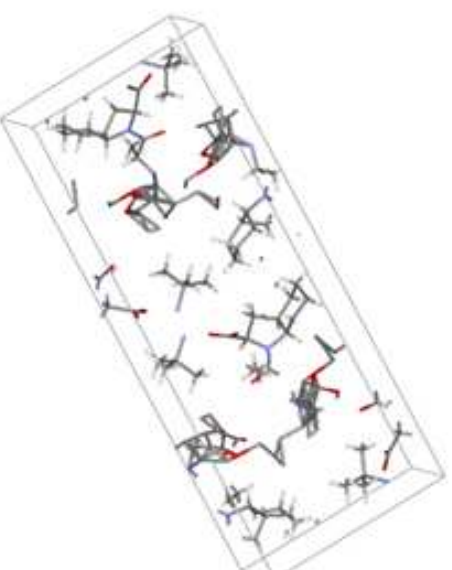
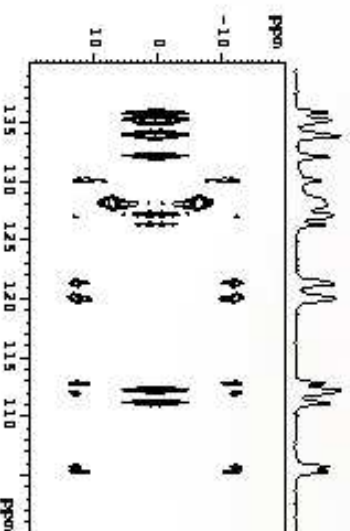


rtg a NMR krystalografie pro farmaceuticky aktivní substance

autoři:

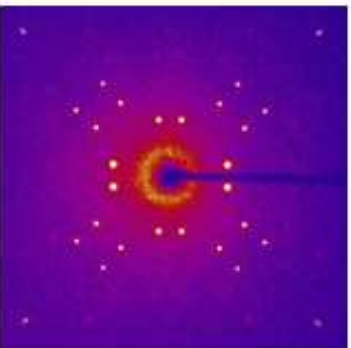
jiri brus, martina urbanová,
alexandr jegorov a michal hušák



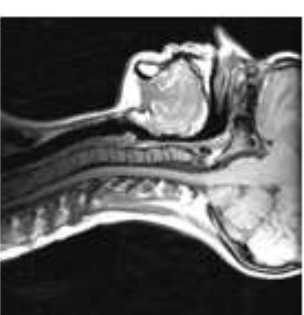
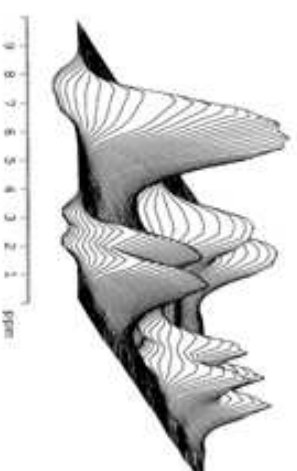
ssNMR - NMR krystalografie

Komplementarita

XRD



NMR



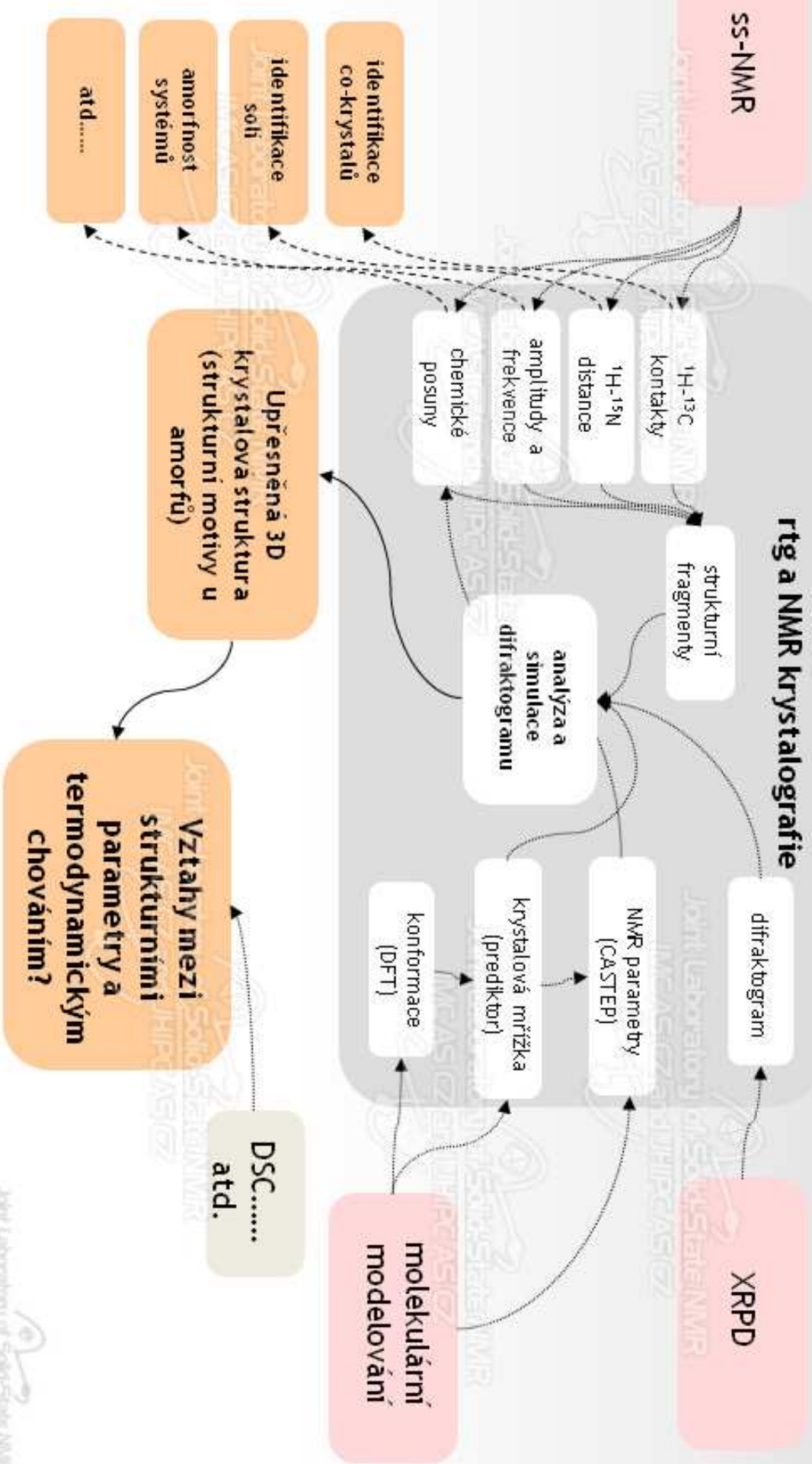
Rtg a NMR krystalografie pro farmaceuticky aktivní substance

- Principy NMR krystalografie a cíle projektu
- Dílčí výsledky:
 - Princip dipolární spektroskopie a určování strukturní fragmentů
 - Uspořádání molekul, strukturní motivy a segmentová dynamika (LT-simvastatin)
 - Faktorová analýza ^{19}F , ^{13}C NMR data a XRPD dat amorfních substancí
 - Sůl nebo co-krytal? ^{15}N CPPI NMR - jednoduchá procedura

Představení a cíle projektu

- Problém - obtížně předpověditelný polymorfismus
- Biologická dostupnost a krystalová struktura
- Patentové komplikace a spory
 - Rozvoj nového vědního oboru - NMR krystalografie
 - Spojení ssNMR, XRPD a molekulárního modelování
 - Rychlá a spolehlivá identifikace a strukturní analýza API
 - Pochopení jevu polymorfie ve vztahu s termodynamickým chováním API
- Metodika NMR krystalografie - monitorování farmaceutických produktů
- Optimalizace pro průmyslové měřítko - minimalizace experimentálního času

Představení a cíle projektu



Díličí cíle projektu - první etapa

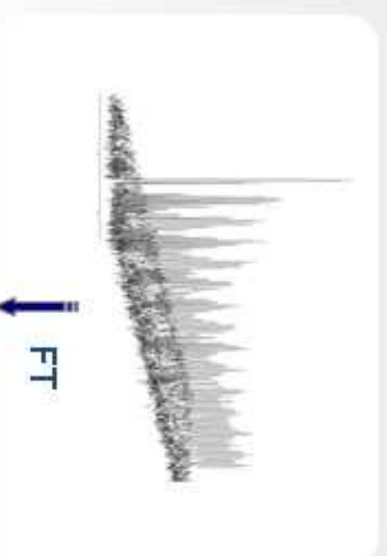
Vypracování metodiky pro jednoduché systémy

- Určování strukturálních fragmentů: ^{13}C - ^1H kontakty a vzdálenosti pro rtg
 - Simvastatin (C25) - fázové přechody a nízkoteplotní formy
 - Lokalizace vodíkových atomů
 - Dynamika
 - Metodický aspekt - porovnání DSC, XRPD, ssNMR
- Rychlá detekce a identifikace krystalových forem
 - ^{19}F NMR - vypovídací hodnota spekter, porovnání s ^{13}C NMR a XRPD
 - Posouzení amorfnosti

Určování strukturálních fragmentů I

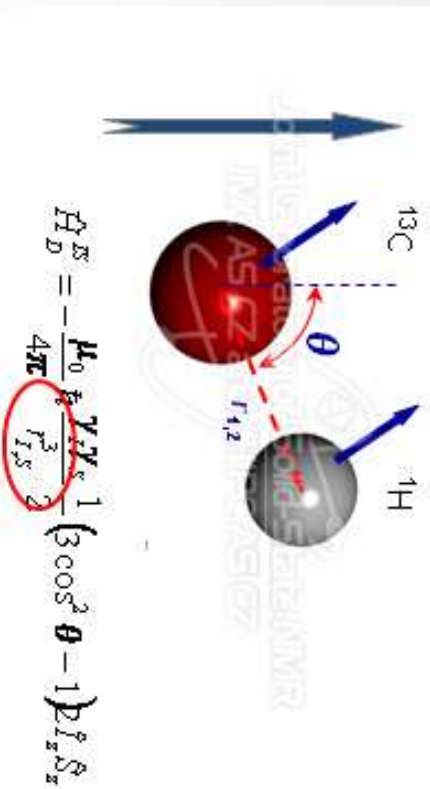
Dipolární interakce a meziatomová vzdálenost

Dipolární oscilace ^{13}C NMR signálu pro typickou C-H skupinu



FT ↓

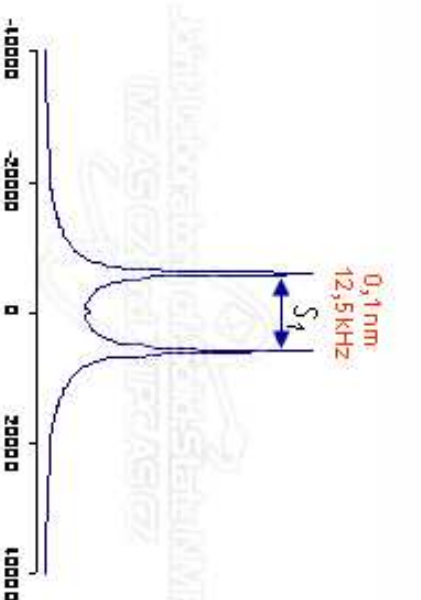
Dipolární spektrum



Škálování D

- D - dipolární interakční konstanta závisí na $1/r_{\text{CH}}^3$.

- D - dipolární interakční konstanta by měla být konstantní pro všechny C-H páry v CH or CH₂ skupinách, protože vzdálenost je vždy 0.11 nm



$$r_{\text{CH}} = a \left(\frac{S_1}{2\pi} \right)^{\frac{1}{3}}$$

$$S_1 = \sin \theta_m \frac{D_S}{\sqrt{2}}$$

$$\sin \theta_m = 0.816$$

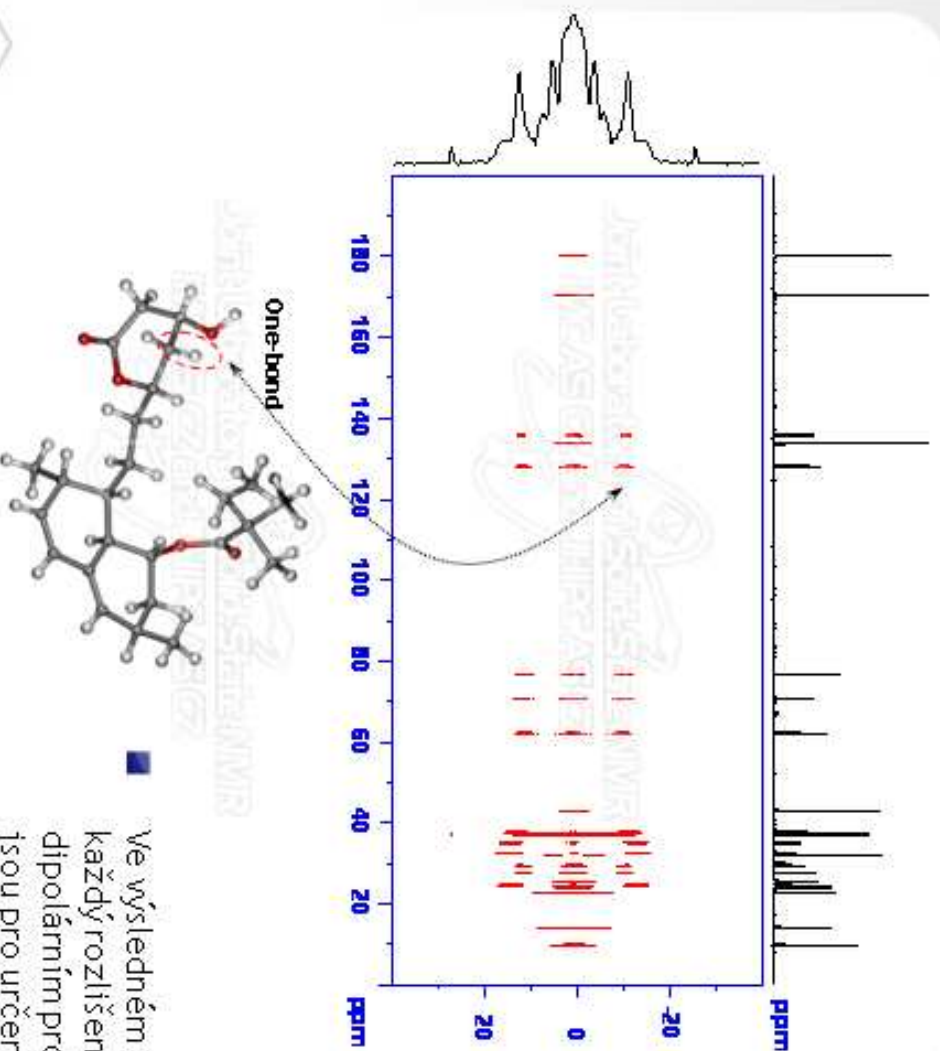
$$\theta_m = 54.7^\circ$$



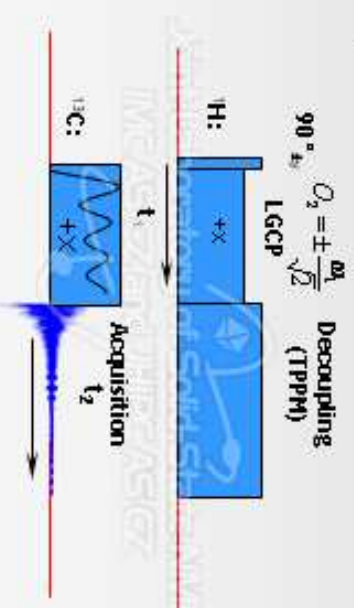
Určování strukturních fragmentů II

Separace lokálních polí

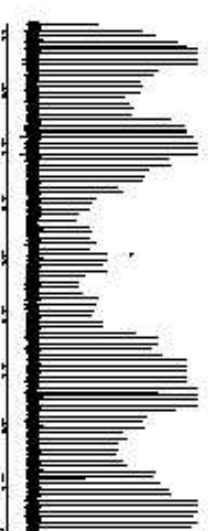
Lee-Goldburg cross-polarization (LG-CP)



■ Ve výsledném 2D spektru jsou dipolární interakce separovány pro každý rozlišený uhlíkový atom do druhé dimenze. Ovšem získaným dipolárním profilu dominují jedno vazebné dipolární interakce, které jsou pro určení struktury nevýznamné.



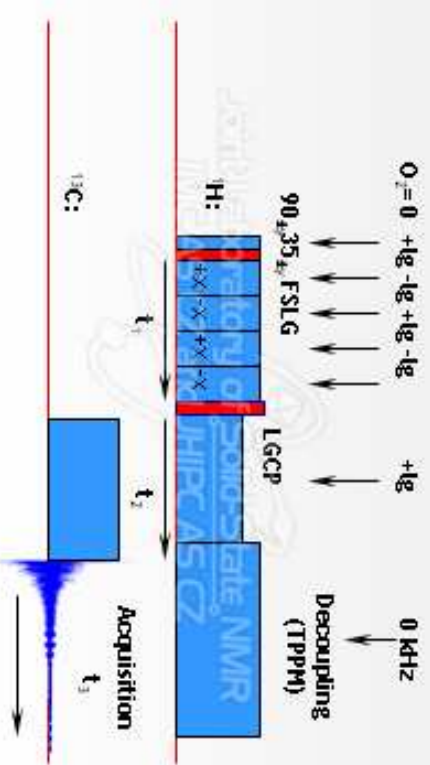
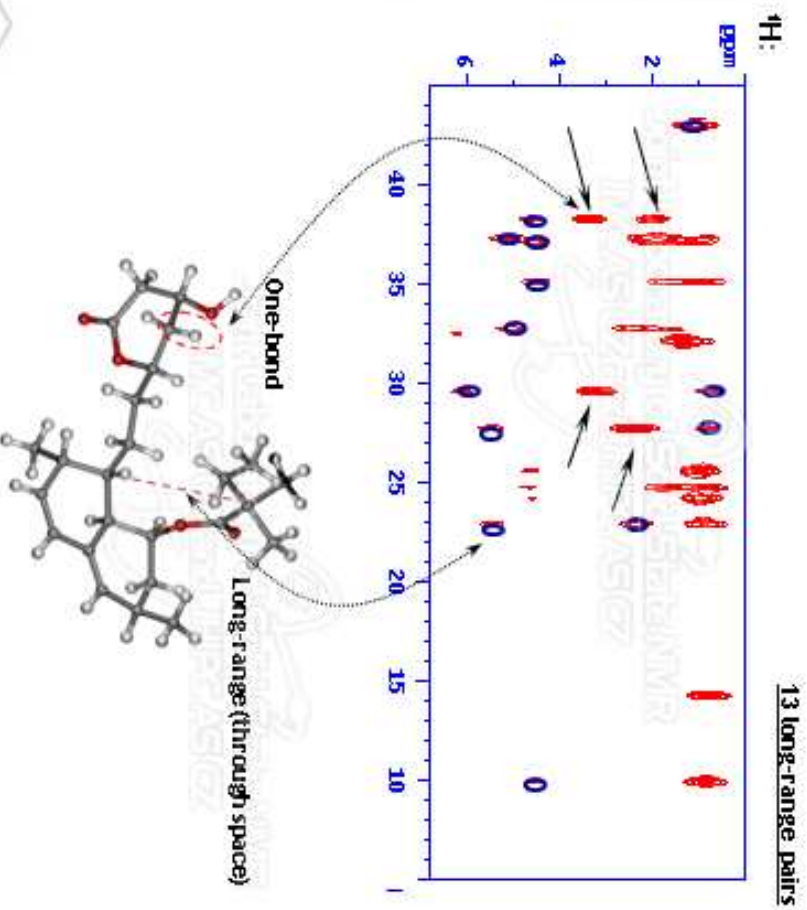
Recoupling of dipolar interactions at ± 1 and ± 2 SSB



Princip dipolární spektroskopie III

Zvýšení dimenzionality experimentu

Standardní 3D experiment
 ^1H - ^{13}C FSLG-LGCP-HETCOR



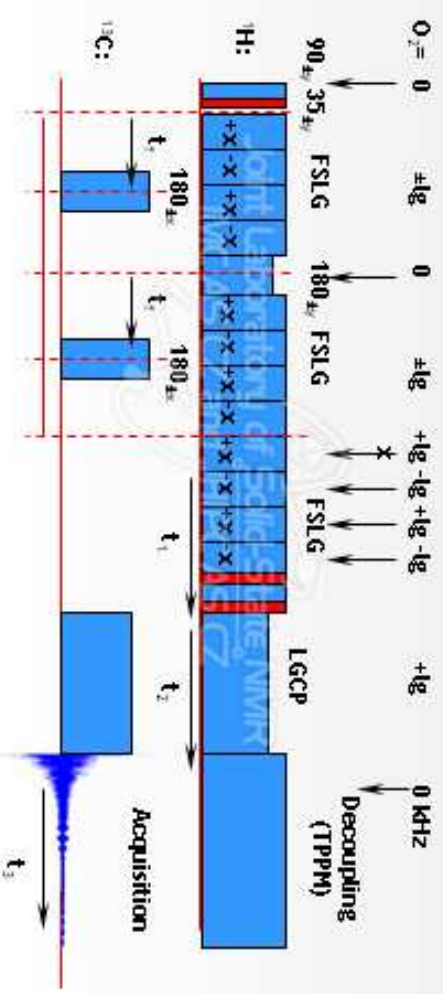
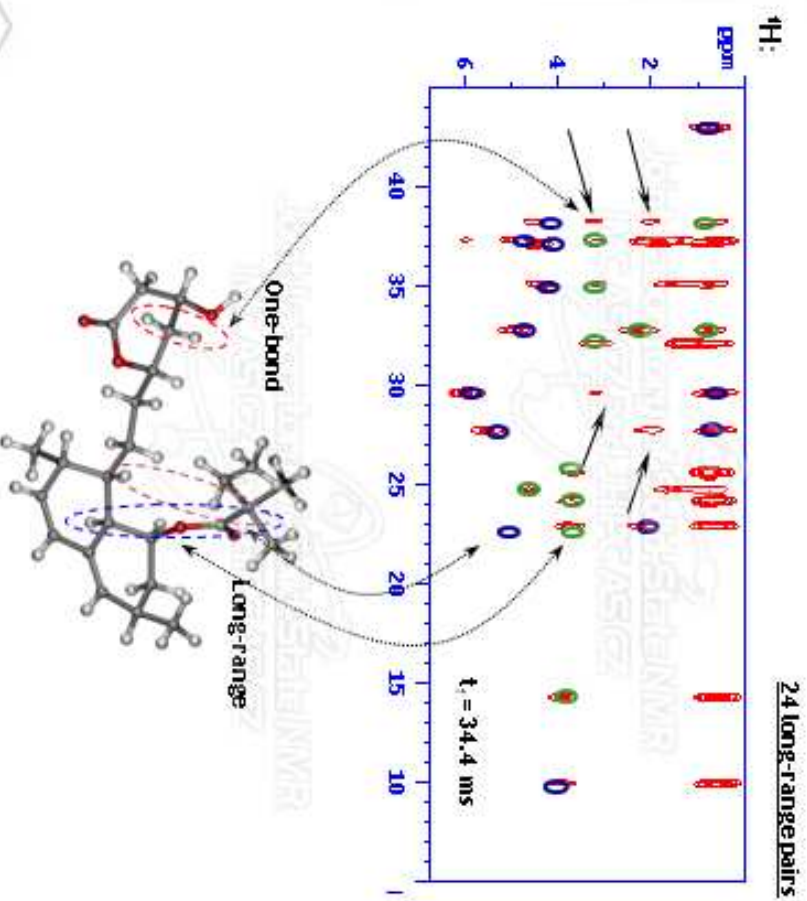
B.-J. van Rossum, et al. J. Am. Chem. Soc. 122, 3465 (2000)

Princip dipolární spektroskopie IV

Potlačení nežádoucích signálů

Rozšířený 3D experiment

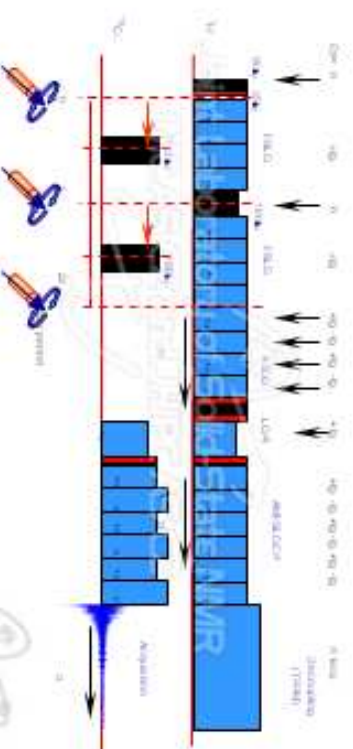
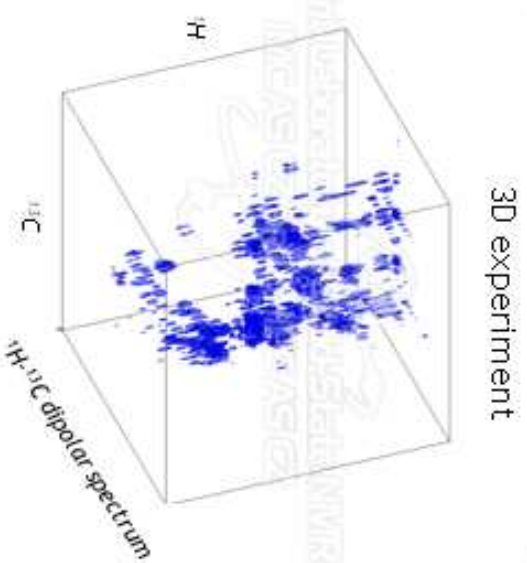
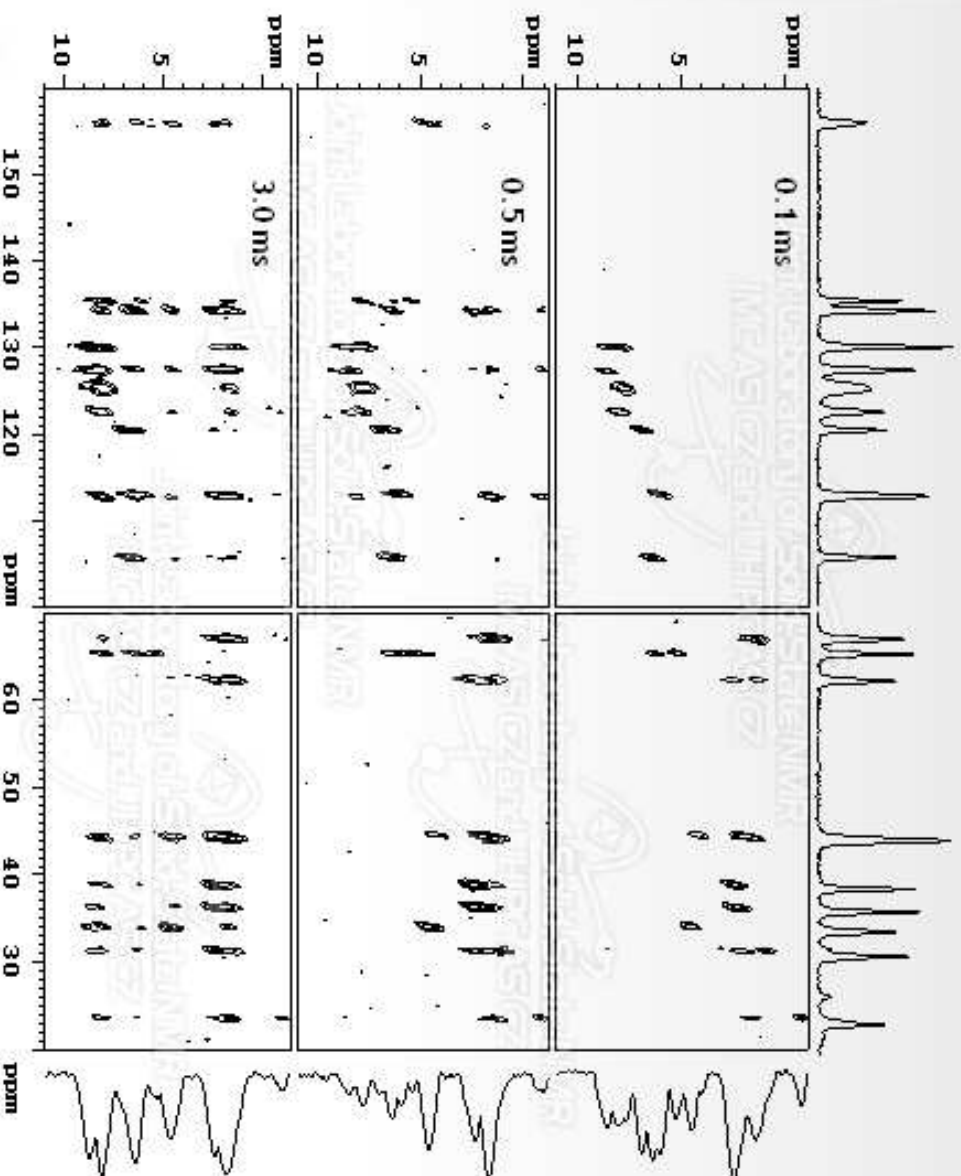
REDOR rozfázovaný ^1H - ^{13}C FSLG-LGCP-HETCOR



Yao X.L., et al. J. Magn. Reson. 149, 139 (2001)

^1H - ^{13}C kontakty: dipolární spektroskopie

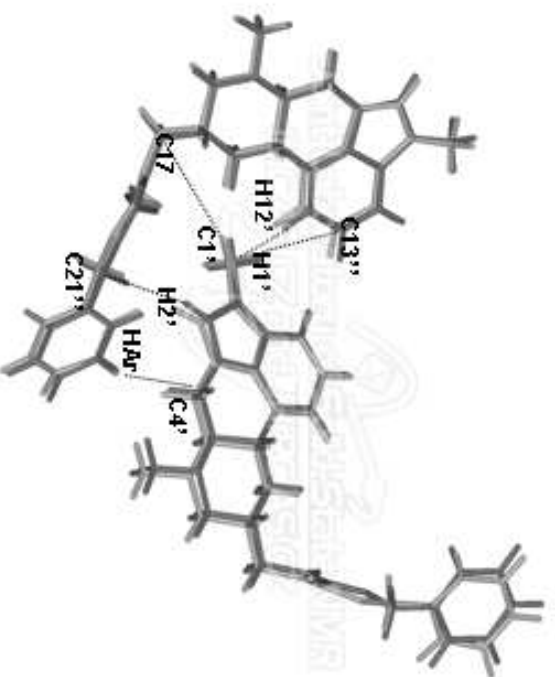
Rozšířený 3D experiment
REDOR rozfázovaný ^1H - ^{13}C FSLG-LGCP-HETCOR s
amplitudovou a frekvenční modulací LGCP



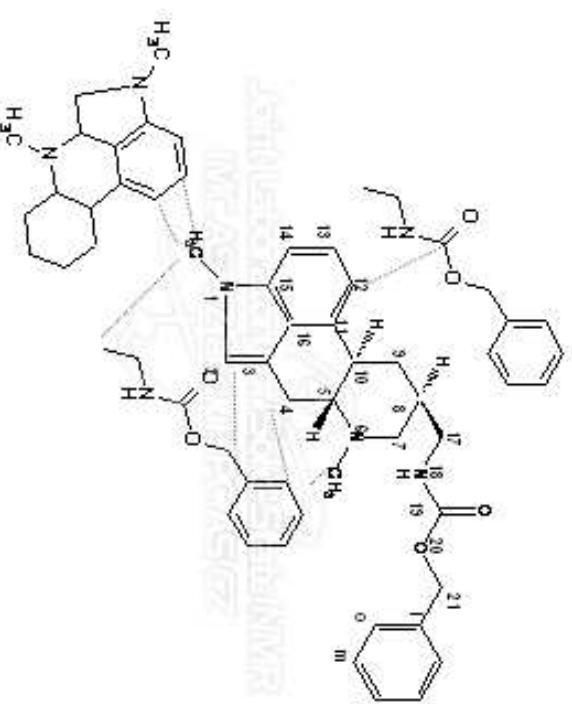
Strukturní fragmenty - geometrická omezení

^{13}C - ^1H FSLG-LGCP HETCOR v porovnání s XRPD výsledky

Upřesněná XRPD struktura



Strukturní fragmenty získané z ssNMR spekter



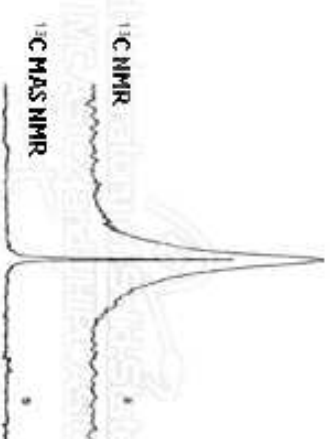
Zcela rigidní systémy

Dokonalé krystaly a atomární sítě

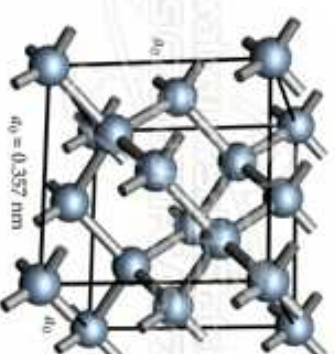
Diamant



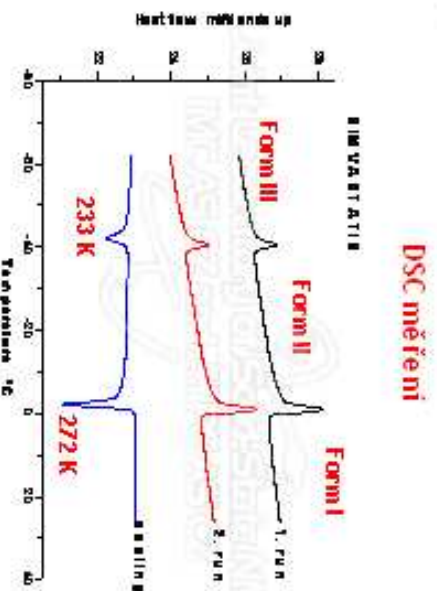
James Bond, 1971, "Diamonds are forever",
Diamant je nejlepší přítel ženy.



T_1 (^{13}C) relaxation time - up to 2 days



Nízko-teplotní formy Simvastatinu



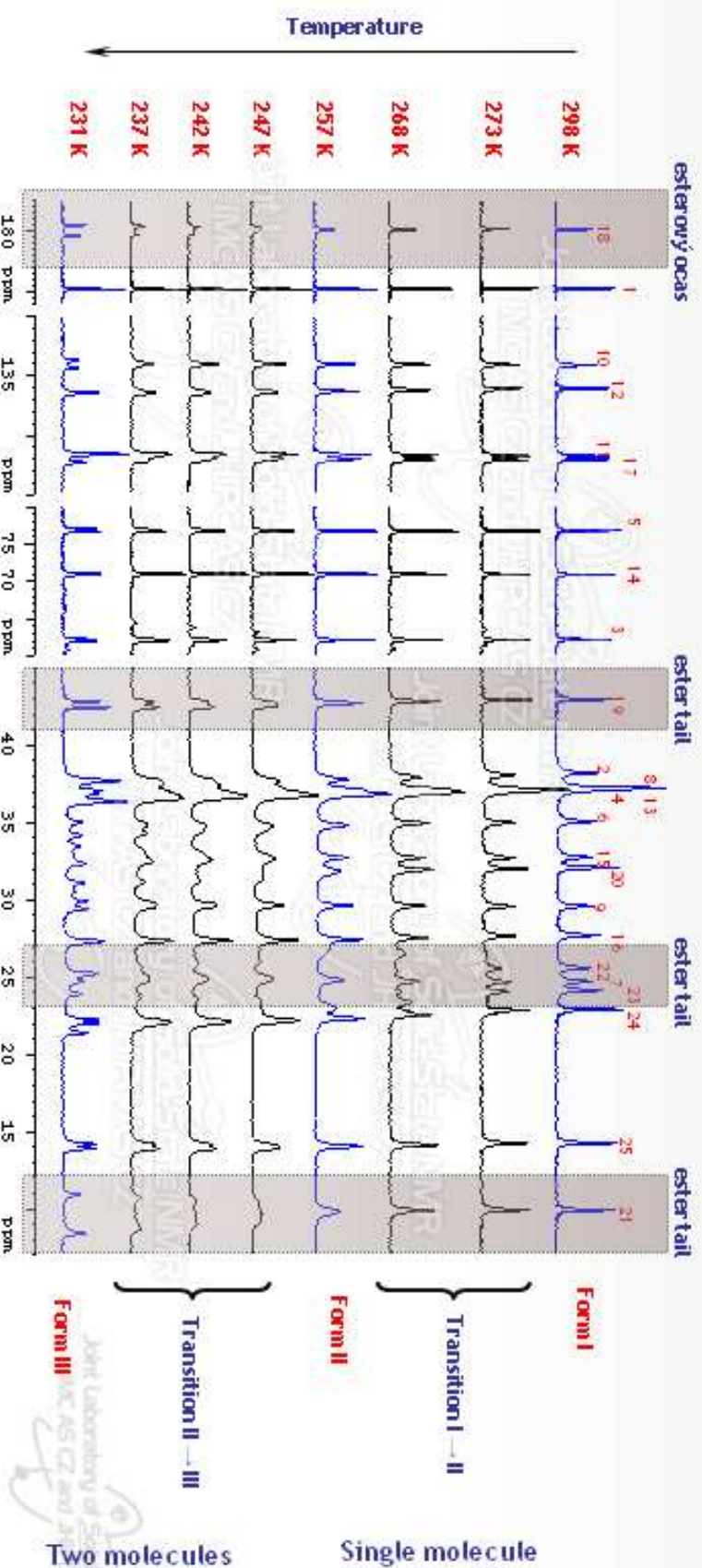
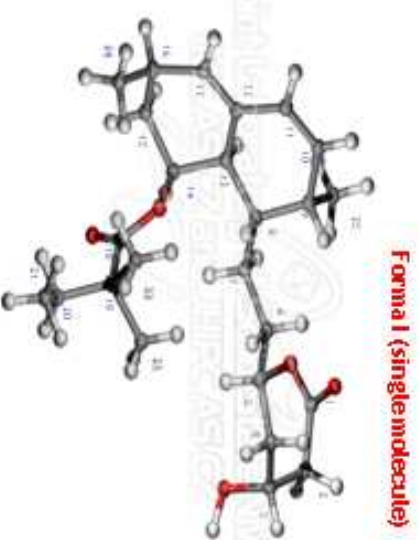
Simvastatin (Zocor®)

Merck

“Every compound has different polymorphic forms, and that, in general, the number of forms known for a given compound is proportional to the time and money spent in research on that compound”

McCrone, W. 1963

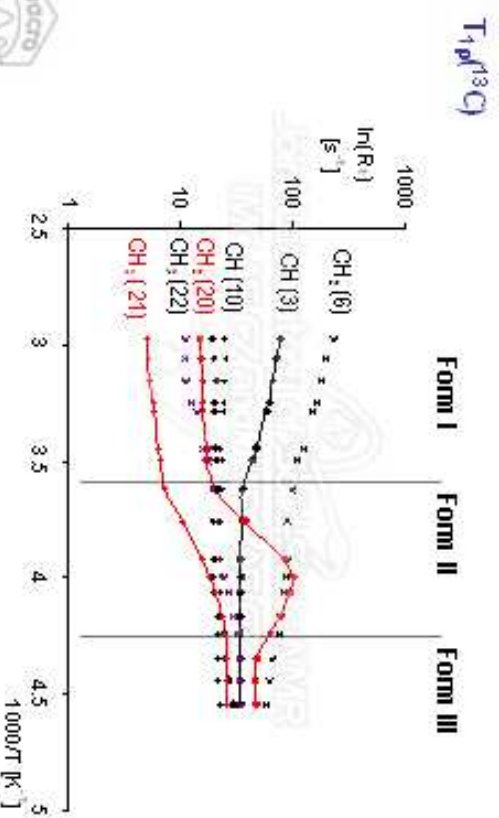
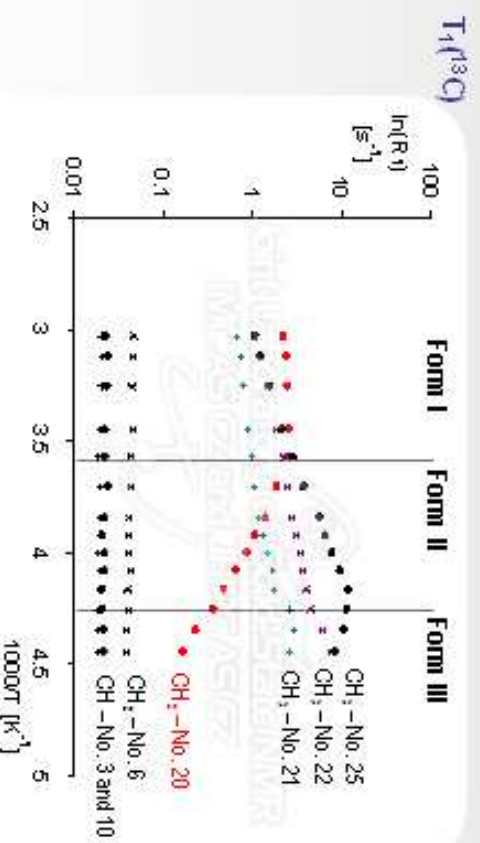
VT ¹³C CP/MAS NMR



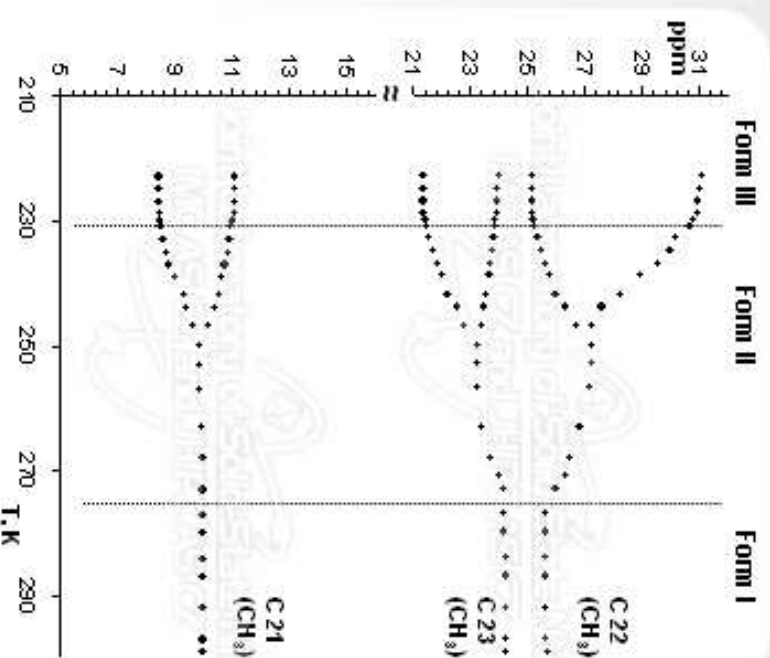
Nízkoteplotní formy Simvastatinu

Konformační přeměny a segmentová dynamika (frekvence)

Relaxační rychlosti vs. teplota

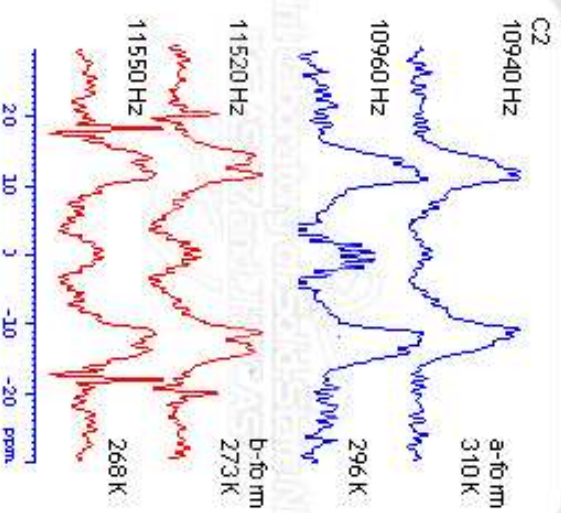
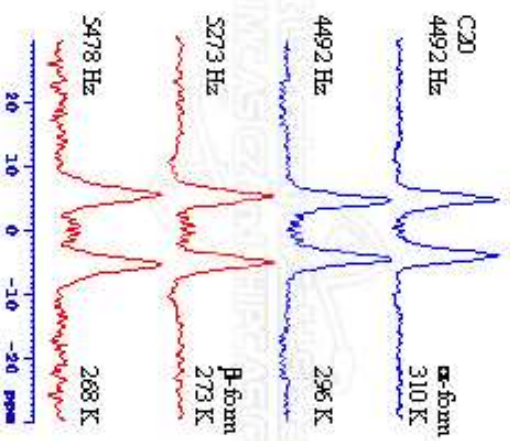
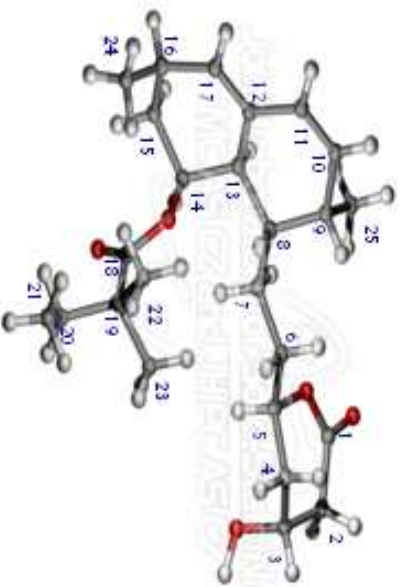


Teplotní měny chemického posunu



Nízkoteplotní formy Simvastatinu

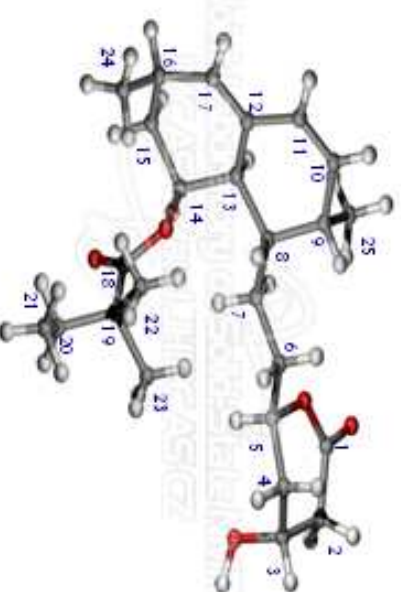
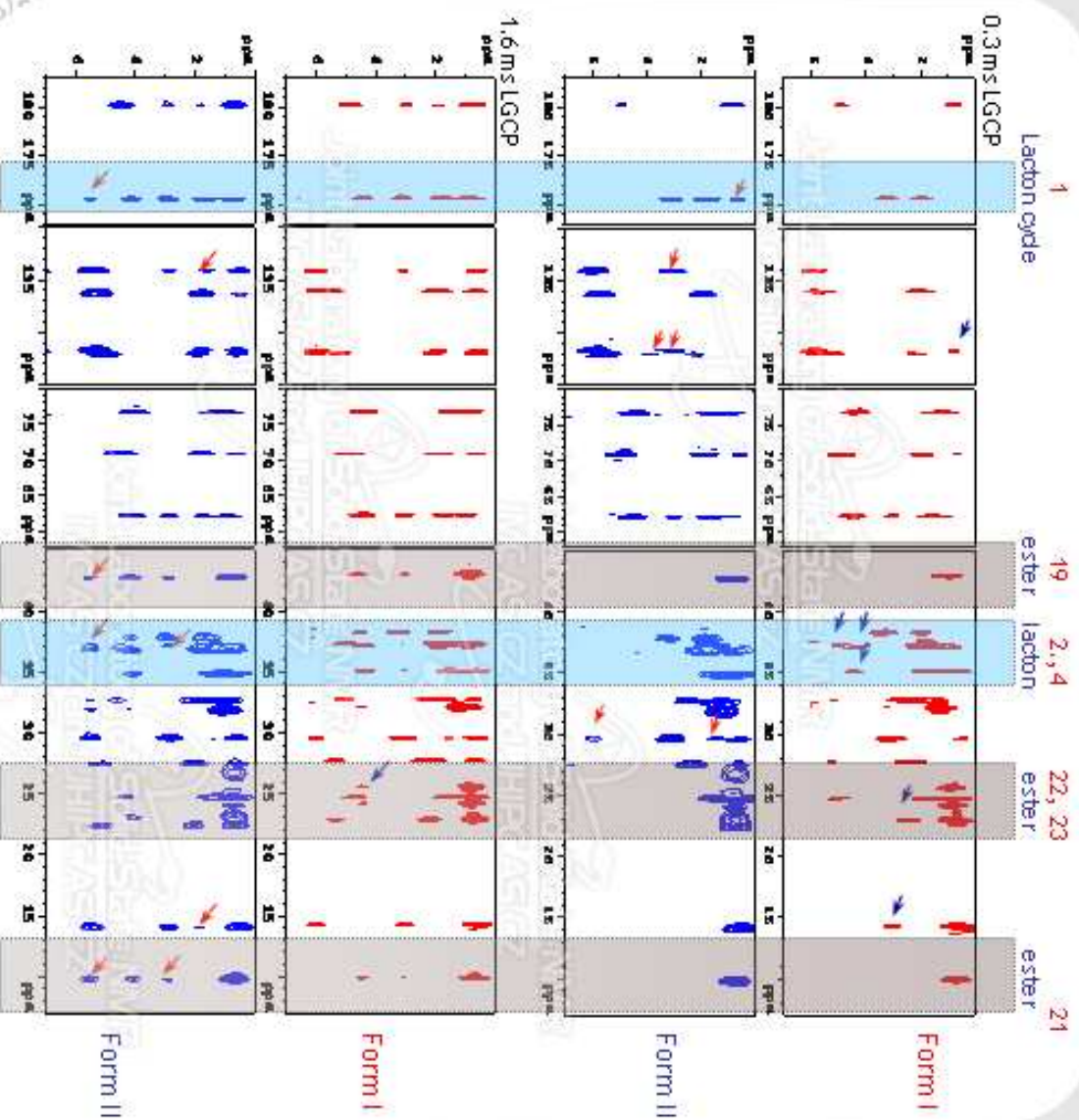
Konformační přeměny a segmentová dynamika (amplitudy)



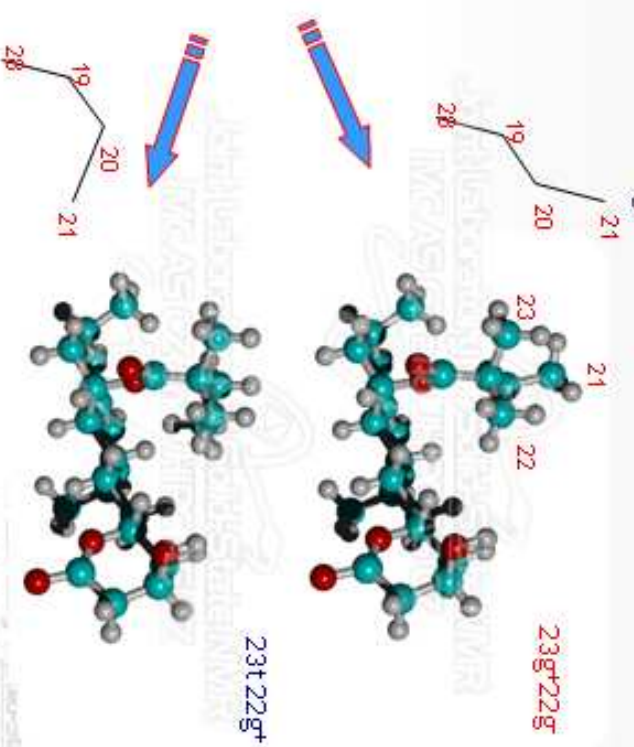
Segment A	Ethylene link B	Lacton cycle C	Ester tail D
C9-C11	C6	C5	C20
Order parameter S ; Root mean square angle (r.m.s.a.)			
Formal	$S = 1 - 0,99$ $0 - 2^\circ$	$S = 0,97$ $\sim 7^\circ$	$S = 0,37$ Three site jump 38:31:31% or $\sim 60^\circ$ in the cone
Formal II	$S = 1 - 0,998$ $0 - 2^\circ$	$S = 0,975$ $\sim 7^\circ$	$S = 0,46$ Three site jump 48:26:26% or $\sim 54^\circ$ in the cone

Nízko-teplotní formy Simvastatinu

VT 2D ^{13}C - ^1H FSLG-LGCP HETCOR



Resulting conformation differences of the ester tail



A co praktické výsledky?

Propojení mezi ssNMR a makroskopickým chováním

Spektrální parametry,
struktura, pohybové
chování

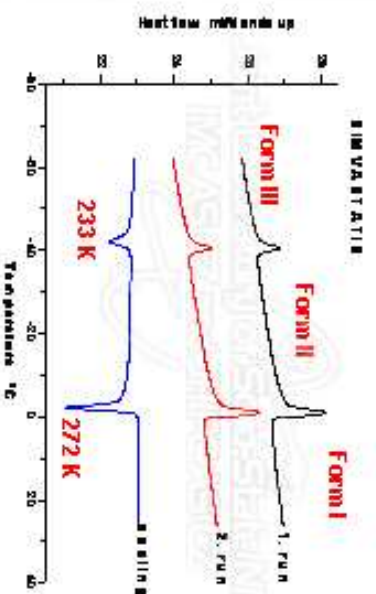
Makroskopické chování



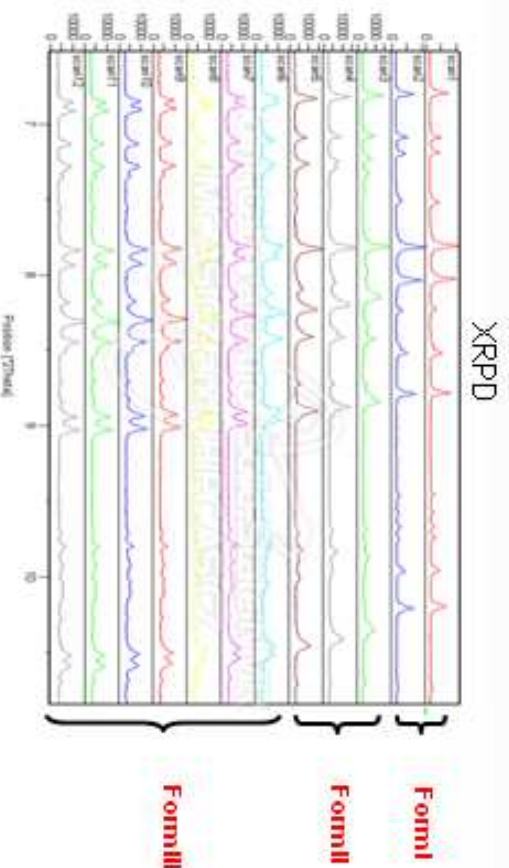
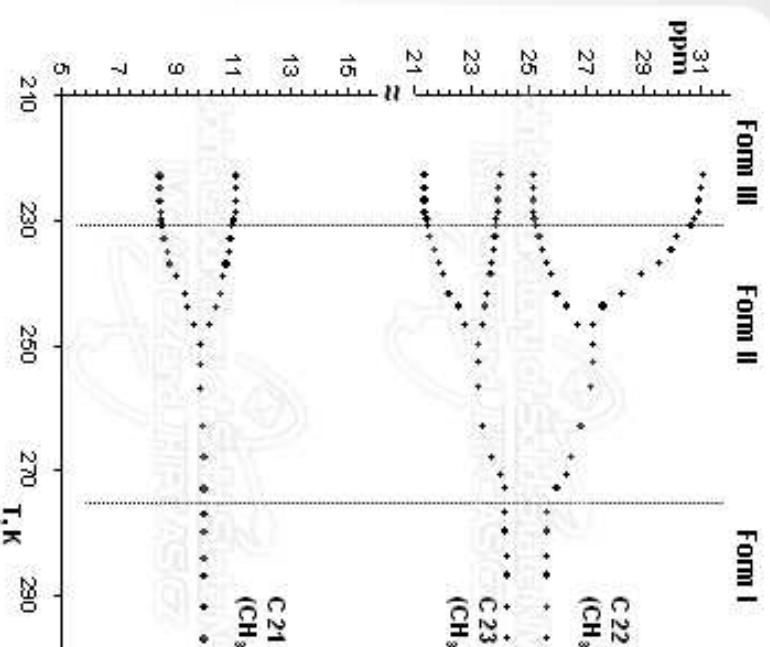
Metodické aspekty

Porovnání výsledků DSC, XRPD a ssNMR

DSC

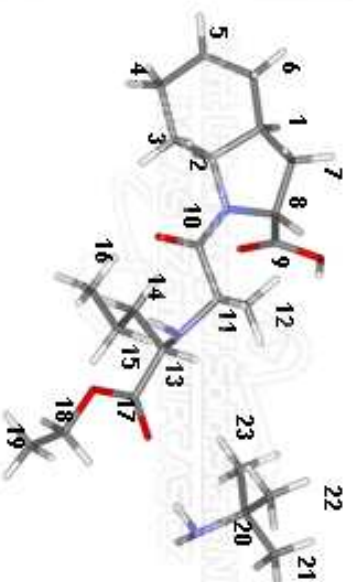


^{13}C CP/MAS NMR



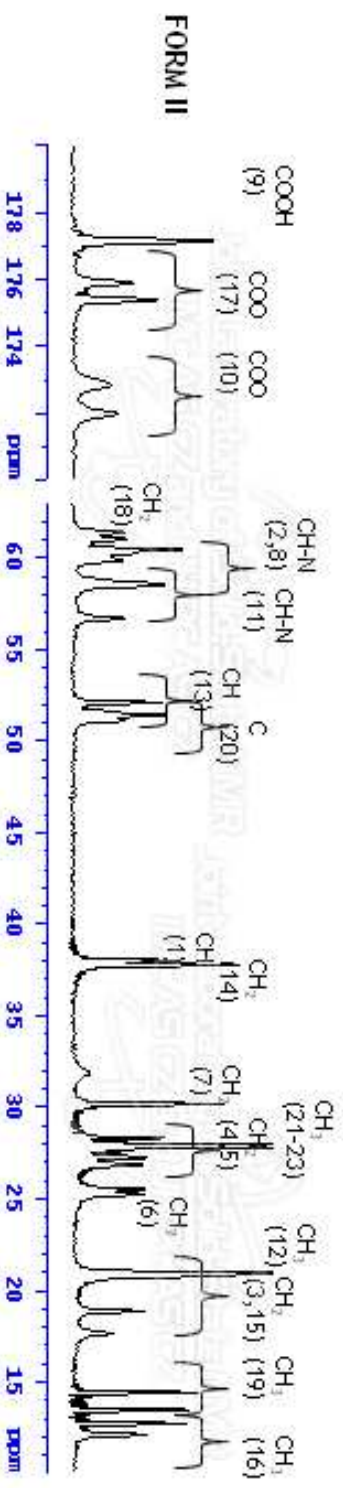
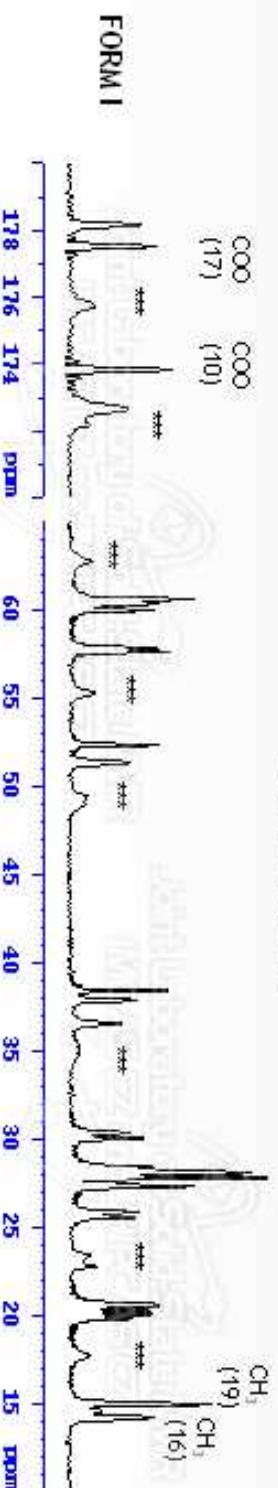
Stabilita krystalové modifikace

Dynamický disorder



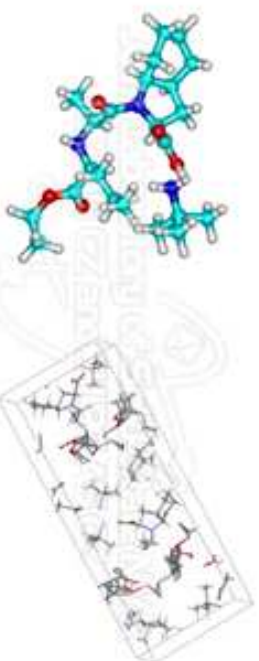
- **Perindopril - Form I:** thermodynamically most stable form - prepared by slow crystallization from aprotic solvents or by moderate short-term heating of other forms (always broad and narrow signals detected in NMR spectra)
- **Perindopril - Form II:** less stable form containing two symmetry independent molecules in the crystal unit, irreversibly converts to the Form I

^{13}C CP/MAS NMR



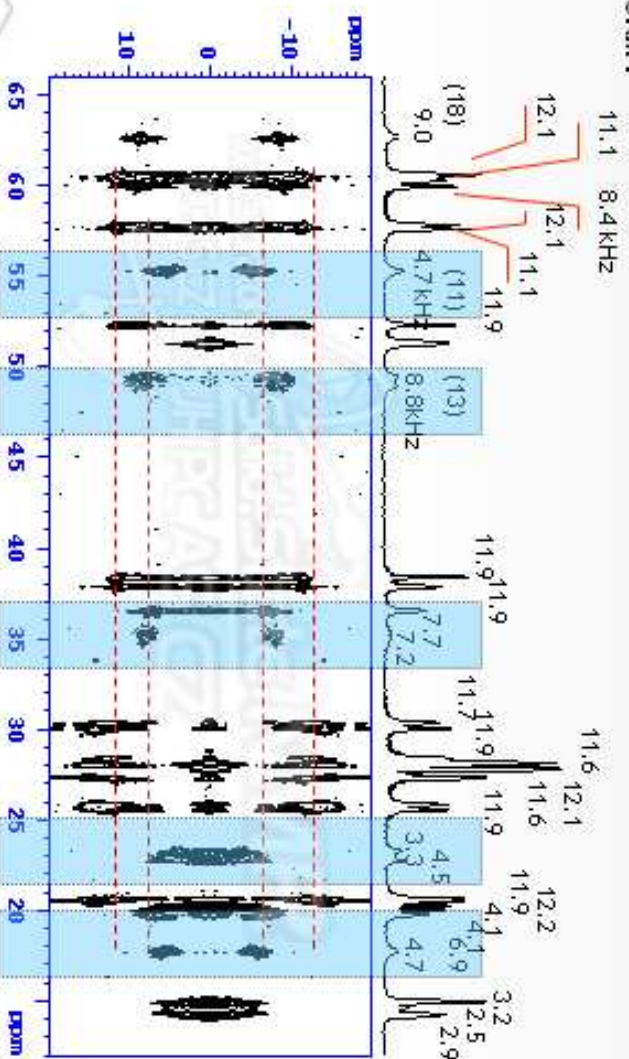
Stabilita krystalové modifikace

Dynamický disorder



FORM I

^1H - ^{13}C dipolar spectrum



- **Perindopril - Form I**: ca. 30% of molecules have undefined conformation, the observed disorder is dynamic (high amplitude segmental motion is detected)

- **Order parameter** determined from dipolar spectra for some CH and CH₂ sites (e.g. 55, 35 ppm) $S = 0.55$

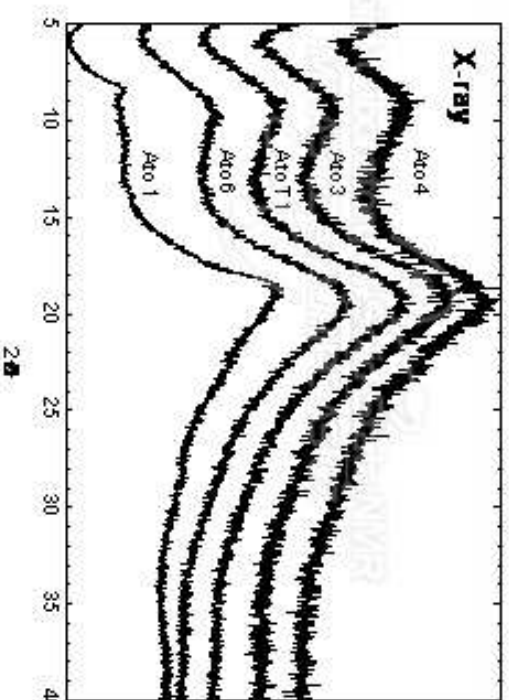
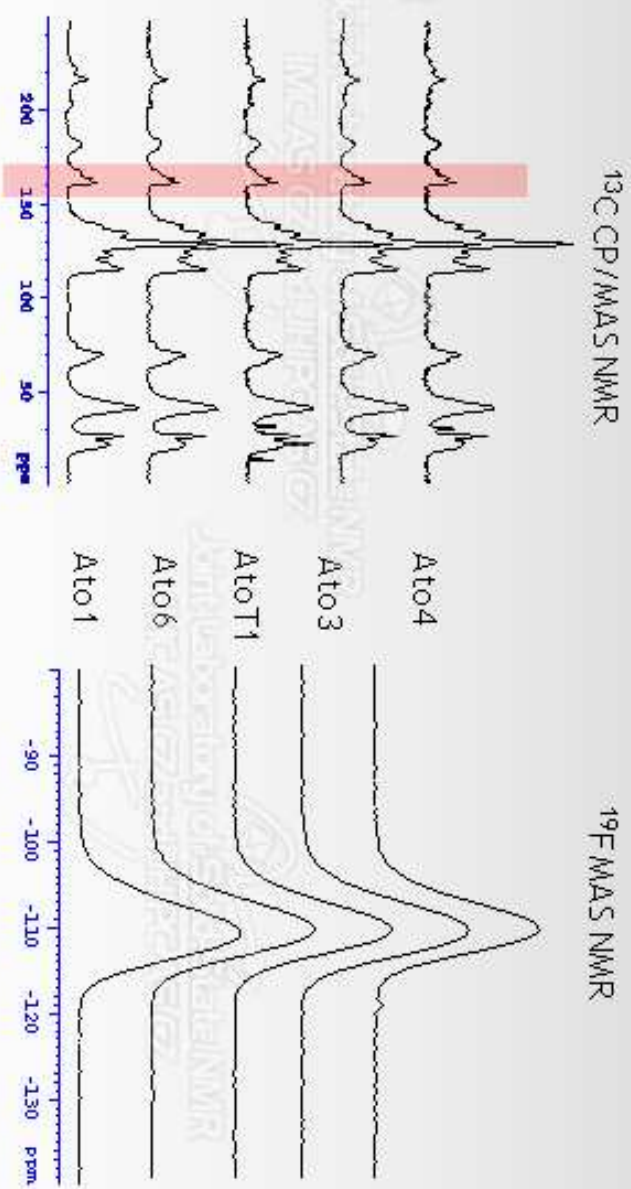
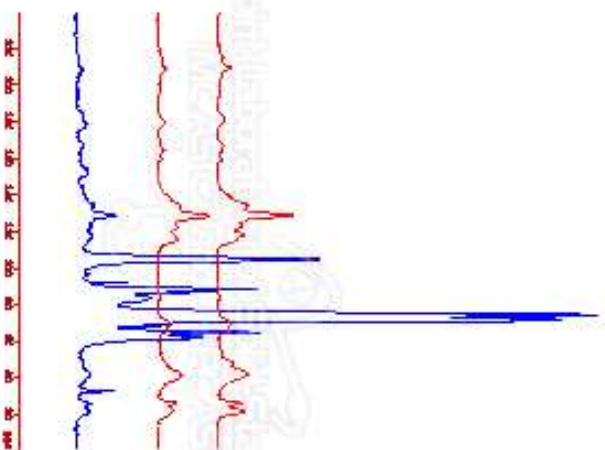
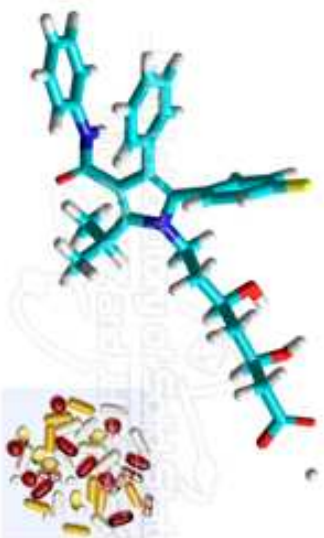
- **Average fluctuation angle** of disordered fractions determined using rotational diffusion model: $\theta = 30\text{-}40^\circ$

- **Upper bound of Gibbs energy** of the transition Form I \leftrightarrow Form II calculated from the order parameters (i.e. increase in conformation entropy at given temperature, stabilization energy):

$$\Delta G = -kT \sum_i \ln \left(\frac{1 - S_{ni}^2}{1 - S_{ni}^1} \right)$$

$$\Delta G = -6.7 \text{ kJ/mol}$$

Atorvastatin: poly(a)morfismus a lékové formy



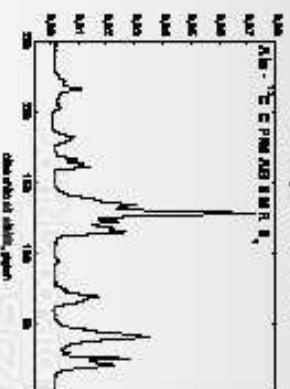
Atorvastatin: poly(a)morfismus a lékové formy

Faktorová analýza

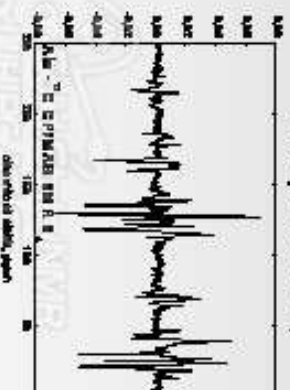
$$Y_i = \sum_{j=1}^n w_j V_{ij} S_j$$

Factor analysis is a mathematical method which can help us to describe large data series by a single or small amount of factors (parameters). The factor analysis enables us to independently characterize each original series of spectra by the orthogonal base. The orthogonal base is composed from the set of so-called "subspectra" S_j . The statistical importance of each spectrum is expressed by the set of singular numbers w_j ; the relative presence of the subspectrum S_j in the experimental spectrum Y_i is specified by the coefficients V_{ij} . The experimental spectrum Y_i is then given by the expression...

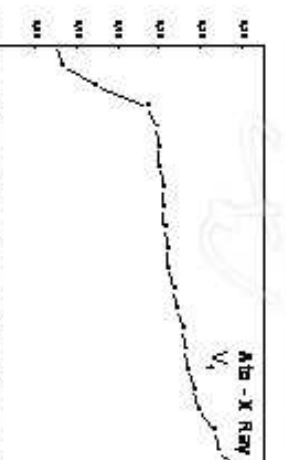
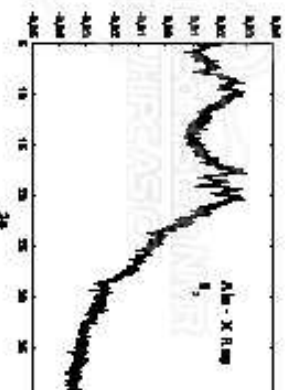
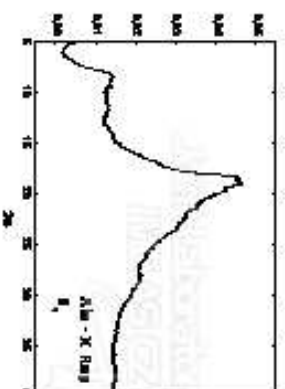
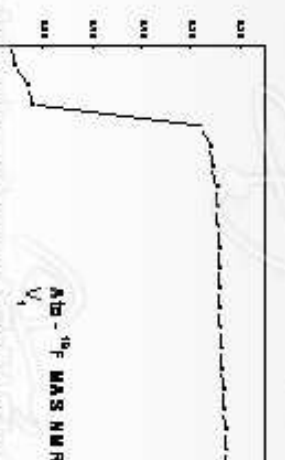
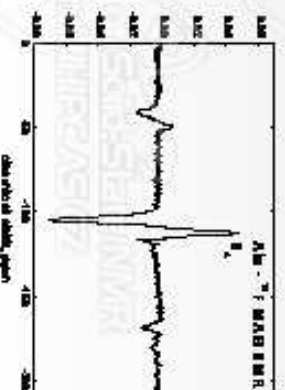
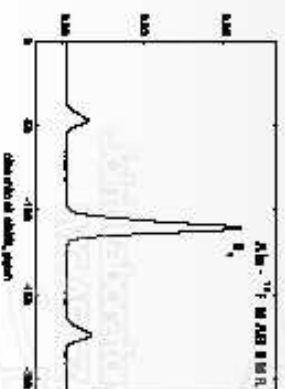
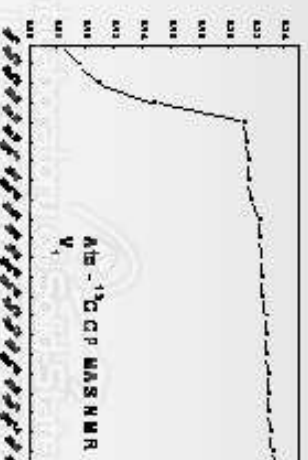
Subspektrum S_1



Subspektrum S_4



Relativní váha subspektra S_{1V} experimentálním spektru



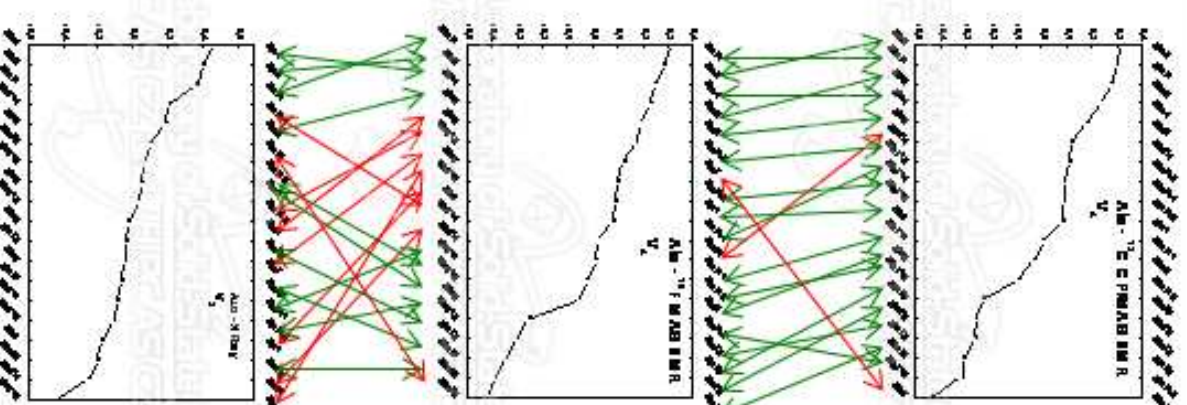
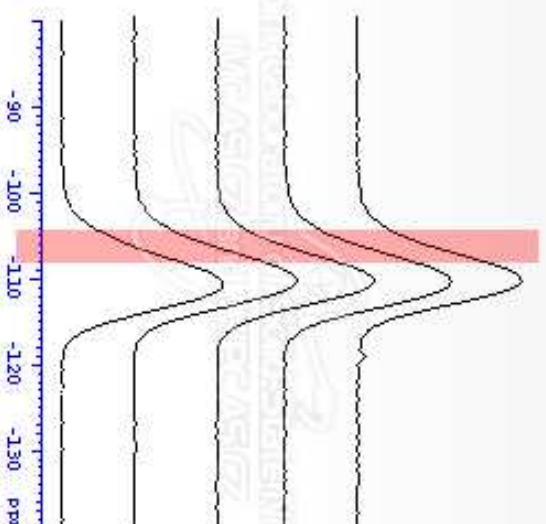
Atorvastatin: poly(a)morfismus a lékové formy

Faktorová analýza

- On the basis of the large database of ^{13}C and ^{19}F NMR spectra the factor analysis can be used to analyze rapidly acquired ^{19}F NMR spectra to predict ^{13}C CP/MAS NMR spectra of disordered forms of atorvastatin. In this way almost featureless ^{19}F NMR spectra provide site-specific structural information (location of sites in molecule of atorvastatin that are changed).

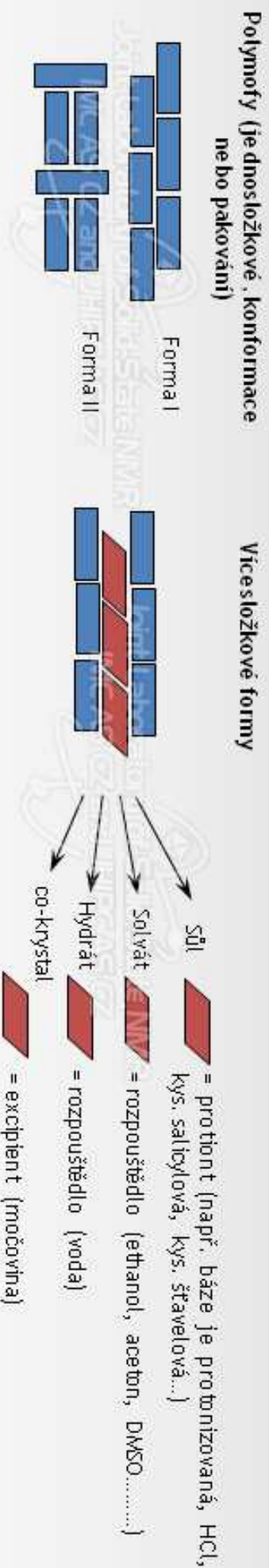
- The main success was that the correlation between the spectra ^{13}C and ^{19}F of amorphous sample was found in the result of factor analysis. The behavior of changes described by the subspectrum S4 of the ^{13}C CP/MAS NMR series and ^{19}F MAS NMR are in a good agreement. This correlation is outlined by the green (good) and red (poor) arrows between the graphs of reordered scores V4.

- The crucial subspectrum S4 indicates which sites in molecule are most strongly influenced by these changes and the structural nuances of semicrystalline polymorphs can be determined.



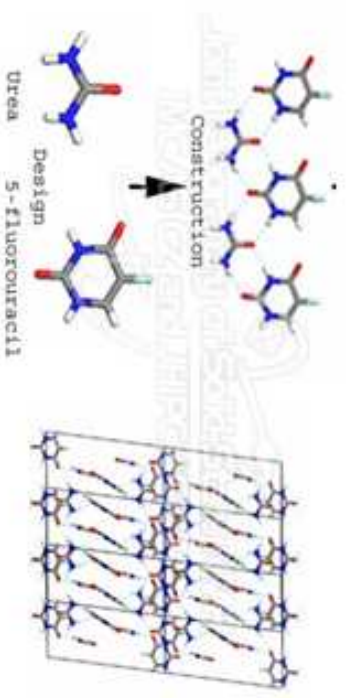
Sůl nebo co-krytal? (Patentové spory?)

Klasifikace různých krystalových forem



Co-krytal a jeho typická příprava

Močovina a 5-fluorouracil.



Co-krytal nebo sůl anebo co-krytal sůl?

Theophylline a kyselina salicylová.

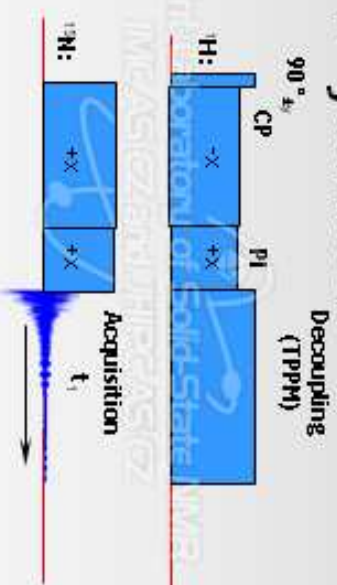


Z hlediska patentové ochrany mohou být již všechny sole patentovány. Z chemického hlediska souvisí s mírou protonizace dusíkového atomu.

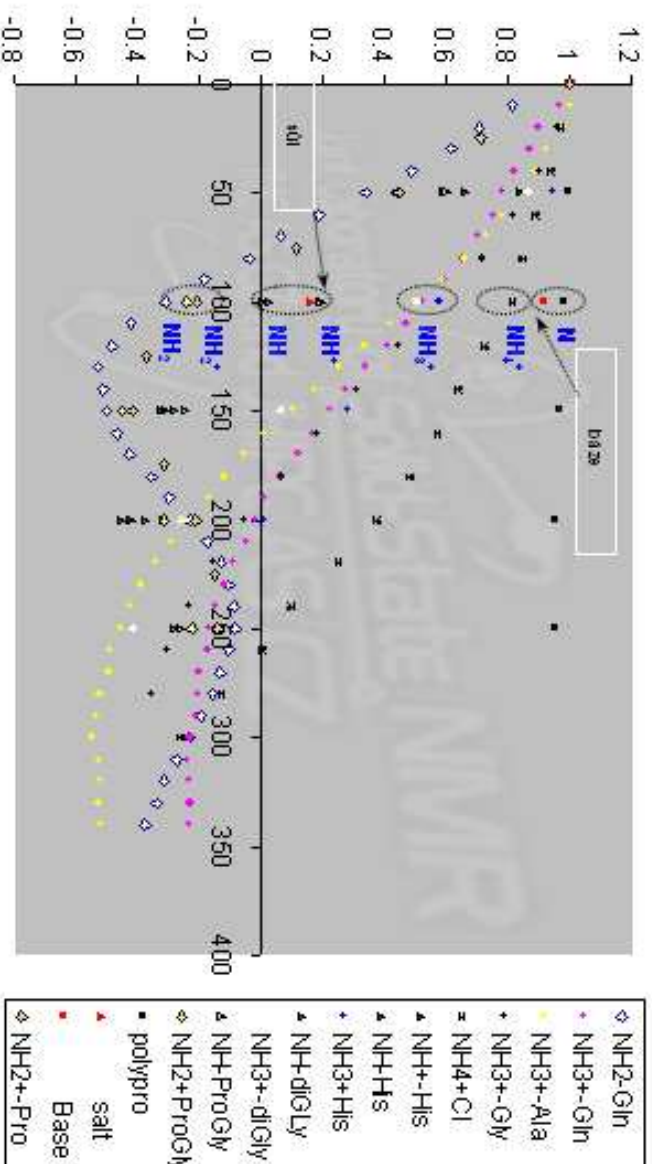
Sůl nebo co-kryystal?

¹⁵N CPP/PI/MAS NMR - identifikace -N- jednotek

- Předpoklad I: experiment umožní rozlišit dusíkové atomy podle počtu blízkých vodíkových atomů, a to buď vázaných klasickou kovalentní vazbou nebo vazbou vodíkovou skrze volný elektronový pár.



Závislost intenzity ¹⁵N NMR signálu na délce PI periody

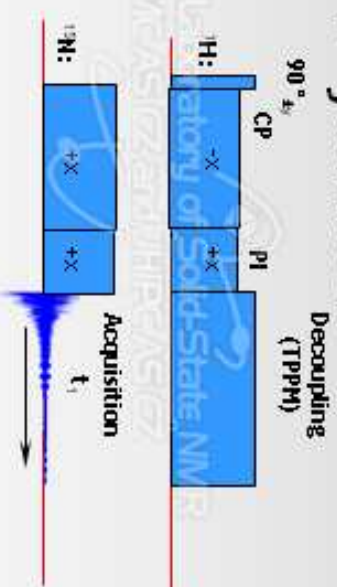


- Experiment je založen na faktu, že lze invertovat polarizaci dusíku ¹⁵N, který má ve svém okolí H atomy.
 - Magnetizaci neprotontizovaných N nelze invertovat
 - Skupiny NH₃⁺ či NH₄⁺ snadno rotují - omezenou inverze polarizace
 - U skupin NH₂ či NH₂⁺: rychlá inverze
 - Zatímco u skupin NH či NH⁺ je tato schopnost poněkud oslabena
 - His a His.HCl (NH 104 pm, NH⁺ 108pm)
- předpoklad II.; lze nalézt podmínky, kdy bude možné jednotlivé skupiny snadno, rychle a spolehlivě rozlišit při minimální spotřebě experimentálního času

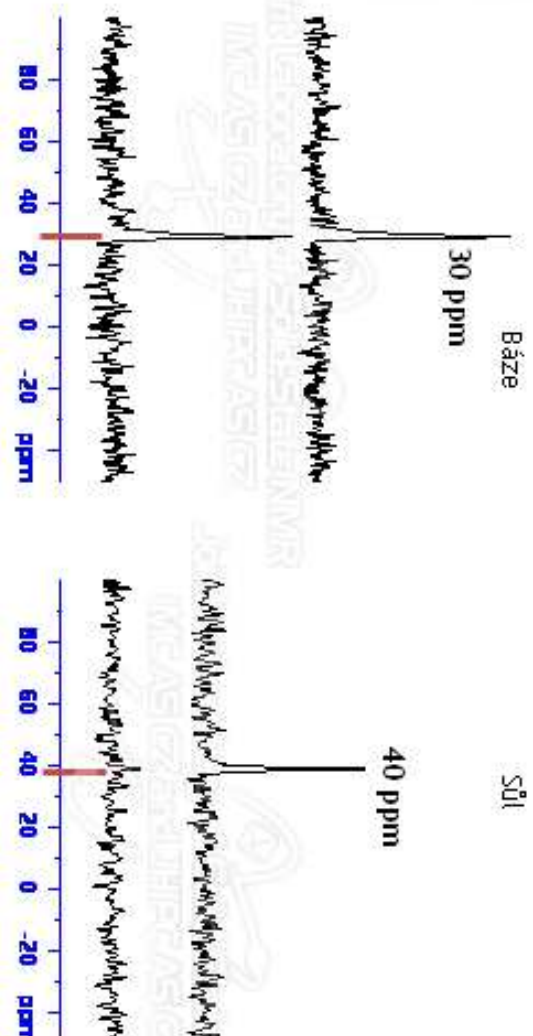
Sůl nebo co-kryystal?

^{15}N CPPI/MAS NMR - identifikace -N- jednotek

- Předpoklad I: experiment umožní rozlišit dusíkové atomy podle počtu blízkých vodíkových atomů, a to buď vázaných klasickou kovalentní vazbou nebo vazbou vodíkovou skrze volný elektronový pár.



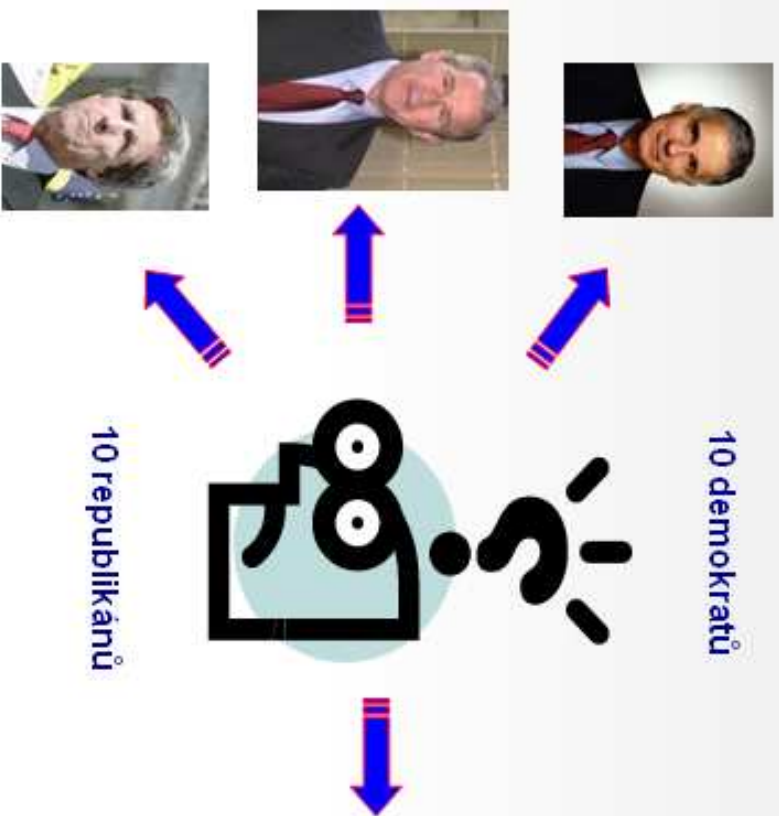
Závislost intezity ^{15}N NMR signálu na délce PI periody



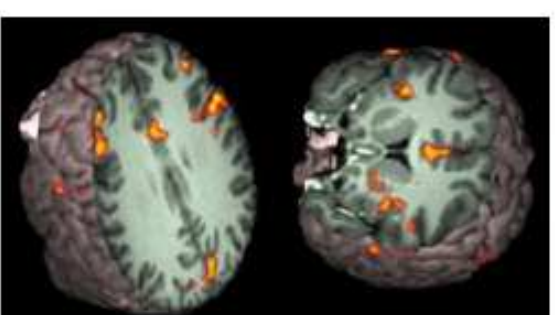
- Experiment je založen na faktu, že lze invertovat polarizaci dusíku ^{15}N , který má ve svém okolí H atomy:
 - Magnetizaci neprotonizovaných N nelze invertovat
 - Skupiny NH_3^+ či NH_4^+ snadno rotují - omezenou inverze polarizace
 - U skupin NH_2 či NH_2^+ : rychlá inverze
 - Zatímco u skupin NH či NH^+ je tato schopnost poněkud oslabena
- Předpoklad II.; lze nalézt podmínky, kdy bude možné jednotlivé skupiny snadno, rychle a spolehlivě rozlišit při minimální spotřebě experimentálního času

Funkční NMR

Jonas T. Kaplan, Joshua Freedman and Marco Jacoboni,
Us versus them: Political attitudes and party affiliation influence neural response to faces of presidential candidates, *Neuropsychologia* (2006)



Aktivace části mozku zvýší průtok krve. Potřeba kyslíku se projevív vyšším obsahem oxyhemoglobinu a poklesem deoxyhemoglobinu (paramagnetický). Aktivovaná místa mají silnější signál - svítí více než místa deaktivovaná.
Nárůst intenzity je ale jen 1-5 %.



It might be suggested that personal opinions about these individual politicians rather than their actual political persuasion might also influence activity in the brain. However, it is probably best to keep out of any political office that has its own MRI machine, especially if you're not one of us.

Martina Urbanová
Tereza Sombati
Jiri Czernek



Alexandr Jegorov

Bohumil Kratochvíl
Jaroslav Malixner
Michal Hušák



Coworkers:

Acknowledgement

Grant IAA400500602, GA AS CR, 2006-2010

Grant 2B08021, MŠMT, 2008-2011

Sponsors:

contacts:

brus@imc.cas.cz

+420 296 809 380

+420 296 809 378

+420 296 809 377

<http://www.imc.cas.cz/nmr/>

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMC AS CZ and JHPC AS CZ

