\alpha \pm \text{SD}$ (%)
40 °C 10 RH 14 dní	0	5,9±1,9
40 °C 10 RH 30 dní	9,5±4,2	10,0±2,0
40 °C 75 RH 14 dní	0	0
40 °C 75 RH 30 dní	31,0±1,5	17,6±3,8
60 °C 10 RH 14 dní	47,0±1,7	49,1±3,6
60 °C 10 RH 30 dní	56,1±3,1	48,7±3,8
60 °C 75 RH 14 dní	36,2±3,5	35,3±9,7
60 °C 75 RH 30 dní	44,3±3	37,2±4,8
25 °C 60 RH 1 měsíc v Al-PE-Al	0	0
25 °C 60 RH 3 měsíce v Al-PE-Al	14,6±3,6	31,2±9,7
25 °C 60 RH 6 měsíců v Al-PE-Al	24,4±3,8	24,1±2,9
25 °C 60 RH 1 měsíc v PE-PE	16,1±7,3	18,7±3,1
25 °C 60 RH 3 měsíce v PE-PE	25,2±9,7	19,1±2,6
25 °C 60 RH 6 měsíců v PE-PE	25,2±9,7	32,4±3,7
40 °C 75 RH 1 měsíc v Al-PE-Al	26,5±2,9	18,4±10,5
40 °C 75 RH 3 měsíce v Al-PE-Al	40,2±8,8	35,5±3,4
40 °C 75 RH 6 měsíců v Al-PE-Al	35,5±9,4	43,0±5,9
40 °C 75 RH 1 měsíc v PE-PE	35,2±1,8	10,7±7,8
40 °C 75 RH 3 měsíce v PE-PE	13,6±0,6	42,9±6,2
40 °C 75 RH 6 měsíců v PE-PE	53,5±8,6	55,3±7,3

### 3.1.9.2. Skenovací elektronová mikroskopie

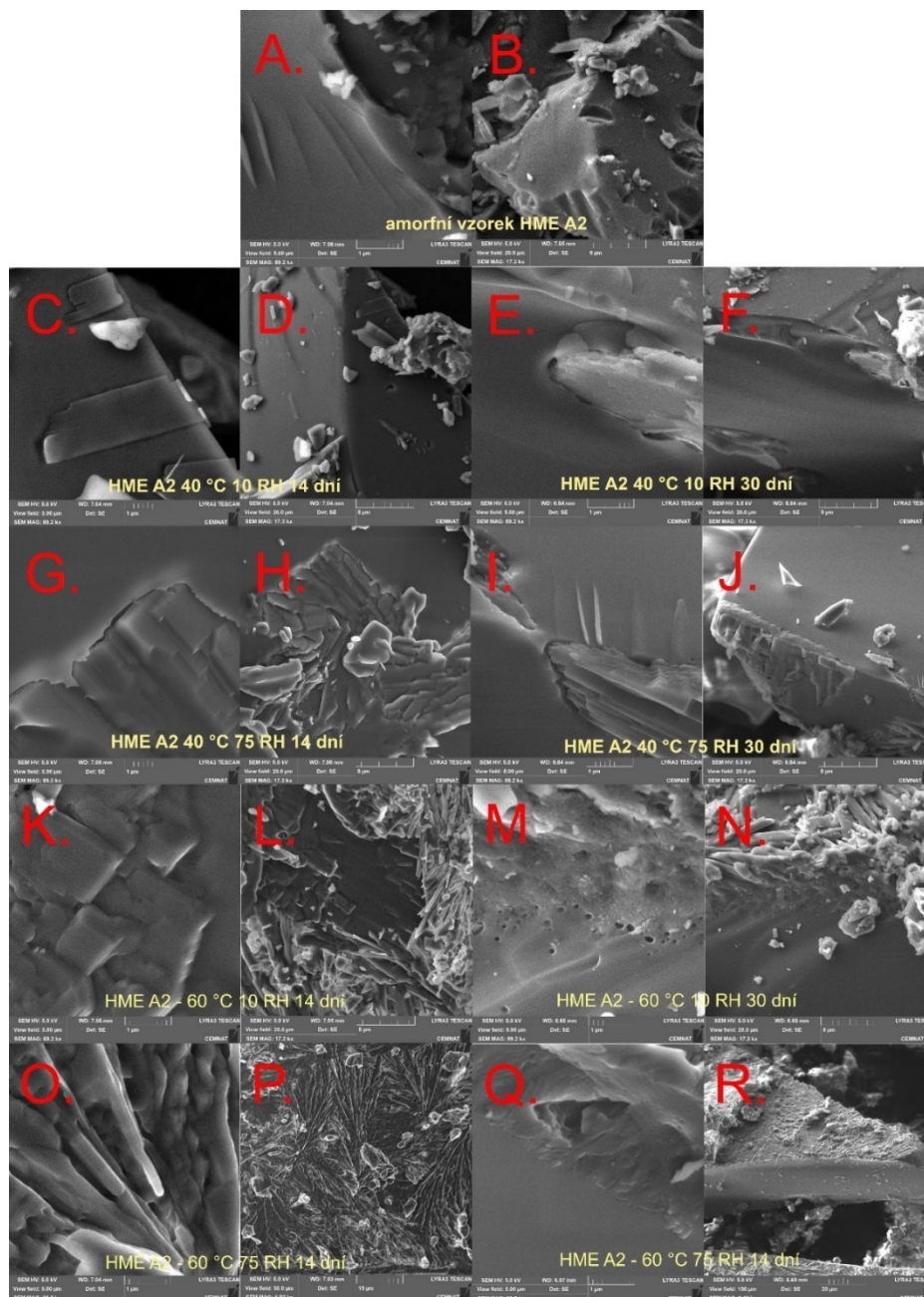
Obrázky 36 a 37 zobrazují snímky čistě amorfních materiálů HME A2 (36 A, B) a HME B2 (37 A, B) a vzorků vystavených krátkodobým stabilitním testům. Materiál HME A2 (Obrázek 36) krystalizuje již ve 40 °C v kombinaci s 10 % RH. Rostoucí krystaly jsou ve tvaru tenkých destiček (Obrázek 36 C–D). Ve zvýšené vlhkosti, tj. 40 °C s 75 % RH krystalická fáze roste ve formě destiček šroubovitě dislokačním mechanismem (36 G–J), přičemž k růstu dochází přednostně na hranách částic čili na mechanicky aktivovaných místech. V 60 °C 10 % RH je povrch částic po 14 dnech zcela pokryt krystaly ve tvaru destiček a tenkých tyčinek (Obrázek 36 K–L). V 60 °C 75 % RH jsou částice po 14 dnech pokryty tenkými tyčinkami (Obrázek 36 O–P) a na Obrázku 36Q (60 °C 75 %RH 30 dní) je vidět, že dochází k růstu krystalů z povrchu dovnitř. V případě materiálu HME B2 dochází k trochu odlišné krystalizaci, viz dále. Na Obrázku 37 C–D (materiál HME B2) odpovídajícímu podmínkám 40 °C 10 % RH 14 dní nejsou vidět krystaly na povrchu, ale je zde náznak krystalů pod povrchem. Krystalizace pod povrchem jasně probíhá v podmínkách 40 °C s 75 % RH (Obrázek 37 G–J), kdy je krystalická vrstva pod povrchem již pravděpodobně plně zformovaná a na povrchu vznikají trasy tenkých tyčinek podélně s povrchem. V 60 °C 10 %

RH je povrch již zcela pokrytý tenkými tyčinkami (37 K–N) a v případě 60 °C 75 % RH tyčinkovité krystaly vytvářejí na povrchu externí útvary různé geometrie (viz Obrázek 37 N).

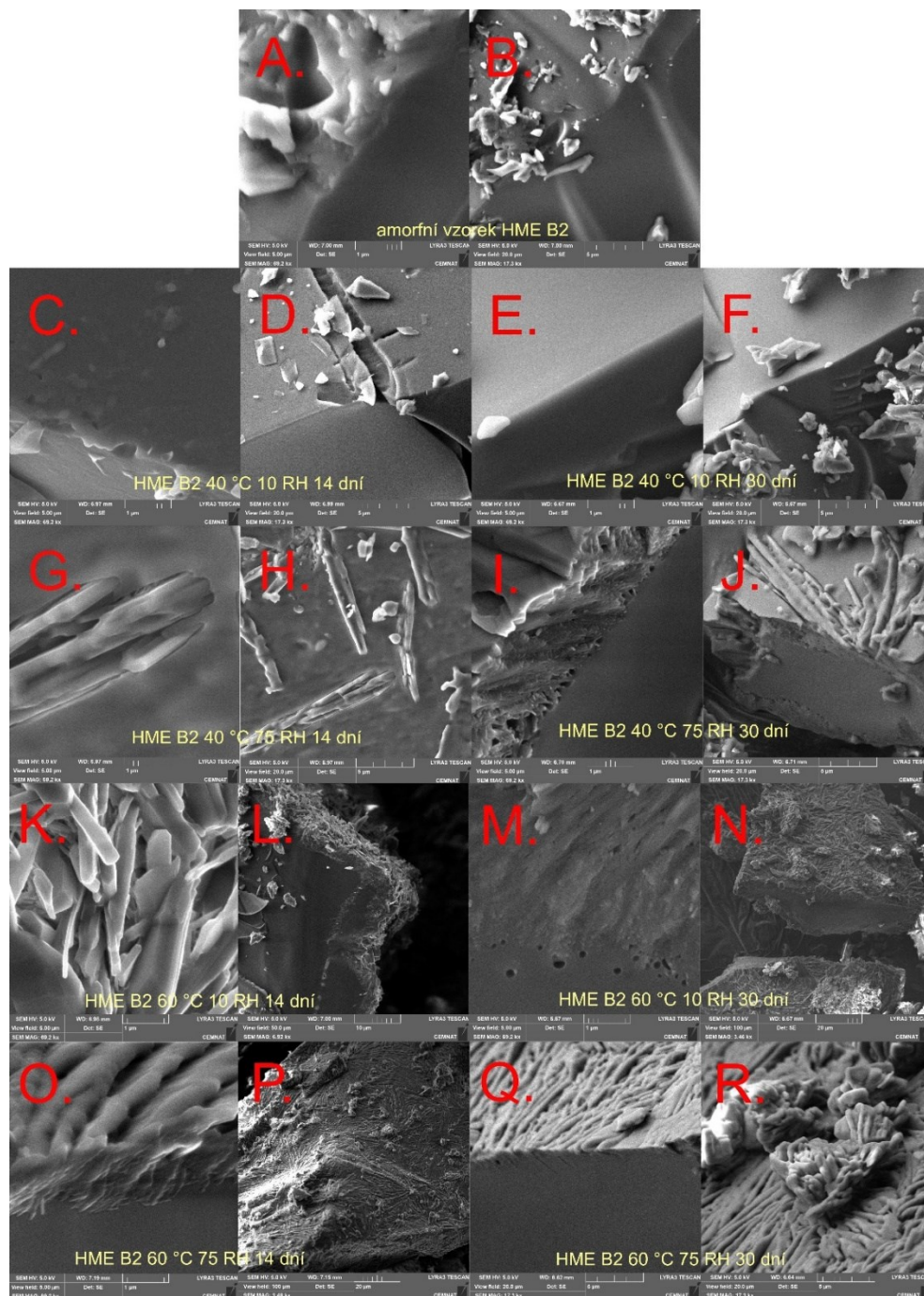
Jak je vidět, oba materiály krystalizují mírně odlišně, což pravděpodobně odpovídá odlišnému krystalizačnímu mechanismu identifikovanému na základě DSC u nízké rychlosti ohřevu. Důležité však je, že ke krystalizaci enzalutamidu dochází bez ohledu na vlhkost, což odpovídá tomu, že ani nedochází k plastifikaci vzorků. Vlhkost tedy primárně neproniká do objemu amorfního materiálu a působí pouze na jeho povrchu. Přítomnost vlhkosti povrchovou krystalizaci výrazně urychlí, dojde k téměř okamžitému pokrytí povrchu krystalickou fází. Žádným obalovým materiálem tedy nelze zabránit krystalizaci amorfního enzalutamidu, alternativní možnosti jsou následující. První možností je použití sprejově sušeného materiálu s tím, že se musí ověřit jeho stabilita ve zvýšené teplotě a vlhkosti. Druhou možností je tvorba tuhého roztoku. Z důvodu nedostatku času a existence dalších témat nebyly tyto možnosti prověřeny. Nicméně náplní této práce bylo primárně studium kinetiky amorfních API.

Snímky z dlouhodobých stabilitních testů jsou zobrazeny v příloze (obrázky P 2–P 9) a vyplývá z nich, že materiál HME B2 je méně stabilní. Obrázek P 2 A, B a P 3 A, B zobrazuje snímky materiálu HME A2 a HME B2, který byl vystaven 25 °C 60 % RH v balení Al-PE-Al po dobu 1 měsíce. Materiál HME A2 vypadá zcela amorfně a u materiálu HME B2 bylo nalezeno několik tyčinek, které jsou pravděpodobně krystalické. Po 6 měsících (Obrázek P 3 E–F) je povrch menších částic materiálu HME B2 zcela pokryt krystaly, zatímco u materiálu HME A2 (Obrázek P 2 E–F) takový povrch nebyl nalezen. Snímky z ostatních podmínek jsou zobrazeny na Obrázcích P 4–P 9. Obrázky P 6 (A, B) a P 7 (A, B) zobrazují materiály vystavené 40 °C 75 % RH v balení Al-PE-Al po dobu 1 měsíce a u obou materiálů je povrch zcela pokryt krystaly s tím, že materiál v objemu je stále amorfní. Stejně výsledky vyplývají i ze snímků materiálů skladovaných ve stejných podmínkách, ale v balení PE-PE (obrázky P8 a P9). Snímky dokazují, že krystalizace probíhá bez ohledu na přítomnost vlhkosti, ale vlhkost krystalizaci urychluje a může měnit tvar vznikajících krystalů (mechanismus krystalizace). Další snímky jsou zobrazeny v Obrázcích P 9 C–E, jsou vidět řezy částicemi HME B2, které byly vystaveny 40 °C 75 % RH v balení PE-PE po dobu 3 a 6 měsíců. V těchto řezech je vidět povrchová zakrystalizovaná vrstva a krystaly vznikající v objemu pod povrchem, které poté pravděpodobně vyrůstají na povrch. U snímků z krátkodobých stabilitních testů materiálu HME B2 byla také odhalena pravděpodobně krystalizace pod povrchem, což je rozdíl v chování HME B2 a HME A2, kde dochází ke krystalizaci pravděpodobně z povrchu dovnitř. V kapitole 3.1.8 bylo vypočteno, že materiál HME B2 bude méně stabilní než

materiál HME A2, ale rozdíl nebyl příliš veliký, a to vyplývá také z těchto výsledků. Nicméně bylo potvrzeno, že krystalizace ve 40 °C a 60 °C je téměř okamžitá a potvrzuje to tedy výsledky predikce předložené v kapitole 3.1.8. Predikovaný rozdíl ve stabilitě materiálů HME A2 a HME B2 při teplotě 25 °C byl jen několik dní, což nelze experimentálními daty potvrdit.



Obrázek 36. SEM snímky materiálu HME A2 vystavenému podmínkám krátkodobých stabilitních testů: A. původní amorfni vzorek HME A2 (měřítko 1  $\mu$ m), B. původní amorfni vzorek HME A2 (měřítko 5  $\mu$ m), C. 40 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 1  $\mu$ m), D. 40 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 5  $\mu$ m), E. 40 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 1  $\mu$ m), F. 40 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 5  $\mu$ m), G. 40 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 1  $\mu$ m), H. 40 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 5  $\mu$ m), I. 40 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 1  $\mu$ m), J. 40 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 5  $\mu$ m), K. 60 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 1  $\mu$ m), L. 60 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 5  $\mu$ m), M. 60 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 1  $\mu$ m), N. 60 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 5  $\mu$ m), O. 60 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 1  $\mu$ m), P. 60 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 10  $\mu$ m), Q. 60 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 1  $\mu$ m), R. 60 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 20  $\mu$ m).



Obrázek 37. SEM snímky materiálu HME B2 vystavenému podmínkám krátkodobých stabilitních testů: A. původní amorfni vzorek HME B2 (měřítko 1 μm), B. původní amorfni vzorek HME B2 (měřítko 5 μm), C. 40 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 1 μm), D. 40 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 5 μm), E. 40 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 1 μm), F. 40 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 5 μm), G. 40 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 1 μm), H. 40 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 5 μm), I. 40 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 1 μm), J. 40 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 5 μm), K. 60 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 1 μm), L. 60 °C 10 % RH 14 dní (měřítko 10 μm), M. 60 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 1 μm), N. 60 °C 10 % RH 30 dní (měřítko 20 μm), O. 60 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 1 μm), P. 60 °C 75 % RH 14 dní (měřítko 20 μm), Q. 60 °C 75 % RH 30 dní (měřítko 5 μm), R. 60 °C 75 % RH

### 3.1.9.3. XRPD

Difraktogramy vzorků vystavených podmínkám krátkodobých a dlouhodobých stabilitních testů jsou zobrazeny v příloze na Obrázcích P 10–13. Výsledky vzorků vystavených krátkodobým stabilitám (Obrázky P 10 a P 11) potvrzují, že vzorek HME A2 je dle XRPD zcela amorfní po 30 dnech ve 40 °C 10 % RH, ale i po 14 dnech v podmínkách 40 °C 75 % RH. Naproti tomu vzorek HME B2 je dle XRPD zcela amorfní pouze po 14 dnech ve 40 °C s 10 % RH. V předcházející kapitole byly diskutovány snímky ze skenovací elektronové mikroskopie a všechny vzorky z krátkodobých stabilitních testů obsahovaly prokazatelné množství krystalické fáze, proto byly kromě XRPD charakterizovány i dalšími technikami s cílem nalézt nejcitlivější metodu k identifikaci krystalické fáze a optimalizovat podmínky měření.

Výsledky z dlouhodobých stabilitních testů jsou zobrazeny v příloze na Obrázcích P 12 a P 13. V obou případech (HME A2, HME B2) zůstávají vzorky amorfní po dobu 1 měsíce v podmínkách 25 °C 60 % RH v balení Al-PE-Al i PE-PE. Další vzorky byly směsí krystalické formy R1 a amorfní formy.

### 3.1.9.4. *ss*-NMR

Výsledky <sup>19</sup>F *ss*-NMR měření jsou zobrazeny na Obrázcích P 14–17. V předchozí kapitole bylo potvrzeno, že vzorky HME A2 vystavené podmínkám 40 °C 10 % RH po dobu 30 dní a 40 °C 75 % RH po dobu 14 dní jsou plně amorfní. Tyto závěry byly na základě analýzy pomocí *ss*-NMR zpřesněny. Výsledky potvrzují, že vzorek vystavený 40 °C 10 % RH je po 14 dnech plně amorfní, avšak po 30 dnech obsahuje přibližně 0,5 % krystalické fáze. Vzorek vystavený 40 °C 75 % RH obsahuje po 14 dnech kolem 0,5 % krystalické fáze a po 30 dnech asi 1 % krystalické fáze (viz Obrázek P 14). Stejně závěry byly obdrženy i v případě HME B2 (viz Obrázek P 16).

V případě dlouhodobých stabilitních testů zůstal vzorek HME A2 plně amorfní v podmínkách 25 °C 60 % RH v Al-PE-Al i PE-PE po dobu 1 měsíce (viz Obrázek P 15). Vzorek HME B2 zůstal po dobu 1 měsíce plně amorfní v podmínkách 25 °C 60 % RH v Al-PE-Al, přičemž vzorek vystavený 25 °C 60 % RH v PE-PE obsahoval už kolem 1 % krystalické fáze (viz Obrázek P 17). Všechny zmíněné vzorky z dlouhodobých stabilitních testů byly dle XRPD amorfní, 1 % krystalické fáze enzalutamidu je v tomto případě pod detekčním limitem XRPD.

V Tabulce 21 jsou uvedeny výsledky srovnání <sup>19</sup>F *ss*-NMR spekter vzorků HME A2 a HME B2, které byly vystaveny podmínkám krátkodobých a dlouhodobých stabilitních testů.

V Tabulce 21 je uvedeno buď označení vzorku, jenž dosáhl vyššího množství krystalické fáze v uvedených podmínkách, nebo slovo *stejně* v případě kdy spektra obou materiálů byla totožná. Z výsledků krátkodobých stabilitních testů vyplývá, že rozdíl v krystalinitě byl detekován v případě 60 °C 10 % RH, kdy vyšší množství krystalické fáze obsahoval vzorek HME A2 a v případě podmínek 60 °C 75 % RH 30 dní, kdy obsahoval vyšší množství vzorek HME B2. Z dlouhodobých stabilit vyplynulo, že po 6 měsících obsahuje vyšší množství krystalů materiál HME B2, a to v podmínkách 25 °C 60 % RH v obou baleních a také v podmínkách 40 °C 75 % RH v případě balení Al-PE-Al. Vyšší množství krystalů v materiálu HME A2 v porovnání s materiálem HME B2 bylo detekováno pouze v podmínkách 40 °C 75 % RH PE-PE. Jasně určit, který materiál krystalizuje více je v tomto případě těžké. Ale v případě dlouhodobých stabilit je materiál HME B2 pravděpodobně méně stabilní než HME A2 v podmínkách, kdy je chráněn před vlhkostí, tedy v Al-PE-Al obalu. To by mohlo odpovídat výsledků predikce krystalizace, protože tam není zohledněn příspěvek vlhkosti.

Tabulka 21. Slovní hodnocení vyjadřující porovnání míry krystalinity ve vzorcích HME A2 a HME B2, které byly vystaveny podmínkám krátkodobých a dlouhodobých stabilitních testů

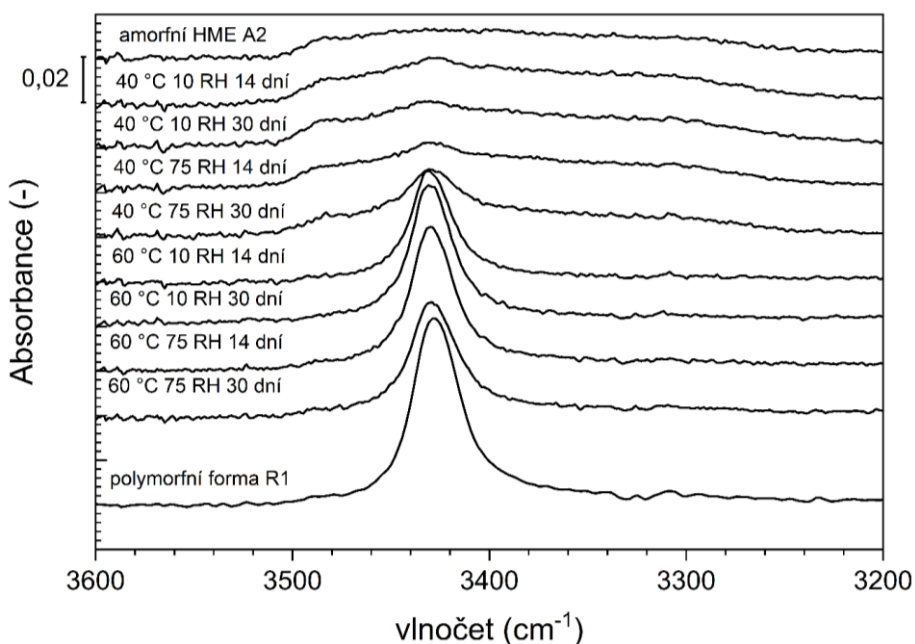
podmínky stabilitního testu/obalový materiál	Název vzorku, který obsahoval větší množství krystalů		
	žádný	Al-PE-Al	PE-PE
40 °C 10 % RH 14 dní	–*		
40 °C 10 % RH 30 dní	stejně**		
40 °C 75 % RH 14 dní	stejně		
40 °C 75 % RH 30 dní	stejně		
60 °C 10 % RH 14 dní	HME A2		
60 °C 10 % RH 30 dní	HME A2		
60 °C 75 % RH 14 dní	stejně		
60 °C 75 % RH 30 dní	HME B2		
25 °C 60 % RH 1 měsíc		stejně	HME B2
25 °C 60 % RH 3 měsíce		stejně	HME B2
25 °C 60 % RH 6 měsíců		HME B2	stejně
40 °C 75 % RH 1 měsíc		HME A2	stejně
40 °C 75 % RH 3 měsíce		HME B2	HME A2
40 °C 75 % RH 6 měsíců		HME B2	HME A2

\*pomlčka znamená, že vzorek dle ss-NMR neobsahoval krystalickou fázi

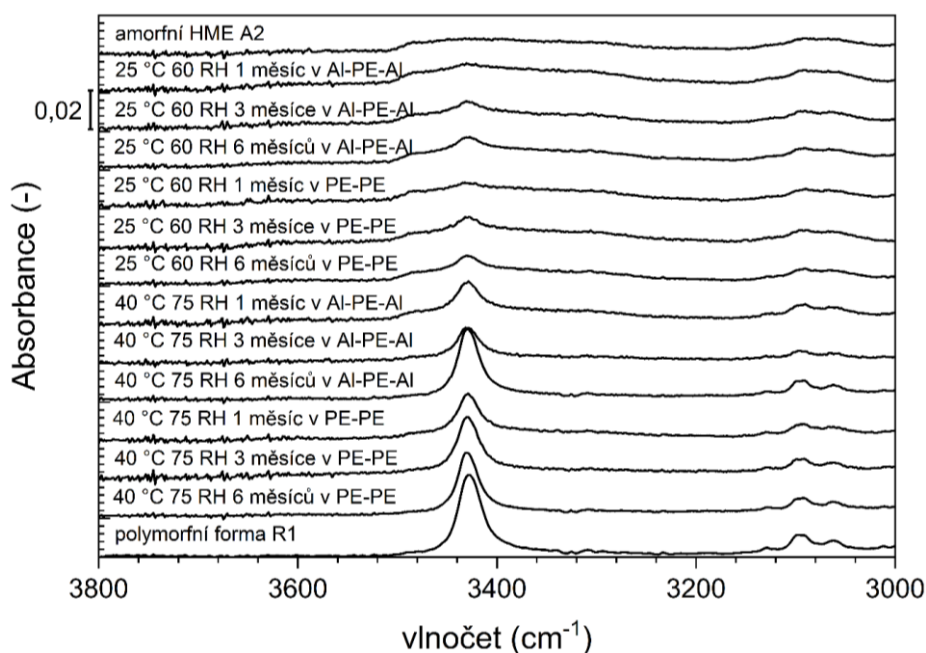
\*\* slovo *stejně* je uvedeno v tabulce v případě, kdy vzorky obsahovaly stejné množství krystalické fáze

## 3.1.9.5. Infračervená spektroskopie

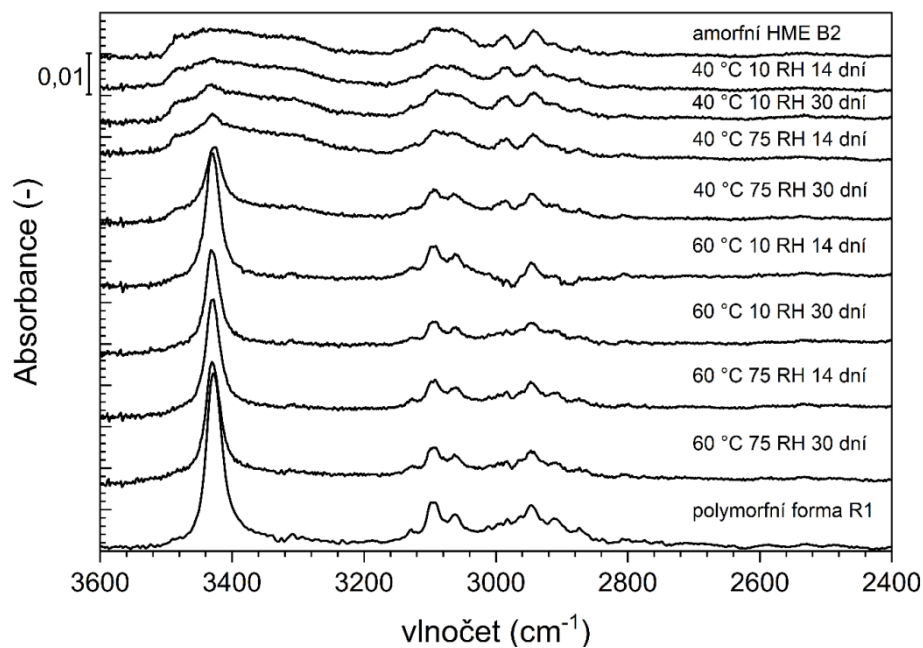
IČ absorpční spektra vzorků z dlouhodobých a krátkodobých stabilit jsou zobrazena v Obrázku 38–41. IČ spektrum krystalické formy R1 obsahuje ostrý absorpční pás s maximem vlnočtu přibližně  $3430\text{ cm}^{-1}$  náležící valenčním vibracím N–H skupiny. Amorfni forma tento pás neobsahuje (viz Obrázek 38). Na základě IČ byla malá příměs krystalů zaznamenána i ve vzorcích, které byly pro ss-NMR plně amorfni.



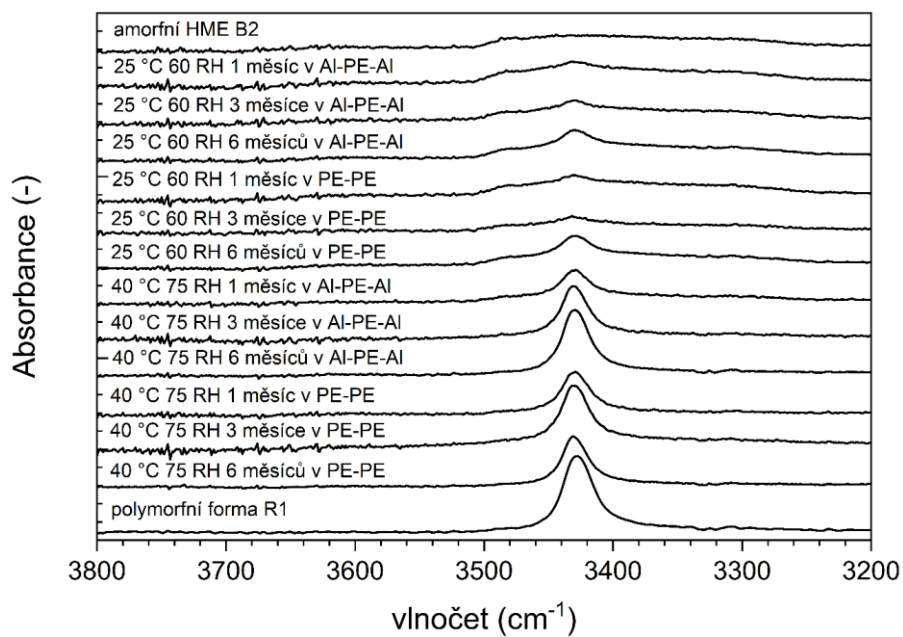
Obrázek 38. Infračervená spektra vzorků HME A2 vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů a spektra plně amorfniho a plně krystalického vzorku. Spektra byla posunuta.



Obrázek 39. Infračervená spektra vzorků HME A2 vystaveným podmínkám dlouhodobých stabilitních testů ve dvojím balení (Al-PE-Al, PE-PE) a spektra plně amorfniho a plně krystalického vzorku. Spektra byla posunuta.



Obrázek 40. Infračervená spektra vzorků HME A2 vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů a spektra plně amorfního a plně krystalického vzorku. Spektra byla posunuta.



Obrázek 41. Infračervená spektra vzorků HME A2 vystaveným podmínkám dlouhodobých stabilitních testů ve dvojím balení (Al-PE-Al, PE-PE) a spektra plně amorfního a plně krystalického vzorku. Spektra byla posunuta.

## 3.1.9.6. HPLC

Tabulka 22 zobrazuje výsledky stanovení čistoty vzorků po krátkodobých a dlouhodobých stabilitách. Retenční čas enzalutamidu byl 5,8 min za podmínek popsanych v kapitole 2.2.14. Ve všech vzorcích bylo nalezeno maximálně 0,35 % degradované API. Vzorky tedy obsahují po stabilitních testech stále z větší části enzalutamid v čisté formě.

Tabulka 22. Množství degradované API stanovené na základě HPLC.

Podmínky stabilit	% degradované API ve vzorku	
	HME A2	HME B2
40 °C 10 RH 30 dní	0,35±0,005	0,25±0,004
40 °C 75 RH 30 dní	0,32±0,005	0,25±0,005
60 °C 10 RH 30 dní	0,19±0,004	0,28±0,006
60 °C 75 RH 30 dní	0,27±0,006	0,18±0,005
25 °C 60 RH 1 měsíc v Al-PE-Al	0,21±0,005	0,20±0,005
25 °C 60 RH 1 měsíc v PE-PE	0,21±0,005	0,22±0,007
40 °C 75 RH 1 měsíc v Al-PE-Al	0,19±0,004	0,22±0,005
40 °C 75 RH 1 měsíc v PE-PE	0,20±0,005	0,22±0,004

\*V tabulce je uveden průměr výsledků tří měření.

## 3.1.10. Shrnutí chování amorfního enzalutamidu

Tato kapitola se zabývala amorfni formou enzalutamidu, jejím krystalizačním chováním za různých podmínek a dopady tohoto chování na skladování a dlouhodobou stabilitu této látky. Uvedené studie měly také za cíl stanovit procedurální standard pro výzkum krystalizačního chování amorfni API. Je-li enzalutamid připraven v DSC ohřevem s následným chlazením, pak během ohřevu připravené amorfni formy není zaznamenána exotermní krystalizace na DSC křivce, nejsou tedy přítomna nuklea z přípravy. Je-li amorfni enzalutamid připraven extruzí, pak je během mletí amorfniho materiálu aktivován jeho povrch a generována nuklea, což se projeví na DSC křivce exotermní krystalizací. Krystalizace takto připraveného materiálu nezávisí na velikosti částic, ale na míře mechanického stresu. Je-li amorfni enzalutamid připraven sprejovým sušením, pak není příčinou vzniku nukleí mechanická aktivace, ale pravděpodobně přítomnost zbytkového rozpouštědla. Tento materiál se však jeví stabilnější než materiál připravený extruzí. Dále bylo ukázáno, že na základě kinetické predikce lze poměrně přesně předpovědět krystalizační chování amorfniho enzalutamidu i v případě růstu krystalů pod  $T_g$ , stejně jako predikovat aditivitu krystalizačních signálů pro práškové materiály o různé velikosti částic.

V této kapitole byly rovněž představeny výsledky stabilitního testování amorfního enzalutamidu připraveného extruzí s použitím různé rychlosti ohřevu. Dle predikce krystalizace na základě kinetických výpočtů by měl být stabilnější materiál připravený pomalejší rychlostí chlazení (HME A2), to však nebylo na základě výsledků stabilitních testů jasně prokázáno.

Bylo potvrzeno, že amorfni enzalutamid připravený extruzí krystalizuje, a to bez ohledu na přítomnost vlhkosti, přítomnost vlhkosti však krystalizaci podpoří. Na základě kinetických výpočtů bylo predikováno, že při teplotě 40 °C a 60 °C začne krystalizace okamžitě a při teplotě 25 °C do dvou týdnů. V případě 40 °C a 60 °C predikce souhlasí, u 25 °C byla krystalizace detekována při 25 °C po 30 dnech pomocí  $^{19}\text{F}$  *ss*-NMR měření, ale pomocí IČ spektroskopie a SEM byly nalezeny náznaky krystalické fáze už po 2 týdnech. Zmíněné dokazuje, že predikce v případě amorfni enzalutamidu je poměrně spolehlivá.

Na základě SEM a IČ bylo dokázáno, že dochází ke krystalizaci ve všech vzorcích předložených stabilitnímu testování. Pokud porovnáme výsledky  $^{19}\text{F}$  *ss*-NMR a XRPD, pak  $^{19}\text{F}$  *ss*-NMR má nižší detekční limit krystalické formy enzalutamidu. Na základě výsledků stabilitních testů nejde zcela jasně potvrdit, že je amorfni forma enzalutamidu HME B2 méně stabilní než forma HME A2, nicméně snímky ze SEM to naznačují. Zároveň byla potvrzena chemická stabilita amorfni enzalutamidu během stabilitních testů, a to na základě HPLC měření.

V neposlední řadě zde byla zkoumána spolehlivost stanovení krystalinity na základě rovnic (27) a (28). Bylo zde prokázáno, že tato rovnice poměrně spolehlivě funguje u vyššího množství krystalické fáze, ale v případě nízké krystalinity je málo průkazná a je potřeba výsledek ověřit jinými metodami.

## 3.2. Benefity plynoucí z použití amorfnní formy v lékové formě

Použitím amorfnní API v lékové formě lze docílit značného zvýšení rozpustnosti vybrané API, viz kapitola 1.3. Cílem této kapitoly bylo porovnat disoluční chování amorfnní a krystalické formy enzalutamidu, a to samotné či v kombinaci s vybraným polymerem. Použití polymeru je esenciální v případě rychle krystalizujících API. V takovém případě je vhodně zvolený polymer schopen udržet API v přesyceném stavu, a to zejména pomocí molekulárních interakcí.

V kapitole 3.2.1 je uvedeno porovnání rychlosti rozpouštění amorfnní a krystalické API. V kapitole 3.2.2 je sledováno rozpouštění amorfnní API v práškové formě s velikostí částic, která bude používána v dalších formulacích. V kapitole 3.2.3 je uvedeno disoluční chování amorfnního enzalutamidu v přítomnosti HPMC AS MF. V každé výše zmíněné kapitole jsou uvedeny výsledky charakterizačních technik materiálů před a po disoluci.

### 3.2.1. Studium disolučního chování enzalutamidu během pravé disoluce

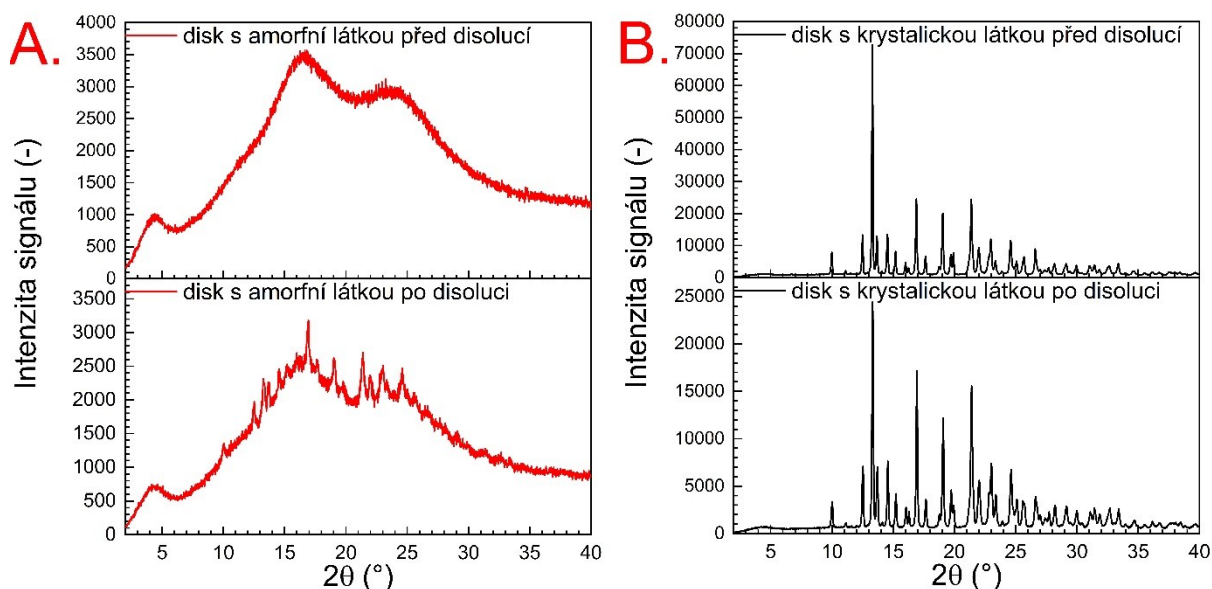
Cílem metody pravé disoluce bylo porovnat rychlost rozpouštění amorfnní a krystalické formy enzalutamidu za podmínek, kdy jejich rozpouštění není limitováno rozpustností (disoluční médium 72,4 mM fosfátový pufr o pH 6.8 s 0,2 w/V\* % dodecylsulfátu sodného) a není ovlivněno formou vzorku (velikostí a tvarem částic). Před vlastním experimentem byla API vybrané pevnofázové formy (amorfnní či krystalické polymorfnní formy R1) slisována lisovacím tlakem 110 N do plochého disku o průměru 8 mm, čímž byla minimalizována závislost na povrchu API. Povrch slisovaného disku musel být hladký, bez viditelných nerovností, neboť k rozpouštění dochází z povrchu disku. Pomocí XRPD bylo ověřeno, že nedochází ke změně pevnofázové formy měřených látek vlivem lisovacího tlaku. Výsledky práškové rentgenové difrakce jsou zobrazeny na Obrázku 42A (horní obrázek – amorfnní látka slisována do podoby plochého disku) a 42B (horní obrázek – krystalická látka slisována do podoby plochého disku). Během tohoto zpracování nedošlo ke změně polymorfnní formy krystalického materiálu či k rekrystalizaci amorfnní API. Takto připravené disky byly použity k disolučnímu experimentu. K částečné fázové transformaci amorfnní API došlo až po kontaktu s disolučním médiem. Došlo k povrchové krystalizaci do polymorfnní formy R1<sup>†</sup>.

---

\* w/V – koncentrace vyjádřená v jednotkách hmotnosti látky na objem disolučního média

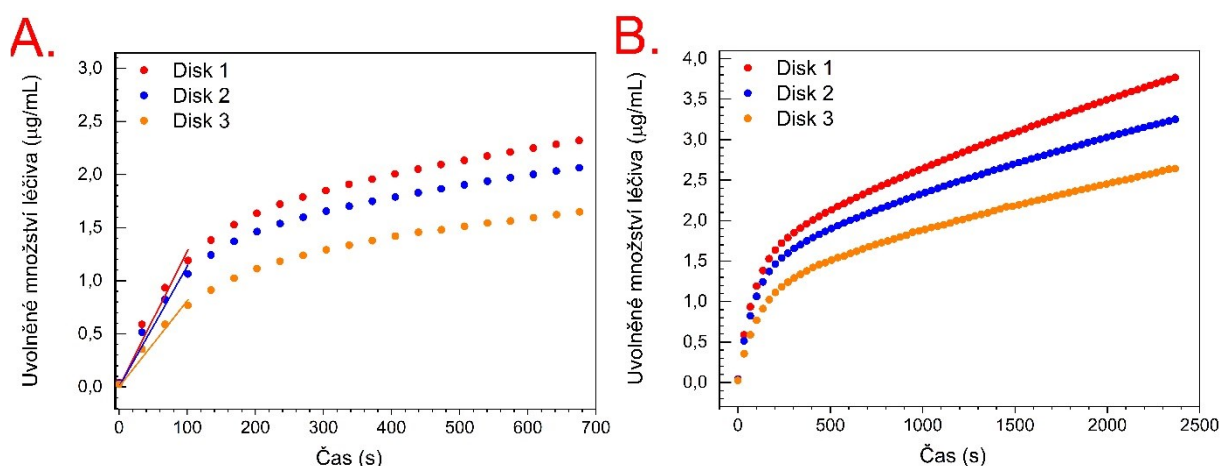
† XRPD byla měřena s odstupem jednoho dne od disolučního experimentu

Difraktogramy API před a po disolučním experimentu jsou uvedeny na Obrázku 42A (horní obrázek – amorfni forma ve formě plochého disku před disolučním experimentu, spodní obrázek – amorfni forma ve formě plochého disku po disolučním experimentu) a 42B (horní obrázek – krystalická forma ve formě plochého disku před disolučním experimentem, spodní obrázek – krystalická forma ve formě plochého disku po disolučním experimentu). Amorfni forma enzalutamidu je v difraktogramu prezentovaná jako difuzní pás – halo efekt. Naproti tomu krystalická forma je v práškovém difraktogramu charakterizována difrakčními liniemi, které svou pozici odpovídají polymorfni formě R1. Difrakční záznam polymorfni formy R1 obsahuje dle patentových informací následující difrakční linie<sup>107</sup>. Hlavní/nejintenzivnější difrakční linie krystalické formy R1 (často označované jako charakteristické) jsou: 12,3; 13,1; 15,0; 17,5±0,2 2θ. Dále pak XPRD záznam polymorfni formy R1 vykazuje řadu dalších (méně intenzivních) difrakčních píků: 9,8; 13,5; 14,3; 16,7; 18,9; 21,1; 21,8 a 24,4±0,2 2θ. XRPD záznam (Obrázek 42A) původně amorfni API (horní obrázek), která byla vystavena disolučnímu experimentu, obsahuje následující difrakční linie: 12,48; 13,22; 16,7; 14,6; 16,86; 19,14; 21,42; 21,98; 23,07; 24,6 2θ. Tyto difrakční linie mají poměrně malou intenzitu, převažuje halo efekt, nicméně difrakční linie odpovídají polymorfni formě R1. Vzorek je tedy z velké části amorfni a pravděpodobně na povrchu disku vykrytalizoval enzalutamid do polymorfni formy R1. V případě disku s krystalickou látkou se pozice difrakčních linií nezměnila, a tudíž se stále jedná o polymorfni formu R1.



Obrázek 42. Výsledky práškové rentgenové difrakce: A. amorfni API (červené křivky) měřené po slisování do disku (horní obrázek) a po proběhnutí disolučního experimentu (spodní obrázek), B. krystalické API (černé křivky) měřené po slisování do disku (horní obrázek) a po proběhnutí disolučního experimentu (spodní obrázek).

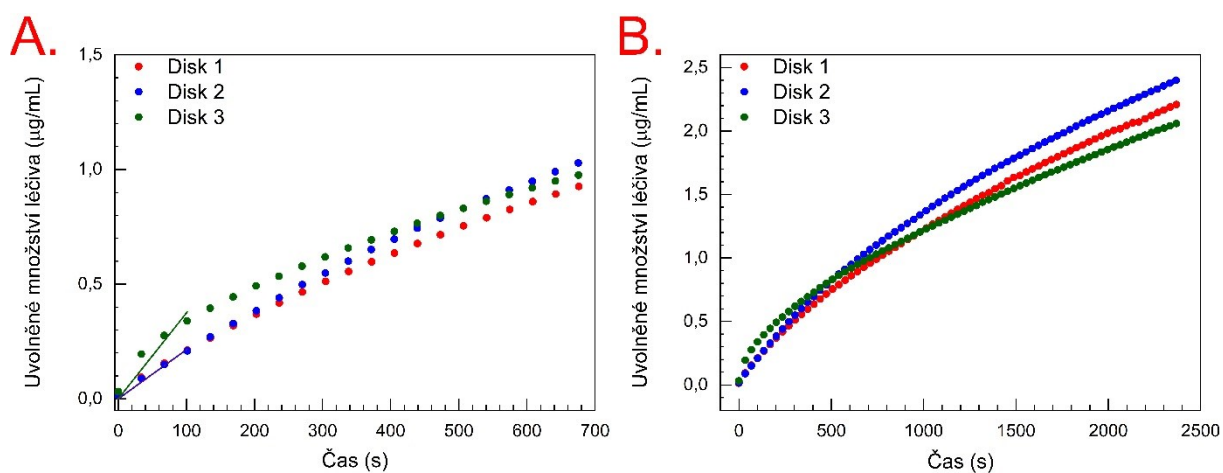
Výsledky vlastního disolučního experimentu amorfni a krystalické formy enzalutamidu ve formě rozpuštěného množství na objem disolučního média jsou uvedeny na Obrázcích 43 a 44. Rychlost rozpouštění byla vyhodnocována z lineárního úseku na počátku disoluční křivky (120 sekund) jako směrnice přímky. Výsledky lineární regrese jsou zobrazeny v Tabulce 23 a 24. Z výsledků je patrné, že rychlost rozpouštění amorfni formy připravené extruzí je 6krát vyšší než rychlost rozpouštění krystalické formy R1. Z Obrázku 43A lze rozpoznat změnu směrnice, respektive její snížení po 120 sekundách. Tato změna může být přisuzována částečné krystalizaci na povrchu disku. Z tohoto experimentu lze usoudit, že ačkoliv benefit amorfniho enzalutamidu je značný, je částečně negován poměrně rychlou krystalizací v disolučním médiu. Výsledky disoluce enzalutamidu v práškové formě jsou uvedeny v kapitole 3.2.2.



Obrázek 43. Pravá disoluce amorfniho enzalutamidu připraveného extruzí: A. Přiblížený úsek disolučního profilu, na který byla aplikována lineární regrese., B. Celý disoluční profil.

Tabulka 23. Výsledky lineární regrese disolučního profilu (120 s) amorfniho enzalutamidu připraveného extruzí.

Pokus	Rychlost rozpouštění ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$R^2$	pH	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Průměrná rychlost rozpouštění $\pm$ SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
1	53,62	0,9704	6,39 $\pm$ 0,09	36,9 $\pm$ 0,39	
2	48,20	0,9750	6,38 $\pm$ 0,10	36,9 $\pm$ 0,41	
3	39,89	0,9721	6,38 $\pm$ 0,09	36,8 $\pm$ 0,44	<b>47,54<math>\pm</math>5,65</b>



Obrázek 44. Pravá disoluce krystalického enzalutamidu formy R1: A. Přibližný úsek disolučního profilu, na který byla aplikována lineární regrese., B. Celý disoluční profil.

Tabulka 24. Výsledky lineární regrese disolučního profilu enzalutamidu krystalické formy R1

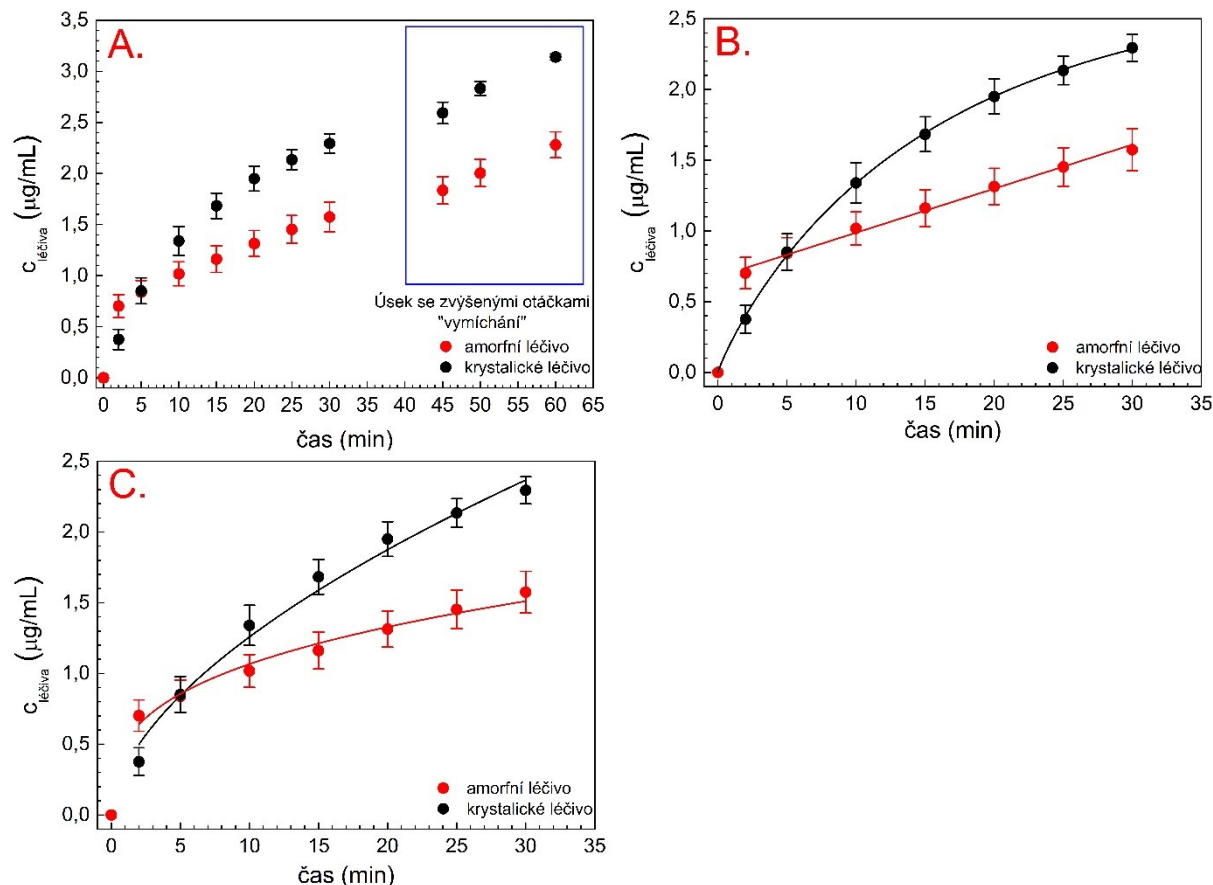
Pokus	Rychlost rozpouštění ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$R^2$ (-)	pH	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Průměrná rychlost rozpouštění ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
1	7,646	0,9946	6,3±0,11	36,9±0,39	<b>7,94±0,25</b>
2	7,863	0,9881	6,39±0,09	36,9±0,43	
3	8,323	0,9987	6,39±0,09	36,9±0,39	

### 3.2.2. Studium disolučního chování enzalutamidu během disoluce API v práškové formě

Pomocí pravé disoluce (viz kapitola 2.3.5, 3.2.1) byl ověřen rozdíl v rychlosti rozpouštění amorfni a krystalické API bez ohledu na formu vzorku (všechny vzorky byly stlačeny do formy disku). Poté bylo nutné otestovat chování amorfni a krystalické API ve formě, ve které budou použity pro přípravu tablet, tedy ve formě práškové. Disoluční profily amorfni (HME) a krystalické API v práškové formě získané při rychlosti otáček míchadla 50 (disoluční metoda 1, viz kapitola 2.3.6) a 100 min<sup>-1</sup> (disoluční metoda 2, viz kapitola 2.3.6), jsou zobrazeny na Obrázcích 45 a 46. Všechny profily byly proloženy kinetickým modelem I. a nultého řádu, modelem Weibull a Korsmeyer-Peppas. Výsledky lineární a nelineární regrese jsou uvedeny v Tabulkách 25-28. Disoluční profily proložené kinetickými modely, u nichž bylo dosaženo nejvyššího koeficientu determinace, jsou zobrazeny na Obrázcích 45 a 46. I přesto, že v případě modelu Korsmeyer-Peppas (viz kapitola 1.7.2.3, rovnice 22) bylo dosaženo poměrně vysokého koeficientu determinace, nemají získané hodnoty parametrů v tomto případě fyzikální odůvodnění. Jedná se totiž o rozpouštění čisté API a tento model je určen k objasnění mechanismu uvolňování API z polymerních matricových tablet. I tak lze prokazatelně identifikovat rozdíl parametrů pro amorfni a krystalickou API. V případě parametru  $n$  (tzv. „release exponent“) bylo dosaženo vyšší hodnoty u krystalické API v porovnání s amorfni formou, zatímco konstanta  $k_{KP}$  je vyšší u amorfni formy (viz Tabulka 25 - 28). I když se v tomto případě nejedná o uvolňování API z polymerního filmu (matrice), rozdílné hodnoty parametru  $n_{KP}$  a  $k_{KP}$  pravděpodobně naznačují rozdílný mechanismus i rychlost rozpouštění krystalické a amorfni API.

Disoluční profil krystalického materiálu v rozhodujícím časovém intervalu do 30 min. od počátku disoluce odpovídá kinetice I. řádu. Oproti tomu u amorfni API nejdříve dojde ke skokovému lineárnímu nárůstu koncentrace během prvních 120 sekund a poté dojde ke snížení směrnice přímky a rozpouštění následně odpovídá kinetice 0. řádu ve studovaném intervalu 30 min (viz Obrázek 45). Z výsledků regresní analýzy (Tabulky 25-28) a z disolučních profilů na Obrázku 45 vyplývá, že v případě práškového amorfniho materiálu nedochází k rychlejšímu rozpouštění API a není dosaženo vyššího rozpuštěného množství ve srovnání s krystalickým materiálem. Amorfni materiál se rozpouští dle kinetiky 0.řádu stejně jako v případě pravé disoluce (výsledky viz kapitola 3.2.1), což může být způsobeno faktem, že dochází k postupnému rozpouštění z větší plochy (tedy k rozpouštění větších částic) nebo z pravidelných ploch. Při vizuálním sledování průběhu disoluce bylo zjištěno, že na počátku

disolučního experimentu dochází k rychlému rozpuštění jemných částic a téměř okamžitému vzniku větších agregátů. Došlo tedy k precipitaci. Vzniklý shluk částic byl dále analyzován a výsledky jsou shrnuty níže. Stejně disoluční chování bylo zaznamenáno při rychlostech míchadla 50 i 100  $\text{min}^{-1}$  (viz Obrázek 45 a 46, Tabulka 25-28).



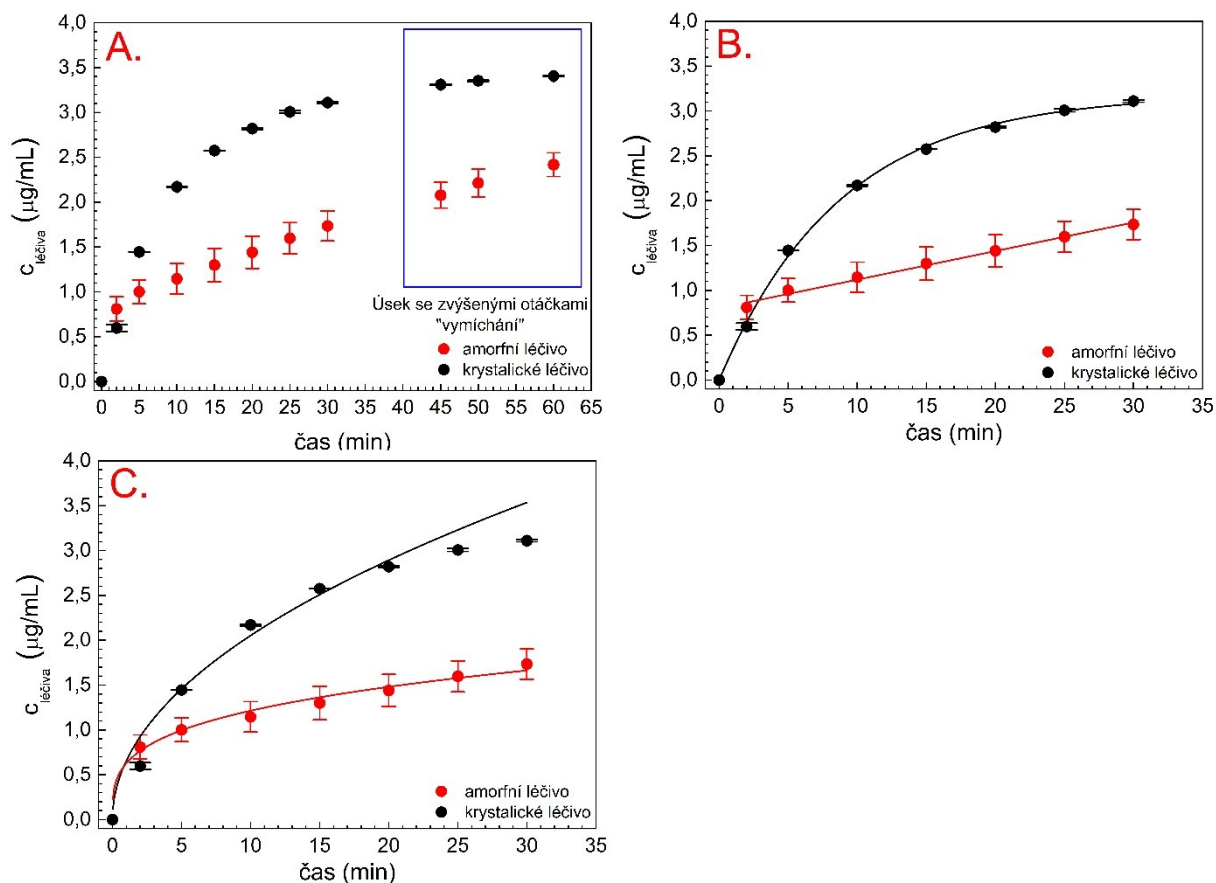
Obrázek 45. Disoluční profil amorfního a krystalického (polymorfni forma R1) enzalutamidu získaný při podmínkách disoluční metody 1 (50  $\text{min}^{-1}$ /45 minut/150  $\text{min}^{-1}$ /15 minut): A. Celý disoluční profil v procentech uvolněného množství API, včetně úseku se zvýšenou rychlostí otáček míchadla (150  $\text{min}^{-1}$ ), B. Disoluční profil úseku s rychlostí otáček 50  $\text{min}^{-1}$  proložený kinetickým modelem I. řádu v případě krystalické API a kinetikou 0.řádu v případě amorfni API; C. Disoluční profily proložené modelem Korsmeyer-Peppas.

Tabulka 25. Výsledky nelineární regrese (model Weibull, model kinetiky I. řádu, model kinetiky 0.řádu, model Korsmeyer-Peppas) disolučního profilu krystalické formy enzalutamidu (polymorfní formy R1) z disolučního experimentu v 72,4mM fosfátovém pufru o pH 6.5 s 0,005 % w/V při rychlosti otáček 50 min<sup>-1</sup> (disoluční metoda 1, kapitola 2.3.6).

Parametry	Kinetický model								
	model Weibull			kinetika I. řádu		kinetika 0. řádu		model Korsmeyer-Peppas	
	A <sub>∞</sub> (μg·ml <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-β</sup> )	β (-)	A <sub>∞</sub> (μg·ml <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-1</sup> )	k (μg· ml <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	C (úsek)	n <sub>KP</sub> (-)	k <sub>KP</sub> (min <sup>-n</sup> )
	2,80±0,093	0,12±0,009	1.11±0,074	2,51±0,051	0,08±0,004	0,07±0,007	0,46±0,138	0,58±0,044	0,33±0,044
R <sup>2</sup> (-)		0,9951			0,9989		0,9456		0,9878

Tabulka 26. Výsledky nelineární regrese (model Weibull, model kinetiky I. řádu, model kinetiky 0.řádu, model Korsmeyer-Peppas) disolučního profilu amorfni formy enzalutamidu (HME) z disolučního experimentu v 72,4mM fosfátovém pufru o pH 6.5 s 0,005 % w/V při rychlosti otáček 50 min<sup>-1</sup> (disoluční metoda 1, kapitola 2.3.6).

Parametry	Kinetický model						
	model Weibull	kinetika I. řádu		kinetika 0. řádu		model Korsmeyer-Peppas	
		A <sub>∞</sub> (μg·ml <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-1</sup> )	k (μg· ml <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	C (úsek)	n <sub>KP</sub> (-)	k <sub>KP</sub> (min <sup>-n</sup> )
	Nekoverguje ke konečné hodnotě.						
		1,41±0,112	0,18±0,055	0,03±0,001	0,68±0,019	0,32±0,024	0,51±0,035
R <sup>2</sup> (-)	0		0,73773		0,9930		0,9767



Obrázek 46. Disoluční profil amorfniho a krystalického (polymorfni forma R1) enzalutamidu získaný při podmínkách disoluční metody 2 (100 min<sup>-1</sup>/45 minut/150 min<sup>-1</sup>/15 minut): A. Celý disoluční profil v procentech uvolněného množství API, včetně úseku se zvýšenou rychlostí otáček míchadla (150 min<sup>-1</sup>), B. Disoluční profil úseku s rychlostí otáček 50 min<sup>-1</sup> proložený kinetickým modelem I. řádu v případě krystalické API a kinetikou 0.řádu v případě amorfni API; C. Disoluční profily proložené modelem Korsmeyer-Peppas.

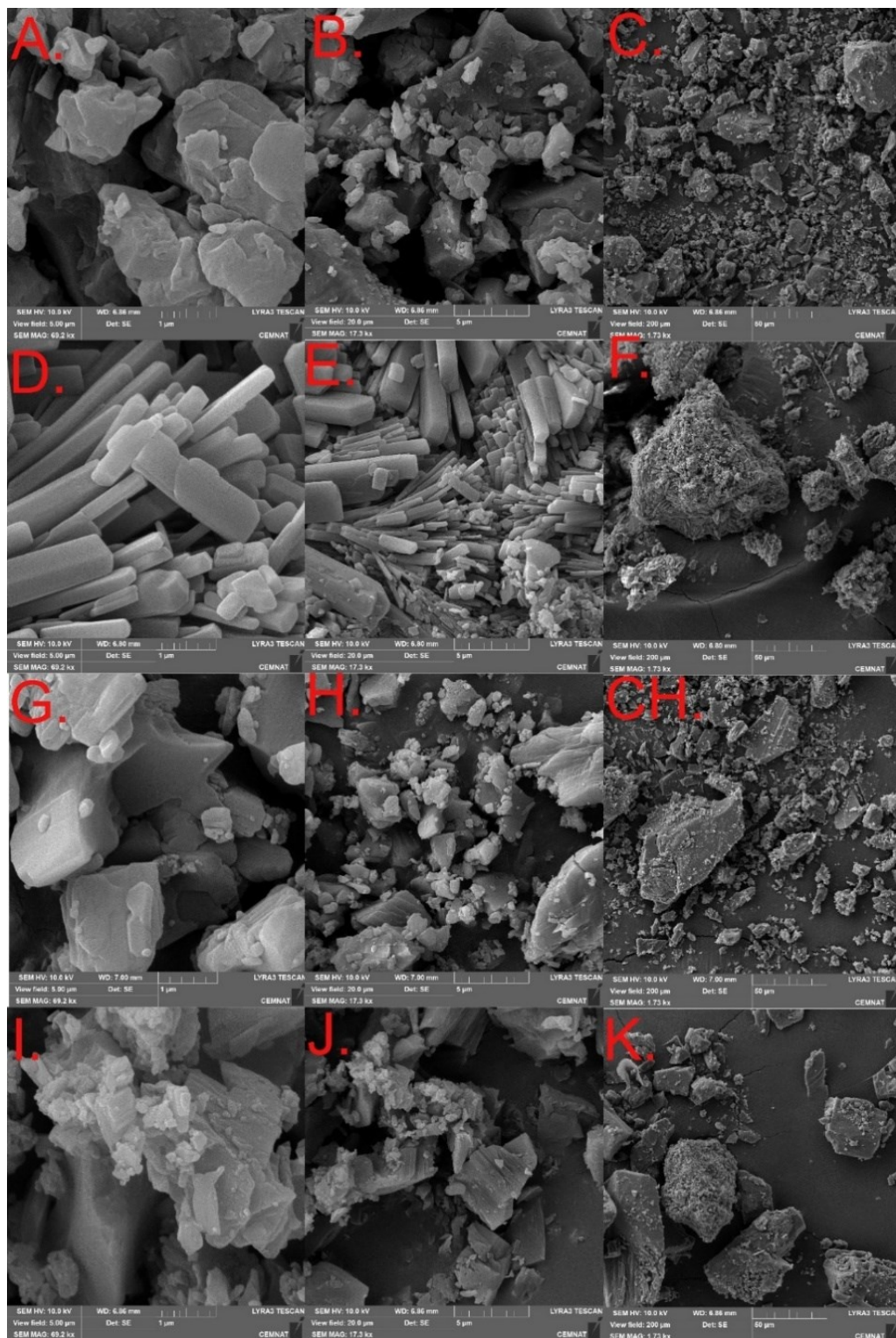
Tabulka 27. Výsledky lineární a nelineární regrese (model Weibull, model kinetiky I. řádu, model kinetiky 0.řádu, model Korsmeyer-Peppas) pro disoluční profil krystalické formy enzalutamidu (polymorfni forma R1) ve 72,4mM fosfátovém pufru o pH 6.5 s 0,005 % w/V při rychlosti otáček 100 min<sup>-1</sup> (disoluční metoda 2, kapitola 2.3.6).

Parametry	Kinetický model								
	model Weibull			kinetika I. řádu		kinetika 0. řádu		model Korsmeyer-Peppas	
	A <sub>∞</sub> (μg·ml <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-β</sup> )	β (-)	A <sub>∞</sub> (μg·ml <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-1</sup> )	k (μg· ml <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	C (úsek)	n <sub>KP</sub> (-)	k <sub>KP</sub> (min <sup>-n</sup> )
	2,86±0,074	0,11±0,007	1,05±0,065	2,92±0,053	0,11±0,006	0,09±0,016	0,59±0,217	0,47±0,098	0,56±0,072
R <sup>2</sup> (-)		0,9982			0,9980		0,8698		0,9486

Tabulka 28. Výsledky lineární a nelineární regrese (model Weibull, model kinetiky I. řádu, model kinetiky 0.řádu, model Korsmeyer-Peppas) pro disoluční profil amorfni formy enzalutamidu (HME) ve 72,4mM fosfátovém pufru o pH 6.5 s 0,005 % w/V při rychlosti otáček 100 min<sup>-1</sup> (disoluční metoda 2, kapitola 2.3.6).

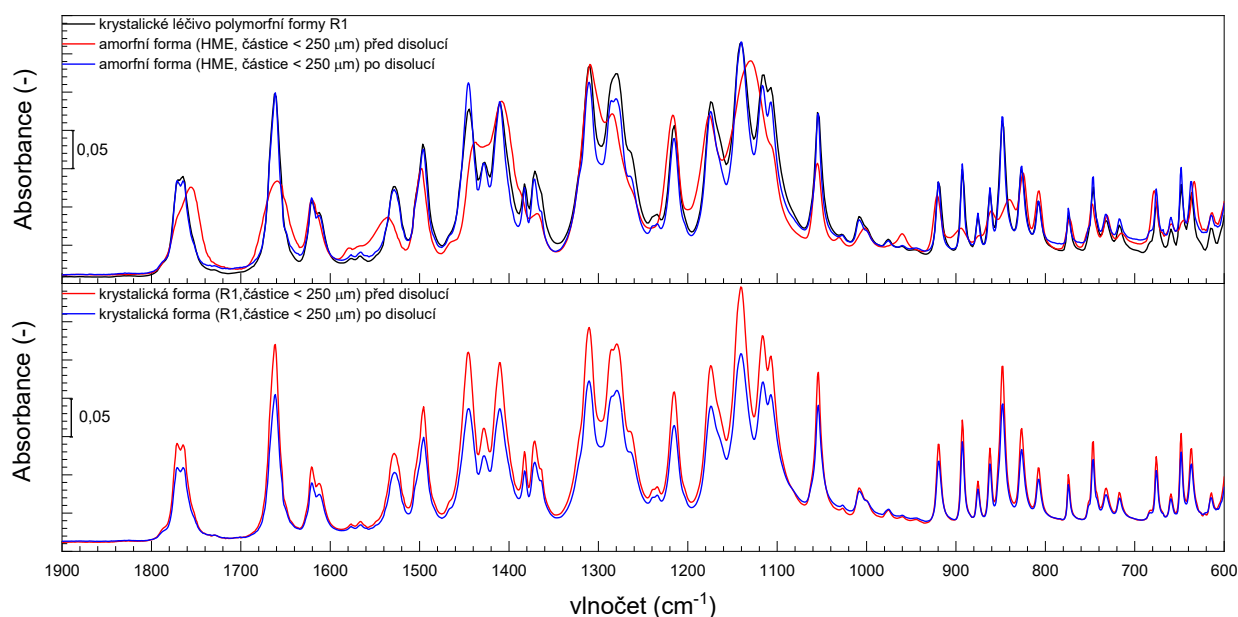
Parametry	Kinetický model						
	model Weibull	kinetika I. řádu		kinetika 0. řádu		model Korsmeyer-Peppas	
		A <sub>∞</sub> (μg·ml <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-1</sup> )	k (μg· ml <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	C (úsek)	n <sub>KP</sub> (-)	k <sub>KP</sub> (min <sup>-n</sup> )
	Nekoverguje ke konečné hodnotě.						
		1,51±0,100	0,23±0,064	0,03±0,002	0,81±0,025	0,29±0,0212	0,63±0,037
R <sup>2</sup> (-)	0		0,8894		0,9889		0,9728

Obrázek 47 shrnuje snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. Snímky potvrzují, že dochází k výrazné změně tvaru původně amorfních částic během disolučního experimentu. Zatímco amorfní částice před disolučním experimentem (Obrázek 47– A, B, C.) nevykazují známky pravidelnosti, částice po disolučním experimentu (Obrázek 47 – D, E, F) vypadají jako shluky částic či větší částice obalené pravidelnými tyčinkami o velikosti jednotek mikrometrů. Jádro „obalených“ částic může být stále ještě amorfní, avšak tyčinky na povrchu s velkou pravděpodobností přísluší krystalické fázi. V případě původně krystalického materiálu nedochází ke změně tvaru částic během disolučního experimentu. Je nutné poznamenat, že tvar původního krystalického materiálu (Obrázek 47 – G, H, CH) není nijak pravidelný, což může být způsobeno intenzivním mletím připraveného materiálu. Není vyloučeno, že došlo k amorfizaci na povrchu částic. V patentové přihlášce (Farmaceutická kompozice krystalického enzalutamidu a způsob její přípravy) náležící firmě Zentiva, k.s. je uveden obrázek nepomletého materiálu enzalutamidu polymorfní formy R1, který má tvar pravidelných kvádrů<sup>108</sup>. Z výše uvedených informací vyplývá, že amorfní enzalutamid velmi rychle krystalizuje, což je podpořeno vysokým specifickým povrchem materiálu v případě, že se provádí prášková disoluce. Krystalizace vzorku byla potvrzena i dalšími technikami uvedenými níže.



Obrázek 47. SEM snímky práškového amorfního materiálu před disolucí, s měřítkem: A. 1 μm, B. 5 μm, C. 50 μm; práškového amorfního materiálu po disolucí, s měřítkem: D. 1 μm, E. 5 μm, F. 50 μm, práškového krystalického materiálu před disolucí, s měřítkem: G. 1 μm, H. 5 μm, CH. 50 μm; práškového krystalického materiálu po disolucí, s měřítkem: I. 1 μm, J. 5 μm, K. 50 μm.

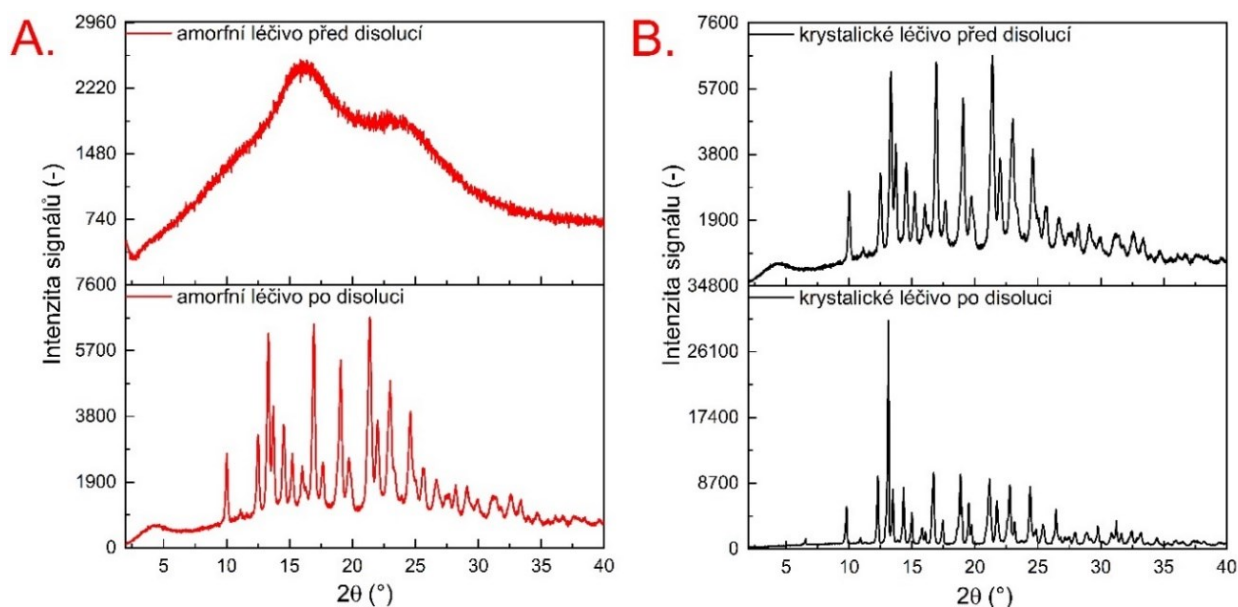
Infračervenou spektroskopií bylo potvrzeno, že se před i po disolučním experimentu jedná stále o stejnou chemickou entitu, tj. o enzalutamid. Zároveň však dochází u amorfní API ke změně fyzikální formy, tj. ke krystalizaci. Rozdíl mezi amorfní a krystalickou formou je patrný posunem polohy maxima absorpčních pásů (například posun absorpčního pásu valenční vibrace karbonylové skupiny C=O u 1756–1763  $\text{cm}^{-1}$ ) a jejich šířkou, jak je zřejmé z Obrázku 48. Výsledky infračervené spektroskopie ukazují, že velká část původně amorfní API je po disolučním experimentu krystalická. Za účelem ověření, zda je vzorek zcela krystalický, byly použity prášková rentgenová difrakce a diferenční skenovací kalorimetrie.



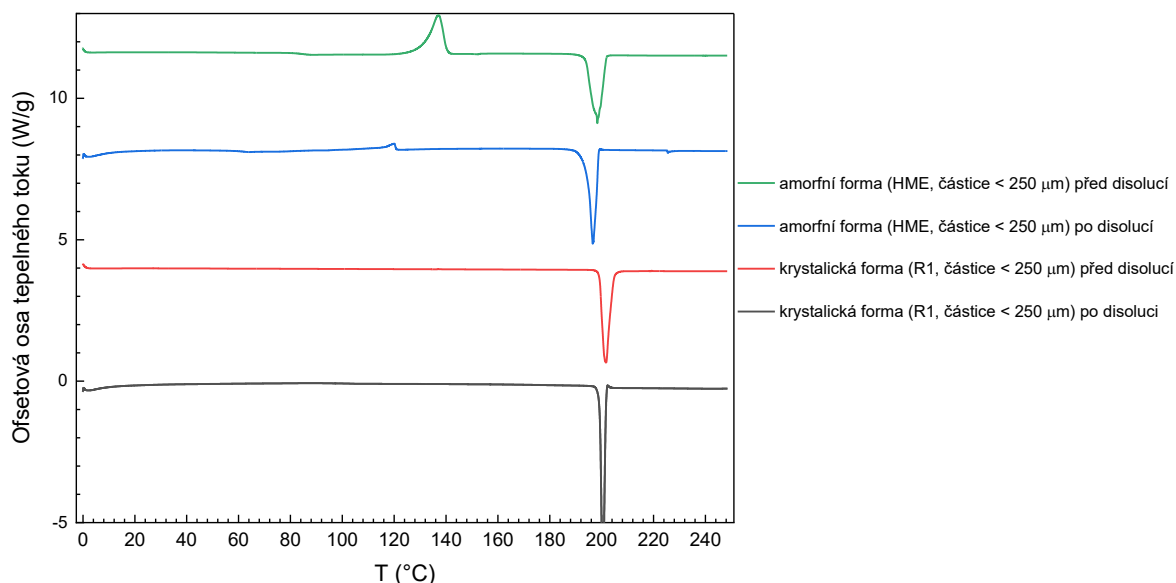
Obrázek 48. Infračervená spektra práškových materiálů (amorfni forma - horní obrázek, krystalická forma - spodní obrázek) před (červená křivka) a po (modrá křivka) disolučním testu. V horním obrázku obsahujícím spektra amorfni formy enzalutamidu před a po disoluci, je zobrazeno navíc referenční spektrum polymorfní formy R1.

Prášková rentgenová difrakce (Obrázek 49) potvrdila, že disoluční zbytek původně amorfni API je po disolučním experimentu z majoritní části krystalický. Této krystalické formě přísluší následující hlavní/neintenzivnější difrakční linie: 12,48; 13,28; 15,20; 16,98 2 $\theta$ . Dále difrakční záznam obsahuje další méně intenzivnější difrakční linie: 10,02; 13,67; 14,52; 16,7; 19,1; 21,48; 21,90; 23,00; 24,7; 24,6 2 $\theta$ . Tento difrakční záznam odpovídá polymorfní formě R1 popsané v patentu WO2014/041487<sup>107</sup>. Zároveň difraktogramy materiálů před disolucí ukazují, že došlo pravděpodobně k částečné (minoritní) amorfizaci krystalického enzalutamidu během mletí při přípravě práškového materiálu k disoluci. Plyne to z toho, že v difraktogramu je zachycen nízký halo efekt, ale převažují difrakční linie polymorfní formy R1. Tento materiál je po disoluci plně krystalický, přičemž XRPD záznam stále odpovídá

polymorfni formě R1. Výsledky DSC měření vzorků před a po disoluci jsou zobrazeny na Obrázku 50 a v Tabulce 29. U krystalické API se jedná před i po disolučním experimentu o polymorfni formu R1. Polymorfni forma R1 má dle literatury teplotu tání 196 °C (onset) s entalpií tání 76 J·g<sup>-1</sup>. Obrázek 50 rovněž zobrazuje DSC křivku amorfni formy před a po disoluci. Před disolucí je materiál plně amorfni, což bylo potvrzeno pomocí IČ i XRPD. Na základě DSC dat, tedy poměru entalpie krystalizace a tání (Tabulka 29) bylo stanoveno, že disoluční zbytek z původně amorfni API je po disoluci pravděpodobně ze 76 % krystalický. Tedy, malá část vzorku zůstává stále amorfni. Maximum tání je posunuto o 2–4 °C k nižším teplotám, to může být však způsobeno morfologií či velikostí krystalů, neboť XRPD potvrdilo, že se jedná o polymorfni formu R1.



Obrázek 49. Výsledky práškové rentgenové difrakce: A. amorfni API ve formě prášku před (horní obrázek) a po (dolní obrázek) disolučním testu, B. krystalická API ve formě prášku před (horní obrázek) a po (dolní obrázek) disolučním testu.



Obrázek 50. DSC křivky práškového (částice < 250  $\mu\text{m}$ ) enzalutamidu amorfni formy před (zelená křivka) a po (modrá křivka) disolučním experimentu a krystalické formy R1 (částice < 250  $\mu\text{m}$ ) před (červená křivka) a po (černá křivka) disolučním experimentu. DSC data byla získána rychlostí ohřevu 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . DSC křivky byly posunuty.

Tabulka 29. Termická charakteristika vzorků před a po disoluci určená na základě DSC dat.

Specifikace vzorku	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{c,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_{m,max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ (J/g)
<b>Amorfni API před disolucí</b>	84,2	137,1	53,5	198,3	70,3
<b>Amorfni API po disoluci</b>	60,6	120,0	12,6	196,5	66,2
<b>Krystalické API před disolucí</b>	–	–	–	201,4	75,1
<b>Krystalické API po disoluci</b>	–	–	–	200,5	68,7

Výše uvedené výsledky je možno shrnout následovně. Vizualně bylo zjištěno, že během disolučního experimentu amorfni API dojde k náhlému rozpuštění částic a okamžitě se objeví větší shluky. Dojde tedy k precipitaci amorfni fáze, která následně vykrytalizuje na povrchu a uprostřed zůstane pravděpodobně amorfni. XRPD a DSC měření potvrdilo, že minoritní část vzorku po disoluci je stále amorfni, což potvrzuje zmíněnou teorii. Krytalizaci amorfniých precipitátů, které mohou ještě stále zvyšovat biodostupnost, je potřeba zabránit. To je možné použitím polymeru, který na základě molekulárních interakcí může udržet API v rozpuštěném či amorfni stavu. Takto je možno dosáhnout podobné efektivity, jaká byla stanovena na základě pravé disoluce.

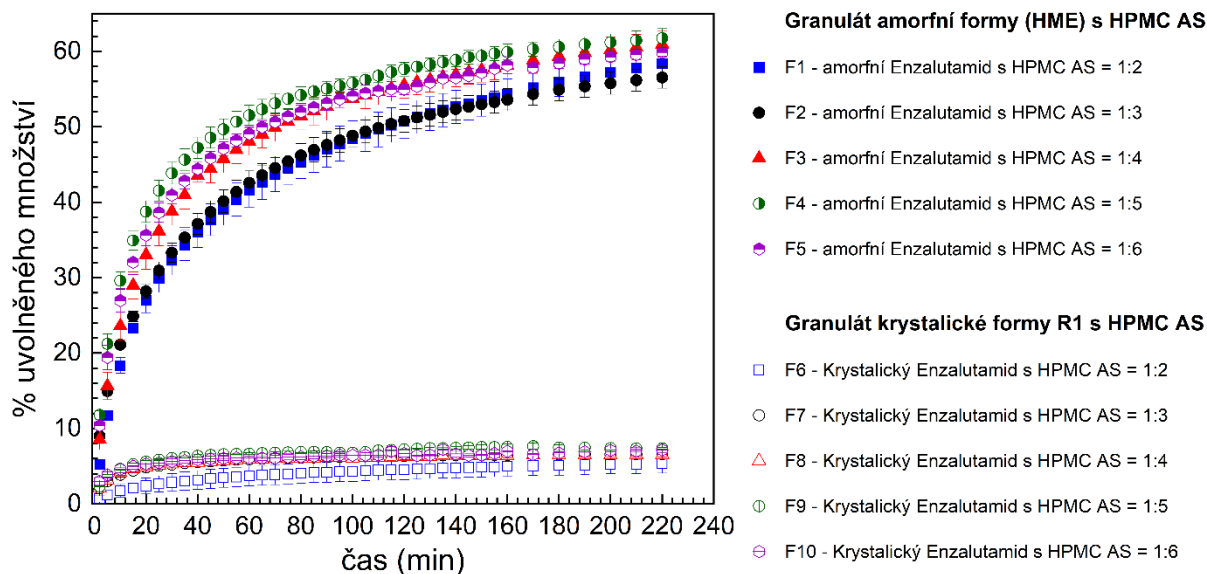
### 3.2.3. Disoluční chování enzalutamidu v přítomnosti HPMC AS

#### 3.2.3.1. Disoluce granulátů enzalutamidu s HPMC AS

V předchozích kapitolách 3.2.1. a 3.2.2. byl zřetelně ukázán rozdíl mezi amorfni a krystalickou formou enzalutamidu a rovněž fakt, že po rozpuštění amorfni formy následuje velmi rychlá precipitace amorfni fáze s následnou krystalizací. Tímto se benefit amorfni formy nevyhnutelně ztrácí. Chceme-li využít potenciál amorfni formy, musíme do pevné lékové formy přidat polymer, jenž bude stabilizovat API v rozpuštěné či amorfni formě. V našem případě byly připraveny granuláty API dané pevnofázové formy s hydroxypropylmethylcelulózou acetylsukcinátem (HPMC AS). HPMC AS byla zvolena ze dvou důvodů: 1) je použita v originálním léku XTANDI<sup>68</sup>, 2) jedná se o polymer schopný vytvářet interakce s účinnou látkou, jež jsou schopny udržet API v přesyceném stavu a tím inhibovat krystalizaci<sup>109,110</sup>. Tento způsob udržení enzalutamidu v přesyceném stavu pomocí vodíkových interakcí s polymerem byl popsán mimo jiné v patentech, viz kapitola 1.6.

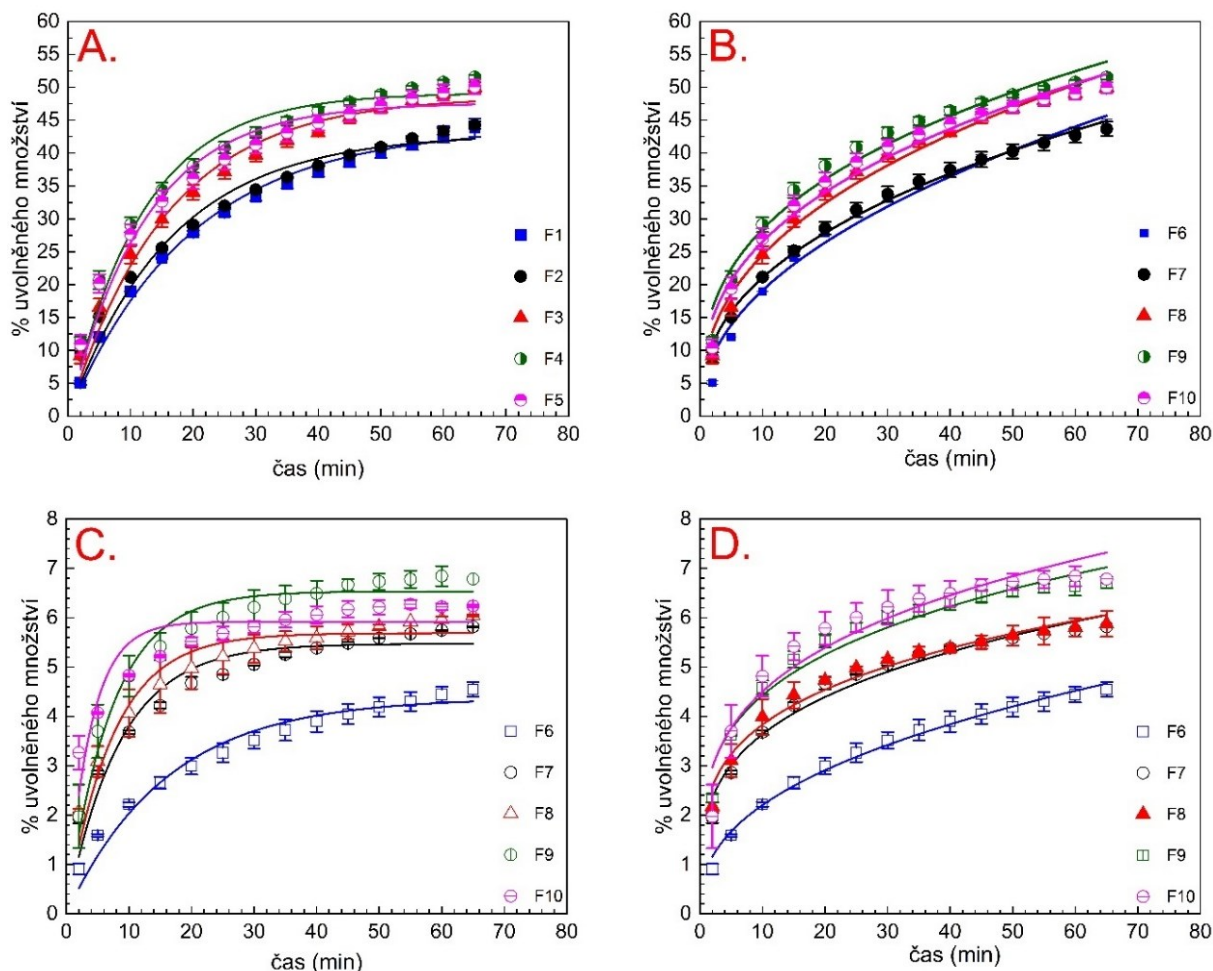
V rámci této disertační práce byla zvolena HPMC AS typu MF za účelem rychlého rozpuštění polymeru v disolučním médiu (pH = 6,8), kde dochází k interakci polymeru s API a polymer je následně schopen udržet API v přesyceném stavu. Označení **M** znamená, že HPMC AS je rozpustná ve středním pH a **F** označuje jemné částice. K disolučnímu testování byly připraveny granuláty API pouze s polymerem (v různých poměrech) s cílem nezanášet další proměnné ve formě dalších excipientů v lékové formě. V patentové přihlášce Obádalová a kol<sup>108</sup> bylo popsáno, že i rozpustnost krystalického enzalutamidu může být zvýšena na úroveň tuhého roztoku, a to mletím s různými excipienty. Tímto experimentem by měl být objasněn pouze vliv polymeru na udržení přesyceného stavu. K rozpuštění polymeru musí dojít velmi rychle, aby byla možná interakce API-polymer. Kromě polymeru tedy granulát obsahoval 2 % rozvolňovadla, protože HPMC AS je dobře lisovatelná a bez použití rozvolňovadla by mohlo dojít k vytvoření pevných částic, které se nebudou rozpadat a nebudou splňovat podmínky okamžitého uvolnění.

Granuláty byly připraveny v poměru 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 a 1:6 ve prospěch polymeru, složení granulátů je popsáno v kapitole 2.3.2, v Tabulce 5. Na Obrázku 51 jsou zobrazeny disoluční křivky granulátů zmíněného složení, a to jak s amorfni, tak s krystalickým enzalutamidem. Z disolučních profilů na obrázku 51 je možné pozorovat významný vliv polymeru na disoluční chování amorfniho granulátu – krystalizace API během disoluce byla polymerem potlačena, o čemž svědčí výrazně vyšší uvolněné množství API z amorfniho granulátu ve srovnání s krystalickým enzalutamidem.



Obrázek 51. Disoluční křivky granulátů složeného z amorfniho (HME) či krystalického (polymorfni forma R1) enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 a 1:6. Formulace navíc obsahuje 2 hm. % kroskarmelózy sodné.

Disoluční křivky granulátů s amorfniím (F1, F2, F3, F4, F5) a krystalickým (F6, F7, F8, F9, F10) enzalutamidem byly proloženy kinetickým modelem I. řádu (Obrázek 52A, 52C) a modelem Korsmeyer-Peppas (Obrázek 52B, 52D). Kinetické modely byly aplikovány na disoluční úsek 60 minut, kde dochází k nejvýraznější změně směrnice disoluční křivky, což je důležité z pohledu vyhodnocení disoluční rychlosti. Výsledky nelineární regrese jsou uvedeny v Tabulkách 30 a 31.



Obrázek 52. Disoluční data (disoluční úsek 60 minut) proložená vybraným kinetickým modelem: A. Disoluční křivky granulátů (F1–F5) s amorfnní API (HME) proložené kinetickým modelem I. řádu, B. Disoluční křivky granulátů (F1–F5) s amorfnní API (HME) proložené modelem Korsmeyer-Peppas, C. Disoluční křivky granulátů (F6–F10) s krystalickou API (polymorfnní formy R1) proložené kinetickým modelem I. řádu, D. Disoluční křivky granulátů (F6–F10) s krystalickou API (polymorfnní formy R1) proložené modelem Korsmeyer-Peppas.

Tabulka 30 uvádí výsledky nelineární regrese pro kinetický model I.řádu aplikovaný na disoluční křivky formulací F1–F10. Z výsledků je patrné, že u formulace F1 (s amorfnním enzalutamidem) bylo dosaženo nejvyššího koeficientu determinace ( $R^2 = 0,9895$ ), což svědčí o dobré shodě kinetického modelu I. řádu s daným disolučním profilem.

U formulace F10 (s krystalickým enzalutamidem) byla zjištěna nízká hodnota koeficientu determinace ( $R^2 = 0,7811$ ) pro kinetický model I. řádu, z čehož lze usuzovat, že se enzalutamid z této formulace uvolňuje pravděpodobně na základě jiného mechanismu. Z Obrázku 52 i z výsledků nelineární regrese (Tabulka 30) je zřejmé, že se stoupajícím množstvím polymeru vzrůstá hodnota rychlostní konstanty a to v případě amorfnního i krystalického enzalutamidu. Z výsledků pro disoluční úsek 60 minut dále vyplývá, že se

v případě amorfni formy rozpustilo 7,5 –10krát více enzalutamidu než v případě krystalické formy (viz Tabulka 30, poměr uvolněného množství v 60 minutách). Tato hodnota byla stanovena jako poměr množství enzalutamidu uvolněného z granulátu obsahujícího amorfni formu API ku množství uvolněného z granulátu obsahujícího krystalickou formu API. Obvykle se experimentální poměr rozpustností amorfni a krystalické API stanovuje na základě shake-flask metody aplikované na obě formy<sup>37</sup>. Ale jelikož amorfni forma může krystalizovat velmi rychle je možné zdánlivou rozpustnost neboli kinetickou rozpustnost amorfni formy určit z disoluční křivky jako hodnotu, kde bylo na počátku dosaženo nejvyšší rozpustnosti alternativně jako hodnotu rozpuštěného množství, která byla udržena. Poměr rozpustností amorfni a krystalické fáze  $R_s$  je pak určován jako poměr zdánlivé rozpustnosti amorfni fáze k rovnovážné rozpustnosti krystalické formy (stanovené na základě shake-flask metody)<sup>34,35</sup>. V této disertační práci, v rámci této studie, nebyla použita shake-flask metoda, neboť bylo cílem zamezit krystalizaci API během disoluce a nalézt vhodný poměr API:polymer. Uvedený poměr uvolněného množství (7,5 – 10) byl stanoven z disoluční křivky pro konkrétní složení formulace za účelem znázornění prokazatelné výhody rozpustnosti amorfni formy. Disoluční křivky obou forem byly porovnávány za stejných disolučních podmínek (teplota, pádelková metoda, množství polymeru atd.). Bylo zde tedy prokázáno, že zdánlivá rozpustnost enzalutamidu v amorfni formě je pravděpodobně několikrát vyšší než rozpustnost krystalické formy enzalutamidu. Tabulka 31 uvádí hodnoty celkového uvolněného množství enzalutamidu z granulátů s amorfním i krystalickým enzalutamidem během 220 minut. Experimentálně bylo tedy stanoveno, že v případě použití amorfniho enzalutamidu v kombinaci s HPMC AS se uvolní 7,9 –9,6krát více API než v případě použití její krystalické formy.

Přítomnost polymeru, respektive jeho koncentrace, má nepatrný vliv na maximální množství uvolněné API dosažené v jednotlivých poměrech. Rozdíl v množství uvolněné API mezi krajními poměry je 3,8 hm. % v případě amorfni formy (mezi formulacemi F1 a F5) a 1,5 hm. % v případě polymorfni formy R1 (mezi formulacemi F6 a F10). Množství polymeru obsaženého v granulátu s krystalickým enzalutamidem (F6–F10) má významný vliv na hodnotu rychlostní konstanty. Grafické znázornění závislosti rychlostní konstanty a maximálního uvolněného množství po 60 minutách na obsahu polymeru v disolučním médiu je uvedeno na Obrázku 53A–B. Obsah polymeru je vztažen na objem disolučního média, neboť předpokládáme, že dojde k jeho úplnému rozpuštění během disolučního experimentu. Z Obrázku 53B lze zřetelně vidět vliv polymeru na množství uvolněného enzalutamidu.

Zároveň nejvyššího rozpuštěného množství bylo dosaženo v poměrech (enzalutamid:HPMC AS) 1:4 (F3), 1:5 (F4) a 1:6 (F5). Z Obrázku 53A vyplývá, že nejvyšší hodnoty rychlostní konstanty u granulátu s amorfním enzalutamidem bylo dosaženo v poměrech 1:5 (F4) a 1:6 (F5). V tabulce 30 je rovněž uveden poměr rychlostní konstanty amorfni a krystalické formy enzalutamidu. Z uvedeného vyplývá, že rychlostní konstanta uvolňování krystalického enzalutamidu je minimálně dvakrát větší než rychlostní konstanta amorfního enzalutamidu. I přesto, že se amorfni enzalutamid rozpouští pomaleji, je díky HPMC AS zamezeno jeho krystalizaci a dosaženo vyššího uvolněného množství než v případě krystalického enzalutamidu.

Tabulka 30. Výsledky nelineární regrese disolučních profilů (kinetický model I. řádu) granulátů proložených v časovém intervalu 60 minut od počátku disoluce.

složení granulátu			parametry kinetického modelu I. řádu			poměr uvolněného množství	poměr rychlostních konstant
F	forma API	Poměr enzalutamid: HPMC AS	A <sub>60min</sub> (%)	k (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup> (-)	$\frac{A_{\infty,amorf}}{A_{\infty,krystal}}$	$\frac{k_{amorf}}{k_{krystal}}$
F1	amorfní	1:2	43,86±0,64	0,05±0,002	0,9895	10,01	0,83
F6	krystalická	1:2	4,38±0,10	0,06±0,005	0,9524		
F2	amorfní	1:3	42,94±0,86	0,06±0,004	0,9643	7,85	0,5
F7	krystalická	1:3	5,47±0,09	0,12±0,009	0,9174		
F3	amorfní	1:4	48,61±0,80	0,06±0,004	0,9756	8,54	0,43
F8	krystalická	1:4	5,69±0,10	0,14±0,010	0,9023		
F4	amorfní	1:5	49,16±0,72	0,08±0,005	0,9649	7,53	0,57
F9	krystalická	1:5	6,53±0,09	0,14±0,011	0,9338		
F5	amorfní	1:6	47,64±0,81	0,08±0,005	0,9564	8,06	0,31
F10	krystalická	1:6	5,91±0,09	0,26±0,028	0,7811		

Tabulka 31. Uvolněné množství enzalutamidu během 220 minut disolučního testu a experimentálně stanovený poměr Rs na základě uvolněného množství API z formulací s amorfním a krystalickým enzalutamidem (poměr množství enzalutamidu uvolněného z granulátu s amorfni API a množství uvolněného z granulátu s krystalickou API).

poměr Enzalutamid:HPMC AS	A <sub>220 min</sub> (granulát s amorfni API) ±SD (%)	A <sub>220 min</sub> (granulát s krystalickou API) ±SD (%)	experimentálně stanovený poměr Rs
1:2	58,37±1,45	6,08±0,14	9,600
1:3	55,84±1,28	6,59±0,16	8,480
1:4	60,92±1,42	6,53±0,25	9,336
1:5	56,45±0,47	7,17±0,38	7,868
1:6	59,85±0,42	7,16±0,27	8,363

Disoluční křivky granulátů F1–F10 byly proloženy rovněž modelem Korsmeyer-Peppas (Obrázek 52B, 52D) za účelem objasnění mechanismu uvolňování. Výsledky nelineární regrese jsou shrnuty v Tabulce 32. Z tabulky vyplývá, že ve všech poměrech u granulátu s amorfním enzalutamidem (F1–F5) bylo dosaženo vysokého koeficientu determinace ( $R^2 = 0,9564 - 0,9895$ ), což dokládá dobrou shodu s výše uvedeným modelem. U disolučních křivek granulátu s krystalickým enzalutamidem dochází k postupnému snižování koeficientu determinace s rostoucím množstvím polymeru. Parametry modelu Korsmeyer-Peppas pro formulace F1–F10 jsou uvedeny v Tabulce 32. Z výsledků vyplývá, že se jedná o mechanismus uvolňování řízený difuzí, neboť hodnoty „release exponentu“ (vysvětlení parametru viz kapitola 1.7.2.3, model Korsmeyer-Peppas) mají nižší hodnotu než 0,5, která je hraniční. U vyšších hodnot by docházelo ke kombinaci difuze a kinetiky 0.řádu<sup>100</sup>. Grafické závislosti konstanty  $k_{KP}$  a „release exponentu“  $n_{KP}$  (vysvětlení parametrů viz kapitola 1.7.2.3, model Korsmeyer-Peppas) na množství polymeru v disolučním médiu jsou uvedeny na Obrázcích 53C a 53D. U amorfni i krystalické API dochází se zvyšujícím se množstvím polymeru k téměř lineárnímu nárůstu konstanty  $k_{KP}$ . Vyššího zvýšení a vyšší hodnoty rychlostní konstanty bylo dosaženo v případě granulátů s amorfním enzalutamidem. Hodnota  $k_{KP}$  dosahovala od 6,54 min<sup>-n</sup> u F1 (poměr enzalutamid:HPMC AS – 1:2) do 11,63 min<sup>-n</sup> (poměr enzalutamid:HPMC AS – 1:6). U granulátů obsahujících krystalický Enzalutamid je hodnota  $k_{KP}$  v rozmezí od 0,87 min<sup>-n</sup> u F6 (poměr enzalutamid:HPMC AS – 1:2) do 2,51 min<sup>-n</sup> u F10 (poměr enzalutamid:HPMC AS – 1:6). Naopak hodnota „release exponentu“ se v obou případech snižuje s množstvím HPMC AS. U formulací F1–F5 (obsahující amorfni API) lze vidět téměř lineární pokles hodnoty  $n_{KP}$ , a to z hodnoty 0,47 (F1) na hodnotu 0,36 (F5). U formulací F6–F10 (obsahující krystalickou API) je vidět exponenciální pokles hodnoty  $n$ , a to z 0,40 (F6) na 0,26 (F10). Přesný mechanismus uvolňování enzalutamidu z těchto granulátů nelze na základě parametru  $n_{KP}$  stanovit, neboť zde dochází k superpozici více dějů. Hlavně dochází k rychlému rozpouštění HPMC AS, a proto by byl matematický popis uvolňování složitější<sup>111</sup>. V Tabulce 33 jsou uvedeny hodnoty disoluční účinnosti (vysvětlení pojmu viz kapitola 1.7.2.4) pro všechny formulace.

Tabulka 32. Výsledky nelineární regrese disolučních profilů granulátů proložených v disolučním intervalu 60 minut modelem Korsmeyer-Peppas.

označení	složení granulátu		parametry modelu Korsmeyer-Peppas		
	forma API	enzalutamid:HPMC AS	k <sub>KP</sub> (min <sup>-n</sup> )	n <sub>KP</sub> (-)	R <sup>2</sup> (-)
F1	Amorfní	1:2	6,54±0,443	0,47±0,018	0,9792
F6	Krystalická	1:2	0,87±0,047	0,40±0,014	0,9805
F2	Amorfní	1:3	8,28±0,290	0,40±0,010	0,9792
F7	Krystalická	1:3	1,94±0,076	0,27±0,011	0,9723
F3	Amorfní	1:4	9,67±0,537	0,40±0,015	0,9796
F8	Krystalická	1:4	2,18±0,097	0,24±0,012	0,9551
F4	Amorfní	1:5	10,77±0,908	0,40±0,024	0,9778
F9	Krystalická	1:5	2,51±0,115	0,25±0,013	0,9538
F5	Amorfní	1:6	11,63±0,961	0,36±0,022	0,9783
F10	Krystalická	1:6	2,48±0,189	0,26±0,021	0,8981

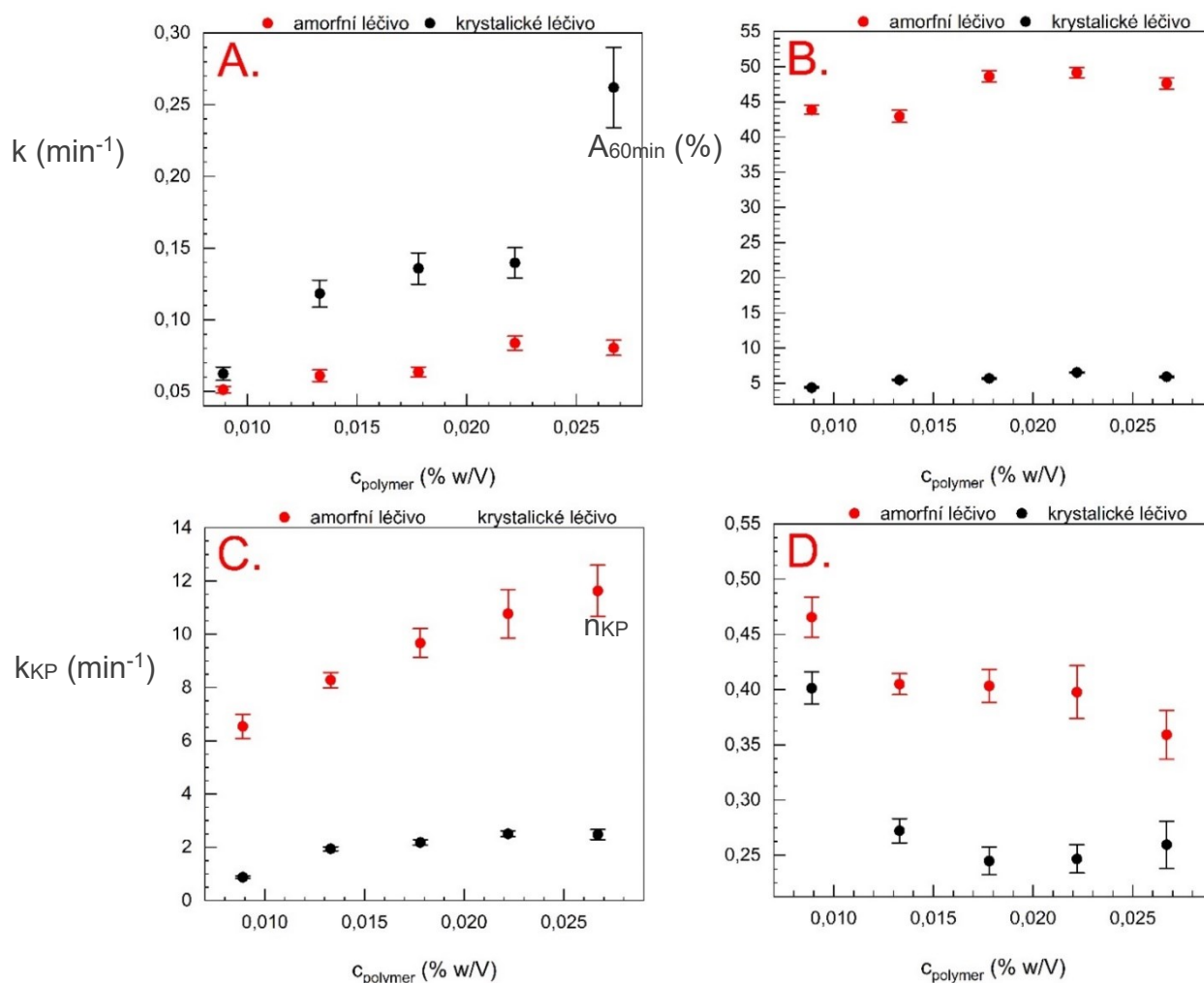
Tabulka 33. Disoluční účinnost (%) týkající se formulací F1–F10, vypočtená pro disoluční úsek 60 minut.

označení	Forma API	$\int_0^t y \cdot dt$	$y_{100} \cdot t$	D.E. (%)
F1	amorfní	10054,22	12841,12	78,3
F6	krystalická	10043,77	12285,33	81,8
F2	amorfní	11116,25	13402,36	82,9
F7	krystalická	11694,98	13581,65	86,1
F3	amorfní	11196,03	13167,73	85,0
F8	krystalická	907,96	1177,73	77,1
F4	amorfní	1314,38	1448,81	90,72
F9	krystalická	1300,25	1435,52	90,58
F5	amorfní	1494,29	1618,87	92,3
F10	krystalická	1378,42	1574,53	87,5

Nejvyšší disoluční účinnosti (vysvětlení pojmu viz kapitola 1.7.2.4) bylo dosaženo u formulací F4, F5 a F9, F10, jak lze vidět z Tabulky 33. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že přítomnost HPMC AS v granulátu s enzalutamidem může udržet amorfní API rozpuštěnou, ale také došlo k určitému zvýšení rozpustnosti krystalické formy, ale to není tak výrazné jako v případě amorfní API. Pokud by se jednalo o nerozpustný polymer (docházelo by k pomalejšímu uvolňování), pak by disoluční rychlost pro stejný časový úsek měla klesat. V našem případě, kdy máme vodorozpustný polymer se schopností vytvářet vodíkové interakce, je situace opačná.

Nejvyšší hodnota uvolněného množství dosáhla 62 hm. % u amorfního enzalutamidu a 7 hm. % u krystalického enzalutamidu. V obou případech byla použita API s velikostí částic pod 250  $\mu\text{m}$ . Zvýšení rozpustnosti s množstvím HPMC AS bylo dosaženo i u krystalického enzalutamidu. Nejedná se o náhodu, neboť dle patentových informací publikovaných Obadalovou a kol.<sup>108</sup> je možno dosáhnout zvýšení rozpustnosti mletím krystalického

enzalutamidu s farmaceuticky přijatelným excipientem. Na tomto místě shrnu důležité informace z patentu. Požadovaná velikost částic pro zvýšení rozpustnosti byla zde publikována jako velikost částic pod 50  $\mu\text{m}$ , nejlépe 10  $\mu\text{m}$ . V případě použití směsi enzalutamidu a HPMC AS LF v poměru 1:3 dosáhli 80 hm. % uvolněného množství během 60 minut v disolučním médiu o pH 6.8 s 0,2 w/V % SLS<sup>108</sup>. V dané formulaci (matricové tablety) použili i další excipienty (kroskarmelóza sodná, laktóza, stearát hořečnatý, krospovidon, mikrokrytalická celulóza, oxid křemičitý), které byly přimíchány intragranulárně či extragranulárně. Ke zvýšení rozpustnosti došlo vlivem energeticky náročné mikronizace na velikost částic až 10  $\mu\text{m}$ , mletím s polymerem či jiným excipientem, ale také vlivem dalších přidaných excipientů. Použití nemikronizovaného enzalutamidu ve formulaci s dalšími excipienty vedlo k uvolnění 14 hm. %<sup>108</sup>. Náhrada nemikronizovaného enzalutamidu za mikronizovaný enzalutamid (částice o velikosti 50–10  $\mu\text{m}$ ) vedla ke zvýšení uvolněného množství na 47 hm. %. Pokud byl místo pouze mikronizovaného enzalutamidu použit tuhý roztok obsahující enzalutamid s HPMC AS LF v poměru 1,5:1 bylo dosaženo 90 hm. % uvolněného množství. Avšak v případě použití dohromady pomleté fyzikální směsi enzalutamidu s kyselinou sorbovou v poměru 1:3 došlo ke zvýšení rozpustnosti podobně jako v případě tuhého roztoku. Dosáhli uvolněného množství 90 hm. %<sup>108</sup>. Z uvedených výsledků z patentu je zjevné, že každá operace použitá během formulačního procesu spolu s volbou excipientů může mít vliv na rozpustnost API a její uvolňování. Proto je popis disolučního chování, vlivu jednotlivých excipientů či jejich mezimolekulární interakcí s API velmi důležitý.



Obrázek 53. Výsledky nelineární regrese disolučních profilů (v rozsahu 60 minut) granulátů obsahujících API v amorfni (červené body) či krystalické (černé body) formě v závislosti na obsahu polymeru v disolučním médiu (F1, F6 – 0,0089 % w/V; F2, F7 – 0,0133 % w/V; F3, F8 – 0,0178 % w/V; F4, F9 – 0,0222 % w/V; F5, F10 – 0,0267 % w/V): A. parametr kinetického modelu 1 řádu – rychlostní konstanta  $k$ , B. parametr kinetického modelu I. řádu –  $A_{\infty}$ , C. parametr modelu Korsmejer-Peppas – rychlostní konstanta  $k_{\text{KP}}$ , D. parametr modelu Korsmejer-Peppas – release exponent  $n_{\text{KP}}$ .

### 3.2.3.2. Charakterizace připravených materiálů a disolučních zbytků

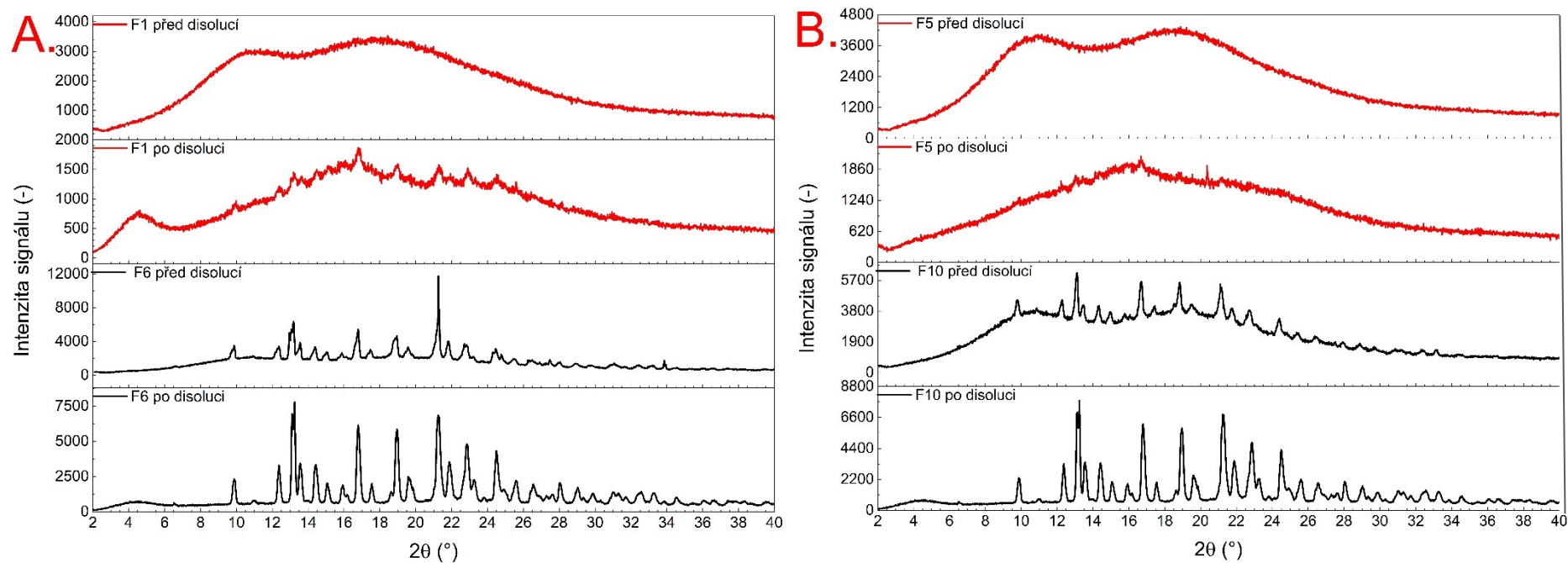
Během disoluce nedošlo u žádné formulace ke 100% uvolnění (jde spíše o rozpuštění) API a část ji zůstala v disolučním zbytku. V následujících odstavcích budou uvedeny výsledky charakterizačních technik, pomocí kterých byly analyzovány vzorky před, ale i po disolučním experimentu. Obrázek 54 zobrazuje difraktogramy krajních poměrů formulací s amorfni (F1, F5) i krystalickou API (F6, F10) po přípravě. Bylo potvrzeno, že formulace F1 a F5 je před disolučním experimentem zcela amorfni, zatímco formulace F6 a F10 je směs amorfni a krystalické formy. Amorfni formou je HPMC AS MF a krystalickou formou je enzalutamid polymorfni formy R1. Obrázek 54 rovněž zobrazuje difraktoframy formulací F1, F5, F6, F10 po disoluci. Disoluční zbytky formulací s krystalickou API (F6, F10) jsou po disoluci plně krystalické, což potvrzuje, že došlo k rozpuštění HPMC AS obsažené v daných formulacích. Difraktogram krystalické látky se plně shoduje s difraktogramem krystalického enzalutamidu polymorfni formy R1, která je dle patentových informací charakterizována následujícími hlavními/intenzivnějšími difrakčními liniemi dle patentu v práškovém rentgenovém záznamu<sup>107</sup>: 12,3; 13,1; 15,0; 17,5±0,2 2θ. XRPD záznam navíc obsahuje další méně intenzivní difrakční píky v pozicích: 9,8; 13,5; 14,3; 16,7; 18,9; 21,1; 21,8; 22,8 a 24,4±0,2 2θ. Naproti tomu disoluční zbytky formulací s amorfni API (F1, F5) jsou po disoluci amorfni s malou krystalickou příměsí polymorfni formy R1. Není vyloučeno, že ke vzniku krystalické příměsi v amorfni materiálu došlo až po disolučním experimentu během čekání ve frontě na měření XRPD. Tato varianta je navíc velmi pravděpodobná, což bude potvrzeno z výsledků SEM a IČ a Ramanovy spektroskopie.

Na Obrázku 55 jsou zobrazena infračervená absorpční spektra jak jednotlivých komponent, tak granulátů obsahujících amorfni formu enzalutamidu. Z Obrázku 55A je patrný rozdíl mezi amorfni a krystalickou formou (polymorfni formou R1) enzalutamidu. Největší rozdíl mezi spektry amorfni a krystalické látky je patrný ve spektrálních oblastech 1767–1756 cm<sup>-1</sup> náležící valenčním vibracím karbonylové skupiny  $\nu(\text{C=O})$ , 1380–1370 cm<sup>-1</sup> náležící deformačním vibracím C-H vazby  $\delta(\text{C-H})$  a v oblasti 1140–1106 cm<sup>-1</sup> náležící pravděpodobně valenčním vibracím C-F vazby  $\nu(\text{C-F})$ . Obrázek 55A zobrazuje také IČ spektrum HPMC AS (typu MF – použité v celé disertační práci), tuhého roztoku enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6 a granulátu amorfniho enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6 (F5). IČ spektrum tuhého roztoku i granulátu je pouhou superpozicí spekter amorfniho enzalutamidu a HPMC AS (typu MF použité v celé disertační práci). Toto znamená, že v pevné fázi nedochází k interakcím mezi API a polymerem.

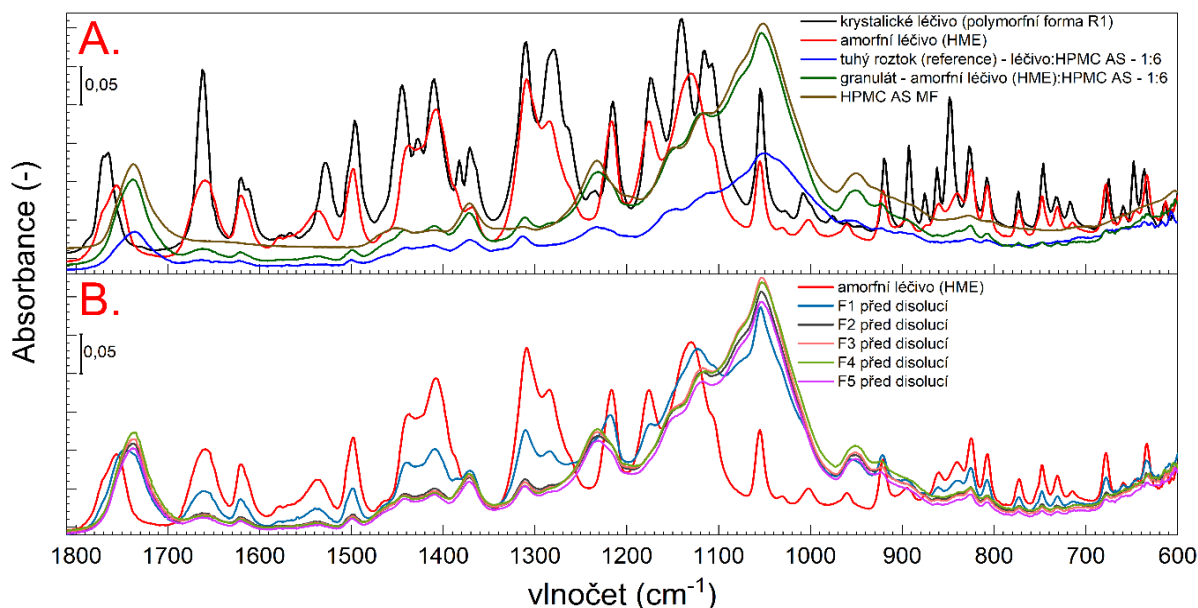
Obrázek 55B. zobrazuje spektra formulací F1–F5 před disolucí. IČ spektra dokazují, že v žádné formulaci nedošlo během přípravy ke rekrystalizaci. Obrázek 56A zobrazuje IČ spektra polymorfní formy R1, amorfni formy enzalutamidu, tuhého roztoku enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6, granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6 a HPMC AS (typu MF použité v celé disertační práci). IČ spektrum granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS je opět superpozicí spektra krystalického enzalutamidu s HPMC AS. Obrázek 56B zobrazuje IČ spektra formulací F6–F10 před disolucí. Spektra potvrzují přítomnost krystalického enzalutamidu polymorfní formy R1 v daných granulátech. Obrázek 57 zobrazuje IČ spektra disolučních zbytků formulací F5 (granulát s amorfni API a HPMC AS v poměru 1:6) a F10 (granulát s krystalickou API a HPMC AS v poměru 1:6). Během disoluce došlo prokazatelně k rozpuštění HPMC AS MF, neboť spektra disolučních zbytků odpovídají spektru čistého enzalutamidu. Disoluční zbytek formulace F5 obsahující před disolucí amorfni enzalutamid je dle IČ plně amorfni. Stejněho závěru bylo dosaženo i v případě ostatních poměrů. Během disoluce granulátů s amorfni enzalutamidem tedy dochází k rozpuštění maximálně 62 hm. % amorfni API a zbytek zůstává v amorfni stavu, pravděpodobně ve formě agregátů, jak je popsáno v literatuře (viz kapitola 1.6.1). Disoluční zbytek formulace F10 obsahující před disolucí krystalický enzalutamid je plně krystalický. Závěry z infračervené spektroskopie byly navíc potvrzeny Ramanovou spektroskopií (Obrázek 58 a 59). Během disolučního experimentu je důležitá i vizuální stránka děje a v případě amorfni i krystalických granulátů docházelo ke vzniku zředěné suspenze jemných částic. Disoluční médium se po disoluci granulátu s amorfni API jevílo jako suspenze nanočástic, což by vysvětlovalo velmi obtížnou a zdlouhavou filtraci disolučního média za účelem získání disolučních zbytků. Proto byly pořízeny snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu (Obrázky 60–63), a to jak granulátů před disolucí, tak po disoluci. Obrázky 60 a 62 zobrazují SEM snímky granulátů před disolucí obsahujících amorfni a krystalický enzalutamid s HPMC AS v poměru 1:2, 1:5 a 1:6. Obrázky zobrazují shluky částic odpovídající přípravě, neboť připravený materiál byl stlačen a pak rozdrcen. Obrázek 61 a 63 zobrazuje SEM snímky disolučních zbytků zmíněných granulátů. V případě formulací F6, F8 a F10 se jedná o krystalický materiál různé velikosti, jsou zde zastoupeny i velmi jemné částice, ale většina částic je v rozmezí velikostí 100 – 50  $\mu\text{m}$  (délka nejdelší strany částice). V případě formulací F1, F4 a F5 jsou částice oválného tvaru s velikostí 100 – 60  $\mu\text{m}$ . Zajímavé je, že tyto částice nejsou na povrchu hladké. Povrch se zdá spíše děrovaný, jsou zde kruhové póry o velikosti maximálně jednoho nanometru. Tento výsledek na první pohled evokuje uvolňování dobře rozpustné složky z nerozpustného materiálu. Prvním vysvětlením

by mohlo být, že byl pouhou granulací připraven tuhý roztok. Tato možnost byla studována diferenční skenovací kalorimetrií (Obrázek 64), která tuto hypotézu vyvrátila. Ve formulacích F1, F4 a F5 se nachází amorfni enzalutamid, ne tuhý roztok. Teplota skelného přechodu enzalutamidu je v těchto formulacích trochu nižší, respektive se snižuje s obsahem HPMC AS (typu MF použité v celé disertační práci), což je ale způsobeno obsahem vody v HPMC AS MF. Pokud by se jednalo o tuhý roztok, musel by být skelný přechod mezi 89 a 120 °C s tím, že by se teplota skelného přechodu zvyšovala s obsahem HPMC AS. Další hypotézou je, že dochází k precipitaci amorfni fáze do formy nanočástic, které jsou nestabilní a dojde k jejich agregaci. Prostor mezi nanočásticemi, pak vytvoří póry. Další hypotézou je, že během disoluce dochází kromě jednoduchého rozpuštění enzalutamidu také k tvorbě agregátů enzalutamidu a ty jsou udržovány v amorfni stavu, tím že se HPMC AS adsorbuje prostřednictvím vodíkových vazeb na jejich povrch, ale stále je HPMC AS rozpuštěná, proto není identifikovaná v disolučních zbytcích. Je nutno poznamenat, že částice jsou pravděpodobně uvnitř plné, což je možné vidět z některých SEM snímků. Navíc nevykazují pravidelný tvar, což znamená, že během disoluce nedochází ke krystalizaci amorfni enzalutamidu. Krystalická příměs v disolučním zbytku identifikovaná práškovou rentgenovou difrakcí vznikla pravděpodobně až po provedení disolučního testu při čekání na měření XRPD.

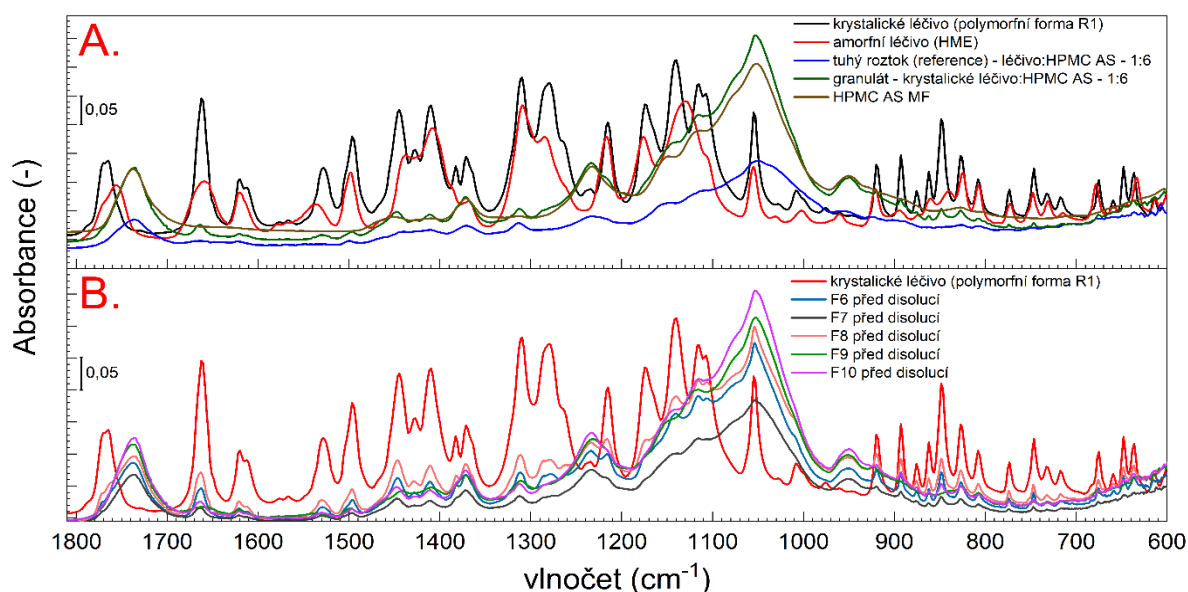
I když není jasný přesný mechanismus tvorby amorfni agregátů, je jasné, že během disoluce došlo ke stabilizaci amorfni enzalutamidu pomocí polymeru. Inhibice krystalizace amorfni API pomocí HPMC AS je popsána v literatuře. Inhibice byla převážně zprostředkována tvorbou vodíkových můstků mezi API a HPMC AS, a byla také pozorována stabilizace amorfni agregátů API tímto polymerem, stejně jako v tomto případě<sup>109,110,112,113</sup>.



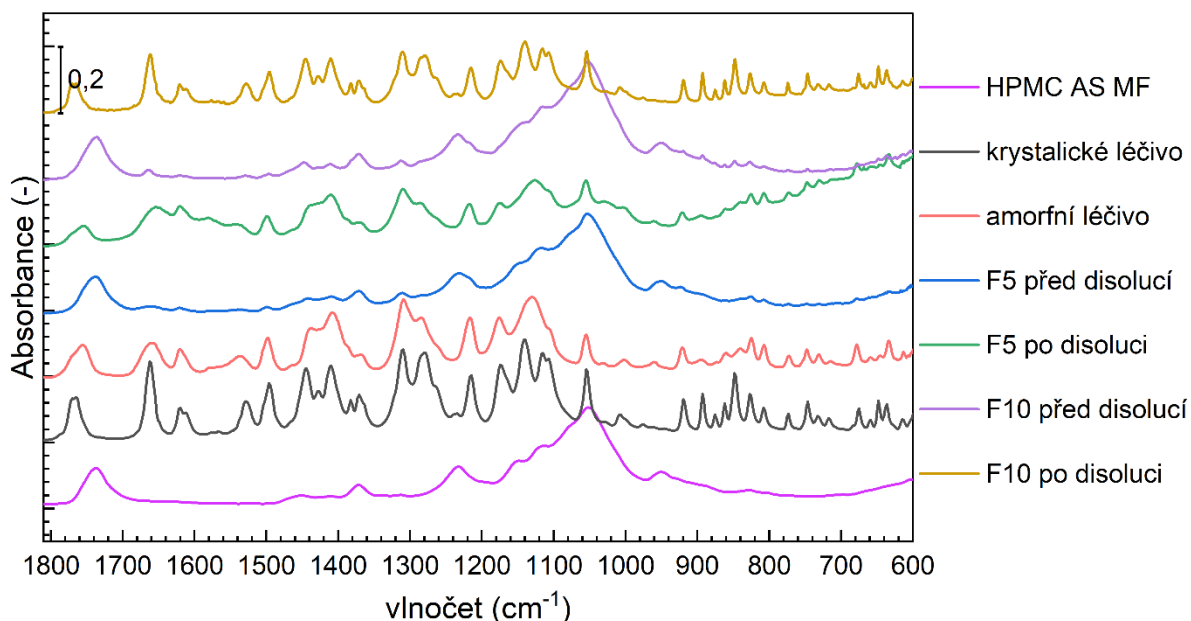
Obrázek 54. Výsledky práškové rentgenové difrakce granulátů před disolučním testem a precipitátů po disolučním testu: A. granulát obsahující amorfni (F1) či krystalickou (F6) API s HPMC AS v poměru 1:2; B. granulát obsahující amorfni (F5) či krystalickou API (F10) v poměru 1:6.



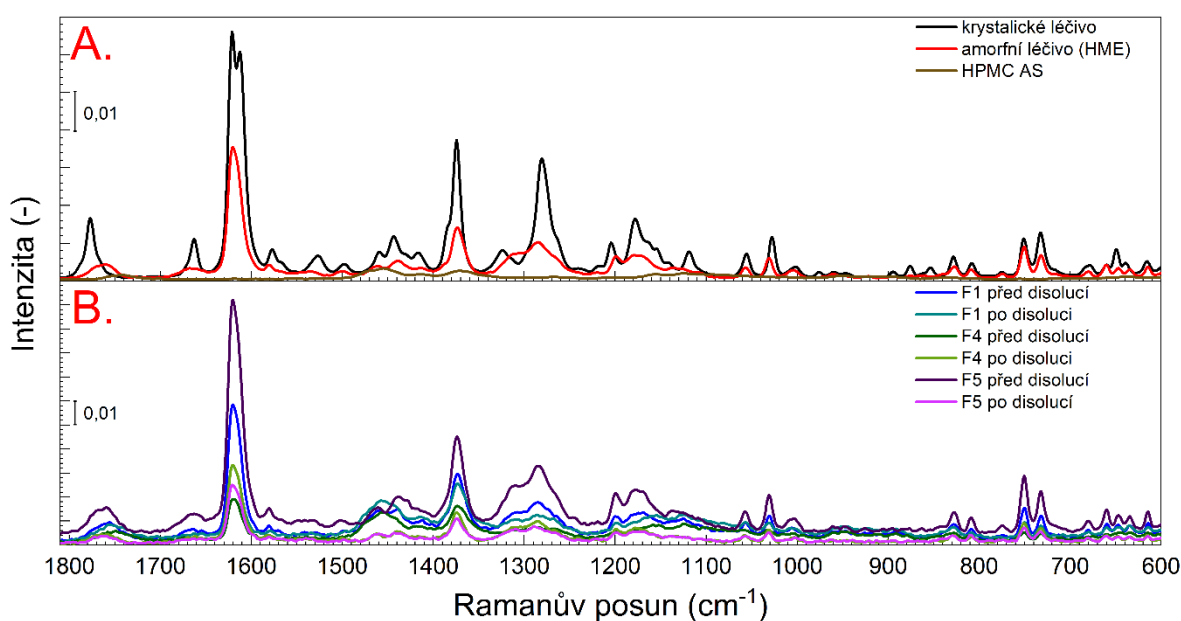
Obrázek 55. Infračervená spektra: A. krystalického enzalutamidu polymorfní formy R1 (černá plná čára), amorfního enzalutamidu HME (červená plná čára), tuhého roztoku enzalutamidu s HPMC AS – 1:6 (modrá plná čára), granulátu F5 před disolucí – amorfni enzalutamid s HPMC AS v poměru 1:6 (zelená plná čára), HPMC AS MF (hnědá plná čára); B. amorfního enzalutamidu (červená plná čára) a granulátů před disolucí – F1 (světle modrá plná čára), F2 (tmavě šedá plná čára), F3 (světle červená plná čára), F4 (světle zelená plná čára), F5 (světle růžová plná čára).



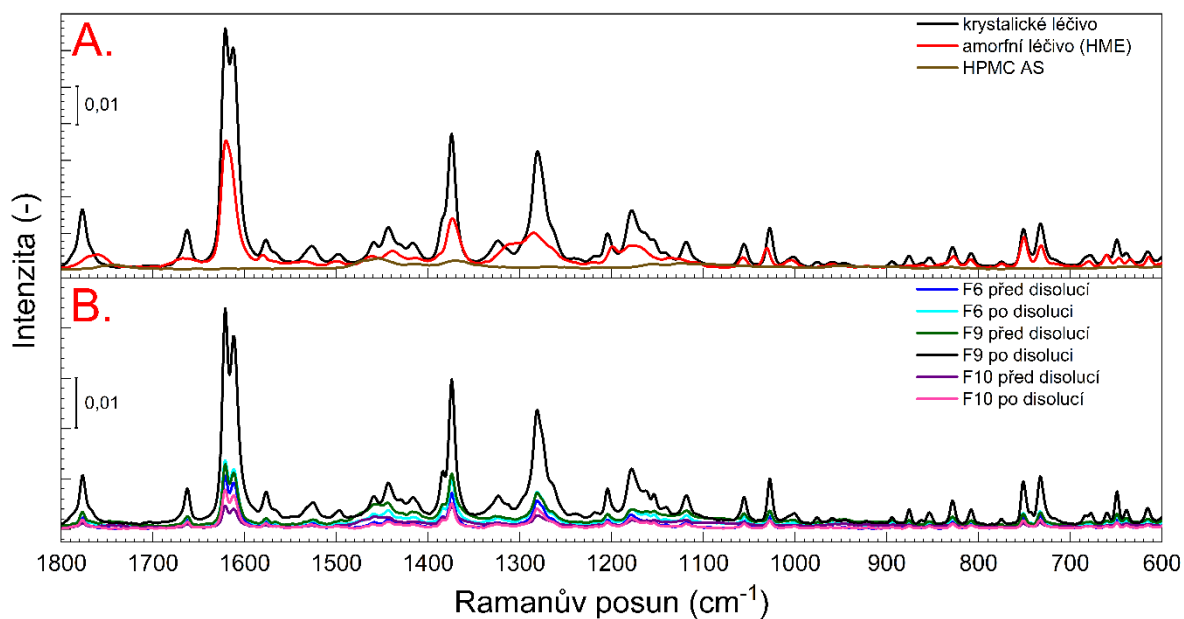
Obrázek 56. Infračervená spektra: A. krystalického enzalutamidu polymorfní formy R1 (černá plná čára), amorfního enzalutamidu HME (červená plná čára), tuhého roztoku enzalutamidu s HPMC AS – 1:6 (modrá plná čára), granulátu F10 – krystalický enzalutamid s HPMC AS v poměru 1:6 (zelená plná čára) před disolucí, HPMC AS MF (hnědá plná čára); B. krystalického enzalutamidu (červená plná čára) a granulátů před disolucí – F6 (světle modrá plná čára), F7 (tmavě šedá plná čára), F8 (světle červená plná čára), F9 (světle zelená plná čára), F10 (světle růžová plná čára).



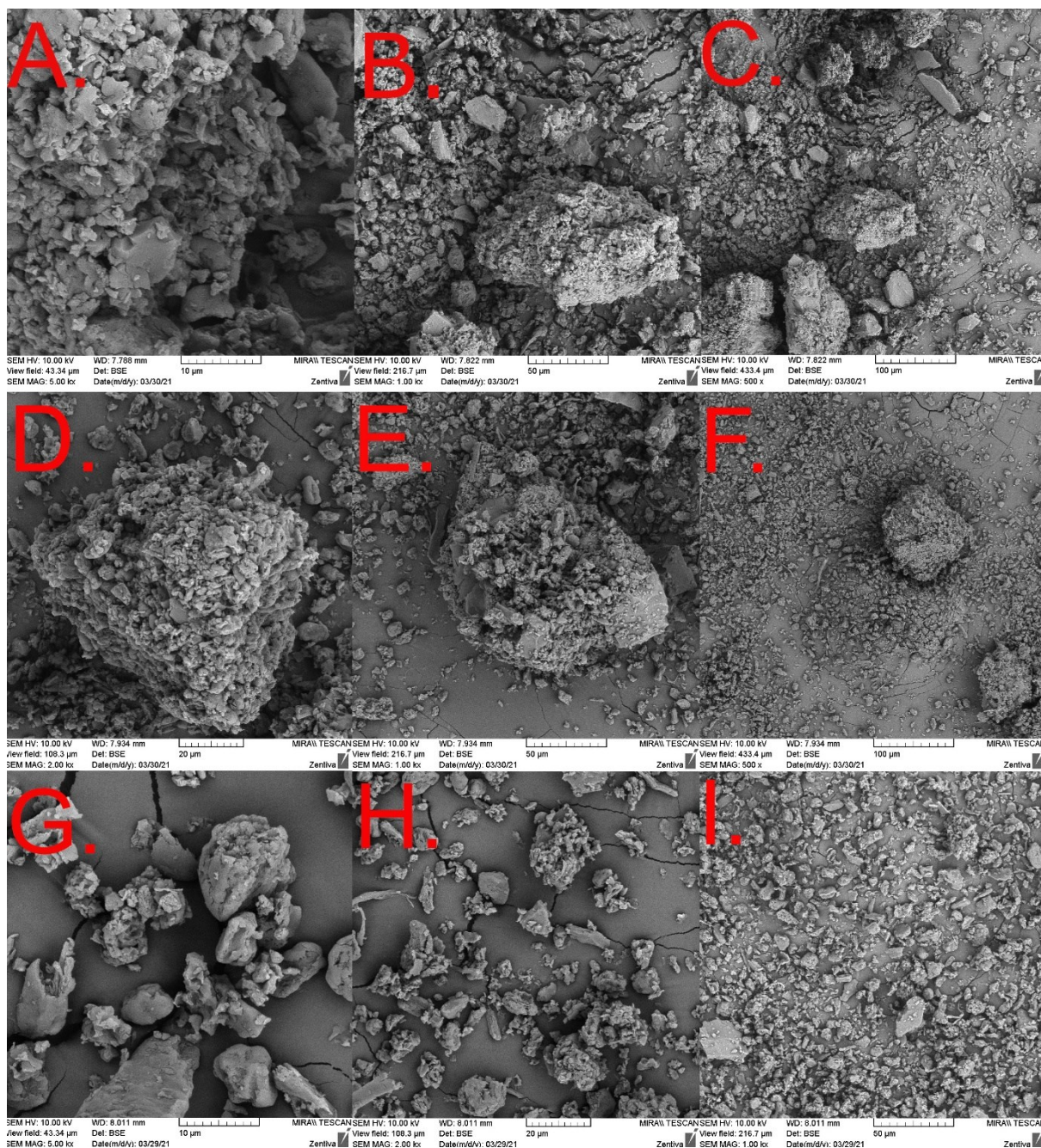
Obrázek 57. Infračervená spektra HPMC AS MF (světle růžová plná čára), krystalického enzalutamidu polymorfní formy R1 (černá plná čára), amorfnního enzalutamidu HME (světle červená plná čára), granulátu F5 před disolucí (světle modrá plná čára), granulátu F5 po disoluci (světle zelená plná čára), granulátu F10 před disolucí (světle fialová plná čára) a granulátu F10 po disoluci (žlutá plná čára).



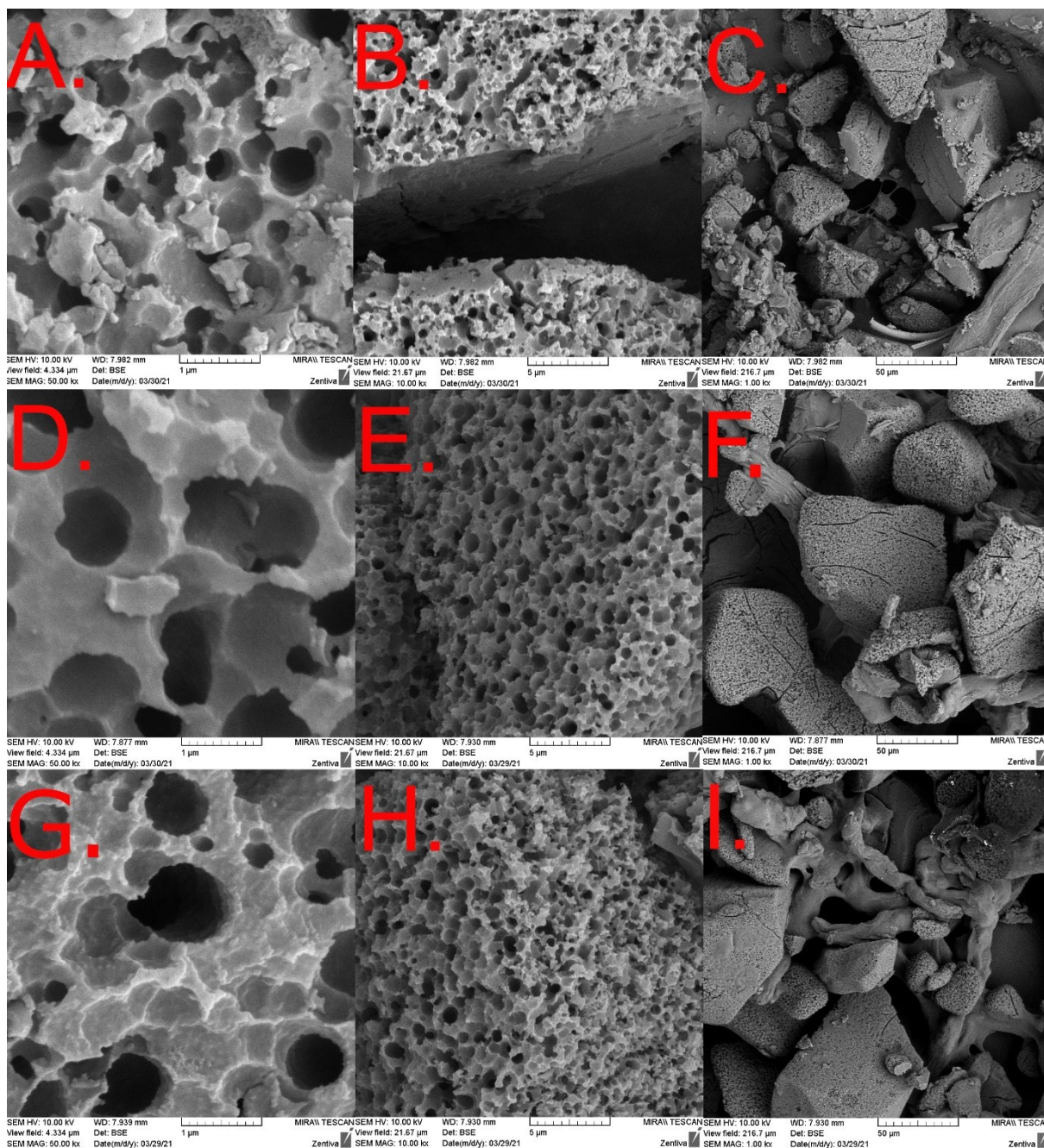
Obrázek 58. Ramanova spektra: A. čistých látek: krystalického enzalutamidu polymorfní formy R1 (černá plná čára), amorfnního enzalutamidu HME (červená plná čára), HPMC AS (hnědá plná čára); B. granulátů – F1 před disolucí (tmavě modrá plná čára), F1 po disoluci (světle modrá plná čára), F4 před disolucí (tmavě zelená plná čára), F4 po disoluci (světle zelená plná čára), F5 před disolucí (tmavě fialová plná čára) a F5 po disoluci (růžová plná čára).



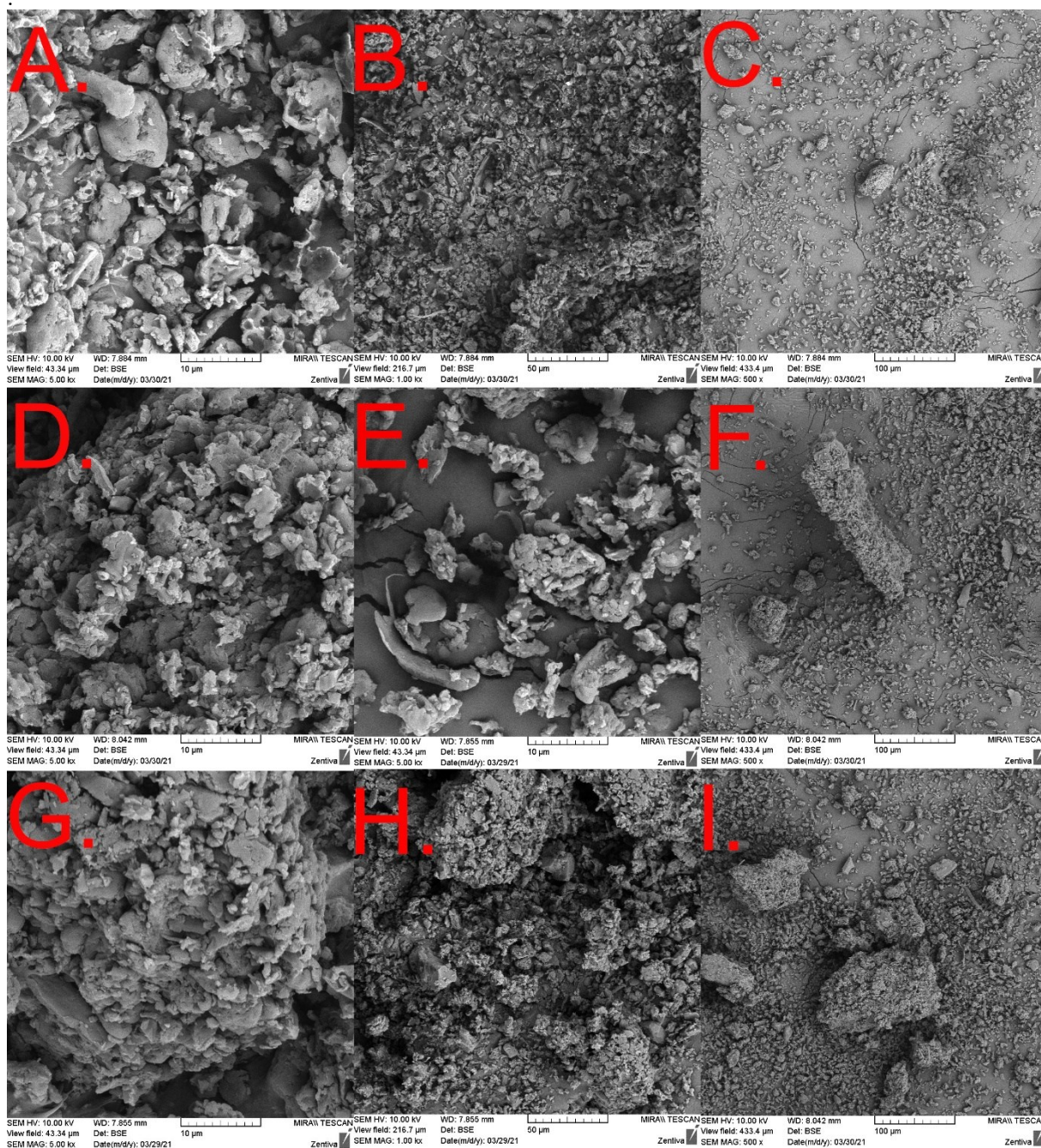
Obrázek 59. Ramanova spektra: A. čistých látek: krystalického enzalutamidu polymorfni formy R1 (černá plná čára), amorfního enzalutamidu HME (červená plná čára), HPMC AS (hnědá plná čára); B. granulátů – F6 před disolucí (tmavě modrá plná čára), F6 po disoluci (světle modrá plná čára), F9 před disolucí (tmavě zelená plná čára), F9 po disoluci (černá plná čára), F10 před disolucí (tmavě fialová plná čára) a F10 po disoluci (růžová plná čára).



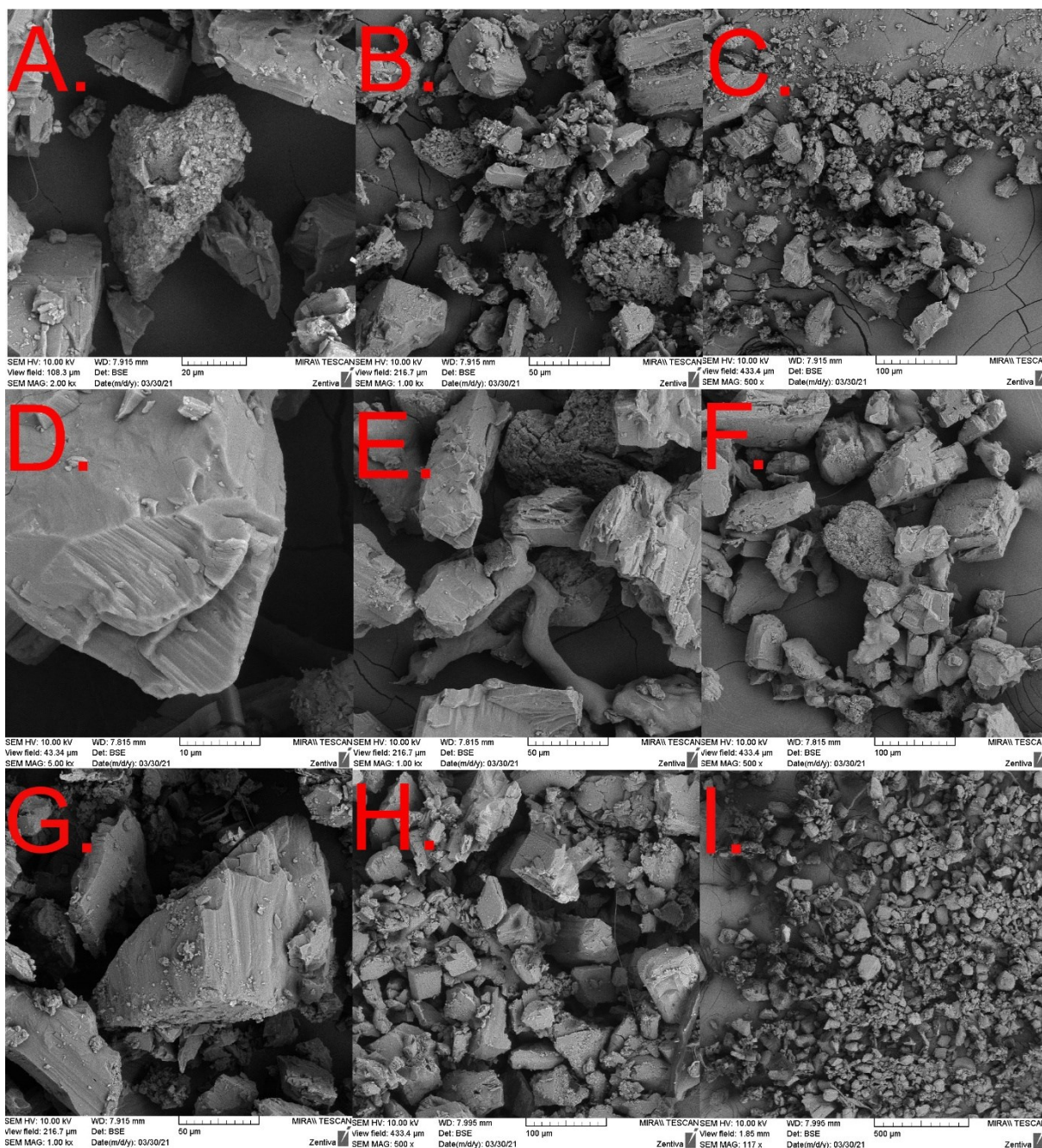
Obrázek 60. SEM snímky připraveného granulátu amorfního enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:2 (F1) před disolucí, s měřítkem: A. 10 µm, B. 50 µm, C. 100 µm; SEM snímky připraveného granulátu amorfního enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:5 (F4), s měřítkem: D. 20 µm, E. 50 µm, F. 100 µm; SEM snímky připraveného granulátu amorfního enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6 (F5), s měřítkem: G. 10 µm, H. 20 µm, I. 50 µm.



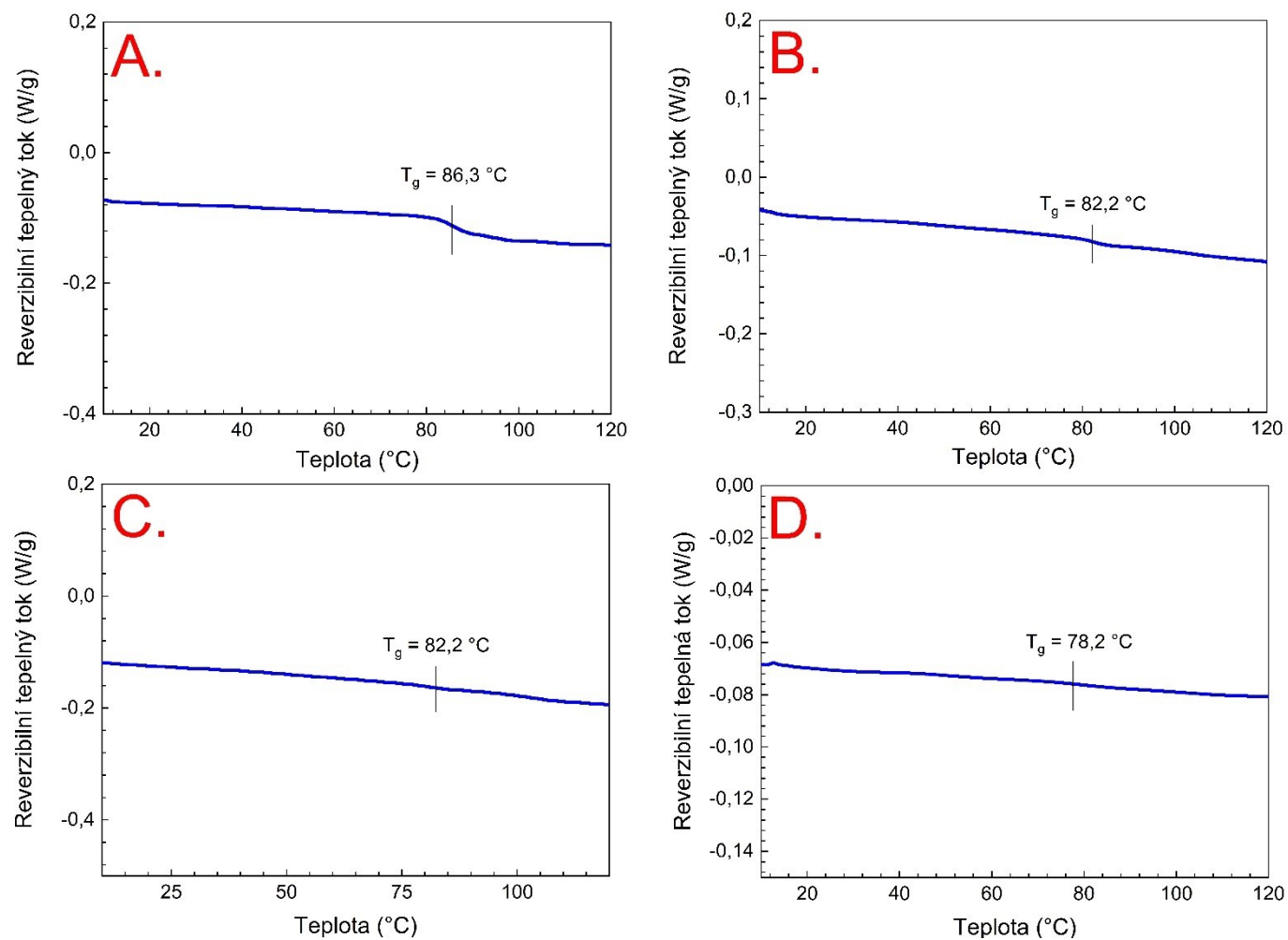
Obrázek 61. SEM snímky precipitátů granulátu amorfního enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:2 (F1) po disolučním experimentu, s měřítkem: A. 1  $\mu\text{m}$ , B. 5  $\mu\text{m}$ , C. 50  $\mu\text{m}$ ; SEM snímky precipitátů granulátu amorfního enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:4 (F4) po disolučním experimentu, s měřítkem: D. 1  $\mu\text{m}$ , E. 5  $\mu\text{m}$ , F. 50  $\mu\text{m}$ ; SEM snímky precipitátů granulátu amorfního enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:5 (F5) po disolučním experimentu, s měřítkem: G. 1  $\mu\text{m}$ , H. 5  $\mu\text{m}$ , I. 50  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 62. SEM snímky připraveného granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:2 (F1) před disolucí, s měřítkem: A. 10 μm, B. 50 μm, C. 100 μm; SEM snímky připraveného granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:5 (F4) před disolucí, s měřítkem: D. 10 μm, E. 10 μm, F. 100 μm; SEM snímky připraveného granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6 (F5) před disolucí, s měřítkem: G. 10 μm, H. 50 μm, I. 100 μm.



Obrázek 63. SEM snímky precipitátů granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:2 (F1) po disolučním experimentu, s měřítkem: A. 20  $\mu\text{m}$ , B. 50  $\mu\text{m}$ , C. 100  $\mu\text{m}$ ; SEM snímky precipitátů granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:5 (F4) po disolučním experimentu, s měřítkem: D. 10  $\mu\text{m}$ , E. 50  $\mu\text{m}$ , F. 100  $\mu\text{m}$ ; SEM snímky precipitátů granulátu krystalického enzalutamidu s HPMC AS v poměru 1:6 (F5) po disolučním experimentu, s měřítkem: G. 50  $\mu\text{m}$ , H. 100  $\mu\text{m}$ , I. 500  $\mu\text{m}$ .



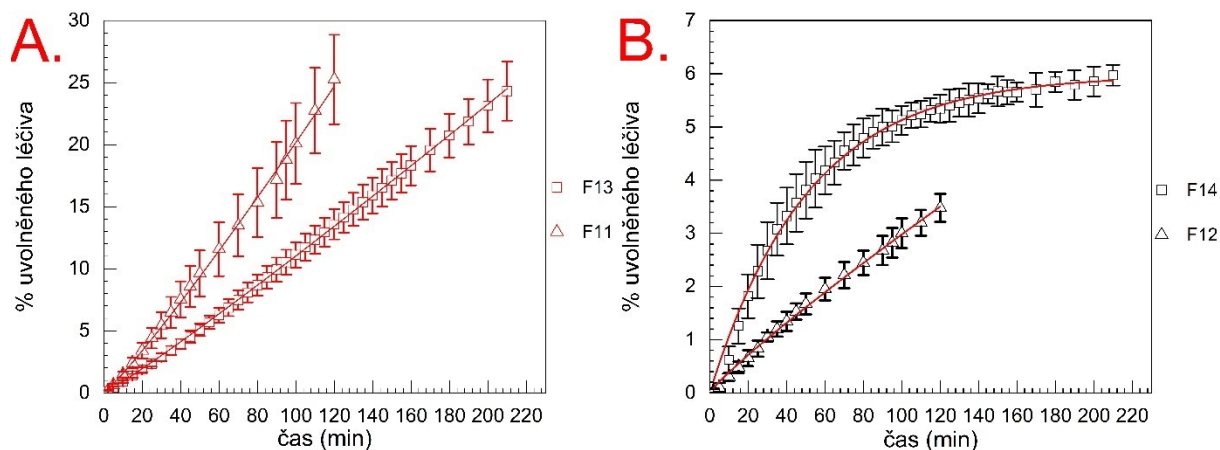
Obrázek 64. Reverzibilní DSC křivky následujících látek: A. amorfni API připravené extruzí; B. granulátu amorfni API s HPMC AS v poměru 1:2; C. granulátu amorfniho API s HPMC AS v poměru 1:5; D. granulátu amorfni API s HPMC AS v poměru 1:6. DSC křivky byly získány modulací s frekvencí 60 sekund, amplitudou  $0,8\text{ °C}$  a rychlostí ohřevu  $5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 3.2.3.3. Disoluce tablet

Mechanismus uvolňování amorfni a krystalické formy enzalutamidu z lékové formy definovaného tvaru byl studován metodou disolučního testu. V rámci této kapitoly jsou prezentovány a diskutovány dosažené výsledky. Jednotlivé formulace tablet (F11 – F14) byly připraveny dle složení uvedeného v kapitole 2.3.3. Připravené tablety enzalutamidu s HPMC AS se během disolučního experimentu nerozpadaly, proto bylo přidáno rozvolňovadlo (2 hm. % kroskarmelózy sodné). Přídavek rozvolňovadla také nevedl k požadovanému rozpadu tablet, proto byla HPMC AS (typu MF použitá v celé disertační práci) s kroskarmelózou sodnou předem zgranulována, následně smíchána s enzalutamidem a vylišována lisovací silou 5 kN. Rychlý rozpad tablet byl požadován za účelem dosažení okamžitého uvolnění. K rozpadu tablet došlo pouze v případě tablety obsahující krystalický enzalutamid s granulovanou HPMC AS a kroskarmelózou sodnou. U tablet obsahujících amorfni enzalutamid s granulovanou HPMC AS došlo pouze ke zmenšení rozměru tablety čili k erozi svrchních vrstev tablety. Tyto tablety by byly tedy vhodnější k řízenému uvolňování API, ale je zde vyšší riziko rekrystalizace během uvolňování API z lékové formy. Disoluční křivky tablet obsahujících amorfni a krystalický enzalutamid v kombinaci buď s HPMC AS MF dodanou výrobcem nebo s granulovanou HPMC AS MF jsou zobrazeny na Obrázku 65.

Disoluční profily formulací F11–F13 byly proloženy modelem Korsmeyer-Peppas modelem za účelem posouzení mechanismu uvolňování API. Výsledky regresní analýzy jsou uvedeny v Tabulce 34. V případě disolučního profilu formulace F14 bylo dosaženo nižšího koeficientu determinace v důsledku vyššího rozptylu dat. Tento disoluční profil odpovídá kinetice I. řádu (viz Tabulka 34). Při vizuálním sledování disolučního testu bylo zjištěno, že v případě amorfniho materiálu (F11, F13) dochází k vytvoření pevné matrice, která se během disolučního testu nerozpadá. Na základě regresní analýzy disolučního profilu byla stanovena hodnota koeficientu  $n$  v modelu Korsmeyer-Peppas, která potvrzuje, že amorfni API se z této matrice uvolňuje dle kinetiky 0. řádu. Vyšší rychlosti rozpouštění enzalutamidu u HPMC AS dodané výrobcem ve srovnání s předem granulovanou HPMC AS bylo dosaženo v případě HPMC AS dodané výrobcem (HPMC AS MF), která je ve formě jemných částic. Toto může být způsobeno tím, že v případě jemných částic je amorfni API v těsném kontaktu s HPMC AS (typu MF použité v celé disertační práci) a interakce tak probíhají již v okamžiku hydratace tablety. Je-li ve formulaci použita krystalická API v kombinaci s HPMC AS (typu MF použité v celé disertační práci) dodanou výrobcem (formulace F12), pak je opět výsledkem kompaktní matrice, která se nerozpadá. Uvolňování API z formulace F12 probíhá

dle kinetického modelu 0. řádu. Jedná se o tzv. Case II transport, který je dle rovnice Korsmeyer-Peppas (viz. rovnice 22) dán hodnotou parametru  $n = 0,89$  pro cylindrické tablety. Pokud je ve formulaci s krystalickým enzalutamidem použita předem granulovaná HPMC AS (formulace F14), pak disoluční médium snadno penetruje dovnitř tablety, která postupně podlehne erozi. V tomto případě dojde k uvolnění API kinetikou I. řádu.



Obrázek 65. Disoluční křivky: A. tablet obsahujících amorfni API s negranulovanou HPMC AS MF v poměru 1:6 (F11) či granulovanou HPMC AS MF v poměru 1:6 (F13); B. tablet obsahujících krystalickou API s negranulovanou HPMC AS MF v poměru 1:6 (F12) či granulovanou HPMC AS MF v poměru 1:6 (F14). Disoluční křivky se liší v délce trvání disolučního testu, neboť se jednalo o první pokusy spojené s optimalizací procesů. Disoluční křivky byly proloženy modelem Korsmeyer-Peppas.

Tabulka 34. Výsledky nelineární regrese disolučních profilů tablet (F11–F14).

parametry Korsmeyer-Peppasova modelu			
formulace	$k_{KP}$ ( $\text{min}^{-n}$ )	$n$ (-)	$R^2$ (-)
F11	$0,10 \pm 0,008$	$1,06 \pm 0,008$	0,9944
F12	$0,05 \pm 0,006$	$0,89 \pm 0,028$	0,9914
F13	$0,08 \pm 0,008$	$1,08 \pm 0,022$	0,9952
parametry kinetického modelu I. řádu			
formulace	$M_{\infty}$ (-)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$ (-)
F14	$5,97 \pm 0,080$	$0,02 \pm 0,001$	0,7191

Za účelem dosažení rychlejšího uvolnění API či rychlejšího rozpadu tablety by bylo potřeba dodat ve vodě rozpustné excipienty (laktóza, mannitol atd.), popřípadě zvýšit množství rozvolňovadla<sup>114</sup>.

### 3.2.4. Shrnutí výsledků

V předchozích kapitolách bylo popsáno disoluční chování amorfního a krystalického enzalutamidu. Pravá disoluce ukázala, že rychlost rozpouštění amorfní formy vůči krystalické je až 6krát vyšší. Během disoluce práškové amorfní formy enzalutamidu byla potvrzena precipitace amorfní fáze s následnou rychlou krystalizací částic na povrchu, která limituje rozpustnost amorfní API. Řešením je přidavek dobře rozpustného polymeru. V našem případě byla zvolena HPMC AS MF, která je velmi dobře lisovatelná a vytvoří kompaktní tablety, které se během disolučního experimentu nerozpadají a dochází k postupnému uvolňování API kinetikou 0. řádu. V případě enzalutamidu je výhodnější dosáhnout okamžitého uvolnění, proto byla jako formulační cesta zvolena příprava granulátu. Tento granulát může být v budoucnu použit jako náplň želatinové kapsle. V rámci této disertační práce se nejednalo o průmyslovou suchou granulaci, ale o její laboratorní simulaci. Maximální uvolněné množství bylo v případě formulací F4, F5 přibližně 62 hm. %. Zvýšit uvolněné množství je možné buď přípravou tuhého roztoku, který je výhodný i z hlediska stability amorfní látky, nebo přidavkem dobře rozpustných látek (laktóza, cyklodextriny, kyselina sorbová), které jsou schopny zvýšit rozpustnost amorfní API, čili udržet ji v amorfním stavu. V této disertační práci bylo prokázáno, že HPMC AS je schopna udržet enzalutamid v přesyceném stavu. Přesný mechanismus nebyl jasně prokázán, ale zásadní roli hrají pravděpodobně interakce enzalutamid s HPMC AS v roztoku. Na základě SEM, XRPD bylo prokázáno, že během disoluce granulátů vznikají amorfní shluky enzalutamidu, které jsou pravděpodobně udržovány v amorfním stavu pomocí HPMC AS. Jednou s hypotéz je adsorpce HPMC AS na povrchu amorfního enzalutamidu, čímž je stéricky zamezeno krystalizaci amorfního enzalutamidu. Tato hypotéza může být potvrzena morfologií amorfních precipitátů, které jsou na povrchu děrované. Přesný mechanismus vzniku těchto děr nebyl v rámci disertační práce objasněn, ale určitou roli zde s vysokou jistotou hraje HPMC AS.

V kapitole 3.2 byl prokázán rozdíl v disoluci amorfní a krystalické API. Použitím amorfního enzalutamidu ve formulaci lze prokazatelně zvýšit rozpustnost enzalutamidu. Jelikož se však jedná o rychle krystalizující API, je nutné její krystalizaci zamezit volbou vhodných excipientů. V této disertační práci byla vybrána HPMC AS, která vedla nejen k zamezení krystalizace amorfní API na povrchu, ale také k udržení API v přesyceném stavu. Tento poznatek je velmi důležitý z hlediska biodostupnosti enzalutamidu a možného použití čisté amorfní formy v lékové formě.

## 4. ZÁVĚR

Kapitola *Závěr* je rozdělena do dvou podkapitol. V první podkapitole jsou sumarizovány a diskutovány závěry představené v předkládané disertační práci, kde tématem je fyzikálně-chemické chování, pevnofázová stabilita a disoluční charakteristiky amorfního enzalutamidu. Druhá podkapitola shrnuje výsledky a závěry dosažené během doktorského studia v rámci řešení dalších témat, jež nebyla kvůli nadměrnému rozsahu do předkládané práce zahrnuta. Teorii a diskutované experimentální výsledky k těmto tématům lze nalézt v Rozšířeném souboru komentovaných výsledků na příloženém nosiči.

### 4.1. Amorfni enzalutamid

První část předložené disertační práce se zabývala pevnofázovou stabilitou enzalutamidu – léčiva III. třídy dle členění GFA. U tohoto léčiva bylo potvrzeno, že je stabilní pouze za určitých podmínek. Bylo prokázáno, že krystalizační proces je v případě enzalutamidu ovlivněn řadou faktorů, kdy dominantním faktorem akcelerace procesu krystalizace se ukázala být mechanická aktivace povrchu – např. pomocí mletí či drcení. Pomocí kinetické predikce bylo ukázáno, že zvýšení krystalizační rychlosti enzalutamidu v závislosti na velikosti částic drceného materiálu může být 100-násobné již při změně velikostní frakce z 50 – 125  $\mu\text{m}$  na 20 – 50  $\mu\text{m}$ ; pro rozdíl mezi práškovými frakcemi 300 – 500  $\mu\text{m}$  a 20 – 50  $\mu\text{m}$  bylo předpovězeno více než 300-násobné zvýšení krystalizační rychlosti. Srovnáním s výsledky sprejově sušeného enzalutamidu (velikost částic 0.1 – 1  $\mu\text{m}$ ; bez mechanické aktivace) bylo navíc dokázáno, že pro akceleraci krystalizačního procesu je klíčová právě přítomnost mechanicky indukovaných defektů, neboť tato forma enzalutamidu se zdaleka největším povrchem krystalizovala pomaleji než mechanicky aktivovaná prášková frakce 20 – 50  $\mu\text{m}$ .

Jedním z cílů této disertační práce bylo prostudovat a charakterizovat kinetiku krystalizace amorfního léčiva a predikovat průběh růstu krystalické fáze. Jelikož izotermní experimenty jsou obecně velmi časově náročné a často nepřesné, byla ověřována metoda založená na neizotermních experimentech. Modelováním kinetiky krystalizačního chování amorfního enzalutamidu a následným experimentálním ověřením kinetických predikcí při teplotách extrapolovaných mimo rozsah neizotermních měření bylo prokázáno, že nejspolehlivější predikce může být získána z kinetiky krystalizace stanovené na základě DSC dat měřených nejnižší rychlostí ohřevu, která je nejvíc podobná izotermním podmínkám. Bylo zjištěno, že k přesnému predikování krystalizačního chování je potřeba nejen velmi přesně

určit teplotní závislost aktivační energie, ale i kvantifikovat vývoj krystalizačního mechanismu pomocí teplotních závislostí parametrů zvoleného kinetického modelu. Díky tomuto postupu bylo dosaženo dosud ojedinělé přesnosti predikce stupně přeměny i pro predikce extrapolované o více než 50 °C. Dále bylo ukázáno, že tato nově vyvinutá metodika predikce krystalizačního chování amorfních látek dovoluje s velkou přesností určit krystalizační rychlost pro práškový materiál o široké distribuci velikosti částic, a to za pomoci aditivní predikce signálů pro jednotlivé velikostní frakce.

Přesná měření krystalizační rychlosti pro amorfní enzalutamid připravený různými metodami odhalila i další zajímavá fakta. Semikrystalický materiál připravený termickým odpařením z roztoku krystalizoval při nižší teplotě a s nižší aktivační energií makroskopicky sledovaného procesu. Překvapivě byl ale vývoj krystalizačního mechanismu jednotný pro oba materiály – při nízkých rychlostech blízký autokatalyzované kinetice 0. řádu, při vyšších rychlostech přecházející na kinetiku blízkou nukleačně růstovému konceptu. Na základě kalorimetrických dat byly dále identifikovány mikrostrukturní změny amorfni matrice související s rozdílnými technikami přípravy. V případě materiálu připraveného termickým odpařením z roztoku byl identifikován plastifikační efekt zbytkových molekul rozpouštědla projevující se výrazným snížením teploty skelné transformace. V případě rapidně chlazeného extrudovaného enzalutamidu byla zjištěna kontraintuitivní, mírně vyšší tendence ke krystalizaci, pravděpodobně v důsledku rozvolněné struktury či vnitřních mikrotrhlin.

Důležitost vlivu mechanické aktivace povrchu vlivem mletí či drcení byla pro amorfni enzalutamid potvrzena i v případě stabilitního testování. Bylo zjištěno, že v případě, kdy je povrch materiálu mechanicky aktivován, krystalizuje bez ohledu na teplotu, vlhkost a hodnotu  $T_g$ . Materiál krystalizoval i v případě 5 °C (skladování v lednici), což je teplota cca 80 °C pod skelným přechodem enzalutamidu, tj. stav, kde by měl být teoreticky stabilní. U takové API je tudíž vhodné použít jinou metodu přípravy, například sprejové sušení, kde se vyhneme mechanickým operacím. Stabilitní testování sprejově sušeného materiálu nebylo prováděno, ale skladování při 5 °C ukázalo, že sprejově sušený materiál zůstal oproti extrudovanému ve zcela nezměněné podobě po dobu nejméně 4 měsíců (extrudovaný materiál byl za tuto dobu již zcela pokryt krystalickou fází).

Druhá část předložené disertační práce byla zaměřená na disoluční chování amorfniho a krystalického enzalutamidu. Základní rozdíl mezi oběma formami byl, podle předpokladu, v rychlosti rozpouštění, kdy rychlost rozpouštění amorfni formy byla 6krát vyšší. Během tohoto experimentu v režimu pravé disoluce bylo však zjištěno, že se cca po 2 minutách výrazně mění směrnice disoluční křivky, což indikuje vznik krystalické fáze na povrchu

amorfního disku. Identický efekt byl pozorován i v případě disoluce práškového enzalutamidu, tzn. ve formě ve které je enzalutamid používán ve formulacích. V těchto podmínkách byla pozorována prakticky okamžitá krystalizace na povrchu amorfních částic a na disolučních křivkách došlo opět cca po 2 minutách k výrazně změně směrnice. Tímto způsobem byl benefit amorfní API negován, neboť krystalická fáze precipitovaná na povrchu amorfních zrn limitovala rozpustnost obaleného amorfního jádra. Jako řešení k potlačení precipitace amorfní fáze (jež následně prakticky okamžitě přecházela na fázi krystalickou) a k udržení přesyceného stavu byl shledán jako velmi vhodný přídavek polymeru - hydroxypropylmethylcelulózy acetylsukcinátu (HPMC AS typu MF). HPMC AS byla zvolena na základě svých vlastností a velké úspěšnosti u řady léčiv. Z disolučních experimentů granulátu práškového enzalutamidu a HPMC AS vyplynul jednoznačný benefit přídavku polymeru – již při poměru 1:2 (enz.:HPMC) byl eliminován proces krystalizace precipitátu a bylo pozorováno 7,5–10 násobné zvýšení uvolněného množství API oproti granulátu krystalické formy API. Testována byla i forma tablet vylisovaných z amorfního enzalutamidu a HPMC granulované s rozvolňovadlem. V tomto případě však docházelo pouze k částečnému rozpadu tablety, což je vzhledem k povaze enzalutamidu (kdy je preferováno okamžité uvolnění) nevhodné. Jako nejvhodnější formulaci pro amorfní enzalutamid je tedy možno doporučit granulát s HPMC AS plněný např. do želatinové kapsle.

Předložená disertační práce představila modelovou studii amorfního léčiva III. třídy dle GFA, enzalutamidu, kdy hlavním úhlem pohledu byly technologické a fyzikálně-chemické parametry práce s tímto léčivem. V první části práce byly modelovány a experimentálně testovány podmínky pro přípravu, zpracování a dlouhodobé skladování amorfního léčiva. Druhá část práce pak demonstrovala postup testování disolučního chování a návrh formulace pro amorfní léčivo III. třídy dle GFA, kdy zásadním aspektem bylo potlačení rekystalizace z přesyceného roztoku. Propojujícím aspektem obou těchto částí předkládané disertační práce je poukázání na relativně vysokou nestabilitu léčiv III. třídy dle GFA a nástin jejího řešení v modelovém případě.

#### 4.2. Další studie

Vedle enzalutamidu byla v průběhu doktorského studia studována ještě další tři amorfní léčiva III. třídy dle GFA: ketokonazol, dabigatran etexilát mesylát a ivakaftor. Vliv mechanické aktivace povrchu byl demonstrován i pro případ ketokonazolu, jenž rovněž vykazoval krystalizační pík v případě drceného prášku, zatímco ve formě amorfního bulku (přípravený v DSC kelímku) nekrystalizoval ani při 60 °C. V případě dabigatran etexilátu

mesylátu šlo o studii stabilní amorfni fáze připravené sprejovým sušením, jež však byla velmi náchylná k degradaci v přítomnosti vlhkosti. V takovém případě došlo k rozkladu léčiva, což iniciovalo krystalizaci za současného vzniku krystalů původního léčiva i nečistoty vzniklé během dekompozice. Sprejovaný ivakaftor byl naopak fyzikálně i chemicky stabilní ve všech sledovaných podmínkách. Pokud jde o predikce krystalizační rychlosti na základě kinetických výpočtů, u dabigatran etexilátu mesylátu ji nebylo možné použít a její spolehlivost byla omezená i v případě ivakaftoru, neboť zde nedocházelo ke krystalizaci léčiva do původní polymorfni formy. Souhrnem lze tedy říci, že léčiva III. třídy dle GFA jsou poměrně stabilní, ovšem je třeba je vždy testovat na vliv řady experimentálních podmínek, jejichž vliv na tendenci krystalizovat se případ od případu liší.

V další sérii studií prováděné během stáže v materiálovém institutu NIMS (Japonsko) byly blíže zkoumány možnosti použití různých polymerů vhodných k udržení přesyceného stavu v případě nebezpečí rekrystalizace léčiva z roztoku (podobně jako tomu bylo v případě enzalutamidu během disolučních studií). Modelovým léčivem byl v tomto případě amorfni ketokonazol, jehož chování bylo zkoumáno ve formě amorfniho zrna v kontaktu s malým množstvím vody či roztoku polymeru. Bylo zkoumáno pět různých polymerů a u dvou z nich byla pozorována inhibice krystalizace. Následně byla pravdivost tohoto experimentu ověřena precipitačním testem – pH shift disoluční metodou. V případě polymerů (HPMC AS MF, Eutragit® L100), u kterých bylo dosaženo inhibice krystalizace ketokonazolu, byl během precipitačního testu pozorován vznik nanočástic, které byly v případě Eutragit® L100 stabilní až po dobu 14 dní. Inhibice krystalizace těmito polymery byla očekávaná, neboť se jedná o zásadité léčivo a iontové polymery. Krystalizační experiment, tedy krystalizace amorfniho léčiva ve své pevnofázové formě v kontaktu s vodou či roztokem polymeru, může být použit jako predikce chování léčiva v přesyceném stavu.

Poslední studie řešila problém tvrdnutí tablet obsahujících kyselinu salicylovou a Kollidon® SR. Bylo zjištěno, že i suchým kontaktem s polymerem velmi pravděpodobně dochází k amorfizaci kyseliny salicylové. Kyselina salicylová samotná je v amorfni formě téměř nepřipravitelná, avšak v případě této formulace dochází vlivem mletí a následné stabilizace pomocí interakcí s polyvinylpyrrolidonem (Kollidon SR je směsí PVP a PVAc) k její amorfizaci. Toto zjištění je velmi významné, neboť neočekávaná amorfizace API může způsobit značné snížení rychlosti uvolňování API. Rychlost uvolňování API a tím i uvolněné množství klesá s dobou skladování formulace mimo jiné v důsledku změny pevnosti tablet.

## 5. CITACE

- (1) ČESKO. Zákon č. 378 Ze Dne 31. Prosince 2007 o Léčivech. In: Sbíрка Zákonů České Republiky. 2007, Částka 115.
- (2) Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*; Vydavatelství VŠCHT, 2007.
- (3) Martínková, J. *Farmakologie pro Studenty Zdravotnických Oborů*; Grada: Praha, 2007.
- (4) Hinderliter, P.; Saghir, S. A. Pharmacokinetics. In *Encyclopedia of Toxicology*; Elsevier, 2014; pp 849–855. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00419-X>.
- (5) Martínková, J.; Chládek, M.; Mičuda, S.; Cermanová, J.; Grim, J. *Obecná Farmakologie Jako Základ Studia Farmakologie Experimentální a Klinické*; Olga Čermáková: Hradec Králové, 2001.
- (6) Tovey, G. D. *Pharmaceutical Formulation: The Science and Technology of Dosage Forms*, 1st ed.; Thurston, D., Ed.; Fox, D., Martinez, A., Rotella, D., Shen, H., Series Eds.; The Royal Society of Chemistry: United Kingdom, 2018.
- (7) Yun, Y. H.; Lee, B. K.; Park, K. Controlled Drug Delivery: Historical Perspective for the next Generation. *J. Controlled Release* **2015**, *219*, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.005>.
- (8) Babu, N. J.; Nangia, A. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (7), 2662–2679. <https://doi.org/10.1021/cg200492w>.
- (9) Zhang, H.; Surian, J. M. Biopharmaceutic Consideration and Assessment for Oral Controlled Release Formulation. In *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp 33–46.
- (10) Ku, M. S. Preformulation Consideration for Drugs in Oral CR Formulation. In *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp 47–69.
- (11) Wen, H.; Park, K. Introduction and Overview of Oral Controlled Release Formulation Design. In *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery*; Wen, H., Park, K., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp 1–19. <https://doi.org/10.1002/9780470640487.ch1>.
- (12) Shukla, T.; Pandey; Upmanyu; Sudheesh, M.; Chandel, H.; Pawan, K.; Porwal. The Biopharmaceutical Classification System (BCS): Past and Present Scenario of Scientific framework for Bio-waiver Extension and Need of its Validation /paper/The-Biopharmaceutical-Classification-System-(BCS)-Shukla-Pandey/3e26a654b0569d30416011a7bb3344a0494326a3 (accessed 2020 -12 -28).
- (13) Tsume, Y.; Matsui, K.; Searls, A. L.; Takeuchi, S.; Amidon, G. E.; Sun, D.; Amidon, G. L. The Impact of Supersaturation Level for Oral Absorption of BCS Class IIb Drugs, Dipyridamole and Ketoconazole, Using in Vivo Predictive Dissolution System: Gastrointestinal Simulator (GIS). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *102*, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.042>.
- (14) Charalabidis, A.; Sfouni, M.; Bergström, C.; Macheras, Panos. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond Guidelines. *Int. J. Pharm.* **2019**, *566*, 264–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.041>.
- (15) Kawabata, Y.; Wada, K.; Nakatani, M.; Yamada, S.; Onoue, S. Formulation Design for Poorly Water-Soluble Drugs Based on Biopharmaceutics Classification System: Basic Approaches and Practical Applications. *Int. J. Pharm.* **2011**, *420* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.032>.

- (16) FDA. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/biopharmaceutics-classification-system-bcs-guidance> (accessed 2021 -08 -16).
- (17) Yu, L. X.; Amidon, G. L.; Polli, J. E.; Zhao, H.; Mehta, M. U.; Conner, D. P.; Shah, V. P.; Lesko, L. J.; Chen, M.; Lee, V. H. L.; Hussain, A. S. Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (7), 921–925. <https://doi.org/10.1023/A:1016473601633>.
- (18) *Český Lékopis*; Grada Publishing: Praha, 2017.
- (19) *European Pharmacopoei (Ph.Eur) 9th Edition*; European Director for the Quality of Medicine & HealthCare, 2018; Vol. 1.
- (20) FDA/CDER/Purdie, F. P. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry. **2017**, 19.
- (21) Siepmann, J.; Siepmann, F. Mathematical Modeling of Drug Dissolution. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.044>.
- (22) Rams-Baron, M.; Jachowicz, R.; Boldyreva, E.; Zhou, D.; Jamroz, W.; Paluch, M. *Amorphous Drugs*; Springer International Publishing: Cham, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72002-9>.
- (23) Rasenack, N.; Hartenhauer, H.; Müller, B. W. Microcrystals for Dissolution Rate Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. *Int. J. Pharm.* **2003**, *254* (2), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00005-X).
- (24) Chu, K. R.; Lee, E.; Jeong, S. H.; Park, E.-S. Effect of Particle Size on the Dissolution Behaviors of Poorly Water-Soluble Drugs. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35* (7), 1187–1195. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0709-3>.
- (25) Leuner, C. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50* (1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00076-X).
- (26) Siepmann, J.; Rades, T.; Muellertz, A.; Loftsson, T. Poorly Soluble Drugs. *Int. J. Pharm.* **2020**, *577*, 119055. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119055>.
- (27) Serajuddin, A. T. M. Salt Formation to Improve Drug Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>.
- (28) Pudipeddi, M.; Serajuddin, A. T. M. Trends in Solubility of Polymorphs. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94* (5), 929–939. <https://doi.org/10.1002/jps.20302>.
- (29) Rodrigues, M.; Baptista, B.; Lopes, J. A.; Sarraguça, M. C. Pharmaceutical Cocrystallization Techniques. Advances and Challenges. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547* (1–2), 404–420. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.024>.
- (30) Perlovich, G.; Manin, A. Design of Pharmaceutical Cocrystals for Drug Solubility Improvement. *Russ. J. Gen. Chem.* **2014**, *84*. <https://doi.org/10.1134/S107036321402042X>.
- (31) Yan, Y.; Chen, J.-M.; Geng, N.; Lu, T.-B. Improving the Solubility of Agomelatine via Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (5), 2226–2233. <https://doi.org/10.1021/cg201423q>.
- (32) Drabold, D. A. Topics in the Theory of Amorphous Materials. *Eur. Phys. J. B* **2009**, *68* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1140/epjb/e2009-00080-0>.

- (33) Gupta, P.; Chawla, G.; Bansal, A. K. Physical Stability and Solubility Advantage from Amorphous Celecoxib: The Role of Thermodynamic Quantities and Molecular Mobility. *Mol. Pharm.* **2004**, *1* (6), 406–413. <https://doi.org/10.1021/mp049938f>.
- (34) Murdande, S. B.; Pikal, M. J.; Shanker, R. M.; Bogner, R. H. Solubility Advantage of Amorphous Pharmaceuticals: I. A Thermodynamic Analysis. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (3), 1254–1264. <https://doi.org/10.1002/jps.21903>.
- (35) Murdande, S. B.; Pikal, M. J.; Shanker, R. M.; Bogner, R. H. Solubility Advantage of Amorphous Pharmaceuticals, Part 3: Is Maximum Solubility Advantage Experimentally Attainable and Sustainable? *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100* (10), 4349–4356. <https://doi.org/10.1002/jps.22643>.
- (36) Almeida e Sousa, L.; Reutzel-Edens, S. M.; Stephenson, G. A.; Taylor, L. S. Assessment of the Amorphous “Solubility” of a Group of Diverse Drugs Using New Experimental and Theoretical Approaches. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (2), 484–495. <https://doi.org/10.1021/mp500571m>.
- (37) Murdande, S. B.; Pikal, M. J.; Shanker, R. M.; Bogner, R. H. Aqueous Solubility of Crystalline and Amorphous Drugs: Challenges in Measurement. *Pharm. Dev. Technol.* **2011**, *16* (3), 187–200. <https://doi.org/10.3109/10837451003774377>.
- (38) Edueng; Bergström; Gråsjö; Mahlin. Long-Term Physical (In)Stability of Spray-Dried Amorphous Drugs: Relationship with Glass-Forming Ability and Physicochemical Properties. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (9), 425. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090425>.
- (39) Hancock, B. C.; Parks, M. What Is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals? *Pharm. Res.* **2000**, *17* (4), 397–404. <https://doi.org/10.1023/A:1007516718048>.
- (40) Manchanda, A.; Kleppe, M. S.; Bogner, R. H. Nuances in the Calculation of Amorphous Solubility Enhancement Ratio. *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108* (11), 3560–3574. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.06.020>.
- (41) Parks, G. S.; Huffman, H. M.; Cattoir, F. R. Studies on Glass. II. The Transition between the Glassy and Liquid States in the Case of Glucose. *J. Phys. Chem.* **1928**, *32* (9), 1366–1379. <https://doi.org/10.1021/j150291a008>.
- (42) Blaabjerg, L. I.; Lindenberg, E.; Rades, T.; Grohgan, H.; Löbmann, K. Influence of Preparation Pathway on the Glass Forming Ability. *Int. J. Pharm.* **2017**, *521* (1–2), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.042>.
- (43) Willart, J. F.; Descamps, M. Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (6), 905–920. <https://doi.org/10.1021/mp800092t>.
- (44) Hengsawas Surasarang, S.; Keen, J. M.; Huang, S.; Zhang, F.; McGinity, J. W.; Williams, R. O. Hot Melt Extrusion versus Spray Drying: Hot Melt Extrusion Degrades Albendazole. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43* (5), 797–811. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1220577>.
- (45) Gupta, S. S.; Solanki, N.; Serajuddin, A. T. M. Investigation of Thermal and Viscoelastic Properties of Polymers Relevant to Hot Melt Extrusion, IV: Affinisol™ HPMC HME Polymers. *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17* (1), 148–157. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0426-6>.
- (46) Crowley, M. M.; Zhang, F.; Repka, M. A.; Thumma, S.; Upadhye, S. B.; Kumar Battu, S.; McGinity, J. W.; Martin, C. Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion: Part I. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2007**, *33* (9), 909–926. <https://doi.org/10.1080/03639040701498759>.

- (47) Fan, W.; Zhu, W.; Zhang, X.; Xu, Y.; Di, L. Application of the Combination of Ball-Milling and Hot-Melt Extrusion in the Development of an Amorphous Solid Dispersion of a Poorly Water-Soluble Drug with High Melting Point. *RSC Adv.* **2019**, *9* (39), 22263–22273. <https://doi.org/10.1039/C9RA00810A>.
- (48) Lang, B.; McGinity, J. W.; Williams, R. O. Dissolution Enhancement of Itraconazole by Hot-Melt Extrusion Alone and the Combination of Hot-Melt Extrusion and Rapid Freezing—Effect of Formulation and Processing Variables. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (1), 186–196. <https://doi.org/10.1021/mp4003706>.
- (49) Chamsai, B.; Sriamornsak, P. Effect of Cooling Technique on Physicochemical Properties of Ternary Solid Dispersion of Manidipine Hydrochloride Prepared by Melting Method. *Asian J. Pharm. Sci.* **2016**, *11* (1), 193–194. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.11.040>.
- (50) Hwang, I.; Kang, C.-Y.; Park, J.-B. Advances in Hot-Melt Extrusion Technology toward Pharmaceutical Objectives. *J. Pharm. Investig.* **2017**, *47* (2), 123–132. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0309-9>.
- (51) Ma, X.; Huang, S.; Lowinger, M. B.; Liu, X.; Lu, X.; Su, Y.; Williams, R. O. Influence of Mechanical and Thermal Energy on Nifedipine Amorphous Solid Dispersions Prepared by Hot Melt Extrusion: Preparation and Physical Stability. *Int. J. Pharm.* **2019**, *561*, 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.014>.
- (52) Mahmah, O.; Tabbakh, R.; Kelly, A.; Paradkar, A. A Comparative Study of the Effect of Spray Drying and Hot-Melt Extrusion on the Properties of Amorphous Solid Dispersions Containing Felodipine: Preparation of Felodipine Solid Dispersion. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, *66* (2), 275–284. <https://doi.org/10.1111/jphp.12099>.
- (53) Singh, A.; Van den Mooter, G. Spray Drying Formulation of Amorphous Solid Dispersions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *100*, 27–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>.
- (54) Mahlin, D.; Ponnambalam, S.; Heidarian Höckerfelt, M.; Bergström, C. A. S. Toward *In Silico* Prediction of Glass-Forming Ability from Molecular Structure Alone: A Screening Tool in Early Drug Development. *Mol. Pharm.* **2011**, *8* (2), 498–506. <https://doi.org/10.1021/mp100339c>.
- (55) Cabral, A. A.; Fredericci, C.; Zanotto, E. D. A Test of the Hruby Parameter to Estimate Glass-Forming Ability. *J. Non-Cryst. Solids* **1997**, *219*, 182–186. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(97\)00327-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(97)00327-X).
- (56) Alhalaweh, A.; Alzghoul, A.; Kaialy, W.; Mahlin, D.; Bergström, C. A. S. Computational Predictions of Glass-Forming Ability and Crystallization Tendency of Drug Molecules. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (9), 3123–3132. <https://doi.org/10.1021/mp500303a>.
- (57) Baird, J. A.; Van Eerdenbrugh, B.; Taylor, L. S. A Classification System to Assess the Crystallization Tendency of Organic Molecules from Undercooled Melts. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (9), 3787–3806. <https://doi.org/10.1002/jps.22197>.
- (58) Van Eerdenbrugh, B.; Baird, J. A.; Taylor, L. S. Crystallization Tendency of Active Pharmaceutical Ingredients Following Rapid Solvent Evaporation—Classification and Comparison with Crystallization Tendency from Under Cooled Melts. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (9), 3826–3838. <https://doi.org/10.1002/jps.22214>.
- (59) Mahlin, D.; Bergström, C. A. S. Early Drug Development Predictions of Glass-Forming Ability and Physical Stability of Drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49* (2), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.03.016>.

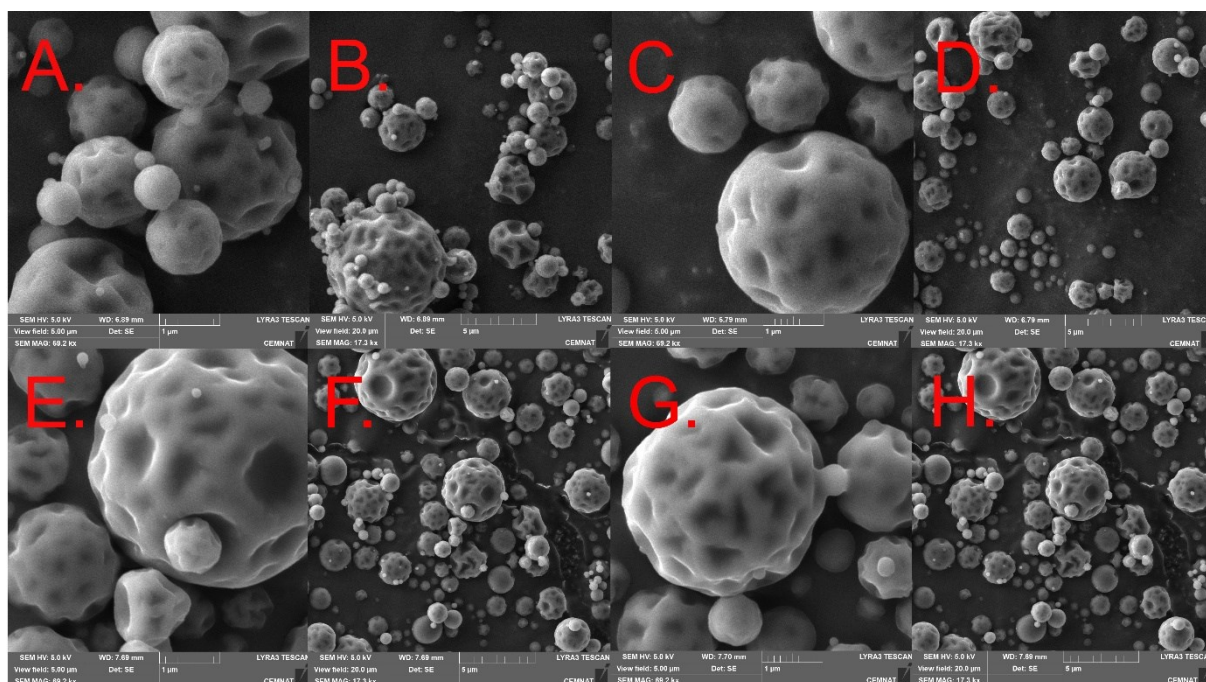
- (60) Blaabjerg, L. I.; Lindenberg, E.; Löbmann, K.; Grohgan, H.; Rades, T. Glass Forming Ability of Amorphous Drugs Investigated by Continuous Cooling and Isothermal Transformation. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (9), 3318–3325. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00650>.
- (61) Descamps, M.; Willart, J. F.; Dudognon, E.; Caron, V. Transformation of Pharmaceutical Compounds upon Milling and Comilling: The Role of T(g). *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (5), 1398–1407. <https://doi.org/10.1002/jps.20939>.
- (62) Graeser, K. A.; Strachan, C. J.; Patterson, J. E.; Gordon, K. C.; Rades, T. Physicochemical Properties and Stability of Two Differently Prepared Amorphous Forms of Simvastatin. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (1), 128–135. <https://doi.org/10.1021/cg700913m>.
- (63) Alhalaweh, A.; Alzghoul, A.; Mahlin, D.; Bergström, C. A. S. Physical Stability of Drugs after Storage above and below the Glass Transition Temperature: Relationship to Glass-Forming Ability. *Int. J. Pharm.* **2015**, *495* (1), 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.101>.
- (64) Wyttenbach, N.; Kuentz, M. Glass-Forming Ability of Compounds in Marketed Amorphous Drug Products. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *112*, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.031>.
- (65) Baciarello, G.; Sternberg, C. N. Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (MCRPC) with Enzalutamide. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *106*, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.07.005>.
- (66) Enzalutamide <https://go.drugbank.com/drugs/DB08899> (accessed 2021 -01 -12).
- (67) Ahmed, M. E.; Joshi, V. B.; Badawy, M.; Pagliaro, L. C.; Karnes, R. J.; Lowe, V.; Thorpe, M. P.; Kwon, E. D.; Kendi, A. T. Radium-223 in the Third-Line Setting in Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer (MCRPC): Impact of Concomitant Use of Enzalutamide on Overall Survival and Predictors of Improved Overall Survival. *Clin. Genitourin. Cancer* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2020.12.009>.
- (68) ANNEX I Summary of Product Characteristics: Xtandi. European Medicines Agency 2018.
- (69) M, van N.; S, G.; Am, B.; Ji, R.; H, R.; Jh, B.; Adr, H. Plasma Levels of Enzalutamide and Its Main Metabolites in a Patient With Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Undergoing Hemodialysis <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30626533/> (accessed 2021 -01 -12). <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.12.004>.
- (70) Miura, R.; Hirabatake, M.; Irie, K.; Ikesue, H.; Muroi, N.; Kawakita, M.; Hashida, T. Safety Evaluation of Enzalutamide Dose-Escalation Strategy in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2020**, S1078143920304282. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.09.013>.
- (71) Liu, Y.-M.; Wu, P.; Fukushi, R.; Yamada, S.; Chen, Q. Pharmacokinetics and Safety of Enzalutamide in Healthy Chinese Male Volunteers. *Clin. Ther.* **2019**, *41* (2), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.12.002>.
- (72) Wilson, V.; Lou, X.; Osterling, D. J.; Stolarik, D. F.; Jenkins, G.; Gao, W.; Zhang, G. G. Z.; Taylor, L. S. Relationship between Amorphous Solid Dispersion in Vivo Absorption and in Vitro Dissolution: Phase Behavior during Dissolution, Speciation, and Membrane Mass Transport. *J. Controlled Release* **2018**, *292*, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.11.003>.
- (73) Volkova, T. V.; Drozd, K. V.; Surov, A. O. Effect of Polymers and Cyclodextrins on Solubility, Permeability and Distribution of Enzalutamide and Apalutamide Antiandrogens. *J. Mol. Liq.* **2021**, *322*, 114937. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114937>.

- (74) Aoki, H.; Kojima, R.; Namiki, S.; Oba, S.; Sakai, T.; Takagi, A.; Umemoto, Y.; Yoshida, T. Pharmaceutical Composition for Oral Administration Comprising Enzalutamide. CA3060366A1, November 1, 2018.
- (75) Everett, J. a; Irie, R.; Kanbayashi, A.; Konagurthu, S.; Lorenz, D. A.; Matz, S.; Nishimura, K.; Oba, S.; Sakai, T.; Takaishi, Y.; Toyota, H.; Wald, R. J. Formulations of Enzalutamide. WO2014043208A1, March 20, 2014.
- (76) Maini, L.; Braga, D.; Farinella, F.; Melotto, E.; Verzini, M.; Brescello, R.; Michieletto, I.; Munari, I. Crystal Forms of Enzalutamide and a Crystal Engineering Route to Drug Purification. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (7), 3774–3780. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01613>.
- (77) Munson, E. J. Analytical Techniques in Solid-State Characterization. In *Developing Solid Oral Dosage Forms*; Elsevier, 2009; pp 61–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00003-5>.
- (78) *Principles and Applications of Thermal Analysis*; Gabbott, P., Ed.; Blackwell Publishing: UK, 2008.
- (79) Liu, F.; Wang, H. F.; Chen, Z.; Yang, W.; Yang, G. C. Determination of Activation Energy for Crystallization in Amorphous Alloys. *Mater. Lett.* **2006**, *60* (29–30), 3916–3921. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.04.063>.
- (80) Wellen, R. M. R.; Canedo, E. L. On the Kissinger Equation and the Estimate of Activation Energies for Non-Isothermal Cold Crystallization of PET. *Polym. Test.* **2014**, *40*, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2014.08.008>.
- (81) Starink, M. J. The Determination of Activation Energy from Linear Heating Rate Experiments: A Comparison of the Accuracy of Isoconversion Methods. *Thermochim. Acta* **2003**, *404* (1–2), 163–176. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00144-8).
- (82) Vyazovkin, S.; Burnham, A. K.; Criado, J. M.; Pérez-Maqueda, L. A.; Popescu, C.; Sbirrazzuoli, N. ICTAC Kinetics Committee Recommendations for Performing Kinetic Computations on Thermal Analysis Data. *Thermochim. Acta* **2011**, *520* (1–2), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.03.034>.
- (83) Šesták, J.; Berggren, G. Study of the Kinetics of the Mechanism of Solid-State Reactions at Increasing Temperatures. *Thermochim. Acta* **1971**, *3* (1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(71\)85051-7](https://doi.org/10.1016/0040-6031(71)85051-7).
- (84) Avrami, M. Kinetics of Phase Change. I General Theory. *J. Chem. Phys.* **1939**, *7* (12), 1103–1112. <https://doi.org/10.1063/1.1750380>.
- (85) Arhangel'skii, I. V.; Dunaev, A. V.; Makarenko, I. V.; Tikhonov, N. A.; Tarasov, A. V. Non-Isothermal Kinetic Methods. **2013**.
- (86) USP 711: Dissolution. The United States Pharmacopeial Convection 2011.
- (87) Státní ústav pro kontrolu léčiv <https://www.sukl.cz/> (accessed 2021 -10 -17).
- (88) European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/en> (accessed 2021 -10 -17).
- (89) U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/home> (accessed 2021 -10 -17).
- (90) Lindenbaum, J.; Mellow, M. H.; Blackstone, M. O.; Butler, V. P. Variation in Biologic Availability of Digoxin from Four Preparations. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285* (24), 1344–1347. <https://doi.org/10.1056/NEJM197112092852403>.
- (91) Tyrer, J. H.; Eadie, M. J.; Sutherland, J. M.; Hooper, W. D. Outbreak of Anticonvulsant Intoxication in an Australian City. *BMJ* **1970**, *4* (5730), 271–273. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5730.271>.

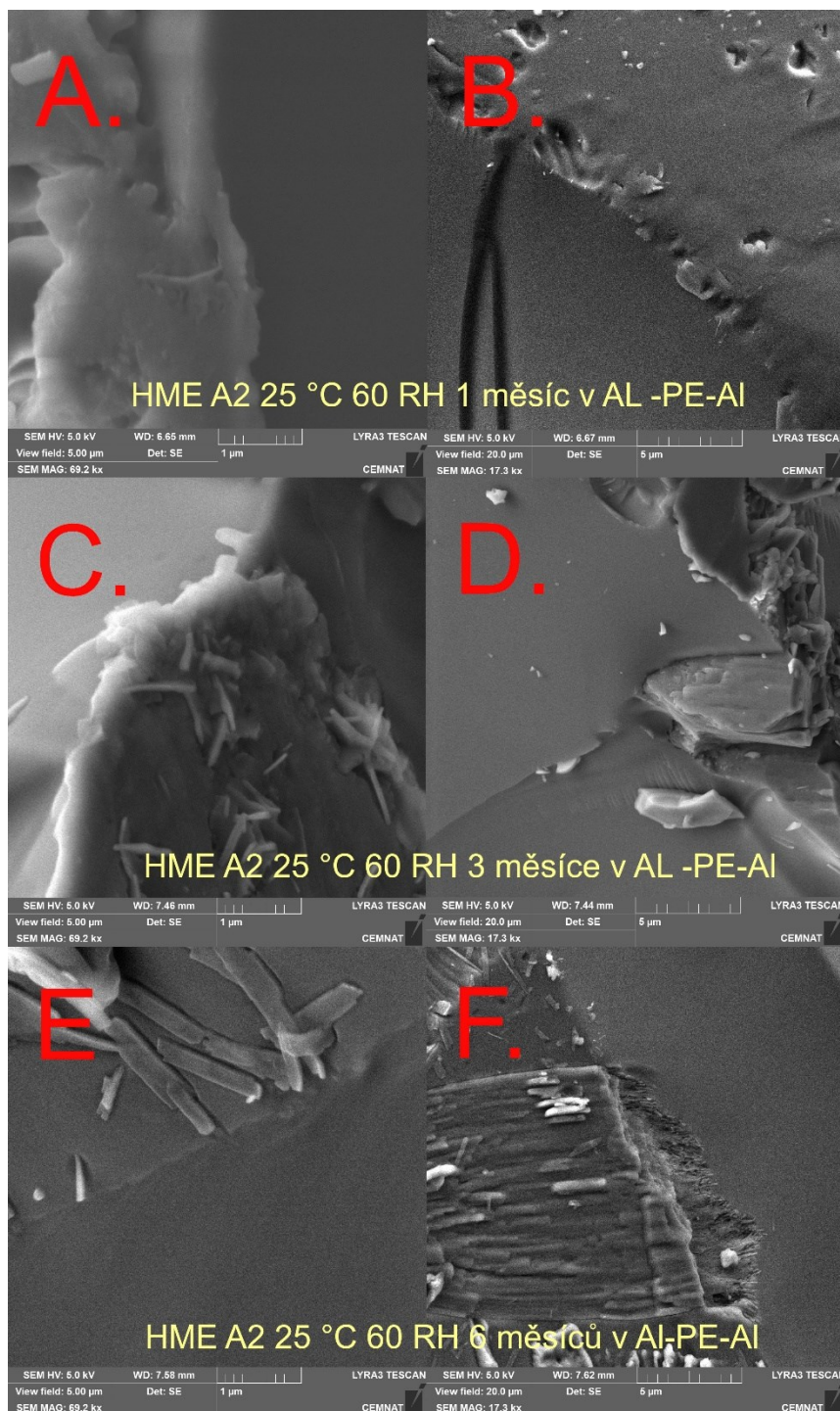
- (92) Theeuwes, F.; Bayne, W. Dosage Form Index: An Objective Criterion for Evaluation of Controlled-Release Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66* (10), 1388–1392. <https://doi.org/10.1002/jps.2600661009>.
- (93) Guo, M. Dissolution Testing: In Vitro Characterization of Oral Controlled Release Dosage Forms. In *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*; 2010; pp 245–256. <https://doi.org/10.1002/9780470640487.ch15>.
- (94) Different Types of Dissolution Apparatus: Pharmaceutical Guidelines <https://www.pharmaguideline.com/2017/11/different-types-of-dissolution-apparatus.html> (accessed 2020-12-29).
- (95) USP 724: Drug Release. The United States Pharmacopeial Convention 2012.
- (96) Hezaveh, H.; Muhamad, I. I. Controlled Drug Release via Minimization of Burst Release in PH-Response Kappa-Carrageenan/Polyvinyl Alcohol Hydrogels. *Chem. Eng. Res. Des.* **2013**, *91* (3), 508–519. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2012.08.014>.
- (97) Costa, P.; Sousa Lobo, J. M. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13* (2), 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1).
- (98) Huang, X.; Brazel, C. S. On the Importance and Mechanisms of Burst Release in Matrix-Controlled Drug Delivery Systems. *J. Controlled Release* **2001**, *73* (2–3), 121–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6).
- (99) Al-Zoubi, N.; Malamataris, S. Three-Layer Matrix Tablets and Simple Approach of Drug Release Programming. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2008**, *18* (6), 431–437. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(08\)50083-9](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(08)50083-9).
- (100) Peppas, N. A. Analysis of Fickian and Non-Fickian Drug Release from Polymers. *Pharm. Acta Helv.* **1985**, *60* (4), 110–111.
- (101) 5 - Mathematical Models of Drug Release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*; Bruschi, M. L., Ed.; Woodhead Publishing, 2015; pp 63–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
- (102) Fan, W.; Zhang, X.; Zhu, W.; Di, L. The Preparation of Curcumin Sustained-Release Solid Dispersion by Hot-Melt Extrusion—II. Optimization of Preparation Process and Evaluation In Vitro and In Vivo. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109* (3), 1253–1260. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.11.020>.
- (103) Khan, K. A. The Concept of Dissolution Efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* **1975**, *27* (1), 48–49. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1975.tb09378.x>.
- (104) Florence, A. T.; Attwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy: In Manufacture, Formulation and Clinical Use*, 6th ed.; Pharmaceutical Press, 2015.
- (105) Kissinger, H. E. Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. *Anal. Chem.* **1957**, *29* (11), 1702–1706. <https://doi.org/10.1021/ac60131a045>.
- (106) Seshan, K. *Handbook of Thin Film Deposition*, 3rd ed.; Elsevier, 2012.
- (107) Boge, R.; Madivada, L. R.; Peddy, V. Enzalutamide Polymorphic Forms and Its Preparation. WO2014041487A2, March 20, 2014.
- (108) Obadalová, I.; Schöngut, M.; Žvátora, P. Pharmaceutical Composition of Crystalline Enzalutamide and Preparing It. CZ20199A3, July 15, 2020.

- (109) Ishizuka, Y.; Ueda, K.; Okada, H.; Takeda, J.; Karashima, M.; Yazawa, K.; Higashi, K.; Kawakami, K.; Ikeda, Y.; Moribe, K. Effect of Drug–Polymer Interactions through Hypromellose Acetate Succinate Substituents on the Physical Stability on Solid Dispersions Studied by Fourier-Transform Infrared and Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (6), 2785–2794. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00301>.
- (110) Ueda, K.; Higashi, K.; Yamamoto, K.; Moribe, K. The Effect of HPMCAS Functional Groups on Drug Crystallization from the Supersaturated State and Dissolution Improvement. *Int. J. Pharm.* **2014**, *464* (1–2), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.005>.
- (111) Siepmann, J.; Peppas, N. A. Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *48* (2), 139–157. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00112-0).
- (112) Ueda, K.; Higashi, K.; Moribe, K. Direct NMR Monitoring of Phase Separation Behavior of Highly Supersaturated Nifedipine Solution Stabilized with Hypromellose Derivatives. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (7), 2314–2322. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00178>.
- (113) Tajarobi, F.; Larsson, A.; Matic, H.; Abrahmsén-Alami, S. The Influence of Crystallization Inhibition of HPMC and HPMCAS on Model Substance Dissolution and Release in Swellable Matrix Tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78* (1), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.020>.
- (114) Paus, R.; Prudic, A.; Ji, Y. Influence of Excipients on Solubility and Dissolution of Pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2015**, *485* (1), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.004>.

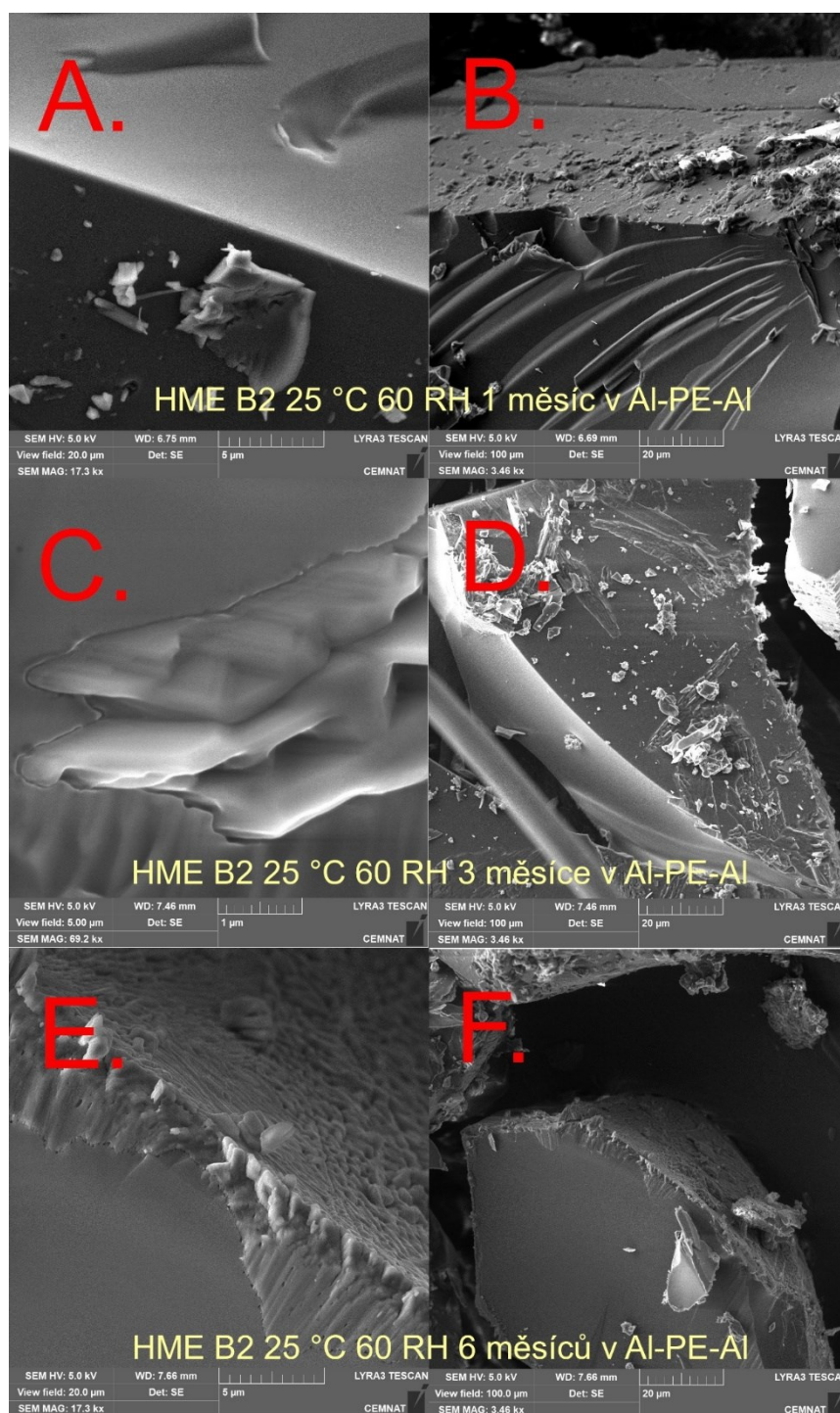
## PŘÍLOHY



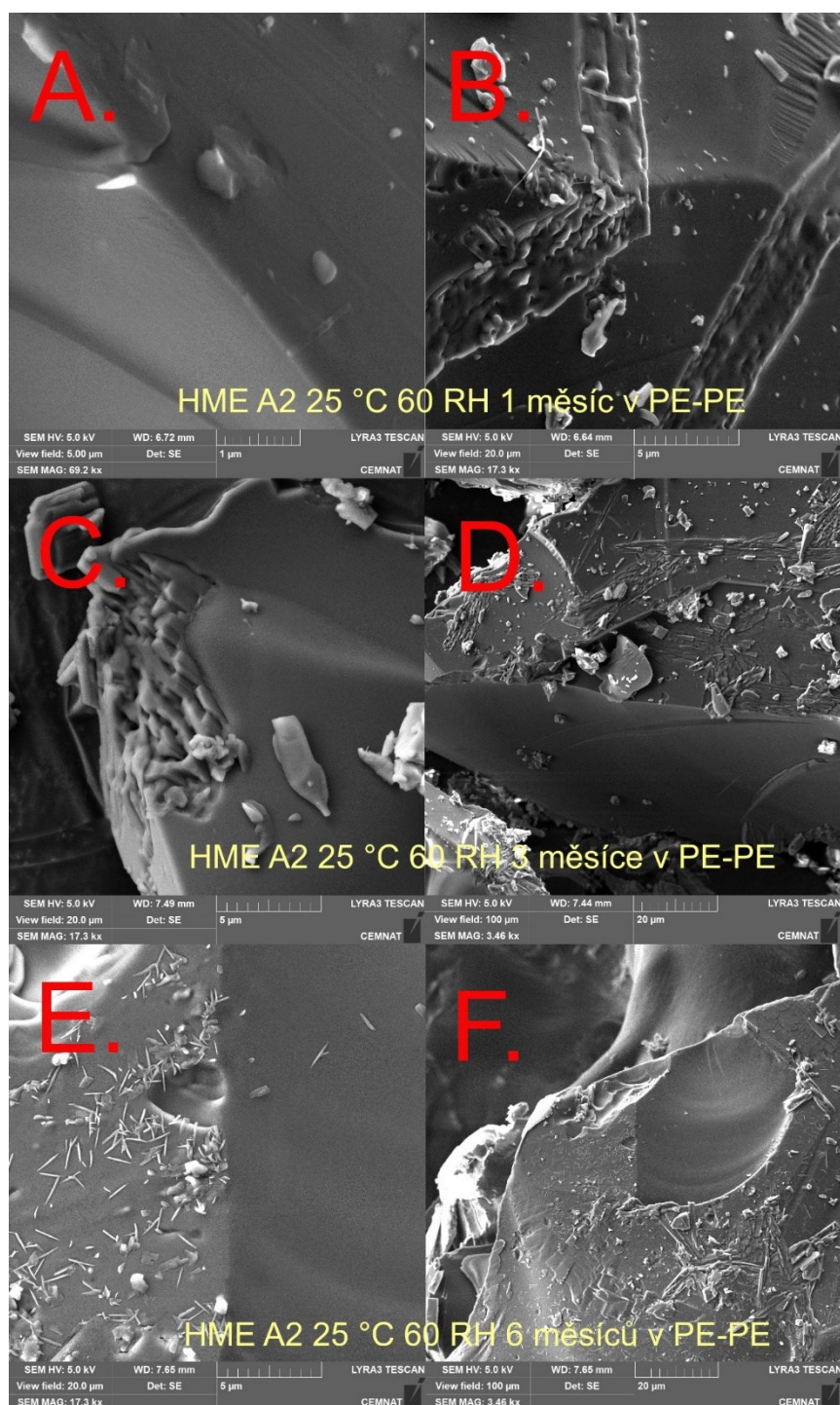
Obrázek P 1. SEM snímky následujících látek: A. Materiál SD A (nesušený materiál) měřený po přípravě, zobrazený s měřítkem 1  $\mu\text{m}$ ; B. Materiál SD A (nesušený materiál) měřený po přípravě, zobrazený s měřítkem 5  $\mu\text{m}$ ; C. materiál SD B (vysušený) měřený po přípravě, zobrazený s měřítkem 1  $\mu\text{m}$ ; D. materiál SD B (vysušený), měřený po přípravě, zobrazený s měřítkem 5  $\mu\text{m}$ ; E. Materiál SD A (nesušený materiál) měřený po 156 dnech (skladovaný v 5  $^{\circ}\text{C}$ ), zobrazený s měřítkem 1  $\mu\text{m}$ ; Materiál SD A (nesušený materiál) měřený po 156 dnech (skladovaný v 5  $^{\circ}\text{C}$ ), zobrazený s měřítkem 5  $\mu\text{m}$ ; Materiál SD B (vysušený) měřený po 156 dnech (skladovaný v 5  $^{\circ}\text{C}$ ), zobrazený s měřítkem 1  $\mu\text{m}$ ; Materiál SD B (vysušený) měřený po 156 dnech (skladovaný v 5  $^{\circ}\text{C}$ ), zobrazený s měřítkem 5  $\mu\text{m}$ .



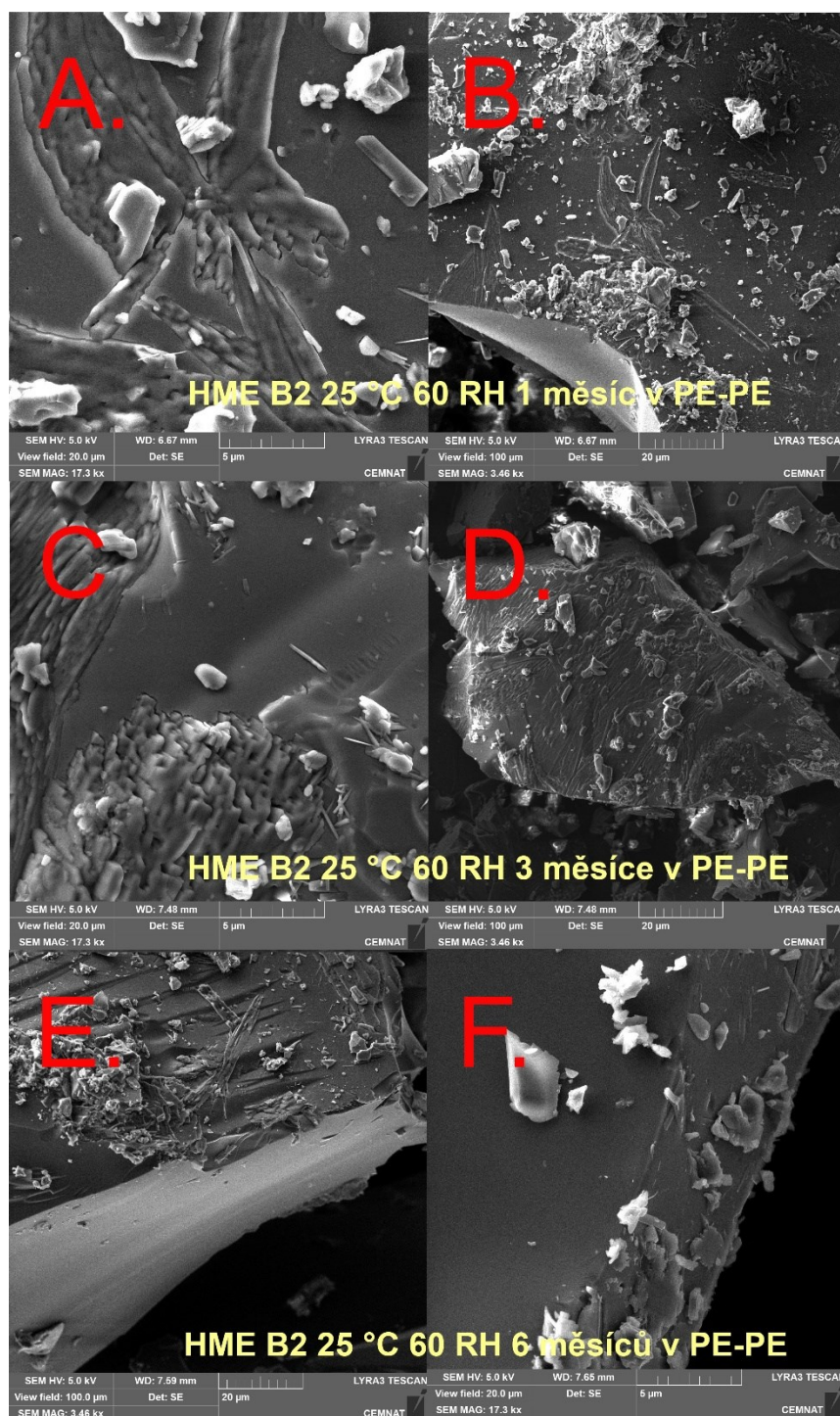
Obrázek P 2. SEM snímky materiálu HME A2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), B. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), C. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), D. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), E. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), F. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 5 μm).



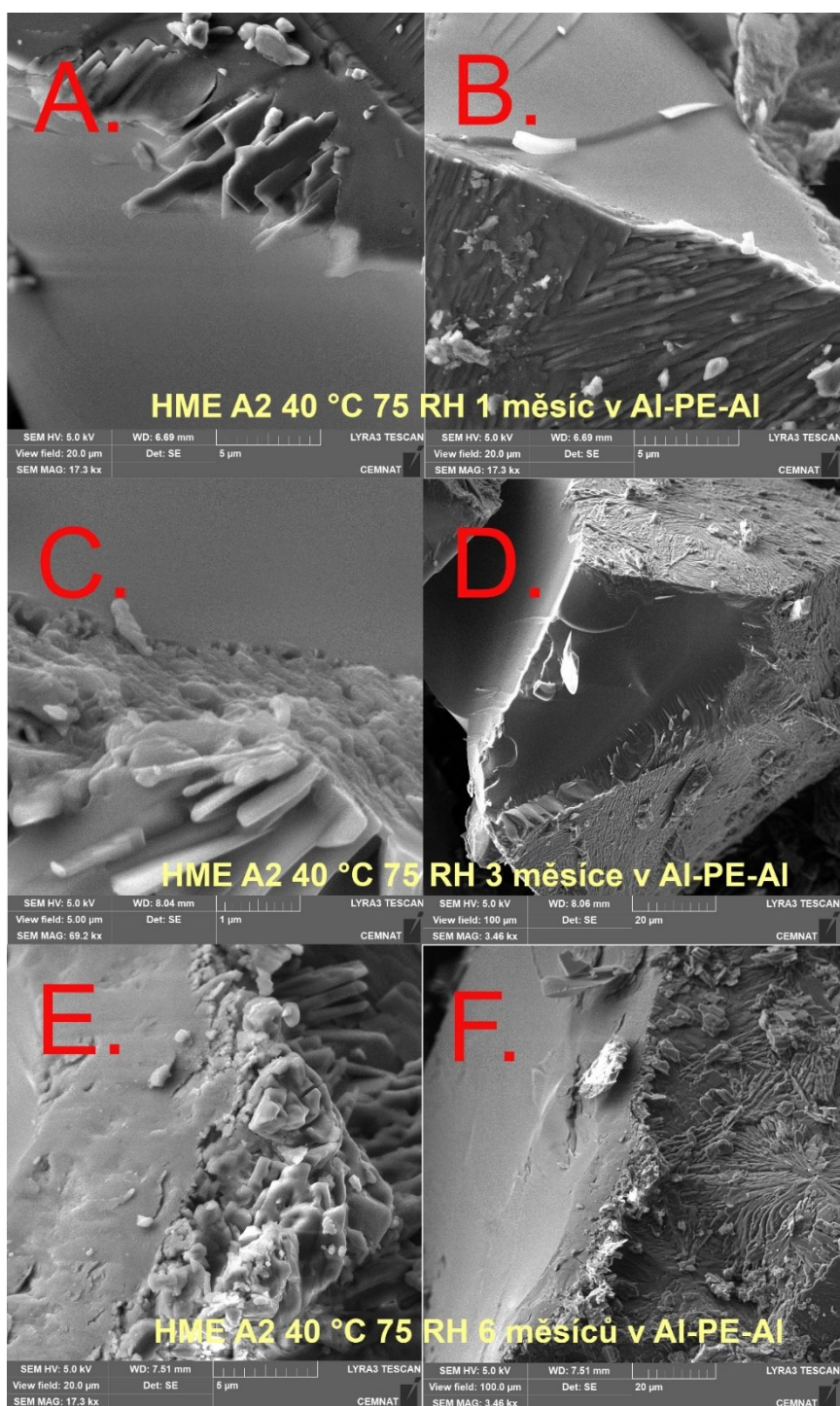
Obrázek P 3. SEM snímky materiálu HME B2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), B. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), C. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), D. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), E. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), F. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 5 μm).



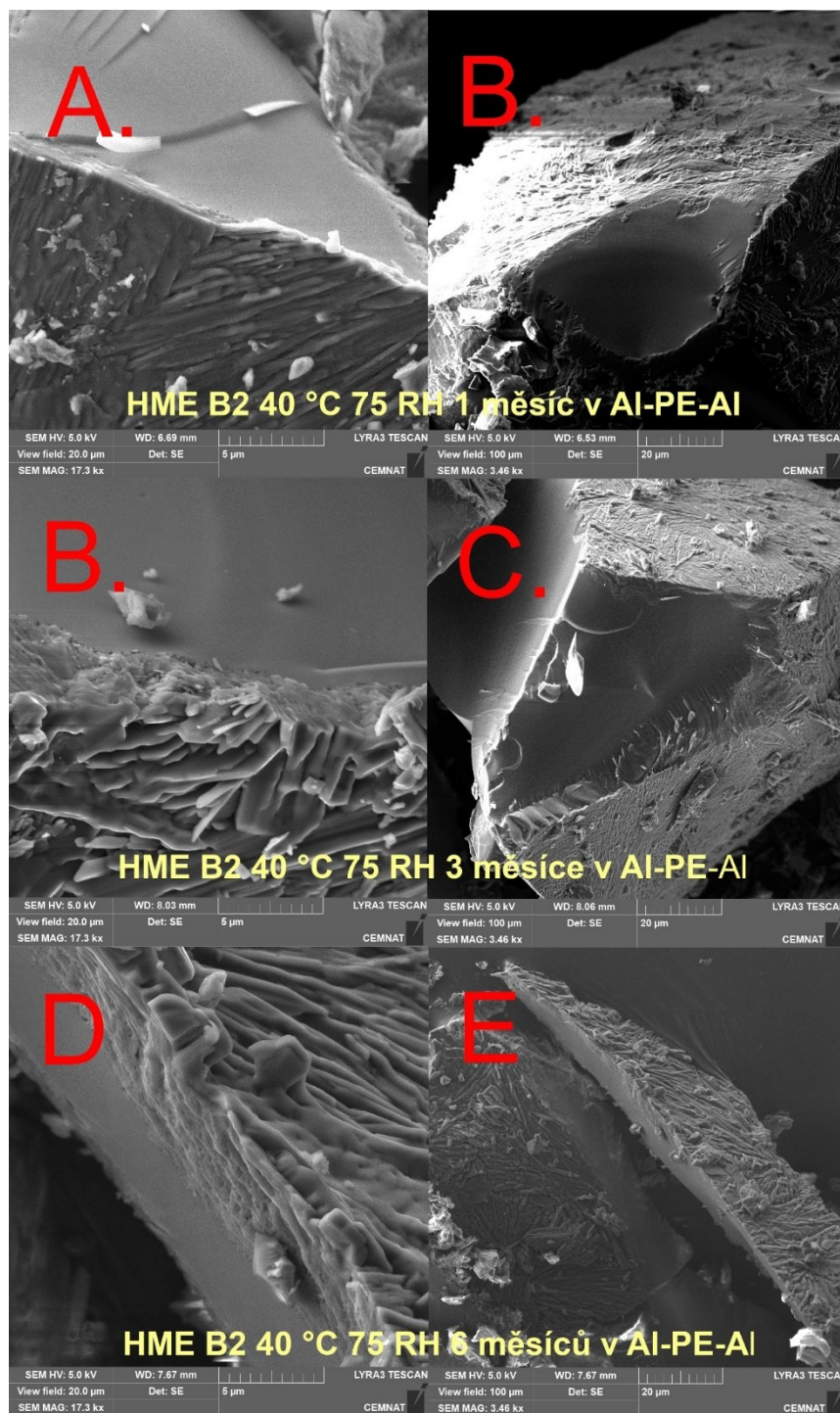
Obrázek P 4. SEM snímky materiálu HME A2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 1  $\mu\text{m}$ ), B. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 5  $\mu\text{m}$ ), C. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 1  $\mu\text{m}$ ), D. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 5  $\mu\text{m}$ ), E. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 1  $\mu\text{m}$ ), F. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 5  $\mu\text{m}$ ).



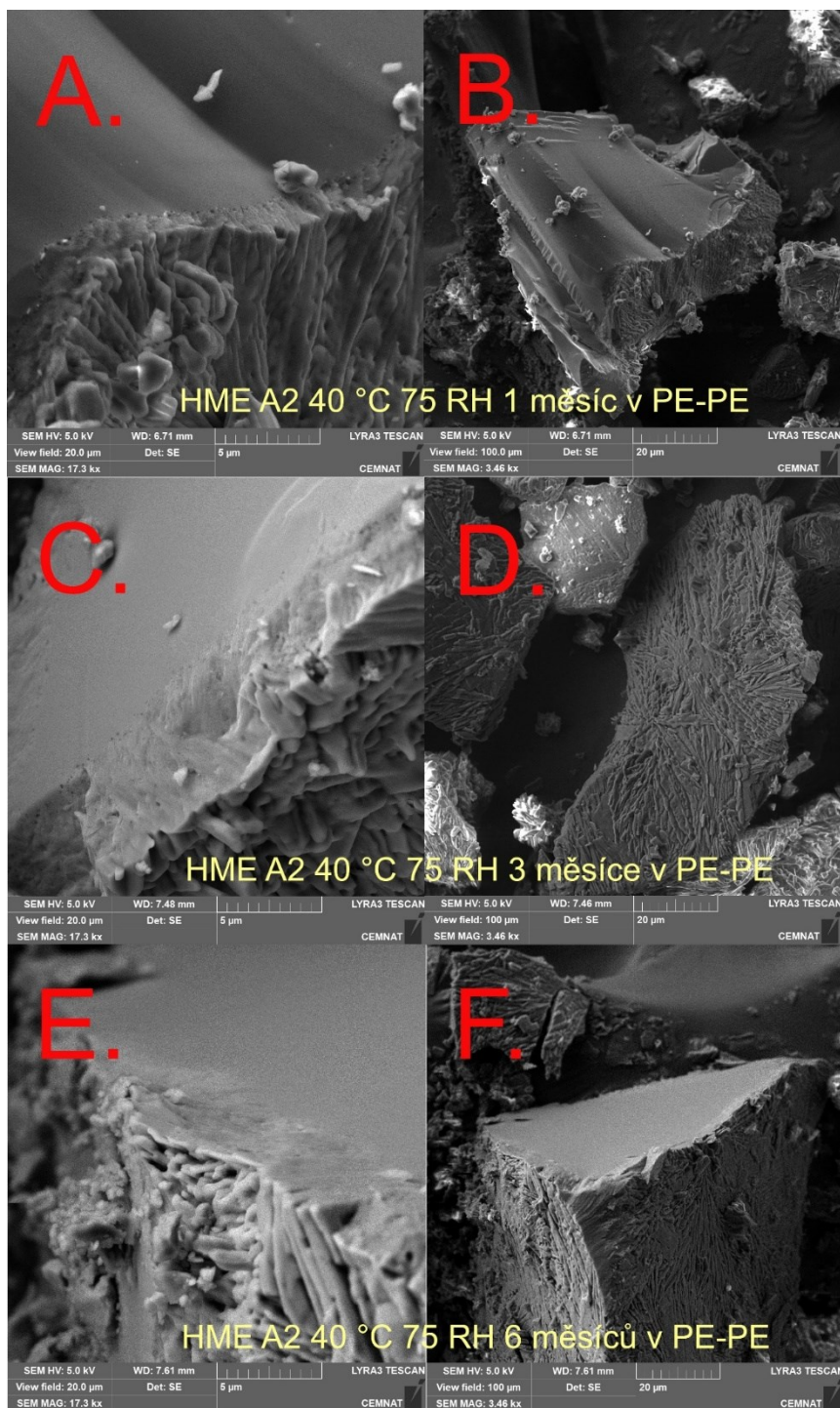
Obrázek P 5. SEM snímky materiálu HME B2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 1 μm), B. 25 °C 60 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 5 μm), C. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 1 μm), D. 25 °C 60 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 5 μm), E. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 1 μm), F. 25 °C 60 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 5 μm).



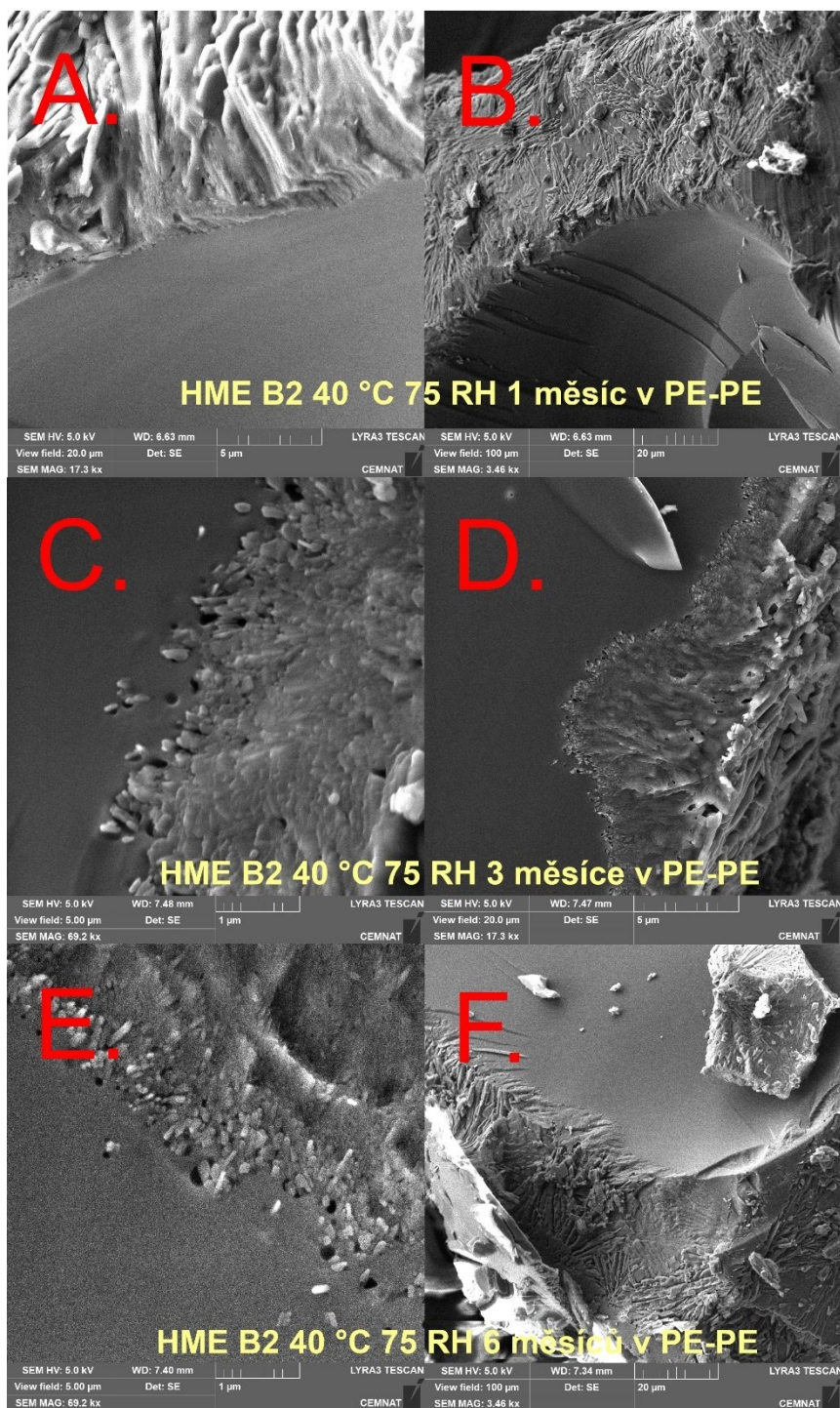
Obrázek P 6. SEM snímky materiálu HME A2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), B. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), C. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), D. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), E. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), F. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 5 μm).



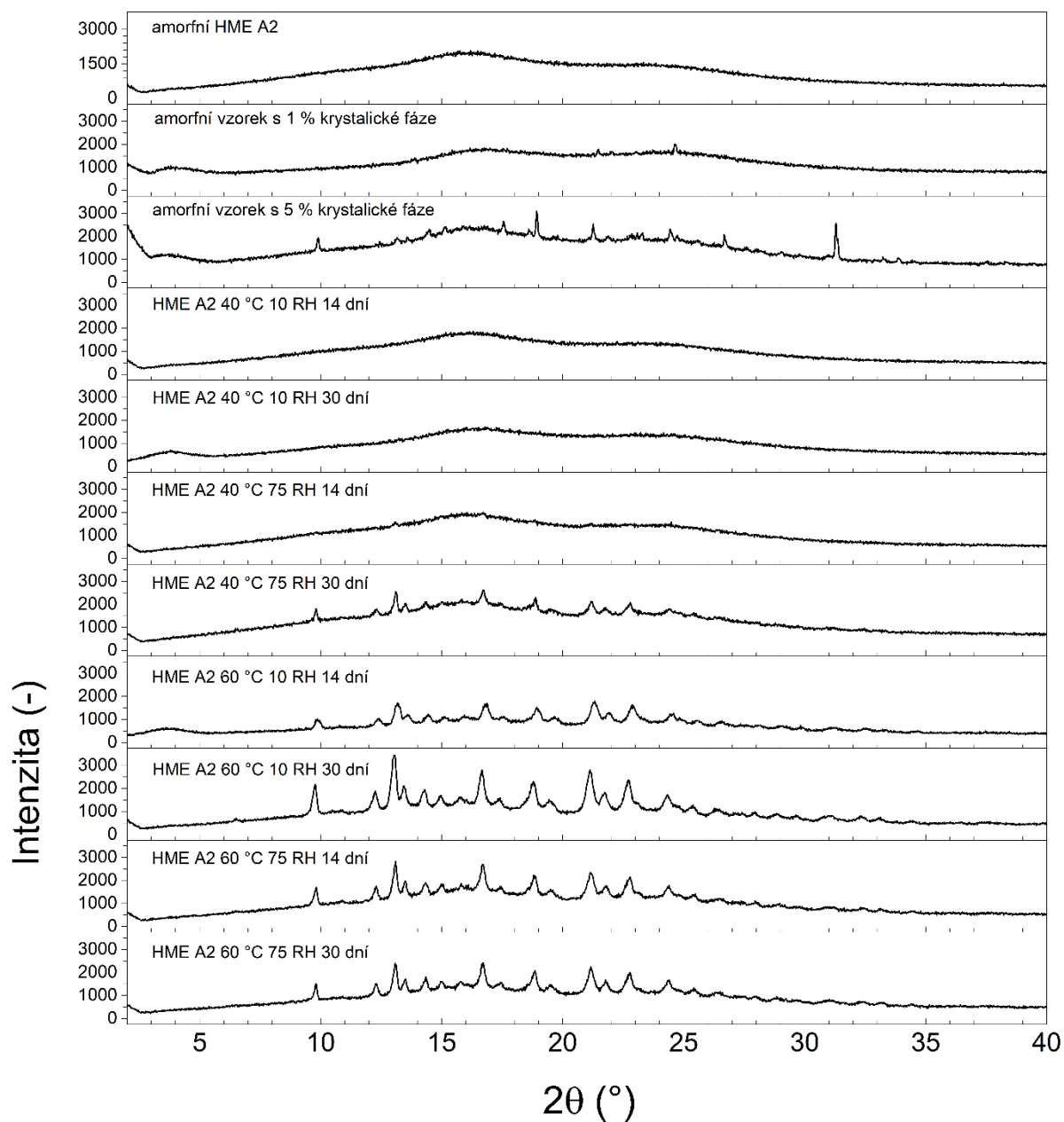
Obrázek P 7. SEM snímky materiálu HME B2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), B. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), C. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), D. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v Al-PE-Al (měřítko 5 μm), E. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 1 μm), F. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v Al-PE-Al (měřítko 5 μm).



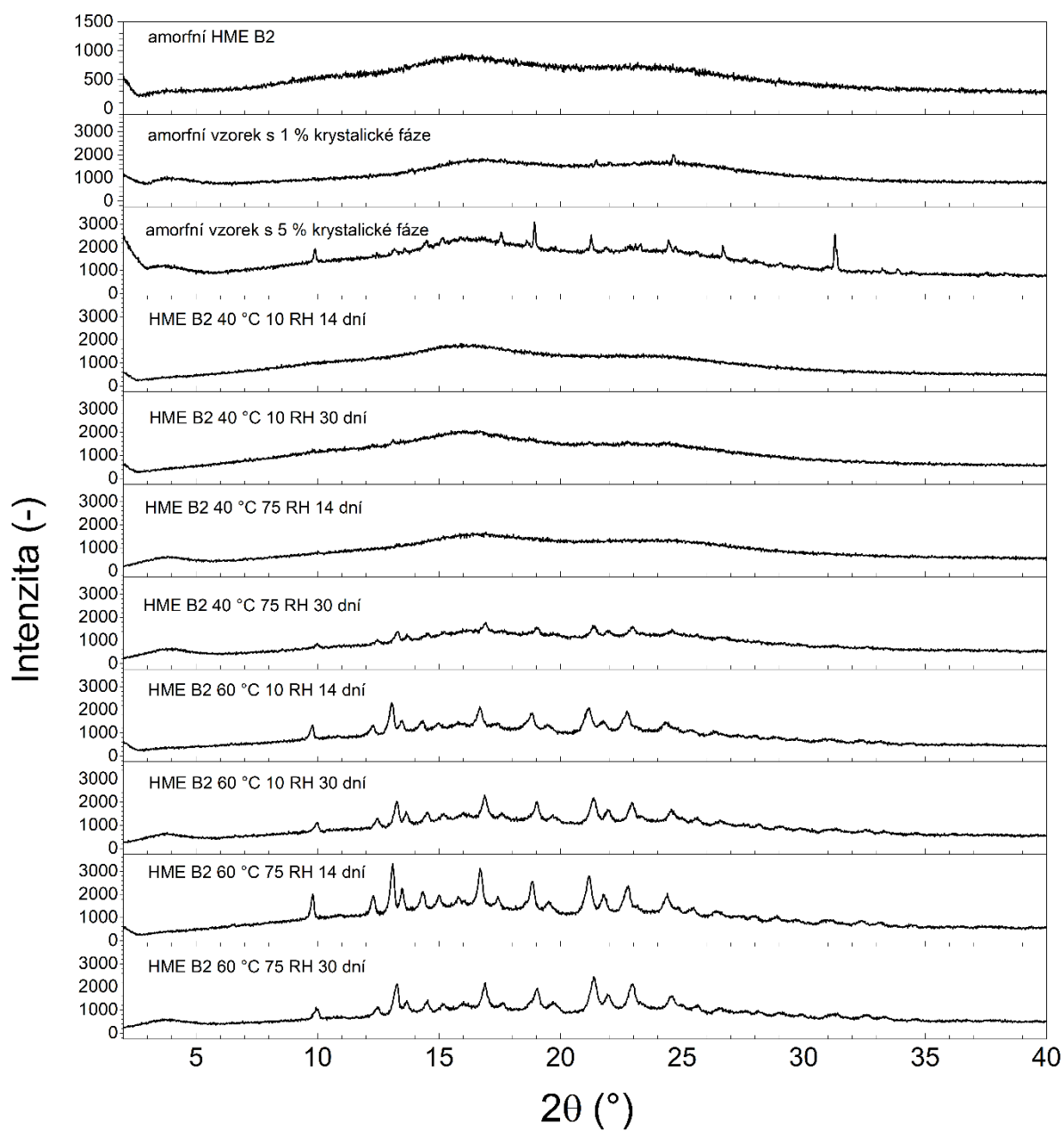
Obrázek P 8. SEM snímky materiálu HME A2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 1 μm), B. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 5 μm), C. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 1 μm), D. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 5 μm), E. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 1 μm), F. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 5 μm).



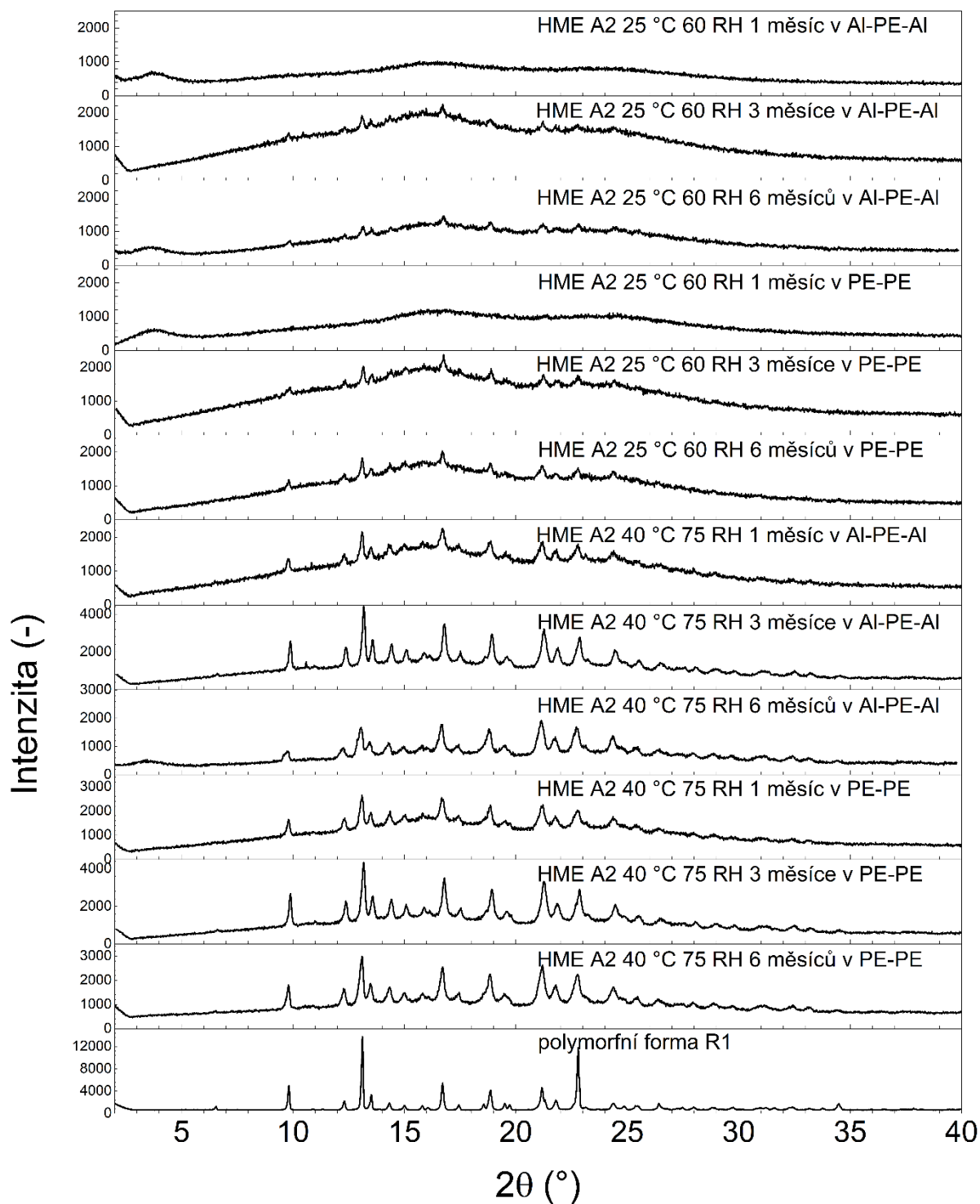
Obrázek P 9. SEM snímky materiálu HME B2 vystavenému podmínkám dlouhodobých stabilitních testů: A. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 1 μm), B. 40 °C 75 % RH 1 měsíc v PE-PE (měřítko 5 μm), C. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 1 μm), D. 40 °C 75 % RH 3 měsíce v PE-PE (měřítko 5 μm), E. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 1 μm), F. 40 °C 75 % RH 6 měsíců v PE-PE (měřítko 5 μm).



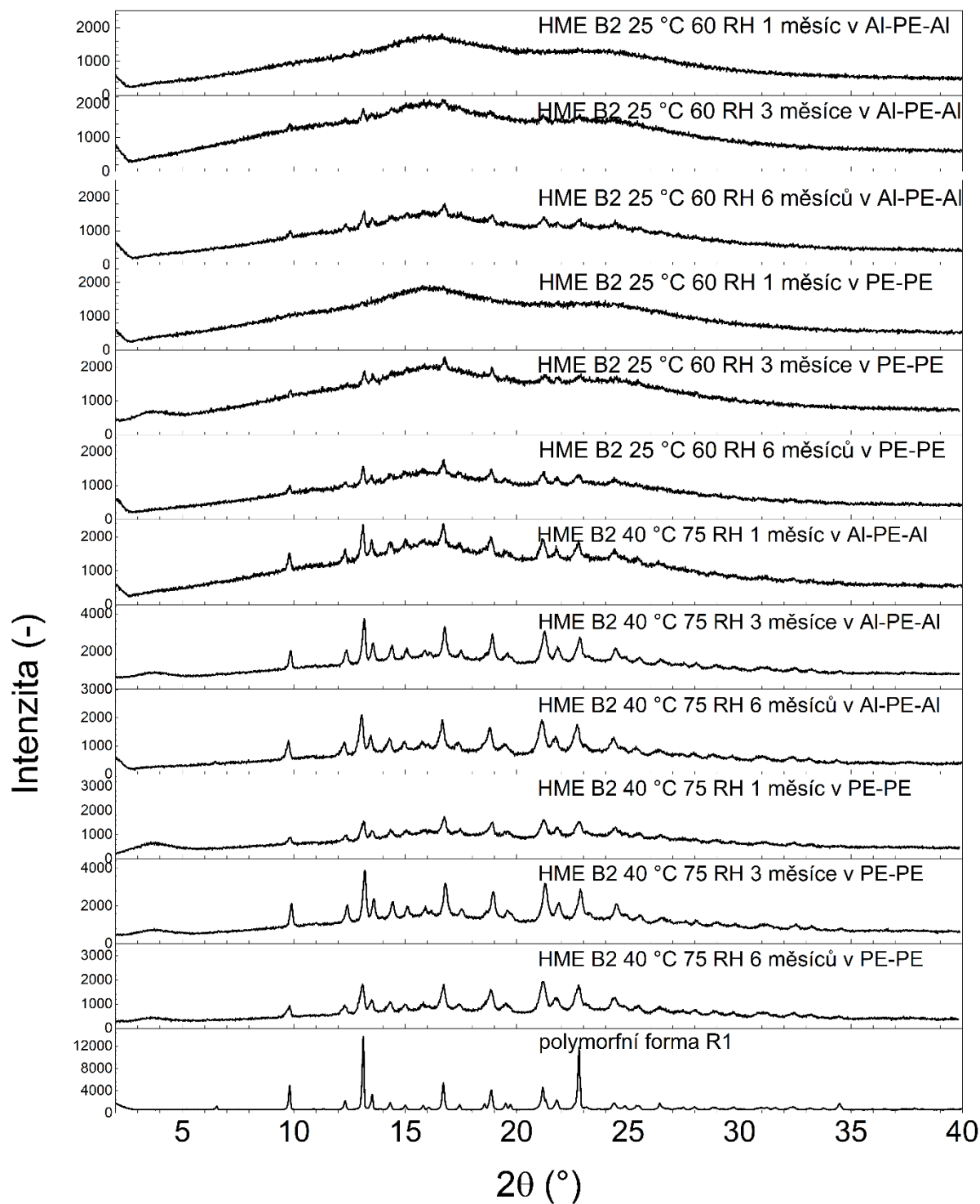
Obrázek P 10. Výsledky práškové rentgenové difrakce vzorků HME A2 vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů a difraktogramy směsi amorfni API s 1 % a 5 % polymorfní formy R1.



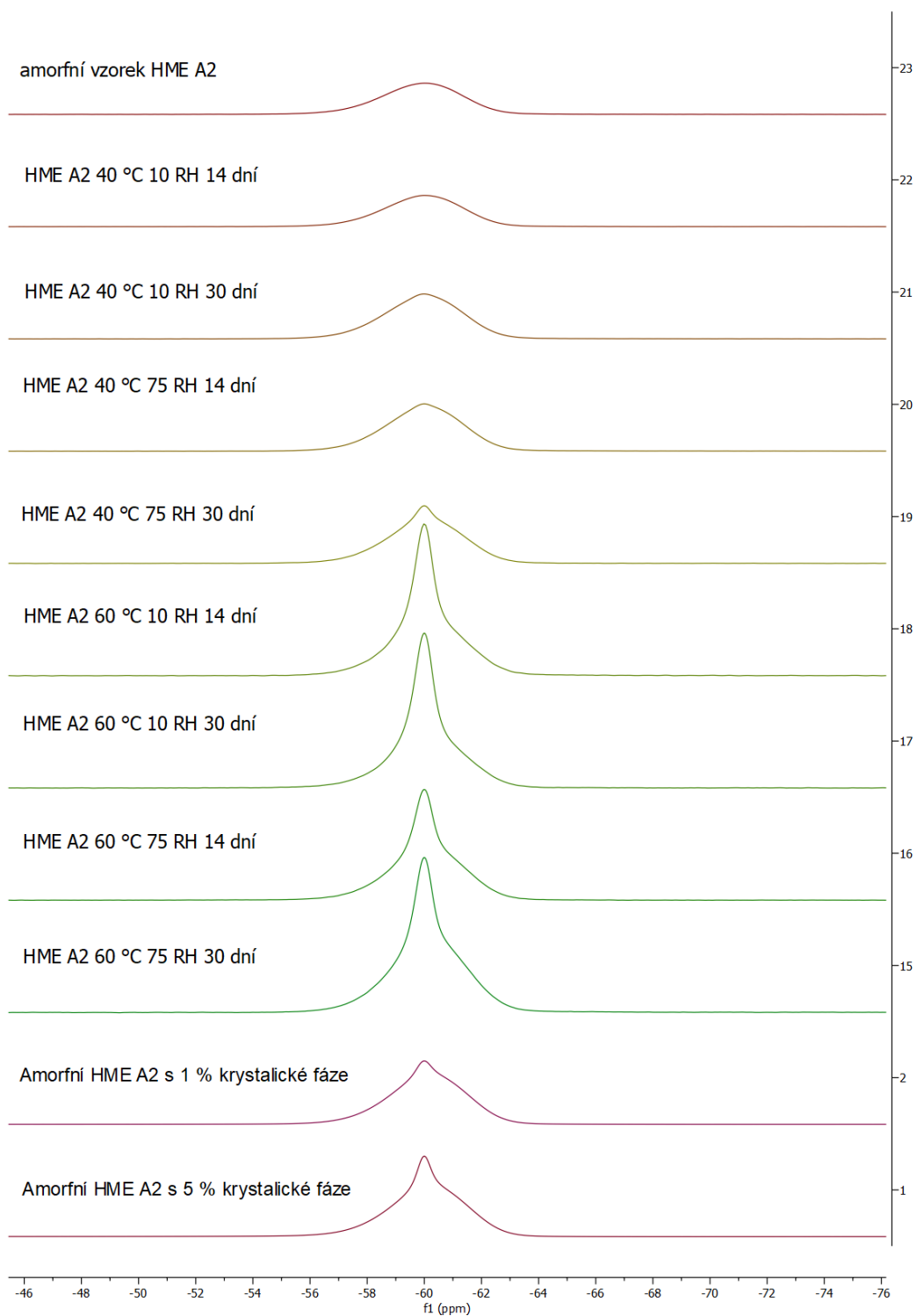
Obrázek P 11. Výsledky práškové rentgenové difrakce vzorků HME B2 vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů a difraktogramy směsi amorfni API s 1 % a 5 % polymorfní formy R1.



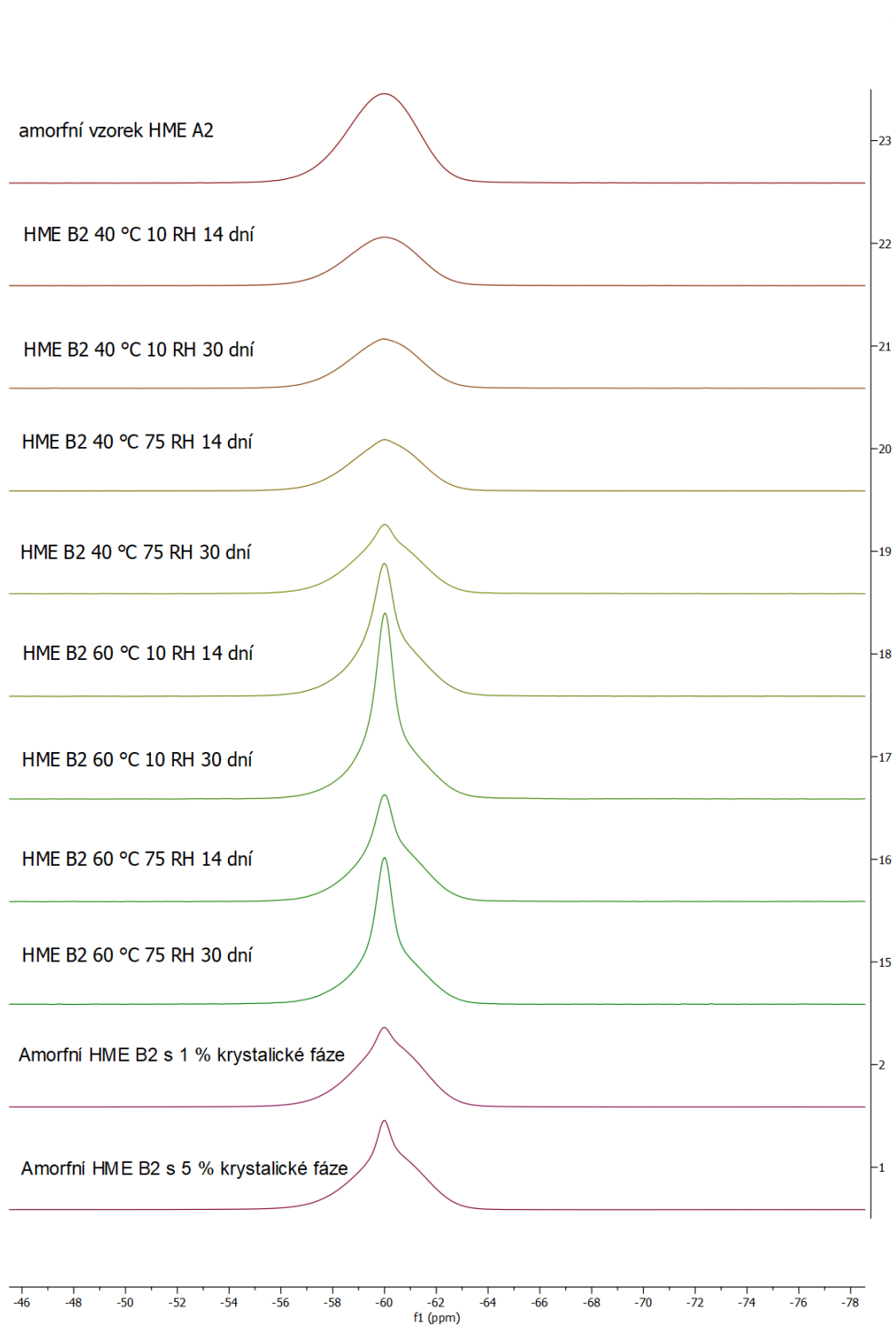
Obrázek P 12. Výsledky práškové rentgenové difrakce vzorků HME A2 vystaveným podmínkám dlouhodobých stabilitních testů ve dvojím balení (Al-PE-Al nebo PE-PE) a difraktogram polymorfní formy R1.



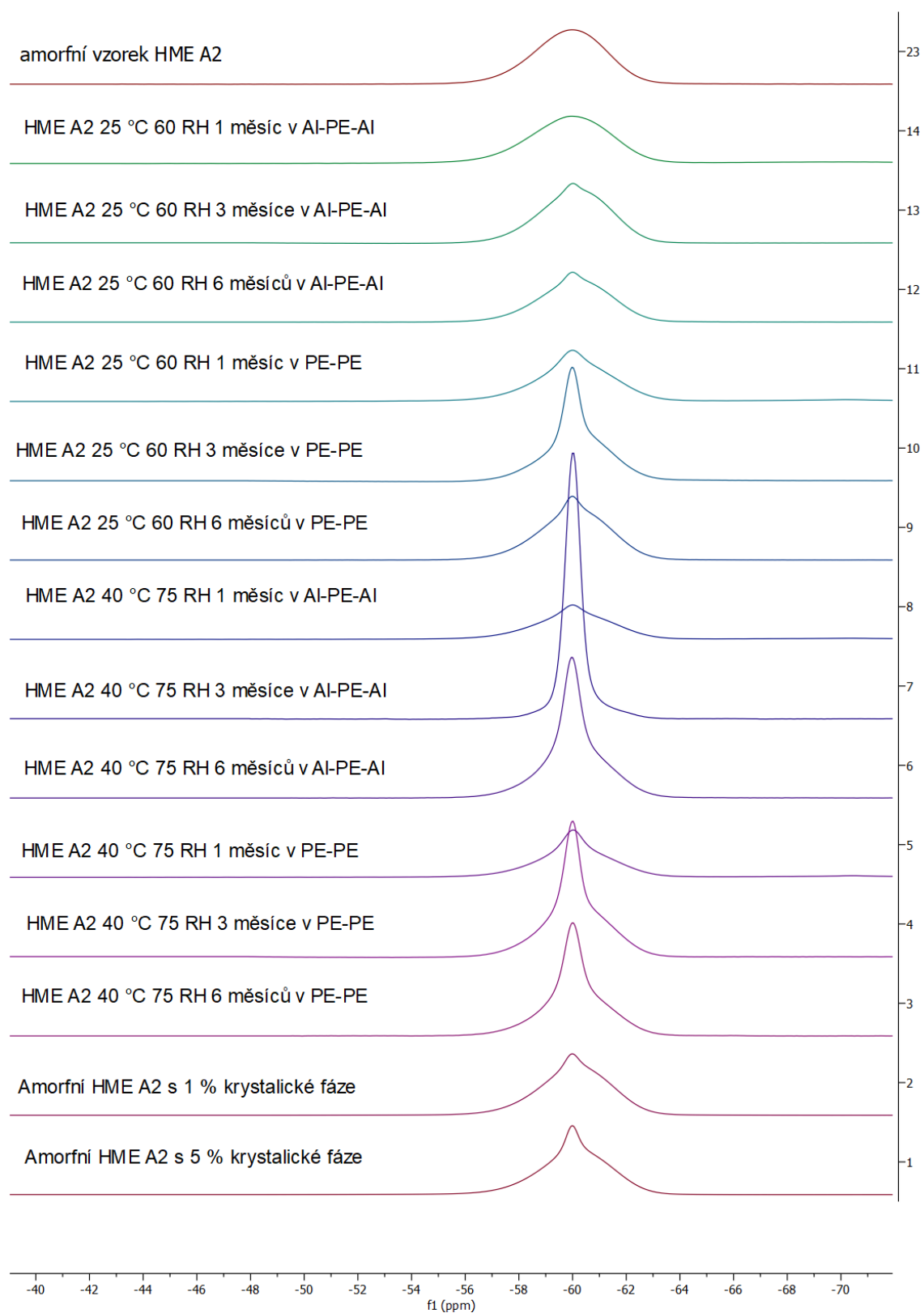
Obrázek P 13. Výsledky práškové rentgenové difrakce vzorků HME B2 vystaveným podmínkám dlouhodobých stabilitních testů ve dvojím balení (Al-PE-Al nebo PE-PE) a difraktogram polymorfní formy R1.



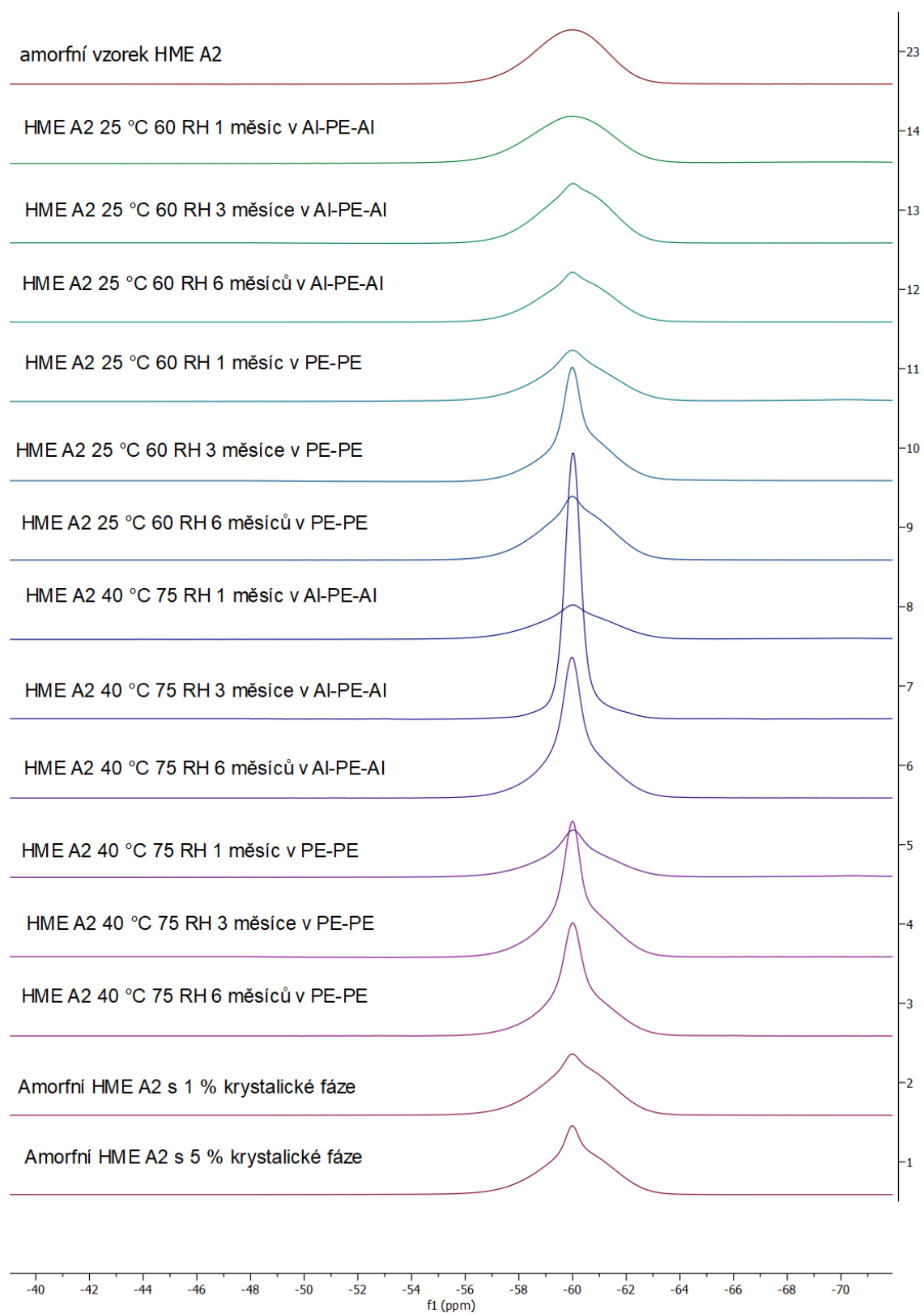
Obrázek P 14.  $^{19}\text{F}$  ss-NMR spektra vzorků HME A2 vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů a směsí HME A2 s 1 % a 5 % krystalické fáze.



Obrázek P 15.  $^{19}\text{F}$  ss-NMR spektra vzorků HME A2 vystaveným podmínkám dlouhodobým stabilitních testům ve dvojím balení (Al-PE-Al, PE-PE) a směsí HME A2 s 1 % a 5 % krystalické fáze.



Obrázek P 16.  $^{19}\text{F}$  ss-NMR spektra vzorků HME B2 vystaveným podmínkám krátkodobých stabilitních testů a směsí HME B2 s 1 % a 5 % krystalické fáze.



Obrázek P 17.  $^{19}\text{F}$  ss-NMR spektra vzorků HME B2 vystaveným podmínkám dlouhodobých stabilitních testů a směsí HME B2 s 1 % a 5 % krystalické fáze.

**ROZŠÍŘENÝ SOUBOR KOMENTOVANÝCH VÝSLEDKŮ  
(PŘILOŽEN NA NOSIČI)**