

STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE NOVÉ GENERACE LÉČIV A BIOMATERIÁLŮ: APLIKACE NMR KRYSTALOGRAFIE

MARTINA URBANOVÁ, JIŘÍ CZERNEK a JIŘÍ BRUS

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

Došlo 10.4.18, přijato 14.6.18.

Klíčová slova: NMR spektroskopie pevného stavu, léčiva, biomateriály, nové formulace, hybridní systémy

Obsah

1. Úvod
2. Strukturní rozmanitost pokročilých farmaceutických systémů
3. NMR krystalografie: tam kde RTG difrakce nestačí
4. NMR pohledy na farmaceutické systémy
 - 4.1. Peptidové deriváty kyseliny boronové a jejich unikátní struktura
 - 4.2. Tuhé polymerní disperze léčiv a mukoadhezivní-bukální filmy
 - 4.3. Hybridní materiály a nanomateriály ve službách medicíny
5. Závěr

1. Úvod

Akademie věd ČR zformulovala v roce 2014 svou novou strategii, nazvanou *Strategie AV21 (Špičkový výzkum ve veřejném zájmu)*, zaměřenou na posílení schopnosti identifikovat důležité vědecké a společenské otázky, fundovaným způsobem definovat problematiku a vypracovat návrhy řešení. Jedním z cílů této nové strategie je usnadnit přenos výsledků výzkumu do vzdělávací a aplikační sféry, zapojit partnery do tvorby a řešení výzkumných programů Akademie věd a přispět tak k vytvoření prostředí a podmínek pro novou kvalitu vzájemné spolupráce. Nástrojem k naplnění tohoto nově definovaného poslání Akademie věd jsou výzkumné programy, které reprezentují tři základní hodnoty Akademie věd, kterými jsou: *a)* posouvání hranic poznání, *b)* analýza proměn společnosti a globální výzvy, a *c)* vyspělé technologie.

Jedním z výzkumných programů definovaných Strategií AV21 je program *Molekuly a materiály pro život*, který se zaměřuje na výzkum nových chemických technologií s důrazem na ochranu životního prostředí a vývoj nových

prostředků pro moderní medicínu. Program staví na kombinaci přístupů jak medicínální chemie, tak makromolekulární, fyzikální a anorganické chemie, tradičně úspěšných oborů v Akademii věd ČR. Výzkumný program *Molekuly a materiály pro život* se realizuje ve třech liniích, které jsou koordinovány Ústavem makromolekulární chemie AV ČR v.v.i. (ÚMCH), a které jsou kromě ÚMCH řešeny na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. projektem *Biologicky aktivní molekuly* a Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR v.v.i. projektem *Nanostrukturní materiály pro katalýzu a ochranu životního prostředí*.

Realizace jednotlivých výzkumných projektů ve smyslu prohloubení mezioborové a mezi-institucionální spolupráce a posílení kontaktů s průmyslovými partnery primárně probíhá ve výzkumných centrech a aplikačních laboratořích. V případě ÚMCH je pro účely dosažení synergických efektů a nalezení efektivní spolupráce s partnery z farmaceutického průmyslu a farmaceutických fakult při vývoji farmaceuticky aktivních materiálů část výzkumného projektu *Makromolekulární systémy a biomateriály pro moderní medicínu* aktuálně řešena v rámci *Společné laboratoře NMR spektroskopie pevného stavu*, která je vybavena unikátním NMR spektrometrem, a kterou společně provozují ÚMCH AV ČR a ÚFCH JH AV ČR. Předmětem tohoto referátového příspěvku je shrnout nedávné aktivity realizované v rámci tohoto programu na poli farmaceuticky orientovaného výzkumu vedeného ve spolupráci s průmyslovými společnostmi.

2. Strukturní rozmanitost pokročilých farmaceutických systémů

Vývoj nové generace léčivých přípravků zahrnuje nejen sofistikovanou syntézu aktivních substancí (léčiv), ale vyžaduje i detailní pohled do jejich struktury. Tím nejpádnějším důvodem pro detailní strukturní charakterizaci léčiv je existence obtížně předpověditelného polymorfismu organických sloučenin a z něj plynoucí nezbytná ochrana spotřebitele. V současnosti reprezentují pevné farmaceutické produkty (tablety, kapsle, granule, apod.) asi 80–90 % trhu s léčivy. Aktivní farmaceutické ingredience (API) v nich obsažené se vyskytují v různých pevných formách: jsou krystalické, amorfni případně kapalně-krystalické. V případě těch krystalických se pak daná molekula API obvykle vyskytuje v řadě různých modifikací. Tento jev, zvaný polymorfismus, který je vlastní téměř všem organickým sloučeninám, však značně komplikuje vývoj a výrobu léčiv. Biologická dostupnost léčiva je totiž silně závislá na kinetice jeho rozpouštění, a tím tedy i na

jeho krystalové struktuře. Tento fakt je snadno pochopitelný, když si uvědomíme, že diamant a grafit jsou dvě krystalové (alotropické) modifikace jednoho a téhož – čistého uhlíku. Vlastnosti obou modifikací jsou však zcela rozdílné. Podobně je tomu i u léčiv a jejich různých modifikací. Je nutné si uvědomit, že základní podmínkou úspěšné léčby je rozpuštění léčiva z pevné lékové formy a přestup molekul aktivní substance do krevní plazmy. A ačkoli je nutno hledat vlastní terapeutickou aktivitu dané molekuly ve složitých biochemických cyklech, první krok vedoucí k účinné terapii je řízen triviální vlastností, jakou je rozpouštěcí rychlost. Máme-li na paměti značně rozdílné vlastnosti krystalových forem uhlíku, asi nikoho nepřekvapí, že i rozpouštěcí rychlost aktivních substancí se značně liší pro různé krystalové modifikace a amorfní formy látek. Příčinu tohoto chování pak musíme hledat právě v uspořádání molekul léčiva v krystalové struktuře.

V současné době tak kvalitu léčiv přísně sledují státní instituce, jako jsou např. Food and Drug Administration (FDA, USA), Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL, ČR) nebo European Medicines Agency (EMA, EU). Farmaceutický průmysl je tak nucen hledat efektivní postupy kontroly kvality jak vstupních surovin, tak i výsledných produktů. A právě ve *Společné laboratoři NMR spektroskopie pevného stavu* dochází k vypracování nových postupů analytických technik NMR krystalografie vedoucích k monitorování výroby farmakoproduktů, ke snadné a bezpečné identifikaci příměsí a pro detailní popis krystalové struktury farmaceuticky aktivních látek (API). Konečným cílem výzkumu je optimalizace těchto postupů pro charakterizaci nových léčiv na bázi nanokrystalických nebo částečně uspořádaných až amorfních systémů, které jsou v současné době intenzivně zkoumány. Vzhledem k současným vysokým nárokům, které jsou na kvalitu a charakterizaci léčiv kladeny, jsou tyto metody cíleně navrženy pro průmyslové podmínky tak, aby poskytovaly požadované informace v krátkém čase na základě minimalizovaného množství experimentálních dat.

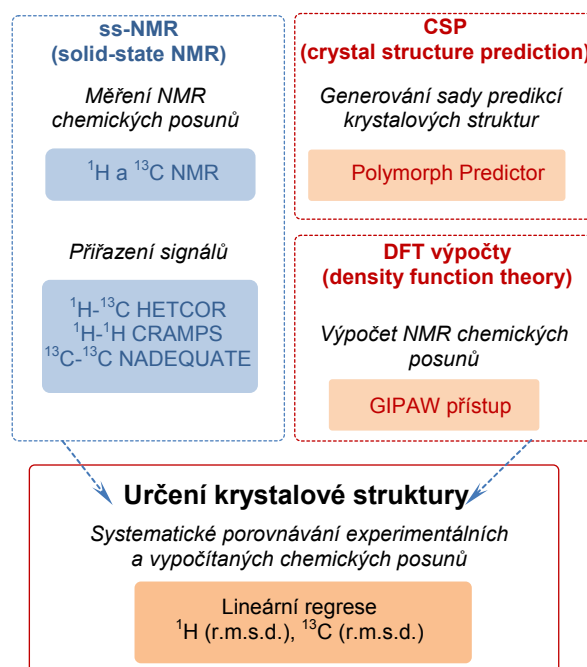
3. NMR krystalografie: tam kde RTG difrakce nestačí

Již více než 60 let nanomateriály přitahují pozornost vědecké obce. V oblasti nanomedicíny snaha o optimalizaci terapeutické účinnosti nově objevených účinných sloučenin vedla k vývoji supramolekulárních systémů, které mohou vykonávat současně více funkcí a umožňovat tak nejen cílenou dopravu léčiv na místo určení, poskytovat mu časově omezenou ochranu a následně ho kontrolovaně uvolňovat, ale také kombinovat výhody pevných a kapalných lékových forem^{1,2}. Právý potenciál těchto systémů však nebyl dosud plně využit. Kromě formulace nejmodernějších syntetických postupů vývoj těchto supramolekulárních materiálů totiž vyžaduje přesnou strukturní charakterizaci jednotlivých prvků systému a popis vzájemných vztahů mezi nimi. V této souvislosti se však jedná o velmi přísný požadavek, neboť tyto sys-

témy se přirozeně nacházejí na hranici mezi krystalickými a amorfními pevnými látkami, pro které jsou vysoce kvalitní difrakční údaje jen obtížně dosažitelné. V této souvislosti prokázala svůj pozoruhodný potenciál NMR krystalografie³.

V širším smyslu slova NMR krystalografie představuje experimentálně-výpočetní přístup kombinující analýzu difrakčních dat s měřením NMR parametrů za účelem zpřesnění struktur komplexních molekulárních systémů, flexibilních a částečně neuspořádaných segmentů, pro zkoumání změn lokálních struktur indukovaných dehydratací nebo desolvatačním procesem či pro detailní analýzu systému vodíkových vazeb a dalších nekovalentních interakcí^{4–6}. Koncept NMR krystalografie vyvinutý ve skupině L. Emsleyho v letech 2010–2013 však představuje zcela jedinečný protokol *ab-initio* určování krystalové struktury látek, který je založený na kombinaci NMR spektroskopie pevné fáze (ss-NMR), počítačové predikce modelů krystalových struktur (CSP) a kvantově-chemických (DFT) výpočtů izotropních hodnot chemických posunů^{7–10}.

Jak plyne z grafického znázornění na obr. 1, difrakční data se při tomto experimentálním uspořádání vůbec nedostávají do procesu určování a upřesnění krystalové struktury. Experimentálně je tento přístup založen na přesném změření souboru izotropních chemických posunů ¹H a ¹³C jader, což jsou základní NMR parametry, které jsou dostupné snadno a s vysokou přesností pomocí standardních ss-NMR technik. Paralelně s experimenty pak probíhá počítačové generování souboru modelů a predikcí krystalových struktur. K této proceduře dnes existuje celá řada



Obr. 1. Schématická reprezentace experimentálně-výpočetního konceptu práškové NMR krystalografie

sofistikovaných nástrojů, a jak vyplynulo ze série pravidelných slepých testů¹¹, nedávný vývoj výpočetních metod vyústil ve schopnost velmi spolehlivě předpovídat krystalové struktury stabilních fází široké škály organických sloučenin. Dnes je možno vygenerovat stovky a tisíce krystalových struktur ve velmi krátkém čase (desítky hodin). A tak klíčovým bodem přístupu práškové NMR krystalografie je spolehlivý výběr správné krystalové struktury z velkého počtu strukturních predikcí.

V této souvislosti se prokázalo, že citlivým parametrem pro výběr správné krystalové struktury jsou izotropní chemické posuny ^1H a ^{13}C jader. Díky kvantově-chemickým výpočetním procedurám přímo popisujícím periodické molekulární systémy jsou totiž teoreticky vypočítané hodnoty NMR parametrů velmi spolehlivé. A tak se prokázalo, že systematické porovnávání experimentálních a teoreticky vypočítaných hodnot vede k nalezení správné krystalové struktury i v rozsáhlém souboru strukturních predikcí. Klíčovým parametrem pro identifikaci správné struktury je hodnota střední kvadratické odchylky (r.m.s.d.) mezi experimentálními a teoreticky spočítanými hodnotami získaná lineární regresí. Na řadě organických krystalických sloučenin již bylo dostatečně ilustrováno, že správná krystalová struktura je vždy charakterizována nejmenší střední kvadratickou odchylkou ^1H NMR izotropních chemických posunů, přičemž tato hodnota je menší než 0,5 ppm. Současně musí být střední kvadratická odchylka ^{13}C NMR izotropních chemických posunů menší než 2,5 ppm (cit. 7–10,12). Zároveň je nezbytné, aby všechny signály v ^1H a ^{13}C MAS NMR spektrech byly explicitně přiřazeny. Pro tento účel jsme vypracovali postup predikce ^1H - ^{13}C NMR korelačních spekter^{13,14}.

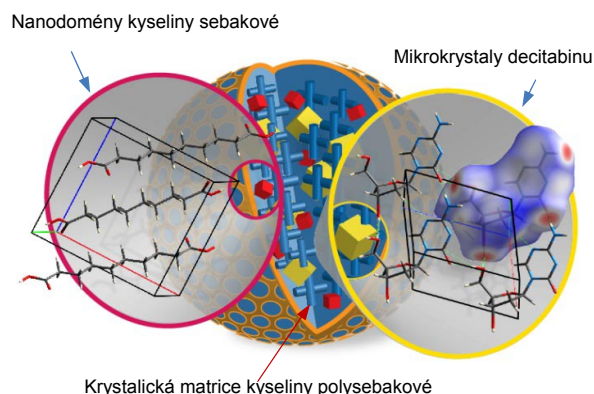
Výše uvedené prahové hodnoty jsou tak nezbytnou podmínkou indikující správný model krystalové struktury. V ideálním případě by kvantově-chemickými výpočty (metodikou založenou na teorii hustotního funkcionálu, DFT, aplikovanou na periodické systémy) byla zoptimalizována geometrie a vypočítány hodnoty ^1H a ^{13}C NMR izotropních chemických posunů všech predikovaných struktur. Ve skutečnosti však, díky časové náročnosti DFT výpočtů, je nutno nejprve prvotní množinu predikcí krystalových struktur zúžit a vybrat reprezentativní sadu fyzikálně realistických modelů. K tomu slouží hodnota relativní mřížkové energie, kdy se prokázalo, že hledaná správná krystalová struktura se nachází v souboru modelů s relativní mřížkovou energií nižší než 30 kJ mol^{-1} . S rozvojem algoritmů predikce krystalových struktur a s rozvojem výpočetní techniky však lze v budoucnu očekávat, že tento primární předvýběr bude postupně ztrácet na důležitosti.

Až do nedávné doby bylo určení krystalových struktur využívající výhradně analýzu izotropních NMR chemických posunů aplikováno pouze na krystalograficky uniformní systémy organických látek^{7–10,12}. Skutečný potenciál přístupu NMR krystalografie však spočívá ve strukturním popisu komplexních polykrystalických kompozitů s mikro- nebo nanodoménovou architekturou či směsí krystalických látek, pro které je prakticky nemožné zdokonalování přímých krystalových struktur XRPD dat. Tuto

skutečnost lze velmi dobře dokumentovat na případě strukturní analýzy nedávno vyvinuté pokročilé formulace decitabinu, což je nový inhibitor methyltransferas DNA, určený k léčbě myelodysplastického syndromu a akutní či chronické myeloidní leukemie. V krevním řečišti však tento inhibitor velmi rychle podléhá nevratné hydrolyze. Pro zpomalení tohoto procesu tak byl decitabin přeformulován do podoby injektovatelných bio-degradovatelných mikročástic na bázi semikrystalické matrice kyseliny polysebakové. V této matici jsou pak dispergovány mikrokrystalky aktivní substance a nanodomény krystalické kyseliny sebakové¹⁵.

S využitím doménově citlivých NMR experimentů¹⁵ byly na základě rozdílu v rychlostech spinových relaxací zkoumané polyanhydridové mikročástice nejprve spektroskopicky rozloženy na jednotlivé složky. Tak byla odhalena přítomnost krystalické polymerní matrice, která je doprovázena imobilizovanou (sklovitou) amorfni fází, a mikrokrystalické domény decitabinu doprovázené nanodoménami krystalické kyseliny sebakové. Následně pak, s využitím výše popsané strategie NMR krystalografie, byla detailně popsána poměrně složitá hierarchická struktura a vnitřní architektura této formulace decitabinu a pro každou krystalickou fázi byla určena její krystalová struktura (obr. 2).

Je tedy zřejmé, že díky vzájemnému synergickému působení mezi pokročilými experimenty a výpočetními přístupy predikce a optimalizace struktur lze formulovat a optimalizovat postup stanovení krystalových struktur v atomárním rozlišení i pro systémy, pro které je získání požadovaných strukturních informací konvenčními metodami prakticky nedostupné. Metoda NMR krystalografie tak může být obecně aplikována pro různé polykrystalické systémy a mikro- či dokonce nano-kompozity se složitou hierarchickou architekturou. To je obzvláště vhodné pro systémy, ve kterých může docházet k nepředvídatelným fázovým transformacím či spontánnímu vzniku nových



Obr. 2. Grafická reprezentace vnitřní struktury mikročásticového dopravníkového systému decitabinu (upraveno podle cit. 15)

polymorfních forem indukovaných pod vlivem okolní matrice.

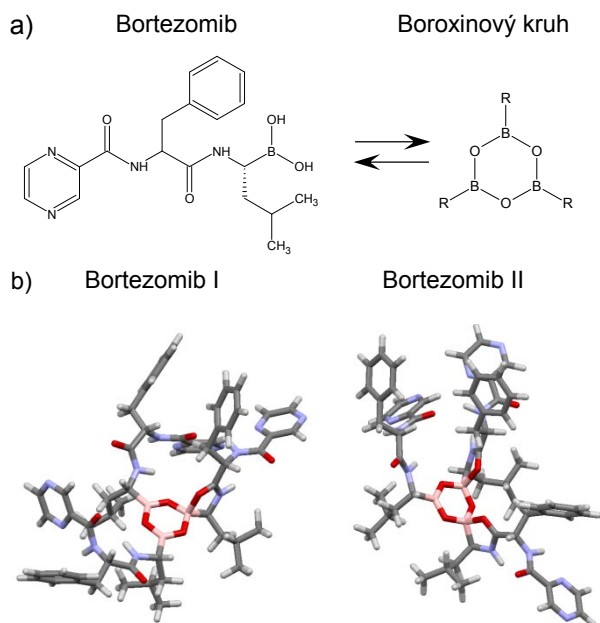
4. NMR pohledy na farmaceutické systémy

Limitujícím faktorem přístupu NMR krystalografie je nutnost systému existovat v krystalickém stavu, tedy zaujmout periodické a pokud možno rigidní uspořádání a mít známou a jasně definovanou chemickou strukturu (strukturní vzorec). Ačkoli se druhý požadavek může zdát zbytečný, protože léčivé substance přeci musí být chemicky jasně definovány, existují zajímavé aktivní látky na bázi kyseliny boronové, které mohou spontánně podléhat řadě reverzibilních chemických procesů. Díky tomu je struktura dané látky v pevném stavu obtížně předpověditelná. Příkladem takových farmaceuticky aktivních substancí mohou být bortezomib či ixazomib.

4.1. Peptidové deriváty kyseliny boronové a jejich unikátní struktura

Organické sloučeniny obsahující atomy boru jsou již dlouho známé jako potenciálně velmi účinné farmaceutické ingredience. V této souvislosti vedly nedávné výzkumy k objevení mnoha slibných vysoce účinných farmaceutických prostředků vykazujících cytostatickou a antibakteriální aktivitu. Příkladem těchto aktivních substancí jsou bortezomib či ixazomib či látky známé pod kódovým označením MLN978, CEP-18770, GSK2251052. Výzkum těchto sloučenin se významně zrychluje také proto, že deriváty kyseliny borité a boronové hrají klíčovou úlohu v mnoha oborech organické, bioorganické, makromolekulární či supramolekulární chemie^{16–19}. Kontrolovaná reverzibilní kondenzace fragmentů kyseliny boronové totiž otevřela cestu k syntéze zcela nových a unikátních supramolekulárních systémů, polymerů, hydrogelů či kovalentních organických mřížek, které vykazují specifické sorpční a katalytické vlastnosti^{20–22}. Plné využití všech těchto systémů však vyžaduje jejich přesnou strukturní charakterizaci. Tento požadavek platí především pro systémy amorfní, které neposkytují kvalitní difrakční záznamy.

Bortezomib, inhibitor proteozomu schválený pro léčbu mnohočetného myelomu, představuje jedinečnou kombinaci látky s vysokou multilaterální farmaceutickou aktivitou s komplexní supramolekulární strukturou v pevném stavu. Bortezomib krystalizuje ve dvou krystalových modifikacích I a II, a jak je popsáno v registrační dokumentaci a v patentové literatuře, v pevném stavu pravděpodobně existuje ve formě anhydridu kyseliny boroxinové (obr. 3a), ačkoli tato jeho boroxinová struktura nebyla potvrzena. Proto jsme v této souvislosti ve spolupráci se společností TEVA Czech Industries vyvinuli velmi efektivní experimentální procedury, které umožňují rychle a spolehlivě popsat vznik těchto unikátních a velmi rozmanitých struktur, jež reverzibilně vznikají postupnou samo-organizací základních stavebních bloků kyseliny boronové²³. Základem těchto experimentálních postupů je



Obr. 3. Strukturní vzorec bortezomibu a boroxinového cyklu, kde R = peptidová část molekuly (a), a DFT optimalizované struktury bortezomibu formy I a II (b)

¹¹B NMR spektroskopie^{24–26}

Pomocí dvoudimenzionálních (2D) ¹¹B-¹¹B NMR korelačních technik podporovaných kvantově-chemickými (DFT) výpočty jsme vytvořili spolehlivý a účinný nástroj pro sledování kovalentních samo-uspořádávacích procesů derivátů kyseliny boronové v pevném stavu. Prokázalo se, že zaznamenané ¹¹B NMR parametry citlivě reagují i na velice jemné změny v lokální geometrii, přičemž lze tyto změny spolehlivě interpretovat a přímo vizualizovat DFT výpočty. Navíc jsme zjistili, že výstavbové křivky dvoukvantových (DQ) ¹¹B-¹¹B signálů velmi přesně odráží borborové meziatomové vzdálenosti a to až do vzdálenosti 6 až 7 Å (cit. ^{24,27}). V případě bortezomibu byla takto stanovena uniformní B...B vzdálenost 2,6 Å, což jednoznačně odpovídá boroxinovému cyklu. Analýzou ¹¹B MAS NMR spekter jsme také zjistili, že boroxinové kruhy jsou vnitřně stabilizovány transformací jednoho až dvou atomů boru z trigonální koordinace směrem k tetraedrální geometrii za vzniku sekundárních pětičlenných kruhů (obr. 3b).

Je tedy zřejmé, že kombinace experimentálních ¹¹B NMR přístupů s kvantově-chemickými výpočty umožnila podrobně sledovat nejen již dříve předpovězenou kondenzaci molekul bortezomibu, ale také odhalit unikátní dříve nepopsané lokální struktury boroxinových motivů obou polymorfů bortezomibu. Polymorfismus těchto farmaceuticky aktivních látek tak získal zcela nový rozměr. A tak díky schopnosti přesně popsat všechny procesy, ke kterým dochází při výrobě a formulaci léčiv na bázi peptidových derivátů kyseliny boronové, se podstatně otevírá cesta ke snadnější optimalizaci nových vysoce aktivních kancerostatik.

4.2. Tuhé polymerní disperze léčiv a mukoadhezivní-bukální filmy

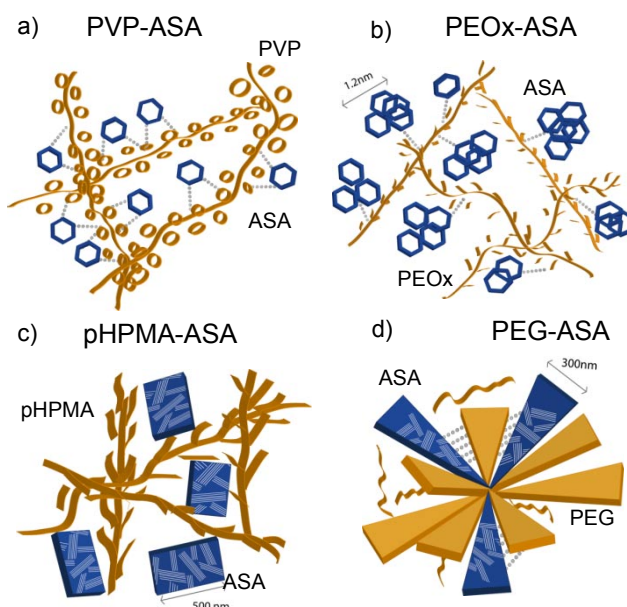
Polymery hrají při vývoji nových biomateriálů a formulaci pokročilých lékových forem významnou roli. Polymery díky své strukturní a chemické variabilitě jsou nedílnou součástí systémů pro cílenou dopravu a kontrolované uvolňování léčiv. Pomocné látky na bázi polymerní matrice pak umožňují stabilizovat aktivní látky v podobě tuhých disperzí, které vykazují neobvyklou variabilitu vnitřní architektury a s ní spojených fyzikálně-chemických vlastností^{28,29}.

S využitím technik NMR spektroskopie pevného stavu založených na sledování ^1H spinové difuze jsme mohli detailně nahlédnout do struktury těchto kompozitních materiálů a odhalit klíčovou roli polymerní matrice při stabilizaci a tvorbě těchto disperzí aktivních látek. Při rozsáhlém testování řady polymerů lišících se v chemickém složení a délce polymerního řetězce se prokázalo, že daná aktivní substance (např. kyselina acetylsalicylová, kterou obsahuje např. lék Acylpirin) může vytvářet minimálně čtyři zcela odlišné typy tuhých disperzí (obr. 4)²⁸. Tuhý roztok molekulárně dispergované kyseliny acetylsalicylové (ASA) vzniká v matrici polyvinylpyrrolidonu (PVP) (obr. 4a), zatímco v matrici tvořené poly-2-ethyl-2-oxazolinem (PEOx) byly identifikovány klastry aktivní látky o velikosti několika nanometrů (obr. 4b). Amorfní skelná suspenze mikrokrytalitů aktivní substance pak vzniká v matrici poly-*N*-(2-hydroxypropyl)-metakrylamidu (PHPMA) (obr. 4c) a v krystalické matrici polyethylenoxidu (PEG)

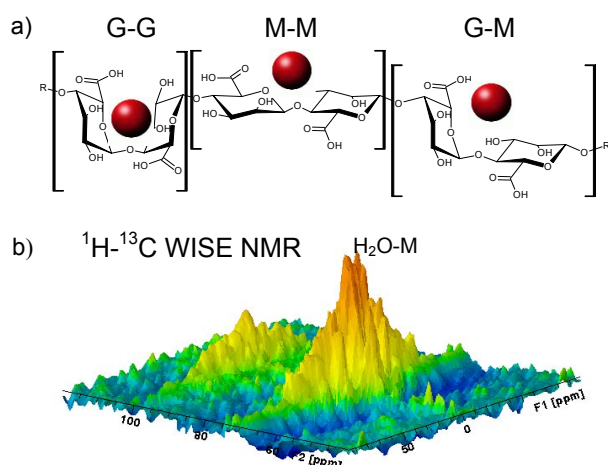
vzniká krystalická tuhá disperze nanokrytalitů kyseliny acetylsalicylové (obr. 4d). Rozdíly ve struktuře se samozřejmě promítly do rychlosti uvolňování léčiva, do disolučních profilů, které bylo možno dále optimalizovat a kontrolovat délkou polymerních řetězců.

Polymery však mohou sloužit nejen jako nosič aktivní terapeutické farmaceutické ingredience, ale mohou zároveň vytvářet podporu pro růst buněk. A tak v souvislosti s vývojem nových biomateriálů jsme se nedávno intenzivně zabývali hledáním optimálních síťovacích činidel alginátů, což jsou přírodní polysacharidy široce používané pro buněčné transplantace. Algináty patří mezi hydrokoloidy, tj. vysokomolekulární látky charakterizované schopností pevně a stabilně vázat značná množství vody (až stonásobek vlastní hmotnosti). Hydrogely s algináty se dnes používají v lékařství u různých poranění jako ochranná vrstva mezi poškozenou tkání a obvazem, a také ve spojení s živými buňkami mohou sloužit jako „inkoust“ do 3D tiskáren pro tisk matrice lidských orgánů, např. ucha.

Alginát je po chemické stránce polysacharid tvořený dvěma složkami – manurátem (M) a guluronátem (G) (obr. 5a). Obě složky jsou do struktury alginátu zabudovány ve formě bloků. V molekule alginátu můžeme střídavě nalézt různě velké oblasti tvořené buď molekulami M, nebo G. Tato zdánlivá maličkost je pro vlastnosti alginátu velice důležitá. Gel vzniká v přítomnosti dostatečného množství vícemocných iontů. Vazebnými místy jsou především sekvence G úseků obsahujících alespoň čtyři jednotky guluronové kyseliny. Sekvence bohaté na M bloky hrají klíčovou roli mediátorů při samouspořádávání alginát-



Obr. 4. Grafická reprezentace vnitřní architektury tuhých disperzí kyseliny acetylsalicylové (ASA) v matrici polyvinylpyrrolidonu (PVP) (a), poly-2-ethyl-2-oxazolinu (PEOx) (b), poly-*N*-(2-hydroxypropyl)-metakrylamidu (PHPMA) (c) a polyethylenoxidu (PEG) (d) (upraveno podle cit.²⁸)



Obr. 5. Grafická reprezentace struktury alginátového řetězce s diádami guluronových a manuronových jednotek (a) a dvoudimenzionální (2D) ^1H - ^{13}C WISE NMR spektrum alginátu síťovaného iontem Al^{3+}

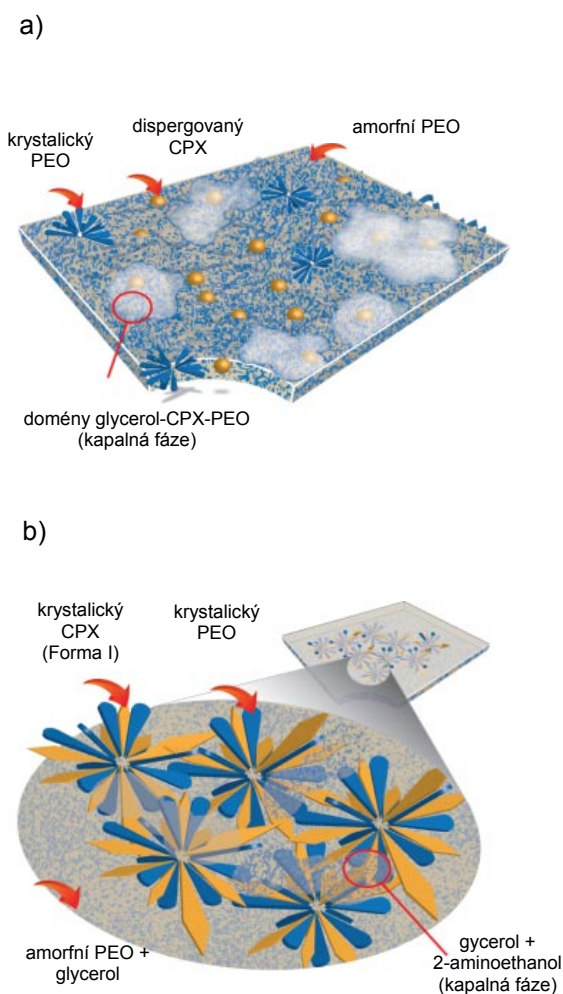
tových gelů. Ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně (VFU) jsme našli zákonitost mezi velikostí (iontovým poloměrem) síťovacího iontu a strukturálními defekty v oblasti manuronových bloků. Ty zcela jistě hrají roli mediátorů, které svou otevřenou konformací a jistou flexibilitou umožňují komplexaci guluronových bloků, jež tak zajišťují tvorbu sítě v podobě fragmentů podle „egg-box“ modelu³⁰. Také se podařilo prokázat preferenční lokalizaci vody v blízkosti manuronových jednotek, což lze dobře dokumentovat na štěpení signálu M-jednotek v ^1H - ^{13}C WISE NMR spektru (obr. 5b). Snad i díky tomu vykazují tyto M-jednotky zvýšenou segmentovou pohyblivost³¹.

Polymery jsou tedy vhodným nosičem léčiva či podpůrným prvkem pro růst tkání, kdy se např. termálně zpracovaný polyakrylonitril díky své unikátní 3D struktuře jeví jako ideální materiál pro regenerativní medicínu³². Mohou mít také funkci terapeutickou. Typickým příkladem je Sevelamer nebo Colesevelam, což jsou nerozpustné zesíťované polymery používané například ke snížení zvýšeného obsahu nízkohustotního lipoproteinového cholesterolu (LDL-C) u pacientů s primární hyperlipidemií. Na obdobném principu vychytávání nežádoucích látek (iontů Cu^{2+}) byl nedávno vyvinut v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR systém na bázi modifikované celulosy a zesíťovaného chitosanu s kovalentně vázaným 8-hydroxychinolinem, který vykazuje neobvyklý potenciál být vynikajícím terapeutickým prostředkem pro léčbu Wilsonovy nemoci³³.

Užitečnost polymerů také může ležet v jejich mechanických vlastnostech, jako je elasticita, houževnatost či přilnavost k povrchu. Materiál kombinující tyto vlastnosti je pak ideální pro terapeutické aplikace kombinované

s lokálním krytím zánětlivých ložisek v dutině ústní. A tak nejnovější lékovou formou určenou pro aplikaci na orální sliznici jsou mukoadhezivní buklální filmy (MBF) na bázi syntetických polymerů. Díky nanosenému polymernímu filmu s účinnou látkou dojde nejen k prodloužení doby expozice léčivé látky, ale také k ochraně léze před mechanickými stresy dutiny ústní. MBF mohou být také použity i pro systémovou léčbu, kdy je výhodou přímé vstřebání účinné látky přes ústní sliznici do krevního oběhu, a kdy se léčivo na rozdíl od běžného orálního podání dostává na cílové místo, aniž by prošlo v první fázi játry. Dalšími výhodami oproti perorálnímu podání jsou nízká enzymatická aktivita v ústech, stejně jako dobrý přístup k léčivu a jeho snadné odstranění v případě vzniku nežádoucích efektů. MBF jsou koncipovány jako vrstvené folie, skládající se ze dvou nebo tří vrstev. Setrvání těchto filmů v dutině ústní je pak projevem tzv. mukoadheze, která je specifickým případem bioadheze, kdy dochází ke vzájemnému prolétání a penetraci makromolekulárních řetězců polymeru a mucinu a posléze k vytvoření interakcí mezi těmito řetězci.

Součástí našeho nedávného výzkumu byla příprava a strukturální charakterizace mukoadhezivních buklálních filmů, kde aktivní látkou byl ciclopirox olamin (CPX), což je syntetický antimykotický prostředek pro topickou dermatologickou léčbu povrchových mykóz, který byl zabudován do matrice polyethylen oxidu (PEO) měkčeného glycerolem³⁴. Bylo neobvyklé, že systémy, které obsahovaly malé množství aktivní látky (CPX), vykazovaly rychlé uvolnění léčiva a ztrátu mechanických vlastností, zatímco systémy s vysokým obsahem CPX vykazovaly požadované zpomalené uvolňování léčiva při zvýšené mechanické odolnosti proti poškození na sliznici, kdy elasticita a plasticita tohoto materiálu byla překvapivě vysoká. Kombinací různých typů experimentů NMR v pevném stavu bylo zjištěno, že tyto materiály se dramaticky liší ve své struktuře. Filmy s nízkým obsahem CPX vytvořily dvoufázové nanoheterogenní filmy, ve kterých byla aktivní látka molekulárně dispergována v amorfni matrici PEO. Tato amorfni matrice pak byla osídlena malým množstvím krystalitů polymeru (obr. 6a). Na druhou stranu, systémy s vysokým obsahem CPX vykazovaly architekturu pseudo-kokrytalické tuhé disperze, kdy léčivo vykrytalizovalo v mezilamelárním prostoru krystalitů polymerní matrice (obr. 6b). Tyto filmy také obsahovaly velmi malé množství amorfni fáze, což v kombinaci se vzájemnými povrchovými interakcemi krystalitů aktivní látky a polymerní matrice způsobilo jak zvýšení mechanické odolnosti, tak i zpomalení uvolňování léčiva. Je to tedy kombinace dvou faktorů, která definuje strukturální a fyzikálně-chemické vlastnosti těchto systémů: a) přístupnost a afinita vhodných molekulárních míst pro tvorbu interakce polymer-léčivo s vodíkovou vazbou a b) tendence polymerních řetězců ke vzniku vysoce krystalické fáze. Je tedy zřejmé, že biologickou dostupnost léčiva lze účinně řídit cíleným strukturováním mukoadhezivních buklálních filmů.



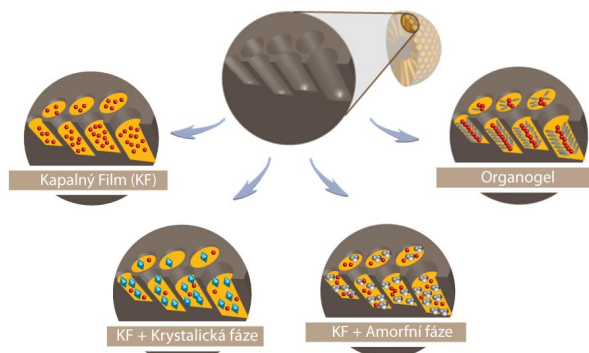
Obr. 6. Grafická reprezentace vnitřní architektury mukoadhezivních bukálních filmů (MBF) ciclopirox olaminu (CPX) na bázi polyethylenoxidu (PEO). Systém s nízkým obsahem aktivní látky je uveden na obrázku (a), zatímco typický systém s vysokým obsahem aktivní složky je znázorněn na obrázku (b) (upraveno podle cit.³⁴)

4.3. Hybridní anorganicko-organické materiály a nanomateriály ve službách medicíny

Exkurze světem struktury pokročilých farmaceuticky aktivních materiálů a bio-materiálů vyvíjených v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR a viděná očima NMR spektroskopie pevného stavu se pomalu blíží ke svému závěru, ale zároveň se vrací na začátek. Richard Feynman již téměř před šedesáti lety otevřel dveře do světa nanomateriálů a nanotechnologií. V oblasti nanomedicíny nedávné úsilí o optimalizaci terapeutické účinnosti nově objevených léčiv vedlo k formulaci originálních nanostrukturních systémů, které umožňují nejen cílené doručení léčiva, jeho řízené uvolňování a dočasnou ochranu, ale také kombinují

výhody pevných a kapalných lékových forem. V této souvislosti byly vyvinuty systémy, které se makroskopicky chovají jako pevné práškové materiály, ale které ve své porézní hmotě ukrývají aktivní substance ve formě kapalné a tudíž snadno uvolnitelné do tělních tekutin. Tyto „liquisolid“ systémy jsou založeny na zabudování kapalného filmu aktivní látky na povrch mezoporézní siliky, kdy se jako rozpouštědlo obvykle používá PEO s nízkou molekulovou hmotností. A ačkoli již bylo mnoho učiněno při syntéze těchto materiálů, velmi málo je známo o jejich struktuře, zvláště o molekulární struktuře aktivních látek na fázovém rozhraní. Vzhledem ke komplexnosti slabých, a většinou reverzibilních interakcí mezi povrchem a aktivní sloučeninou lze očekávat vznik řady nejrůznějších uspořádání a to od tvorby kapalných filmů, vzniku krystalických, amorfních i částečně uspořádaných domén až po vznik jakýchkoli protokrystalických či kapalně-krystalických fází (obr. 7)^{35,36}.

Z toho důvodu, ve spolupráci s farmaceutickou společností Teva Czech Industries a Ratiopharm GmbH, soustavně rozvíjíme spolehlivé experimentálně-výpočetní strategie, které poskytují jasný pohled na strukturu těchto komplexních hybridních anorganicko-organických systémů mikročástic pro podávání léků na úrovni atomového rozlišení. V této souvislosti jsme již dokázali vyvinout relativně jednoduchou a robustní metodu, kdy jsme též prokázali vznik exotických částečně uspořádaných (protokrystalických) fází léčiv, které vznikají na povrchu indukovanými porézní strukturou nosiče³⁵. Tyto silně organizované fáze reprezentují netradiční formu hmoty nacházející se na rozhraní kapalné a pevné fáze, neboť stále vykazují chování roztoku, kdy molekuly jsou pohyblivé a vykazují jistou nezanedbatelnou kooperativní dynamiku a díky tomu usnadňují uvolnění léčiva do tělních tekutin. Na druhou stranu tyto fáze zároveň vykazují vysokou míru molekulárního uspořádání a architektury, která tak dává systému dostatečnou dlouhodobou stabilitu při skladování léčiva.



Obr. 7. Grafická reprezentace vnitřní architektury typických hybridních anorganicko-organických „liquisolid“ systémů

5. Závěr

Vedle sofistikované supramolekulární syntézy vyžaduje vývoj nových materiálů a nanomateriálů, pro farmaceutické a biomedicínální aplikace, mít k dispozici účinný nástroj, kterým je možné sledovat strukturní a chemické přeměny těchto komplexních systémů v atomárním rozlišení. Jedná se však o velice přísný požadavek, neboť nově formulované mnohasložkové systémy se přirozeně nacházejí na hranici mezi krystalickými a amorfními pevnými látkami, pro které jsou vysoce kvalitní difrakční data jen obtížně dosažitelná. Jak však vyplývá z výše uvedené krátkého shrnutí, jsou to nejmodernější kombinace pokročilých technik NMR spektroskopie pevného stavu, práškové rentgenové difrakce a kvantově-chemických výpočtů, které nabízejí značné množství velmi efektivních strategií, jak nahlédnout do nitra nanostrukturovaných a mnohdy hybridních materiálů a nalézat nové a někdy i netradiční formy hmoty.

Vývoj pokročilých funkčních materiálů a nanomateriálů běží kupředu tempem tak rychlým, že mnohdy je obtížné nové objevy a trendy zachytit a efektivně převést do široké praxe. V této věci je tudíž nezbytná úzká spolupráce s aplikační sférou, znalostně orientovanými průmyslovými společnostmi, které dokáží předefinovat někdy velice komplikovaný a široce pojímaný akademický problém. Další nezbytností pro docílení efektivního výzkumu je multidisciplinární a meziinstitucionální spolupráce, kdy spojením značného znalostního potenciálu různých specializovaných institucí povede k dosažení značných synergetických efektů a nalezení řešení vědeckého problému v reálném čase. Farmaceuticky a bio-medicínálně orientovaný výzkum realizovaný v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR tyto atributy dlouhodobě naplňuje. A právě díky intenzivní a dlouhodobé spolupráci ústavu s průmyslovými společnostmi, jako je např. Teva Czech Industries, s.r.o., Zentiva k.s., a univerzitními pracovišti např. s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, či Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně, mohlo být dosaženo výše uvedených výsledků.

Autoři článku děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR za finanční podporu výzkumu v rámci programu Národní program udržitelnosti I (NPU I), projekt LO1507 POLYMAT.

LITERATURA

- Chen B., Wang Z. H., Quan G. L., Peng X. S., Pan X., Wang R. C., Xu Y. H., Li G., Wu C. B.: *Int. J. Nanomedicine* 7, 199 (2012).
- Peer D., Karp J. M., Hong S., Farokhzad O. C., Margalit R., Langer R.: *Nat. Nanotechnol.* 2, 751 (2007).
- Harris R. K., Wasylishen R. E., Duer M. J. (ed.): *NMR crystallography*, J. Wiley, Chichester UK 2009.
- Hughes C. E., Reddy G. N. M., Masiero S., Brown S. P., Williams P. A., Harris K. D. M.: *Chem. Sci.* 8, 3971 (2017).
- Luedeker D., Gossmann R., Langer K., Brunklaus G.: *Cryst. Growth Des.* 16, 3087 (2016).
- Fernandes J. A., Sardo M., Mafra L., Choquesillo-Lazarte D., Masciocchi N.: *Cryst. Growth Des.* 15, 3674 (2015).
- Salager E., Day G. M., Stein R. S., Pickard C. J., Elena B., Emsley L.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2564 (2010).
- Baias M., Dumez J. N., Svensson P. H., Schantz S., Day G. M., Emsley L.: *J. Am. Chem. Soc.* 135, 17501 (2013).
- Baias M., Widdifield C. M., Dumez J. N., Thompson H. P. G., Cooper T. G., Salager E., Bassil S., Stein R. S., Lesage A., Day G. M., Emsley L.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 8069 (2013).
- Leclaire J., Poisson G., Ziarelli F., Pepe G., Fotiadu F., Paruzzo F. M., Rossini A. J., Dumez J. N., Elena-Herrmann B., Emsley L.: *Chem. Sci.* 7, 4379 (2016).
- Reilly A. M., Cooper R. I., Adjiman C. S. a 90 spoluautorů: *Acta Cryst. B* 72, 439 (2016).
- Brus J., Czernek J., Kobera L., Urbanová M., Abbrent S., Husak M.: *Cryst. Growth Des.* 16, 7102 (2016).
- Czernek J., Brus J.: *Chem. Phys. Lett.* 586, 56 (2013).
- Czernek J., Brus J.: *Chem. Phys. Lett.* 608, 334 (2014).
- Brus J., Czernek J., Hruby M., Svec P., Kobera L., Abbrent S., Urbanová M.: *Macromolecules* 2018 (odesláno).
- Baker S. J., Ding C. Z., Akama T., Zhang Y. K., Hernandez V., Xia Y.: *Future Med. Chem.* 1, 1275 (2009).
- Smoum R., Rubinstein A., Dembitsky V. M., Srebnik M.: *Chem. Rev.* 112, 4156 (2012).
- Baker S. J., Tomsho J. W., Benkovic S. J.: *Chem. Soc. Rev.* 40, 4279 (2011).
- Dick L. R., Fleming P. E.: *Drug Discovery Today* 15, 243 (2010).
- Nishimura N., Yoza K., Kobayashi K.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 777 (2010).
- Niu W. J., Smith M. D., Lavigne J. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 16466 (2006).
- Peters G. M., Skala L. P., Plank T. N., Hyman B. J., Reddy G. N. M., Marsh A., Brown S. P., Davis J. T.: *J. Am. Chem. Soc.* 136, 12596 (2014).
- Smith M. K., Northrop B. H.: *Chem. Mater.* 26, 3781 (2014).
- Brus J., Czernek J., Kobera L., Urbanová M., Jegorov A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 487 (2017).
- Brus J., Zhigunov A., Czernek J., Kobera L., Uchman M., Matejček P.: *Macromolecules* 47, 6343 (2014).
- Kobera L., Czernek J., Streckova M., Urbanová M., Abbrent S., Brus J.: *Macromolecules* 48, 4874 (2015).
- Hušík M., Jegorov A., Rohlíček J., Fitch A., Czernek J., Kobera L., Brus J.: *Cryst. Growth Des.* 18, 3616 (2018).
- Policianova, O., Brus J., Hruby M., Urbanová M., Zhigunov A., Kredatusova J., Kobera L.: *Mol. Pharm.*

- 11, 516 (2014).
29. Urbanova M., Brus J., Sedenkova I., Policianova O., Kohera L.: *Spectrochim. Acta, Part A* 100, 59 (2013).
 30. Braccini I., Pérez S.: *Biomacromolecules* 2, 1089 (2001).
 31. Brus J., Urbanová M., Czernek J., Pavelková M., Kubová K., Vysloužil J., Abbrent S., Konefal R., Horský J., Vetchy D., Vysloužil J., Kulich P.: *Biomacromolecules* 18, 2478 (2017).
 32. Vetrík M., Pařízek M., Hadraba D., Kukačková O., Brus J., Hlídková H., Kománková L., Hodan J., Sedláček O., Šlouf M., Bačáková L., Hrubý M.: *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10, 8496 (2018).
 33. Vetrík M., Mattová J., Macková H., Kučka J., Poučková P., Kukačková O., Brus J., Eigner-henke S., Sedláček O., Sefc L., Štěpánek P., Hrubý M.: *J. Controlled Release* 273, 131 (2018).
 34. Urbanova M., Gajdosova M., Steinhart M., Vetchy D., Brus J.: *Mol. Pharm.* 13, 1551 (2016).
 35. Brus J., Albrecht W., Lehmann F., Geier J., Czernek J., Urbanova M., Kohera L., Jegorov A.: *Mol. Pharm.* 14, 2070 (2017).
 36. Vraníková B., Gajdziok J., Vetchý D., Kratochvíl B., Seilerová L.: *Chem. Listy* 107, 681 (2013).

M. Urbanová, J. Czernek, and J. Brus (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*): **Structural Characterization of the New Generation of Drugs and Biomaterials: Application of NMR Crystallography**

A sustained effort to maximize the therapeutic effect of newly discovered active pharmaceutical ingredients (APIs) leads to the search for and development of advanced drug formulations. In this regard, a range of multi-component and nanostructured systems that often combine the properties of solid and liquid materials have been developed. Besides the sophisticated supramolecular synthesis the development of these systems also requires in-depth view into their local architecture at atomic-resolution level. As these materials naturally exist at the borderline between the solid and liquid phases, the high-quality diffraction data are inherently unavailable. Therefore the structural description of these materials requires development of novel and highly efficient strategies. The aim of all this process is formulation of computation-experimental procedures allowing for precise characterization of the complex pharmaceutical systems including composite solids, nanocrystalline systems as well as partially ordered materials. In this regard, NMR crystallography belongs among the most successful approaches. In this contribution we report our recent achievements in characterizing atomic-resolution structure of complex pharmaceutical solids such as peptide derivatives of boronic acid, hybrid organic-inorganic liquid drug delivery systems, polymer-drug solid dispersions and mucoadhesive buccal films.

Keywords: solid-state NMR spectroscopy, drugs, biomaterials, advanced formulations, hybrid systems