



MATTEO DALDOSSO, ZADEO CIMAROSTI, BRIGIDA ALLIERI
APTUIT, CENTER FOR DRUG DISCOVERY & DEVELOPMENT, VERONA
MATTEO.DALDOSSO@APTUIT.COM

LA DIFFRAZIONE DI RAGGI X DA POLVERI E IL “PROBLEMA DELLA FORMA” IN CAMPO FARMACEUTICO

I principi attivi farmaceutici (API) spesso presentano la tendenza ad ordinarsi allo stato solido in differenti strutture cristalline, dette polimorfi, che possono presentare proprietà chimico-fisiche molto diverse. La scelta della forma di un determinato principio attivo per lo sviluppo farmaceutico ha un impatto enorme sulle proprietà stesse della prodotto finale: il “problema della forma” presenta implicazioni in campo etico, terapeutico, brevettuale, commerciale ed economico. La diffrattometria a raggi X per polveri (X-Rays Powdern Diffraction, XRPD) è la tecnica principe per la determinazione e quantificazione delle varie forme solide (polimorfi, solvati, idrati, amorfo, sali, co-cristalli, etc.) di un determinato composto e quindi uno strumento analitico imprescindibile per dare risposta al “problema della forma”.

It is at least this author's opinion that every compound has different polymorphic forms and that, in general, the number of forms known for each compound is proportional to the time and money spent in on that compound.

Walter C. McCrone, 1965.

Il 1° marzo del 1996 la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti d'America ha approvato il Ritonavir (Norvir), farmaco scoperto e sviluppato dalla società farmaceutica Abbott, noto con la sigla ABT-538 nella sua fase sperimentale.

Il Ritonavir è un farmaco antiretrovirale appartenente alla classe degli inibitori delle proteasi utilizzato nel trattamento dell'infezione del virus HIV e frequentemente inserito nella terapia HAART (terapia antiretrovirale altamente attiva), che consiste nella combinazione di farmaci inibitori delle proteasi con altri farmaci atti a bloccare la proliferazione del virus HIV. Questo farmaco è stato lanciato sul mercato in capsule per somministrazione orale, formulato partendo dall'unica forma cristallina nota durante il suo sviluppo, denominata forma I.

Nel 1998, del tutto inaspettatamente, una nuova forma cristallina (forma II) del Ritonavir è apparsa: una forma con struttura a minor energia libera e conseguentemente più stabile se paragonata alla forma I [1]. La forma II presentava caratteristiche chimico-fisiche ben diverse dalla forma commercializzata: era drammaticamente meno solubile e di conseguenza molto meno bio-disponibile, inficiando l'efficacia terapeutica della formulazione originale. In più, la comparsa della forma II ha compromesso i processi produttivi della forma I in quanto, sebbene presente in tracce, semi (seeds) di forma II catalizzavano l'interconversione delle forme durante il manufacturing. La compromessa efficacia del prodotto commercializzato e l'impossibilità di ottenere la forma solida autorizzata dalla FDA costrinse la Abbott a ritirare

il farmaco dal mercato per un lungo periodo (con un danno economico stimato in 3 milioni di dollari per giorno di assenza del prodotto dal mercato) e poi a sostituire la distribuzione del Norvir in forma solida con una formulazione in sospensione con maggiori problemi di stabilità.

Le capsule sono state poi sostituite da particolari capsule/gel refrigerate e nel 2000 una formulazione modificata in compressa (oggi proprietà dell'azienda AbbVie) è stata approvata per la commercializzazione, eliminando la necessità della conservazione a bassa temperatura.

A seguito di questo episodio, la comunità internazionale e gli enti regolatori hanno cominciato ad

occuparsi (e preoccuparsi) del cosiddetto "Problema della Forma", direttamente connesso al polimorfismo. Il polimorfismo è la tendenza di un composto molecolare (per elementi puri si parla di allotropia) o di miscele stechiometriche di composti ad ordinarsi allo stato solido in differenti strutture cristalline. Si parla poi di idrati (o solvati) quando, per una determinata molecola, acqua (o solvente) viene incorporata nel reticolo cristallino, dando origine a strutture cristallografiche peculiari.

Spesso idrati e solvati vengono denominati pseudo-polimorfi di un dato composto molecolare, tuttavia per motivi "pratici" la definizione di polimorfo dell'FDA non fa distinzioni, includendo solvati ed idrati.

Questo fenomeno è molto comune nei composti organici e, di conseguenza, è quantomai frequente in campo farmaceutico. Esempio emblematico è l'acetaminofene (paracetamolo) che presenta varie "forme": due polimorfi anidri, un solvato, un di-idrato, un tri-idrato (Fig. 1).

Attualmente la FDA richiede alle industrie farmaceutiche sia lo studio del polimorfismo dei farmaci sottoposti a test clinici e successivamente immessi sul mercato sia un monitoraggio continuo del processo di produzione.

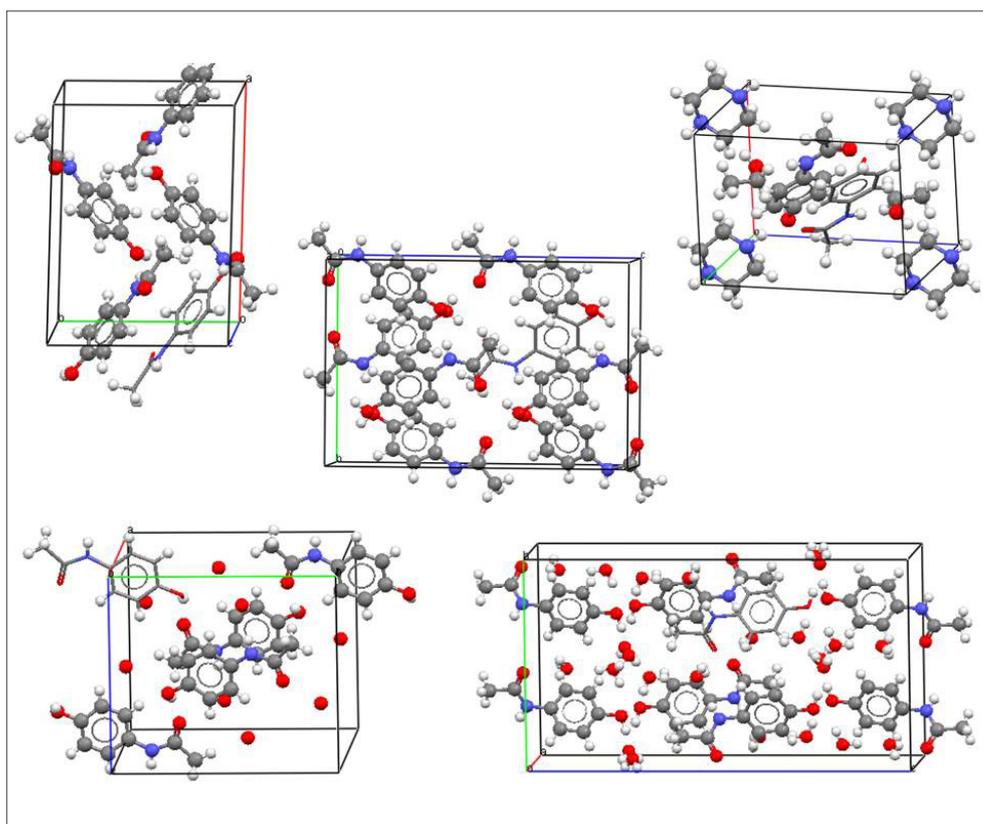


Fig. 1 - Le varie forme dell'acetaminofene (paracetamolo): due polimorfi anidri, un solvato, un di-idrato, un tri-idrato

Questo perchè la scelta della forma cristallina di un determinato principio attivo farmaceutico identificata per lo sviluppo del prodotto finito ha un impatto enorme sulle proprietà stesse della forma farmaceutica finale.

Differenti polimorfi possono infatti avere proprietà chimico-fisiche e meccaniche anche molto diverse (stabilità, velocità di dissoluzione, solubilità, igroscopicità, conducibilità termica ed elettrica, durezza, etc.) con conseguenze notevoli sul loro utilizzo, manipolazione ed assorbimento. Inoltre la possibilità di interconversione tra le varie forme può avere conseguenze molto serie sulla vita di un prodotto e sul mantenimento delle sue proprietà (efficacia terapeutica, stabilità chimica, etc.).

Più in specifico, va considerato che, in funzione di variabili quali temperatura, pressione, umidità relativa, una forma metastabile può trasformarsi in una forma termodinamicamente più stabile, oppure una forma cristallina anidra può trasformarsi in una forma cristallina idrata per assorbimento di vapore dall'ambiente, ed una forma cristallina solvata può, a sua volta, trasformarsi in una forma cristallina anidra o con diverso grado di solvatazione per perdita di solvente.

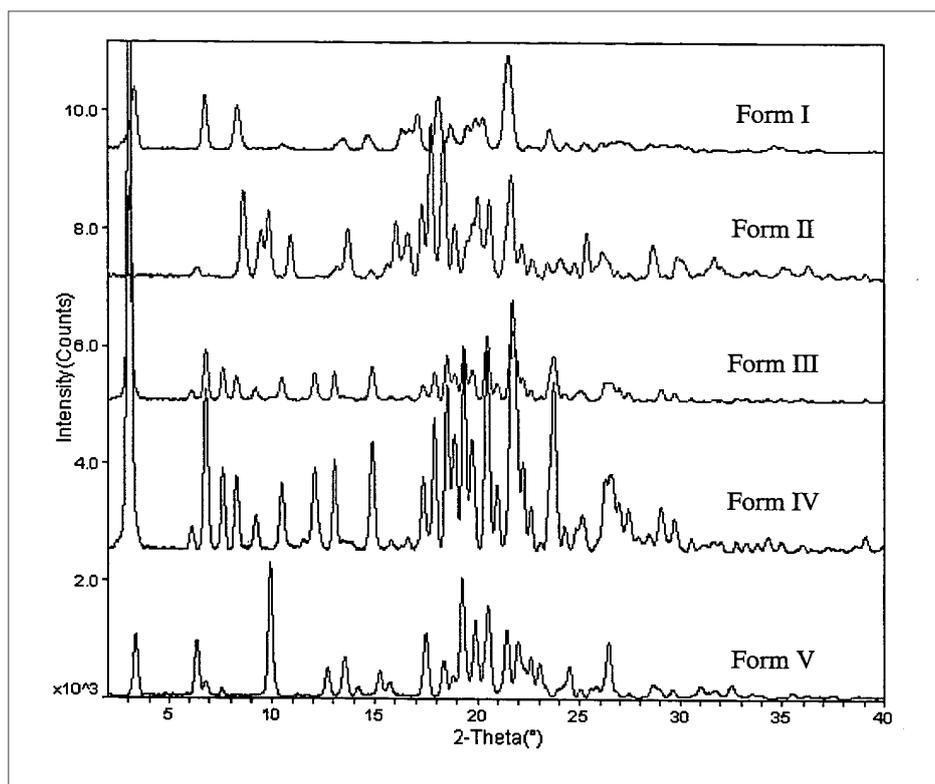


Fig. 2 - Polimorfismo del Ritonavir - pattern XRPD (Brevetto US 2004/0024031 A1)

Quindi lo studio del polimorfismo di un dato principio attivo farmaceutico è un punto fondamentale nello sviluppo di un farmaco in quanto le caratteristiche della forma selezionata hanno implicazioni a 360 gradi.

Spesso il “Problema della Forma” è percepito principalmente come un problema di difesa della proprietà intellettuale per le cause brevettuali che hanno scosso il mercato dei generici (ranitidina cloridrato, terazosin, etc.), ma il caso del Ritonavir dimostra invece quanto il polimorfismo sia in primo luogo un problema etico con ricadute che possono essere gravi sui pazienti che fanno affidamento su una determinata terapia quando questa dovesse inaspettatamente rendersi inefficace.

Il metodo della diffrazione di raggi X da polveri (X-Rays Powder Diffraction, XRPD) è la tecnica analitica sperimentale principe per dare una risposta al “problema della forma” nel campo dello sviluppo farmaceutico.

È il metodo standard di determinazione e quantificazione delle varie forme solide (polimorfi, solvati, idrati, amorfo, sali, co-cristalli, etc.) in un principio attivo farmaceutico, dove conoscere l’esatta natura del composto che si intende sviluppare è cruciale per tutte quelle diverse proprietà che le varie forme possono avere e che vanno studiate a fondo.

Basti pensare che, ad esempio, l’European Patent Office (EPO) impone, a chi deposita un brevetto su un farmaco che si presenta sotto forma di polvere cristallina, una caratterizzazione per diffrazione di raggi X.

La Fig. 2 mostra i pattern di diffrazione di raggi X per polveri del Ritonavir (non solo il polimorfo I e II ma anche altre forme scoperte successivamente).

L’interazione tra i raggi X e la materia permette di studiare le proprietà strutturali e microstrutturali di un composto allo stato solido: c’è una diretta ed univoca relazione tra il pattern di diffrazione da raggi X per polveri e l’ordine/disordine strutturale di un dato materiale. La posizione e l’intensità

relativa dei picchi che si notano in un pattern (picchi di Bragg) riflettono la simmetria della cella cristallografica della forma in esame. In caso di miscele, gli stessi picchi (anche detti riflessi) possono essere utilizzati per quantificare il rapporto in massa tra le diverse forme cristalline presenti nella miscela. In più, la forma e la larghezza dei riflessi stessi portano informazioni microstrutturali del materiale.

In generale, un pattern di diffrazione da raggi X per polveri di un materiale cristallino è una sorta di “fingerprint” di un dato composto in una data forma. A tal motivo un numero crescente di database raccolgono sempre più composti e relativi polimorfi per facilitare l’identificazione strutturale del campione in esame e la quantificazione di miscele (citiamo a titolo di esempio il database PDF/4-Organics gestito dall’ICDD, International Center for Diffraction Data, che conta più di mezzo milione di record).

Il metodo di diffrazione da polveri è stato introdotto nel 1916 da Debye e Scherrer e per circa cinquant’anni è stato utilizzato per analisi qualitative (identificazione delle diverse forme presenti nel campione in esame) o semi-quantitative.

Nel 1969 Hugo Rietveld (recentemente scomparso, [2]) ha introdotto una nuova metodologia [3] di raffinamento strutturale basata sull’uso dell’intero pattern di diffrazione (non solo quindi sulle singole



posizioni ed intensità relative dei riflessi di Bragg) che ha riscosso un enorme successo, ampliando l'uso dei dati XRPD all'analisi quantitativa del rapporto in massa delle varie forme presenti nella polvere in esame.

L'introduzione del metodo di Rietveld è stato talmente rilevante che la comunità scientifica ha omaggiato *post mortem* l'autore dando ad un nuovo minerale il suo nome: la rietveldite [4].

Negli ultimi venticinque anni, l'avvento del computer con la sua enorme capacità di calcolo e i significativi progressi nel campo della modellizzazione teorica dei profili di diffrazione hanno permesso di utilizzare dati da polveri per la cosiddetta risoluzione strutturale, applicazione tradizionalmente riservata alla diffrazione di raggi X da cristallo singolo.

A supporto di questi progressi, la tecnologia costruttiva dei diffrattometri per polveri da laboratorio ha fatto passi da gigante, garantendo la generazione di dati a sempre più alta risoluzione (vedi Fig. 3).

L'affinamento delle geometrie di raccolta (riflessione, trasmissione, capillare), l'introduzione di ottiche raffinate come monocromatori, specchi focalizzanti, slitte automatiche e rivelatori a stato solido particolarmente sensibili e veloci (bi-dimensionali) hanno consentito l'acquisizione di pattern di diffrazione per polveri in maniera routinaria con risoluzione angolare sufficiente all'analisi quantitativa dei dati generati con i più moderni metodi matematici di affinamento e modellizzazione [5]. In più, la risoluzione sempre maggiore ottenibile nello spazio reale ha permesso l'uso di questi dati per la determinazione di strutture nano-cristalline e amorfe [6].

In questo modo, lo screening di polimorfismo in campo farmaceutico ha trovato spazio nei laboratori di ricerca delle industrie del settore. La tecnica di diffrazione di raggi X per polveri è quindi diventata uno strumento imprescindibile per l'identificazione di diversi polimorfi (forme) di un dato principio attivo farmaceutico e della quantificazione di miscele.

La possibilità di effettuare esperimenti di diffrazione di raggi X per polveri in condizioni non ambientali ha permesso poi di determinare in maniera efficiente i pattern di intercon-

versione tra un polimorfo ed un altro, i campi di esistenza di forme idrate/forme anidre, la presenza di forme metastabili in condizioni estreme. Questo grazie alla possibilità di utilizzare camere *ad hoc* nei diffrattometri da laboratorio dove possono essere controllate la temperatura (dalla temperatura dell'elio o azoto liquido fino a 1.000 °C), l'umidità relativa e la pressione (vuoto e alte pressioni), permettendo la costruzione di diagrammi di fase e studi cinetici di interconversione *in situ* (point focus, 2D scan).

Ancora, tecniche di interazione tra la materia e la radiazione X non di classica diffrazione di Bragg, ma bensì di diffusione della luce incidente, come small/wide angle scattering (WAXS, SAXS) e grazing-incidence small-angle scattering (GISAS) hanno permesso lo studio dei materiali a livello nanostrutturale e in film sottile.

A seguito di uno screening di polimorfismo, identificata la forma cristallina voluta per lo sviluppo del prodotto finito (in quanto rispondente a requisiti di stabilità termodinamica, solubilità, efficacia, potenza, etc.) e quindi risolto il "problema della forma", assume oggi sempre più importanza la capacità di garantire con un livello di accuratezza elevato la "purezza della forma" allo stato solido. In altre parole è necessario abbassare sempre più il limite di rilevabilità (LoD) di una forma cristallina in un'altra, per garantirne l'aderenza a quanto voluto e dichiarato anche da un punto di vista regolatorio.

L'alta risoluzione dei diffrattometri da laboratorio (basati sulla generazione di raggi X da catodo di rame, molibdeno o argento) spinge tipicamente l'LoD a pochi % (in massa) di una fase rispetto ad un'altra.

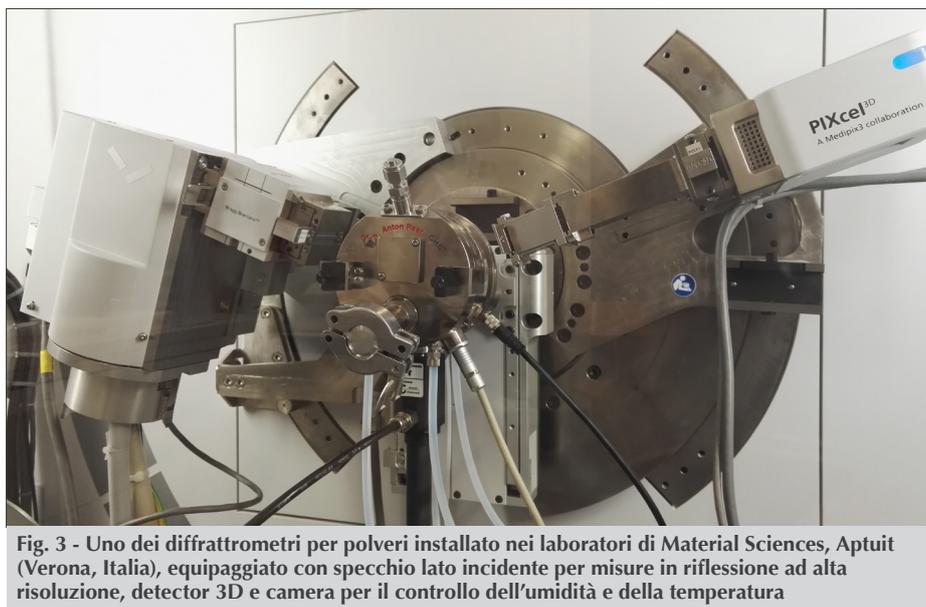


Fig. 3 - Uno dei diffrattometri per polveri installato nei laboratori di Material Sciences, Aptuit (Verona, Italia), equipaggiato con specchio lato incidente per misure in riflessione ad alta risoluzione, detector 3D e camera per il controllo dell'umidità e della temperatura



Fig. 4 - La sede di Aptuit a Verona

Ci sono comunque casi in cui la pur ottima risoluzione dei diffrattometri da laboratorio non è sufficiente e si rivela necessario trovare metodologie alternative per abbassare il limite di rilevabilità di un polimorfo in un altro. I raggi X prodotti da un sincrotrone (la cosiddetta luce di sincrotrone), data la loro alta energia e intensità, accoppiata a rivelatori a stato solido multidimensionali molto veloci, permettono di raccogliere dati di diffrazione da polveri ad altissima risoluzione, utilizzando lunghezze d'onda variabili e tempi di acquisizione molto brevi (per minimizzare il danno da radiazione), abbassando tipicamente l'LoD ben sotto lo 0,5% in massa [7], e in alcuni casi perfino a 0,01% in massa [8], dopo attento "fine-tuning" del set up sperimentale. Altre tecniche non convenzionali per lo studio strutturale dei solidi cristallini sono la diffrazione dei neutroni, dei muoni e l'utilizzo di sorgenti X-FEL (x-rays free electron laser), che troveranno nel futuro sempre maggiori applicazioni in campo farmaceutico.

Conclusioni

In conclusione, la diffrattometria a raggi X per polveri (XRPD) è di certo la tecnica principe per l'approccio analitico al problema della forma in campo farmaceutico, spesso accoppiata ad altre tecniche sperimentali come spettroscopia Raman, spettroscopia IR, calorimetria a scansione differenziale (DSC) e microscopia a scansione elettronica (SEM) che oggi trovano posto nei più moderni laboratori delle industrie farmaceutiche che affrontano problematiche di stato solido (Fig. 4).

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Bauer *et al.*, *Pharm. Res.*, 2001, **6**, 859.
- [2] A. Hewat *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2016, **49**, 1394.
- [3] H.M. Rietveld, *J. Appl. Crystallogr.*, 1969, **2**, 65.

- [4] A.R. Kampf *et al.*, *CNMNC Newsletter*, 2016, **34**, 132 e *Mineralogical Magazine*, 2016, **80**, 131.
- [5] I. Ivanisevic *et al.*, *Uses of X-Ray Powder Diffraction in the Pharmaceutical Industry*, *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development and Manufacturing*, edited by Shayne C. Gad, 2010, p. 1-42.
- [6] T. Davis *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, 2013, **13**, 4239.
- [7] F. Gozzo, PPXRD-12 Conference, 2013, Chinese Academy of Science, Beijing, China (see: <http://www.icdd.com/ppxrd/12/presentations/index.htm>).
- [8] F. Gozzo, private communication (see also <https://www.parkinnovaare.ch/pharmaceutical-mixtures-excelsus-achieves-an-unprecedented-level-of-detection>).

RISORSE

- S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, Joseph G. Stowell, *Solid State Chemistry of Drugs*, 2nd Edition, 1999.
- R. Hilfiker, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, 2006.
- J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, 2002.
- H. Brittain, *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, 1999.

The X-Rays Powder Diffraction (XRPD) and the "Form Selection Process" in the Pharmaceutical Industry

Active Pharmaceutical Ingredients (API) shows the tendency to get order and crystallize as solids in different structures (forms). This phenomenon is known as polymorphism. In general, different polymorphs show different physicochemical characteristics and properties. Therefore, the selection of the API form for drug product (DP) development is more than critical because the API form itself has a great impact on the properties of the final DP: the form selection problem has ethic, therapeutics, commercial and economic implications. The X-Rays Powder Diffraction (XRPD) is the essential technique for the determination and quantification of polymorphic (or pseudo-polymorphic) forms in a given API in order to effectively support the form selection process.