Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině chemických věd

Příspěvek k poznání polymorfie farmaceutických substancí

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru anorganická chemie

Bohumil Kratochvíl

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Praha, duben 2004

Obsah

1. Úvod 3
2. Polymorfie ve farmacii - současný stav problematiky 6
3. Proč tato disertace vznikla a její cíle 8 4.
Příspěvek Ústavu chemie pevných látek na VŠCHT Praha k řešení
problému polymorfie 9
4.1. Polymorfie námelových alkaloidů 10
4.1.1. Nepeptidické námelové alkaloidy
13
4.1.2. Peptidické námelové alkaloidy 19
4.2. Polymorfie cyklosporinů 24
5. Závěry pro realizaci v praxi a další rozvoj vědy 32
6. Použitá literatura 33
Souhrn tezí disertace 37
Abstract 39

1. Úvod

Pojem polymorfie resp. polymorfismus (z řeckého: *polys* = mnohý, *morf* = tvar) použil poprvé, v krystalografické souvislosti, Mitscherlich [1] v roce 1822. Všiml si, že u některých arseničnanů a fosforečnanů může jedna sloučenina, určitého chemického složení, vykrystalovat ve více krystalových formách. O 10 let později byla polymorfie pozorována u první organické sloučeniny – benzamidu [2]. Původně byla polymorfie chápána jako krystalografická mnohotvarost jedné sloučeniny. Dnes víme, že krystalový habitus je projevem symetrie vnitřní struktury (i když tento vztah není jednoduchý) a proto polymorfii definujeme jako možnost určité molekuly, resp. vzorcové jednotky krystalovat ve více krystalových strukturách neboli polymorfech. Pokud jsou do struktury zabudovány i molekuly solventu (nejčastěji vody), hovoříme o solvátech (hydrátech) nebo jsou pro tyto formy používány i jiné pojmy - solvatomorfy, resp. pseudopolymorfy. I solváty však mohou být polymorfní.

Je rozdíl mezi relativně jednoduchými polymorfními (modifikačními) přeměnami v anorganických systémech a komplikovanými transformacemi v organických soustavách. Modifikační přechody, např. v jednoduchých anorganických binárních sloučeninách (oxidech, halogenidech, chalkogenidech), jsou vyvolány změnou teploty nebo tlaku a jsou dokonale reverzibilní. Anorganické sloučeniny vytváří většinou jen několik modifikací, zatímco počet organických polymorfů a solvátů od určité molekuly nezřídka přesahuje 10. Polymorfní přechody jsou zde často hysterezní, špatně definované a probíhají přes kapalnou fázi („solvent-mediated“). Právě o organických molekulách McCrone [3] v roce 1963 provokativně prohlásil, že „… každá molekula je potenciálně polymorfní, počet jejích polymorfů závisí pouze na množství peněz, času a energie, investovaných do jejího výzkumu“. Zdá se, že toto tvrzení platí dokonale, počty nově popsaných polymorfů a solvatomorfů rostou úměrně tomu, jak je studovaná molekula v centru pozornosti. S polymorfií a polymorfními přeměnami se setkáváme u řady látek (léčiva, keramika, barviva, pigmenty, výbušniny, palivová aditiva, katalyzátory, sladidla aj. – viz Tab.I) a tyto jevy musíme respektovat, protože polymorfy se liší v mnoha chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech. Na druhé straně však, u tak dlouho známých sloučenin, jakými jsou naftalen a sacharosa, polymorfie pozorována dosud nebyla. Rozumné vysvětlení zde chybí.

V posledních, zhruba 10 letech význam polymorfie vzrostl především ve farmacii, který ještě akceleroval po prvním velkém patentovém sporu firem Glaxo a Novopharm o substanci - ranitidin hydrochlorid, v roce 1995. Farmaceuticky aktivní substance (API - Active Pharmaceutical Ingredience) jsou často polymorfní. Jsou to, v drtivé většině,

organické molekuly vázané v krystalové struktuře slabými interakcemi, především vodíkovými vazbami, coulombickými silami, van der Waalsovými silami (VdW) a π-π interakcemi.

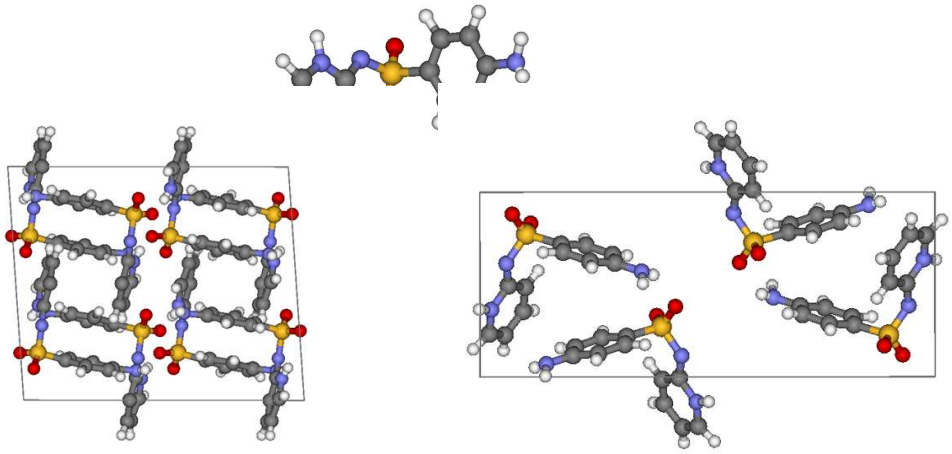
Tabulka I. Příklady polymorfie a solvatomorfie

Látka	Poly(Solvato)morfy: názvy, symetrie nebo počet	Aplikace
Uhličitan vápenatý	kalcit,aragonit,vaterit	plnivo do plastů
Oxid zirkoničitý	monoklinický, tetragonální, kubický	keramika
Oxid titaničitý	rutil, anatas, brookit	pigment,katalyzátor
Dusičnan amonný	5	výbušnina, hnojivo
Chlorid titanitý	4	katalyzátor
Tetraethylplumbum	6	palivové aditivum
Sorbitol	2	sladidlo
Aspirin	4	léčivo
Atorvastatin	přes 25 pevných forem	léčivo
Sulfathiazol	okolo 120 pevných forem	léčivo

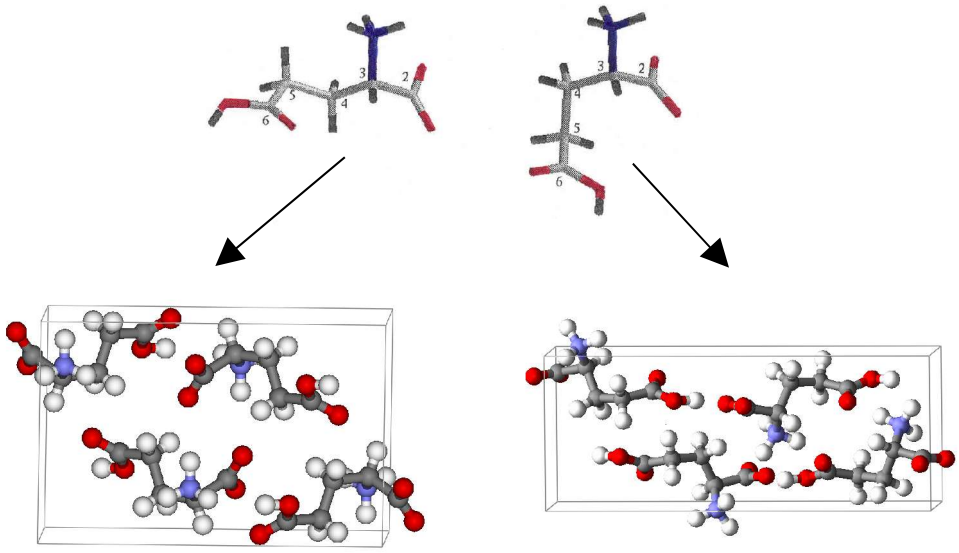
Rozeznáváme dva základní typy polymorfie: pakovací a konformační. Pakovací polymorfie znamená, že molekula je rigidní a polymorfy se liší pouze jejím pakováním v krystalové struktuře. Konformační polymorfie vzniká tehdy, když je molekula flexibilní a tvoří konformery, které odlišně krystalují. V praxi se setkáváme jak s čistou pakovací nebo konformační polymorfií, tak se smíšenými typy (obr.1,2).

Ačkoliv je biologický účinek aktivní substance vyvolán interakcí molekuly léčiva s cílovým receptorem (farmakodynamika), je velmi důležité v jaké pevné formě je aktivní substance pacientovi podávána (farmakokinetika). To znamená, že ve farmacii záleží nejenom na molekulové, ale i krystalové struktuře aktivní substance, z které vyplývají její vlastnosti.

Problémy spojené s polymorfií a solvatomorfií aktivních substancí jsou v centru pozornosti výrobců léčiv. Ve farmaceutické výrobní praxi je zvykem hovořit o pevných formách, příp. fázích. Tím jsou míněny nejen krystalické polymorfy, ale i amorfní formy (amorfáty) a také různé krystalické hydráty nebo solváty. Snahou etické farmaceutické firmy (originálního výrobce), která vyvinula určitou aktivní substanci, je patentově ochránit všechny její možné formy. S tím souvisí také validace vhodné



Obr. 1. Molekula sulfapyridinu a její dva pakovací polymorfy (z celkových 6 popsaných)



Obr.2. Dva rotamery L-glutamové kyseliny a odpovídající konformační polymorfy

analytické metodiky, která je schopna všechny pevné formy studované molekuly jednoznačně charakterizovat, rozlišit a stanovit. To je nutné nejenom pro stanovení fázové (polymorfní, solvatomorfní) čistoty zvolené formy při výrobě, ale také při patentových sporech etických a generických firem (dalších výrobců). Generické firmy jsou vůči originálnímu výrobci v pozici, kdy před vypršením patentové ochrany hledají jiný polymorf (solvatomorf), který musí být bioekvivalentní s originálem.

2. Polymorfie ve farmacii - současný stav problematiky

V souvislosti s existencí polymorfie a jejím nutným respektováním musí každý farmaceutický výrobce řešit následující otázky:

- Jaká je frekvence výskytu polymorfů (solvatomorfů) u určité, farmaceuticky zajímavé, molekuly?
- Lze polymorfii teoreticky předpovědět?
- Jak připravit zvolený polymorf dostatečně masivní, kontrolovanou a reprodukovatelnou technologií?
- Jaké jsou podobnosti a rozdíly ve vlastnostech jednotlivých polymorfů od určité molekuly? Neohrozí záměna polymorfu zdraví pacienta?
- Jaké, dostatečně citlivé a validované analytické techniky se hodí k identifikaci, rozlišení a stanovení polymorfů?

Odpovědi na tyto otázky jsou následující:

- Jak uvedla ve své prezentaci Tomková [4], výsledky ze 150 „screeningových" studií ukázaly, že 87 % aktivních substancí se vyskytuje ve více než jedné formě (51 % existuje ve více než jednom polymorfu, 39 % se vyskytuje i v amorfní formě, 37 % tvoří hydráty a 31 % solváty). To znamená, že polymorfie (solvatomorfie) je častým jevem u pevných farmaceutik a každý farmaceutický výrobce musí provádět průběžný „screening" a rešerši na polymorfii (solvatomorfii) svých aktivních substancí.

- V současné době není možná vyčerpávající predikce polymorfie opřená o teoretické studie. Při výpočtu krystalového pakování molekul nelze zahrnout přesný popis periodického potenciálu a jsou problémy s výpočtem entropického členu. Chyby při výpočtech energií jednotlivých polymorfů často přesahují energetické rozdíly mezi nimi. V některých případech je možná pouze dílčí predikce, která uvažuje pouze polymorfii a ne celou škálu krystalizace možných solvátů. Příkladem dílčího úspěchu je předpověď existence třetího polymorfu paracetamolu a jeho následné experimentální potvrzení [5]. Problém polymorfie a její neobhajitelné predikce v patentových sporech farmaceutických firem rozebral ve své prezentaci Lee [6].
- O tom, jaký polymorf vykrystalizuje se rozhoduje v prenukleačním stadiu, tedy u molekulárních klastrů (agregátů), na základě kompetice kinetických a termodynamických faktorů. Těchto faktorů je celá řada a jejich dodržení vyžaduje

přísnou technologickou kázeň při výrobě. Většinou se zvolený polymorf daří reprodukovatelně a robustně vyrábět i když jsou známé případy, kdy z ne zcela zřejmých důvodů vykrystaluje v některé šarži polymorf jiný. Nezvládnutí této situace může vést až k zastavení výroby a přechodu na kapalnou formu. Příkladem je ritonavir (inhibitor HIV-proteasy), léková forma Norvir®, vyráběný firmou Abbott Laboratories [7].

- Polymorfy a solvatomorfy jedné aktivní substance se liší svojí krystalovou strukturou, která determinuje jejich vlastnosti, které jsou tudíž obecně rozdílné. Nejdůležitější vlastností je bezesporu rozpustnost a rozpouštěcí rychlost (disoluční profil). Právě velké rozdíly v rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti polymorfů mohou být příčinou velkých rozdílů v jejich distribuci v organismu. Ačkoliv zatím není známo, že by podcenění, resp. zanedbání rozdílných vlastností polymorfů způsobilo neštěstí podobné „conterganové aféře“ v 50.letech 20. století (plodové malformace způsobené záměnou enantiomeru), musí farmaceutické firmy splnit dokumentační kritéria státních autorit pro schvalování a kontrolu léčiv (např. SÚKL, FDA), aby nedostaly se do patentových kolizí a uspěly v licenčním řízení při prodeji svých produktů.

- Analytické techniky k rozlišení a stanovení polymorfů jsou dány příslušnými směrnicemi státních autorit. Podle uznávané směrnice FDA ICH Q6A-decision trees [8] k nim patří:

- RTG prášková (fázová) analýza
- Spektroskopie pevného stavu (NMR, IČ, Ramanova)
- Termální analýza (TGA, DSC, mikrokalorimetrie)
- Mikroskopie (optická, termooptická, SEM, AFM)
- Mikrometrie (granulometrie, povrch částic, porozita, hustota)
- Stanovení rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti
- Sorpce/desorpce vlhkosti

Samozřejmě, je uznávána i RTG strukturní analýza z monokrystalu, ovšem primárním produktem farmaceutické výroby je polykrystalický prášek o zrnitosti 10-50 μm, který je vstupním materiálem pro ostatní uvedené techniky. K rutinní RTG strukturní analýze

však potřebujeme monokrystal o velikosti řádově 0,1mm (výjimečně 0,01mm). Vypěstování monokrystalu od určitého polymorfu může být někdy problém.

Celkový přehled etap řešení problémů spojených s polymorfií ve farmaceutickém průmyslu je uveden v Tab. II.

Tabulka II. Etapy vývoje vhodného polymorfu ve farmaceutickém průmyslu

Fáze vývoje	Cíle
Časná	1. Sklon k tvorbě různých krystalových forem u dané substance 2. Vyhledání stabilních forem 3. Vyhledání stabilních hydrátů
Vytvoření celkového přehledu	1. Popis nejstabilnější formy 2. Popis nejstabilnějšího hydrátu 3. Komplexní popis ostatních forem
Cílená	Příprava vybrané formy v technologickém měřítku s dodržením podmínek správné výrobní praxe
Komplexní řešení	1. Detailní popis nejstabilnější formy z různých aspektů 2. Posouzení vhodnosti a výhodnosti pro lékovou formu 3. Vyhledávání patentově nechráněných forem 4. Patentová ochrana všech forem

3. Proč tato dizertace vznikla a její cíle

Můj zájem o fenomén polymorfismu iniciovala firma Galena (potom Ivax CZ a dnes Ivax Pharmaceuticals), která byla nucena tento problém řešit v souvislosti se svým produktem terguridem při jeho prodeji do zahraničí v roce 1989. Vzhledem k tomu, že naše pracoviště již tehdy disponovalo relevantní RTG difrakční analytickou technikou a kvalifikací získanou řešením fázových a strukturních problémů anorganických i organických sloučenin na VŠCHT Praha, PřF UK Praha a jinde, byla uzavřena vzájemně prospěšná spolupráce, která trvá dodnes. Naše zkušenosti získané při studiu polymorfie využily později i další farmaceutické firmy, především Léčiva (dnes Zentiva).

Dosažené výsledky mají bezprostřední praktický význam a jsou cíleny na vyřešení určitého dílčího problému při vývoji generika. I když je třeba pochopitelně respektovat určitý a dočasný stupeň utajení při prezentaci výsledků, lze studovanou problematiku rozvíjet nekonfliktním akademickým směrem, takže polymorfismus a solvatomorfismus

farmaceuticky zajímavých sloučenin byl a je námětem několika našich grantových projektů, řady diplomových a doktorských prací a vědeckých sdělení na konferencích a v odborném tisku. Na jedné straně je v zájmu farmaceutických firem, aby pozornost věnovaná jejich produktům měla odpovídající vědeckou prestiž a na straně druhé akademická pracoviště tak získávají zajímavou a prakticky realizovatelnou tématiku výzkumu.

4. Příspěvek Ústavu chemie pevných látek na VŠCHT v Praze k řešení problému polymorfie

Polymorfismus farmaceutických substancí je složitý problém a jeho komplexní řešení vyžaduje nasazení značné výzkumné kapacity. Např. na řešení polymorfie, již zmíněného, ritonaviru nasadila firma Abbott Laboratories celkem 600 lidí, po dobu zhruba jednoho roku a přesto nedospěla k jasnému výsledku. Menší pracoviště, zabývající se problematikou polymorfie, se spíše zaměřují na řešení dílčích problémů. Můj příspěvek a příspěvek mých spolupracovníků na Ústavu chemie pevných látek VŠCHT Praha k problematice polymorfie je také dílčí a spočívá především v monitorování polymorfie vybraných substancí metodou RTG fázové a strukturní analýzy a v rozvoji této metodiky pro farmaceutické firmy působící v ČR (nově: řešení krystalových struktur substancí z RTG práškových dat). Výsledky našich studií jsou aplikovány pro sledování molekulárního pakování polymorfů, dále pro výzkum flexibility/rigidity biologicky aktivních molekul, v modelování kavit v krystalových strukturách substancí a ve studiu jejich zaplnění molekulami solventů, ve vývoji specializovaného krystalografického software, v modelování interakcí některých substancí s receptory, ve vybraných krystalizacích a v mikroskopických pozorováních.
Během 15 let výzkumu polymorfie byly v naší RTG laboratoři studovány tyto skupiny biologicky aktivních substancí:

- **Námelové alkaloidy** (tergurid, lisurid, cabergolin, metergolin, nicergolin, pergolid, bromokryptin, ergotamin, dihydroergotamin, hydroxyergotamin, deoxodihydroergotamin, ergometrin, ergocristin, dihydroergocristin, ergocristam, dihydroergocristam, ergokryptin, dihydroergokryptin, hydroxyergokryptin, ergokryptinin, ergocornin, dihydroergocornin, ergotoxin, dihydroergotoxin, erginin, hydroxyerginin, ergogalin, ergoladinin)
- **Imunosupresiva** (cyklosporiny A, E, H,V, dihydrocyklosporin A, acetylcyklosporin

A, acetylbromcyklosporin A, mykofenolát mofetil, mykofenolová kyselina, FK-506 (tacrolimus))

- **Morfinany a jejich intermediáty** (buprenorfin, butorfanol, dehydrobutorfanol, cykloamin, dehydrocykloamin, diol, triol, naloxon, naltrexon)
- **Statiny** (simvastatin, atorvastatin)
- **Flavanolignany** (silymarin, silybinin)
- **Další aktivní substance** (ranitidin hydrochlorid, taxol, flobufen, alprazolam, meloxicam, terazosin, praezosin, galmarin, ganciclovir, sertralin hydrochlorid, nystatin, valsartan, clopidogrel aj.)
- **Neaktivní složky (excipienty) lékových forem** (manitol)

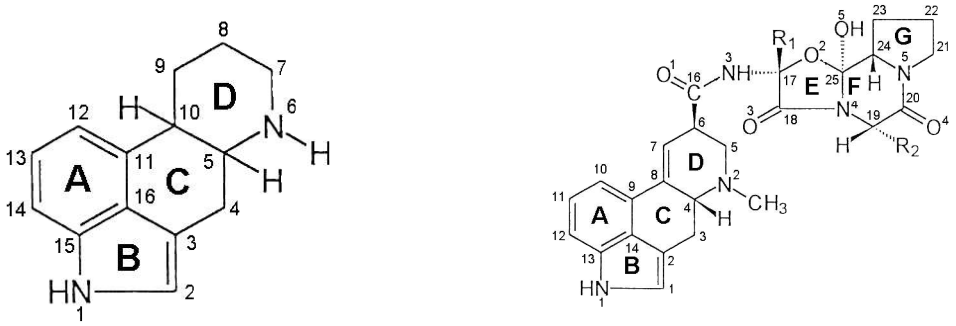
Tyto substance byly, až na výjimky, syntetizovány ve farmaceutických firmách a většina z nich má terapeutické použití. Nejvíce byla z uvedeného souboru prostudována polymorfie námelových alkaloidů a cyklosporinů a proto je dále demonstrována na vybraných substancích z těchto skupin farmaceutik.

4.1. Polymorfie námelových alkaloidů

Přírodních námelových alkaloidů je popsáno více než 80 a jejich semisyntetických derivátů okolo 300. Většina z nich vykazuje výraznou biologickou aktivitu. Zjednodušeně je lze rozdělit na nepeptidické a peptidické. Nepeptidické alkaloidy zahrnují klaviny a deriváty kyseliny lysergové, peptidické alkaloidy tvoří majoritně ergopeptiny, minoritně ergopeptamy (biologicky neaktivní). Hydrogenací dvojné vazby C7 = C8 u přirozených ergopeptinů se syntetizují jejich deriváty – dihydroergopeptiny. Změnou konfigurace na C6 u přírodních ergopeptinů vznikají biologicky neaktivní ergopeptininy (deriváty isolysergové kyseliny).

Historicky vzniklé číslování atomů nepeptidických a peptidických námelových alkaloidů není bohužel zcela analogické (obr.3). Pro drtivou většinu z nich je charakteristický tetracyklický ergolinový (resp. ergolenový) skelet, tvořený kruhy A, B, C, D. Peptidické alkaloidy obsahují navíc tripeptidickou skupinu, vázanou k ergolinu (ergolenu) resp. k lysergové kyselině amidickou vazbou. U běžných přírodních ergopeptinů má tripeptid v pozici 1.aminokyseliny: alanin, L-aminomáselnou kyselinu nebo valin, v pozici 2. aminokyseliny: fenylalanin, valin, leucin nebo isoleucin a v pozici 3. aminokyseliny: prolin nebo alanin. Zbytky těchto tří aminokyselin vytváří v ergopeptinech kruhy E, F, G (tzv. cyklol), u ergopeptamů není kruh E uzavřen. Ergopeptiny jsou syntetizovány námelem (*Claviceps*) extraribozomálně pomocí

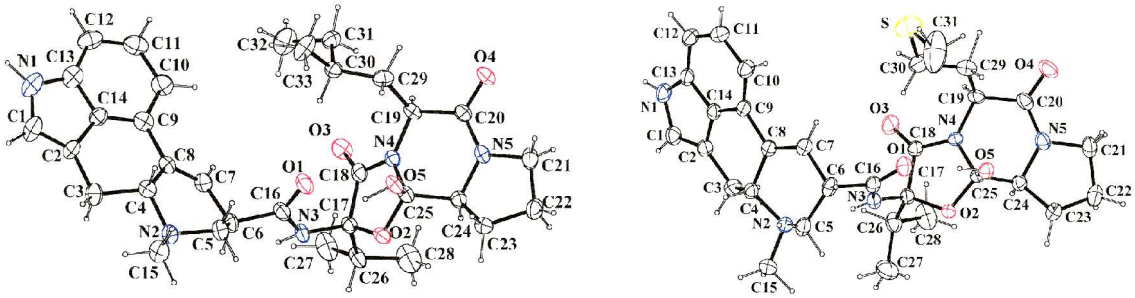
multienzymatického systému. Díky nižší specifitě tohoto typu biosyntézy, ve srovnání s transkribcí, byly v nedávné době izolovány další minoritní námelové alkaloidy obsahující některé další aminokyseliny v pozici 2., např. norleucin, homoisoleucin nebo methionin. Z hlediska farmakodynamiky námelových alkaloidů je důležitá konformace kruhů, konfigurace na chiralitních centrech a příp. také orientace a konformace postranních řetězců. Indolová část ergolinu (resp. ergolenu) tvořená kruhy A a B je vždy planární. Kruh C (nepeptidické alkaloidy: C3-C4-C5-C10-C11-C16; peptidické alkaloidy: C2-C3-C4-C8-C9-C14) je mírně zprohýbán, přičemž toto prohnutí může být zdůrazněno substitucí OH skupiny na C6 (hydroxyergopeptiny), kdy dojde k vytvoření intramolekulární H-vazby s N3 a pootočení rigidní části C4-C8-C7-C6. Podobný efekt má i další možná intramolekulární H-vazba: N3H…N2. Nejdůležitější je konformace kruhu D (nepeptidické alkaloidy: N6-C5-C10-C9-C8-C7; peptidické alkaloidy: N2-C4-



Obr.3. Vlevo: číslování ergolinového skeletu a značení kruhů (skelet obsahující dvojnou vazbu v poloze 8,9 je $\Delta^{8,9}$-ergolen a v poloze 9,10 $\Delta^{9,10}$-ergolen). Vpravo: číslování ergopeptinů a značení kruhů (R_1 = methyl, ethyl, isopropyl; R_2 = benzyl, isopropyl, isobutyl, *sec*-butyl)

C8-C7-C6-C5), který je nejvíce flexibilní. U peptidických alkaloidů rozlišujeme tři možné konformace kruhu D. U přírodních ergopeptinů majících dvojnou vazbu v poloze 9,10 jsou možné formy E „flap-up“ forma I a CB „flap-down“ forma II; u dihydroergopeptinů má kruh D pouze jedinou možnou konformaci označovanou jako „DHE“. Konformace E „flap-up“ postavení může ještě existovat s pseudoequatoriální amidickou skupinou (přírodní ergopeptiny) nebo s pseudoaxiální amidickou skupinou (ergopeptininy), viz obr. 26. Kruh E (ergopeptiny: C17-C18-N4-C25-O2) je vždy téměř planární, kruhy F (N4-C19-C20-N5-C24-C25) a G (N5-C21-C22-C23-C24) mají většinou konformaci obálky, někdy jsou mírně distortované. U ergopeptinů je G kruh tvořen L-prolinem, u ergopeptamů D-prolinem.

Ergolinový skelet obsahuje tři chiralitní centra na C5, C8, C10 (resp. C4, C6, C8), cyklol čtyři chiralitní centra na C17, C19, C24 a C25. Stereochemie námelových alkaloidů vychází z biosyntetického prekurzoru L-tryptofanu a proto je přirozená chiralita C5(R) resp. C4(R). Aktivní substance používané v terapii tuto absolutní konfiguraci vesměs zachovávají. V literatuře je popsáno relativně málo syntetických modifikací přírodního ergolinového tripeptidu. V naší Laboratoři byly vyřešeny struktury nově izolovaných přírodních námelových alkaloidů – ergogalinu [V1] (zde byla v 2. pozici prokázána přítomnost aminokyseliny L,L-homoisoleucinu a tato struktura je dosud první, která obsahuje tuto aminokyselinu) a ergoladininu [V2] (v 2. pozici byl prokázán methionin, obr.4).



Obr.4. Ergogalin (vlevo) a ergoladinin (vpravo)

Cílovými makromolekulami námelových alkaloidů jsou neuroreceptory serotoninového, dopaminového a noradrenalinového typu spřažené s G-proteinem [9]. Námelové alkaloidy se však na tyto neuroreceptory neváží specificky, ale často smíšeně, takže se mohou projevovat jako agonisté, částeční agonisté nebo antagonisté zároveň na více receptorech. Semisyntetické modifikace přírodních námelových alkaloidů jsou vedeny právě snahou o zvýšení biologické aktivity a dosažení větší specificity účinku. Námelové alkaloidy obsahují ve svém základním skeletu a v substituovaných postranních řetězcích řadu možných protonových donorů i akceptorů (především O a N). Vzhledem k tomu, že protonový donor může být současně i akceptorem a to i vícenásobným, vytváří se velká variabilita možných intermolekulárních H-můstků. Samozřejmě případná hydratace (solvatace) tuto variabilititu dále rozšiřuje. Indolový skelet v ergolinu (ergolenu) může interagovat prostřednictvím π-π vazeb s aromatickými solventy (např. v benzen solvátech) a podobný typ interakce se může uplatňovat i při interakci s receptory. Kromě toho se u námelových alkaloidů výrazně uplatní i VdW vazba, která je nesměrová a nenasytitelná. Všechny tyto interakce se mohou podílet na

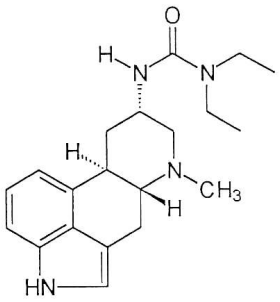
rozmanitém molekulárním pakování námelových alkaloidů, takže počet možných polymorfů a především solvatomorfů je zde vysoký.

K identifikaci a stanovení polymorfních a solvatomorfních směsí a monitorování fázových přechodů byly použity především RTG strukturní a fázová analýza, dále IČ spektroskopie a studium tepelného rozkladu (TG, DTA, DSC). Pro studium konformace molekul v roztoku byla využita NMR spektroskopie, pro identifikaci nových derivátů MS spektroskopie a pro stanovení relativní konfigurace CD spektroskopie. Závislosti totální energie na torzních úhlech byly počítány jak semiempirickými, tak i *ab initio* kvantově-mechanickými metodami.

Pro ilustraci polymorfního (solvatomorfního) chování byly z nepeptidických námelových alakaloidů vybrány: tergurid, lisurid, nicergolin a cabergolin; a z peptidických: dihydroergotamin a 4 složky dihydroergotoxinu, především ve formě jejich mesylátů. Souhrnná diskuse je věnována především molekulárnímu pakování jejich polymorfů a solvatomorfů.

4.1.1. Nepeptidické námelové alkaloidy

U **terguridu** je terapeuticky používaný isomer 5*R*,8*S*,10*R*, zkráceně nazývaný

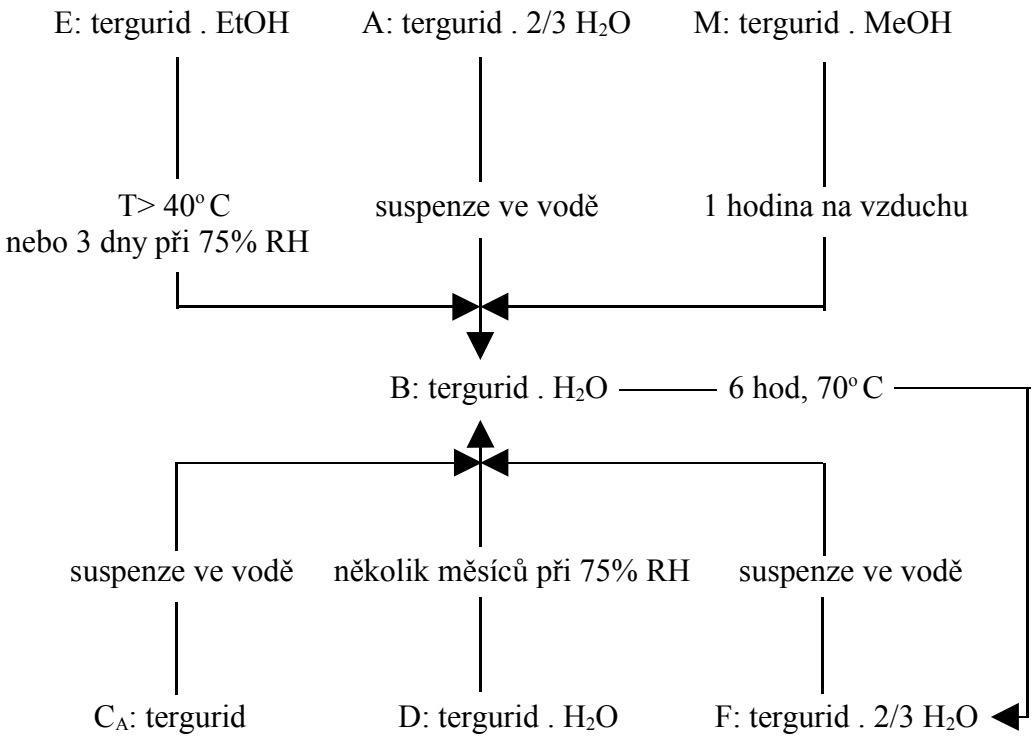


Obr.5. Tergurid

trans-D-tergurid podle postavení vodíků H5 a H10 (obr.5). V naší Laboratoři byla též stanovena struktura *cis*-D-terguridu [V4]. Polymorfie *trans*-D-terguridové (dále jen terguridové) molekuly zahrnuje 7 forem: dva monohydráty (označované B a D), dva dvoutřetinové hydráty (A a F), jednu bezvodou formu (C_A) a dva solváty: ethanol solvát a methanol solvát (E a M). Nejstabilnější formou je sice B, ale pro výrobu Teluronu® (Schering) se používá bezvodá forma C_A. Krystalizace bezvodé formy a jednotlivých hydrátů je velmi přísně podmíněna obsahem vody ve finálním rozpouštědle.

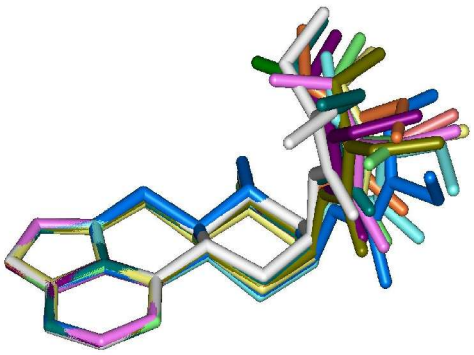
Methanol a ethanol solváty krystalují z příslušných bezvodých alkoholů. Transformační schéma je uvedeno na obr.6.

U forem A [V5], B [V6], C_A [V5] a M [V7] byly vypěstovány monokrystaly a v naší Laboratoři provedena jejich RTG strukturní analýza. Vyřešené krystalové struktury poskytly celkem 12 krystalograficky nezávislých molekul (obr. 7). Z jejich překryvu vyplývá, že fixní částí molekuly je ergolinový skelet, zatímco močovinový postranní



Obr.6. Transformační schéma terguridových forem (RH-relative humidity)

řetězec je flexibilní. To je ve shodě s kvantově-chemickým *ab-initio* výpočtem [viz V5].



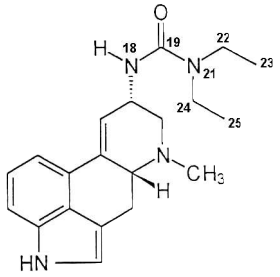
Obr.7. Překryv terguridových molekul

C_A, molekula 1 (světle červená)
C_A, molekula 2 v1[a] (tmavě zelená)
C_A, molekula 2 v2[a] (tmavě fialová)
C_A, molekula 3 (světle modrá)
C_A, molekula 4 (šedá)
A, molekula 1 (zlatá)
A, molekula 2 (modrozelená)
A, molekula 3 (světle fialová)
B, molekula 1 (žlutá)
B, molekula 2 (tmavě modrá)
M, molekula v1[a] (tmavě červená)
M, molekula v2 (světle zelená)

[a] v1 a v2 jsou disordrované molekuly

U **lisuridu** (obr.8) byly posány a vyřešeny struktury následujících forem [V9]: lisurid

bezvodý, lisurid monohydrát, lisurid ethanol solvát a lisurid methanol solvát. Krystalizace určité formy je podmíněna použitým rozpouštědlem. Bezvodá forma krystaluje primárně z acetonitrilu, monohydrát primárně z *tert*-butylmethyletheru. Bezvodá forma a monohydrát často koexistují, přičemž monohydrát vypadává při rychlé



Obr.8. (5*R*,8*S*) – lisurid („lisurid“)

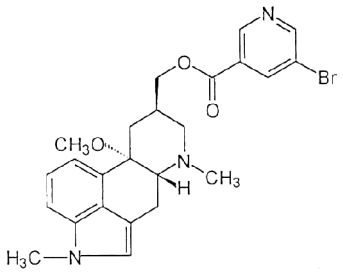
krystalizaci ze zředěných roztoků, zatímco bezvodá forma pomaleji krystaluje z přesycených roztoků. Monohydrát je nejstabilnější formou. Nejméně stabilní je methanol solvát, který desolvatuje při 95° C, desolvatace ethanol solvátu proběhne při 102° C. Podobně jako u terguridových alkoholových solvátů, je uvolněná molekula alkoholu substituována molekulovou vody ze vzdušné vlhkosti a vzniká monohydrát. Z řešení krystalových struktur lisuridových forem vyplynulo 5 krystalograficky nezávislých molekul. Podobně jako u terguridu je i zde fixní ergolenový skelet a flexibilní postranní močovinový řetězec.

Solvatomorfie bází **terguridu a lisuridu** je analogická. V obou případech byly popsány hydráty a analogické alkoholsolváty. Molekula lisuridu má však proti terguridu dvojnou vazbu C9 = C10 místo jednoduché a o dva atomy H méně - na C9 a C10 (ergolinový skelet u terguridu a $\Delta^{9,10}$-ergolenový skelet u lisuridu). Tato, relativně subtilní, chemická změna vede ke změně konformace kruhů C a D. U solvatomorfů lisuridu bylo nalezeno: E_3, resp. $E_3 - {}^2H_3$ pro C-kruh a ${}^6H_1$ resp. ${}^6H_1 - {}^6E$ pro D-kruh. U solvatomorfů terguridu: ${}^1E$ pro C-kruh a ${}^1C_4$ pro D-kruh. Rozdíly mezi oběma molekulami byly zjištěny též v konformaci postranního močovinového řetězce, jak plyne ze srovnání hodnot torzních úhlů C9-C8-N18-C19, C19-N21-C22-C23 a C19-N21-C24-C25 (viz obr. 8 a 13, lit. [V5, V9]). Konformační změny vedou k dimenzionálním změnám v molekule a jinému linkování H-vazeb.

Zajímavý rozdíl nacházíme u protonizovaných bází: tergurid hydrogenmaleát [V3] potřebuje k vykrystalování molekulu vody na jednu molekulu terguridu, lisurid hydrogenmaleát [V8] krystaluje bezvodý. Molekulární pakování lisuridu hydrogenmaleátu vytváří řetězce H-vazeb mezi kyslíky maleátu a dusíky ergolenu.

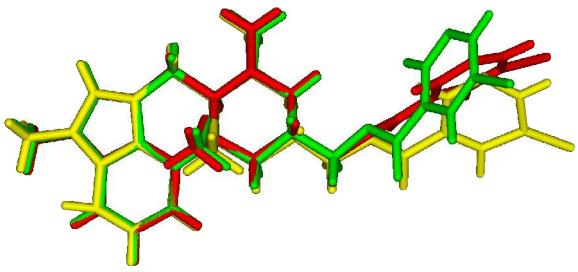
Interakce mezi řetězci je VdW povahy. U terguridu hydrogenmaleátu monohydrátu se vytváří podobné řetězce, které jsou navíc propojeny mezi sebou příčnými H-můstky mezi molekulami vody a kyslíkem močovinového řetězce na jedné straně a prvním dusíkem močovinového řetězce a kyslíkem maleátu na druhé straně.

Fabregas a Beneyto [10] popsali dva polymorfy **nicergolinu** (obr. 9) , značené I a II. Forma I (M.p. 409 K) krystaluje z polárních rozpouštědel (např. z ethanolu nebo methanolu), forma II (M.p. 397 K) z nepolárních rozpouštědel (např. z toluenu). Majoritně je vyráběna forma I, forma II je její nečistotou.



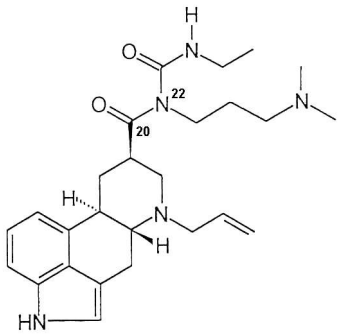
Obr.9. Nicergolin

Stanovení absolutních krystalových struktur [V10, V11] ukázalo, že chiralita obou forem je 5*R*, 8*R*, 10*S*. Krystalograficky nezávislé 3 molekuly (dvě u formy I a jedna u formy II) se tvarově liší především orientací bromonikotinového postranního řetězce (obr. 10). Je pozoruhodné, že popsané polymorfy nicergolinu jsou různě molekulárně pakovány pouze zásluhou VdW sil, H-vazby se zde neuplatní. U polymorfu I je nejbližší kontakt sousedních molekul 3,45(1), u polymorfu II 3,287(6) Å. Ke stanovení obou forem vedle sebe byla u modelových směsí testována Rietveldova metoda a metoda lineární regrese závislosti intenzita píku/koncentrace pro prášková RTG data [viz V11]. Mez detekce formy II v matrici formy I jsou asi 3%.



Obr. 10. Překryv tří krystalograficky nezávislých molekul nicergolinu (červená – polymorf I, molekula 1, žlutá – polymorf I, molekula 2, zelená – polymorf II)

U **cabergolinu** (obr. 11) jsou popsány tři polymorfy, značené I, II a VII. Struktura



Obr.11. Cabergolin

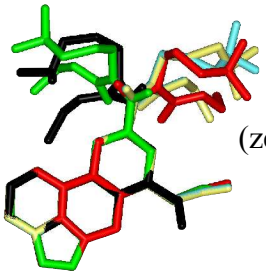
formy I je popsána v literatuře [11]. Téměř současně byla určena struktura formy II v naší Laboratoři a v patentu firmy Pharmacia Italia [12]. V naší Laboratoři byla také určena struktura formy VII [V12] (patentované firmou Pharmacia & Upjohn [13]) a 3 izostrukturních solvátů: s *tert*-butylmethyletherem, cyklohexanem a tetrahydropyranem. Kromě toho byly připraveny ještě solváty s xylenem, trimethylbenzenem a toluenem. Patentová literatura uvádí ještě formu označenou X [14] (Pharmacia & Upjohn).

Desolvatace izostrukturních solvátů, která proběhne okolo teploty 75°C, vede přednostně k formě II. Forma II je tak nejstabilnějším polymorfem v cabergolinovém systému.

Krystalové formy **nicergolinu a cabergolinu** vykazují čistou polymorfii, což je u námelových alkaloidů výjimka. U nicergolinu navíc nejsou popsány žádné solváty, což nevylučuje ve smyslu McCroneho tvrzení (viz str. 3) jejich možnou existenci, ale musely by být méně stabilní než známé dva polymorfy. V důsledku volné otáčivosti vazby C19-O20 zaujímá postranní řetězec nicergolinu tři různé konformace (viz [V11]). U nicergolinového polymorfu I je rovina brompyridinového kruhu orientována k ergolinu zhruba kolmo, zatímco u polymorfu II je postavení daleko plošší (viz obr.10). To je v souladu s faktem, že z polárních rozpouštědel přednostně krystaluje polymorf I, právě pro výhodnější postavení atomů N6 a O22, které se tak snáze solvatují. Důvodů, proč v polymorfech nicergolinu nenacházíme H-vazby je několik. V prvé řadě je důležitý protonový donor N1 methylován a žádné další donory nejsou k dispozici a přítomnost velkého atomu bromu v molekule coulombicky nedovolí u sousedních molekul bližší kontakt než je potřebný pouze pro VdW interakci. Případné

solváty (hydráty), by musely interagovat s možnými akceptory O20, O22 resp. N25 (pyridinový kruh) a to se nezdá stéricky příliš výhodné.

Cabergolin tvoří 3 polymorfy: I, II a VII. Polymorfy I a VII krystalují sice ve stejné symetrii, $P\ 2_1$, ale s rozdílnou geometrií mřížky. Krystalové pakování formy II je analogické izostrukturním cabergolinovým solvátům (stejná prostorová symetrie, $P\ 2_12_12_1$ a velmi podobná geometrie mřížky). Pro biologický účinek, ale i pro polymorfní chování cabergolinu je důležitý dlouhý a flexibilní boční řetězec subtituovaný na C8, obsahující dva kyslíkové a dva dusíkové akceptory a jeden dusíkový donor protonu. Druhý boční řetězec – propyl na N6 má daleko menší význam. Překryv krystalograficky nezávislých molekul polymorfů I,II a VII (2 molekuly, z nichž jedna je „disorderovaná“) vede k zajímavé odlišnosti. Zatímco orientace bočního řetězce u forem I a II je téměř shodná, u formy VII je opačná, jak plyne z hodnot torzního úhlu C7-C8- C20-N22 (I: 174°, II: 151° VII: 63° a 88°; viz obr. 12).

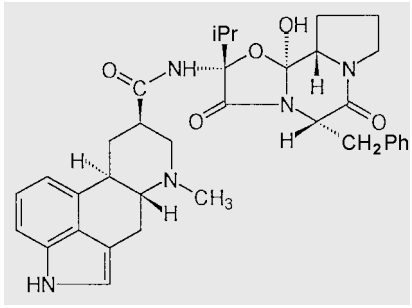


Obr.12. Překryv molekul cabergolinu ve formách I (zelená), II (černá) a VII (červená, modrá-žlutá disorder)

Krystalové pakování všech tří cabergolinových polymorfů se děje intermolekulárním H-linkováním molekul do řetězců. Vždy je do linkování zahrnut dusíkový donor N1, v případě polymorfu VII se tvoří H-vazby typu dusík … kyslík: N1-H…O24^{i} (^{i} značí sousední ekvivalentní polohu), v případě polymorfů I a II H-vazby typu dusík … dusík: N1-H…N6^{i}.

4.1.2. Peptidické námelové alkaloidy

Nejstabilnějším solvatomorfem **dihydroergocristinu** (obr. 13) je jeho mesylát monohydrát, tzv. forma I, která je ovšem velmi málo rozpustná. Její strukturu jsme

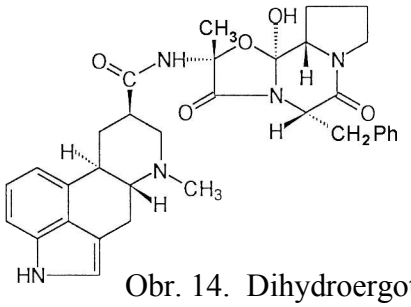


Obr. 13. Dihydroergocristin

publikovali ve [V13]. Kromě toho byla námi popsána i struktura dihydroergocristinu bis (dioxan) solvátu [V14]. Z důvodu hledání solvatomorfu s vyšší rozpustností byla zkoumána existence i dalších forem a podařilo se vykrystalizovat:

dihydroergocristin mesylát monohydrát bis(ethylacetát) solvát
dihydroergocristin mesylát methanol solvát
dihydroergocristin mesylát bis(ethylmethylketon) solvát
dihydroergocristin mesylát monohydrát amylacetát methanol solvát
dihydroergocristin mesylát ethylacetát ethanol solvát

Vysušením dihydroergocristinu mesylátu monohydrátu bis(ethylacetát) solvátu (forma V), vzniká dihydroergocristin mesylát monohydrát, který se ovšem liší od formy I právě daleko vyšší rozpustností.
U všech popsaných forem dihydroergocristinů mesylátů byla stanovena RTG krystalová struktura a vzájemně porovnána konformační analýza a molekulární pakování. Absolutní chiralita dihydroergocristinové molekuly je následující: C4(R), C8(*R*), C6(*R*), C17(*R*), C25(*S*), C24(*S*), C19(*S*).
Vyřešené struktury 7 forem poskytly 7 krystalograficky nezávislých molekul. Kruh C má vesměs konformaci E_3, kruh D vesměs $^4C_1$, kruh F zaujímá formu ^6E, někdy mírně distortovanou k $^6H_5$ a kruh G leží mezi ^4E a $^4T_5$.
V literatuře je popsána struktura **dihydroergotaminu** (obr.14) mesylátu monohydrátu [15]. V naší Laboratoři jsme studovali solvatomorfii dihydroergotaminu vinanu



Obr. 14. Dihydroergotamin

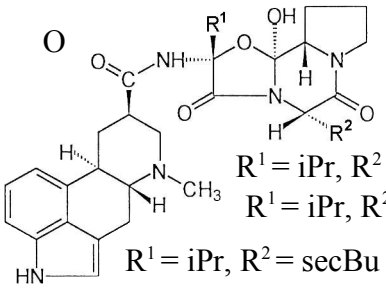
z hlediska srovnání vlivu aniontu na konformaci báze. Byly vykrystalovány následující solváty a stanovena jejich struktura [V 15]:

dihydroergotamin vinan methanol solvát
dihydroergotamin vinan ethanol solvát
dihydroergotamin vinan monohydrát methanol solvát

Ukázalo se, že methanol a ethanol solvát jsou izostrukturní. Monohydrát methanol solvát se vyznačuje spojitými kanály, v nichž obsah solventů odráží ve volném poměru jejich poměr v matečném louhu.

Dihydroergotoxin (obr. 15) je směsí alkaloidů – dihydroergocorninu, α- a β-dihydroergokryptinu a dihydroergocristinu (o dihydroergocristinu mesylátu, který se rovněž terapeuticky užívá jako čistá látka, viz str. 19-20).

Solvatomorfie dihydroergocorninu mesylátu zahrnuje 6 forem, strukturně vyřešených



br.15. Dihydroergotoxin

R^1 = iPr, R^2 = CH_2 Ph : dihydroergocristin
R^1 = iPr, R^2 = iPr : dihydroergocornin
R^1 = iPr, R^2 = iBu : dihydro-α-ergokryptin
R^1 = iPr, R^2 = secBu : dihydro-β-ergokryptin

v naší Laboratoři:

dihydroergocornin mesylát monohydrát acetonitril solvát
dihydroergocornin mesylát monohydrát bis (nitromethan) solvát
dihydroergocornin mesylát bis(ethanol) solvát
dihydroergocornin mesylát hemihydrát bis (*i*-propanol) solvát

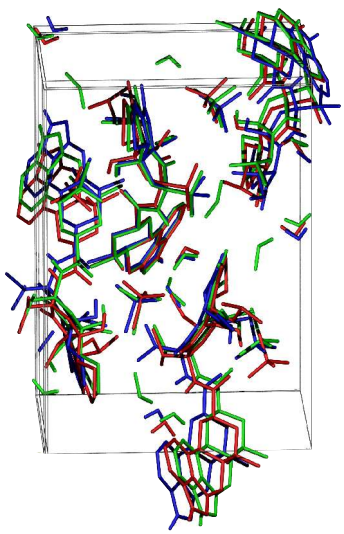
dihydroergocornin mesylát monohydrát bis (*n*-propanol) solvát
dihydroergocornin mesylátu monohydrát 1.33 (methanol) solvát

U dihydroergokryptinů mesylátů existují 4 formy, jejichž struktury byly vyřešeny v naší Laboratoři a publikovány:

dihydro-α-ergokryptin mesylát monohydrát aceton solvát [V16]
dihydro-α-ergokryptin mesylát monohydrát nitromethan solvát [V16]
dihydro-α-ergokryptin mesylát monohydrát ethanol solvát [V17]
dihydro-β-ergokryptin mesylát monohydrát methanol solvát [V17]

Krystalové struktury 16 **dihydroergopeptinů** , vyřešených v naší Laboratoři, lze rozdělit do 5 strukturních typů [viz V16], kdy v každém z nich se kryje pozice příslušného dihydroergotoxinu, mesylátu a solventu (zde samozřejmě přibližně). Struktury v rámci jednoho typu nazýváme izostrukturní (obr. 16-20). Pojem izostrukturnosti zde není tak přísný jako např. u anorganických strukturních typů (chlorid sodný, chlorid cesný apod.), spíše se jedná o obtížnou rozlišitelnost RTG difraktogramů. Výjimku tvoří strukturní typ IV, kde se struktury liší symetrií a proto nejsou izostrukturní. Nalézáme zde pouze podobnost v uspořádání dvou solvátů dihydroergocristinu mesylátu v 1/2 objemu buňky (viz obr.19).

V rámci určitého strukturního typu lze studovat možnosti solvatace v izostrukturní sérii metodou vizualizace kavit. Tak byla např. v případě dihydroergocristinu mesylátu potvrzena substituovatelnost ethanolového a methanolového solvátu nebo u solvatomorfů dihydroergocorninu byla zpřesněna predikce solventů, které se mohou vejít do dané kavity a zpětně studován vliv solventu na konformaci peptidického námelového alkaloidu – obr. 21. Zajímavé kavity byly nalezeny ve strukturách ergotaminu bis(benzen) solvátu a ergocristinu bis(benzen) solvátu [V18]. Struktury ergocristamu a ergocristinu aceton solvátu jsou uvedeny v [V19].



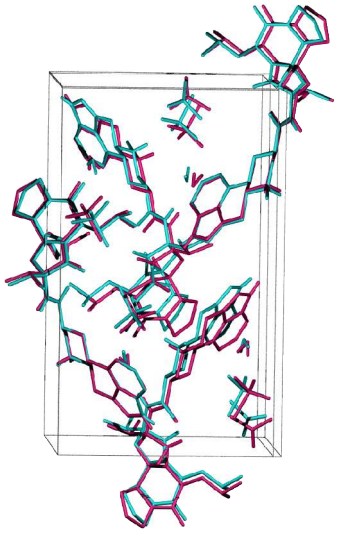
Obr.16. Strukturní typ I

DH-α-ergokryptin msf . H_2O. EtOH (červeně)

DH- β-ergokryptin msf . H_2O. MeOH (modře)

všechny DH-ergocorniny msf

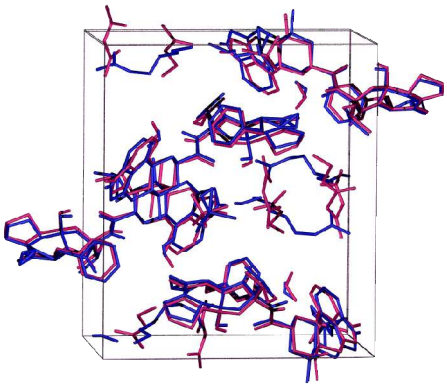
(zde nakreslen pouze: . H_2O . MeOH – zeleně)



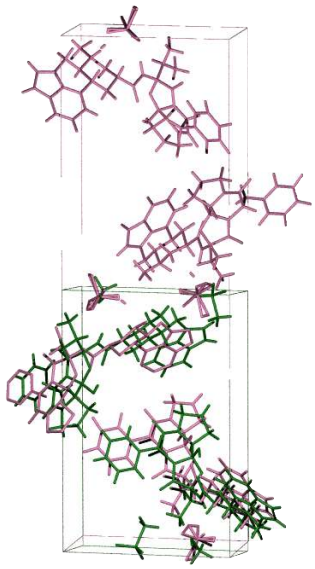
Obr.17. Strukturní typ II

DH-α-ergokryptin msf . H_2O. aceton (modře)

DH-α-ergokryptin msf . H_2O. nitromethan (červeně)



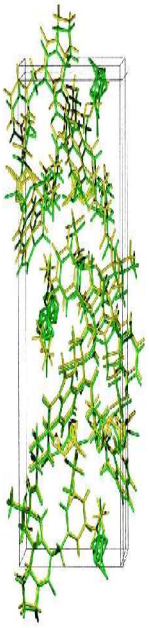
Obr.18. Strukturní typ III



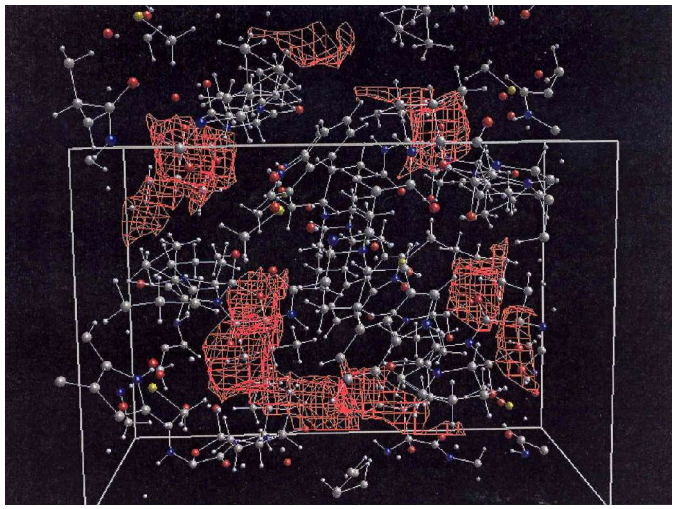
DH-ergocristin msf . H_2O . bis(AcOEt) (červeně)

DH-ergocristin msf . H_2O . AcOAm . MeOH (modře)

Obr. 19. Strukturní typ IV
DH-ergocristin msf . MeOH
(zeleně)
DH-ergocristin msf .H_2O
(červeně)



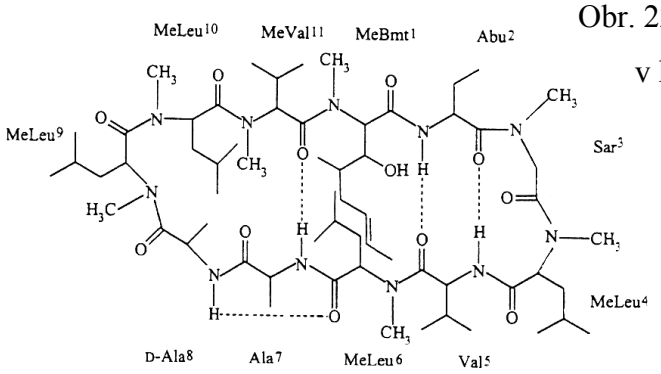
Obr.20. Strukturní typ V
DH-cristin msf . bis(MeCOEt) (žlutě)
DH-cristin msf . ACOEt . EtOH (zeleně)



Obr. 21. Vizualizace kavit ve struktuře
DH-corninu msf . bis(EtOH)

4.2. Polymorfie cyklosporinů

Přírodní cyklosporiny jsou cyklické undekapeptidy, z nichž největší význam má imunosupresivní cyklosporin A (CsA = cyclo(-MeBmt[1]-Abu[2]-Sar[3]-MeLeu[4]-Val[5]-MeLeu[6]-Ala[7]-D-Ala[8]-MeLeu[9]-MeLeu[10]-MeVal[11]-)). Ve srovnání s ostatními peptidy, CsA obsahuje především neobvyklou aminokyselinu, MeBmt[1] = (2S, 3R, 4R, 6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-oktenová kyselina. Aminokyselinové zbytky CsA, kromě achirálního Sar[3] a D-Ala[8], mají L-konfiguraci (obr. 22).



Obr. 22. Struktura CsA v krystalickém dihydrátu

Ostatní přírodní cyklosporiny, které se od CsA liší substitucí jedné až dvou aminokyselin (v literatuře se označují např. písmeny B až Z nebo vyznačením substituce vůči CsA), a různé semisyntetické deriváty, vykazují nižší imunosupresivní účinek než původní CsA.

Efekt snížení, resp. ztráta imunosupresivity je ze strukturního hlediska pozoruhodná, protože cyklosporiny jsou poměrně velké molekuly ($M_r \approx 1\ 200$), ale přesto i nepatrná chemická a tudíž i strukturní změna na jedné aminokyselině (např. demethylace) může vyvolat zásadní změnu biologické aktivity. Neimunosupresivní cyklosporiny jsou také v centru pozornosti, vzhledem k jejich možnému použití při léčbě MDR („multidrug resistance“) a AIDS [16].

Přírodních a semisyntetických cyklosporinů a jejich metabolitů je dnes popsáno okolo 100. Cyklosporiny mohou navíc vystupovat jako ligandy v komplexech, např. s Li, Na, K, Mg, Ca, Zn, Cu aj. Kromě struktur CsA, krystalovaných z různých rozpouštědel, byly vyřešeny i struktury cílových proteinových receptorů s cyklosporiny. Komplex CsA s cyklofilinem A (CypA) je znám v několika formách, např. monomeru [17] nebo dekameru [18]. Jak konformace cyklosporinového skeletu, tak vazebné místo na cyklofilin jsou však ve všech těchto formách stejné. Další komplex cyklofilin A / cyklosporin A/ kalcineurin (CypA/CsA/Cn) se zatím nepodařilo vykrystalovat, takže jeho RTG-struktura je neznámá. Je však známa konformace CsA vázaného na FAB fragment monoklonální protilátky [19].

Na rozdíl od lineárních peptidů nemá cyklický skelet cyklosporinů k dispozici volnou karboxy nebo amino-skupinu a přítomné aminokyselinové zbytky jsou neutrální (Abu, Ala, Thr, MeVal, Val, Nva, Sar, MeLeu, Leu, Ile a MeBmt). V důsledku tohoto faktu a těsně uspořádané sekundární struktury jsou cyklosporiny lipofilní a hydrofóbní. CsA má sedm N-methylovaných aminokyselinových zbytků (1,3,4,6,9,10,11) a tyto methylace umožňují vznik *cis/trans* izomerů peptidových vazeb (vzájemné postavení methylové skupiny a atomu kyslíku) .

Konformace neboli prostorové uspořádání cyklosporinového skeletu je primárně dáno energetickou výhodností systému a úzce souvisí s jeho biologickou účinností. V tomto systému se vytváří intramolekulární vodíkové vazby, které jsou dány jednak počtem donorů a akceptorů protonů, které má skelet k dispozici, a dále jejich prostorovou orientací. Kvalitativní informaci o určité konformaci poskytuje obrázek tvaru molekuly, kvantitativním vyjádřením jsou hodnoty konvenčních torzních úhlů (značených ϕ,ψ,ω) peptidových vazeb.

Krystalické cyklosporiny vykazují značnou solvatomorfii. Vzhledem k terapeutickému použití, byla a je největší pozornost věnována formám CsA a jejím derivátům. Kromě toho se podařilo vykrystalovat a v naší Laboratoři určit strukturu tří solvatomorfů CsE a dvou dalších solvátů jiných cyklosporinů: CsH diethyletheru hemisolvátu monohydrátu [V20] a Cs V bis(tert-butylmethyletheru) solvátu [V21] a dvou acetyl derivátů cyklosporinu A : acetyl CsA a bromacetylu CsA [V22] - důležitých intermediátů při syntéze lidského cyklosporinového metabolitu AM1 (M-17).

Z hlediska určité predikce možných solvatomorfů cyklosporinů byl v naší Laboratoři použit model cyklosporinových klatrátů [V23]. Při krystalovém pakování se mezi molekulami cyklosporinů vytváří různě velké a různě orientované kavity. Tyto kavity jsou při solvataci vyplňovány molekulami solventů vhodné velikosti a tvaru. Tvar a objem kavit lze vypočítat a graficky modelovat [20, 21]. Tak lze pro různé cyklosporinové klatráty stanovit maximální počet nevodíkových atomů solventu, které lze do kavity směstnat.

Cyklosporin A je imunosupresivem první volby, které se používá pro potlačení reakce hostitele na tkáňové transplantáty a pro léčbu autoimunitních chorob. Produkuje se biotechnologicky, např. submerzní fermentací hub rodu *Tolypocladium* [22]. Z mycelia této houby byl izolován a v naší Laboratoři strukturně charakterizován nový typ hydroxamové kyseliny a jejího komplexu s Fe^{III} – nežádoucího pigmentu, který surový CsA zbarvuje do žluta [V24].

Podle současné farmakodynamické představy prochází CsA buněčnou membránou do cytoplazmy, kde se váže přes rezidua 1,2,3,9,10 a 11 na cytosolický protein cyklofilin A, peptidylprolin-*cis*-*trans*-isomerasu (EC 5.2.1.8). Ve vzniklém komplexu, CypA/CsA je k dispozici tzv. efektivní smyčka („effector loop“), tvořená zbylými rezidui (4-8), pro interakci s dalším cytosolickým proteinem – kalcineurinem (Cn), fosfoprotein fosfohydrolasou (EC 3.1.3.16). Imunosupresivní účinek této interakce se projeví tlumením tvorby a uvolňování lymfokinů, především interleukinu-2, růstového faktoru T lymfocytů.

Vazba cyklosporinů na cyklofilin přímo koreluje s jejich imunosupresní aktivitou. Při interakci volného cyklosporinu A (podávané léčivo) s cyklofilinem A se razantně změní konformace cyklosporinového skeletu během několika desítek ps [23]. Původní čtyři intramolekulární H-vazby ve volném CsA (viz obr. 22) se redukují na jednu - (MeBmt[1]OH…COMeLeu[4]), v CsA vázaném v komplexu s CypA. Dále je podstatné, že při této interakci se mění i vzájemné postavení atomu kyslíku a methylové skupiny peptidické vazby mezi MeLeu[9] a MeLeu[10] z konfigurace *cis* (volný CsA) na *trans* (vázaný CsA).

Solvatomorfie CsA zahrnuje zatím 7 krystalických forem a od všech je známa krystalová struktura:

CsA monohydrát [25], prostorová grupa $P\,2_12_12_1$

CsA dihydrát [24] $P\,4_1$ } cyklosporinové klatráty

CsA monohydrát bis(aceton) solvát [V26] $P\,4_1$ }

CsA dimethylisosorbid [V25] $P\,2_1$ }

CsA di-*n*-butylether solvát [viz V23] $P\,2_1$ } cyklosporinové klatráty

CsA tetrahydrofuran solvát [viz V23] $P\,2_1$ }

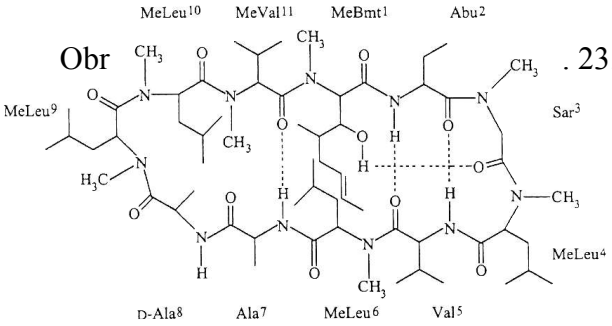
CsA (±)-*n*-butyl-laktát [V26] $P\,2_1$ }

Konformace cyklosporinů v klatrátech se liší od konformace cyklosporinu A v dihydrátu v zásadě pouze orientací postranního řetězce rezidua MeBmt[1], přičemž samotná rezidua 1-5 jsou, podobně jako u CsA dihydrátu, v uspořádání nesouhlasně orientovaného β-skládaného listu a rezidua 7-11 tvoří otevřenou smyčku s peptidickou *cis*-vazbou mezi rezidui 9-10. Konformace CsA v nepolárních rozpouštědlech (benzen, chloroform) je velmi podobná jeho konformaci v krystalových formách. V krystalových formách však lze rozlišit dva různé typy konformací podle systému intramolekulárních H-vazeb v cyklosporinovém skeletu (Tab. III):

Tabulka III. Konformační typy v krystalickém CsA

Typ	H-vazby	Zástupci

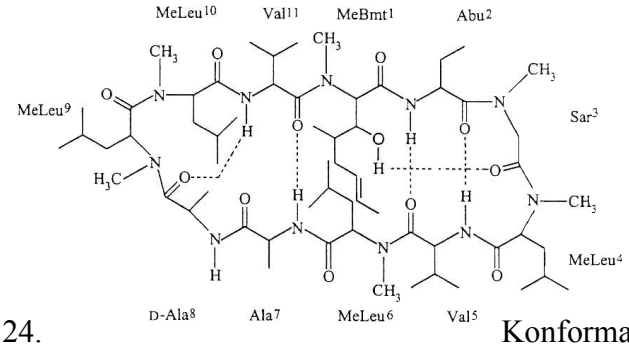
CsA dihydrát (obr.22)	D-Ala^{8}NH…COMeLeu^{6}, Ala^{7}NH…COMeVal^{11}, Abu^{2}NH…COVal^{5}, Val^{5}NH…COAbu^{2}	CsA dihydrát CsA monohydrát CsA monohydrát bis(aceton) solvát [O-acetyl-MeBmt^{1}] CsA [O-acetyl-ω-bromo-MeBmt^{1}] CsA
CsA dimethylisosorbid (obr.23)	MeBmt^{1}OH…COSar^{3} , Ala^{7}NH…COMeVal^{11}, Abu^{2}NH…COVal^{5}, Val^{5}NH…COAbu^{2}	CsA dimethylisosorbid CsA di-*n*-butylether solvát CsA tetrahydrofuran solvát Dihydro-CsA bis(*tert*-butylmethylether) solvát CsA (±)-*n*-butyl-laktát



Obr . 23. Konformační typ CsA dimethylisosorbidu

Cyklosporin E má ve srovnání s CsA demethylovaný 11tý aminokyselinový zbytek [Val^{11}]. Touto demethylací se protonizuje atom dusíku valinu a vznikne nová intramolekulární vazba Val^{11}NH…D-Ala^{8}CO. Tím se počet H-vazeb zvýší na 5 (obr.24).

Srovnání tvarů molekul CsA, CsE ukazuje, že smyčka reziduí 8-11 je u CsE vlivem přítomnosti páté H-vazby podstatně více „zaškrcena“ (zhruba ze 4 Å u CsA na



Obr. 24. Konformační typ CsE v aceton solvátu monohydrátu [V27]

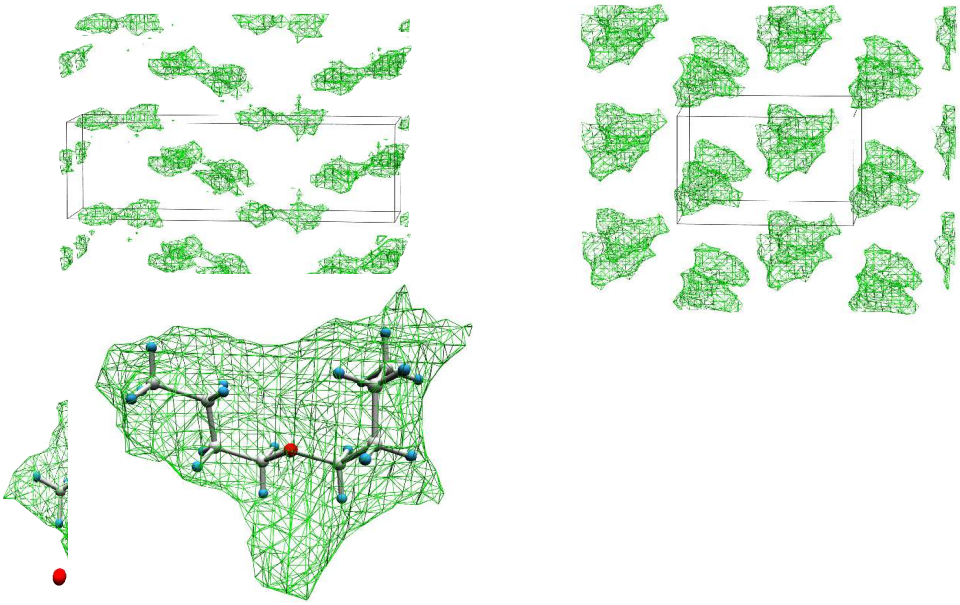
3 Å u Cs E). Pátá H-vazba podstatně přispívá ke stabilitě konformace a CsE má pouze jednu identickou konformaci v krystalových formách, nepolárních i polárních rozpouštědlech. Imunosupresivita CsE je ve srovnání s CsA asi 20 %.

Solvatomorfie CsE zatím zahrnuje tři krystalické formy a všechny mají známou krystalovou strukturu, vyřešenou v naší Laboratoři:

CsE monohydrát bis(2-butanol) solvát [V23], PG $P\,2_1$
CsE monohydrát aceton solvát [V27] $P\,2_1$
CsE (±)-*n*-butyl-laktát [V28] $P\,2_1$
} cyklosporinové klatráty

Originálním přínosem našeho týmu je uvažovat solvatomorfii cyklosporinů jako vyplňování kavit v krystalových strukturách cyklosporinů vhodnými molekulami solventů. Cyklosporiny jsou překvapivě rigidní molekuly preferující ve volné formě v krystalech symetrické uspořádání prostorové grupy $P\ 2_1$. V tomto strukturním uspořádání (cyklosporinové klatráty) se do elementární buňky umístí dvě vzorcové jednotky cyklosporinu včetně solventů ($Z = 2$) a v prostoru mezi molekulami cyklosporinů se vytváří kavity o maximální velikosti řádově 300 – 600 Å^3 (viz Tab. IV). Řidčeji se u cyklosporinových klatrátů objevuje i jiné symetrické uspořádání:

$P\,4_1$, Z = 4, rovněž s velkými kavitami. Jiné symetrické uspořádání, $P\,2_12_12_1$, nalézáme v krystalu CsA monohydrátu, v acetyl-CsA a acetylbromo-CsA, které krystalují nesolvatovány a v CsA vázaném na cyklofilinový receptor. Maximální kavity u symetrie $P\,2_12_12_1$ mají velikost pouze několik desítek Å^3. Na obr. 25 je rozložení kavit vizualizováno jak pro symetrii $P\,4_1$, tak pro symetrii $P\,2_1$.



Obr.25. Vlevo: oblast 42x42x20 Å ve struktuře CsA monohydrátu bis(aceton) solvátu, grupa $P\ 4_1$ a dvě molekuly acetonu v kavitě (kyslík molekuly vody je v důsledku H-vazeb z kavity vysunut). Vpravo: oblast ve struktuře CsA di-*n*-butylether solvátu a molekula solventu v kavitě. Pro lokalizaci solventů v kavitách byl použit program MCE [V29]. Tvar kavity byl definován body, které jsou vzdáleny minimálně 1Å od VdW sféry nejbližšího atomu v cyklosporinovém skeletu.

Důležité parametry kavit ve vyřešených strukturách cyklosporinových klatrátů CsA a CsE jsou uvedeny v Tab. IV.

Tabulka IV. Parametry kavit ve strukturách solvatovaných CsA a CsE

Cyklosporin A	mono-hydrá	dihydrát	monohydrát bis-(aceton) solvát	dimethyl-isosorbid	di-*n*-butyl-ether solvát	di-*n*-butyl-ether solvát	(±)-*n*-butyl-laktát
Prost.grupa	$P2_12_12_1$	$P4_1$	$P4_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Z	4	4	4	2	2	2	2
T sběru dat (K)	293	293	150	293	150	293	150
Buňka V (Å^3)	7216	7896	7751	4121	3961	4144	3987
Počet všech atomů[a)]	372	407	400	212	204	213	205
Počet atomů solventu[b)]	(372-4x85) = 32	(407-4x85) = 67	(400-4x85) = 60	(212-2x85) = 42	(204-2x85) = 34	(213-2x85) = 43	(205-2x85) = 35
Počet atomů v kavitě[c)]	32/4 = 8	67/4 = 17	60/4 = 15	42/2 = 21	34/2 = 17	43/2 = 21	35/2 = 17
Největší kavita V_k (Å^3)	61	332	314	438	377	463	387
Suma kavit v buňce V_Σ (Å^3)	360	1326	1256	875	754	926	774
Podíl kavit v buňce	5 %	17 %	16 %	21 %	19 %	22 %	19 %

Atomů v solventu [d]	1	2	9	12	9	9	10
Pakovací koeficient	7216/ (4x85 + 4x1) = 21,0	7896/ (4x85 + 4x2) = 23,0	7751/(4x85 + 4x9) = 20,6	4121/ (2x85 + 2x12) = 21,2	3961/ (2x85 + 2x9) = 21,1	4144/ (2x85 + 2x9) = 22,0	3987/ (2x85 + 2x10) = 21,0
V_k / atomů v solventu	61,0	166,0	34,9	36,5	41,9	51,4	38,7

Cyklosporin E	monohydrát bis(2-butanol) solvát	monohydrát aceton solvát	(±)-*n*-butyl-laktát
Prost.grupa	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Z	2	2	2
T sběru dat (K)	150	150	150
Buňka V (Å^3)	4093	4302	3981
Počet všech atomů[a]	211	222	205
Počet atomů solventu[b]	(211-2x84) = 43	(222-2x84)=54	(205-2x84) = 37
Počet atomů v kavitě[c]	43/2= 21	54/2=27	37/2=18
Největší kavita V_k (Å^3)	473	563	405
Suma kavit v buňce V_Σ (Å^3)	946	1144	810
Podíl kavit v buňce	23%	27%	20%
Atomů v solventu [d]	2x6+1 = 13	2x4+1=9	10
Pakovací koeficient	4093/(2x84+2x13)= 21,1	4302/(2x84+2x9)= 23,1	3981/(2x84+2x10)= 21,2
V_k / atomů v solventu	36,4	63,5	40,5

a) Teoretický počet všech nevodíkových atomů v buňce (V/19,4). Hodnota 19,4 je pakovací koeficient pro jeden nevodíkový atom [26].
b) Teoretický počet nevodíkových atomů solventu v buňce (CsA má 85 nevodíkových atomů, CsE 84).
c) Teoretický počet nevodíkových atomů umístitelných do jedné kavity (za předpokladu, že na asymetrickou část buňky připadá jedna kavita).
d) Počet nevodíkových atomů daného solventu v jedné kavitě.

Pokud byla struktura řešena jak při laboratorní teplotě (293K), tak při 150K, jsou uvedeny výpočty parametrů kavit pro obojí data. Rozdíl je však logická redukce rozměrů pouze o několik procent při snížení teploty (např. u CsA di-*n*-butyletheru se objem kavity sníží při 150K o 4,6 % proti hodnotě vypočítané pro 293 K), což není podstatné.

Teoreticky umístitelný počet atomů solventu do kavity je nutné korelovat s tvarem kavity (viz obr. 25 dole). Zajímavé jsou hodnoty pakovacích koeficientů, které vychází v poměrně úzkém intervalu 21-23 nezávisle na přítomném solventu. Z toho vyplývá, že CsA i CsE jsou schopné vykrystalovat s určitým i když velkým počtem solventů a jejich kombinací, které se do tohoto rozmezí vejdou. V této souvislosti je „podezřelá“ hydratace CsA.2H_2O, protože vypočtená kavita má zde daleko větší objem než pro pouhé dvě molekuly vody. Stanovení krystalové struktury CsA.2H_2O je však staršího data [viz 24].

Chiralita samotného cyklosporinového skeletu, symetrické dispozice kavit a možnost vytváření vodíkových vazeb s hostující molekulou solventu nabízí i možnost využití preferenční krystalizace k separaci různých enantiomerů. Každý z enantiomerů zaujímá v kavitě specifickou pozici, což podporuje potenciální možnost diskriminace větších chirálních molekul. Celkem jsme testovali [viz V26] inkorporaci tří typů chirálních molekul. Byly syntetizovány nesymetrické chirální ethery, avšak nepodařilo se nalézt vhodný analytický systém pro separaci enantiomerů. Jako další byl testován (*R,S*)-butyl-laktát (resp. (±)-*n*-butyl-laktát), avšak i zde bylo u klatrátu CsE nalezeno zastoupení obou enantiomerů v poměru 1:1. I tato molekula s 10 nevodíkovými atomy je zjevně příliš malá vzhledem k velikosti kavity. Inkorporace (*R,S*)-2-butanolu do CsE sice prokázala, že tato molekula je také příliš malá a v kavitě byly nalezeny oba enantiomery. Každý z těchto enantiomerů však zaujímá specifickou pozici, což podporuje potenciální možnost diskriminace větších chirálních molekul.

Vzhledem ke snadné tvorbě, tvaru i kvalitě krystalů představuje postup krystalizace cyklosporinů ve formě izostrukturních klatrátů i výbornou metodu jak přimět ke krystalizaci neznámé cyklosporiny. Tato metoda byla např. úspěšně použita pro primární identifikaci CsV [viz V21]. Postup byl testován i pro různé metabolity cyklosporinu a podařilo se takto vyřešit strukturu dihydro-CsA [viz V21] (dihydro-metabolity vznikají pravděpodobně zpětnou resorpcí ze střeva v důsledku působení střevní mikroflory).

Předpokladem pro uvažování solvatomorfie na principu zaplňování kavit, je velký rozdíl ve velikosti hostitelské molekuly (cyklosporinu) a hosta (solventu). To je v našem případě splněno, cyklosporiny obsahují přes 80 nevodíkových atomů, použité solventy okolo 10. Izostrukturní cyklosporinový klatrát pak krystaluje téměř nezávisle na solventu, vždy ve stejné symetrii a s téměř shodnou geometrií mřížky. Podobných příkladů existuje jistě mnoho, problém však je, že výsledky systematických krystalizačních a strukturních studií větších molekul s mnoha solventy nejsou vždy podrobně publikovány. Principu zaplňování kavit jsme použili i při vysvětlení krystalových struktur solvatomorfů peptidických námelových alkaloidů.

5. Závěry pro realizaci v praxi a další rozvoj vědy

Výsledky uvedené v této práci měly, k určitému datu, velký praktický význam pro farmaceutické firmy, které se obrátily na naší Laboratoř s žádostí o expertní studie RTG difrakce v konkrétních polymorfních a solvatomorfních systémech v souvislosti s časovým harmonogramem vývoje určitého generika. Tyto studie byly nezbytné, aby

firmy splnily dokumentační kritéria státních autorit pro schvalování a kontrolu léčiv (SÚKL, FDA), nedostaly se do patentových kolizí a uspěly v licenčním řízení při prodeji svých produktů. Zejména se jednalo o neustálé zvyšování úrovně Drug Master Files, jejichž neopomenutelnou kapitolou jsou výsledky RTG měření. Např. firma Schering-Plough zhodnotila v roce 1998 DMF Galeny (dnes Ivax Pharmaceuticals) na cyklosporin, po zapracování RTG partie, jako „very high standard". V rámci registrace aktivních substancí prostřednictvím nového evropského systému certifikátů se právě RTG strukturní studie dostávají až k projednání na úrovni Evropské komise pro léčivé substance a promítnou se tak v budoucnu i do závazných evropských norem v rámci monografií European Pharmacopoeia (EP).

Z hlediska kontroly jakosti byla na základě našich RTG měření monitorována polymorfie a solvatomorfie výrobních a validačních šarží, vstupních surovin a laboratorních krystalizací a strukturně a difrakčně identifikovány produkty, meziprodukty a nečistoty.

Kromě toho byla aplikačně rozvíjena metodika RTG difrakčních studií ve farmacii, tak jak to vyžaduje evropský standard. Vedle těchto kontrolně výrobních aspektů mají dosažené výsledky i svoji akademickou hodnotu. Praktické téma polymorfie určité aktivní substance lze rozvíjet směrem k základnímu výzkumu a výsledky nekolizně publikovat, společně s pracovníky V&V farmaceutických firem, v odborném tisku. I toto je přitažlivé pro farmaceutický průmysl, neboť tím zvyšuje vědecký kredit svých výrobků.

Z hlediska dalšího poznání polymorfie farmaceutických substancí přispívá tato práce detailním popisem několika důležitých polymorfních a solvatomorfních systémů. Nejvíce si cením originálního přístupu uvažovat solvatomorfii jako možnost zaplňování kavit ve struktuře hostitele (substance) různými molekulami solventů (hostů).

A tip pro další rozvoj vědního oboru – vytvořit databázi polymorfů a solvatomorfů pevných farmaceutik. Dosavadní údaje jsou poněkud nepřehledně rozprostřené v primární a sekundární literatuře [27,28] a v patentech. Nevím, že by taková interaktivní databáze existovala nebo se o ní uvažovalo na odborných setkáních. Nepochybuji, že by byla užitečná a velmi vyhledávaná.

6. Použitá literatura

Použitá literatura je rozdělena do dvou bloků. V prvním bloku jsou uvedeny nevlastní práce (1 – 28) a ve druhém bloku vlastní práce (V1 – V29).

1. Mitscherlich E.: Ann.Chim.Phys. *19*, 350 (1822).
2. Wöhler F., Liebig J.: Ann. Pharm. *3*, 249 (1832).
3. McCrone W. v knize: Physics and Chemistry of the Organic Solid State, vol I (Fox D. ed.), str. 725, Interscience, New York 1963.
4. Tomková H. v prezentaci: Legislativní aspekty polymorfismu aktivních farmaceutických substancí. 3.odborná konference VÚFB: Vliv polymorfismu na chování farmaceutických látek. VÚFB Praha, 12.-13.11.2003.
5. Beyer T. et al.: J. Am. Chem. Soc. 123, 5086 (2001).
6. Lee J.S. v prezentaci: The problem with polymorphs. GphA 2002 Fall Technical Workshop. Washington D.C. October 15-16, 2002.
7. Bernstein J. v prezentaci: Polymorphism in Crystals. ACS ProSpectives Conferences "Polymorphism in Crystals: Fundamentals, Prediction and Industrial Practice" Tampa, Florida February 23, 2003.
8. Lawrence X.Yu. v prezentaci: FDA Perspective on Polymorphism in ANDAs. GphA 2002. Fall Technical Worshop. Washington D.C. October 15-16, 2002.
9. Čejka J.: Dizertační práce. VŠCHT Praha 1999.
10. Fabregas L. L., Beneyto L.E.: Il Farmaco-Ed. Pr. 36, 256 (1981).
11. Sabatino P., Di Sanseverino L.R., Tonati R.: Farmaco 50, 175 (1995).
12. Patent WO 01/72747 z 2004-01-06.
13. Patent WO 01/72746 A1 z 2001-10-04.
14. Patent WO 03/07 8392 z 2003-09-25.
15. Hebert H.: Acta Cryst. B35, 2978 (1979).
16. Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., Ryska M.: Chem.Listy 91, 2 (1997).
17. Mikol V., Kallen J., Pfugl G., Walkinshaw M.D.: J. Mol. Biol. *234*, 1119 (1993).
18. Pfugl G., Kallen J., Schirmer T., Jansonius J.N., Zurini M.G.M., Walkinshaw M.D.:Nature *361*, 91 (1993).
19. Vix O., Rees B., Thierry JC., Altschuh D.: Proteins 15, 339 (1993).
20. Spek A.L.: PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht,The Netherlands 2000.
21. Hušák M., Čejka J. ve sborníku: European Crystallographic Meeting, ECM-19, poster s3.m1.p1. Nancy, 25.-31. srpen 2000 (Mulliert G., Torlay L. eds), Nancy 2000.

22. Maťha V. a kolektiv: Cyklosporin A. Grada Publishing, Praha 1994.
23. Köck M., Müller G., Kessler H.: Helv. Chim. Acta *77*, 171 (1994).
24. Loosli HR., Kessler H., Oschkinat H., Weber HP., Petcher T. J. Widmer A.: Helv. Chim. Acta *68*, 682 (1985).
25. Knott R. B., Schefer L., Schoenborn B. P.: Acta Crystallogr. *C46*, 1528 (1990).
26. Alkorta I., Rozas I., Elguero J., Foces-Foces C., Cano F. H.: J. Mol. Struct. 382, 205 (1996).
27. Borka L.: Pharma. Acta Helv. 66, 16 (1991).
28. Borka L.: Pharmeuropa 7, 568 (1995).

V1. Cvak L., Jegorov A., Sedmera P., Havlíček V., Ondráček J., Hušák M., Pakhomova S., Kratochvíl B., Granzin J.: J.Chem.Soc.Perkin Trans.2 (1994), 1861.
V2. Cvak L., Minář J., Pakhomova S., Ondráček J., Kratochvíl B., Sedmera P., Havlíček V., Jegorov A.: Phytochemistry. 42, 231 (1996).
V3. Hušák M., Kratochvíl B., Sedmera P., Stuchlík J., Jegorov A.: Collect.Czech.Chem. Commun. 58, 2944 (1993).
V4. Hušák M., Kratochvíl B., Sedmera P., Havlíček V., Votavová H., Cvak L., Bulej P., Jegorov A.: Collect. Czech. Chem.Commun. 63, 425 (1998).
V5. Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I., Cvak L., Jegorov A., Böhm S.: Collect. Czech. Chem.Commun. 67, 479 (2002).
V6. Kratochvíl B., Ondráček J., Novotný J., Hušák M., Jegorov A., Stuchlík J.: Z. Kristallogr. 206, 77 (1993).
V7. Kratochvíl B., Novotný J., Hušák M., Had J., Stuchlík J., Jegorov A.: Collect. Czech.Chem. Commun. 59, 149 (1994).
V8. Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Stuchlík J.: Z. Kristallogr. 209, 363 (1994).
V9. Čejka J., Kratochvíl B., Böhm S., Císařová I., Cvak L., Jegorov A.: Collect. Czech.Chem.Commun. 68, 2150 (2003).
V10. Hušák M., Kratochvíl B., Ondráček J., Maixner J., Jegorov A., Stuchlík J.: Z. Kristallogr. 209, 260 (1994).
V11. Hušák M., Had J., Kratochvíl B., Cvak L., Stuchlík J., Jegorov A.: Collect. Czech.Chem.Commun. 59, 1624 (1994).
V12. Bednář R., Cvak L., Čejka J., Kratochvíl B., Císařová I., Jegorov A.: Acta Crystallogr. E, 000 (2004). V tisku.
V13. Čejka J., Ondráček J., Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Stuchlík J.: Collect. Czech.Chem.Commun. 60, 1333 (1995).

V14. Čejka J., Kratochvíl B., Jegorov A., Cvak, L.: Z. Kristallogr. 212, 111 (1997).

V15. Čejka J., Kratochvíl B., Císařová I., Jegorov A.: Collect. Czech.Chem.Commun. Rukopis v přípravě.

V16. Petříčková H., Čejka J., Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I., Jegorov A., Cvak L.: Collect. Czech.Chem.Commun. 67, 490 (2002).

V17. Čejka J., Kratochvíl B., Jegorov A., Cvak L.: Collect. Czech.Chem.Commun. 65, 1329 (2000).

V18. Klepetářová B., Čejka J., Kratochvíl B., Pakhomova S., Císařová I., Cvak L., Jegorov A.: Collect. Czech.Chem.Commun. V tisku.

V19. Pakhomova S., Ondráček J., Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Cvak L., Sedmera P.,Havlíček V.: Z. Kristallogr. 212, 593 (1997).

V20. Jegorov A., Cvak L., Husek A., Šimek P., Heydová A., Ondráček J., Pakhomova S., Hušák M., Kratochvíl B., Sedmera P., Havlíček V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *65*, 1317 (2000).

V21. Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I., Jegorov A.: Collect. Czech. Chem. Commun. *65*, 1950 (2000).

V22. Kratochvíl B., Jegorov A., Pakhomova S., Hušák M., Bulej P., Cvak L., Sedmera P., Havlíček V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 89 (1999).

V23. Jegorov A., Pakhomova S., Hušák M., Kratochvíl B., Žák Z., Cvak L., Buchta M.: J. Inclusion Phenomena *37*, 137 (2000).

V24. Jegorov A., Maťha V., Hušák M., Kratochvíl B., Stuchlík J., Sedmera P., Havlíček V.: J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1993, 1287.

V25. Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Maťha V., Stuchlík M., Andrýsek T.: Z. Kristallogr. 211, 313 (1996).

V26. Jegorov A., Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I.: Crystal Growth &Design 3, 441 (2003).

V27. Hušák M., Kratochvíl B., Buchta M., Cvak L., Jegorov A.: Collect. Czech. Chem. Commun. *63*, 115 (1998).

V28. Kratochvíl B., Hušák M., Jegorov A.: Conformational flexibility of cyclosporins. Slovenski kemijski dnevi 2001. Maribor. Zbornik p.208. September 20.-21. 2001.

V29. Hušák M., Kratochvíl B.: J. Appl. Crystallogr. 36, 1104 (2003).

Souhrn tezí disertace

Schopnost molekuly vykrystalovat v různých krystalových formách se nazývá polymorfie (polymorfismus). Pokud je do krystalové struktury zahrnut i solvent (nejčastěji voda), hovoříme o solvátech (hydrátech), případně používáme pro tyto formy i jiné názvy – solvatomorfy nebo pseudopolymorfy. I solváty však mohou vykazovat polymorfii. Různá krystalová struktura polymorfů a solvatomorfů determinuje jejich odlišné vlastnosti.

V posledních, zhruba 10 letech význam polymorfie vzrostl především ve farmacii a ještě akceleroval po prvním velkém patentovém sporu firem Glaxo a Novopharm o ranitidin hydrochlorid v roce 1995. Etické farmaceutické firmy (originální výrobci) se snaží před generickými firmami patentově ochránit všechny možné pevné formy určité farmaceutické substance. Polymorfie a solvatomorfie jsou u farmaceutik velmi častým jevem a nelze je teoreticky předpovědět z kvantově-chemických výpočtů a proto je nutné u vybrané substance provést komplexní „screening“, což představuje velké

množství krystalizačních experimentů. S tím souvisí také validace vhodné analytické metodiky, která je schopna všechny polymorfy, resp. solvatomorfy jednoznačně charakterizovat, rozlišit a stanovit. Polymorfy a solvatomorfy určité substance se liší především farmakokinetickým profilem, biodostupností, technologickými parametry (mletí, tabletace, filtrovatelnost) a stabilitou.

Můj příspěvek a příspěvek mých spolupracovníků na Ústavu chemie pevných látek VŠCHT Praha k uvedené problematice spočívá především v monitorování polymorfie a solvatomorfie vybraných substancí metodou RTG fázové a strukturní analýzy. Dále v rozvoji této metodiky a problematiky, jednak pro potřeby farmaceutických firem působících v ČR a pak i nekolizním akademickým směrem. Výsledky našich studií jsou aplikovány pro sledování molekulárního pakování polymorfů a solvatomorfů, dále pro výzkum flexibility/rigidity biologicky aktivních molekul, v modelování kavit v krystalových strukturách substancí a ve studiu jejich zaplnění molekulami solventů, ve vývoji specializovaného krystalografického software, v modelování interakcí některých substancí s receptory, ve vybraných krystalizacích a v mikroskopických pozorováních. Během 15 let výzkumu polymorfie byly v naší RTG laboratoři studovány tyto skupiny biologicky aktivních substancí: námelové alkaloidy, imunosupresiva, morfinany, statiny, flavanolignany a další. Tyto substance byly, až na výjimky, syntetizovány ve farmaceutických firmách a většina z nich má terapeutické použití. Nejvíce byly z uvedeného souboru prostudovány polymorfní a solvatomorfní systémy námelových alkaloidů a cyklosporinů (imunosupresiva) a proto jsou dosažené výsledky v disertaci demonstrovány na vybraných substancích z těchto skupin farmaceutik. U námelových alkaloidů jsou popsány krystalové formy terguridu, lisuridu, nicergolinu, cabergolinu a vybraných dihydroergopeptinů - dihydroergocristinu, dihydroergotaminu a dihydroergotoxinu; z cyklosporinů je popsána solvatomorfie cyklosporinu A a cyklosporinu E.

Tergurid krystaluje v 7 formách, lisurid ve 4 formách, nicergolin je dimorfní a u cabergolinu je známo 8 forem. Dihydroergocristin mesylát se podařilo vykrystalovat v 5 různých solvátech, dihydroergotamin vinan ve 3 solvátech a u dihydroergotoxinu mesylátu jsme popsali 6 forem. U každého zmíněného typu námelového alkaloidu je studována a diskutována flexibilita/rigidita molekuly, postavení bočních řetězců, krystalové pakování, stabilita forem a jejich případné fázové transformace. Krystalové struktury studovaných dihydroergopeptinů se navíc podařilo rozdělit do 5 strukturních typů.

Výrazně imunosupresivní cyklosporin A krystaluje v 7 různých solvátech a cyklosporin E se podařilo vykrystalovat ve 3 solvátech. Podrobně byla studována konformace cyklosporinového molekulárního skeletu, daná systémem intramolekulárních H-vazeb a její ovlivnění solvatací. Originálně byla solvatomorfie cyklosporinů uvažována jako vyplňování kavit v jejich krystalových strukturách molekulami solventů. Byly vypočítány parametry těchto kavit a korelovány s hodnotami pakovacích koeficientů vybraných solventů. Byl zaveden pojem izostrukturních cyklosporinových klatrátů preferenčně krystalujících v prostorových grupách $P\,2_1$ a $P\,4_1$.

Výsledky uvedené v této práci měly a mají velký praktický význam pro spolupracující farmaceutické firmy v souvislosti s časovým harmonogramem vývoje určitého generika. Studie polymorfie a solvatomorfie byly nezbytné, aby firmy splnily dokumentační kritéria státních autorit pro schvalování a kontrolu léčiv (SÚKL, FDA), nedostaly se do patentových kolizí a uspěly v licenčním řízení při prodeji svých produktů. Zejména se jednalo o neustálé zvyšování úrovně „Drug Master Files“, jejichž neopomenutelnou kapitolou jsou výsledky RTG fázových a strukturních měření.

A contribution to understanding of polymorphism of pharmaceutical substances

The ability of a particular chemical substance to exist in several different crystal forms is called polymorphism or solvatomorphism for forms including solvents. These phenomena are frequently observed in solid pharmaceuticals. Polymorphs have different crystal structures and vary in both their physical and biological properties (crystal shape, hardness, melting point, solubility, bioavailability etc.). This affects commercial drug formulations and their therapeutical effect. Polymorphs and solvatomorphs can be detected using various analytical techniques including mainly X-ray diffraction, NMR and IR spectroscopies, thermal methods, and microscopy. The exact theoretical prediction of polymorphic and solvatomorphic behaviour is not yet possible. Therefore, producers of original pharmaceuticals tend to patent all crystal forms of the developed active substance, while producers of generics mostly search for new polymorphs (solvatomorphs) or technologies. Clearly, this practice can lead to lawsuits.

My contribution as well as the contribution of my co-workers at the Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague to understanding of

polymorphism of pharmaceutical substances comprises monitoring of polymorphs (solvatomorphs) by X-ray diffraction methods. Results of our studies are enable description of crystal packing, molecular rigidity/flexibility, modeling of solvent-cavities in crystal structures, and interaction of substances with cell receptors. In addition, new crystallization methods are tested in our Laboratory and crystallographic software is being developed.

This thesis provides a detailed description of polymorphism and solvatomorphism for selected ergot alkaloids and cyclosporins:

Semisynthetic ergot alkaloid derivatives – terguride crystallizes in seven different forms, lisuride in four forms, nicergolin is dimorphic, and cabergoline has seven forms. Crystal structures of 16 ergopeptine solvatomorphs can be divided into five structural types. Transformation pathways of the crystal forms and conformation flexibility of ergoline (ergolene) moiety and its side chains are also described.

Immunosuppressive cyclosporin A (Cs A) forms seven solvatomorphs while cyclosporin E (Cs E) three. A conformational comparison of solvated Cs A with its non-immunosuppressive derivative Cs E shows some differences in the system of intramolecular H-bonds. We found that the inclusion effect of cyclosporin molecules packed in "cyclosporin clathrates" promotes preferential crystallization with various chiral molecules and organic solvents.

X-ray diffraction studies of active pharmaceutical substances are extremely important for the pharmaceutical industry since they enable to improve the Drug Master Files required by regulatory authorities such as FDA and SÚKL.