

EPR

Primene u farmaciji



BioScope Labs

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs

Miloš Mojović, v. prof.



EPR Lab

- Centar za fizičku hemiju bioloških sistema.
- EPR tehnike u: fizičkoj hemiji, biologiji, medicini, farmaciji ...



Izgled aparature za EPR spektrometriju:

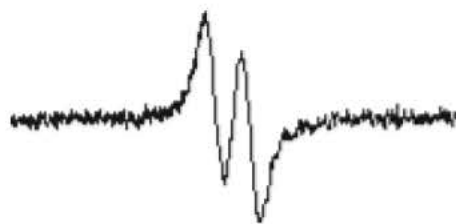
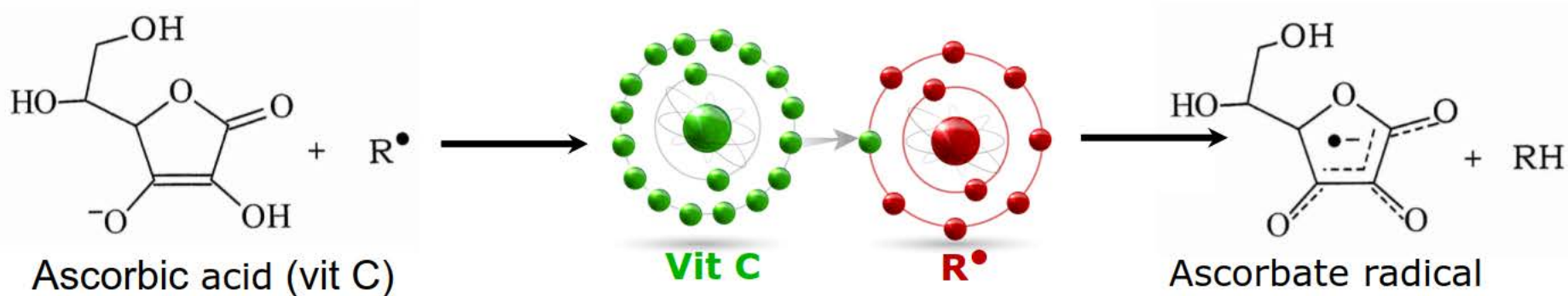
Bruker Biospin Elexsys II E540EPR

- X- (9.5GHz), L-band (1.2GHz).
- Rezonatori.
- Različita snimanja: tN₂ (100-350K), tHe (4-100K).
- EPR spektroskopija i imidžing.



Šta je EPR?

- Detektujemo nesparene elektrone.
- Slobodni radikali, prelazni metali.
- Jedina poznata tehnika koja direktno detektuje slobodne radikale.



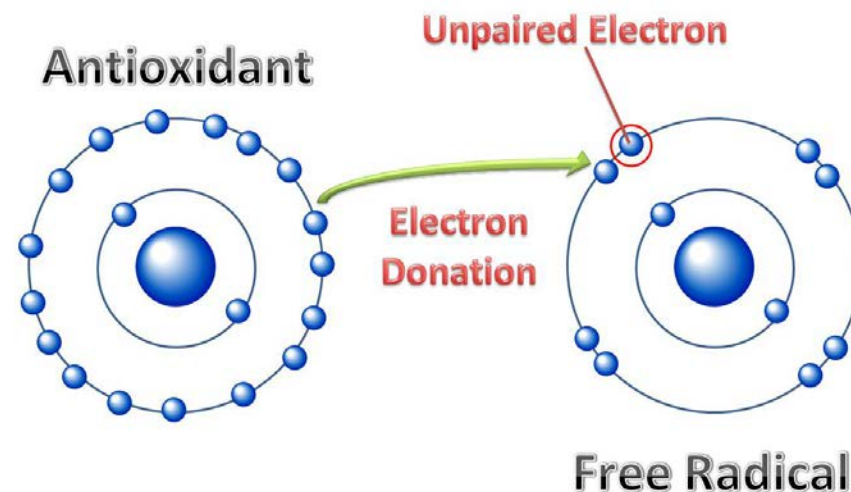
EPR spectrum



EPR Lab

Slobodni radikali i antioksidansi

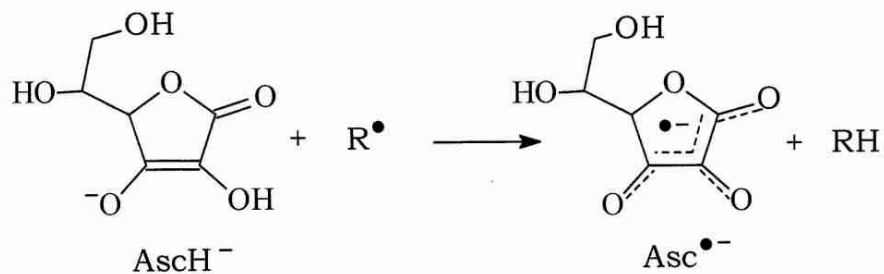
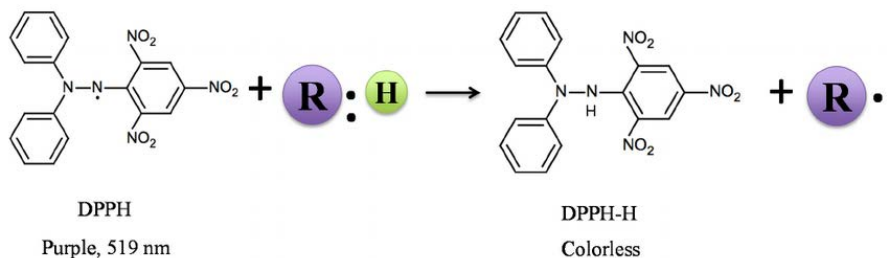
- Šta su slobodni radikali?
- Izazivaju oštećenja DNK, proteina, ćel. membrana, povezani sa patofiziološkim stanjima.
- Antioksidansi.
- Sprečavaju ili usporavaju oksidaciju drugih molekula ukanjajući slob. radikale.
- Ima ih u biljkama, raznim tradicionalnim lekovima, hemijski ih generišemo ...



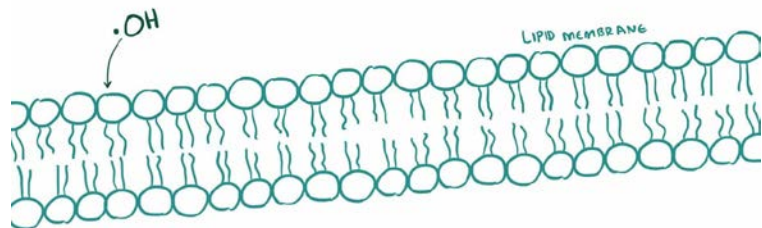


EPR metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti



LIPID PEROXIDATION



- EPR je jedina pouzdana metoda za ovu svrhu.
- Druge metode baziraju se na uklanjanju biološki-irelevantnih radikala (npr. DPPH).
- EPR može:
 1. Odrediti kapacitet AOX da ukloni **·OH, ⁻O₂, NO·** ... (generatorski sistemi).
 2. Odrediti kapacitet AOX da ukloni dugoživeće radikale (**CC·, Asc·**).
 3. Odrediti kapacitet AOX da speči lipidnu peroksidaciju indukovanu ROS i RNS (primenom lipozoma i micela).



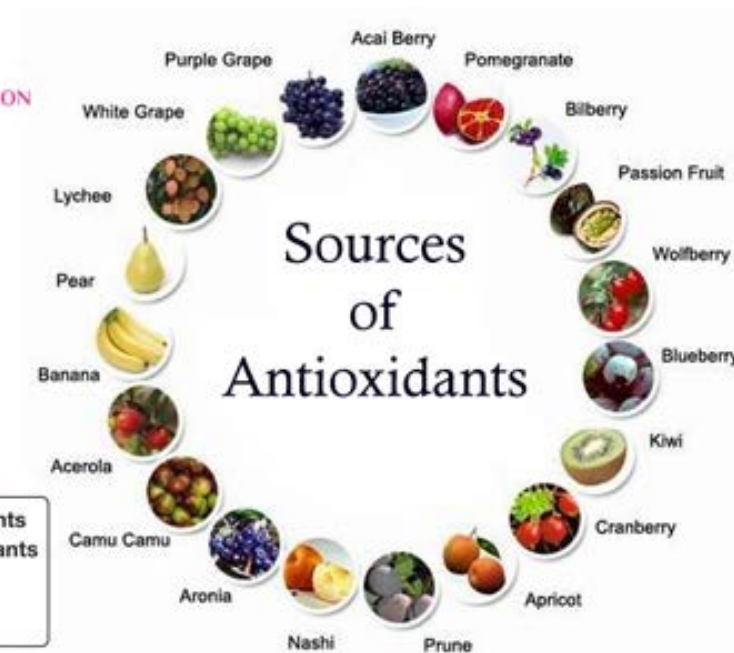
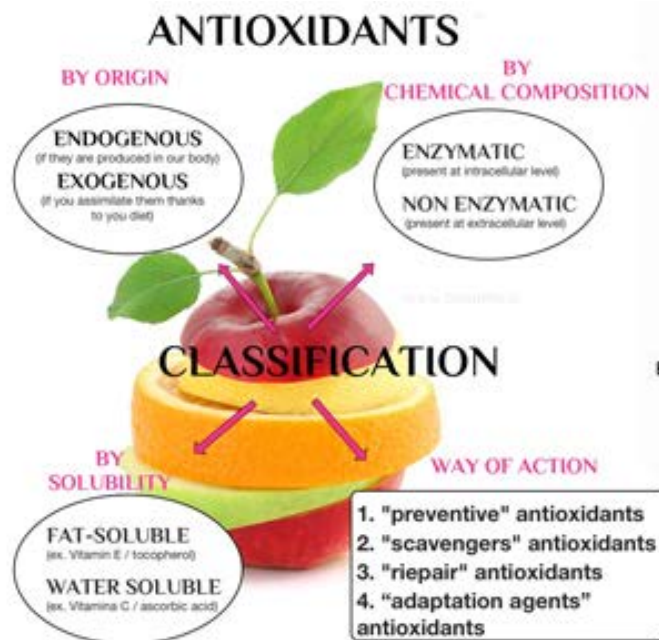
EPR metode

Određivanje AOX kapaciteta vodonerastvornih jedinjenja

Šta raditi sa vodonerastvornim AOX?

- Najbolji AOX su često vodonerastvorni i ovo je problem koji se teško (ili loše) rešava.

- EPR može i ovo pomoću posebne metode.
- Ova metoda je inače ekskluzivno razrađena u EPR Lab FFH.



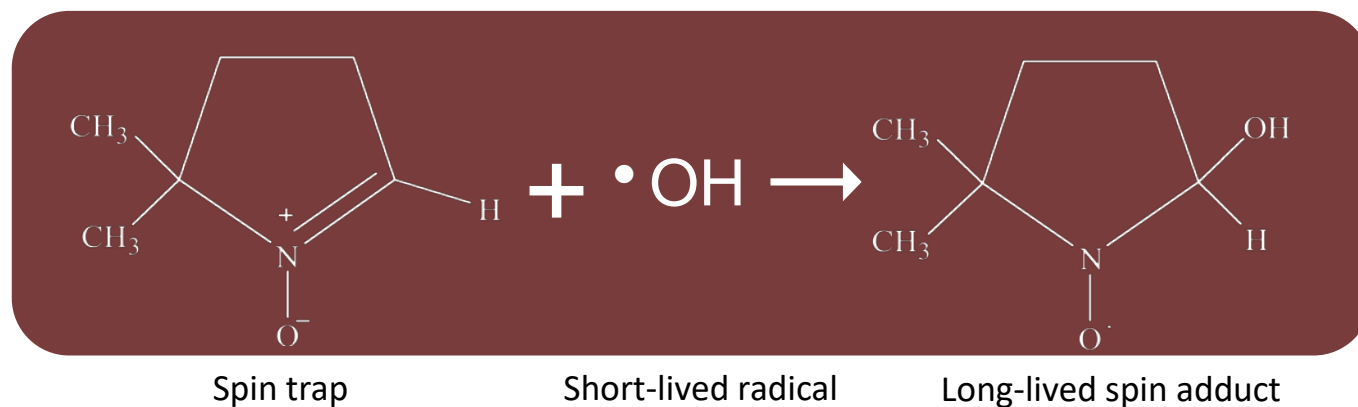


EPR metode

Određivanje AOX kapaciteta za uklanjanje kratkoživećih radikala

EPR spin-traping

- Oksidativni stres je uzrok mnogih patofizioloških stanja.
- Neke metode su posredne (fluorimetrija). Ima artefakata.
- EPR može meriti $\cdot\text{OH}$, O_2^- , NO pomoću spin-trap metode.
- Princip spin-trap metode.
- Ovako možemo detektovati ROS intra- i ekstracelularno.

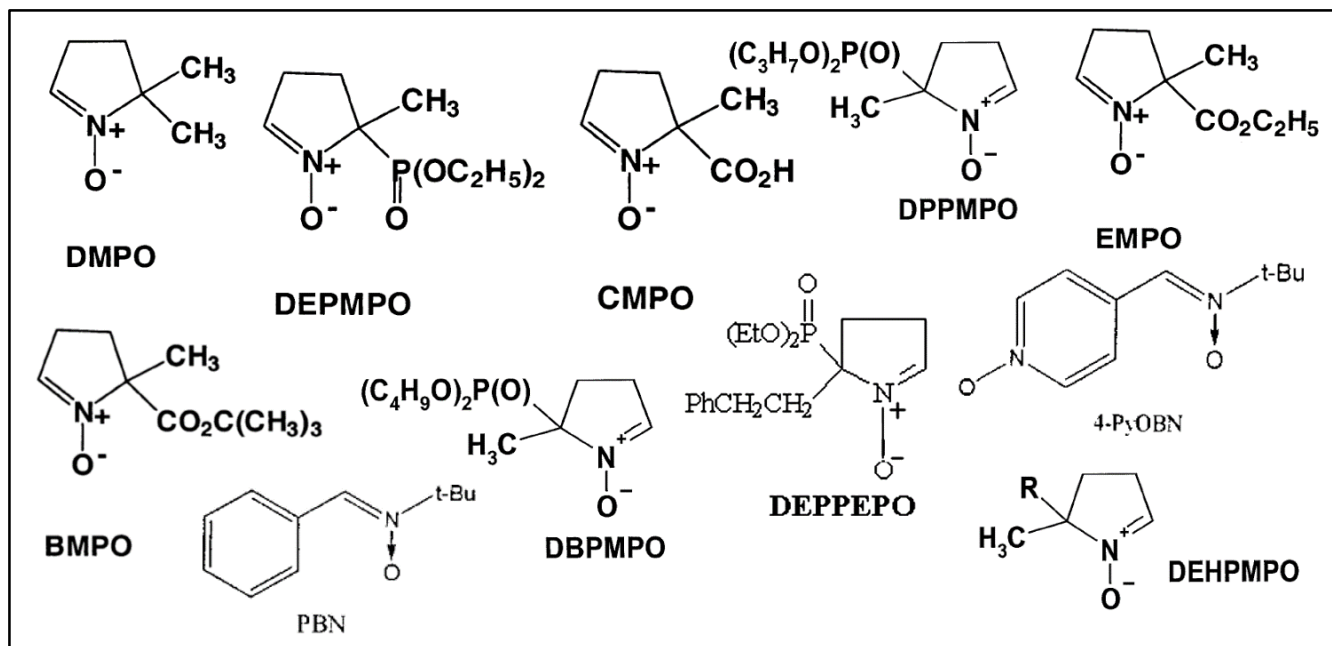




EPR metode

EPR spin-trapping

- Šta mora da poseduje jedan dobar spin-trap?
- Spin-trapping market.



- Preskupi.
- Često sadrže nečistoće.
- Degradiraju se na višim T.
- Imaju isuviše složen EPR signal.
- U višim dozama letalni.
- Adukti skloni raspadanju.
- Adukti podložni i redukciji i oksidaciji.
- Složena kinetika.



EPR metode

EPR spin-traping *in vivo*?

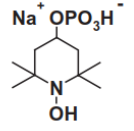
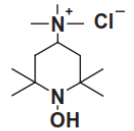
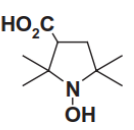
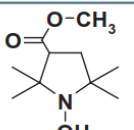
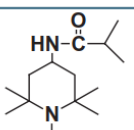
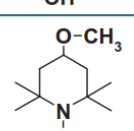
Type	Name	Structure	Lipophilicity	Lifetime of O ₂ ^{•-} Products	Detection	Applications
Spin Traps	PBN		10	-	R [•] RO [•]	Detection of R-C [•] <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .
	POBN		0.15	-		
	DMPO		0.06	0.9 min	OH [•] , O ₂ ^{•-} , R [•] , RO [•]	Cell-free and extracellular detection of OH [•] , O ₂ ^{•-} , R [•] , S [•] .
	EMPO		0.33	10 min	OH [•] O ₂ ^{•-} RO ₂ [•]	
	DEPMPO		0.16	17 min	R [•] S [•]	
	BMPO		-	23 min	OH [•] , O ₂ ^{•-} , S [•]	

- Detekcija O₂^{•-} radikala u biosistemima limitirana je sporom kinetikom O₂^{•-} trapovanja (~55 M⁻¹ s⁻¹)
- Biodegradacija adukata (redukcija do HA i oksidacija u sekundarne nitrone).
- Ali, ciklični HA reaguju sa O₂^{•-} 100 puta brže nego trapovi!
- Mogu se takmičiti sa ćelijskim AOX i reagovati sa intraćelijskim O₂^{•-}.
- Neki spicificni HA ...



EPR metode

Tehnika upotrebe hidrosilamina

Cyclic Hydroxylamines	PP-H		0.005	<p>More than 4 hours in blood plasma, in cells and tissue</p> <p>Can be used <i>in vivo i.p.</i> and <i>i.v.</i> injections</p>	<p>$O_2^{\bullet-}$ ONOOH Aryl-O\bullet</p> <p>Quantitative measurements of extracellular $O_2^{\bullet-}$ and quantification of intracellular $O_2^{\bullet-}$ in cells and tissue samples.</p> <p><i>In vivo</i> $O_2^{\bullet-}$ detection.</p>
	CAT1-H		0.01		
	CP-H		0.05		
	CM-H		27		
	TMT-H		35		
	TM-H		43		

- Nedostatak specifičnosti HA prevazilazimo korišćenjem inhibitora proizvodnje $O_2^{\bullet-}$ i SOD.
- Bitno je naelektrisanje probe (katjonska, anjonska, neutralna).
- Bitna je lipofilnost i ćelijska propustljivost za specifičnu probu.
- *Site-specific* $O_2^{\bullet-}$ detekcija sa visokom osetljivošću.
- Neki specifični spin-trapovi ...



EPR metode

EPR spin-trapovi

CDMIO . K

[4-Carboxy-2,2-dimethyl-2H-imidazole-1-oxide . K]

ALX-430-089-M010 10 mg

ALX-430-089-M050 50 mg

Water soluble, **non-cell permeable spin trap**. Stable against reduction by vitamin C and thiols.

DMPIO

[2,2-Dimethyl-4-phenyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-088-M010 10 mg

ALX-430-088-M050 50 mg

Widely used, **cell permeable** and highly sensitive **spin trap**. Alternative to PBN (Prod. No. ALX-430-082). More lipophilic than TMIO (Prod. No. ALX-430-073). Does not trap the superoxide radical.

TMPO

[3,3,5,5-Tetramethyl-pyrroline-N-oxide; M4PO]

ALX-430-084-M100 100 mg

ALX-430-084-M500 500 mg

Solid cell permeable spin trap.

TMIO

[2,2,4-Trimethyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-073-M050 50 mg

ALX-430-073-M250 250 mg

ALX-430-073-G001 1 g

Selective, **cell permeable** and non-toxic **spin trap** for peroxynitrite and secondary O-, C-, S-, and N-centered free radicals.

MCPIO

[2-(2-Carboxyethyl)-2-methyl-4-phenyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-083-M010 10 mg

ALX-430-083-M050 50 mg

Cell permeable, stable spin trap. Alternative to PBN (Prod. No. ALX-430-082).

POBN (high purity)

[α -(4-Pyridyl 1-oxide)-N-tert-butylnitron]

ALX-430-091-M500 500 mg

ALX-430-091-G001 1 g

Cell permeable hydrophilic spin trap for both *in vivo* and *in vitro* studies. Water soluble analog of PBN (Prod. No. ALX-430-082). Low paramagnetic impurities.

TEMPONE-H . HCl

[1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine . HCl]

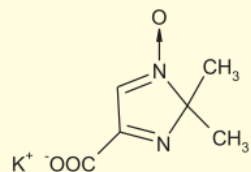
ALX-430-071-M010 10 mg

ALX-430-071-M050 50 mg

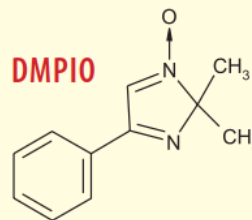
ALX-430-071-M250 250 mg

Very effective, **cell permeable** and non-toxic **spin trap** for the detection of superoxide radical and peroxynitrite.

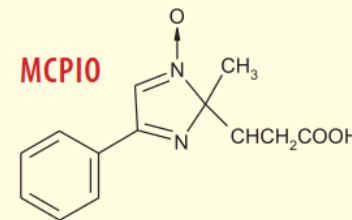
Chemical Structures



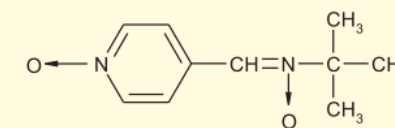
CDMIO . K



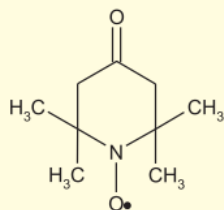
DMPIO



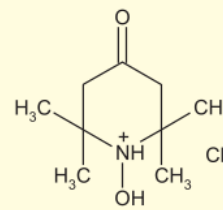
MCPIO



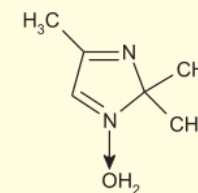
POBN (high purity)



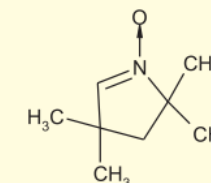
TEMPONE



TEMPONE-H . HCl



TMIO



TMPO



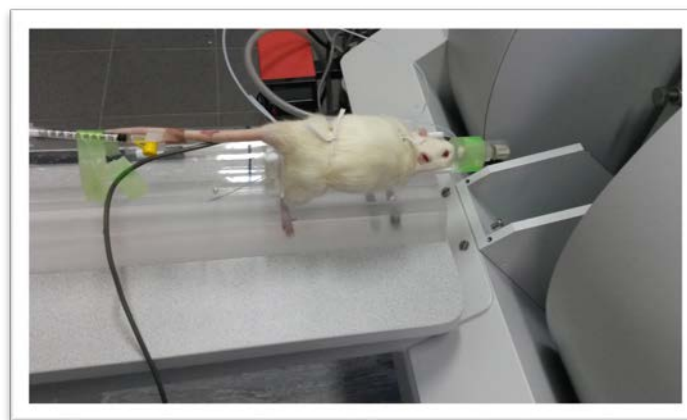
EPR metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vivo*

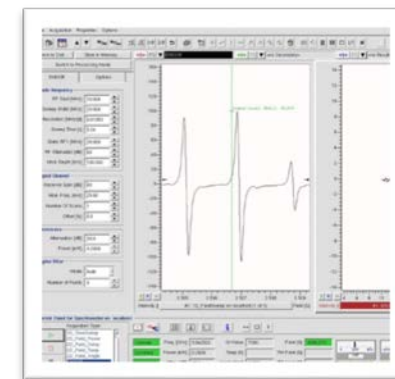
Da li su mogući *in vivo* EPR eksperimenti?

- Da li možemo vizualizovati performanse jednog antioksidansa *in vivo*?
- Možemo, upotrebom kombinovane EPR spektroskopije i imidžinga.

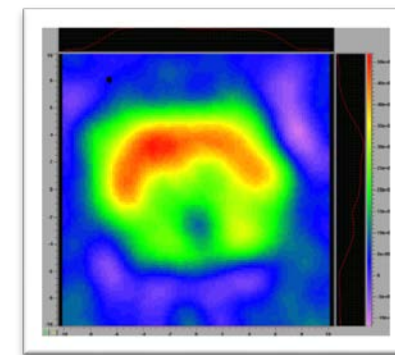
- L-band EPR spektroskopija i imidžing.
- Svi eksperimenti sa životinjama moraju se izvoditi u skladu sa domaćim i međunarodnim zakonima "Animal testing regulation laws".



In vivo EPR merenje



Slobodni radikali *in vivo*
EPR spektroskopija



Slobodni radikali *in vivo*
2D EPR imidžing

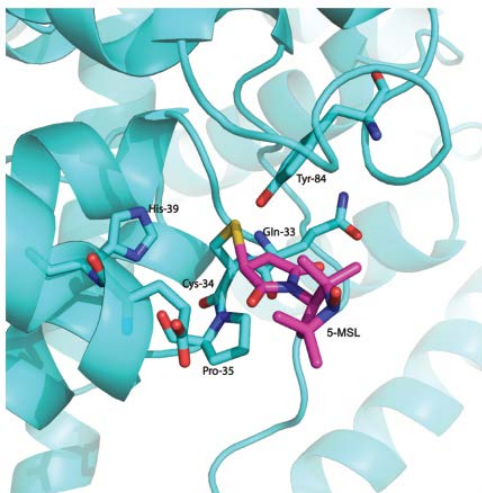


EPR metode

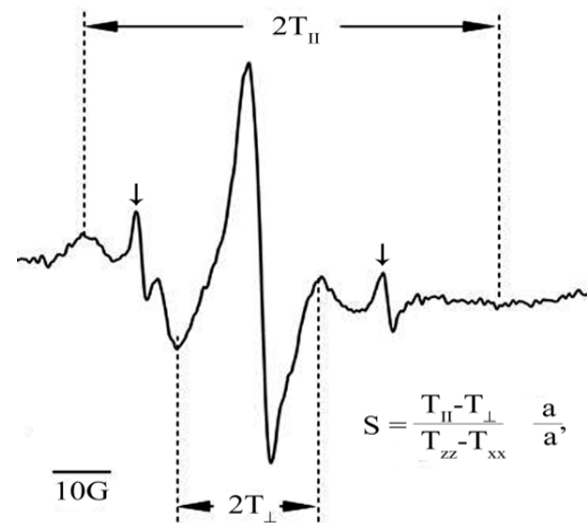
Spinsko obeležavanje

EPR spinsko obeležavanje membrana i proteina

- Koristimo specijalno dizajnirane EPR-aktivne molekule (spinske obeleživače).
- Obeležavamo membrane i proteine.
- Možemo detektovati lipidnu peroksidaciju od strane ROS/RNS.
- Možemo ispitivati konformacione promene proteina (npr. u interakciji sa lekovima).



Spin-label 5-MSL covalently bound to Cys-34 of BSA



$$S = \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{T_{zz} - T_{xx}} \frac{a}{a'}$$

The EPR spectrum of 5-MSL bound to BSA

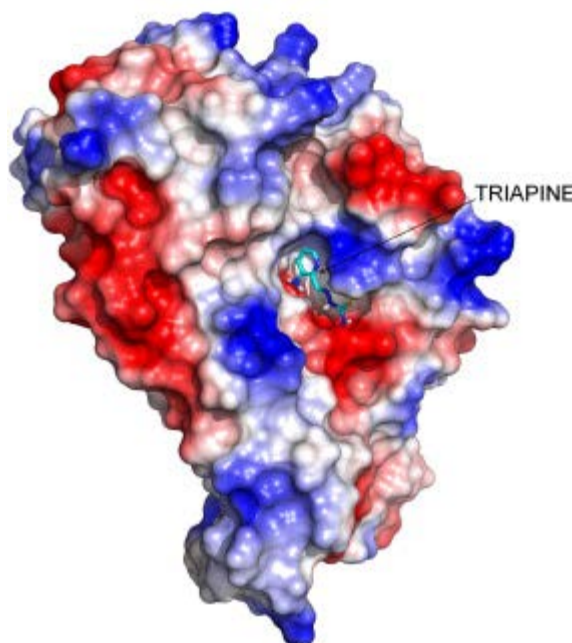


EPR metode

EPR metaloproteina i proteinskih radikala

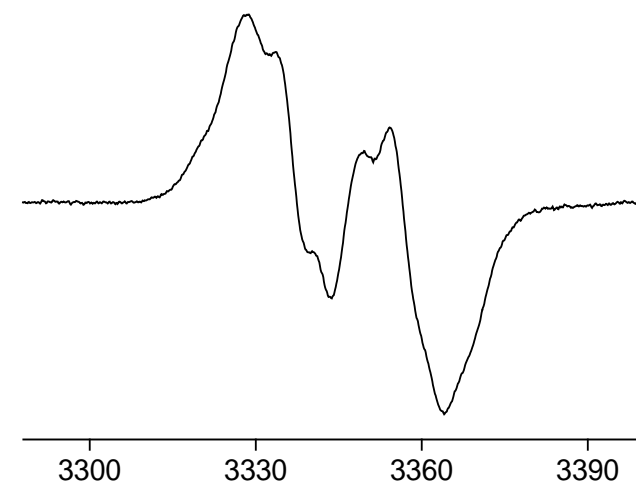
Studija ispitivanja metaloproteina i proteinskih radikala – delovanje antikancer leka Triapina

- Ovi eksperimenti se izvode od 77K (tN₂) do 4K (tHe).
- Detektujemo metalne komplekse.
- Ribonukleotid reduktaza (RNR) - target za antikancer lek Triapin.
- Interakcija sa lekom Triapinom rezultuje formiranjem iron(II)-Triapine kompleksa.
- Stvara se ROS koji oštećuje RNR enzim.
- Smanjuje se količina Tirozil radikala, pa vidimo da lek radi.



R2 subunit of RNR

Human R2 RNR Tyrosyl radical @30K



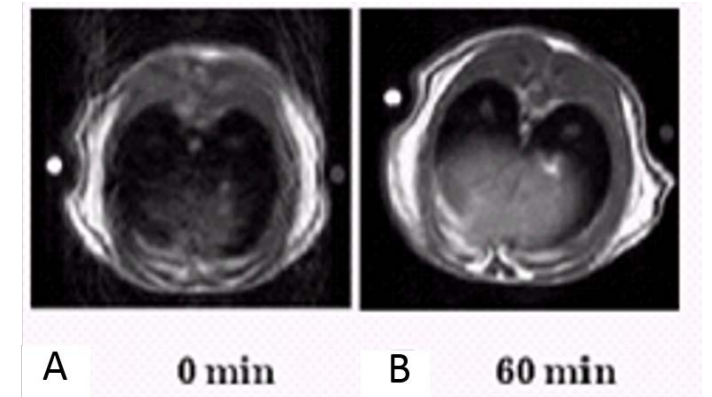
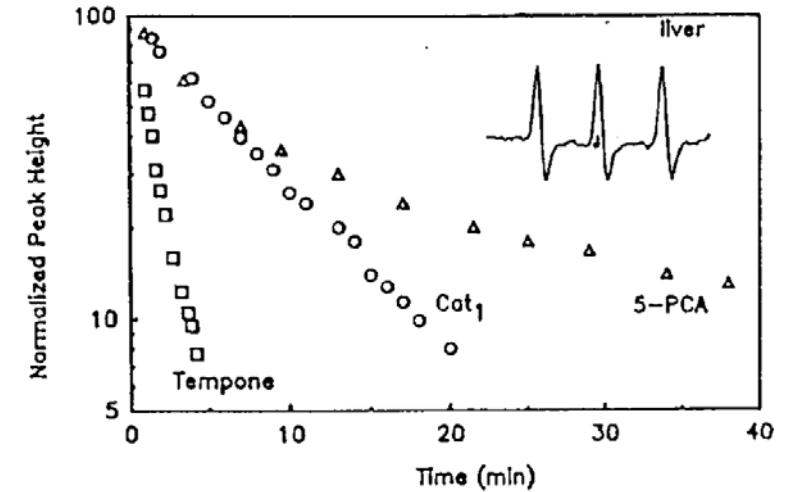


EPR metode

In vivo spektroskopija malih životinja za detekciju NO i ROS

Ispitivanje farmakokinetike nitroksida

- L-band EPR rezonatori u koje smeštamo male životinje.
- EPR signal se smanjuje pod uticajem ispiranja probe ili delovanjem endogenih antioksidanasa.
- Možemo pratiti BBB propustljivost ili totalni antioksidativni kapacitet tkiva i organa.
- Rezultati se porede sa onima koji se dobijaju kada se aplicira potencijalni lek.
- Paramagnetski efekat nitroksida može istovremeno poslužiti i kao MRI kontrastni agens.



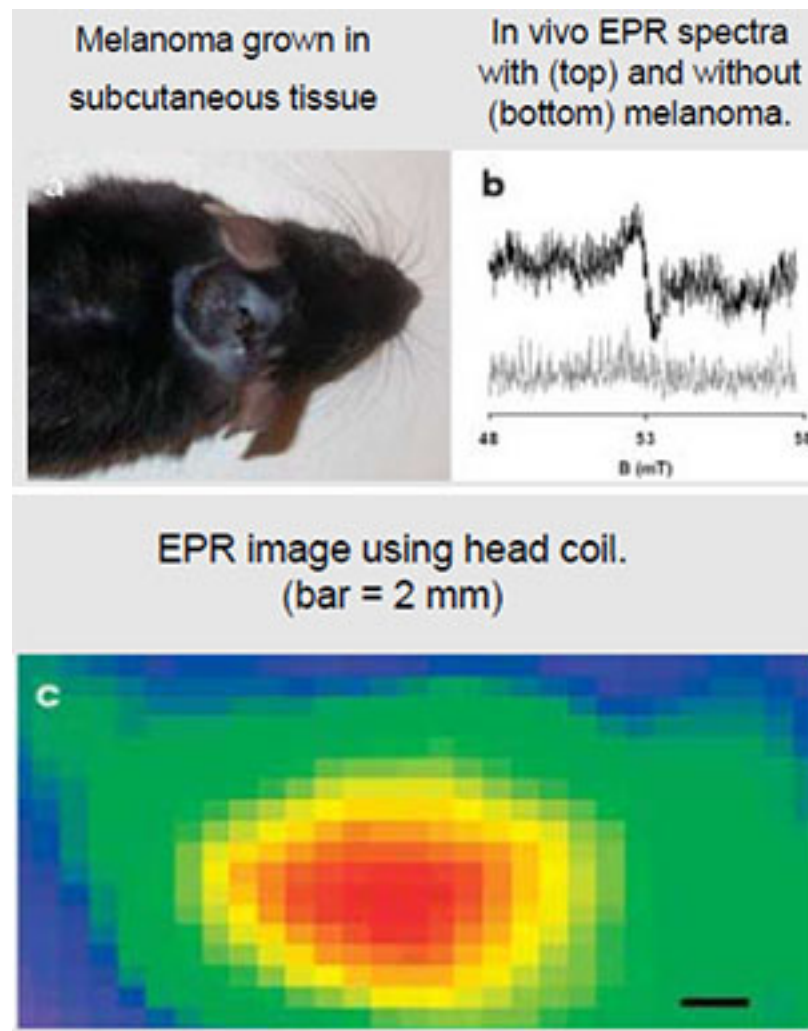


EPR metode

EPR spektroskopija i imidžing - koža

Primena u farmaciji - koža

- Direktino ispitivanje uticaja leka na prisustvo slobodnih radikala u koži.
- Lek može ili namerno generisati radikale ili ih uklanjati.
- Ispitavanje delovanja UV zračenja na kožu (sa i bez leka).
- Ispitivanje isporuke lekova kroz kožu (integrisanih u liposome ili micide).
- Praćenje kontrolisane isporuke lekova kroz kožu.



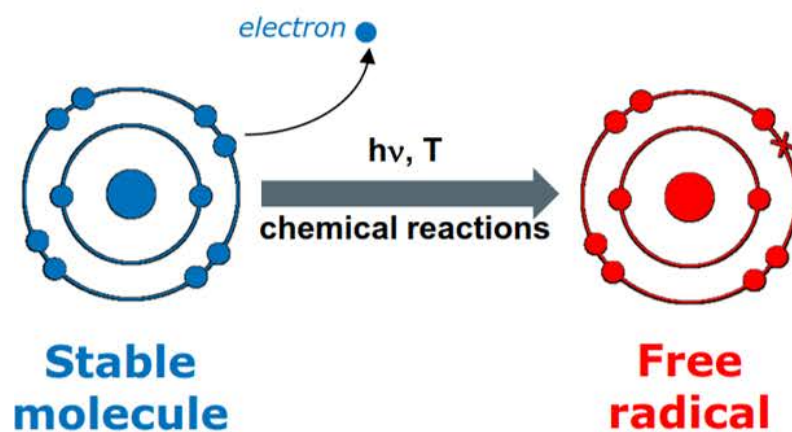
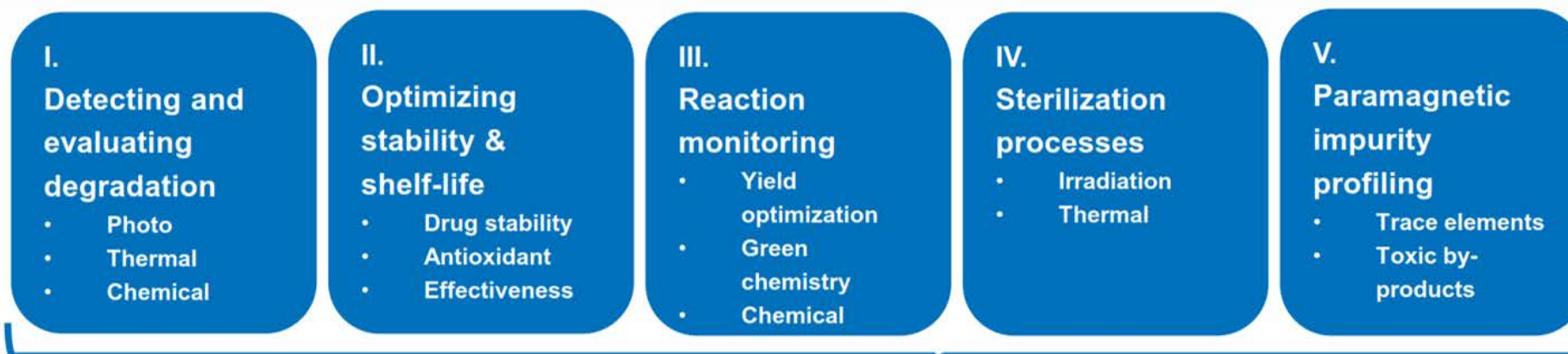


Još neke primene u farmaciji

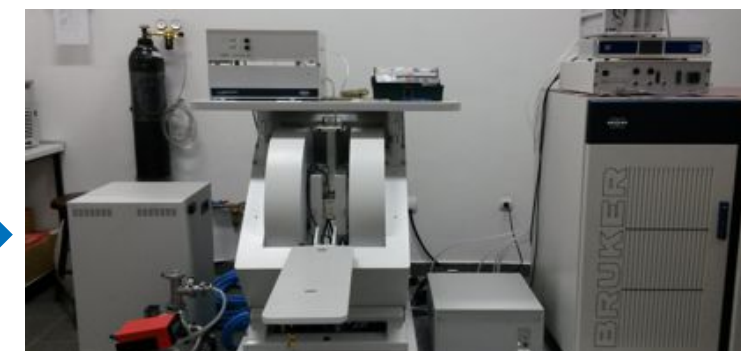


Zašto je potrebno detektovati slobodne radikale u lekovima?

- Ima 5 oblasti gde nam EPR može pomoći:



Free radicals & Transition metals





Još neke primene u farmaciji



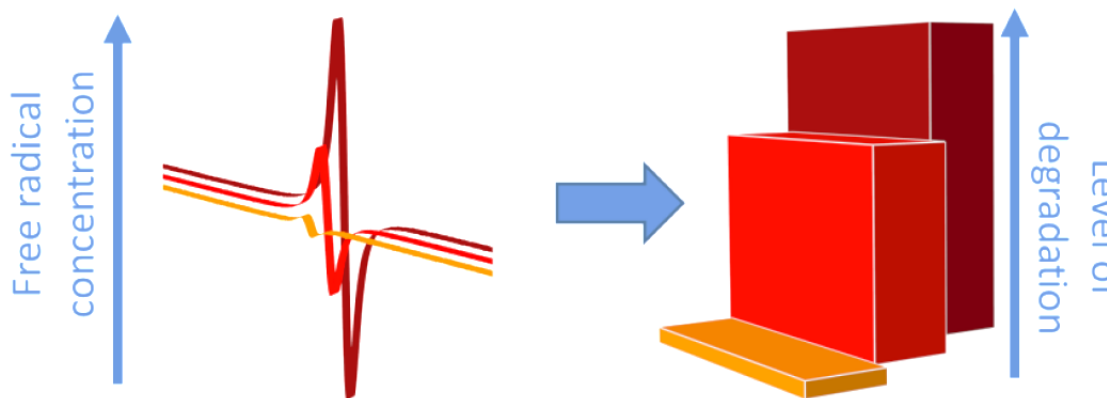
I. Praćenje degradacije leka

Faktori koji utiču na stabilnost farmaceutskog preparata:

- Toplota
- Svetlost (UV, VIS)
- Kiseonik
- Vlaga
- Proces sterilizacije
- Nečistoće
- Pomoćni sastojci

Svi ovi faktori utiču na degradaciji API-ja, dodatka leku ili formulacija

- Degradacioni procesi često uključuju učešće slobodnih radikala i prelaznih metala
- Degradacija se koreliše sa EPR signalom



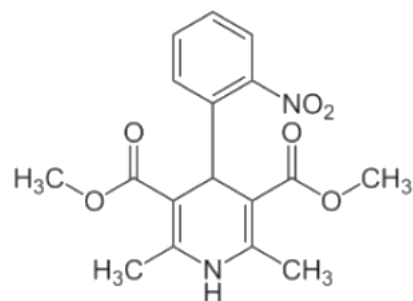


Još neke primene u farmaciji



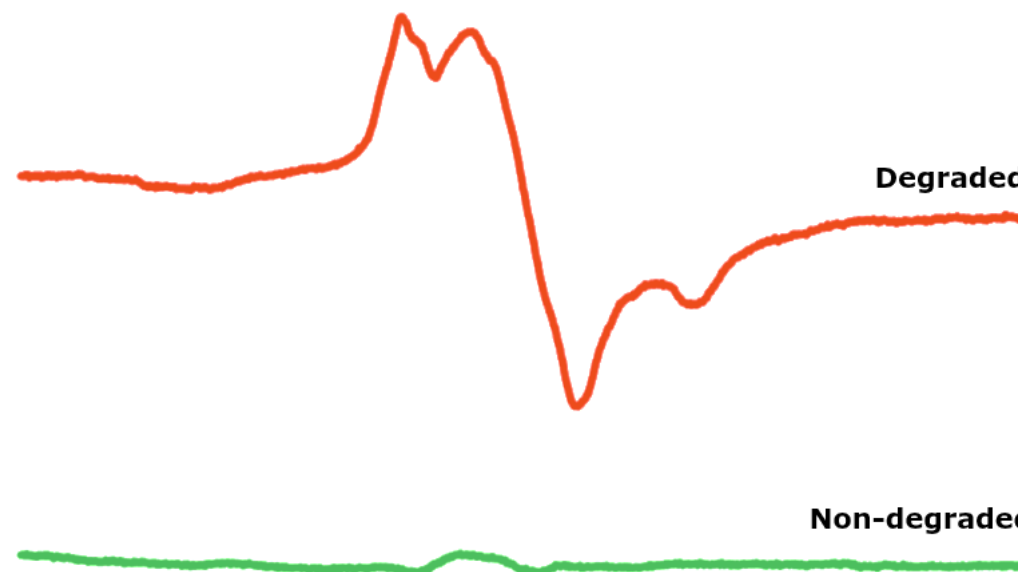
I. Praćenje degradacije leka

- Kako EPR ovde može pomoći?
 - Merenjem tj. određivanjem uzročnika degradacije leka
 - Merenjem nivoa degradacije API-ja, dodataka leku ili formulacija
 - Predvideti rok trajanja tj. stabilnost API-ja, dodataka leku ili formulacija



Nifedipine

Photodegradation of Nifedipine after exposure to light shows the formation of N-based free radical. The amount of free radicals corresponds to the level of degradation



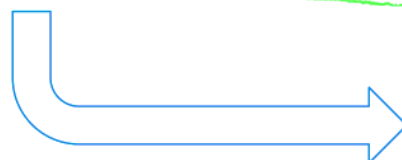
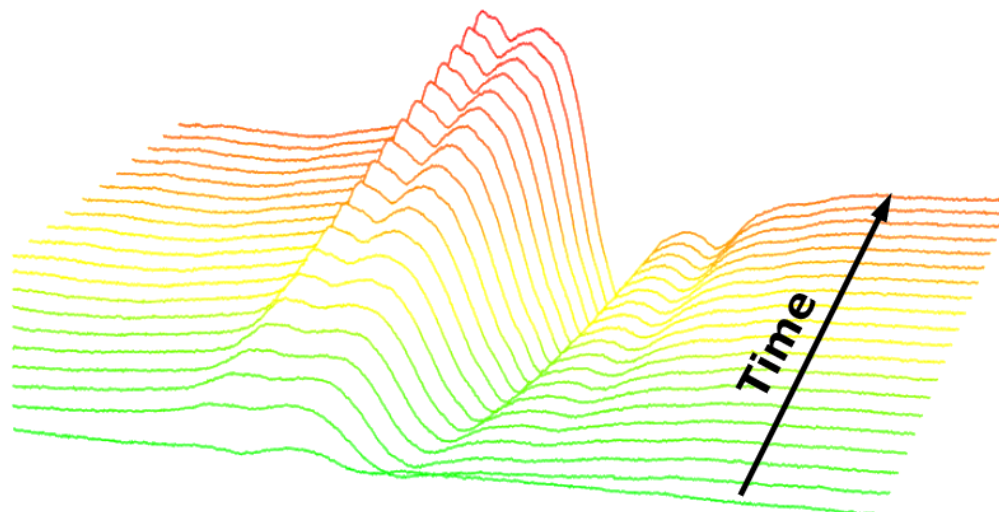


Još neke primene u farmaciji



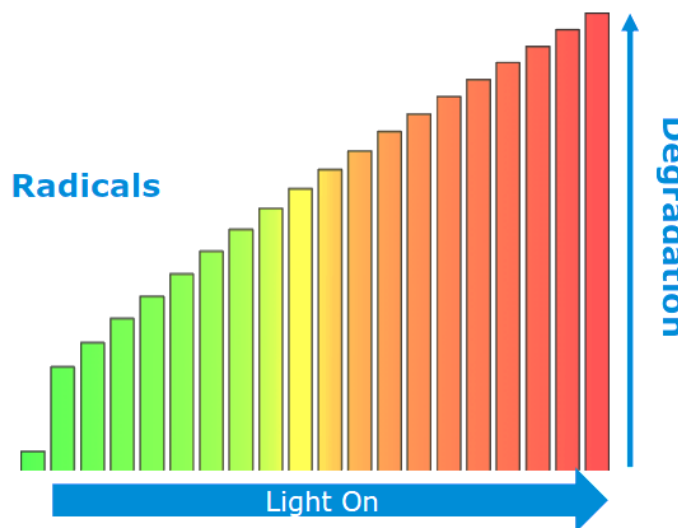
I. Praćenje degradacije leka

- Vremenska zavisnost visine EPR pika radikala dobijenog degradacijom API-ja



- The increasing amount of radicals shows the level of API degradation and can be used to predict stability of the product.

Free Radicals



Williams H.E. and Claybourn M. (AstraZeneca), Predicting the photostability characteristics of active pharmaceutical ingredients using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2012) 38(2) 200



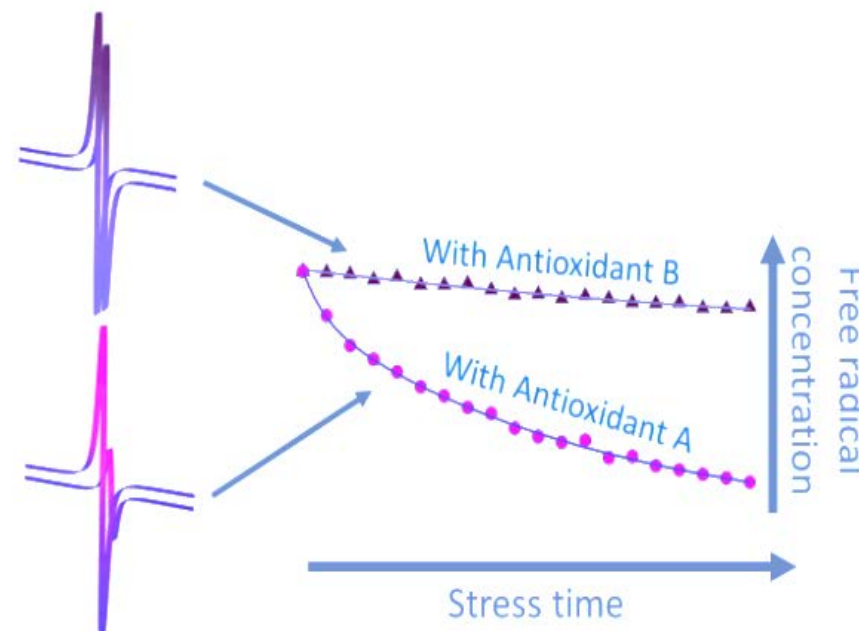
Još neke primene u farmaciji



II. Optimizovanje stabilnosti i roka trajanja leka

- Ispitivanje kako indukovani oksidativni stres utiče na oksidaciju/degradaciju u cilju predviđanja stabilnosti leka.
- Tokom testa na stres, lek se podvrgava toploti, delovanju svetlosti i hemijskim agensima
- Na ovaj način se postiže:
 - Bolje razumevanje mehanizama degradacije
 - Određivanje svojstvene stabilnosti i roka trajanja
 - Razvijanje stabilnijih formulacija

Antioxidant A is more effective than antioxidant B at quenching the free radicals in the drug formulation





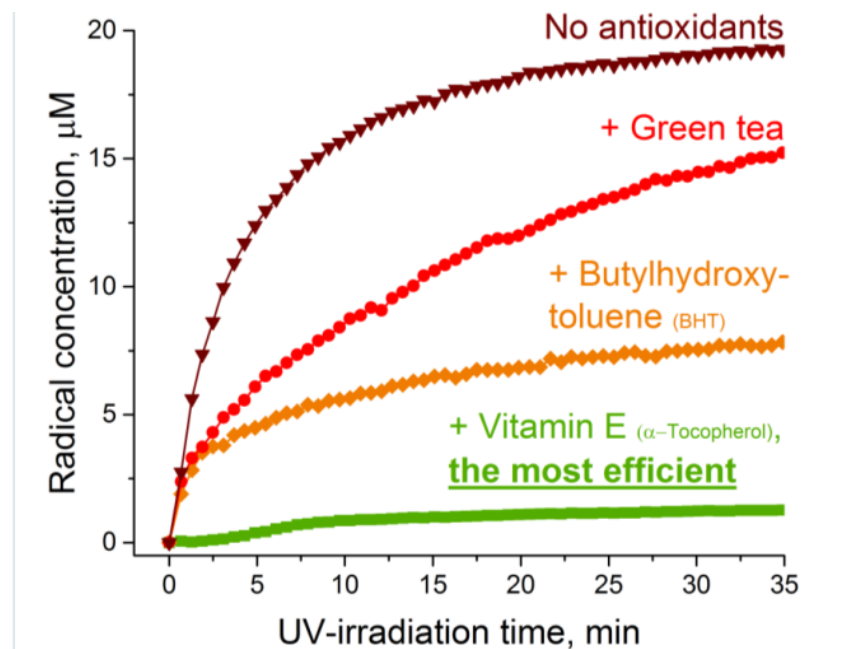
Još neke primene u farmaciji



II. Optimizovanje stabilnosti i roka trajanja leka

- Kako EPR ovde može pomoći?
 - Praćenjem procesa koji uključuju proizvodnju slobodnih radikala, što može pomoći u predviđanju dugotrajne foto-, termo- i hemijske stabilnosti leka.
 - Za ispitivanja su potrebne izuzetno male količine leka (važno za početne faze razvoja leka).
 - Određivanje antioksidativne efikasnosti leka za uklanjanje slobodnih radikala pomoću ranije ustanovljenih eseja.

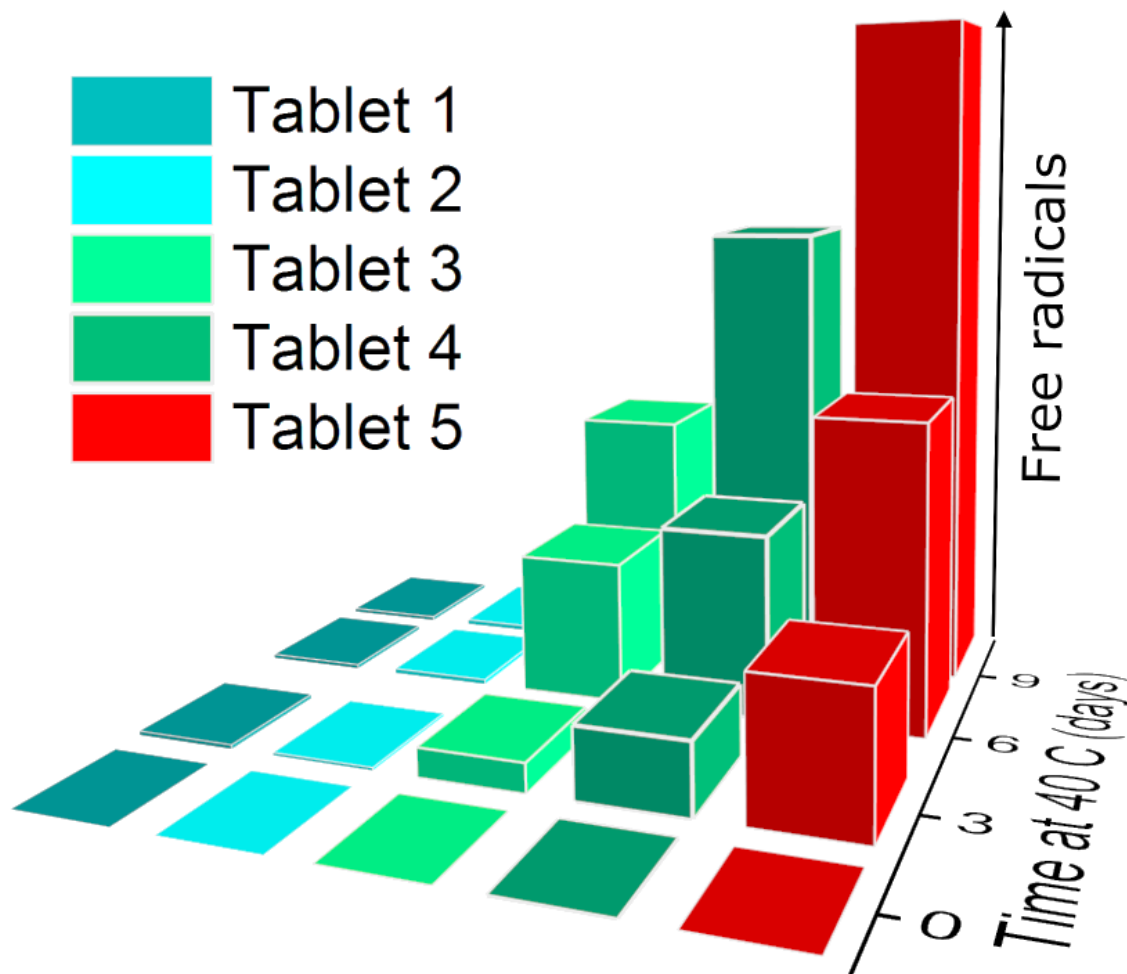
Evaluation of antioxidants' effect on a skin care product during UV-irradiation shows vitamin E to be the most efficient antioxidant.





Još neke primene u farmaciji

II. Optimizovanje stabilnosti leka i roka trajanja leka



Određivanje roka trajanja:

- Pet formulacija u obliku tableta se testiraju na temperaturski stres od 40°C, tokom perioda od 10 dana.
- Povećana koncentracija slobodnih radikala u tabletama 3-5, pokazuje skraćen rok trajanja leka.
- Tablete 1&2, koje imaju nisku koncentraciju slobodnih radikala, pokazuju bolji potencijal za dalji razvoj leka.

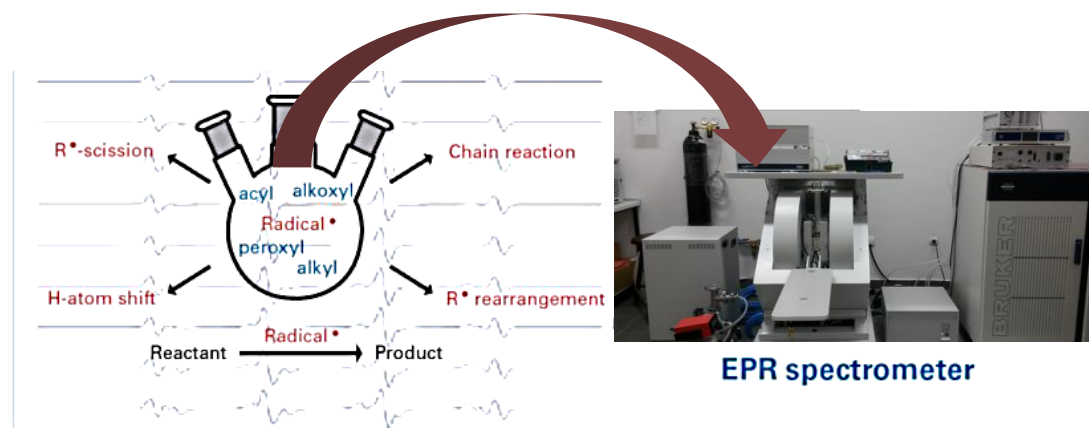


Još neke primene u farmaciji



III. Praćenje toka hemijskih reakcija – proizvodnja leka

- Praćenje reakcije je kritično za proces razumevanja, optimizacije unapređenju procesa proizvodnje leka.
- Razumevanje reakcionih mehanizama vodi smanjenju troškova i očuvanju kvaliteta finalnog proizvoda.
- Informacije dobijene iz proučavanja kinetike i modelovanja, omogućavaju predviđanje uslova sinteze leka, što dovodi do optimizacije i kontrole procesa proizvodnje leka, kao i proceni rizika.
- Detaljno poznavanje hemijskih mehanizama proizvodnih procesa, koji uključuju radikale i prelazne metale, su važni za povećanje prinosa i ekološkim aspektima proizvodnje leka.





Još neke primene u farmaciji

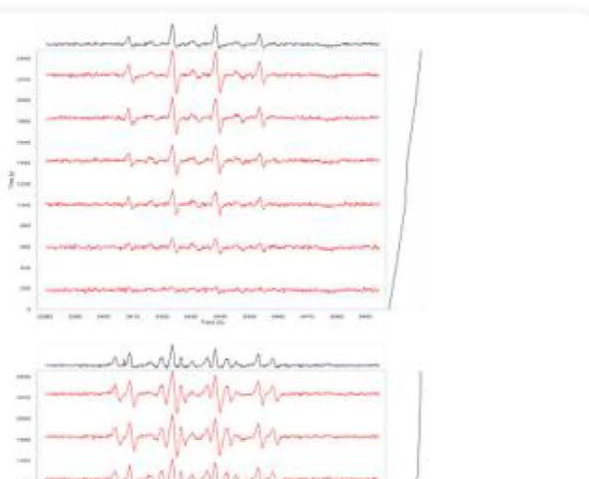
III. Praćenje toka hemijskih reakcija



- Kako EPR ovde može pomoći?

Hydroxyl Radical Generation by Ultrasonic Irradiation

As an example of closed loop reaction analysis, the radical generation initiated by ultrasonic irradiation was analyzed. When hydrogen peroxide (H_2O_2) is added to water and ultrasonic irradiation is performed, OH radicals are generated. These OH-radicals can be observed by using the spin trapping reagent DMPO (Fig. 4 upper). When methanol is added, both OH- and carbon centered radicals are generated from the water and methanol (Fig. 4 lower). The radical identities were determined by SpinFit and their concentration by SpinCount. The kinetics are analyzed by the Xenon software.



- Identifikacija reakcionih intermedijera (slobodnih radikala i prelaznih metala) daje informacije o mehaničkim svojstvima leka.
- Dobijaju se odgovori na dva osnovna pitanja: reakcioni prinos i reakciona kinetika.
- Dobijaju se podaci za kreiranje kinetičkih modela.
- Kvantifikacija količine slobodnih radikala i metala tokom reakcije.

Mangion I. et. al. (Merck), Using electron paramagnetic resonance spectroscopy to facilitate problem solving in pharmaceutical research and development. *J. Org. Chem.* (2016) 81 6937



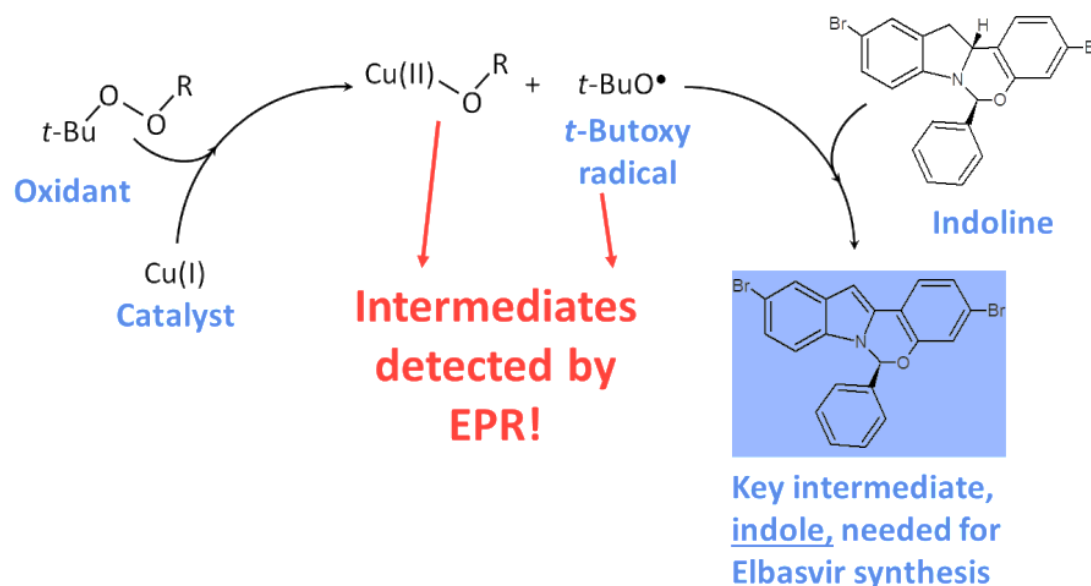
Još neke primene u farmaciji



III. Praćenje toka hemijskih reakcija

Primer kompanije MERCK:

- An indole intermediate is a synthetic challenge in the production of a new Hepatitis C drug (Elbasvir)
- A proposed mechanism suggests that the catalyst Cu(I) is oxidized to form Cu(II) and tert-butoxy radical
- A novel green chemistry synthesis with high efficiency (92% indole yield) is accomplished



Simplified proposed mechanism of indoline oxidation

Peng F. et. al. (Merck), A mild Cu(I)-catalyzed oxidative aromatization of indolines to indoles, *J. Org. Chem.* (2016) 81 10009



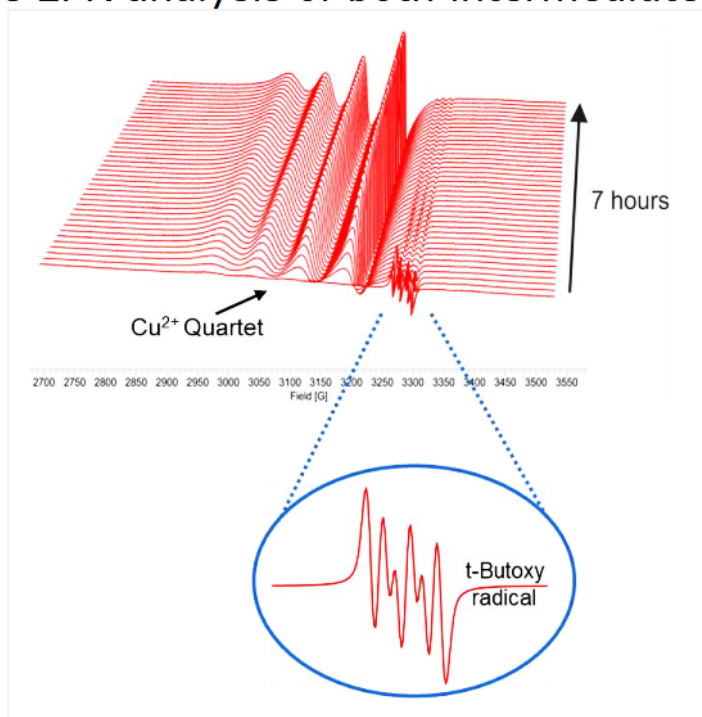
Još neke primene u farmaciji



III. Praćenje toka hemijskih reakcija

Primer kompanije MERCK:

- Monitoring the reaction confirms oxidation of the EPR silent Cu(I) to the EPR active Cu(II)
- Cu(II) signal reaches a plateau after ~ 3 hours indicating completion of the reaction
- t-Butoxy radical is detected as well by EPR using a spin trap
- Quantitative EPR analysis of both intermediates provides information about the synthesis efficiency



Peng F. et. al. (Merck), A mild Cu(I)-catalyzed oxidative aromatization of indolines to indoles, *J. Org. Chem.* **(2016)** 81 10009



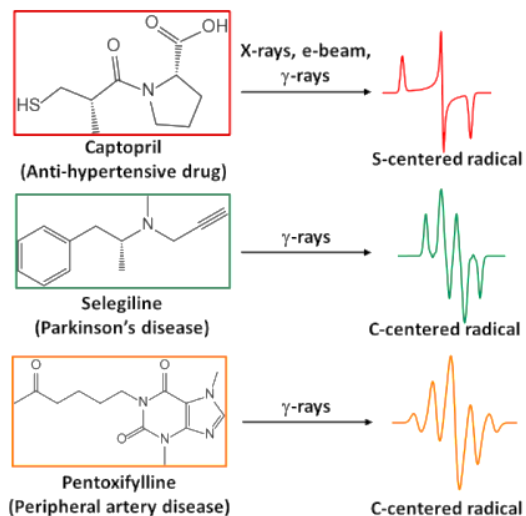
Još neke primene u farmaciji



IV. Praćenje procesa sterilizacije

- Ispravna sterilizacija API-ja, dodataka leku, finalne fomulacije leka, laboratorijske opreme i medicinskih uređaja su veoma važni za proizvođače lekova.
- Međutim, proces sterilizacije može rezultovati stvaranjem radikala koji:
 - Su odgovorni za degradaciju ozračenog materijala
 - Su odgovorni za promenu fizičko-hemijskih osobina sterilisanog proizvoda
 - Smanjuju efikasnost leka zbog njegove delimične degradacije tokom procesa sterilizacije
 - Mogu predstavljati toksikološku opasnost.

Examples:



- Gamma-irradiation of drugs in the solid-state (Captopril, Selegiline, Pentoxifylline) induces S- or C-centered free radicals.
- Identifying the structure of radicals provides a better understanding of the mechanism of radiolysis.
- Quantification of radical amount enables one to establish a threshold for the radiosterilization of these drugs.

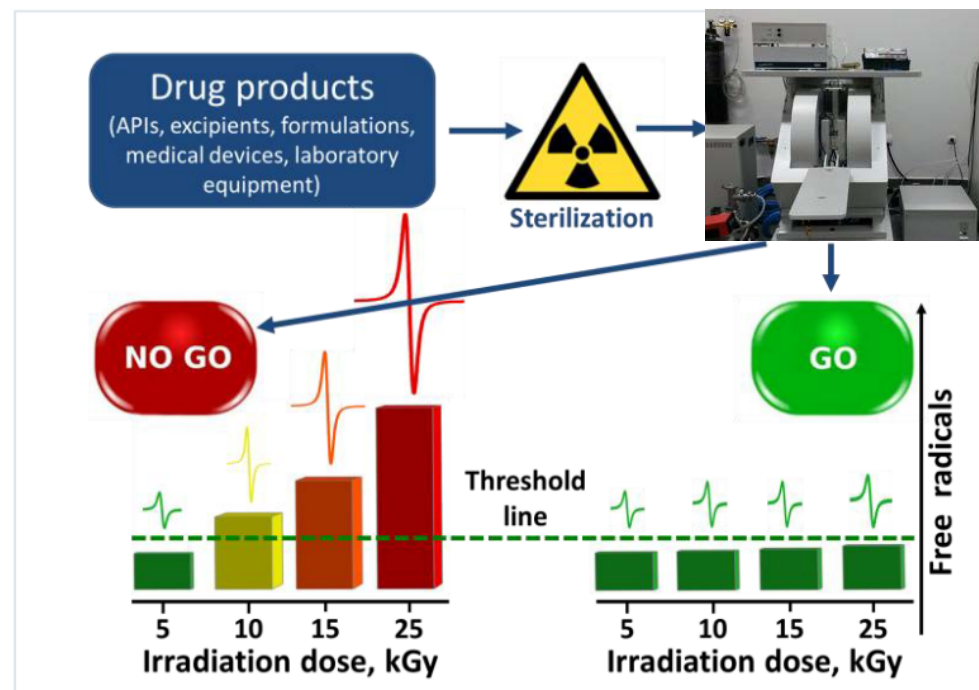


Još neke primene u farmaciji



IV. Praćenje procesa sterilizacije

- Kako EPR ovde može pomoći?
- Određuje stabilnost leka nakon sterilizacije.
- Može vršiti karakterizaciju slobodnih radikala i identifikaciju njihovog izvora.
- Omogućava donošenje važnih odluka tokom proizvodnje leka baziranih na kvantifikaciji slobodnih radikala tokom provere kvaliteta leka.



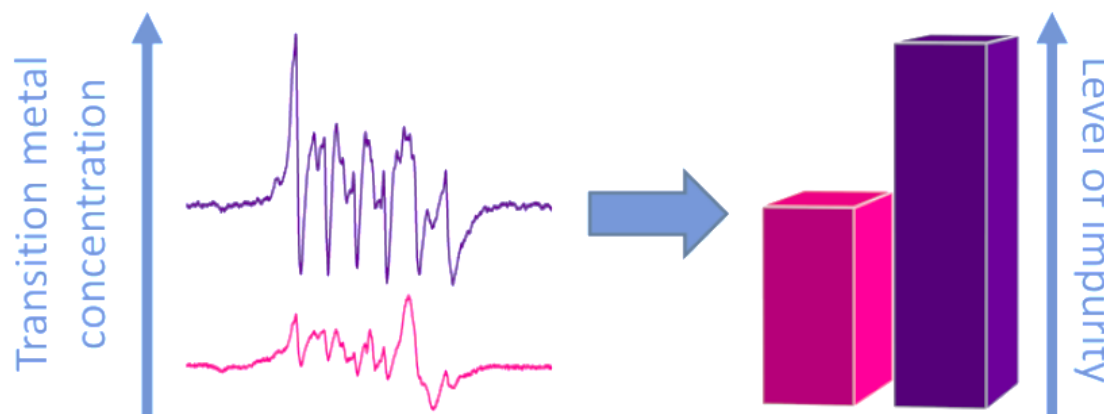


Još neke primene u farmaciji



V. Detekcija farmaceutskih nečistoća

- Nečistoće u leku potiču ili od API-ja, ili dodataka leku, ili od oba od ovih izvora.
- Nečistoće se takođe mogu uneti tokom procesa formulacije leka, tokom pakovanja ili skladištenja.
- Postojanje nečistoća može imati više neželjenih efekata, kao što su:
 - Smanjenje terapeutskog efekta leka
 - Skraćenje roka trajanja
 - Pojave toksičnosti leka



Metal concentration correlates with the EPR signal

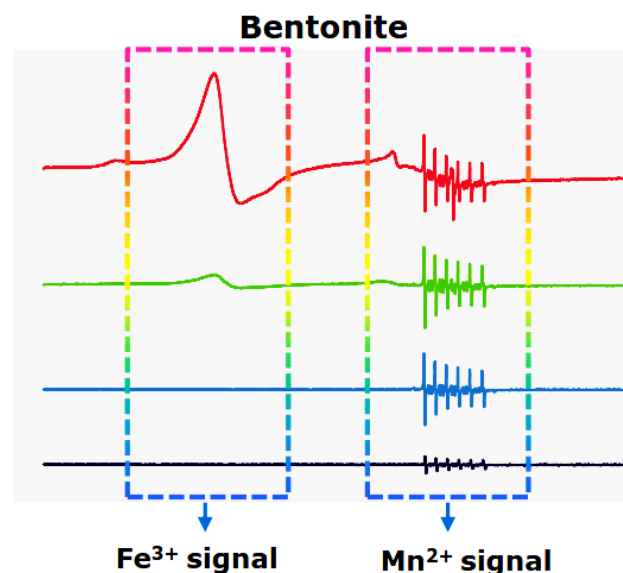


Još neke primene u farmaciji

V. Detekcija farmaceutskih nečistoća



- Kako EPR ovde može pomoći?
 - Detektovanje i identifikacija prelaznih metala u tragovima.
 - Praćenje procesa degradacije leka koji uključuju proizvodnju slobodnih radikala.
 - Proučavanje proizvodnje slobodnih radikala, katalisane prelaznim metalima ili nečistoćama.



Trace analysis: Impurity identification and control

- Manganese (Mn^{2+}) and iron (Fe^{3+}) are present at trace levels in the excipient bentonite, commonly used as a filler in tablets.
- Increasing amounts of metals accelerate the degradation of APIs and excipients.



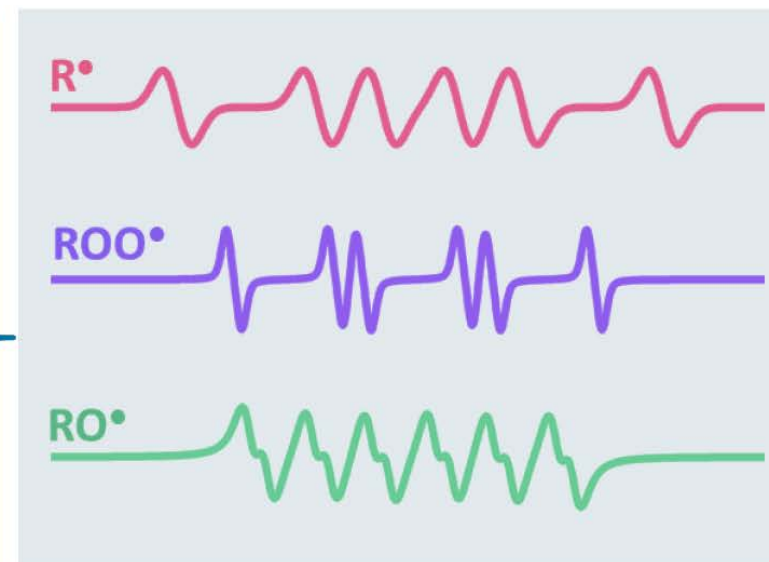
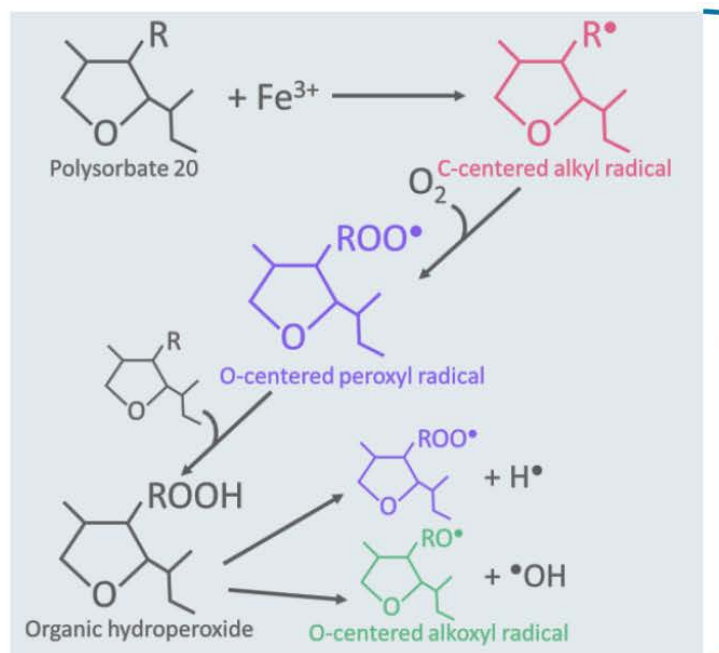
Još neke primene u farmaciji

V. Detekcija farmaceutskih nečistoća



Studija za jednu farmaceutsku kuću:

- Polisorbat 20, koji se prilikom formulacije leka koristi kao stabilizator, podleže atooksidaciji.
- Autooksidacija je katalisana prelaznim metalima što kao rezultat daje sporednu reakciju tokom koje se formiraju slobodni radikali.
- Pomoću EPR-a, mogu se detektovati identifikovati i kvantifikovati slobodnoradikalne nečistoće.



Lam X.E. et al. (Genentech Inc.), Site-specific tryptophan oxidation induced by autocatalytic reaction of polysorbate 20 in protein formulation, *Pharm. Res.* (2011) 28 2543



EPR Lab

- Za više informacija posetite naš sajt:



BioScope Labs

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs