

Demeter Ádám

NMR spektroszkópai vizsgálatok biszindol, dipeptid és tetrapeptid típusú gyógyszerkészítmények körében

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Szerves Kémia Tanszék
Richter Gedeon Rt., Szerkezetkutatási Laboratórium
Budapest

2002

I. Bevezetés, célkitűzések

A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia közel fél évszázados múltja alatt a többi spektroszkópai módszerhez viszonyítva páratlanul dinamikus és szerteágazó fejlődésen ment keresztül: az NMR folyamatosan bővülő fizikai, kémiai, biológiai és orvosi alkalmazásaival interdiszciplináris tudománnyá vált.

Az NMR spektroszkópia a módszerben rejlő szerkezetkutatási potenciálnak köszönhetően korán integrálódott a gyógyszeripari kutatásokba. Napjainkra a mágneses magrezonancia módszerek széles tárháza [oldat- és szilárdfázisú NMR, kapcsolt technikák: HPLC-NMR, CE-NMR, HPLC-MS-NMR, *in vivo* módszerek: magnetic resonance spectroscopy (MRS) és magnetic resonance imaging (MRI), stb.] áll a modern gyógyszeripari kutatás-fejlesztés (K+F) szolgálatában. Az NMR spektroszkópia gyógyszeripari alkalmazása átível a gyógyszeripari K+F folyamat egészen: Az első szintetikus laboratóriumi kísérletektől kezdve a felüzemi, illetve üzemi léptékű méretnövelésig, a gyártási szennyezésprofil vizsgálatokon keresztül a készítmények minőségellenőrzéséig, illetve a piacra bevezetendő készítmények törzskönyvezéséig az NMR spektroszkópia szinte minden esetben vezető szerepet kap szerkezetkutatási feladatok megoldásában.

Doktori munkám alapjául a Richter Gedeon Rt. Szerkezetkutatási Laboratóriumában végzett, alapvetően alkalmazott NMR spektroszkópai tanulmányok szolgálnak. Az értekezés szükségszerűen heterogén, ami két fő okra vezethető vissza: Az elért eredmények döntő többsége az éppen aktuális gyógyszerkutatási, fejlesztési és minőségbiztosítási projektek során felmerülő problémák felismeréséből és megoldásából született, amelyek egyben a vizsgált molekulák körét is kijelölték. Az értekezés tárgyát képező vegyületek biszindol, dipeptid és tetrapeptid típusú gyógyszerkészítmények csoportjába sorolhatók. A heterogénitás másik oka egyfajta belső kutatói motiváció: A gyógyszeripari kutatási keretek között igyekeztem az aktuális, „piaci indíttatású” szerkezetkutatási kérdések megoldásán túl a vizsgálatokat elmélyíteni és a „szolgáltatói szintet” meghaladó tudományos következtetésekre jutni. Több, a jelen disszertációban bemutatott közlemény megszületése ebből a belső igényből fakadt. Mindazonáltal a témák heterogenitása lehetőséget teremt arra, hogy dolgozatommal az NMR spektroszkópia gyógyszeripari alkalmazásának egy jelentős szeletét homogén módon reprezentáljam, amely doktori munkám mögött rejlő általános célkitűzésnek tekinthető. Az értekezés legfontosabb célkitűzései az alábbiakban foglalhatók össze.

1. Általános célkitűzés, hogy az elért eredményeken keresztül az NMR spektroszkópia széleskörűen mutassam be a gyógyszeripari szerkezetkutatás néhány főbb jellemzőjét, illetve azokat a legfontosabb NMR alkalmazási területeket, amelyek a gyógyszeripari K+F tevékenység szolgálatában állnak.

2. Az értekezés meghatározó célja biszindol, di- és tetrapeptid típusú gyógyszerkészítmények szerkezetvizsgálata modern NMR módszerekkel, különös tekintettel a vegyületek konfigurációs és konformációs jellemzőinek meghatározására.
3. További cél a szerkezetvizsgálatok során, vagy azokról függetlenül felmerülő elméleti kérdések tanulmányozása.

II. Alkalmazott módszerek

A jelen munkával kapcsolatos NMR méréseket Varian INOVA spektrométereken, gradiens inverz mérőfejek (1H 300 MHz-en, Varian 5-mm ¹H{¹⁵N,³¹P} PFG Indirect • nmr mérőfej; és ¹H 500 MHz-en, Varian 5-mm ¹H{¹³C/¹⁵N} PFG Triple • nmr mérőfej) végeztem. A munka során alkalmazott 2D NMR technikák: PFG-DQF-COSY, PFG-HSQC, PFG-HMBC, TOCSY, NOESY és ROESY; szelektív 1D NMR technikák: NOE differencia, DPGSE-NOE (iBurp-2 pulzusforma), PFG-TOCSY (eBurp-1 pulzusforma), szelektív heteronukleáris ¹³C spinlecsatolás (adiabatikus WURST lecsatolás). A mérések, illetve az adatfeldolgozás során valós idejű digitális jelfeldolgozást (real-time DSP, AnalógPlus™ digitális szűrő) és lineáris predikciót alkalmaztam. A molekulamodellézési számításokhoz InsightII programcsomagot (CFF91 erőter, vákuum), illetve HyperChem programot (MM+ erőter, vákuum) használtam, a számításokat SGI OCTANE (R10000) munkaállomáson, illetve PC-n végeztem.

III. Új tudományos eredmények

Az új tudományos eredmények az alábbi, némileg átfedésben lévő vezérlő elvek szerint csoportosíthatók.

Az NMR spektroszkópia gyógyszeripari alkalmazását érintő metodikai és technológiai fejlődési irányok összefoglalása:

1. Összefoglaltuk az NMR spektroszkópia szerepét gyógyszer-szennyezések azonosításában és meghatározásában. Válogatott példákon keresztül tárgyaltuk a szennyezésprofil vizsgálatokkal (kromatográfiás elválasztás nélkül és után) kapcsolatos legfontosabb elméleti és metodikai szempontokat [6].
2. Összefoglaltam a mágneses magrezonancia módszerek gyógyszeripari alkalmazásának lehetőségeit és feltételeit, különös tekintettel a makromolekuláris NMR módszerekre (fehérjevizsgálat, kötődésvizsgálat) [7].
3. Elvégeztem vinblasztin típusú biszindolok oxidatív 3'-7'-transzannuláris ciklizációjával, majd a ciklizált termékek savkatalizált aszpidoszpermán→eburnán gyűrűtranszformációjával nyerhető vegyületek részletes NMR spektroszkópai jellemzését. Megállapítottam, hogy a vázátrendezés a C(16') szénatom konfigurációjának inverziójával, vagy retenciójával zajlik a kiindulási konfigurációtól függően [3].
4. Biológiai vizsgálatok céljából olyan thymocartin (Arg-Lys-Asp-Val) származékokat állítottuk elő, amelyek az arginin ? -amino csoportján, ill. a lizin ? -amino csoportján (+)-biotinil és 6-(+)-biotinilaminohexanoil jelzéssel rendelkeznek. A vegyületek szerkezetét, illetve a jelzőcsoportok kapcsolódásának helyét 2D homo- és heteronukleáris NMR módszerekkel igazoltam [5].

Gyártáskövető szerkezetkutatási feladatok:

5. A lisinopril szennyezésprofil vizsgálatok keretében az enalapril és lisinopril termikus ciklizálásával, majd a ciklizált származékok lúgos hidrolízisével epimer diketopiperzin (DKP) származékokat állítottunk elő. Elvégeztem a kapott epimer DKP-ok részletes sztereokémiai analizisét NMR spektroszkópiával. Meghatároztam az egyes epimerek domináns konformációját és abszolút konfigurációját [1].
6. A lisinopril gyógyszeralapanyag tetrametil-ammónium tartalmának mérésére alkalmas kvantitatív NMR módszert fejlesztettem ki [6].

Elméleti jellegű NMR vizsgálatok

7. Deutérium kicserélődési NMR mérések segítségével vizsgáltam az enalapril DKP-ok báziskatalizálta epimerizációs folyamatainak kinetikáját. Meghatároztam a folyamatok relatív sebességét és egyensúlyi helyzetét [2].

8. Analizáltuk a sugárzási csillapítás kimutatására alkalmas különféle spektrális jellemzők alkalmazhatóságának lehetőségeit és korlátait. Megállapítottuk, hogy a gyenge sugárzási csillapítás kimutatására az M_z mágneszettség felépülési sebessége a legérzékenyebb paraméter. A gyenge sugárzási csillapítás érzékeny kimutatására alkalmas mérési módszert (RADDSY – radiation damping difference spectroscopy) fejlesztettem ki [4].

IV. Az eredmények jelentősége és hasznosítási lehetőségei.

Az 5. és 6. tézispontokban tárgyalt NMR spektroszkópiai vizsgálatok eredményeinek közvetlen piaci haszna volt: a szennyezésprofil vizsgálatok hozzájárultak a technológiai know-how bővüléséhez, a Lisopress® készítmény törzskönyvezéséhez és minőségbiztosításához, és így a készítmény piaci sikeréhez. Az enalapril DKP-ok epimerizációs kinetikai vizsgálatai (7. tézispont) hozzájárultak az epimer DKP szennyezések keletkezési folyamatának megértéséhez. A vinblasztin típusú biszindol származékok vázátrendeződése során végbemenő

sztereokémiai változások (3. tézispont) elsősorban elméleti szerves-kémiai jelentőségűek. A molekulacsalád konformációs sajátságainak ismerete, valamint a vegyületek CD és NMR spektroszkópiai jellemzése segítséget nyújthat rokon szerkezetű vegyületek sztereokémiai problémáinak tisztázásánál. A gyenge sugárzási csillapítás vizsgálata és érzékeny kimutatása (8. tézispont) elsősorban a modern NMR spektroszkópia elméletét gazdagítja. A biotinnel jelzett thymocartinok biológiai vizsgálatai időközben a projekt leállítása miatt abbamaradtak. Bár ez a tény a munka célkitűzése és hasznosulása szempontjából az eredmények jelentőségét mindenképpen csökkentti, megítéléseim szerint azonban a kémiai és szerkezetkutatói munka (4. tézispont) konkrét tudományos értékéből nem von le. Az 1. és 2. pontokban tárgyalt összefoglaló munkák, a tárgyalt kérdéskörök konkrét szakmai tartalmán túl, szándékunk szerint az adott kérdéskörrel ismerkedő, vagy már abban járatos szakemberek számára is hordoznak új, a gyógyszeripari NMR spektroszkópiát érintő üzenetet.

Ezúton fejezem ki köszönetemet témavezetőmnek, Dr. ifj. Szántay Csabának munkám irányításáért és áldozatkész oktató-nevelő munkájáért.

Ádám Demeter

NMR spectroscopic studies in the field of bisindole, dipeptide and tetrapeptide type drug derivatives

Ph.D. thesis

Budapest University of Technology and Economic,
Department of Organic Chemistry
Gedeon Richter Ltd., Spectroscopic Research Center
Budapest
2002

I. Introduction and aims

Since the discovery of the nuclear magnetic resonance (NMR) phenomenon (1946), NMR spectroscopy has undergone a truly amazing evolutionary process, unparalleled by any other spectroscopic technique: with the steadily expanding physical, chemical, biological and medical applications, NMR has become a multidisciplinary subsience in its own right.

Owing to the powerful structure elucidation potential of NMR, the method was integrated into the pharmaceutical industry very early. Today a plethora of magnetic resonance methods [liquid- and solid-phase NMR, coupled techniques: HPLC-NMR, CE-NMR, HPLC-MS-NMR, *in vivo* methods: magnetic resonance spectroscopy (MRS) and magnetic resonance imaging (MRI), etc.] serves to support modern pharmaceutical research and development (R&D). NMR plays a primary role in the numerous structure elucidation tasks cropping up from the first synthetic laboratory experiments through to scale-up, impurity profiling, patent application, quality control and pre-marketing registration of a drug.

The present thesis is based on applied NMR spectroscopic studies carried out in the Spectroscopic Research Center of Gedeon Richter Ltd. The unusual heterogeneity of the work is

rooted in two main factors. First, the majority of the achieved results sprang from the recognition and resolution of problems thrown up by drug R&D or quality-control projects, which thus inevitably determined the set of investigated structures. The explored molecules can be broadly classified as bisindole, dipeptide and tetrapeptide type drug derivatives. Secondly, some degree of heterogeneity stems from an intrinsic motivation: the solution of an NMR-related problem often spawned some challenging, more scientifically inclined side-branches that I strived to pursue, within the constraints of the pharmaceutical environment, beyond the level that satisfied the external requirements. The origin of many papers presented here lies in this personal demand. Nevertheless, the heterogeneity of the topics allows a large segment within the pharmaceutical application of NMR to be displayed homogeneously, which can be regarded as a general feature underlying this doctoral work.

The principal aims of the thesis can be summarized as follows.

1. I intend to give, from the viewpoint of an NMR spectroscopist, a brief account of the main pharmaceutical attributes of spectroscopic research as well as the main application fields where NMR supports the pharmaceutical R&D.
2. The central aim of the thesis is the structure elucidation of bisindole, dipeptide and tetrapeptide type drug derivatives with modern NMR spectroscopic methods, with focus on the determination of their conformational and configurational characteristics.
3. A further aim is the investigation of theoretical questions occurring in connection with, or independently of, the structural studies.

II. Applied methods

In connection with the present work the NMR measurements were carried out on Varian *INOVA* spectrometers with gradient inverse probes (^1H 300 MHz, Varian 5-mm $^1\text{H}\{^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}\}$ PFG Indirect • nmr probe; and ^1H 500 MHz, Varian 5-mm

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ PFG Triple • nmr probe). Applied 2D NMR techniques: PFG-DQFCOSY, PFG-HSQC, PFG-HMBC, TOCSY, NOESY and ROESY; selective 1D NMR techniques: NOE difference, DPGSE-NOE (iBurp-2 pulse shape), PFG-TOCSY (eBurp-1 pulse shape), selective heteronuclear ^{13}C spin decoupling (adiabatic WURST decoupling). During the measurements and processing real-time digital signal processing (real-time DSP, AnalogPlus™ digital filter) and linear prediction was applied. InsightII (Discover, CFF91 forcefield, vacuum) and HyperChem (MM+ forcefield, vacuum) programs were used for molecular modeling on an SGI OCTANE (R10000) workstation and on a PC, respectively.

III. New scientific results

The new scientific results can be classified on the basis of the following, partially overlapping guidelines.

A summary of the methodological and technological advances in connection with the pharmaceutical application of NMR:

9. The role of NMR spectroscopy in the identification and determination of impurities in drugs was summarized. Crucial theoretical and methodological aspects relevant to impurity profiling (without and after chromatographic separation) were discussed through selected examples [6].

10. With focus on the macromolecular aspects (protein NMR research and binding studies), the scope and limitations of various magnetic resonance methods in pharmaceutical research were reviewed [7].

Synthesis follow-up structural studies:

11. Detailed NMR spectroscopic analysis of bisindoles as obtained by oxidative 3'-7'-transannular cyclization (**4**→**5**) and a subsequent acid-catalyzed aspidospermane→eburnane skeletal

rearrangement (**5**→**6**) of the vinblastine type alkaloids (**4a-d**) was accomplished. Depending on the starting configuration the rearrangement results in either inversion (**5**→**6**) or retention (**7**→**8**) of the C(16') configuration [3].

12. Thymocartin (Arg-Lys-Asp-Val) derivatives labeled with (+)-biotinyl as well as 6-(+)-biotinylaminohexanoyl groups at either the α -amino group of the arginyl or the γ -amino moiety of the lysyl residue were synthesized for biological studies and their structure was verified by 2D homo- and heteronuclear NMR methods [5].

Production follow-up structural studies:

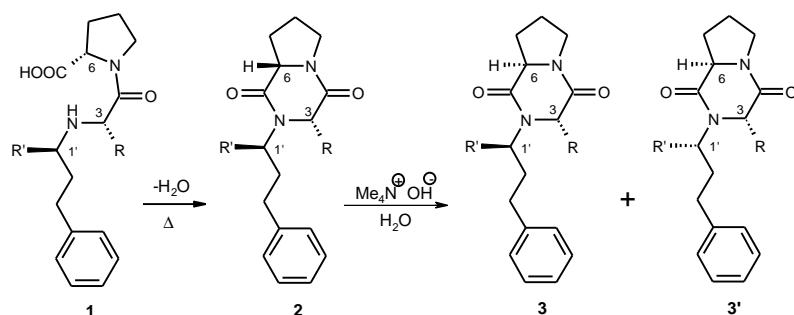
13. Epimeric diketopiperazine (DKP) derivatives of enalapril (**1a**) and lisinopril (**1b**) were obtained by thermic cyclization and subsequent base-catalyzed hydrolysis. A detailed stereochemical analysis of the epimeric DKPs (**2,3,3'**) was performed by NMR spectroscopy. The dominant conformations and the absolute configurations were deduced [1].

14. A quantitative NMR method was developed to measure the tetramethylammonium content of the lisinopril bulk drug [6].

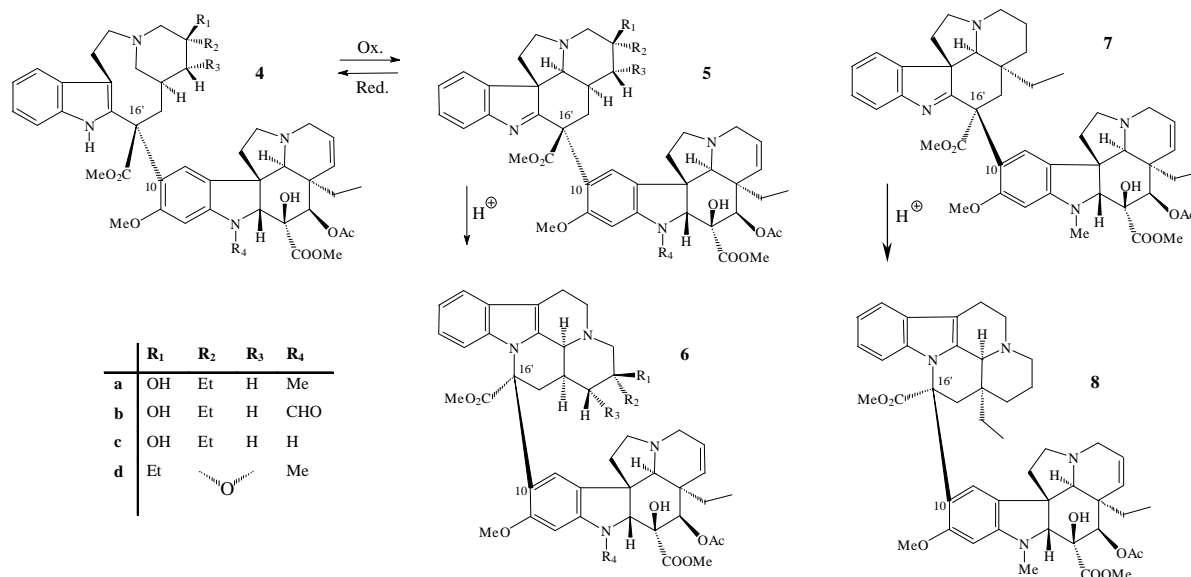
Theoretical NMR studies:

15. With the aid of deuterium exchange NMR experiments the kinetics of the base-catalyzed epimerizations of enalapril DKPs was investigated. The relative rates and the equilibrium position of the respective processes were determined [2].

16. We explored the scope and limitations of the various spectral tools available to diagnose radiation damping. It was shown that the recovery rate of the M_z magnetization is the most sensitive parameter to indicate weak damping. A suitable gradient technique (RADDSY – radiation damping difference spectroscopy) which can sensitively detect the presence of weak damping was developed [4].



	R	R'
a	CH ₃	COOEt
b	(CH ₂) ₄ NH ₂	COOH
c	(CH ₂) ₄ NHCOCF ₃	COOEt
d	CH ₃	COOH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	OH	Et	H	Me
b	OH	Et	H	CHO
c	OH	Et	H	H
d	Et			Me

IV. Significance and utility of the results

The results of the NMR spectroscopic studies discussed in points 5. and 6. had definite market benefit: the impurity profiling widened the technological know-how, they contributed to the registration and quality control of the Lisopress® product and thus to the market success of the drug. The kinetic studies of the enalapril DKPs (7.) allowed a better understanding of the processes leading to the respective epimer DKP impurities. The observed stereochemical changes (3.) during the rearrangement of the vinblastine-type bisindole derivatives have mainly theoretical significance in organic chemistry. A knowledge of the conformational properties of this compound family as well as the CD and NMR spectroscopic characterization might help to resolve stereochemical problems of related compounds. The investigation and sensitive detection of weak radiation damping (8.) adds primarily to the theory of modern NMR spectroscopy. Due to the termination of the project, the biological studies of the biotinylated thymocartins were stopped in the meantime. As far as the aim and utility are concerned, this fact inevitably reduces the significance of the results. However, it does not detract from the concrete scientific value of the synthetic and spectroscopic results (4). Beyond the technical content of the discussed topics, the reviews (1. and 2.) intend to convey a fresh and hopefully novel view regarding the essence of modern pharmaceutical NMR spectroscopy.

Publications

1. **Á. Demeter**, T. Fodor, J. Fischer, Stereochemical investigations on the diketopiperazine derivatives of enalapril and lisinopril by nmr spectroscopy, *J. Mol. Struct.*, **471**, 161-174 (1998).
2. **Á. Demeter**, T. Fodor, J. Fischer, Preliminary results concerning the base-triggered epimerizational kinetics of enalapril diketopiperazines, *Peptides 1998*, S. Bajusz and F. Hudecz (eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest (1999), p. 414-415.
3. K. Honty, **Á. Demeter**, Cs. Szántay Jr., M. Hollósi, P. Kolonits, Cs. Szántay, Synthesis of vinca alkaloids and related compounds. Part xciii. Skeletal rearrangement of cyclovinblastine derivatives: formation of a novel bisindole system, *Heterocycles*, **50**(1), 169-194 (1999).
4. Cs. Szántay Jr., **Á. Demeter**, Radiation Damping Diagnostics, *Concepts Magn. Reson.* **11**, 121-145 (1999).
5. I. Schön, O. Nyeki, **Á. Demeter**, Synthesis of Biotinylated Thymocartins, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **43**, 309-322 (2000).
6. *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, S. Görög (ed.), **Chapter 2.4.**, Nmr Spectroscopy (Cs. Szántay Jr. and **Á. Demeter**), Elsevier, Amsterdam (2000).
7. **Demeter Á.**, Az nmr spektroszkópia alkalmazási lehetőségei a Gyógyszertervezésben, *Magyar Tudomány*, **11**, 1380-1389 (2000).