

Título em Português: Melhoria das propriedades físico-químicas de fármacos inibidores de transcriptase reversa por Engenharia de Cristais

Título em Inglês: Improvement of the physicochemical properties of reverse transcriptase inhibitor drugs by Crystal Engineering

Autor: Raphael Vieira Moreira da Serra

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Javier Alcides Ellena

Área de Pesquisa / SubÁrea: Física da Matéria Condensada

Agência Financiadora:

Melhoramento das propriedades físico-químicas de fármacos inibidores de transcriptase reversa por Engenharia de Cristais

Raphael Vieira Moreira da Serra

Prof. Dr. Javier Ellena; Msc. Paulo Nunes de Souza

Laboratório Multiusuário de Cristalografia Estrutural Instituto de Física de São Carlos, LaMuCrEs-IFSC/USP

serrapha@usp.br

Objetivos

A finalidade deste projeto é o desenvolvimento de novas formas sólidas de fármacos inibidores de transcriptase reversa por meio de técnicas de Engenharia de Cristais. Esses resultados serão utilizados para nortear o desenvolvimento de protocolos de síntese supramolecular de novas formas sólidas as quais serão posteriormente caracterizadas por difração de raio X, espectroscopia vibracional, análises térmicas e por microscopia óptica térmica com luz polarizada.

Métodos e Procedimentos

Inicialmente, a fim de analisar as possíveis interações intermoleculares envolvendo os insumos farmacêuticos ativos (IFA's) sob estudo (Lamivudina, Estavudina e Zidovudina) e investigar a probabilidade estatística da formação de um sólido farmacêutico inédito, foi utilizado o software *Mercury (CCDC)* para gerar os mapas de interações completas e avaliar a estabilidade relativa das estruturas e mapear as possíveis interações não-covalentes [1]. Para compreender o comportamento químico das moléculas sob estudo, seus grupos funcionais foram analisados, assim como os seus grupos complementares sob a óptica dos sítios intermoleculares.

Pelos resultados anteriores e por possuir um pKa próximo ao dos fármacos trabalhados (o que evita casos de reação ácido-base[2]), a prolina foi escolhida como coformador principal. Com base nisso, foram desenvolvidos diferentes protocolos de síntese supramolecular utilizando métodos mecanoquímicos e de evaporação de solvente com o objetivo de obter novos sólidos farmacêuticos desses IFA's com esse aminoácido..

Após as sínteses, os sólidos foram avaliados por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), difração de raio-x de pó e Monocristal. Os resultados foram analisados como sendo mais ou menos promissores dependendo de critérios como a presença de novas fases nos difratogramas de pó e diferenças nas análises térmicas.

A análise estrutural do co-cristal Estavudina e L-prolina foi realizada usando a técnica de difração de raio-x por monocristal usando radiação síncrotron da linha MANACÁ (*MAcromolecular micro and NAnoCrystAllography*) do Sírius, LNLS-CNPq Campinas.

Resultados

Após o processo de síntese, os resultados foram analisados por DSC, TG e Difração de Pó. Os resultados que se mostraram mais

promissores foram recristalizados e analisados por difração de monocristal.

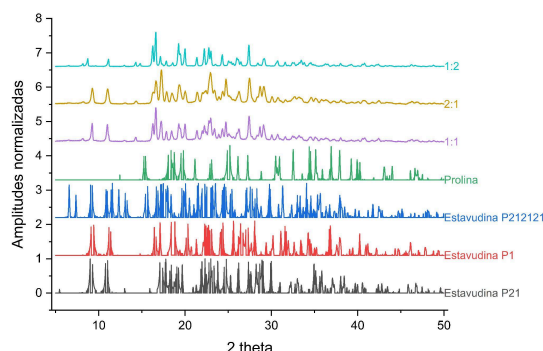


Figura 1: Difratoograma da síntese supramolecular de Estavudina e L-prolina em água via mecanoquímica.

A maior parte dos sólidos obtidos a partir dos protocolos de síntese supramolecular correspondiam aos cristais dos compostos de partida, com exceção do experimento com Estavudina e L-prolina em água. Então, sua estrutura cristalina foi resolvida.

Nele, temos uma unidade assimétrica composta de uma molécula de Estavudina, uma molécula de L-prolina e uma água de cristalização. Seu sistema cristalino é monoclínico e seu grupo espacial é $P2_1$.

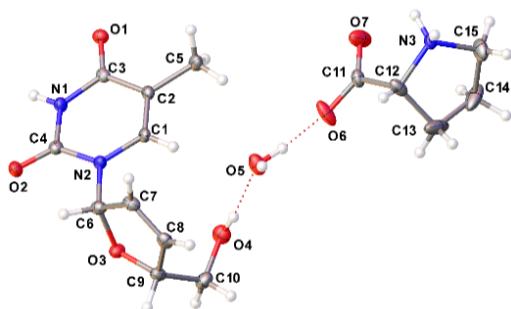


Figura 2: Representação tipo Ortep da Unidade assimétrica do co-cristal Estavudina-L-Prolina com elipsóides

térmicos a 50% de probabilidade.

A estrutura cristalina é estabilizada por ligações de hidrogênio do tipo O-H...O que conectam moléculas de estavudina em cadeia e N-H...O que criam cadeias de L-prolina, formando um arranjo bidimensional.

Conclusões

De todos os protocolos desenvolvidos, dois deles podem ser destacados como relevantes: Estavudina e L-prolina e Lamivudina e L-prolina. Até o momento, apenas cristais de Estavudina e L-prolina foram analisados. Nele, temos uma unidade assimétrica composta de uma molécula de Estavudina, uma molécula de L-prolina e uma água de cristalização. Mostrando a eficácia dos métodos empregados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - CNPEM, pelo uso da linha MANACÁ que obteve os dados de difração usados neste trabalho. Os autores também agradecem ao LaMuCrEs - IFSC pelo uso das instalações. Raphael Vieira Moreira da Serra agradece à USP pela bolsa de IC.

Referências

- [1] Peter A. Wood et al. "Evaluation of molecular crystal structures using Full Interaction Maps". Em *CrystEngComm* 15 (1 2013), pp. 65-72. DOI: [10.1039/C2CE25849H](https://doi.org/10.1039/C2CE25849H). URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C2CE25849H>.
- [2] Maryam Karimi-Jafari et al. "Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications". Em: *Crystal Growth & Design* 18.10 (2018), pp. 6370-6387. DOI: [10.1021/acs.cgd.8b00933](https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933). eprint: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933>. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933>

Improvement of the physicochemical properties of reverse transcriptase inhibitors through Crystal Engineering.

Raphael Vieira Moreira da Serra

Prof. Dr. Javier Alcides Ellena; Msc. Paulo Nunes de Souza

Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP

serrapha@usp.br

Objectives

The purpose of this project is the development of new solid forms of reverse transcriptase inhibitors through Crystal Engineering techniques. These results will be used to guide the development of supramolecular synthesis protocols for new solid forms, which will then be characterized by X-ray diffraction, vibrational spectroscopy, thermal analysis, and polarized light optical thermal microscopy.

Methods and Procedures

Initially, in order to analyze the possible intermolecular interactions involving the active pharmaceutical ingredients (APIs) under study (Lamivudine, Stavudine, and Zidovudine) and to investigate the statistical probability of forming a novel pharmaceutical solid, the *Mercury* (CCDC) software was used to generate full interaction maps and evaluate the relative stability of the structures while mapping the possible non-covalent interactions [1]. To understand the chemical behavior of the molecules under study, their functional groups were analyzed, as well as their complementary groups from the perspective of intermolecular synthons.

Based on previous results and because it has a pKa close to that of the studied drugs (which avoids acid-base reactions [2]), proline was chosen as the main co-former. Based on this,

different supramolecular synthesis protocols were developed using mechanochemical and solvent evaporation methods with the aim of obtaining new pharmaceutical solids of these APIs with this amino acid.

After the syntheses, the solids were evaluated by Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG), powder and single-crystal X-ray diffraction. The results were analyzed as more or less promising depending on criteria such as the presence of new phases in the powder diffraction patterns and differences in thermal analyses.

The structural analysis of the Stavudine and L-proline co-crystal was carried out using single-crystal X-ray diffraction with synchrotron radiation from the MANACÁ line (*MAcromolecular micro and NAnoCrystAllography*) at Sirius, LNLS-CNPEM Campinas.

Results

After the synthesis process, the results were analyzed by DSC, TG, and Powder Diffraction. The most promising results were recrystallized and analyzed by single-crystal diffraction.

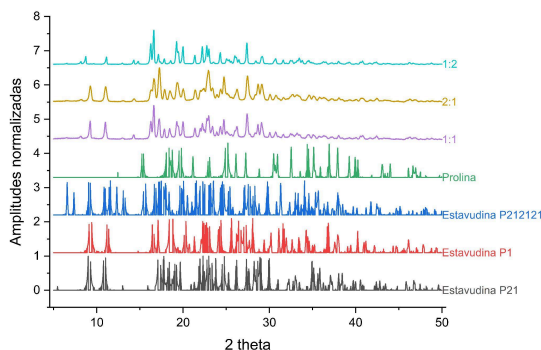


Figure 1: Diffraction pattern of the supramolecular synthesis of Stavudine and L-proline in water via mechanochemistry.

Most of the solids obtained from the supramolecular synthesis protocols corresponded to the crystals of the starting compounds, except for the experiment with Stavudine and L-proline in water. Therefore, its crystal structure was resolved.

In this structure, we have an asymmetric unit composed of one Stavudine molecule, one L-proline molecule, and one crystallization water molecule. Its crystal system is monoclinic, and its space group is $P2_1$.

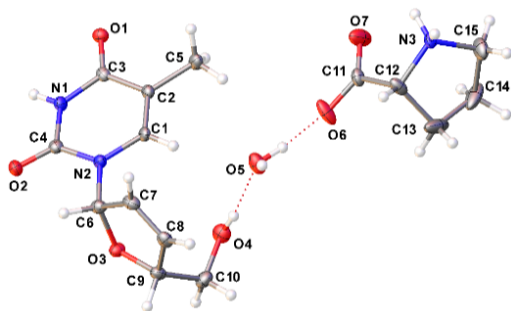


Figure 2: Ortep-type representation of the asymmetric unit of the Stavudine-L-Proline co-crystal with thermal ellipsoids at 50% probability.

The crystal structure is stabilized by O-H...O hydrogen bonds that connect stavudine

molecules in a chain and N-H...O bonds that create L-proline chains, forming a two-dimensional arrangement.

Conclusions

Of all the developed protocols, two can be highlighted as relevant: Stavudine with L-proline, and Lamivudine with L-proline. So far, only crystals of Stavudine and L-proline have been analyzed. In this structure, we have an asymmetric unit composed of one Stavudine molecule, one L-proline molecule, and one crystallization water molecule, demonstrating the effectiveness of the methods employed.

Acknowledgements

The authors thank LNLS - Brazilian Synchrotron Light Laboratory - CNPEM, for the use of the MANACÁ beamline that provided the diffraction data used in this work. The authors also thank LaMuCrEs - IFSC for the use of their facilities. Raphael Vieira Moreira da Serra thanks USP for the undergraduate research scholarship.

References

- [1] Peter A. Wood et al. "Evaluation of molecular crystal structures using Full Interaction Maps". Em *CrystEngComm* 15 (1 2013), pp. 65-72. DOI: [10.1039/C2CE25849H](https://doi.org/10.1039/C2CE25849H). URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C2CE25849H>.
- [2] Maryam Karimi-Jafari et al. "Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications". Em: *Crystal Growth & Design* 18.10 (2018), pp. 6370-6387. DOI: [10.1021/acs.cgd.8b00933](https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933). eprint: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933>. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933>.

.