

Od etapu projektowania leku do kontroli produkcji gotowego preparatu

zastosowania spektroskopii NMR w chemii farmaceutycznej



Anna Zajac

Kierownik Laboratoriów, Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o



dr Marek Żylewski

Kierownik Pracowni Spektroskopii NMR, Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest obecnie jedną z najbardziej istotnych metod analitycznych w chemii. Zakres jej zastosowania, początkowo ograniczony jedynie do analizy strukturalnej niewielkich cząsteczek organicznych, ciągle rośnie, zarówno w ilości możliwych do uzyskania informacji na temat badanych układów, jak i ich wielkości.

Pierwsze obserwacje zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego przeprowadzono już w 1945 roku. Lata 50 przyniosły rozwój wiedzy na temat zależności zjawiska przesunięcia chemicznego i sprzężenia spinowo-spinowego od struktury chemicznej badanych próbek, co umożliwiło zastosowanie spektroskopii NMR do ustalania i potwierdzania struktury chemicznej związków. W latach 70. XX wieku wprowadzono do użycia magnesy nadprzewodzące i zastosowano w pomiarach eksperymenty impulsowe, wraz z procedurą szybkiej transformacji Fouriera. Dla chemików używających tej techniki badawczej był to milowy krok w rozwoju, który w sposób zdecydowany poprawił jej czułość i zwiększył rozdzielczość otrzymywanych widm. Był też podstawą, która umożliwiła wprowadzenie w następnej dekadzie eksperymentów wieloimpulsowych, metod akwizycji widm kolejno dwu i wielowymiarowych, dzięki którym możliwe stało się zastosowanie spektroskopii NMR do badania tak złożonych układów, jak białka i kwasy nukleinowe. Rozwój w stosowanej aparaturze i metodyce pomiarowej trwa nieprzerwanie po dzień dzisiejszy, otwierając coraz to nowe pola zastosowań dla tej potężnej techniki badawczej. O tym, jak ważna jest spektroskopia NMR dla dzisiejszej nauki, świadczą cztery nagrody Nobla otrzymane przez naukowców zajmujących się tą metodą – Felix Bloch i Edward Purcell otrzymali je w 1952 r., Richard Ernst w 1991 r. a Kurt Wuthrich w 2002 r.

Spektroskopia NMR – wprowadzenie

W spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego badać możemy jedynie takie jądra atomowe, które mogą oddziaływać z zewnętrznym polem magnetycznym. Na szczęście dla chemików, wśród tych możliwych do wykorzystania w spektroskopii NMR, są izotopy pierwiastków powszechnie spotykane w związkach organicznych. Najważniejsze z nich to jądra ^1H , ^{13}C – podstawowe składniki każdego związku organicznego, bardzo ważny, szczególnie w chemii medycznej, farmaceutycznej, a także w biochemii izotop ^{15}N , czy istotne w metabolomice, chemii związków naturalnych i badaniu metabolitów leków jądra ^{19}F i ^{31}P . Umieszczenie tych jąder w zewnętrznym polu magnetycznym, pozwala na absorpcję przez nie promieniowania elektromagnetycznego o charakterystycznej energii (a zatem i częstotliwości promieniowania), zależnej od natężenia zewnętrznego pola magnetycznego, budowy samego jądra atomowego i co wielce istotne z perspektywy zastosowania w chemii, od otoczenia chemicznego danego jądra atomowego – czyli od rozmieszczenia sąsiednich atomów w cząsteczce, ich rodzaju i sposobu ich połączenia wiązaniami chemicznymi. Na tej podstawie możliwe jest powiązanie częstości absorbowanego przez poszczególne atomy promieniowania elektromagnetycznego ze strukturą chemiczną cząsteczki umieszczonej w zewnętrznym polu magnetycznym. Idąc dalej, możemy zatem stwierdzić obecność w badanym związku różnorodnych grup funkcyjnych czy różnych elementów strukturalnych jak np.: pierścienie aromatyczne, fragmenty olefinowe czy alifatyczne. Na podstawie intensywności sygnałów możemy również wyznaczyć wzajemne stosunki ilości atomów budujących różne fragmenty struktury chemicznej molekuly, co przekłada się na możliwość poznania wielkości tych fragmentów

JCI JAGIELLOŃSKIE CENTRUM INNOWACJI

Badania wykonywane w Laboratorium Spektroskopii NMR:

- określenie struktury związków chemicznych (wyznaczenie sposobu połączenia atomów budujących związek chemiczny, określenie jego budowy przestrzennej)
- badanie czystości związków
- badanie profilu zanieczyszczeń substancji chemicznych
- produktów ich degradacji
- pomoc na etapie przygotowania i projektowania badań w celu rozwiązania konkretnych problemów, jak i interpretacji otrzymanych wyników

www.jci.pl



(długość łańcucha alifatycznego, liczbę pierścieni aromatycznych itp.). W bardzo licznych przypadkach, szczególnie dotyczy to niezbyt dużych i nieskomplikowanych cząsteczek organicznych, powiązanie tych informacji pozwala na jednoznaczne rozwiązanie, czy też potwierdzenie struktury chemicznej badanej molekuly. W przypadkach bardziej skomplikowanych, gdzie w grę wchodzi zjawiska izomerii, wzrost wielkości cząsteczki, zwiększenie różnorodności fragmentów strukturalnych ją budujących, a proste reguły wiążące częstość pochłanianego promieniowania ze strukturą cząsteczki nie dają jednoznacznych rozwiązań, z pomocą przychodzi wspomniane już w rysie historycznym eksperymenty wieloimpulsowe, pozwalające na otrzymywanie widm dwu- i wielowymiarowych. Użycie tych metod dostarcza wielkiej ilości szczegółowych informacji strukturalnych np. wskazujących na wzajemne sąsiedztwo atomów w strukturze cząsteczki, czy też pozwalających na wyodrębnianie całych układów atomów w przypadku modułowej budowy struktury molekularnej. Szczególnie interesujący dla badań chemii medycznej i biochemii był rozwój metod pozwalających na uzyskanie informacji dotyczących sąsiedztwa atomów w przestrzeni, niezależnie od samego szkieletu wiązań chemicznych. Dało to wgląd w strukturę chemiczną cząsteczki nie tylko w odniesieniu do kolejności i sposobu połącze-

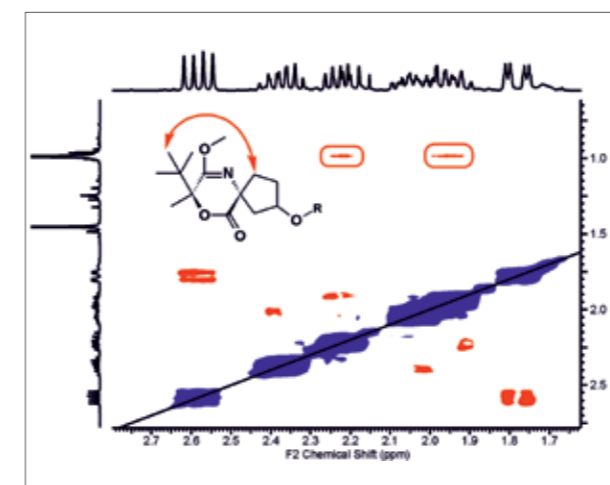
nia atomów budujących badaną molekulę, ale pozwoliło na określenie wzajemnego położenia fragmentów cząsteczki w przestrzeni, co jeszcze niedawno zarezerwowane było praktycznie wyłącznie dla rentgenografii strukturalnej. Obecnie jesteśmy w stanie przy użyciu spektroskopii NMR badać tak duże obiekty molekularne jak białka, określając z bardzo dużą dokładnością ich strukturę przestrzenną. Przykład zastosowania tego typu eksperymentów pokazano na rys. 1. Rysunek przedstawia wynik dwuwymiarowego eksperymentu NOESY, który zastosowany został w celu określenia wzajemnej konfiguracji przestrzennej podstawników pierścienia sześciocząłowego. Wskazane na widmie sygnały korelacyjne (obwiedzione czerwonymi prostokątami), odpowiadają, jak wskazuje strzałka na zamieszczonym wzorze, oddziaływaniu przez przestrzeń protonów grupy tert-butylowej i protonów grupy CH_2 pierścienia pięciocząłowego. Oddziaływanie to jest możliwe jedynie wtedy, gdy dwa fragmenty struktury związku, znajdują się po tej samej stronie względem płaszczyzny pierścienia sześciocząłowego, definiując jednoznacznie strukturę przestrzenną badanego związku.

Projektowanie leków

W chemii medycznej spektroskopia NMR jest techniką znajdującą zastosowanie począwszy od etapu projektowania leku, a skończywszy na kontroli produkcji gotowego preparatu.

Poszukiwanie struktur wiodących w pracach nad nowym lekiem generalnie opiera się na dwóch zasadniczych drogach postępowania bądź ich kombinacji. Pierwszą jest synteza metodami chemii kombinatorycznej obszernych bibliotek związków, poddawanych w dalszym etapie prac próbom wiązania z receptorem białkowym. W badaniach tych spektroskopia NMR, dzięki możliwości zastosowania całej gamy różnorodnych eksperymentów, zaczyna odgrywać coraz poważniejszą rolę jako metoda weryfikacji wiązania się ligandu do receptora. Użycie spektroskopii NMR pozwala na zidentyfikowanie związków już o stosunkowo słabym powinowactwie, nie wymagając jednocześnie wcześniejszej wiedzy na temat działania samego białka.

Obserwować można zmianę własności spektralnych receptora, co przy odpowiednim zaprojektowaniu eksperymentów, pozwala również stwierdzić czy ligand wiąże się w miejscu aktywnym, czy np. następuje wiązanie do nieaktywnych kieszeni na powierzchni cząsteczki białka. Dodatkowo, można także prowadzić obserwacje



Ryc.1. Dwuwymiarowy eksperyment NOESY



spektroskopowe potencjalnych ligandów, co jest bardzo użyteczne jako technika screeningowa, pozwalająca na szybkie wyodrębnienie z grupy potencjalnych ligandów, związków łączących się z receptorem. Drugie podejście zakłada ukierunkowane projektowanie cząsteczki liganda, zgodnie z wymogami miejsca wiążącego receptora, według koncepcji „klucza i zamka”. Pierwszym etapem w tym podejściu jest poznanie samego receptora białkowego, jego struktury przestrzennej, w czym spektroskopia NMR może stanowić cenne źródło informacji. Otrzymane w wyniku celowego projektowania związki, bada się i optymalizuje ich strukturę, w czym ponownie nieocenione możliwości daje spektroskopia NMR, mająca wgląd w strukturę przestrzenną cząsteczki w roztworze (SAR by NMR).

Badanie gotowych preparatów

Zostawiając już bardzo obszerną tematykę projektowania nowych substancji leczniczych, nie można nie wspomnieć o zastosowaniu spektroskopii NMR do badania już gotowych preparatów. Ze względu na bardzo duży zakres skali dynamiki pomiaru widm NMR oraz możliwość prowadzenia pomiarów ilościowych, spektroskopię NMR można używać do badania czystości otrzymanych preparatów, oznaczania profilu zanieczyszczeń, oznaczania zawartości resztkowej rozpuszczalników oraz do oznaczania zawartości poszczególnych izomerów (jeżeli istnieją) w gotowym preparacie. Jednocześnie, oznaczając czystość otrzymanego preparatu, otrzymuje się istotną informację na temat chemicznego charakteru obecnych zanieczyszczeń, a często udaje się je także jednoznacznie zidentyfikować. Z tego samego powodu spektroskopia NMR doskonale nadaje się do oznaczania składu preparatów wieloskładnikowych, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, co może również być wykorzystane do potwierdzenia autentyczności preparatu. Pomiary takie, określane mianem ilościowego NMR (qNMR), z powodzeniem są również stosowane w badaniach nad produktami pochodzenia naturalnego, w chemii spożywczej (analiza soków owocowych, olejów jadalnych czy win), jak również w chemii substancji pomocniczych stosowanych w farmacji, takich jak polimery i biopolimery (np. heparyny, modyfikowana skrobia, glukany). Podobnie bada się obecnie polisacharydy używane w procesie produkcji szczepionek. Ze względu na bardzo skomplikowany charakter takich układów, analiza opiera się często na porównywaniu widm próbek z widmem wzorca, bez konieczności przypisania sygnałów do odpowiednich składników próbki. Jednakże, jeżeli istnieje taka potrzeba, możliwe jest zidentyfikowanie składników produktu i określenie wzajemnej proporcji składników w próbce. Widma wykonywane w czasie posłużą do badania stabilności strukturalnej i oznaczania produktów rozkładu badanych substancji.

Rozwój spektroskopii NMR

Ogromny rozwój, jaki dokonał się na przelocie wieków w technologii konstrukcji magnesów nadprzewodzących (magnesy aktywne ekranowane), elektronice, konstrukcji sond pomiarowych (kriosondy), a także pojawienie się nowych metod pomiarowych, owocuje coraz większym zasięgiem możliwości zastosowania spektroskopii NMR w różnych dziedzinach chemii, biochemii czy farmacji, przy czym warto podkreślić, ciągle niewielkim koszcie pomiaru widma NMR wynoszącym od 30 do 40 zł.

Powyższy opis ma na celu jedynie zasygnalizowanie możliwych kierunków badań, w których spektroskopia NMR już odgrywa, bądź rozpoczyna odgrywać coraz większą rolę. ■

