



4. Workshop on Solid-State NMR and Computational Methods

11. listopadu 2010, Praha

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6

**Společná laboratoř NMR spektroskopie pevného stavu
ÚMCH AV ČR, v.v.i. a ÚJH AV ČR, v.v.i.**

pořádají

dne 11.11. 2010

v

klubu B
Ústavu Makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.
Heyrovského nám. 2, Praha 6

**4. workshop NMR pevného stavu
a souvisejících výpočtových metod**

v rámci projektu

**NMR krystalografie aktivních farmaceutických substancí pro
průmyslové aplikace**
(NPV II – ZDRAVÝ A KVALITNÍ ŽIVOT, č.p. 2B08021)

řešitelských pracovišť

ÚMCH AV ČR, VŠCHT Praha

pod patronací vedoucích řešitelských týmů

Ing. Jiřího Bruse PhD a prof. RNDr. Bohumila Kratochvíla, Dsc

Bližší informace o projektu naleznete
<http://www.imc.cas.cz/nmr/projekt/projekt.htm>

Program

9:15			<i>zahájení</i>
9:30	-	10:00	Brus Jiří ÚMCH AV ČR Nové perspektivy ss-NMR spektroskopie ve farmaceutickém výzkumu
10:00	-	10:30	Czernek Jiří ÚMCH AV ČR Do jaké míry Londonova disperzní interakce řídí stabilitu konformerů perindopril erbuminu?
10:30	-	10:50	<i>přestávka na kávu</i>
10:50	-	11:20	Hušák Michal VŠCHT Praha Výpočet teoretického ss-NMR a aplikace pro řešení krystalové struktury
11:20	-	11:50	Kratochvíl Bohumil VŠCHT Praha Farmaceutické kokrystaly
11:50	-	12:50	<i>oběd</i>
12:50	-	13:20	Urbanová Martina ÚMCH AV ČR Využití NMR spektroskopie pevného stavu a faktorové analýzy pro charakterizaci API
13:20	-	13:50	Šeděnková Ivana ÚMCH AV ČR Ramanovy spektrometrie pro charakterizaci farmaceuticky aktivních materiálů v tuhých disperzích
13:50	-	14:20	<i>přestávka na kávu</i>
14:20	-	14:50	Pola Robert ÚMCH AV ČR Polymerní systémy pro cílený transport a řízené uvolňování léčiv
14:50	-	15:20	Hrabal Richard VŠCHT Praha NMR spektroskopie - zkoumání struktury peptidů, proteinů a jejich komplexů.
		15:30	<i>zakočení</i>
16:00			<i>neformální diskuse</i>

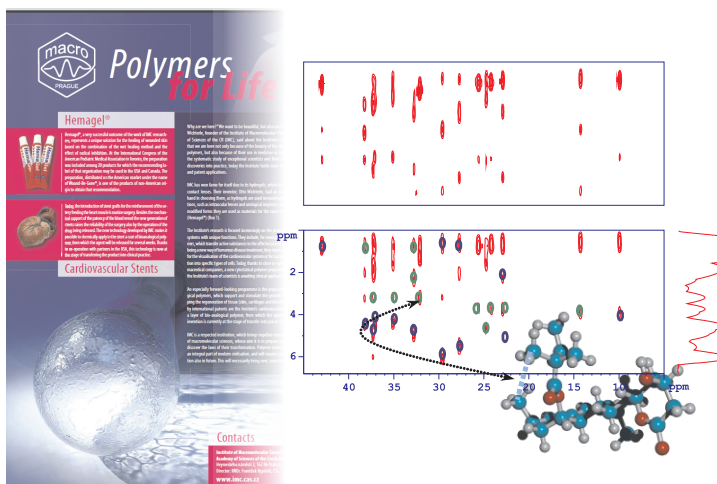
Nové perspektivy ss-NMR spektroskopie ve farmaceutickém výzkumu

J. Brus , M. Urbanová, O. Policianová

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ČR.
brus@imc.cs.cz

NMR krystalografie, soubor experimentálních technik a výpočetních postupů, dnes již dosáhla stavu, který umožňuje precizní charakterizaci struktury a dynamiky čistých aktivních farmaceutických substancí v krystalickém stavu. Již od roku 2004 se problematice rozvoje těchto experimentálních postupů soustavně věnujeme, přičemž kolem roku 2008 jsme dosáhli značného pokroku při charakterizaci strukturních a pohybových změn při fázových přechodech simvastatinu, či při popisu různých krystalových forem metergolinu. Ovšem práce na projektu „NMR krystalografie pro farmaceutické aplikace“ (2B08021, MŠMT, 2008-2011) probíhají na více úrovních, jež mimo jiné vyplývají i z potřeb partnerské společnosti. Na první úrovni se věnujeme základnímu vyhledávacímu výzkumu, polymorfismu různých aktivních ingrediencí či stanovení jejich fázové čistoty. Na druhé úrovni pak řešíme složitější úkoly často spojené s pokusy rozlišit protonizované či neprotonizované formy řady aktivních substancí. Až na třetí úrovni se pokoušíme detailně charakterizovat krystalické API a to ve smyslu molekulární struktury a segmentové dynamiky. Při tomto úsilí se snažíme postupovat systematicky od systémů krystalograficky jednoduchých až k těm složitějším. Přirozeně pak na konci této řady jsou látky značně neuspořádané až zcela amorfní. Nanejdůležitější se pak jeví problém charakterizace amorfních substancí v tabletových formulacích při jejich velmi nízkých koncentracích. V tomto bodě se soustřeďujeme na NMR techniky měření méně tradičních jader, jako jsou izotopy ^{19}F , ^{11}B či ^{23}Na s jejich následným statistickým zpracováním. Od roku 2010 se pak intenzivně věnujeme přípravě a především komplexní charakterizaci nových formulací API v podobě tuhých roztoků a disperzí aktivních substancí v polymerních maticích.

Přehledu výše uvedených aktivit je věnován uvedený referát.

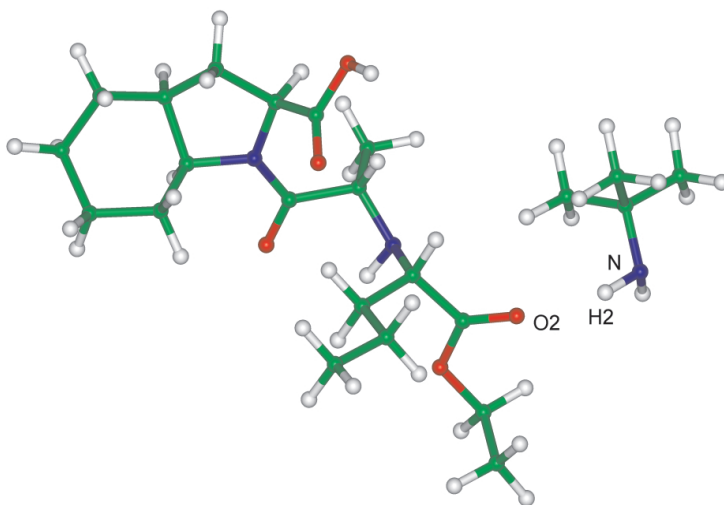


Do jaké míry Londonova disperzní interakce řídí stabilitu konformerů perindopril erbuminu?

J. Czernek

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ČR.
cernek@imc.cs.cz

Struktura a vlastnosti perindopril erbuminu, tj. komplexu perindoprilu (P) a t-But-aminu (A), jsou předmětem řady studií [1]. V rámci snah o popis jeho polymorfizmu se zabýváme prohledáváním konformačního prostoru a následným určováním hodnot interakčních energií ΔE mezi P a A. Využitím symetricky adaptované poruchové teorie mezimolekulových interakcí je možné dospět k rozkladu ΔE na složky s jasným fyzikálním významem [2]. Na příkladech energetických minim systému P–A budu diskutovat důležitost jednotlivých interakčních příspěvků pro celkovou stabilizaci. Zaměřím se na vliv Londonovy disperzní interakce v komplexech „vázaných vodíkovou vazbou“, jako v situaci znázorněné na obrázku:



Obr. 1. Konformer perindopril erbuminu, pro jehož stabilizaci by se jako rozhodující mohla jevit přítomnost vodíkové vazby N–H₂–O₂.

Odkazy:

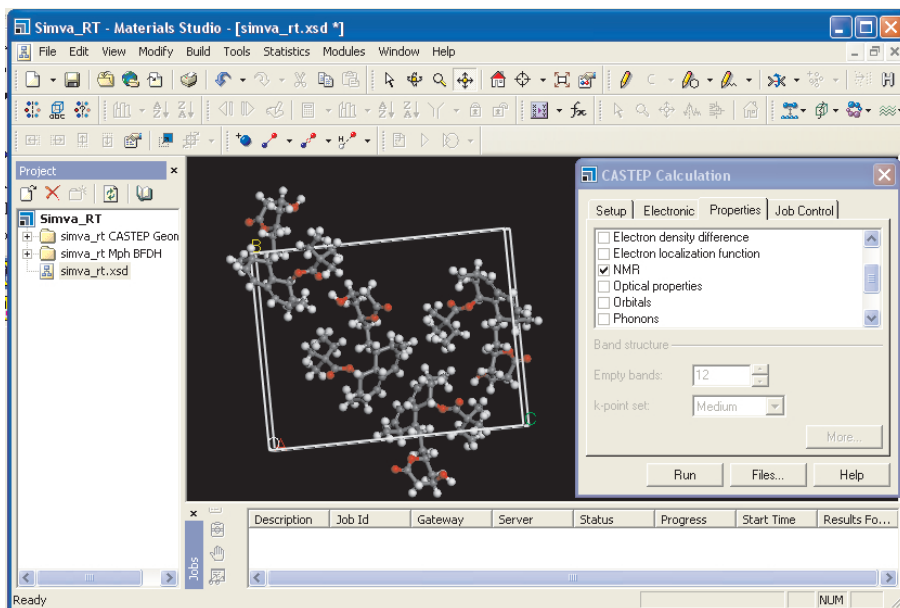
1. Alfakih, K.; Hall, A. S., Perindopril, *Expert Opin. Pharmacol.* **2006**, *7*, 63–71.
2. Stone, A. *Theory of Intermolecular Forces*; Clarendon: Oxford, 1996.

Výpočet teoretického ss-NMR a aplikace pro řešení krystalové struktury

M. Hušák

Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, michal.husak@vscht.cz

ss-NMR pevné látky dokáže poskytnout užitečné doplňkové informace pro potřeby řešení krystalové struktury z práškových difrakčních dat. Na VŠCHT je k dispozici softwarové a HW vybavení schopné predikce ss-NMR: 8-mi jaderný 64 bytový výpočetní server a program CASTEP NMR jako součást Accelrys Material Studio. Na přednášce budu prezentovány zkušenosti s používáním tohoto software. Na příkladech alaptidu a látky ze skupiny flavinu budou demonstrovány možnosti využití ss-NMR výpočtů pro confirmaci řešení struktury.



Uživatelské rozhraní programu Accelrys Material Studio s integrovaným modulem CASTEP NMR

Farmaceutické kokrystaly

B.Kratochvíl

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav chemie pevných látek, Technická 5, 166 28 Praha 6; bohumil.kratochvil@vscht.cz

Kokrystaly (molekulární komplexy, supramolekulární adukty, směsné krystaly apod.) jsou multikomponentní sloučeniny. Mnoho z nich má potenciální farmaceutickou aplikaci a proto se ustálil název farmaceutické kokrystaly. Farmaceutický kokrystal je stechiometrický adukt typu hostitel (aktivní molekula) : host (kokrystalizační partner), vytvořený ze dvou nebo více složek, které jsou v čistém stavu a za pokojové teploty pevné, např. karbamazepin : sacharin (1:1) a mnoho dalších. Vazba v kokrystalu mezi hostitelem a hostem je zprostředkována nekovalentní slabou interakcí (většinou H-můstky) a vzniklé 0-D, 1-D a 2D útvary se v kokrystalu spojují především - interakcemi nebo VdW silami. Farmaceutické kokrystaly představují novou alternativu volby API pro pevné lékové formulace, kokrystalizační partner ovšem musí respektovat požadavek farmaceutické akceptovatelnosti. Farmaceutické kokrystaly jsou pro farmacii zajímavé proto, že modifikují důležité vlastnosti pevné fáze:

- * kokrystaly mají jiný disoluční profil než původní API
- * pokud je původní API polymorfní, kokrystal může být monomorfní
- * pokud původní API vytváří racemickou směs, tak kokrystalizace může sloužit k chirální separaci
- * kokrystalizace může být použita k izolaci API ze směsi a její purifikaci
- * pokud je API amorfní, tak její kokrystaly mohou být krystalické, resp. pokud je API nestabilní, její kokrystaly mohou být stabilní
- * kokrystaly mají jiné materiálové vlastnosti než původní API
- * kokrystaly mají jinou hygroskopicitu než původní API

Systematika farmaceutických kokryсталů zahrnuje:

- * kokrystaly
- * kokrystaly hydratované (solvatované)
- * kokrystaly ionizované (kokrystaly solí)
- * kokrystaly solí hydratované (solvatované)
- * polymorfy všech předchozích typů kokryсталů

U ionizovaných kokryсталů neexistuje ostrá hranice mezi kokryсталem a solí. Zda při reakci mezi karboxylovou kyselinou a bazickým N-heterocyklem vznikne sůl nebo kokrystal, lze predikovat na základě hodnoty $pK_a = pK_a(\text{báze}) - pK_a(\text{kyselina})$ nebo stanovit experimentálně z pozice protonu mezi O...N ve výsledném produktu.

Syntetické techniky pro „screening“ kokryсталů vychází z kapalně (společná krystalizace složek z roztoku, krystalizace ze společné taveniny), pevně (společné mletí) nebo plynné fáze (společná sublimace). Další významnou technikou je přikapávání kokryсталizačního partnera k mleté aktivní substanci či využití efektu přikapávaného rozpouštědla („molekulárního maziva“) při společném mletí - urychlení kokryсталizační kinetiky. Hlavním důvodem výzkumu kokryсталů je hledání jasného vztahu mezi molekulovou a krystalovou strukturou aktivní substance a jejími funkčními vlastnostmi v pevné fázi. Kokrystaly jsou přístupem budování funkčních vlastností produktu z molekulární úrovně („bottom-up“). Kokrystaly jsou v současnosti především předmětem výzkumu akademických pracovišť a pracovišť V&V farmaceutických firem. Na trhu s léčivy zatím kokrystaly registrovány příliš nejsou. Na základě strukturálních studií, by však některé registrované soli měly být překvalifikovány na kokrystaly (viz stanovení pozice protonu mezi O...N), což má svoji důležitost v patentových sporech.

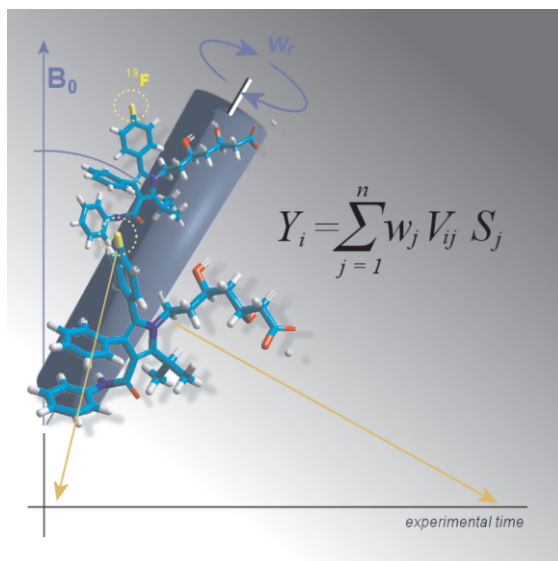
Problematika byla řešena za podpory projektu NPV II 2B08021.

Využití NMR spektroskopie pevného stavu a faktorové analýzy pro charakterizaci API

M. Urbanová, I. Šeděnková, J. Brus

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ČR.
urbanova@imc.cs.cz

Polymorfismus (případně pseudopolymorfismus) a jeho snadná a rychlá analýza je ve farmaceutickém průmyslu, při vývoji a výrobě léčiv (aktivních farmaceutických ingrediencí – API), aktuálním problémem. Možnost dané aktivní látky vyskytovat se v několika krystalových modifikacích totiž může mít vliv na účinnost připraveného produktu. Strukturální charakterizace aktivních farmaceutických substancí (API) v pevných lékových formách je velmi obtížná. Hlavní komplikace vyplývají z nízké koncentrace API v tabletových formulacích. V předneseném příspěvku bude představena možnost rychlé a spolehlivé metody identifikace amorních a semikrystalických forem API pomocí ^{19}F MAS NMR. Námi navržený postup je založen na faktorové analýze ^{19}F MAS NMR spekter. Výsledkem takové analýzy je sada subspekter S_j , jež zvýrazňují jednotlivé spektrální rozdíly mezi různými „amorfními formami“ zkoumané aktivní látky. Kvantitativně jsou pak tyto rozdíly vyjádřeny koeficienty V_{ij} . Ukázalo se, že tyto koeficienty zcela jednoznačně identifikují každou modifikaci API, a to jak v čistém stavu, tak i v pevné lékové formě.



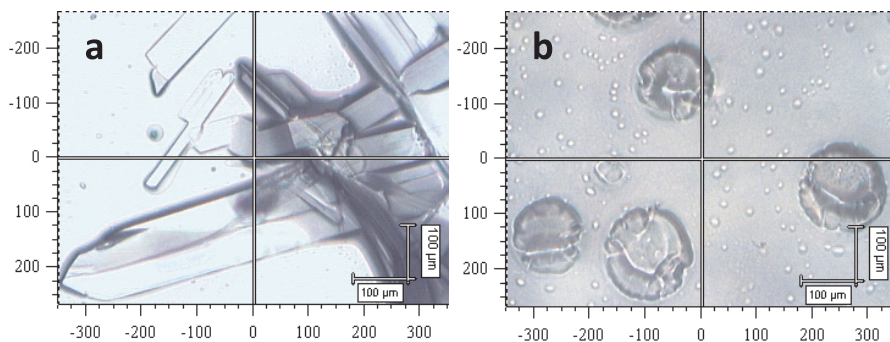
Využití Ramanovy spektrometrie pro charakterizaci farmaceuticky aktivních materiálů v tuhých disperzích

I. Šeděnková, O. Polcianová, M. Urbanová

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ČR.
sedenkova@imc.cs.cz

Vibrační spektroskopie, Ramanova a FTIR spektroskopie, je široce využívanou metodou strukturní analýzy ve farmaceutickém i polymerním výzkumu. Ve spojení s mikroskopií se pak Ramanova mikrospektroskopie uplatňuje ve studiu heterogenních materiálů. Hlavní předností jejího využití při studiu tuhých disperzí je studium interakcí jednotlivých složek lékové formy [1] a určení jejich distribuce ve vzorku.

Metodou Ramanovské mikrospektroskopie byly studovány směsi účinných látek s vodou rozpustnými polymery - simvastatinu s PVP a kyseliny acetylsalicylové s PVP, HPMA a PEG.



obr . Snímky z optického mikroskopu a) krystalicky simvastatin; b) disperze simvastatinu v polyvinylpyrrolidinu

[1] Tailor L.S., Zografi G. *Pharm. Res.*, **1997**, 14(12):1691-1698

Hosté

doc. Ing. Richard Hrabal, CSc.

vedoucí Centrálních laboratoří VŠCHT Praha, vedoucí laboratoře NMR VŠCHT Praha. Oblastí jeho vědecké činnosti je aplikace NMR spektroskopie s vysokým rozlišením v chemii, biochemii a molekulární biologii. Molekulové modelování, především pro zkoumání struktury peptidů, proteinů a jejich komplexů.

Ing. Robert Pola, Ph.D.

postdoktorant oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR, v.v.i. Jeho vědecká činnost je zaměřena na syntézu hydrofilních polymerů a studium možností použití syntetických polymerů nebo konjugátů syntetických a přírodních makromolekul jako nosičů při přípravě polymerních systémů pro cílený transport a řízené uvolňování léčiv a dalších biologicky aktivních molekul.

Témata k diskusi

Alex Pines a jeho pohled na dobu, kdy vyvinul dnes již fenomenální ^{13}C CP/MAS NMR experiment.

CC/NUMBER 32
AUGUST 12, 1991

This Week's Citation Classic®

Pines A, Gibby M G & Waugh J S. Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids.
J. Chem. Phys. 59:569-90, 1973.
[Department of Chemistry and Research Laboratory of Electronics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA]

The NMR signals of isotopically or chemically dilute nuclear spins "S" can be enhanced by repeated cross-polarization under the Hartmann-Hahn condition from a more abundant species "I" (usually hydrogen). High-frequency resolution is obtained by decoupling of the I spins during observation of the S spin free induction decay. The theory and experimental requirements are discussed, and illustrative applications to carbon-13 NMR in organic solids are demonstrated. [The *SCI*® indicates that this paper has been cited in more than 1,000 publications.]

Carbon-13 NMR in Solids

Alexander Pines
Lawrence Berkeley Laboratory and
Department of Chemistry
University of California
Berkeley, CA 94720

As a small boy, I often wondered about the chemical shift anisotropy of benzene. After my application for graduate school was rejected at Berkeley, I settled for the Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge.

had also developed the famous coherent averaging of spin interactions by means of multiple-pulse sequences that revealed the chemical shifts of hydrogen in solids. It occurred to us that, because of its low natural abundance (and correspondingly weak magnetic dipole-dipole couplings), carbon-13 should yield high-resolution Fourier-transform spectra with reasonable sensitivity by spin decoupling following polarization transfer from hydrogen to carbon. After building a spectrometer with Michael G. Gibby and arguing for two weeks about whether the double-resonance sequence should be called pulse program or pulse programme, we needed

a model sample to try the experiment. Henry A. Resing (known affectionately as

a model sample to try the experiment. Henry A. Resing (known affectionately as Mr. Adamantane because of his work on plastic crystals) was visiting, and I asked him what would be a cheap compound with at least two inequivalent carbon sites, solid at room temperature but with the molecules reorienting roughly isotropically, and with T_1 and $T_1 \rho$ relaxation times of about one second. He suggested adamantane. Indeed, after we vaporized a number of samples in the probe with high radiofrequency power, the first successful experiments showed two resolved carbon-13 peaks with good signal/noise in solid adamantane. We subsequently obtained chemistry.

It was during this period that Gibby became known as a hermitian operator because he would lock himself in the lab and run the spectrometer for weeks on end.

In our 1973 paper, we called the technique proton-enhanced nuclear induction spectroscopy, a term erected from the foundations of nuclear induction laid by physicists.¹ The early applications were to carbon-13, but we did extend the experiments to nitrogen-15 and silicon-29. Later, J. Schaefer and E.O. Stejskal added magic-angle spinning and, today, CP/MAS is widely available on royalty-yielding commercial spectrometers.

I left the east coast to come to Berkeley when Simkins was just completing the quantum theory of phlogiston at MIT. I'm not sure why our paper is cited so often. Perhaps one reason is that it talks openly and frankly about the Hartmann-Hahn condition, an affliction suffered by many chemists in the rotating frame of reference.

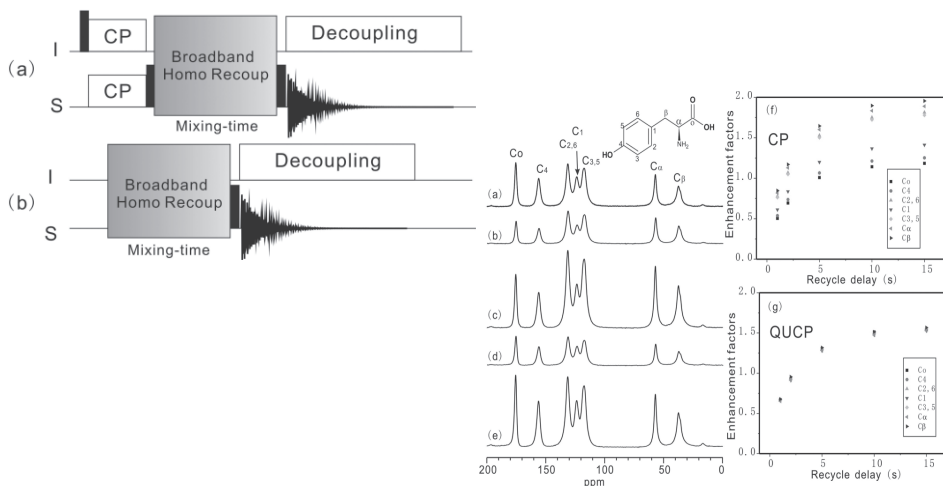
O čem jsme přemýšleli my, když jsme byli malými chlapci/děvčaty?

Témata k diskusi

Nová technika pro kvantitativní měření ss-NMR spekter.

J. Am. Chem. Soc. 132 (16), pp 5538–5539 (2010)

S kvantitou je to vždy v NMR spektroskopii pevného stavu poněkud komplikované. Při standardní jedno-pulsní excitaci je nutné pro získání kvantitativní informace nastavit opakovací prodlevu 5-krát delší než je T1 relaxační doba měřeného jádra. To je jistě velmi časově náročné. Jisté zlepšení přináší CP/MAS NMR experiment, kdy se uvádí, že použití relativně dlouhé doby přenosu polarizace (2-5 ms) vede k získání kvantitativních dat. V článku J. Am. Chem. Soc. 132 (16), pp 5538–5539 (2010) představují autoři novou techniku založenou na zavedení DARR rekuplovací pulsni sekvence. Tato homonukleární rekuplovací technika velmi dobře funguje pro izotopicky obohacené systémy, pro něž je vyrovnání magnetizace mezi různými jádry přirozené. DARR sekvence je aplikována jak na ^{13}C tak i na ^1H spinový systém. Otázkou je proč tato metoda velmi dobře funguje i pro systémy v přirozeném izotopickém zastoupení, kde nelze předpokládat rychlou spinovou výměnu mezi řídkými ^{13}C jádry. Pokud dochází k vyrovnání např. ^{13}C magnetizace využitím ^1H spinového systému, pak jde o jakýsi ekvivalent CP s dlouhou kontaktní dobou. Autoři také uvádějí, že pro dosažení kvantitativně správných údajů pro neobohacené systémy je nutné aplikovat DARR periodu v délce až 20s při intenzitě rekuplovacího pole cca 15 kHz. Není to sice extrémní hodnota, ale je to dost. V každém případě QUCP experimenty poskytují kvantitativní spektra při použití relativně krátké opakovací periody.



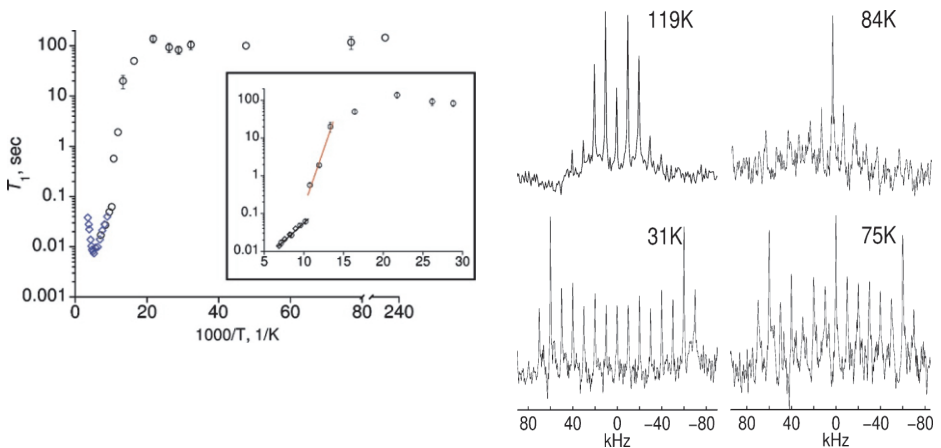
Stojí za to riskovat poškození vzorku intenzivním recouplingem, a tak dosáhnout spolehlivá kvantitativní data? Jaký je mechanismus dosažení kvazi-rovnovážného stavu v systémech bez izotopického obohace? A co na to NOE?

Témata k diskusi

Dynamika methylových skupin v hydrofobním proteinu.

J Am Chem Soc 132 (12), 4038, (2010)

Segmentová dynamika hraje klíčovou roli pro pochopení fungování řady proteinů, a proto se této problematice věnují významné vědecké časopisy, mezi které bez sporu patří i Journal of the American Chemical Society. Proto naší pozornosti neunikl příspěvek věnovaný dynamice methylové skupiny L69 v hydrofobním jádru proteinu HP36 při extrémně nízkých teplotách 140–4 K. Autoři ve své práci docházejí k zjištění, že při teplotě pod 95 K dojde k prudkému nárůstu aktivační energie rotace methyly, což indikuje zamrznutí tohoto pohybu. Biofyzikální povaha popsaného jevu je předmětem dalšího studia.



Methyl groups are thought to dominate the dynamics of proteins after slow collective modes of motion freeze out in a glass-transition process. In this work we investigate methyl group dynamics of a key hydrophobic core leucine residue in chicken villin headpiece subdomain protein at 140–4 K using deuterium NMR longitudinal relaxation measurements. A distinct increase in the apparent activation energy is observed at 95 K, indicating an abrupt freezing of methyl group dynamics. Relaxation times at temperatures below 60 K are dominated by the deuterium tunneling mechanism.

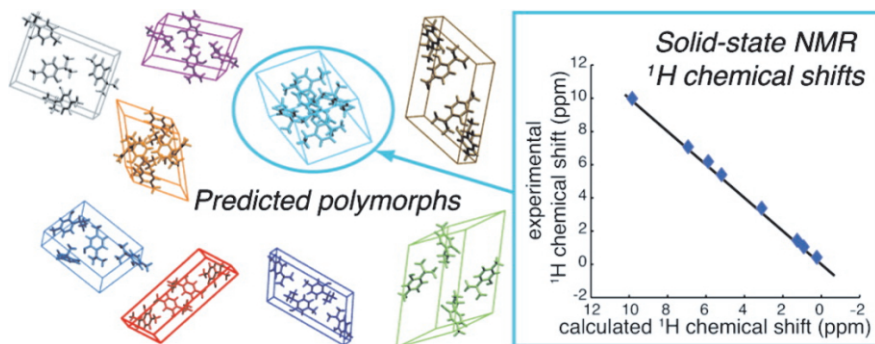
Velmi by mě zajímalo, kdy jindy než při velmi nízké teplotě dojde k zamrznutí rotace methylové skupiny? Nebo je 95K stále teplota vysoká? Jak lze vysledovat biofyzikální podstatu sledovaného procesu, když k němu dochází při -178°C (teplota varu kapalného dusíku je -196°C).

Témata k diskusi

NMR krystalografie: kombinace predikce krystalové struktury a ^1H MAS NMR spektroskopie.

J. Am. Chem. Soc., 2010, 132 (8), pp 2564–2566

Nedávné pokroky v molekulárním modelování umožnily navrhnout strategie predikce krystalové struktury pouze při znalosti konektivity atomů v molekule. Obvykle je počet predikovaných struktur kolem 10-100. Autoři této studie uvádějí jak je možné využít ^1H - ^1H MAS NMR korelačních spekter s vysokým rozlišením pro výběr správné struktury. Z 10000 struktur bylo vybráno 23 s nejnižší potenciální energií (10 kJ/mol). Následně byly počítány chemické posuny pomocí CASTEP codu.



„We note that isotropic shifts are by far the easiest solid-state NMR parameter to measure. This method is very fast, assignment is not needed, and this approach should be applicable to sets of potential structures generated from a wide range of methods. The excellent results here have encouraged further work to test the general applicability of the method to molecular organic crystals, which is underway. Although they require a longer experiment, proton-proton spin diffusion data are also shown to determine the correct structure and could prove useful when cross-validation of the structure determination is needed, for example if two potential candidates emerge from the chemical ^1H shift procedure.“

Blížíme se k okamžiku, kdy již nebudou potřeba experimentální metody a bude možné předpovědět polymorfismus? Co by uvedený přístup naznačil, pokud by byl aplikován na systém, u kterého nebyl polymorfismus prokázán?

