

PL 1
NEWS FROM OLD DRUGS:
INVESTIGATIONS ON THE POLYMORPHISM OF
GLUCOCORTICOIDS

CHRISTIAN NÄTHER

*Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Olshausenstraße 40, D-24098 Kiel
 cnaether@ac.uni-kiel.de*

Polymorphism, which is defined as the ability of a compound to exist in more than one crystalline modification is a widespread phenomenon and is of great importance in a number of areas like material science or pharmaceutical development. In drug polymorphism several aspects are of importance: Before a new drug is marketed it has to be adhered to the standards of the authorities, which also includes investigations on the polymorphism. In addition, because polymorphic modifications frequently exhibit different physical properties like e. g. solubility, melting point, compressibility, bioavailability or stability on storage, information on the influence of the corresponding phase onto the chemical, biological or physical properties of a drug are needed. Finally, polymorphic modifications can be patented separately if they have some advantages compared to that phase which is in use.

However, also the polymorphism of very old drug substances can be of great interest, which in most cases has not been investigated satisfactorily. This is the case e.g. for glucocorticoids, which belong to the most versatile and effective drugs and which are used in therapy for a very long time. In several cases they are administered as a crystalline suspension and hence marketed in glass ampoules. During the preparation of the dosage form, these drugs must be sterilized, for which different methods exist. A very interesting method is the sterile filtration in which the compound is dissolved in a given solvent, filtered off, recrystallized, dried and micronized. During this procedure different polymorphic or pseudopolymorphic (solvates or co-crystals) modifications can occur and in the end it has to be guaranteed that only that phase is formed which is used in therapy or which is preferred by the producer.

Therefore, we have performed systematic investigations on the polymorphism of glucocorticoids, which also includes investigations on the pseudopolymorphism, because it has to be proved which polymorphic modification is formed on desolvation of a given solvate. To investigate such typical solid-state phenomena different methods are needed. This includes X-ray single crystal and powder diffraction, simultaneously differential thermoanalysis (DTA) and thermogravimetry (TG) coupled to mass spectroscopy (MS), differential scanning calorimetry (DSC), temperature dependent X-ray powder diffraction as well as thermomicroscopy. For a systematic search for new forms a polymorphic screening has to be performed in the beginning.

For triamcinoloneacetate e. g. we have found two different modifications namely the trigonal form (space group R-3) that corresponds to the patented and commercial available product and a second, tetragonal form (space group P4₁2₁2). We have found that the commercial product contains a small amount of water that is responsible for the stability of

that form. Therefore, the form that is patented and used in therapy is in fact a hydrate. If the water is removed a transformation into the tetragonal form is observed. Therefore, the melting point given in the patent does not correspond to the patented and trigonal form, it corresponds to the new and hitherto unknown tetragonal form.

Triamcinoloneacetate crystallizes as solvates in nearly all solvents used for crystallization. Altogether three different structure types have been observed. In addition to these pseudopolymorphic forms we have identified two solvent free polymorphic modifications.

For pure triamcinolone we have found two crystalline modifications and one hydrate. Interestingly the commercial product is thermodynamically metastable at room temperature and can only be prepared by decomposition of the hydrate. If crystalline suspensions of this form are stirred a transformation into the thermodynamic stable form is observed.

Prednisolone also exists in two different polymorphic modifications and one hydrate. In contrast to triamcinolone, desolvation of the hydrate leads to that form which represents the thermodynamically most stable form at room temperature.

For hydrocortisone several different pseudopolymorphic forms were discovered in the beginning. In addition, from most solvents a solvent free thermodynamically stable modification is obtained which corresponds to that form which is used in therapy. Surprisingly, if single crystals were crystallized from these solvents a new and hitherto unknown metastable form of hydrocortisone is obtained.

Summarizing, these investigations show that even for well-known drugs one can find new and surprisingly results, which are of great importance for the preparation and sterilization of drug substances.

PL 2
MASS SPECTROMETRY IN CLINICAL
ENZYMOLGY: TOWARD NEWBORN SCREENING
OF INBORN ERRORS OF METABOLISM

**FRANTIŠEK TUREČEK^a, MICHAEL H. GELB^{a,b},
 C. RONALD SCOTT^c, YIJUN LI^a, and DING WANG^a**

*Departments of Chemistry^a, Biochemistry^b and Pediatrics^c
 University of Washington, Seattle, WA, USA
 turecek@chem.washington.edu*

Mass spectrometry is a highly sensitive method that has been widely used for the selective detection and quantitation of various metabolites that are present at trace levels in body fluids and manifest genetic diseases. Here we describe a novel approach of using tandem mass spectrometry for the detection of inborn errors of metabolism in patients. In particular, we focus on two groups of lysosomal storage diseases (LSD) that are caused by defective enzymes in the lysosome¹. The first group includes diseases caused by deficiencies of lysosomal enzymes involved in catabolic degradation of sphingolipids. The other group is mucopolysaccharidoses (MPS) that are caused by deficiencies of enzymes that catalyze degradation of glycosaminoglycans, such as heparan sulfate and dermatan sulfate. The methods reported here have evolved from our previous studies of mass spectrometric methods for diagnos-

ing enzyme deficiencies in cultured cells using affinity capture-elution electrospray ionization mass spectrometry (ACESIMS)^{2,3} that addressed several LSD and congenital disorders of glycosylation. The advantage of tandem mass spectrometry over other mass spectrometry-based approaches is that it (i) provides highly selective and efficient separation of ions from low-abundance analytes in the mass spectrometer, (ii) increases overall selectivity and sensitivity, (iii) works with rehydrated dried blood spots (DBS) from newborn screening cards as biological sample, and, last but not least, (iv) uses simpler and less expensive substrates and procedures for routine use in clinical practice.

The use of MS/MS for enzyme assays in DBS is illustrated in Scheme 1 (ref.⁴). The sample, which is a 2-5 mm diameter punch of a DBS on a Guthrie screening card, is incubated with a buffer containing a non-endogenous substrate conjugate that incorporates a structure moiety that is similar to that in the natural substrate and is recognized by the enzyme. Action of the enzyme forms the enzymatic product (P) whose molecular mass is different from that of the substrate conjugate. Electrospray ionization (ESI) produces gas-phase ions (Ionized P) by protonation, alkali metal ion attachment, or deprotonation of P that are directly related to its molecular mass and can be readily separated in the mass spectrometer from those of the substrate conjugate. Internal standard (IS) is added to P that upon ESI forms gas-phase ions that are chemically similar to ionized P, but differ in mass. Collisional activation in the tandem mass spectrometer produces fragment ions from ionized P and IS that are unequivocally related to P and IS and are used to monitor the ionized P and IS intensities. Since ion intensities from electrospray are proportional to analyte concentrations, the measured relative intensities of P and IS reporter fragment ions are proportional to P and IS concentrations. The proportionalities (response factors in ESI-MS/MS) are determined from calibration curves for P and IS.

In case IS is an isotopomer of P, their ESI-MS/MS response factors are nearly identical and no external calibration is necessary.

Examples will be given of determinations of activities in dried blood spots for lysosomal enzymes glucocerebrosidase (Gaucher disease), acid sphingomyelinase (Niemann-Pick disease variants A and B), galactocerebroside β -galactosidase (Krabbe disease), acid- α -galactosidase (Fabry disease), acid α -glucosidase (Pompe disease), and α -D-iduronidase (mucopolysaccharidosis Type I, Hurler disease) from affected patients, heterozygotes, and normal individuals. The activities were measured simultaneously by multiple-reaction monitoring of ion dissociations from cations produced by electrospray ionization of enzymatic products. Simple and inexpensive assay protocols were developed that are readily adopted for handling multiple samples in 96-well microtiter plates, employ simple separation steps, and use $\leq 3 \mu\text{mol}$ of synthetic or commercially available substrates and $< 25 \text{ nmol}$ of internal standards per analysis. The assays have the potential of being used for large-scale screening of newborns for the detection of inborn errors of metabolism.

Supported by the National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIH-DK 67859), the Genzyme Corporation, and Applied Biosystems.

REFERENCES

1. Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (ed.): *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition, Part 16, Lysosomal Storage Disorders. McGraw-Hill, New York 2001,
2. Gerber S. A., Scott C. R., Tureček F., Gelb M. H.: J. Am. Chem. Soc. *121*, 1102 (1999).
3. Tureček F.: J. Mass Spectrom. *37*, 1 (2002).
4. Li Y., Scott C. R., Chamoles N. A.(†), Ghavami A., Pinto B. M., Tureček F., Gelb M. H.: Clin. Chem. *50*, 1785 (2004).

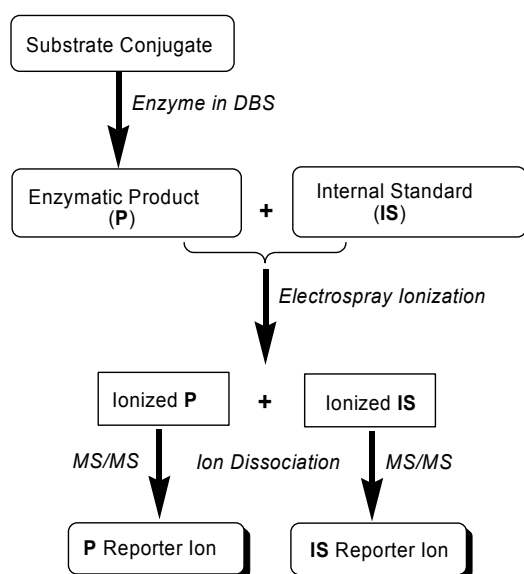
PL 3

SILYBIN A SILYMARIN - NOVÉ MOŽNOSTI APLIKACE V BIOMEDICÍNĚ ANEB STARÉHO PSA LZE (NĚKDY) NAUČIT I NOVÝM KOUSKŮM

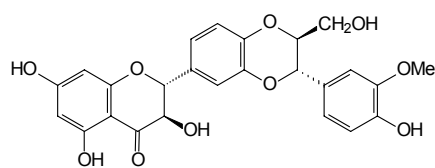
**VLADIMÍR KŘEN^{a,b}, RADEK GAŽÁK^a, DANA WAL-
TEROVÁ^b, JITKA ULRICHOVÁ^b a VILÍM ŠIMÁNEK^b**

^a Mikrobiologický ústav AV ČR, Centrum biokatalýzy a biotransformací, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^b Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Universita Palackého, Hněvotinská 3, 775 13 Olomouc
kren@biomed.cas.cz

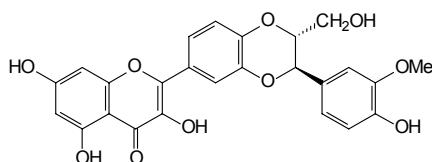
Silymarin je směs flavonolignanů a polyfenolů ze semen bodláku ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*)¹. Flavonolignany silymarinu jsou užívány v léčení a podpůrné terapii jaterních onemocnění a některých onemocnění trávicího traktu od starověku do současnosti. V nedávné době byly přesně určeny struktury (stereochemie) silybinu A a B - hlavní komponenty silymarinu - a byly popsány některé zcela nové mechanismy účinku na signální procesy ve zdravých a nádorových buňkách².



Scheme 1. Flow chart of tandem MS enzyme assays



Silybin B

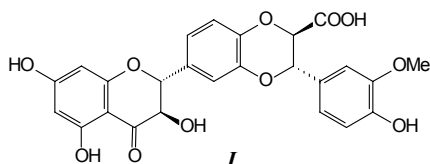
2 *R*, 3 *R*, 10 *S*, 11 *S*

2,3-Dehydrosilybin A

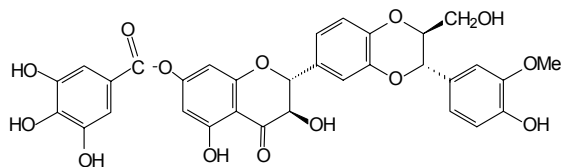
10 *R*, 11 *R*

Pomocí rozsáhlé série nových derivátů jsme upřesnili mechanismus antioxidačního působení silybinu a určili tyto mechanismy u jeho farmakologicky významného derivátu 2,3-dehydrosilybinu v systémech *in vitro* a *ex vivo*. Byly též identifikovány některé produkty oxidativní oligomerizace těchto látek. Dále byla studována selektivní oxidace obou těchto flavonolignanů a připraveny nové deriváty – např. kyselina silybinová **I** – vyznačující se změněnými farmakodynamickými parametry³.

U jednoho z diastereomerů silybinu (silybin B) jsme nově popsali estrogení účinky⁴. Dále byla série nových derivátů výše uvedených sloučenin testována jako inhibitory Pgp a MDR proteinů (multi-drug-resistance protein). Tato SAR studie určila strukturální požadavky derivatizace obou molekul pro optimální účinek na buněčné transportérové systémy a byla identifikována nová skupina látek (deriváty 2,3-dehydrosilybinu) s velmi nízkou toxicitou pro inhibici mnohonásobné lékové rezistence⁵.

**I**

Připravili jsme též hybridní antioxidanty na bázi silybinu s řádově vyššími antioxidačními účinky – např. galloyl silybin **II**.

**II**

Během nedávné doby byly uvedeny na trh ve spolupráci s průmyslovými partnery nové přípravky na bázi silymarinu s výhodnějšími a/nebo novými účinky. V současné době je

vyvíjen nový preparát na bázi 2,3-dehydrosilybinu pro dermatologické aplikace.

Silybin a některé jeho nové deriváty mají též vysoký potenciál jako podpůrné léčivo při terapii některých nádorových onemocnění (např. rakovina prostaty), což je založeno na nově popsáných mechanismech působení².

LITERATURA

1. Šimánek V., Křen V., Ulrichová J., Vičar J., Cvak L.: *Hepatology* 32, 442 (2000).
2. Křen V., Walterová D.: *Biomed. Papers* 149, 29 (2005).
3. Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Sedmera P., Příkrylová V., Walterová D., Křen V.: *Bioorg. Med. Chem.* 12, 5677 (2004).
4. Plíšková M., Vondráček J., Křen V., Gažák R., Sedmera P., Walterová D., Psotová J., Šimánek V., Machala M.: *Toxicology* 215, 80 (2005).
5. Džubák P., Hajdúch M., Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Walterová D., Sedmera P., Křen V.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3793 (2006).

PL 4

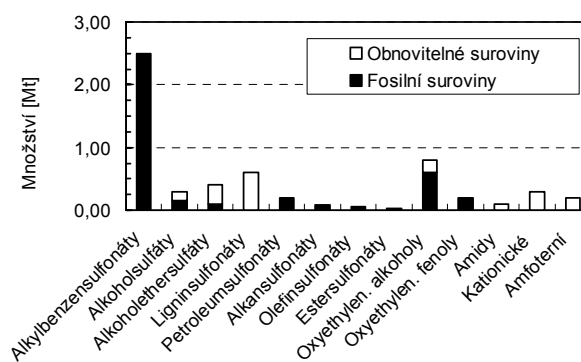
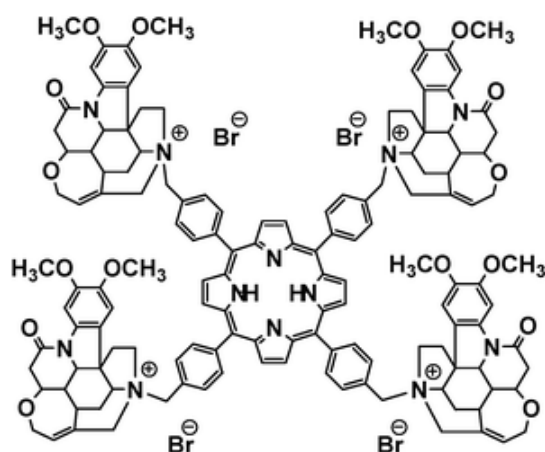
OPTICAL SENSING SYSTEM FOR ATP USING PORPHYRIN-ALKALOID CONJUGATES

ZDENĚK KEJÍK^a, KAMIL ZÁRUBA^a, DAVID MICHALÍK^a, JIŘÍ ŠEBEK^{ab}, JURAJ DIAN^c, STATIS PATARIDIS^a, KAREL VOLKA^a, and VLADIMÍR KRÁL^{ab}

^a Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Prague 6, 166 28 Prague, ^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, ^c Charles University Prague, Department of Chemical Physics and Optics, Ke Karlovu 3, 121 16 Prague 1
kralv@vscht.cz

The sensing of ATP has received considerable attention in recent years as ATP serves as the primary energy currency of the cell. ATP depletion is a central process in pathogenesis, in particular ischemia, Parkinson's disease, hypoxia and hypoglycemia. ATP plays important roles in sensory transduction acting as a link from non-neural to neural cells. Overabundance of ATP in blood can lead to circulatory shock.

The tertrabrucin-porphyrin selector, which we describe here as a sensor for ATP, fulfills the condition of multiple binding modes leading to selectivity for ATP under physiological conditions. Our design is based on a combination of aromatic π - π stacking (porphyrin macrocycle and/or peripheral phenyl ring moiety with adenosine) and sufficient positive charge leading to charge neutralization of the receptor-ATP complex. A porphyrin core enhances the interaction of porphyrin with ATP by the binding of hydroxyl groups. Moreover, the use of a porphyrin as an excellent signaling unit (chromophore and fluorophore) connected to four binding sites represents a unique selector structure. The calculated values of the stability constants of 1:1 complexes of porphyrin and nucleotides were 64 000, 6700, and 2400 for ATP, ADP, and AMP, respectively (nonlinear re-



Obr. 2. Výroba jednotlivých typů tenzidů

gression of measured data pointed to the creation of a 1:1 complex for each analyte used). The estimated values afford evidence for the good selectivity of sensor towards ATP.

The financial support from the Ministry of Education of the Czech Republic MSM 6046137307 and LC512, the Grant Agency of Czech Republic (grants no. 203/03/0900 and 203/06/1038), and European Union project (CIDNA NMP4-CT-2003-505669) is gratefully acknowledged.

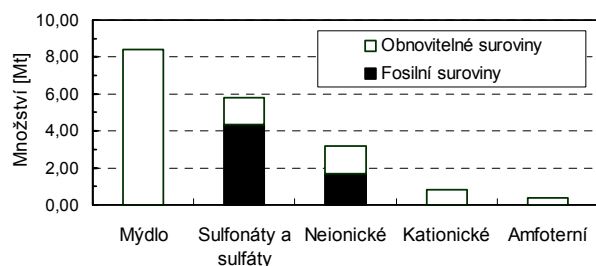
PL 5
TENZIDY

JAN ŠMIDRKAL a VLADIMÍR FILIP

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha 6 - Dejvice
Jan.Smidrkal@vscht.cz

Pokud je na vývoji chemie a technologie tenzidů v posledních letech něco charakteristické, tak je to změna surovinové základny, je to přechod z fosilních surovin na suroviny obnovitelné a to zejména na suroviny rostlinného původu.

Na obr. 1 je znázorněna světová výroba tenzidů podle typů a je vidět, že kromě mýdla se ostatní tenzidy vyrábějí převážně z fosilní suroviny (ropy). Téměř 3/4 výroby sulfonátů a sulfátů vyráběných z fosilních surovin tvoří natriumdo-

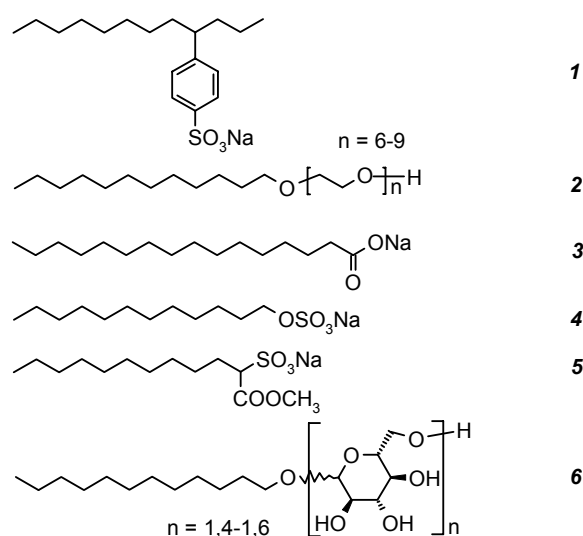


Obr. 1 Světová výroba tenzidů podle typů (rok 2000)

decyl-benzensulfonát. (1), který stále zůstává, hlavním tenzidem v práškových pracích prostředcích. V poslední době jeho množství v pracích prostředcích klesá a naopak roste obsah oxyethylenovaných mastných alkoholů (2), původem z ropy a částečně z kokosového oleje (Malajsie). Třetím základním tenzidem v práškových pracích prostředcích je sodné mýdlo (3).

Z obr. 2 je zřejmé, jak dominantní postavení má mezi tenzidy (1), druhé místo co do množství zaujímají oxyethylenované mastné alkoholy (2).

Natriumdodecylbenzensulfonát se patrně nestal majoritním tensidem díky svým vlastnostem, ale spíše kvůli velice dobré dostupnosti a ceně. Jeho výroba je oproti ostatním sulfonátům a sulfátům, které připadají v úvahu jako tensidy do práškových pracích prostředků (alkylsulfáty, alkansulfonáty, olefinsulfonáty či estersulfonáty), technologicky méně náročná. Další výhodou (*I*) je, že jeho kyselá forma tj. kyselina dodecylbenzensulfonová, jejíž neutralizací se vyrábí, je na rozdíl od kyselých forem výše uvedených sulfátů a sulfonátů neomezeně stabilní, dá se snadno převážet a neutralizuje se až



na místě. Ostatní výše uvedené sulfáty a sulfonáty se převážejí ve formě sodných solí obvykle jako 30–40% pasty, což znamená vyšší přepravní náklady, kromě toho jsou tyto pasty vzhledem k obsahu vody korozivní a musí se obvykle při čerpání z cisterny rozehtívat parou.

Z obnovitelných surovin jsou z uvedených sulfátů a sulfonátů běžné pouze alkylsulfáty (4) a estersulfonáty (5). Alkylsulfáty a estersulfonáty mají tu nevýhodu, že mohou v pracím roztoku hydrolyzovat a výroba estersulfonátů, které se vyrábějí sulfonací methylesterů vyšších mastných kyselin, je vzhledem k přítomnosti esterové skupiny technologicky mnohem náročnější než příprava ostatních sulfonátů.

Alternativou k (2) jsou alkylpolyglukosidy (6), které jsou zcela na bázi obnovitelných surovin, jejich nevýhodou pro použití v práškových pracích prostředcích je jejich pěnivost a vyšší cena. Vzhledem k těmto vlastnostem se (6) používají v recepturách kosmetických mycích přípravků, tj. ve vlasových šamponech, tekutých mýdlech atp.

V budoucnosti lze zřejmě očekávat postupné snižování množství natriumdodecylbenzensulfonátu (1) v recepturách, ale zřejmě to bude proces pomalý, který však může být urychlen zvyšováním cen ropy, či legislativně, podobně jako se to stalo v České republice tohoto roku s fosfáty.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR: VZ 6046137305.

LITERATURA

1. Šmidrkal J.: Chem. Listy 93, 421 (1999).
2. Johansson I., Karsa D.: Surfactants derived from oils & fats; A Story of Continuous Development; 3rd Euro Fed Lipids Congress, Edinburgh, 5.-8.09.2004.
3. Sbírka zákonů ČR: Vyhláška 109/2005 Sb.

PL 6

SACHARIDY

JITKA MORAVCOVÁ

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Jitka.Moravcova@vscht.cz*

Sacharidy jsou nejdostupnější organické sloučeniny z obnovitelných zdrojů, a proto byly a stále jsou pokládány za perspektivní náhradu surovin z fosilních zdrojů. Jsou důležitou složkou naší potravy a v biologických systémech byly sacharidy po řadu let považovány pouze za stavební jednotky, zásobárnu energie, nezbytné složky pojivových tkání a součástí biologicky důležitějších molekul. V tomto posledním případě se jako významná role sacharidů oceňovala jejich schopnost modifikovat fyzikálně-chemické vlastnosti molekul, dodávat jim rozpustnost ve vodě či ovlivňovat prostorové uspořádání molekul pomocí sítí vodíkových vazeb, modulovat jejich biologickou aktivitu nebo stabilizovat jejich strukturu.

Zjištění, že rozpoznávání na buněčné úrovni je založeno na interakci sacharidového epitopu glykoproteinu nebo glykolipidu s proteinovým receptorem, vedlo k explozi zájmu o chemii sacharidů. Tak se sacharidy účastní adheze infekčních buněk na buňku hostitelskou, zrání a směřování leukocytů, interakci imunitního systému nebo tvorby a diferenciaci

rakovinných buněk a jejich metastáz a dalších životně důležitých pochodů. Porozumění tomu, jakými mechanismy sacharidy při těchto dějích vystupují, je velice důležité, protože rozpoznávání je vždy první fází onemocnění a cíleně zasáhnout v tomto okamžiku je samozřejmě žádoucí. Obecně hledání inhibitorů tohoto děje sleduje dva základní motivy: aktivitu proti biosyntéze glykokonjugátů a nebo interferenci s glykokonjugáty v procesu rozpoznávání. Přes obrovské úsilí vědců jsou zatím pokroky v hledání léčiv a vakcín na bázi sacharidů poněkud problematické. Důvodů je několik. Prozatím chybí metodika porovnatelná se syntézou peptidů na pevném nosiči, modifikace polyfunkčních molekul jsou vždy obtížné a drahé a sacharidy obecně mají dosti nevhodné vlastnosti pro použití jako léčiva: jejich afinita k proteinům je nízká a podávané orálně jsou inaktivní, protože jsou hydrolyzovány snadno enzymy *in vivo*. Mohou být proto podávány pouze injekčně pro léčbu akutních symptomů, ale i tak mohou podléhat ataku glykosidas např. v séru. Z uvedených důvodů je často výhodné nahradit sacharidy látkami, které napodobují jejich strukturu a funkci v procesu rozpoznávání, ale které mají lepší stabilitu, selektivitu, afinitu a syntetickou dostupnost. Nicméně pro porozumění procesu rozpoznávání je definování role sacharidů velice důležité, a proto bádání většinou začíná u sacharidů s cílem definovat ty funkční skupiny, které jsou pro interakce s proteiny nejdůležitější. Zvláštní pozornost bude v přednášce věnována hledání inhibitorů galaktosyltransferas.

Ovšem manipulace s polyfunkčními a polárními molekulami, jakými sacharidy jsou, přináší s sebou řadu překážek, které musí organický chemik překonávat. V přednášce budou uvedeny i příklady běžných organických reakcí, které vedly k neočekávaným produktům, pokud byly použity pro modifikace sacharidů.

Práce je součástí řešení výzkumného záměru MŠMT 6046137305 a projektu GA ČR 203/04/0355.

PL 7

PŘÍKLADY POUŽITÍ ORGANICKÉ POLAROGRAFIE

PETR ZUMAN

*Department of Chemistry, Clarkson University, Potsdam,
136 99 – 5810 NY, USA
zumanp@clarkson.edu*

Polarografie, t.j. měření křivek intenzity proudu v závislosti na napětí za použití kapkové rtuťové elektrody, je metoda objevená r. 1923 profesorem Jaroslavem Heyrovským (Nobelova cena 1959). Tato metoda patřila v letech 1950–1970 mezi pět nejčastěji užívaných analytických metod. Díky rozvoji chromatografických a dalších analytických metod je dnes k analýzám užívána méně. Jsou však stále obory, v nichž je použití polarografie výhodné při řešení problémů aplikovaného i základního výzkumu. Jen z naší laboratoře a ze spolupracujících pracovišť je možné uvést řadu příkladů takového použití polarografie z poslední doby (cca sedmi let). Jsou to analýzy léčiv, xenobiotik v životním prostředí, dále výzkum některých heterogenních systémů, jako studium reakce žlučových kyselin s ionty Me^{2+} , sledování interakce

nitrosaminů či pesticidů s ligninem apod. V heterogenních směsích byl též studován původ huminových kyselin a alkalický rozklad ligninu.

Mezi řešení problémů základního výzkumu patří studium elektronové delokalizace v azinovém seskupení $>\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{C}<$,

diprotonace hydrazonů a oximů, vznik iminu jako reakčního meziprojektu, důkaz vzniku karbinolaminů, hydratace azomethinových vazeb a vazeb $\text{C}=\text{O}$ v aromatických dialdehydech.