

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

**AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ
PERMEACE: STUDIE VLIVU STRUKTURY
NA AKCELERAČNÍ ÚČINEK**

Doktorská disertační práce

Mgr. Michal Novotný

Červenec 2010

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Svoji doktorskou práci jsem vypracoval pod pečlivým a přátelským vedením doc. PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D. Touto formou děkuji své školitelce za pomoc a rady, které mi během celého studia poskytovala.

Můj dík patří celému kolektivu naší pracovní skupiny v čele s prof. PharmDr. Alexandrem Hrabálkem, CSc., jmenovitě Mgr. Barboře Janůšové, Mgr. Jaroslavu Rohovi, Mgr. Jakubovi Novotnému a Mgr. Kateřině Hruškové za tvorbu a udržování pozitivní nálady a dobrých mezilidských vztahů.

Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ivě Vencovské a Daně Cardové za bezchybnou spolupráci při analýzách připravených sloučenin a Ivaně Astapenkové za nezastupitelnou pomoc při administrativní činnosti.

Rád bych poděkoval Ing. Martině Tmějové z Vědeckého oddělení za pomoc a rady při administrativním řešení grantového úkolu.

Za významnou finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (79607/2007/B-CH/FaF), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV-2010-261-001) a svým rodičům.

1. Obsah

1. Obsah.....	1
Abstrakt.....	3
Abstract	4
2. Cíl práce	5
3. Úvod	7
3.1. Transdermální podání léčiv	7
3.2. Bariérová funkce kůže.....	8
3.3. Cesty prostupu látek přes kůži	9
3.4. Akceleranty transdermální permeace	10
3.4.1. Mechanismus účinku akceleraantů.....	10
4. Přehled permeačních akceleraantů odvozených od ω-aminokyselin	12
4.1. Acyklické deriváty ω -aminokyselin.....	12
4.1.1. Deriváty lysinu.....	12
4.1.2. Deriváty glycinu a β -alaninu.....	13
4.1.3. Deriváty 6-aminohexanové a tranexamové kyseliny	15
4.2. Cyklické deriváty ω -aminokyselin.....	19
4.2.1. Deriváty azetidinu-2-onu (ϵ -laktamy).....	19
4.2.2. Deriváty pyrrolidinu-2-onu (γ -laktamy).....	19
4.2.3. Deriváty piperidinu-2-onu (δ -laktamy).....	23
4.2.4. Deriváty azepanu-2-onu (ϵ -laktamy).....	24
5. Experimentální část	29
5.1. Chemikálie a přístrojové vybavení.....	29
5.2. Syntéza derivátů dikarboxylových kyselin	29
5.2.1. Příprava látek M, F a S.....	29
5.2.2. Příprava látek MOH, SOH a FOH.....	30
5.2.3. Příprava látek MI, SI a FI	31
5.2.4. Příprava látek T a mT.....	32
5.2.5. Příprava látek TOH a mTOH.....	32
5.2.6. Příprava látek AT a AmT.....	33
5.2.7. Příprava látek CT a CmT	34
5.3. Syntéza analog T12	35
5.3.1. Příprava hydrochloridů ω -aminokyselin.....	35
5.3.2. Příprava amonium-chloridů.....	35
5.3.3. Příprava amonium-karbamatů	38
5.4. Permeační experimenty a HPLC stanovení.....	39
5.4.1. Příprava kůže.....	39
5.4.2. Příprava donorových vzorků	40
5.4.3. Modelová léčiva.....	40
5.4.4. Akceptorová fáze	41

5.4.5.	<i>Vlastní permeační experiment</i>	41
5.4.6.	<i>Pretreatment experiment a měření dermální elektrické impedance</i>	42
5.4.7.	<i>HPLC analýza</i>	42
5.4.8.	<i>Kalibrační standardy</i>	43
5.4.9.	<i>Výpočet fluxů a akceleračních poměrů</i>	43
6.	Výsledky a diskuze	44
6.1.	Deriváty dikarboxylových kyselin.....	44
6.1.1.	<i>Příprava derivátů dikarboxylových kyselin</i>	44
6.1.2.	<i>Urychlovací aktivita derivátů dikarboxylových kyselin</i>	47
6.2.	T12 a jeho analoga.....	52
6.2.1.	<i>Příprava polohových izomerů T12</i>	52
6.2.2.	<i>Urychlovací aktivita DDEAC a T12 a jeho analog</i>	53
6.2.3.	<i>Vliv pH na aktivitu akcelarantu</i>	57
6.2.4.	<i>Pretreatment experiment a změny v dermálních elektrických impedancích</i>	60
7.	Závěr	65
8.	Seznam zkratk	67
9.	Literatura	68
10.	Seznam publikovaných prací	73

Příloha I.

Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůsová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K. Dicarboxylic acid esters as transdermal permeation enhancers: effects of chain number and geometric isomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19(2), 344-347.

Příloha II.

Novotný, M., Hrabálek, A., Janůsová, B., Novotný, J., Vávrová, K. Transkarbams as transdermal permeation enhancers; Effects of ester position and ammonium carbamate formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 9(1), 2726-2728.

Příloha III.

Novotný, M., Klimentová, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action. *Under review*.

Abstrakt

Permeační akceleranty slouží k usnadnění prostupu léčiv přes kůži do systémové cirkulace či přilehlých tkání. Tato doktorská práce přímo navazuje na výsledky předchozích studií naší pracovní skupiny a věnuje se potenciálním permeačním akcelerantům dvou odlišných chemických skupin: derivátům dikarboxylových kyselin a Transkarbamu 12 a jeho analogům. Hlavním cílem bylo studovat vztahy mezi strukturou a účinkem těchto akcelerantů a přispět k objasnění mechanismu jejich účinku.

Nejprve jsem se zabýval studiem strukturních vztahů u derivátů dikarboxylových kyselin. Připravil jsem sérii látek odvozených od kyseliny maleinové, fumarové, jantarové, (2*R*,3*R*)-vinné a *meso*-vinné. Schopnost těchto sloučenin urychlit vstup modelového léčiva theofylinu přes prasečí kůži plné tloušťky byla studována pomocí *in vitro* permeačních experimentů ve Franzových difuzních celách. Bylo zjištěno, že jednořetězcové amfifilní molekuly jsou mnohem účinnějšími akceleranty než odpovídající dvouřetězcové sloučeniny. Nejaktivnější látka celé série – monododecylester kyseliny maleinové (derivát s *cis*-dvojnou vazbou), vykázal významně větší schopnost urychlit přestup theofylinu přes kůži v porovnání s příslušným *trans*-derivátem. Dále bylo zjištěno, že aktivita látek s jednoduchou vazbou (derivátů kyseliny jantarové) je silně závislá na donorovém médiu. U diastereoizomerních sloučenin odvozených od kyselin (2*R*,3*R*)-vinné a *meso*-vinné nebyl v této práci pozorován významný rozdíl v urychlovacích schopnostech.

Druhá část mé práce je věnována Transkarbamu 12, což je vysoce účinný, širokospektrý, netoxický a nedráždivý permeační akcelerant. Z chemického hlediska jde o dvouřetězcový amonium-karbamát vznikající reakcí dodecylesteru 6-aminohexanové kyseliny s oxidem uhličitým. Nejprve byla připravena série izomerů Transkarbamu 12. Zjistili jsme, že aktivita těchto sloučenin je přímo závislá na poloze esterové skupiny v molekule. Dále jsme vyslovili hypotézu, že mechanismus účinku transkarbamů je pravděpodobně duální. Část jejich aktivity je spjatá se solí karbámové kyseliny a/nebo s jejím rozkladem v mírně kyselém prostředí stratum corneum za uvolnění oxidu uhličitého. Překvapivě jsme však zjistili, že vzniklé amonium-chloridy mají vlastní urychlovací schopnost a přispívají tak k celkové aktivitě transkarbamů. Dále byly popsány závislosti účinku Transkarbamu 12 na pH donorového média, které byly v souladu s touto hypotézou. Na základě jeho vlivu na permeaci dvou rozdílných léčiv a elektrickou impedanci kůže jsme zjistili, že Transkarbam 12 ovlivňuje několik rozdílných cest léčiva přes stratum corneum. Tyto poznatky budou v budoucnu využity k cílenému návrhu nových účinnějších akcelerantů transdermální permeace léčiv.

Abstract

Permeation enhancers are compounds that promote drug flux into systemic circulation or adjacent tissues. This doctoral thesis follows our previous results and aims at studying two different groups of potential permeation enhancers: dicarboxylic acid derivatives and analogues of Transkarbam 12. The main purpose of my work was to study the structure-activity relationships in these permeation enhancers and to contribute to the elucidation of their mechanism of action.

The first part of my work was focused on derivatives of dicarboxylic acids. Series of enhancers based on maleic, fumaric, succinic, tartaric and *meso*-tartaric acids were prepared. The enhancing activity of these compounds was investigated *in vitro* in Franz diffusion cells using theophylline as a model drug and porcine skin. The single-chain amphiphiles were markedly more effective than the double-chain ones. The most active enhancer, monododecyl maleate, that is a *cis*- derivative, was a more potent enhancer than its respective *trans*- isomer. Furthermore, the activity of similar succinates, i.e. compounds having a single bond, strongly depended on the donor vehicle. No difference between diastereoisomeric tartaric and *meso*-tartaric acid derivatives was found.

The second part of my work dealt with Transkarbam 12, an ammonium carbamate formed by the reaction of dodecyl 6-aminohexanoate with carbon dioxide, which is a highly active, broad-spectrum, nontoxic, and nonirritant transdermal permeation enhancer. First, a series of Transkarbam 12 isomers was prepared. It was found that their activity highly depends on the position of the ester group. Furthermore, we hypothesized that transkarbams probably act by a dual mechanism: a part of their activity is associated with the carbamic acid salt and/or its decomposition in the acidic stratum corneum releasing carbon dioxide. Surprisingly, the ammonium esters thereby released are active enhancers as well and contribute to the overall activity of transkarbams. Furthermore, pH-dependent effects of Transkarbam 12 were described, which were in agreement with the above hypothesis. The effects of this enhancer on the permeation of two different drugs and on the skin electrical impedance suggested that Transkarbam 12 influences more drug penetration pathways through the stratum corneum. These findings will be used in a more rational design of novel transdermal permeation enhancers.

2. Cíl práce

Cílem mé doktorské práce bylo sledovat vztahy mezi chemickou strukturou navržených a připravených potenciálních permeačních akceleračních látek a jejich schopností urychlit průnik modelových léčiv přes prasečí kůži plné tloušťky *in vitro*. Pro tento účel byly vybrány dvě odlišné skupiny látek: deriváty dikarboxylových kyselin a Transkarbam 12 (T12) a jeho analoga.

Deriváty dikarboxylových kyselin

Nejperspektivnějšími akceleranty se v současné době jeví amfifilní látky dočasně rozvolňující uspořádání lipidových lamel v SC. Základními částmi takových amfifilních akceleračních látek jsou polární hlava a hydrofobní řetězec (řetězce). Předchozí publikovaná práce zabývající se amfifilními analogy ceramidů,¹ v níž nejlepších výsledků bylo dosaženo s derivátem, který měl v polární části molekuly kyselinu maleinovou, dala základ pro návrh a syntézu modelových potenciálních akceleračních látek hodnocených v této práci. Délka hydrofobního řetězce (řetězců) byla vybrána dle předchozích studií, ze kterých vyplývá, že optimální délka řetězce se pohybuje mezi 10 a 12 uhlíky.² Chemické obměny struktury byly proto v této práci zaměřeny jak na polární hlavu, tak na hydrofobní část molekuly a to s cílem objasnit vliv struktury sloučeniny na její schopnost urychlit přestup modelového léčiva přes kožní bariéru.

Cílené zjednodušení struktury v místě polární hlavy akcelerační látky umožnilo hledat souvislosti mezi deriváty kyseliny maleinové, fumarové, jantarové, (2*R*,3*R*)-vinné a *meso*-vinné. Byly tak navrženy: a) estery s odlišnou geometrickou izomerií na dvojnou vazbě (*E*-, *Z*-), b) sloučeniny, které měly dvojnou vazbu nahrazenou vazbou jednoduchou, c) sloučeniny, u nichž byly přítomné hydroxylové skupiny schopné tvořit vodíkové vazby.

Obměny v hydrofobní části molekuly byly navrženy především s cílem zjistit, zda má na urychlovací schopnost potenciálního akceleračního činidla vliv přítomnost pouze jednoho nebo dvou hydrofobních řetězců. Proto jsme jako základ vzali látky typu: didodecylesterů, monododecylesterů a dodecyl-methylesterů od všech uvedených dikarboxylových kyselin.

Transkarbam 12 a jeho analoga

Transkarbam 12 je akcelerační transdermální permeace připravený na našem pracovišti,³ který vykazuje vysokou akcelerační účinnost pro řadu různých léčiv, přičemž jeho výhodou je, že je netoxický, nedráždivý a biodegradabilní. Tyto vlastnosti jej řadí mezi perspektivní látky, u nichž se vyplatí hledat vztahy mezi strukturou a účinkem a pátrat po mechanismu akceleračního účinku.

Na základě předchozích výsledků byla vyslovena hypotéza, že labilita soli karbámové kyseliny (tj. schopnost uvolňovat oxid uhličitý) by mohla být zodpovědná za mechanismus účinku této látky.^{45,46} Zároveň však bylo zjištěno, že při urychlení permeace adefoviru přes kůži bylo dosaženo nejlepších výsledků při pH 4. To by mohlo naznačovat, že karbamátová struktura T12 není vždy k účinku nutná, a že v případě adefoviru je T12 schopen urychlovat i ve formě amoniové soli.⁴⁷ Cílem této druhé části doktorské práce bylo tedy tyto známé informace doplnit a zjistit zda se by se v případě transdermální podání T12 nemohlo jednat o duální mechanismus účinku – že akceleračně působí jak karbamát T12, tak amoniová sůl DDAEC z něj vznikající.

Při návrhu modelových akceleračních látek jsme vycházeli z předchozích publikovaných prací,^{49,50} ze kterých vyplývá, že přítomnost esterové skupiny je pro schopnost T12 urychlit prostup léčiva přes kůži nezbytná. S cílem ověřit hypotézu o možném duálním mechanismu účinku T12 (resp. obecně celé skupiny transkarbamů) a významu polohy esterové funkce byly navrženy a studovány dva typy sloučenin – dvouřetězcové amonium-karbamáty a jednořetězcové amonium-chloridy, přičemž celá série obou typů sloučenin byla koncipována jako řada polohových izomerů T12 stejného sumárního vzorce, lišících se vzdáleností esterové skupiny od dusíkového atomu. Dále jsme si kladli za cíl studovat vliv pH donorového vzorku na aktivitu T12 a jeho metabolitu DDEAC, tedy amoniové soli vzniklé po rozkladu T12 v kyselém prostředí, pomocí dvou modelových léčiv a elektrické impedance kůže.

3. Úvod

3.1. Transdermální podání léčiv

Transdermální podání léčiv (transdermal drug delivery, TDD) spočívá v aplikaci léčivé látky přes kůži s cílem dosáhnout jejího systémového účinku. Na rozdíl od klasického podání léčiva (perorálního či parenterálního) poskytuje transdermální aplikace mnoho výhod.^{4,5} Mezi nejvýznamnější výhody počítáme:⁶

- vyloučení first-pass efektu po průchodu játry a gastrointestinálním systémem
- vyloučení nežádoucího dráždění trávicího traktu
- možnost rychlého přerušení přívodu léčiva odstraněním transdermálního systému
- vyloučení fyzikálně-chemických interakcí s potravou či současně podávanými léčivy
- možnost udržet stabilní plazmatickou hladinu léčiva po dlouhou dobu
- menší traumatizaci pacienta a zlepšení compliance

I přesto, že dnes již není lidská kůže považována za neprostupnou membránu, vhodných kandidátů pro transdermální použití je bohužel málo. K tomu, aby léčivo procházelo skrz kůži a bylo tzv. „easy-to-deliver“, musí mít kombinaci následujících fyzikálně-chemických vlastností:⁷

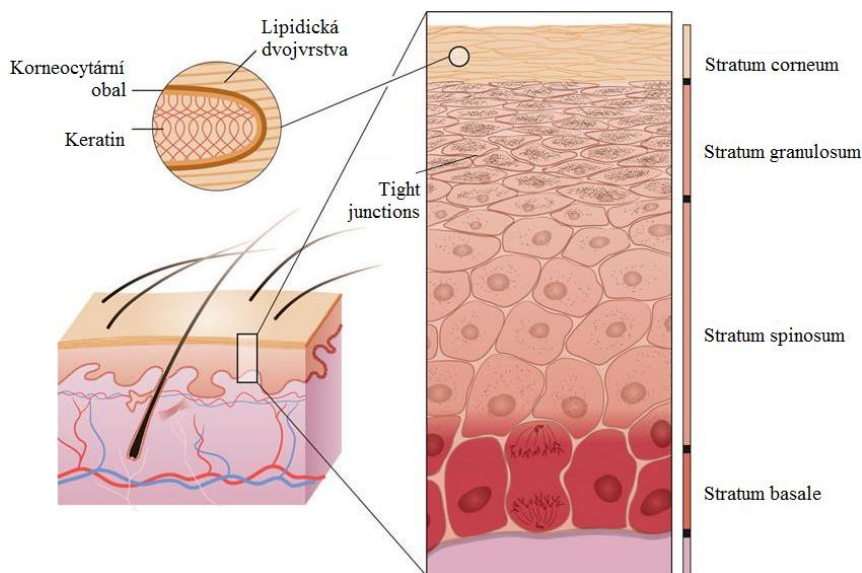
- denní terapeutická dávka nižší než 10 mg
- nízká teplota tání (do 200 °C)
- vyvážená lipofilita látky ($\log P \sim 1-3$)
- molární hmotnost menší než 500 g.mol⁻¹

Většina léčiv však tyto požadavky nespĺňuje. K rozšíření palety transdermálně podávaných léčiv (v současné době jsou to např. klonidin, fentanyl, lidokain, nikotin, nitroglycerin, estradiol, ethinylestradiol, oxybutynin, skopolamin, testosteron, norethindron-acetát, norelgestromin, methylenfenidát, selegilin, rivastigmin, rotigotin či granisetron)⁷ je nutné dočasně snížit bariérovou funkci kůže. Za tímto účelem bylo vyvinuto mnoho různých přístupů včetně chemických akcelerantů, iontoforézy, ultrazvuku, elektroforace, magnetoforézy, fotoakustických vln, mikrojehel, lipozómů a jiných nosičů, eutektických systémů, iontových párů a dalších.⁸

3.2. Bariérová funkce kůže

Klíčovou funkcí lidské kůže je tvořit bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím, tedy zabránit ztrátám vody a endogenních látek a chránit organismus před mechanickým poškozením, nežádoucími substancemi, mikroby a ultrafialovým zářením.

Kůže savců (Obr. 1.) je složena ze dvou hlavních vrstev – vnitřní dermis a vnější nevasikularizované epidermis. **Dermis** je tvořena fibroblasty a extracelulární matrix; také je bohatě protkána kapilárami a nervovými zakončeními. **Epidermis** je z 95 % tvořena keratinocyty, melanocyty, a dále Langerhansovými a Merkelovými buňkami. Epidermis se dělí na čtyři vrstvy: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum. Buňky se v těchto vrstvách nacházejí v odlišných stádiích diference a postupně se migrací dostávají na povrch kůže. Buňky se zplošťují, organely se postupně rozpadají a dochází v nich k ukládání keratinu. Výsledkem procesu zvaného keratinizace je tvorba kožní bariéry.^{9,10,11}



Obr. 1. Struktura kůže a kožní bariéry.¹²

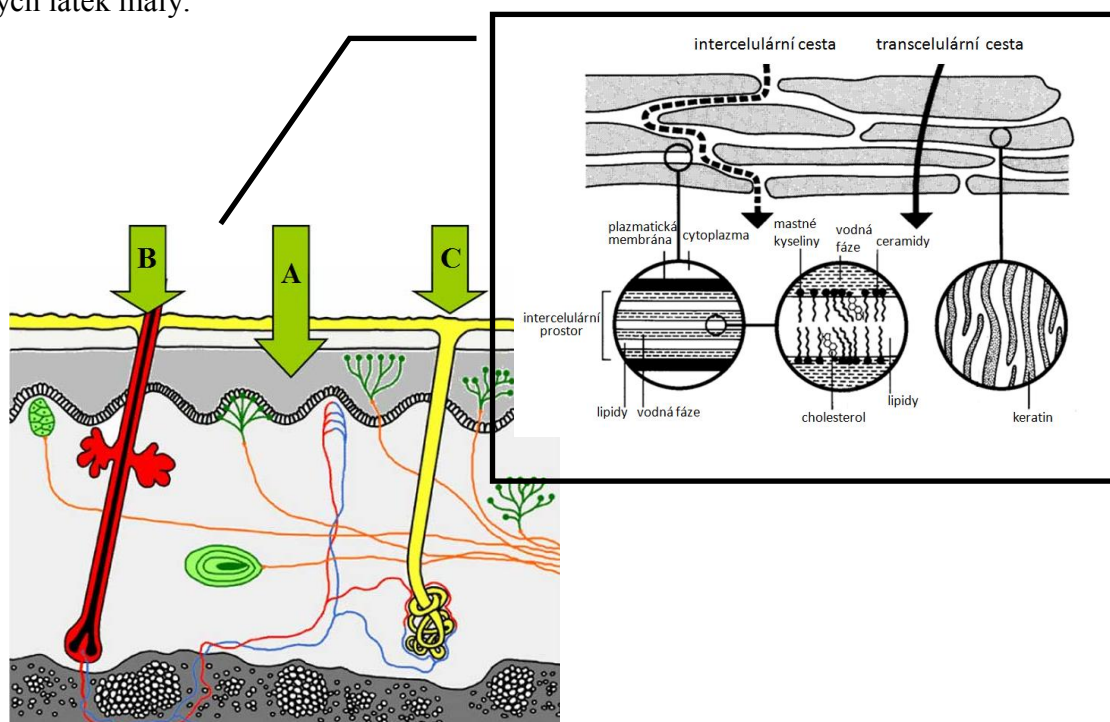
Kožní bariéra je pro naprostou většinu látek lokalizována v nejsvrchnější kožní vrstvě stratum corneum (SC), nazývané také rohová vrstva. SC je tvořeno korneocyty, což jsou keratinocyty nacházející se v terminálním stádiu diference. Tyto ploché, vzájemně do sebe zapadající buňky, jsou vystavěny z hydratovaného keratinu a jsou zodpovědné především za mechanickou odolnost kůže. Za bariéru vůči prostupu vody a jiných látek pak zodpovídá velmi hydrofobní lipidová matrix složená z ceramidů, mastných kyselin a cholesterolu. Barry používá pro zjednodušení popisu neporušeného SC připodobnění ke „zdi“. Cihly, v tomto případě korneocyty, jsou zasazeny v maltě – lipidické matrix.¹³

3.3. Cesty prostupu látek přes kůži

Existují tři potenciální možnosti, jak proniknout přes kožní bariéru (Obr. 2):¹⁴

(A) Většina látek prostupuje přes SC touto cestou, přičemž můžeme rozlišit *transcelulární prostup* přes korneocyty a *intercelulární prostup* mezibuněčnými prostory. Vzhledem k tomu, že mezibuněčné lipidy jsou kontinuální fází v celém SC, permeující látka jimi musí procházet v obou případech. I přesto, že je transcelulární cesta kratší, většina látek preferuje cestu mezibuněčnými lipidy, protože prostup přes korneocyty zahrnuje překonání mnoha fázových rozhraní.

(B + C) Menší část látek, zejména sloučeniny vysoce lipofilní a vysokomolekulární látky, využívá k prostupu přes kožní bariéru vlasových folikulů, mazových a potních žlázek. Ty tvoří asi 0,01–0,1 % kožního povrchu, proto je jejich podíl na permeaci běžných látek malý.⁸



Obr. 2. Cesty prostupu látek přes kůži.^{15,13}

Vztahy mezi mírou kožního prostupu různých sloučenin a jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi jsou v literatuře již dobře popsány. Pro látky schopné přecházet přes kůži jsou nejdůležitějšími veličinami velikost molekuly, její lipofilita a schopnost tvořit vodíkové vazby.^{16,17,18}

3.4. Akceleranty transdermální permeace

Jen velmi málo látek je schopno proniknout přes kožní bariéru v dostatečné míře k dosažení terapeutických koncentrací. Jedním ze způsobů, jak dočasně snížit bariérovou funkci kůže a umožnit léčivu vstup do systémové cirkulace, je použití akceleraantů transdermální permeace.

Je známo, že mnoho chemických látek volně interaguje s lidskou kůží, ale abychom je mohli považovat za permeační akceleranty, musí splňovat přísná kritéria.¹⁹ Ideální akceleraant by měl mít podle Williamse a Barryho^{4,20} kombinaci následujících vlastností:

- měl by být netoxický, nedráždivý, nealergizující
- nástup účinku by měl být co nejrychlejší, jeho délka a průběh musí být předvídatelná
- měl by být bez vlastního farmakologického účinku
- přestup látek by měl být jednosměrný – endogenní látky nesmějí přecházet ven
- po odstranění akceleraantu by mělo dojít k rychlé obnově bariérových vlastností kůže
- měl by být kompatibilní s léčivou a pomocnými látkami
- a měl by být „kosmeticky přijatelný“

V praxi se ukázalo, že by se mělo jednat také o látky snadno dostupné a levné a pro bezpečné terapeutické použití by měl být znám mechanismus jejich účinku. Prozatím žádná látka nespĺňuje požadavky na ideální akceleraant, a proto u dosud známých látek volíme kompromis mezi terapeutickým přínosem a rizikem nežádoucích účinků, jež se projevují jako místní iritace kůže či nevratná změna bariérových funkcí kůže.

Rozdělení akceleraantů lze provést podle různých kritérií. Podle chemické struktury se dají permeační akceleraanty rozdělit do dvou skupin – malé polární molekuly (např. ethanol, propylenglykol, dimethylsulfoxid) a amfifilní látky obsahující polární hlavu a hydrofobní řetězec (např. mastné kyseliny a alkoholy, Azon). Dále mohou být klasifikovány do skupin podle předpokládaného mechanismu účinku, chemické struktury či polarity.²¹

3.4.1. *Mechanismus účinku akceleraantů*

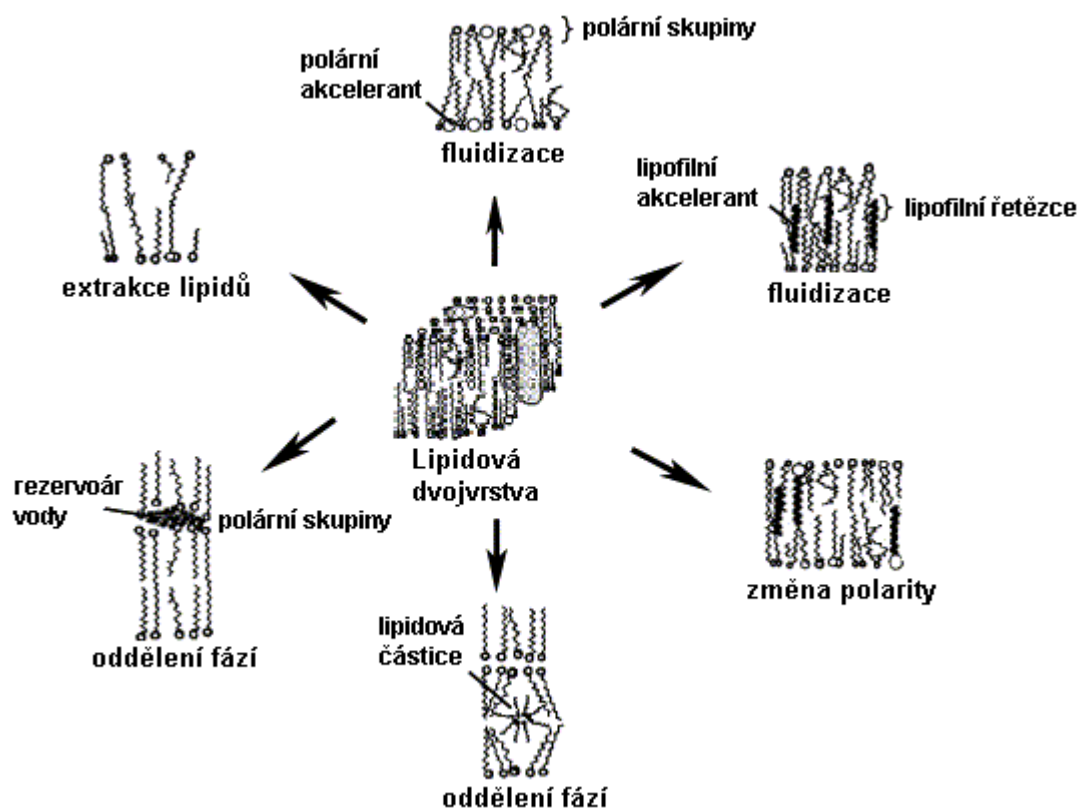
Působení akceleraantů na kůži může být rozčleněno na dvě úrovně. První z nich je penetrace látek do místa účinku, tedy do SC a druhou je vlastní působení v SC. Přesný mechanismus účinku akceleraantů není dosud znám. Je však patrně založen na jejich nespecifických interakcích se strukturami kůže (Obr. 3.). Barry používá klasifikaci akceleraantů transdermální permeace založenou na lipidově-proteinově-rozdělovací teorii (lipid-protein-partitioning concept).⁸ Zjednodušeně lze říci, že akceleraanty mohou

interagovat ve SC s proteinovými strukturami SC (a intracelulárním keratinem nebo desmozomy), jsou schopny měnit vlastnosti intercelulárních lipidů nebo mění rozdělovací rovnováhy mezi SC a léčivem.^{22,23, 24,25}

Interakce s intercelulárními lipidy. Většina akceleraantů interaguje s intercelulárními lipidovými doménami SC.⁸ Malé polární molekuly mohou přerušit vodíkové vazby, které drží u sebe molekuly ceramidů. Amfifilní akceleraanty mají schopnost vmezeřit se mezi lipidové lamely tak, že polární hlava se umístí do polární části a hydrofobní řetězce mezi hydrofobní řetězce lipidů. Toto má za následek narušení uspořádání lipidů a fluidizaci lamelární struktury, což vede ke snížení odporu kožní bariéry.²⁶ Některá rozpouštědla, jako je ethanol nebo dimethylsulfoxid (DMSO), působí extrakci lipidů.

*Interakce s proteinovými strukturami.*²⁷ Některé akceleraanty mohou ovlivňovat konformaci keratinu v korneocytech nebo proteinů v desmozomech. V porovnání s akceleraanty, které interagují s kožními lipidy, je jejich účinek poměrně slabý. Nutno podotknout, že většina konformačních změn proteinů je nevratných.

Ovlivňování rozdělovacích rovnováh. Některé akceleraanty, především nízkomolekulární (např. ethanol či propylenglykol), mají schopnost měnit rozdělovací rovnováhy mezi transdermálním systémem a SC a usnadňují tak vstup léčiva.



Obr. 3. Možný mechanismus účinku akceleraantů transdermální permeace.²⁰

4. Přehled permeačních akceleraⁿtů odvozených od ω -aminokyselin

Do skupiny transdermálních akceleraⁿtů odvozených od ω -aminokyselin lze zařadit velký počet dosud popsaných struktur. Vzhledem k množství publikovaných prací můžeme říci, že se jedná o nejstudovanější a také nejaktivnější permeační akceleraⁿty vůbec. Z hlediska chemické identity jde o poměrně heterogenní skupinu.

Mezi *acyklické* sloučeniny patří:

- deriváty esenciálních aminokyselin (glycinu a lysinu)
- deriváty β -alaninu
- deriváty ω -aminokyselin s větším počtem uhlíkových atomů

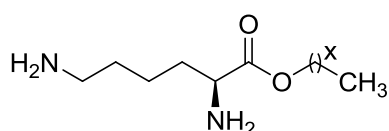
Mezi *cyklické* deriváty (laktamy), které tvoří nejvýznamnější a nejpočetnější skupinu akceleraⁿtů odvozených od ω -aminokyselin, patří:

- deriváty azetidín-2-onu (β -laktamy)
- deriváty pyrrolidín-2-onu (γ -laktamy)
- deriváty piperidín-2-onu (δ -laktamy)
- deriváty azepán-2-onu (ϵ -laktamy)

4.1. Acyklické deriváty ω -aminokyselin

4.1.1. Deriváty lysinu

Mezi permeační akceleraⁿty odvozené od ω -aminokyselin patří nerozvětvené alkylestery lysinu s délkou hydrofobního řetězce C_5 až C_{22} (Obr. 4.). Zajímavostí je, že jsou použitelné pro vstup léčiv nejen skrz kožní bariéru, ale i skrz sliznici, například žaludeční.²⁸

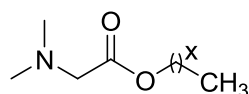


Obr. 4. Estery lysinu ($R = C_4$ - C_{21}).

4.1.2. Deriváty glycinu a β -alaninu

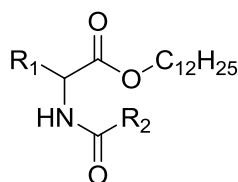
Mezi nejvýznamnější akceleranty transdermální permeace odvozené od glycinu patří jeho *N,N*-disubstituované estery (Obr. 5.). Decylester *N,N*-dimethylglycinu a dodecylester *N,N*-dimethylglycinu (DDAA) byly s pozitivním výsledkem použity pro urychlení vstřebávání indometacinu (hodnoceno *in vitro* na hadí kůži). Také bylo dokázáno, že akcelerační účinnost vzrůstá s délkou alkylových řetězců na dusíku, aniž by vzrůstala toxicita a dráždivost.^{29,30,31,32}

Při studiu dermální dráždivosti DDAA, které bylo provedeno *in vivo* na kůži králíka, bylo zjištěno, že toxicita DDAA je oproti Azonu a *n*-dodekanolu výrazně nižší. Také obnova bariérových funkcí kůže byla statisticky významně rychlejší.³³



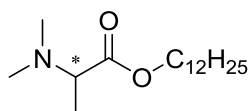
Obr. 5. Estery *N,N*-dimethylglycinu ($R = C_9$ a C_{11}).

Studiem série derivátů glycinu a serinu vč. dipeptidů (Obr. 6.), jež byly navrženy tak, aby se strukturně podobaly kožním ceramidům, bylo zjištěno, že glycinové deriváty jsou lepšími akceleranty než estery serinu a dipeptidové deriváty. Na základě získaných výsledků autoři navrhli hypotézu, že dobrý akcelerant musí mít (podobně jako ceramidy) poměrně malou polární hlavu, aby se mohl vmezeřit do ceramidové lamely, ale na rozdíl od ceramidů musí mít nízkou schopnost tvořit vodíkové vazby. Výsledky regresní analýzy tuto hypotézu potvrdily. Také bylo také zjištěno, že nezáleží na celkové lipofilitě, ale na délce řetězce (řetězců) permeačního akceleraantu.^{34,35}



Obr. 6. Glycinové a serinové deriváty ceramidů ($R_1 = -H, -CH_2OH$; $R_2 = C_{11}H_{23}, -(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3, -CH(R_1)NHCOC_{11}H_{23}, -CH=CHCOOC_{12}H_{25}, -CH(OH)CH(OH)COO-C_{12}H_{25}$).

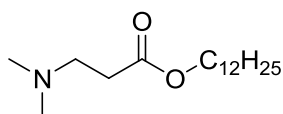
Strukturní obměnou *N,N*-dimethylderivátů glycinu byly získány perspektivní sloučeniny typu *N,N*-disubstituovaných derivátů alaninu. Nejdiskutovanější a nejperspektivnější sloučeninou je dodecylester *N,N*-dimethylalaninu (DDAIP, Obr. 7.). Jeho schopnost urychlit vstup léčiv – indometacinu, hydrokortizonu, klonidinu a 5-fluorouracilu přes hadí kůži byla v porovnání s Azonem vyšší.^{36,37,38}



Obr. 7. DDAIP.

V práci Pfistera a kol.³⁹ byly detailně popsány fyzikálně-chemické vlastnosti DDAIP. Autoři zjistili, že akutní toxicita DDAIP je při experimentech na myších a potkanech velmi nízká. Výsledky studie na kožní dráždivost, genotoxicitu, karcinogenitu a reprodukční toxicitu jednoznačně klasifikují DDAIP jako bezpečný akcelerační pro permeaci léčiv mnoha farmakologických skupin (např. alprostadilu, ketoprofenu a ondansetronu). Autoři popisují velmi rychlou metabolizaci DDAIP esterázami (kožními, plazmatickými i mikrozomálními) na netoxické látky – *N,N*-dimethylalanin a *n*-dodekanol.

Jako zástupce permeačních akceleračních odvozených od β -alaninu lze uvést dodecylester 3-(dimethylamino)propanové kyseliny (Obr. 8.). Jde o izomer DDAIP s přímým ethylenovým spojovacím řetězcem, který byl připraven a na schopnost urychlit vstup theofylinu, indometacinu, hydrokortizonu a adefoviru přes kůži *in vitro* studován v práci J. Novotného a kol.⁴⁰ Současně připravili sérii analogů DDAIP, kde mezi dimethylaminoskupinou a esterovým karbonylem byla větší vzdálenost. V této práci byl také syntetizován polyfluorovaný derivát DDAIP a dále byl sledován vliv chiralit DDAIP na urychlovací schopnost tohoto akceleračního. Autoři nenašli u žádného z léčiv významný rozdíl mezi aktivitou (*R*-), (*S*-) a racemického DDAIP. Také bylo zjištěno, že optimální vzdálenost mezi dusíkem a esterovou skupinou je 4-6 uhlíků a byla vyslovena hypotéza, že větvení ve spojovacím řetězci molekuly DDAIP negativně ovlivňuje urychlovací aktivitu akceleračního. Zajímavým zjištěním je, že zavedením většího počtu atomů fluoru do molekuly akceleračního jeho aktivita vymizí. Tento výsledek by se mohl stát námětem pro vývoj permeačních retardantů.

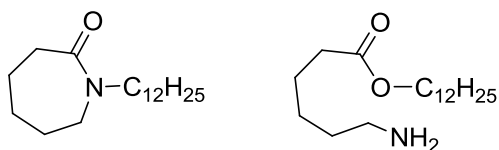


Obr. 8. Dodecylester 3-(dimethylamino)propanové kyseliny.

4.1.3. *Deriváty 6-aminohexanové a tranexamové kyseliny*

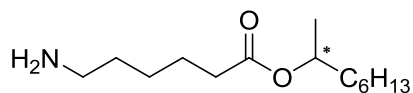
4.1.3.1. *Estery 6-aminohexanové kyseliny*

Estery 6-aminohexanové kyseliny byly navrženy jako otevřená analoga Azonu (Obr. 9.) s jejich předpokládanou metabolizací na netoxické sloučeniny (kyselina 6-aminohexanová a *n*-dodekanol). Na základě výsledků permeačních experimentů lze říci, že urychlovací schopnost připravených esterů 6-aminohexanové kyseliny je v porovnání s Azonem vyšší. Také bylo zjištěno, že s prodlužující se délkou uhlíkového řetězce mezi esterovou skupinou a dusíkem urychlovací aktivita klesá (potvrzeno u esterů kyselin 7-aminoheptanové a 8-aminooktanové).^{41,42}



Obr. 9. Azon a jeho otevřený analog dodecylester kyseliny 6-aminohexanové (DDEAC).

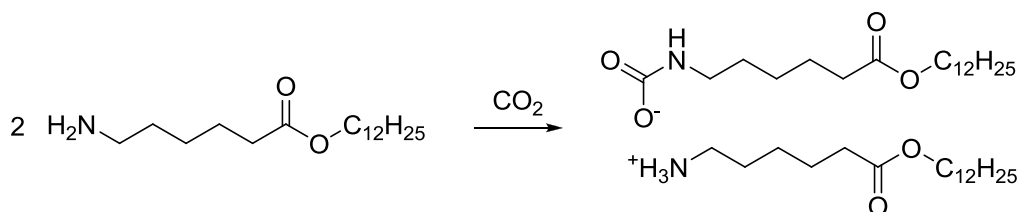
Podobně jako u DDAIP byl i u 2-oktylesteru 6-aminohexanové kyseliny (Obr. 10.) studován vliv chirality na urychlovací schopnost akcelarantu. Stanovení bylo provedeno *in vitro* na lidské kůži s modelovým léčivem theofylinem, nicméně vliv chirality nebyl prokázán.⁴³



Obr. 10. 2-oktylester 6-aminohexanové kyseliny.

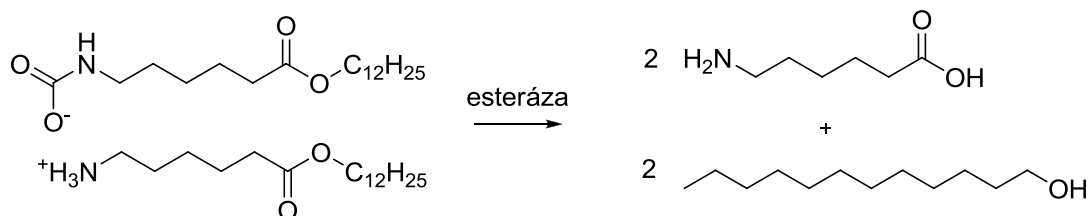
4.1.3.2. *Soli substituovaných karbámových kyselin odvozených od esterů 6-aminohexanové a tranexamové kyseliny*

DDEAC se jevil jako velmi nadějný akcelarant, ale v průběhu pokusů bylo zjištěno, že tento aminoester zřejmě není vlastní účinnou látkou. Bylo prokázáno, že jeho primární aminoskupina reaguje se vzdušným oxidem uhličitým a tvoří dvouřetězcový karbamát (Obr. 11.).



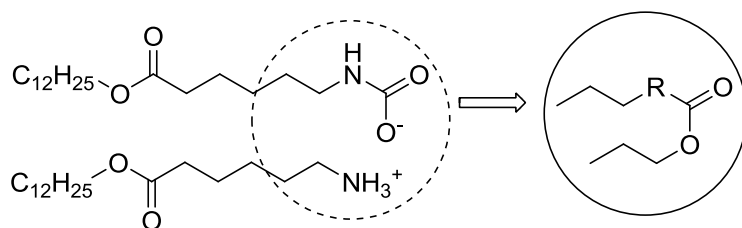
Obr. 11. Tvorba dvouřetězcového karbamátu T12 z DDEAC.

Tato poměrně neobvyklá acidolabilní struktura pak byla prokázána jako vlastní účinná látka – volný amin akcelerační aktivitu postrádal.⁴⁴ Jde o amoniiovou sůl substituované karbámové kyseliny, konkrétně o 5-(dodecyloxykarbonyl)pentylammonium-5-(dodecyloxykarbonyl)-pentylkarbamát (T12, Transkarbam 12). Tato látka velmi účinně usnadňuje vstup celé řady látek přes kůži, je netoxická, nedráždivá a biodegradabilní (Obr. 12.).



Obr. 12. Biodegradabilita T12.

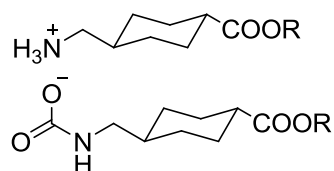
Chování transkarbamu 12 bylo studováno pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), termogravimetrické analýzy (TGA), infračervené spektroskopie (IČ) a rentgenové difrakce. Holas a kol.⁴⁵ vyslovili hypotézu, že labilita soli karbámové kyseliny by mohla být zodpovědná za mechanismus účinku této látky. Tato hypotéza byla ověřena u derivátů T12, které měly oxid uhličitý stabilně vázaný v molekule v podobě esterů kyseliny karbámové a uhličitě (Obr. 13.) a byly zcela neaktivní.⁴⁶



Obr. 13. Deriváty T12 s CO₂ vázaným v podobě esterů kyseliny karbámové a uhličitě (R = -NH-, -O-).

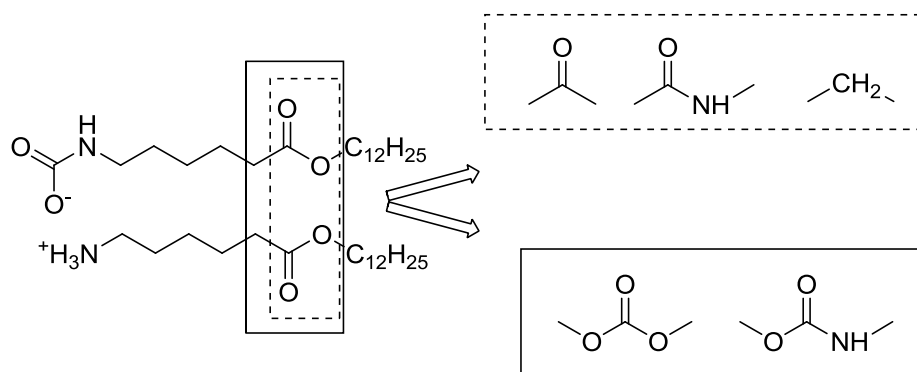
Poněkud kontroverzní výsledky však přinesla studie vlivu T12 na permeaci velmi hydrofilního antivirotika adefoviru. Schopnost urychlit permeaci tohoto léčiva přes prasečí kůži plné tloušťky byla stanovována s použitím různých permeačních akceleračních, při různých pH a výběrem různých donorových medií. Jak autoři uvádí, adefovir pronikal přes kůži málo, výrazného zlepšení nebylo dosaženo modifikací vehikula ani běžnými permeačními akceleračními (Azon, DDAIP, *n*-dodekanol). Velmi dobrých výsledků však bylo dosaženo s 1% T12. Tento akcelerační byl schopen zvýšit vstup adefoviru až na hodnotu $11,3 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Nejvyšší permeace přes kůži bylo překvapivě dosaženo při pH 4, což naznačuje, že karbamátová struktura T12 není vždy k účinku nutná, a že v případě adefoviru je T12 schopen urychlovat i ve formě amoniiové soli.⁴⁷

S cílem získat aktivnější látky a zjistit, které strukturní rysy jsou pro účinek T12 nezbytné, se zabývaly mnohé studie. Vávrová a kol.⁴⁸ připravili sérii derivátů tranexamové kyseliny, v nichž je zachována délka spojovacího řetězce, ale jeho část je součástí cyklohexanového cyklu (Obr. 14.). Autoři zjistili, že látky sice tvoří karbamáty, ale jsou méně účinné než původní T12 (nicméně stále aktivnější než Azon). Pomocí IČ spektroskopie a HPLC prokázali, že v mírně kyselém prostředí SC dochází k rozkladu karbamátu a poté k hydrolyze esterázami na kyselinu tranexamovou.



Obr. 14. Deriváty kyseliny tranexamové (R = C₈-C₁₂ alkyl).

Holas a kol.^{49,50} připravili derivátů T12, kde byl ester nahrazen methylenovou skupinou, ketonem, amidem, esterem kyseliny uhličitě a esterem kyseliny karbámové (Obr. 15.) s cílem ověřit, zda je za aktivitu T12 zodpovědná tvorba intramolekulární vodíkové vazby mezi karbamátovou polární hlavou a jednou z esterových skupin v molekule. Tato hypotéza byla navržena na základě IČ spekter, kde esterová vibrace T12 vykazovala dublet, což bylo interpretováno jako rozdílná schopnost obou esterových skupin tvořit vodíkové vazby. U všech analogů však autoři uvádějí pokles až úplnou ztrátu účinku.



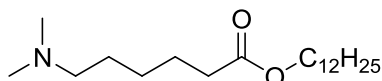
Obr. 15. Analoga T12 s náhradou v esterové části molekuly.

Z dalších publikovaných strukturních obměn se jedná o změny v hydrofobním řetězci molekuly. Bylo popsáno významné snížení účinnosti při rozvětvení molekuly blízko esterové skupiny u derivátů 6-aminohexanové kyseliny – cyklizace pak vedla k úplné ztrátě účinku. Vysvětlením tohoto chování je zřejmě neschopnost stericky náročných aminoesterů tvořit karbamáty.⁵¹ Naopak, rozvětvení v terminální části hydrofobního řetězce 6-aminohexanoátů, které nebrání tvorbě stabilního karbamátu, má na účinek minimální vliv,⁵² na rozdíl od stejné změny v molekule příslušných

mastných alkoholů, kde rozvětvení stejného rozsahu zřejmě zcela mění jejich mechanismus účinku.⁵³

4.1.3.3. Estery *N,N*-disubstituované 6-aminohexanové kyseliny

Nejvýznamnějším představitelem skupiny *N,N*-disubstituovaných esterů 6-aminohexanové kyseliny je dodecylester kyseliny *N,N*-dimethyl-6-aminohexanové (DDAK,⁵⁴ Obr. 16.).



Obr. 16. DDAK.

V molekule DDAK můžeme vysledovat strukturní rysy T12 i DDAIP. Ze srovnání těchto dvou akceleračních činidel vyplynulo, že DDAK je při permeaci theofylinu, hydrokortizonu a adefoviru významně účinnější než DDAIP. Zajímavým zjištěním bylo, že DDAK je poměrně rychle štěpen esterázou ($t_{1/2} = 17$ min) a jeho účinek je reverzibilní (4 hodiny po ukončení aplikace DDAK se elektrická impedance kůže vrátila na hodnoty pozorované u kontroly). Tyto výsledky ukazují na možnost využít DDAK v terapeutické praxi.⁴⁰

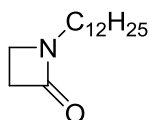
V práci Vávrové a kol.⁴⁷ byl DDAK účinným akceleračním činidlem při všech hodnotách pH s maximem kolem pH 6, kde urychloval flux adefoviru 42x. Byla vyloučena tvorba iontového páru mezi adefovirem a DDAK a navržena hypotéza, že hlavním mechanismem účinku je hlavně přímé snížení bariérové funkce kůže. Výsledky byly potvrzeny i na viabilní lidské kůži, kde DDAK urychloval permeaci adefoviru 179x.

Vzhledem k dosaženým výsledkům při permeačních pokusech byl DDAK podroben stanovení toxicity *in vivo*. Výsledky ukazují na to, že by se mohl DDAK stát permeačním akceleračním činidlem dobře použitelným v klinické praxi, neboť nebyl zaznamenán žádný projev kožní alergizace (morče), žádný projev akutní kožní toxicity (potkan) a dokonce nebyl toxický po perorálním podání (potkan). Pouze při extrémně vysoké dávce DDAK (10% DDAK v PG/H₂O – 6:4; pozn.: běžně se podává 1% akceleračního činidla) byla zaznamenána lehká iritace kůže (králík).⁵⁵

4.2. Cyklické deriváty ω -aminokyselin

4.2.1. Deriváty azetidín-2-onu (ϵ -laktamy)

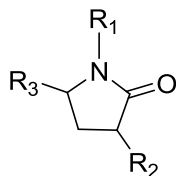
N-dodecylazetidín-2-on (Obr. 17.) byl jako akcelerační prostředek použit pro transdermální podání hydrokortizon-21-acetátu, kde vykázal lepší výsledky než Azon.⁵⁶



Obr. 17. *N*-dodecylazetidín-2-on.

4.2.2. Deriváty pyrrolidín-2-onu (γ -laktamy)

Sloučeniny ze skupiny pyrrolidín-2-onů (Obr. 18.) jsou součástí přirozeného hydratačního faktoru kůže. Tento faktor má zásadní vliv na hydrataci kůže a také ovlivňuje charakteristické mechanické vlastnosti kůže (pevnost, pružnost) a propustnost vitální kůže.⁵⁷ Právě stupeň hydratace kůže je jedním ze základních faktorů usnadňujících průnik látek kůží, proto látky, které hydrataci kůže navozují nebo podporují, budou zřejmě také usnadňovat průnik léčiv.

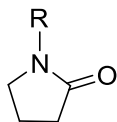


Obr. 18. Deriváty pyrrolidín-2-onu ($R_1 = -H, -alkyl, -cykloalkyl$; $R_2 = -H, -CH_3$; $R_3 = -H$).

U rozsáhlé skupiny pyrrolidín-2-onů byl *in vitro* na lidské kůži hodnocen vztah struktury látky a jejího akceleračního účinku. Autoři uvádí, že pyrrolidín-2-ony jsou stejně jako Azon výbornými urychlovači především pro malé hydrofilní molekuly a pro lipofilní látky jsou velmi málo účinné nebo dokonce neúčinné.²⁰

4.2.2.1. Pyrrolidin-2-on a 1-methylpyrrolidin-2-on

Mezi nejvýznamnější a nejstudovanější deriváty této skupiny (Obr. 19.), jež byly využity jako permeační akceleranty, patří samotný pyrrolidin-2-on (2P) a od něj odvozený derivát 1-methylpyrrolidin-2-on (NMP).⁵⁸



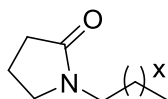
Obr. 19. Pyrrolidin-2-on (R = -H) resp. *N*-methylpyrrolidin-2-on (R = -CH₃).

Výborná schopnost NMP urychlovat přestup látek přes kůži byla dokázána pomocí modelových hydrofilních léčiv - mannitolu, 5-fluorouracilu a sulfaguanidinu.^{20,59} I přesto, že akceleranty této skupiny slouží zejména k permeaci hydrofilních látek, byly zveřejněny práce, ve kterých je popsána dobrá urychlovací schopnost NMP pro lipofilní léčiva např. hydrokortizon, progesteron⁶⁰ a betamethazon-17-benzoát (hodnoceno na lidské kůži).⁶¹ Z dalších léčiv jde např. o topicky podávaná antibiotika (klindamycin, erytromycin, tetracyklin),⁶² inzulin,⁶³ azidothymidin,⁶⁴ kaptopril,⁶⁵ ibuprofen a flurbiprofen.⁶⁶

I nejnovější odborná literatura (publikovaná mezi roky 2005 – 2010) se shoduje s předchozími studii a označuje 2P resp. NMP jako velmi dobré permeační akceleranty, které lze s výhodou použít u mnoha léčiv z různých farmakologických skupin. Ve většině prací bylo s těmito akceleranty dosaženo statisticky významných fluxů modelových permeantů. Z velké řady léčiv se jedná např. o atenolol (kombinace s iontoforézou),⁶⁷ formoterol fumarát,⁶⁸ meloxicam,⁶⁹ indapamid,⁷⁰ diltiazem hydrochlorid,⁷¹ bupranolol (*in vivo* studie na králících⁷² a *in vitro* studie na kůži potkanů⁷³), griseofulvin,⁷⁴ sumatriptan⁷⁵ či lidokain.⁷⁶

4.2.2.2. 1-alkylpyrrolidin-2-ony

Obecnou závislostí účinku na struktuře ve skupině 1-alkylpyrrolidin-2-onů (Obr. 20.) se zabývali Irwin a kol.⁷⁷ Na urychlení permeace ibuprofenu a naproxenu prokázali, že pro daná léčiva existuje v homologické řadě alkylů substituujících dusíkový atom parabolická závislost (s maximem u 1-oktyl- a 1-decylpyrrolidin-2-onu).



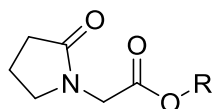
Obr. 20. Obecná struktura 1-alkylpyrrolidin-2-onů.

Sasaki a kol.⁷⁸ navrhli možný mechanismus účinku NMP, resp. obecně všech 1-alkylpyrrolidin-2-onů. Vzhledem k jejich schopnostem kumulovat se ve SC pravděpodobně dochází k vytváření depa léčivé látky v této vrstvě. Toto chování bylo potvrzeno u 1-methyl-, 1-hexyl- a 1-dodecylpyrrolidin-2-onu.

S užitečným nápadem, jak efektivně hodnotit a hledat účinný permeační akcelerant, přišla práce zabývající se závislostí vztahu mezi aktivitou akceleraantu a změnou elektrické kožní impedance. Z velké série zkoumaných struktur byla nalezena výborná schopnost urychlit *in vitro* prostup melatoninu přes prasečí kůži plné tloušťky právě u 1-dodecylpyrrolidin-2-onu.⁷⁹

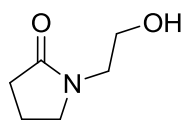
4.2.2.3. Deriváty 1-alkylpyrrolidin-2-onu s předpokládanou biodegradabilitou

Do skupiny biodegradabilních derivátů se řadí estery 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)octové kyseliny (Obr. 21.), které připravili a na urychlení průniku hydrokortizon-21-acetátu přes kůži bezsrstých myší studovali Michniak a kol.⁸⁰ Autoři navrhli tyto struktury pro jejich předpokládanou rozložitelnost kožními esterázami.



Obr. 21. Estery 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)octové kyseliny.

K dalším derivátům této řady patří 1-(2-hydroxyethyl)pyrrolidin-2-on (Obr. 22.) a jeho estery s mastnými kyselinami, které studoval Lambert a kol.⁸¹ Esterová vazba těchto sloučenin je velmi dobře štěpena kožními hydrolytickými enzymy, přičemž lipofilita je velmi variabilní a závisí na zavedených funkčních skupinách. Prodloužením acylového řetězce je možno lipofilitu zvýšit, zavedením volných karboxylových skupin lze naopak potlačit původně nepolární charakter látky.

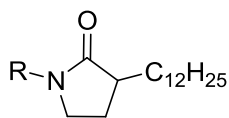


Obr. 22. 1-(2-hydroxyethyl)pyrrolidin-2-on.

4.2.2.4. 1-alkyl-3-alkylpyrrolidin-2-ony

I u derivátů pyrrolidin-2-onu alkylovaných v poloze 3 základního skeletu je v literatuře dobře popsána schopnost urychlit prostup léčiva přes kůži. Důležitým strukturním prvkem, jež pozitivně ovlivňuje urychlovací aktivitu, je kratší substituent

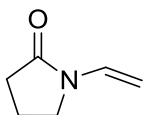
v poloze 1; například 1-propyl-3-dodecylpyrrolidin-2-on či 1-butyl-3-dodecylpyrrolidin-2-on (Obr. 23.) byly úspěšně využity při transdermálním *in vitro* podání indometacinu.⁸²



Obr. 23. 1-alkyl-3-dodecylpyrrolidin-2-ony (R = C₃-C₄ alkyl).

4.2.2.5. 1-alkenylpyrrolidin-2-ony

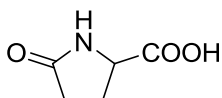
Ze studovaných permeačních akceleračtů typu 1-alkenylderivátů pyrrolidin-2-ony je důležité zmínit 1-vinylpyrrolidin-2-on (Obr. 24.)⁸³, který byl patentován pro transdermální podání kyseliny acetylsalicylové.



Obr. 24. 1-vinylpyrrolidin-2-on.

4.2.2.6. Deriváty 2-oxopyrrolidin-5-karboxylové kyseliny

Kyselina 2-oxopyrrolidin-5-karboxylová (Obr. 25) je v kůži fyziologicky přítomná jako součást přirozeného hydratačního faktoru kůže. Jako permeační akceleranty se používají hlavně její na dusíku substituované deriváty a také její estery. Například 1-dodecyl-2-oxopyrrolidin-5-karboxylová kyselina byla s velmi dobrým výsledkem použita k transdermální absorpci antimykotika griseofulvinu.⁸⁴ Decyl-, dodecyl- a oleylestery této kyseliny jsou výbornými urychlovači pro léčiva klonidin a enalapril v *in vitro* experimentech prováděných na hadí kůži.⁸⁵

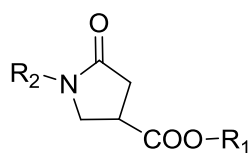


Obr. 25. Kyselina 2-oxopyrrolidin-5-karboxylová.

4.2.2.7. Deriváty pyrrolidin-2-ony se sníženou dermální toxicitou

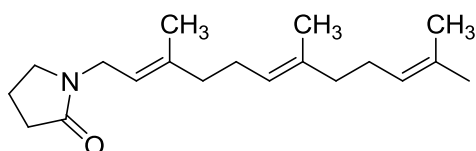
Širokému uplatnění pyrrolidin-2-onů a jejich derivátů v praxi brání jejich nepříznivý účinek na kůži, na které vyvolávají erytém.⁸⁶ Sasaki a kol.⁸⁷ provedli stanovení toxicity u velké série derivátů pyrrolidin-2-ony. Kožní dráždivost studovaná na dorzální kůži králíků byla nejsilnější u 1-dodecylpyrrolidin-2-ony. Naproti tomu deriváty obsahující v poloze 1 methylovou a methoxykarbonylovou skupinu způsobily jen malé podráždění. Dále bylo zjištěno, že příznaky podráždění kůže nezávisí

na kumulaci akceleračního efektu v kůži, ale na akceleračním efektu sloučeniny. Z hlediska poměru mezi urychlovací účinností a kožní dráždivostí byly jako optimální vyhodnoceny deriváty 2-oxopyrrolidin-4-karboxylové kyseliny (Obr. 26.).



Obr. 26. Deriváty kyseliny 2-oxopyrrolidin-4-karboxylové ($R_1 = C_1$, $R_2 = C_6$ nebo C_{12}).

Z dalších derivátů pyrrolidin-2-onu, u nichž autoři popisují významně nízkou dermální toxicitu, stojí za zmínku 1-farnesylpyrrolidin-2-on (Obr. 27.)^{88,89} a 3-hydroxy-1-methylpyrrolidin-2-on.⁹⁰



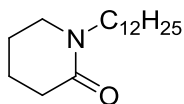
Obr. 27. 1-farnesylpyrrolidin-2-on.

K vyhledávání potenciálních derivátů pyrrolidin-2-onu se sníženou dermální toxicitou bylo použito moderního virtuálního vyhledávacího algoritmu založeného na kombinaci genetických algoritmů, neurálních sítí a nelineárních-teoretických modelech vztahů struktury a účinku látky.⁹¹ Výsledky vyhledávacího algoritmu autoři přímo srovnali s klasicky prováděnými experimenty *in vitro*. Na základě velké série dat autoři ve své studii prokázali, že virtuální vyhledávací screening lze využít k nalezení vhodné struktury stejně dobře, jako klasický permeační experiment *in vitro*. Výhodou tohoto virtuálního modelování struktur potenciálních akceleračních s žádanými vlastnostmi je jednoduchost a rychlost provedení.

4.2.3. Deriváty piperidin-2-onu (δ -laktamy)

4.2.3.1. 1-alkylpiperidin-2-ony

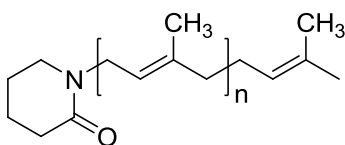
U homologické řady 1-alkylpiperidin-2-onů byla sledována jejich schopnost urychlit průnik indometacinu přes prasečí kůži. Bylo zjištěno, že účinnost těchto látek závisí na jejich lipofilitě, přičemž maximálního urychlení bylo dosaženo u 1-dodecylpiperidin-2-onu (Obr. 28.).⁹² Tento akcelerační byl také úspěšně použit při permeačních *in vitro* experimentech na kůži bezsrstých myši s řadou modelových léčiv – 5-fluorouracilem, kofeinem, salicylurovou kyselinou, salicylovou kyselinou, acetonidem triamcinolonu a ibuprofenem.⁹³



Obr. 28. 1-dodecylpiperidin-2-on.

4.2.3.2. 1-alkenylpiperidin-2-ony

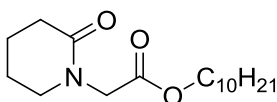
Deriváty piperidin-2-onu substituované na dusíku terpenickým řetězcem (Obr. 29.) byly studovány spolu s obdobnými látkami s 5- a 7-členným cyklem z hlediska jejich schopnosti urychlit průnik 6-merkaptopurinu přes kůži morčete. Jejich urychlovací schopnost byla prokázána, avšak z hlediska účinku ani kožní dráždivosti nebyly výhodnější než analogické deriváty pyrrolidin-2-onu a azepan-2-onu.⁸⁸



Obr. 29. Terpenické deriváty piperidin-2-onu (kde n = 1-3).

4.2.3.3. Alkylestery 2-(2-oxopiperidin-1-yl)octové kyseliny

Řadu alkylesterů 2-(2-oxopiperidin-1-yl)octové kyseliny připravili a na urychlení průniku hydrokortizon-21-acetátu přes kůži bezsrstých myší studovali Michniak a kol.⁹⁴ Nejvyšší aktivity dosáhl decylester 2-(2-oxopiperidin-1-yl)octové kyseliny (Obr. 30.), jehož akcelerační poměr byl 162. Tyto sloučeniny, stejně jako obdobné deriváty pyrrolidin-2-onu, byly navrženy pro jejich předpokládanou biodegradabilitu kožními esterázami a tím sníženou toxicitu.



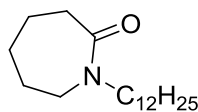
Obr. 30. Decylester 2-(2-oxopiperidin-1-yl)octové kyseliny.

4.2.4. **Deriváty azepan-2-onu (ϵ -laktamy)**

4.2.4.1. 1-dodecylazepan-2-on (N-dodecyl- ϵ -kaprolaktam, Azone[®])

Azon (Obr. 31.) je nejvýznamnější sloučenina skupiny ϵ -laktamů. Byl patentován v USA již v roce 1976. Na pomezí let 80. a 90. byl Azon a jeho deriváty vůbec nejstudovanější skupinou permeačních akceleračních látek. Vzhledem k tomu, že je v literatuře velmi dobře popsán, slouží často jako standard při porovnávání schopnosti urychlit

prostup látky přes kůži. Azon je vysokovroucí, značně lipofilní kapalina. Vystupuje jako vynikající rozpouštědlo pro mnoho léčiv a vyznačuje se vysokou chemickou stabilitou.



Obr. 31. Azon.

4.2.4.2. Mechanismus působení Azonu

Objasnění mechanismu působení Azonu byla věnována řada prací.

Ito a kol.⁹⁵ studovali absorpci indometacinu, ibuprofenu a sulfanilamidu přes bezsrstou abdominální kůži potkana *in vitro*. Donorový vzorek obsahoval 5 % Azonu. Dospěli k závěru, že Azon neovlivňuje rozpustnost jmenovaných léčiv ve vehikulu, ale výrazně zvyšuje jejich rozdělování do kůže.

Zhou a kol.⁹⁶ prováděli pomocí elektronové skenovací mikroskopie *in vivo* studii na abdominální kůži myši a na tkáňové kultuře sarkomu 180. Podle výsledků se domnívají, že Azon vytváří mikroskopické otvory v biomembráně a rozšiřuje ústí vlasových folikulů, čímž zvyšuje transdermální absorpci.

Použití rentgenové difrakce v práci Engbloma⁹⁷ poukázala na to, že převážná část molekul Azonu se umísťuje uvnitř lipidové vrstvy. 19 % pak zůstává zakotveno na fázovém rozhraní lipid-voda, přičemž rozmístění molekul je ovlivněno koncentrací vody v systému.

Kai a kol.⁹⁸ vytvořili modelovou membránu blížící se svým složením fyziologické stavbě SC. Jednalo se o lipozómy složené z ceramidů, cholesterolu, palmitové kyseliny a cholesterol-sulfátu. Pomocí polarizační fluorescenční spektroskopie byla prokázána značná schopnost Azonu fluidizovat membránové lipidy.

Výsledky studií na lidské bukové membráně s použitím fluorescenční spektroskopie potvrdily, že interakce s lipidovými doménami ve SC je významným, i když ne jediným mechanismem účinku Azonu.⁹⁹

Sugibayashi a spol.¹⁰⁰ doložili prostřednictvím měření konduktance kůže, že 1-dodecylazepan-2-on kromě fluidizace lipidů též zvyšuje obsah vody v kůži.

V návaznosti na předchozí publikované studie Boddé a kol.¹⁰¹ vyslovili komplexní názor na mechanismus účinku Azonu. Vycházeli z poznatku, že stabilní konformace Azonu typu „soup spoon“ se zakotvuje vodíkovými můstky na vnější, polární straně lipidické dvojvrstvy intercelulárních prostorů, a to takovým způsobem, že příslušný alkyl

směřuje dovnitř a činí tak tuto dvojvrstvu více hydrofilní a méně viskózní. Proto Azon usnadňuje penetraci polárních i nepolárních látek.

4.2.4.3. Účinnost Azonu na permeaci různých léčiv

Urychlovací schopnost Azonu byla studována s mnoha léčivy různých farmakologických skupin. Obecně se dá říci, že Azon je efektivní permeační akcelerační prostředek pro široký okruh látek hydrofilní i lipofilní povahy (s výjimkou vysoce lipofilních látek).^{102,103} Účinným akceleračním prostředkem je však pouze při použití polárního vehikula – v prostředí lipofilním jako je parafinový olej nebo rostlinné oleje je jeho účinek inhibován.¹⁰⁴

Na pomezí let 80. a 90. byly publikovány práce, které jasně dokládají, že Azon zvyšuje kožní difuzivitu 5-fluorouracilu,¹⁰⁵ methadonu,¹⁰⁶ hydrochloridu morfinu,¹⁰⁷ bromhexinu,¹⁰⁸ β -blokátorů (propranololu, metoprololu, timololu, pindololu, nadololu, atenololu),¹⁰⁹ blokátorů kalciových kanálů (verapamilu,¹¹⁰ nikardipinu,¹¹¹ nifedipinu¹¹²), indometacinu,¹¹³ močoviny,¹¹⁴ antibiotik a antivirotik (cidofoviru a acikloviru),¹¹⁵ glukokortikoidů,¹¹⁶ insulinu,¹¹⁷ metotrexátu,¹¹⁸ edatrexátu,¹¹⁸ terbutalinu,¹¹⁹ ketoprofenu,¹²⁰ klonazepamu,^{121,122} anxiolytik (midazolam maleátu a diazepamu)¹²³ a dihydroergotaminu.¹²⁴ Akcelerační efekt Azonu byl využit též ve fotodynamické terapii povrchových nádorů kůže červeným světlem, a to k urychlení průniku topicky aplikované fotosenzibilizující látky *meso*-tetrafenylporfínsulfonátu tetrasodného do kožních neoplastických lézí.¹²⁵ Pozornost si zaslouží též experimenty s Azonem v oftalmologii. Přes oční rohovku velmi dobře urychlil průnik hydrofilních léčiv acetazolamidu, cimetidinu, guanethidinu a sulfacetamidu, průnik středně lipofilních léčiv bunololu a prednisolonu urychlil mnohem méně a u lipofilního flurbiprofenu nebyl akcelerační efekt pozorován vůbec.¹²⁶

Nejnovější výzkum, publikovaný mezi roky 2001 až 2010, doplňuje předchozí studie a rozšiřuje tak paletu léčiv, se kterými Azon dosáhl po transdermálním podání výborných výsledků. Jedná se například o: letrozol,¹²⁷ sumatriptan sukcinát,¹²⁸ meloxicam,¹²⁹ nortriptylin hydrochlorid,¹³⁰ testosteron,¹³¹ adefovir,⁴⁷ ibuprofen,¹³² butorfanol,¹³³ naloxon,¹³⁴ fluoxetin,¹³⁵ glipizid¹³⁶ a 5-fluorouracil.¹³⁷

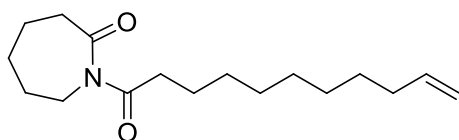
4.2.4.4. Farmakokinetika, metabolismus a toxicita Azonu

Pro porovnání metabolického profilu Azonu s výsledky získanými po dermální aplikaci u člověka byl intravenózně křečkům, opicím a potkanům podán Azon s dodecylovým řetězcem značeným uhlíkem ¹⁴C. Byl použit krém s obsahem 1,6 % značeného Azonu a 0,05 % triamcinolonu acetonidu. Při transdermálním podání lidským dobrovolníkům se během 4 dnů vstřebalo pouze 3,47 % aplikovaného množství akceleračního prostředku.¹³⁸ Radioaktivní metabolity Azonu byly u křečků a opic převážně vylučovány

moči podobně jako u člověka. Metabolický profil v moči ukázal na extenzivní systémový metabolismus u všech studovaných druhů. U člověka byl hlavní podíl metabolitů spíše polárního charakteru, u potkanů, opic a křečků převažovaly metabolity méně polární. Stopy původní látky byly zjistitelné pouze u křečků. Perorální podání Azonu u potkanů mělo stejný metabolický profil jako intravenózní podání, což ukazuje na fakt, že gastrointestinální metabolismus buď neprobíhá, nebo je velmi podobný metabolismu systémovému.¹³⁹ Azon se nemetabolizuje v kůži, hlavní metabolismus probíhá u potkana a člověka v játrech.¹⁴⁰

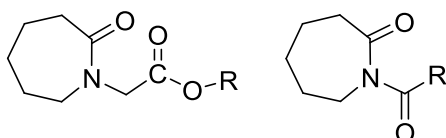
4.2.4.5. Deriváty typu „azon-like“

Strukturní obměny látek v literatuře označovaných jako urychlovače typu „azon-like“ se týkají jak heterocyklické části, tak bočního řetězce. Jednodušší typ obměn postranního řetězce spočíval v zavedení dvojných vazeb (izolovaných i konjugovaných). Jako příklad slouží 1-undecenylazepan-2-on (Obr. 32.),¹⁴¹ který byl patentován a použit pro urychlení průniku haloperidolu.



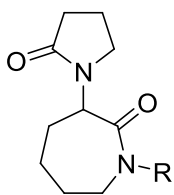
Obr. 32. 1-undecenylazepan-2-on.

Michniak a kol.¹⁴² publikovali řadu obměn Azonu. Sledovali sloučeniny typu *N*-alkoxykarbonylmethylazepan-2-onu a *N*-acylazepan-2-onu (Obr. 33.). Autoři se shodují, že acylderiváty jsou podstatně účinnějšími akceleranty než alkylderiváty.



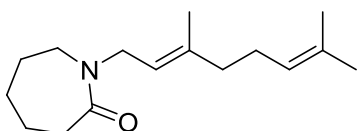
Obr. 33. *N*-alkoxykarbonylmethylazepan-2-on (R = C₁₂ a C₁₄) a *N*-acylazepan-2-on (R = C₉, C₁₁ a C₁₃).

Michniak a kol.¹⁴³ dále syntetizovali a na urychlení průniku hydrokortizonu přes kůži bezsrstých myší studovali deriváty 3-(2-oxo-1-pyrrolidin)hexahydro-*IH*-azepin-2-onu (Obr. 34.). V *in vitro* permeačních experimentech zjišťovali vliv délky alkylových resp. alkylesterových řetězců (v poloze 3 základního skeletu) na urychlovací schopnost a dospěli k závěru, že alkylderiváty vykazují vyšší urychlovací aktivitu než připravené alkylestery.



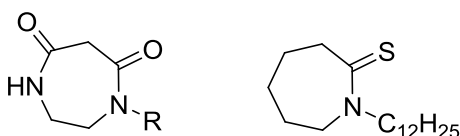
Obr. 34. Deriváty 3-(2-oxo-1-pyrrolidin)hexahydro-1H-azepin-2-onu (R = alkyl, alkylester).

Ze složitějších „azon-like“ sloučenin byly připraveny a hodnoceny deriváty s terpenickými řetězci: 1-farnesyl- a 1-geranylazepan-2-on (Obr. 35.). Tyto deriváty vykazovaly lepší poměr mezi urychlením absorpce 6-merkaptopurinu (hodnoceno na kůži morčete) a kožní dráždivostí (stanoveno na králičí kůži) v porovnání se samotným Azonem. 1-geranylazepan-2-on rovněž urychlil průnik acikloviru.¹⁴⁴



Obr. 35. 1-geranylazepan-2-on.

Složitější zásah do struktury Azonu představují rovněž významně akceleračně aktivní deriváty *N*-alkyl-1,4-diazepan-5,7-dionu¹⁴² a thioderivát *N*-dodecylazepan-2-thion (Obr. 36.).¹⁴⁵



Obr. 36. *N*-alkyl-1,4-diazepan-5,7-dion (R = C₁₀ a C₁₂) a *N*-dodecylazepan-2-thion.

Obecně lze tedy shrnout, že z velkého počtu 1-azacykloalkan-2-onů s 5-7člennými řetězci jsou nejučinnější látky s dodecylovými řetězci, velikost cyklu je méně významná. Rozdíly mezi nasycenými a nenasycenými řetězci jsou sotva znatelné co do účinnosti, látky s nenasycenými terpenickými řetězci mají však nižší kožní dráždivost.¹⁴⁴ Pro transport lipofilních léčiv jsou obecně vhodnější delší alkylové řetězce.

5. Experimentální část

5.1. Chemikálie a přístrojové vybavení

Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma–Aldrich (Schnelldorf, Německo). Silikagel 60 (hrubost částic 230–400) pro sloupcovou chromatografii, TLC desky (silikagel 60 F₂₅₄) a HPLC kolony byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Struktura a čistota syntetizovaných látek byla ověřena pomocí ¹H a ¹³C NMR (přístroj Varian Mercury-V_x BB 300, pracující při 300 MHz pro ¹H, 75 MHz u ¹³C) a infračervené spektroskopie (spektrofotometr Nicolet Impact 400). Chirální sloučeniny byly charakterizovány jejich optickou otáčivostí (polarimetr ADP Bellingham and Stanley; 0.5 dm cela). Teploty tání byly měřeny na bodotávku Büchi B-545 bez korekce.

5.2. Syntéza derivátů dikarboxylových kyselin

5.2.1. Příprava látek M, F a S

Směs anhydridu kyseliny maleinové nebo jantarové, případně volné kyseliny fumarové (5 mmol), dodekanolu (10 mmol) a katalytického množství koncentrované kyseliny sírové v 50 ml toluenu byla zahřívána na olejové lázni při teplotě 130–140 °C 4 hodiny. Poté byla vytřepána 2% roztokem NaHCO₃ (2x30 ml) a koncentrovaným roztokem NaCl (2x30 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl překrytalizován z EtOH a krystaly byly vysušeny za sníženého tlaku nad P₂O₅.

Didodecylester kyseliny maleinové (M). C₂₈H₅₂O₄; 452,39 g.mol⁻¹; výtěžek: 80 %; bílé krystaly; t_f = 29 °C (lit. 28-30 °C)¹⁴⁶; IČ (KBr): ν_{max} 2923, 2853, 1732, 1640 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,23 (2H; s; 2 –CH=); 4,17 (4H; t; 2 –OCH₂–; J= 7,4 Hz); 1,68-1,64 (4H; m; 2 –OCH₂–CH₂–); 1,52-1,01 (36H; m; 18 –CH₂–); 0,88 (6H; t; 2 –CH₃; J= 6,5 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165,3; 129,7; 65,5; 31,9; 29,6; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

Didodecylester kyseliny fumarové (F). C₂₈H₅₂O₄; 452,39 g.mol⁻¹; výtěžek: 74 %; bílé krystaly; t_f = 49 °C (lit. 45-46 °C)¹⁴⁷; IČ (KBr): ν_{max} 2917, 2850, 1707, 1637 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,84 (2H; s; 2 –CH=); 4,19 (4H; t; 2 –OCH₂–; J= 6,6 Hz);

1,77-1,58 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,50-1,18 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2$); 0,87 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J= 6,7$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 165,1; 133,6; 65,5; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

Didodecylester kyseliny jantarové (S). $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_4$; 454,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 60 %; bílé krystaly; $t_f = 39$ °C (lit. 39-40 °C)¹⁴⁸; IČ (KBr): ν_{max} 2918, 2850, 1726 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,07 (4H; t; 2 $-\text{OCH}_2-$; $J= 6,6$ Hz); 2,61 (4H; s; 2 $-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 1,70-1,51 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,39-1,16 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J= 6,1$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172,4; 64,9; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 29,2; 28,6; 25,9; 22,7; 14,1.

5.2.2. Příprava látek MOH, SOH a FOH

Příprava látek MOH a SOH vycházela z anhydridu příslušné kyseliny (5 mmol), který byl smíchán s dodekanolem (5 mmol) a katalytickým množstvím koncentrované kyseliny sírové. Směs byla míchána 10 minut na olejové lázni při teplotě 130-140 °C. Reakce probíhala bez přítomnosti rozpouštědla. Po zchlazení reakční směsi na laboratorní teplotu (RT) byl přidán hexan (25 ml) a vzniklé krystaly byly odflitrovány. Produkt byl 2krát překrytalizován z hexanu a dosušen za sníženého tlaku nad P_2O_5 . Příprava látky FOH byla odlišná a postup je uveden přímo u této látky.

Monododecylester kyseliny maleinové (MOH). $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4$; 284,20 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 75 %; bílé krystaly; $t_f = 58$ °C (lit. 55-57 °C)¹⁶⁵; IČ (KBr): ν_{max} 2920, 2851, 1723, 1705, 1647 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6,45 (1H; d; $-\text{CH}=\text{}$; $J= 12,6$ Hz); 6,37 (1H; d; $-\text{CH}=\text{}$; $J= 12,6$ Hz); 4,27 (2H; t; $-\text{OCH}_2-$; $J= 6,6$ Hz); 1,81-1,63 (2H; m; $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$); 1,54-1,13 (18H; m; 9 $-\text{CH}_2-$); 0,87 (3H; t; $-\text{CH}_3$; $J= 5,9$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 167,9; 164,6; 136,5; 129,4; 67,3; 31,9; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,1; 28,2; 25,7; 22,7; 14,1.

Monododecylester kyseliny jantarové (SOH). $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_4$; 286,21 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 70 %; bílé krystaly; $t_f = 48$ °C (lit. 47 °C)¹⁴⁸; IČ (KBr): ν_{max} 2918, 2850, 1727, 1712 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,1 (2H; t; $-\text{OCH}_2-$; $J= 6,7$ Hz); 2,73-2,56 (4H; m; 2 $-\text{CH}-$); 1,68-1,54 (2H; m; $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$); 1,39-1,17 (18H; m; 9 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (3H; t; 1 $-\text{CH}_3$; $J= 5,9$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 178,1; 172,2; 65,1; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,9; 28,9; 28,5; 25,8; 22,7; 14,1.

Monododecylester kyseliny fumarové (FOH). Látka MOH (7 mmol) byla rozpuštěna v chloroformu a umístěna do uzavíratelné baňky. Přidáním katalytického množství jodu vznikl tmavě červený roztok, který byl míchán a refluxován za nepřítomnosti světla 1 hodinu. Poté byla teplota snížena na 120 °C a přebytečný jod

byl odstraněn probubláváním směsi dusíkem. Po zchlazení směsi na RT byl čistý produkt získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 9:1). $C_{16}H_{28}O_4$; 284,20 g.mol⁻¹; výtěžek: 30 %; bílé krystaly; $t_f = 82\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 80-81 $^\circ\text{C}$)¹⁴⁹; IČ (ATR): ν_{max} 2916, 2848, 1711, 1678, 1646 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,95 (1H; d; -CH=; J=15,9 Hz); 6,84 (1H; s; -CH=; J= 15,9 Hz); 4,20 (2H; t; -OCH₂-; J= 7,0Hz); 1,75-1,61 (2H; m; -OCH₂CH₂-); 1,43-1,17 (18H; m; 9 -CH₂-); 0,88 (3H; t; -CH₃; J= 6,4 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170,1; 164,7; 135,9; 132,5; 65,8; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,5; 25,8; 22,7; 14,1.

5.2.3. Příprava látek M1, S1 a F1

Syntéza látek M1 a S1 vycházela z dimethylesteru příslušné kyseliny (27 mmol), dodekanolu (17 mmol) a katalytického množství kyseliny *p*-toluensulfonové (*p*-TsOH). Tato směs byla zahřívána na olejové lázni při teplotě 130-140 $^\circ\text{C}$ 3 hodiny. Po průběžném monitorování směsi tenkovrstvou chromatografií byl čistý produkt získán gradientovou sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát od 9:1 do 19:1). Příprava látky FOH byla odlišná a postup je uveden přímo u této látky.

Dodecyl-methylester kyseliny maleinové (M1). $C_{17}H_{30}O_4$; 298,21 g.mol⁻¹; výtěžek: 35 %; bezbarvý olej; IČ (substance): ν_{max} 2923, 2853, 1732, 1646 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,24 (2H; s; 2 -CH=); 4,17 (2H; t; 1 -OCH₂-; J= 7,0 Hz); 3,79 (3H; s; 1 -O-CH₃); 1,73-1,56 (2H; m; 1 -OCH₂-CH₂-); 1,41-1,15 (18H; m; 9 -CH₂-); 0,87 (3H; t; 1 -CH₃; J= 6,4 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165,2; 129,9; 129,5; 65,5; 52,1; 31,9; 29,6; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,0.

Dodecyl-methylester kyseliny jantarové (S1). $C_{17}H_{32}O_4$; 300,24 g.mol⁻¹; výtěžek: 20 %; bezbarvý olej; IČ (substance): ν_{max} 2924, 2853, 1739, 1464 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4,07 (2H; t; 1 -OCH₂-; J= 6,6 Hz); 3,68 (3H; s; 1 -O-CH₃); 2,62 (4H; s; 2 -CH₂-); 1,67-1,53 (2H; m; 1 -OCH₂-CH₂-); 1,38-1,09 (18H; m; 9 -CH₂-); 0,87 (3H; t; 1 -CH₃; J= 5,9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172,8; 172,3; 64,9; 51,8; 31,9; 29,6; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 29,1; 28,9; 28,5; 25,8; 22,7; 14,1.

Dodecyl-methylester kyseliny fumarové (F1). K monomethylesteru kyseliny fumarové (3 mmol) v 10 ml suchého chloroformu ochlazeného na 0 $^\circ\text{C}$ byl přidán dodekanol (3 mmol) a 4,4-dimethylaminopyridin (0,3 mmol). Poté byl ke směsi přikapán roztok dicyklohexylkarbodiimidu v suchém chloroformu (3,3 mmol) a reakce byla míchána při laboratorní teplotě (RT) 24 hodin. Následně byla směs vakuově zahuštěna a surový produkt byl suspendován v hexanu. Krystaly byly zfiltrány a na filtru promyty methanolem. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 30:1. $C_{17}H_{30}O_4$; 298,21 g.mol⁻¹;

výtěžek: 70 %; bezbarvý olej; IČ (ATR): ν_{\max} 2923, 2853, 1724, 1645 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,26 (1H; s; 1 $-\text{CH}=\text{}$); 6,85 (1H; s; 1 $-\text{CH}=\text{}$); 4,19 (2H; t; $-\text{OCH}_2-$; $J= 6,2$ Hz); 3,81 (3H; s; $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 1,76-1,58 (2H; m; $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$); 1,44-1,15 (18H; m; 9 $-\text{CH}_2-$); 0,85 (3H; t; $-\text{CH}_3$; $J= 6,4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 165,5; 165,0; 134,0; 133,1; 65,5; 52,2; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,5; 25,9; 22,7; 14,1.

5.2.4. Příprava látek T a mT

Směs dikarboxylové kyseliny (4 mmol), dodekanolu (16 mmol) a katalytického množství *p*-TsOH byla míchána na olejové lázni při 100 °C 2 hodiny. Po zchladnutí reakční směsi na RT byl přidán hexan (25 ml) a vzniklé krystaly byly odflitrovány. Produkt byl získán rekrystalizací z hexanu a vysušen za sníženého tlaku nad P_2O_5 .

Didodecylester kyseliny (2R,3R)-vinné (T). $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_6$; 486,39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 52 %; bílé krystaly; $t_f = 64$ °C (lit. 64 °C)¹⁵⁰; $[\alpha]_D^{28} +10,0^\circ$ (2,0; aceton) (lit. + 9,7°)¹⁵⁰; IČ (KBr): ν_{\max} 3473, 3282, 2916, 2848, 1755, 1722 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,52 (2H; s; 2 HO-CH); 4,25 (4H; t; 2 $-\text{OCH}_2-$; $J= 5,5$ Hz); 3,1 (2H; s; 2 -OH); 1,45-1,15 (40H; m; 20 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J= 6,4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171,6; 72,0; 66,6; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,1; 28,5; 25,7; 22,7; 14,1.

Didodecylester kyseliny meso-vinné (mT). $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_6$; 486,39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek 64 %; bílé krystaly; $t_f = 67$ °C; IČ (KBr): ν_{\max} 3386, 3319, 2920, 2850, 1749, 1735 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,55 (2H; s; 2 HO-CH); 4,18 (4H; t; 2 $-\text{OCH}_2-$; $J= 6,5$ Hz); 3,15 (2H; s; 2 -OH); 1,71-1,55 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,42-1,15 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2-$); 0,87 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J= 6,6$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171,1; 72,9; 53,7; 66,5; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

5.2.5. Příprava látek TOH a mTOH

Monododecylester kyseliny (2R,3R)-vinné (TOH). Látka T (1,5 mmol) byla rozpuštěna ve 30 ml acetonu. Přidáním roztoku NaOH (1,5 mmol) v 15 ml destilované vody vznikl precipitát, který byl odflitrován, následně rozpuštěn v malém množství vody a okyselen kyselinou chlorovodíkovou do mírně kyselého pH. Produkt byl extrahován do ethyl-acetátu. Po oddestilování rozpouštědla a ochlazení směsi na RT byl produkt získán krystalizací z hexanu. $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_6$; 318,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 30 %; bílé krystaly;

$t_f = 72\text{ }^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{28} +12^\circ$ (2,0; CHCl_3); IČ (ATR): ν_{max} 3382, 3196, 2916, 2849, 1733, 1725 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,26 (1H; s; $-\text{COOH}$); 4,70-4,60 (2H; m; 2 HO-CH); 4,22 (2H; t; $-\text{OCH}_2-$; $J = 6,0$ Hz); 1,67 (2H; s; 2 $-\text{OH}$); 1,40-1,20 (20H; m; 10 $-\text{CH}_2-$); 0,87 (3H; t; 1 $-\text{CH}_3$; $J = 6,6$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 174,6; 171,6; 72,1; 66,7; 31,9; 29,7; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2, 28,4; 25,7; 22,7; 14,1.

Monododecylester kyseliny meso-vinné (mTOH). V acetonu ochlazeném na $0\text{ }^\circ\text{C}$ byla rozpuštěna látka MOH (1,7 mmol) a po kapkách byl v průběhu 30 minut přidáván roztok KMnO_4 (1,8 mmol) v 5 ml destilované vody. Reakce byla míchána při $0\text{ }^\circ\text{C}$ další 3 hodiny. Poté se teplota reakce nechala dojít na RT a bylo přidáno 35 ml nasyceného roztoku Na_2SO_3 . Směs byla poté převedena do dělicí nálevky a po přidání 25ml 5% kyseliny sírové důkladně protřepávána, až došlo k odbarvení původně tmavě hnědé barvy. Směs byla vytřepávána 3x40 ml dichlormethanu, organická vrstva byla oddělena, zahuštěna a produkt byl získán krystalizací z hexanu. $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_6$; 318,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 25 %; bílé krystaly; $t_f = 82\text{ }^\circ\text{C}$; IČ (ATR): ν_{max} 3467, 3237, 2918, 2849, 1739, 1724 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,26 (1H; s; $-\text{COOH}$); 4,66 (2H; m; 2 HO-CH); 4,21 (2H; t; $-\text{OCH}_2-$; $J = 7,3$ Hz); 1,65 (2H; m; 2 $-\text{OH}$); 1,40-1,20 (20H; m; 10 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (3H; m; 1 $-\text{CH}_3$; $J = 6,4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 179,0; 171,1; 72,7; 66,9; 31,9; 29,6; 29,3; 29,2; 28,3; 25,7; 22,7; 14,1.

5.2.6. Příprava látek AT a AmT

Látka T resp. mT (10 mmol), 2,2-dimethoxypropan (20 mmol) a katalytické množství p -TsOH bylo rozpuštěno v 40 ml suchého dichlormethanu a směs byla míchána při RT 2 hodiny. Produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 8:3 (AT) a 19:1 (AmT).

Didodecylester kyseliny (4R,5R)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4,5-dikarboxylové (AT). $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_6$; 526,42 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 45 %; bílé krystaly; $t_f = 62\text{ }^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{28} -20,5^\circ$ (1,0; MeOH); IČ (ATR): ν_{max} 2913, 2846, 1753, 1720 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,53 (2H; s; 2 $-\text{O}-\text{CH}-\text{COO}-$); 4,26 (4H; t; 2 $-\text{OCH}_2-$; $J = 6,7$ Hz); 1,79-1,60 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,56 (6H; s; 2 $-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3$); 1,45-1,26 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J = 6,6$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171,6; 72,0; 66,6; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,5; 25,7; 22,7; 14,1.

Didodecylester kyseliny (4R,5S)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4,5-dikarboxylové (AmT). $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_6$; 526,80 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 37 %; bezbarvý olej; IČ (CHCl_3): ν_{max} 2927, 2855, 1759, 1735 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,82 (2H; s; 2 HO-CH-COO-); 4,23-4,01 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-$); 1,70-4,56 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,42 (6H; s; 2 O-C-CH₃); 1,35-1,18 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$);

$J = 6,6$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 168,3; 112,9; 76,4; 65,8; 31,9; 29,7; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 26,6; 25,8; 25,8; 22,7; 14,1.

5.2.7. Příprava látek CT a CmT

Látka T resp. mT (0,8 mmol), dimethylkarbonát (1,1 mmol) a katalytické množství sodíku bylo smícháno v 30 ml suchého chloroformu. Směs byla míchána na olejové lázni o teplotě 90 °C 3 hodiny. Produkty byly (po promytí reakční směsi vodou) získány sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 49:1 (CT) resp. 19:1 (CmT).

Didodecylester kyseliny (4R,5R)-2-oxo-1,3-dioxolan-4,5-dikarboxylové (CT).
 $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}_7$; 512,37 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 30 %; bezbarvý olej; $[\alpha]_{\text{D}}^{28} +3,8^\circ$ (1,3; CHCl_3); IČ (CHCl_3): ν_{max} 2927, 2855, 1743 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,17-4,07 (4H; m; 2 $-\text{O}-\text{CH}_2-$); 3,77 (2H; s; 2 $-\text{OCH}-\text{COO}$); 1,68-1,59 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,40-1,20 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2-$); 0,87 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J = 6,4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 155,9; 155,4; 68,2; 68,0; 54,6; 31,9; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 29,2; 28,6; 28,2; 25,8; 25,6; 22,6; 14,1.

Didodecylester kyseliny (4R,5S)-2-oxo-1,3-dioxolan-4,5-dikarboxylové (CmT).
 $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}_7$; 512,37 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; výtěžek: 57 %; bezbarvý olej; IČ (substance): ν_{max} 2923, 2852, 1748 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,14-4,09 (4H; m; 2 $-\text{O}-\text{CH}_2-$); 3,78 (2H; s; 2 $-\text{OCH}-\text{COO}$); 1,68-1,59 (4H; m; 2 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$); 1,25-1,11 (36H; m; 18 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (6H; t; 2 $-\text{CH}_3$; $J = 6,4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 100,1; 68,3; 68,0; 54,6; 53,6; 31,9; 29,7; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,7; 25,9; 25,7; 22,7; 14,1.

5.3. Syntéza analog T12

5.3.1. Příprava hydrochloridů ω -aminokyselin

Směs vzniklá rozpuštěním příslušné ω -aminokyseliny (1 mmol) v 25 ml vody a 35% HCl (1 mmol) byla při pokojové teplotě míchána 1 hodinu. Poté byly voda a HCl vakuově oddestilovány a produkt byl získán krystalizací z acetonu.

Hydrochlorid kyseliny 3-aminopropanové (3Ac). $C_3H_8ClNO_2$; 125,56 g.mol⁻¹; výtěžek: 96 %; bílé krystaly; $t_f = 123\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 121-122 $^\circ\text{C}$)^{151,152,153}; IČ (KBr): ν_{\max} 2946, 2905, 1724 cm⁻¹.

Hydrochlorid kyseliny 4-aminobutanové (4Ac). $C_4H_{10}ClNO_2$; 139,58 g.mol⁻¹; výtěžek: 90 %; bílé krystaly; $t_f = 135\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 134-136 $^\circ\text{C}$)¹⁵⁴; IČ (KBr): ν_{\max} 2997, 2925, 1730 cm⁻¹.

Hydrochlorid kyseliny 5-aminopentanové (5Ac). $C_5H_{12}ClNO_2$; 153,61 g.mol⁻¹; výtěžek: 98 %; bílé krystaly; $t_f = 95\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 92-94 $^\circ\text{C}$)^{155,156}; IČ (KBr): ν_{\max} 2905, 2872, 1697 cm⁻¹.

Hydrochlorid kyseliny 7-aminoheptanové (7Ac). $C_7H_{16}ClNO_2$; 181,66 g.mol⁻¹; výtěžek: 93 %; bílé krystaly; $t_f = 114\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 112 $^\circ\text{C}$)¹⁵⁷; IČ (KBr): ν_{\max} 2940, 2849, 1719 cm⁻¹.

Hydrochlorid kyseliny 8-aminooktanové (8Ac). $C_8H_{18}ClNO_2$; 195,69 g.mol⁻¹; výtěžek: 82 %; bílé krystaly; $t_f = 149\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 144-146 $^\circ\text{C}$)^{158,159}; IČ (KBr): ν_{\max} 2912, 2851, 1725 cm⁻¹.

Hydrochlorid kyseliny 12-aminododekanové (12Ac). $C_{12}H_{26}ClNO_2$; 251,79 g.mol⁻¹. výtěžek: 93 %; bílé krystaly; $t_f = 168\text{-}169\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. 163-164 $^\circ\text{C}$)¹⁶⁰; IČ (KBr): ν_{\max} 2906, 2845, 1725 cm⁻¹.

5.3.2. Příprava amonium-chloridů

Příprava látek 1a-c, 1e-f a 1h vycházela z hydrochloridu příslušné aminokyseliny (4 mmol), který byl rozpuštěn v nadbytku SOCl₂ (20 mmol) a bez přítomnosti organického rozpouštědla míchán při RT 1 hodinu. Poté byl SOCl₂ odpařen na vakuové odparce a k suchému meziproductu byl přidán roztok odpovídajícího alkoholu (4 mmol) v 15 ml suchého chloroformu. Směs byla míchána při 50-60 $^\circ\text{C}$ 2 hodiny. Poté byl chloroform oddestilován na vakuové odparce, produkt byl rozpuštěn v minimálním

množství absolutního EtOH a vykrytalizován přidáním etheru. Krystaly amoniumchloridu byly vysušeny za sníženého tlaku nad KOH. Příprava látek 1d a 1g byla odlišná a postup je uveden přímo u těchto látek.

2-(pentadecyloxykarbonyl)ethylamonium-chlorid (1a). $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 45 %; bílé krystaly; $t_f = 98$ °C; IČ (ATR): ν_{max} 2952, 2914, 2848, 1722, 720 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,15 (3H; bs; NH_3^+); 4,01 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,5 Hz); 2,93 (2H; t; $^+H_3N-CH_2-$; J=7,0 Hz); 2,62 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=7,2 Hz); 1,65-1,47 (2H; m; $-CH_2-$); 1,39-1,09 (24H; m; 12 $-CH_2-$); 0,83 (3H; t; $-CH_3$; J=6,6 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 172,1; 64,0; 34,9; 34,8; 31,7; 31,5; 29,3; 28,9; 28,2; 22,3; 14,2.

3-(tetradecyloxykarbonyl)propylamonium-chlorid (1b). $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 40 %; bílé krystaly; $t_f = 112$ °C; IČ (ATR): ν_{max} 2996, 2927, 1729 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,15 (3H; bs; NH_3^+); 3,98 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,6 Hz); 2,76 (2H; t; $^+H_3N-CH_2-$; J=7,5 Hz); 2,40 (2H; t; $-CH_2CH_2-COO-$; J=7,3 Hz); 2,32 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=7,4 Hz); 1,65-1,47 (2H; m; $-CH_2-$); 1,39-1,09 (22H; m; 11 $-CH_2-$); 0,83 (3H; t; $-CH_3$; J=6,4 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 173,9; 64,2; 31,5; 30,8; 30,6; 29,2; 29,2; 28,9; 28,9; 28,3; 25,6; 22,7; 22,6; 22,3; 14,2.

4-(tridecyloxykarbonyl)butylamonium-chlorid (1c). $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 72 %; bílé krystaly; $t_f = 105$ °C; IČ (ATR): ν_{max} 2951, 2914, 2848, 1746, 719 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,12 (3H; bs; NH_3^+); 3,98 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,6 Hz); 2,73 (2H; bs; $^+H_3N-CH_2-$); 2,30 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=6,6 Hz); 1,70-1,45 (6H; m; 3 $-CH_2-$); 1,40-1,09 (20H; m; 10 $-CH_2-$); 0,84 (3H; t; $-CH_3$; J=6,5 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 172,8; 64,0; 33,1; 31,5; 29,3; 29,2; 29,18; 29,1; 28,9; 28,9; 28,3; 26,5; 25,6; 22,3; 21,6; 14,1.

5-(dodecyloxykarbonyl)pentylamonium-chlorid (1d). Látka T12 (10 mmol) byla rozpuštěna v chloroformu. Po přidání několika kapek 35% HCl byl roztok 30 minut při RT míchán. Poté byl chloroform odpařen a po ochlazení reakční směsi byl produkt získán krystalizací z hexanu. $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; bílé krystaly; $t_f = 95$ °C (lit. 96-97 °C)⁴²; IČ (ATR): ν_{max} 2953, 2916, 2848, 1733, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,07 (3H; bs; NH_3^+); 3,97 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,6 Hz); 2,71 (2H; t; $^+H_3N-CH_2-$; J=7,8 Hz); 2,27 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=7,4 Hz); 1,60-1,45 (6H; m; 3 $-CH_2-$); 1,35-1,15 (20H; m; 10 $-CH_2-$); 0,84 (3H; t; $-CH_3$; J=6,1 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 173,0; 63,9; 33,5; 31,5; 29,3; 29,2; 29,2; 29,0; 28,9; 28,3; 26,8; 25,6; 25,5; 24,1; 22,3; 14,2.

6-(undecyloxykarbonyl)hexylamonium-chlorid (1e). $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 80 %; bílé krystaly; $t_f = 106\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. t_f 98-101 $^\circ\text{C}$)⁴²; IČ (ATR): ν_{\max} 2917, 2849, 1735, 1728, 728, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,05 (3H; bs; NH_3^+); 3,98 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,6 Hz); 2,71 (2H; t; $^+H_3N-CH_2-$; J=7,7 Hz); 2,27 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=7,1 Hz); 1,77-1,45 (6H; m; 3 $-CH_2-$); 1,40-1,12 (20H; m; 10 $-CH_2-$); 0,84 (3H; t; $-CH_3$; J=6,6 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 173,1; 63,9; 33,5; 31,5; 29,2; 29,1; 28,9; 28,8; 28,3; 28,1 26,9; 25,7; 25,5; 24,4; 22,3; 14,1.

7-(decyloxykarbonyl)heptylamonium-chlorid (1f). $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 81 %; bílé krystaly; $t_f = 98\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. t_f 104-109 $^\circ\text{C}$)⁴²; IČ (ATR): ν_{\max} 2950, 2912, 2847, 1734, 718 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,03 (3H; bs; NH_3^+); 3,98 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,6 Hz); 2,71 (2H; t; $^+H_3N-CH_2-$; J=7,4 Hz); 2,26 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=7,5 Hz); 1,66-1,43 (6H; m; 3 $-CH_2-$); 1,38-1,11 (20H; m; 10 $-CH_2-$); 0,84 (3H; t; $-CH_3$; J=6,6 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 173,1; 63,8; 33,7; 31,5; 29,1; 28,9; 28,8; 28,5; 28,4; 28,3; 27,1; 25,9; 25,5; 24,6; 22,3; 14,1.

9-(oktyloxykarbonyl)nonylamonium-chlorid (1g). 10-bromdekanová kyselina (8 mmol) a nadbytečné množství $SOCl_2$ (40 mmol) bylo smícháno v dusíkové atmosféře a mícháno při RT 1 hodinu. $SOCl_2$ byl odpařen na vakuové odparce a meziproduct vysušen za sníženého tlaku. Poté byl přidán oktanol (8 mmol) v 20 ml suchého chloroformu a směs byla v dusíkové atmosféře míchána při 50-60 $^\circ\text{C}$ 2 hodiny. Po odpaření chloroformu byl čistý oktylester kyseliny 10-bromdekanové získán sloupcovou chromatografií (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 9:1). K takto připravenému esteru byl přidán ftalimid draselný (7,5 mmol) a 25 ml DMF a směs byla míchána při 40 $^\circ\text{C}$ 4 hodiny. Po zchladnutí na RT bylo přidáno 20 ml destilované vody a směs byla vytřepávána 3x30 ml dichlormethanu. Organická fáze byla oddělena, odpařena a k surovému meziproductu byl přidán hydrazin hydrát (7,5 mmol) v 30 ml EtOH. Směs byla 4 hodiny zahřívána za refluxu na olejové lázni, poté byl EtOH odpařen a surový produkt byl rozpuštěn v dichlormethanu. Nerozpustný zbytek byl zfiltrován a filtrát odpařen. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v suchém etheru a do roztoku byl zaveden plynný chlorovodík po dobu 30 minut. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 75 %; bílé krystaly; $t_f = 115\text{ }^\circ\text{C}$; IČ (ATR): ν_{\max} 2914, 2848, 1737, 722 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,01 (3H; bs; NH_3^+); 3,97 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,4 Hz); 2,72 (2H; bs; $^+H_3N-CH_2-$); 2,25 (2H; t; $-CH_2-COO-$; J=7,3 Hz); 1,59-1,41 (6H; m; 3 $-CH_2-$); 1,33-1,16 (20H; m; 10 $-CH_2-$); 0,84 (3H; t; $-CH_3$; J=6,9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 173,1; 63,8; 33,7; 31,4; 28,9; 28,8; 28,7; 28,6; 28,3; 27,2; 26,0; 25,6; 24,7; 22,3; 14,1.

11-(hexyloxykarbonyl)undecylamonium-chlorid (1h). $C_{18}H_{38}ClNO_2$; 335,96 g.mol⁻¹; výtěžek: 64 %; bílé krystaly; $t_f = 114\text{ }^\circ\text{C}$; IČ (ATR): ν_{\max} 2914, 2847, 1737, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,01 (3H; bs; NH_3^+); 3,98 (2H; t; $-OCH_2-$; J=6,6 Hz); 2,72 (2H; t; $^+H_3N-CH_2-$; J=7,5 Hz); 2,25 (2H; t; $-CH_2-COO-$;

$J=7,1$ Hz); 1,62-1,40 (6H; m; 3 $-CH_2-$); 1,35-1,16 (20H; m; 10 $-CH_2-$); 0,85 (3H; t; $-CH_3$; $J=6,9$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 173,1; 63,8; 33,9; 33,7; 31,0; 29,1; 28,9; 28,7; 28,6; 28,3; 27,1; 26,1; 25,3; 24,7; 22,2; 14,1.

5.3.3. Příprava amonium-karbamátů

Příslušný amonium-chlorid (5 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml destilované vody a vytřepáván 3x15 ml etheru s 10 mmol TEA. Organická fáze byla zahuštěna na vakuové odparce a dosušena za sníženého tlaku nad H_2SO_4 (24 hodin). Následným rozpuštěním meziproductu v etheru a probubláváním CO_2 vznikly po ochlazení krystaly, které byly za snížené teploty odfiltrovány přes skládaný filtr a vysušeny v exsikátoru nad P_2O_5 za normálního tlaku.

2-(pentadecyloxykarbonyl)ethylamonium-2-(pentadecyloxykarbonyl)ethylkarbamát (2a); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; 642,55 $g \cdot mol^{-1}$; výtěžek: 30 %; bílé krystaly; $t_f = 77$ °C; IČ (ATR): ν_{max} 2953, 2915, 2847, 1734, 1726, 1617, 1469 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/68.24; 11.60/11.51; 4.36/4.15.

3-(tetradecyloxykarbonyl)propylamonium-3-(tetradecyloxykarbonyl)propylkarbamát (2b); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; 642,55 $g \cdot mol^{-1}$; výtěžek: 45 %; bílé krystaly; $t_f = 72$ °C; IČ (ATR): ν_{max} 3349, 2953, 2914, 2846, 1742, 1735, 1647, 1613, 1460 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/69.19; 11.60/11.95; 4.36/4.05.

4-(tridecyloxykarbonyl)butylamonium-4-(tridecyloxykarbonyl)butylkarbamát (2c); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; 642,55 $g \cdot mol^{-1}$; výtěžek: 35 %; bílé krystaly; $t_f = 62$ °C; IČ (ATR): ν_{max} 3351, 2952, 2916, 2850, 1727, 1647, 1460 cm^{-1} .

5-(dodecyloxykarbonyl)pentylamonium-5-(dodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát, (2d); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; 642,55 $g \cdot mol^{-1}$; výtěžek: 85 %; bílé krystaly; $t_f = 65$ °C (lit. 62-65 °C)⁴⁴; IČ (ATR): ν_{max} 2928, 2856, 1725, 1467 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/68.53; 11.60/11.49; 4.36/4.24.

6-(undecyloxykarbonyl)hexylamonium-6-(undecyloxykarbonyl)hexylkarbamát (2e); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; 642,55 $g \cdot mol^{-1}$; výtěžek: 44 %; bílé krystaly; $t_f = 64$ °C (lit. 55-58 °C)⁴⁴; IČ (ATR): ν_{max} 3317, 2916, 2849, 1733, 1725, 1637, 1460 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/69.43; 11.60/11.91; 4.36/4.13.

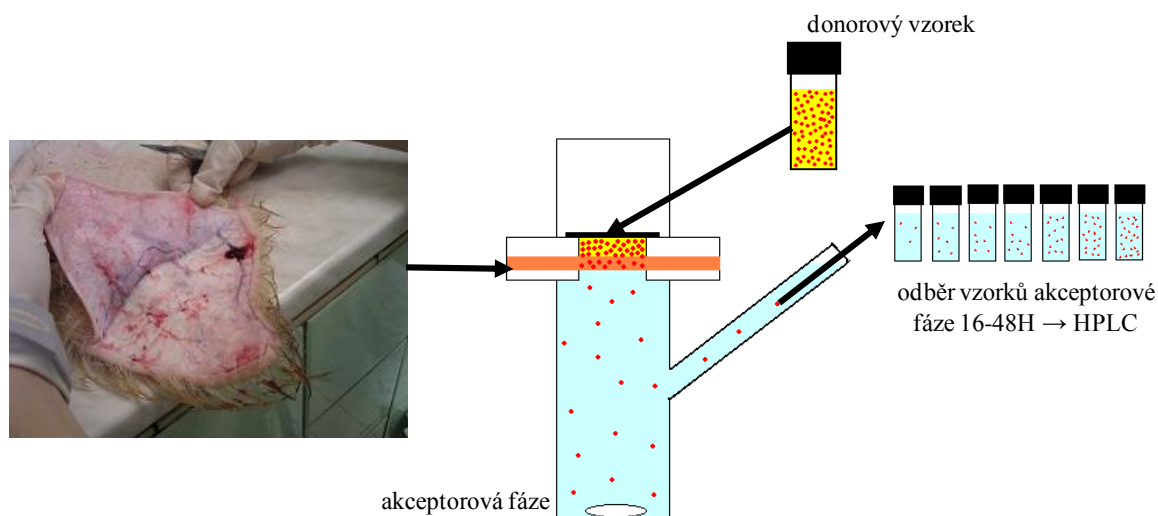
7-(decyloxykarbonyl)heptylamonium-7-(decyloxykarbonyl)heptylkarbamát (2f); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; 642,55 $g \cdot mol^{-1}$; výtěžek: 60 %; bílé krystaly; $t_f = 70$ °C (lit. 61-65 °C)⁴⁴; IČ (ATR): ν_{max} 3360, 2954, 2914, 2848, 1741, 1734, 1647, 1612, 1459 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/69.55; 11.60/11.93; 4.36/4.15.

9-(octyloxykarbonyl)nonylamonium-9-(octyloxykarbonyl)nonylkarbamát (2g); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; $642,55 \text{ g.mol}^{-1}$; výtěžek: 40 %; bílé krystaly; $t_f = 75 \text{ }^\circ\text{C}$; IČ (ATR): ν_{max} 3326, 2920, 2850, 1729, 1647, 1619, 1474 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/68.89; 11.60/11.46; 4.36/4.67.

11-(hexyloxykarbonyl)undecylamonium-11-(hexyloxykarbonyl)undecylkarbamát (2h); $C_{37}H_{74}N_2O_6$; $642,55 \text{ g.mol}^{-1}$; výtěžek: 45 %; bílé krystaly; $t_f = 69 \text{ }^\circ\text{C}$; IČ (ATR): ν_{max} 3371, 2916, 2849, 1726, 1649, 1618, 1474 cm^{-1} ; CHN analýza (vypočítáno/nalezeno): 69.11/69.10; 11.60/11.90; 4.36/4.36.

5.4. Permeační experimenty a HPLC stanovení

Schopnost urychlovat prostup léčiv přes kůži byla hodnocena *in vitro* s použitím modifikované Franzovy difúzní cely (Obr. 37.). Jako modelová membrána sloužila prasečí kůže plně tloušťky a modelovými léčivými byly theofylin a hydrokortizon.



Obr. 37. Franzova difúzní cela.

5.4.1. Příprava kůže

Prasečí uši byly odebrány z místních jatek a k zajištění integrity kožní bariéry byly odděleny od těla ještě před čištěním horkou vodní párou. Kůže byla z dorzální strany prasečích uší opatrně oddělena skalpelem od podložních tkání a chlupy byly odstraněny zastříhovačem. Poté byla kůže konzervována namočením na 5 minut v 0,05% roztoku

azidu sodného. Takto ošetřená kůže byla vakuově uzavřena do polyethylenových sáčků a uskladněna při -18 °C v mrazničce.

5.4.2. *Příprava donorových vzorků*

Při experimentálním hodnocení derivátů dikarboxylových kyselin byl donorový vzorek připraven jako 5% suspenze theofylinu (w/v) s 1 % studovaného akceleraantu v příslušném vehikulu, kterými byly: H₂O, PG/H₂O (6:4) a IPM.

V případě permeačních experimentů s T12 a jeho polohovými izomery byl donorový vzorek připraven jako 5% suspenze theofylinu (w/v) s 1 % studovaného akceleraantu v PG/H₂O 6:4.

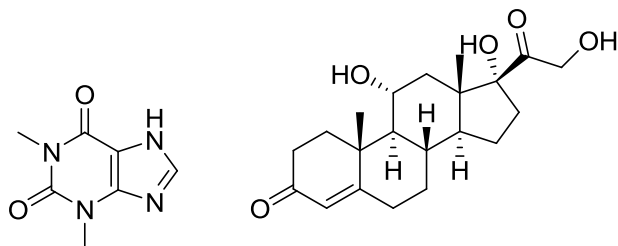
Pro studium vlivu pH na aktivitu T12 a DDEAC byly donorové vzorky připraveny jako 5% suspenze theofylinu (w/v) nebo 2% suspenze hydrokortizonu (w/v) s 1 % T12 nebo DDEAC, přičemž donorovým médiem byl PG/50 mM 2-(hydroxymethyl)-2-aminopropan-1,3-diol (Tris) 6:4, který se na přesné pH v rozmezí 3 až 9 dále upravoval přidáním vodného roztoku NaOH resp. vodného roztoku HCl. Pro pretreatment aplikaci byly připraveny vzorky obsahující pouze akceleraant bez přídavku léčiva ve vehikulu o daném pH.

Všechny vzorky obsahující jako akceleraant jednořetězcový amonium-chlorid byly kvůli vyloučení samovolné reakce se vzdušným oxidem uhličitým probublány dusíkem a to jak při přípravě, tak i před samotnou aplikací vzorku. Z důvodu navození rovnovážného stavu byla suspenze 5 minut míchána při 50 °C a poté byla přenesena do termostatu a uskladněna 24 hodin při teplotě 37 °C. Před jednotlivými pokusy byly donorové vzorky homogenizovány na laboratorní třepačce.

Jako kontrolní vzorek sloužila suspenze léčiva v příslušném vehikulu (bez akceleraantu). Způsob přípravy se shodoval s přípravou donorového vzorku s akceleraantem.

5.4.3. *Modelová léčiva*

Schopnost látek ovlivnit průnik léčiva kožní bariérou byl sledován u dvou modelových léčiv, u bronchodilatancia/antiastmatika theofylinu a glukokortikoidu hydrokortizonu (Obr. 38.).



Obr. 38. Modelová léčiva theofylin a hydrokortizon.

Výběr těchto léčiv byl dán jejich výhodnými vlastnostmi (Tab. 1.). Za běžných podmínek jsou to látky nedráždivé, neovlivňují kožní bariéru a samostatně jí ochotně nepronikají. Také jsou snadno stanovitelné běžnými analytickými metodami. Tyto látky mají navíc rozdílné fyzikálněchemické parametry a pravděpodobně preferují jiné cesty prostupu přes stratum corneum.

Tab. 1. Fyzikálně chemické vlastnosti modelových léčiv (¹ data byla získána z SRC PhysProp databáze dostupné on-line na www.syrres.com, ² data byla vypočítána s využitím ACD/Labs Software V8.14.).

léčivo	Fyzikálně-chemické vlastnosti			
	M_r	t_t^1	pK_a^2	$\log P^1$
theofylin	180	273	1,5; 8,6	-0,02
hydrokortizon	362	220	-	1,61

5.4.4. Akceptorová fáze

Jako akceptorová fáze pro stanovovaná léčiva byl použit izotonický fosfátový pufr o pH = 7,4 (PBS), který je s léčivými kompatibilní, zaručuje jejich vysokou rozpustnost a zároveň je vhodný při HPLC analýze. Byl připraven smícháním 19,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 400 ml vody pro HPLC a 2,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml vody pro HPLC. K izotonizaci pufru bylo použito 3,96 g NaCl a k jeho konzervaci 0,27 g NaN_3 .

5.4.5. Vlastní permeační experiment

Prasečí kůže byla těsně před použitím opatrně rozmrazena a nařezána na kousky o velikosti zhruba 2 x 2 cm. Kůže byla umístěna do Franzových difúzních cel a upevněna sklíčky s otvorem o přesně definované ploše 1 cm^2 . Každá z Franzových cel byla naplněna akceptorovou fází, tj. PBS. Přesný objem akceptorové fáze (16–18 ml) každé z Franzových difúzních cel byl změřen a zahrnut do výpočtů. Cely byly temperovány 30 minut ve vodní lázni o teplotě 32 °C a poté bylo na kůži aplikováno 150 μl donorového vzorku. Abychom u donorových vzorků obsahujících jednořetězcový amonium-chlorid jako akcelerant vyloučili jejich případnou reakci se vzdušným oxidem

uhličitým a tím tedy případnou tvorbu amonium-karbamátů, byl akceptorový kompartment Franzových cel naplněn dusíkem. Vzorek byl překryt krycím sklíčkem, aby bylo zamezeno odpařování vehikula. Akceptorová fáze byla po celou dobu trvání experimentu míchána ve vodní lázni o teplotě 32 °C. Poté byly v přesných časových intervalech v průběhu 48 hodin (theofylin) resp. 52 hodin (hydrokortizon) odebrány vzorky akceptorové fáze. Jednotlivé vorky měly objem 0,6 ml a vždy byly nahrazeny stejným objemem čerstvé akceptorové fáze.

5.4.6. *Pretreatment experiment a měření dermální elektrické impedance*

V případě aplikace T12 a DDEAC formou pretreatmentu byla Franzova cela naplněná PBS pufrům a s připevněnou prasečí kůží temperována ve vodní lázni o teplotě 32 °C 30 minut. Po ustanovení teplotní rovnováhy bylo na kůži nanášeno 0,5 ml fosfátového pufru a změřena dermální elektrická impedance ($k\Omega \cdot \text{cm}^2$). K měření byl použit přístroj LCR meter 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Germany) s měřicím rozsahem 20 Ω -10 M Ω měřící při frekvenci 120 kHz. Elektrody z nerezavějící oceli byly umístěny jedna v donorovém kompartmentu a druhá v akceptorovém kompartmentu Franzovy cely a byla změřena a zaznamenána hodnota elektrické dermální impedance. Poté byl povrch kůže opatrně vysušen a na kůži bylo nanášeno 150 μl donorového vzorku obsahujícího 1 % (w/v) DDEAC resp. T12 adjustovaného na přesné pH v rozmezí 3 až 9 (v PG/Tris). Do kontrolních cel bylo nanášeno 150 μl donorového vzorku obsahujícího pouze PG/Tris o stanoveném pH (bez akcelerantu). Po 2 hodinách byly donorové vzorky nanášené na kůži odstraněny gázovým tamponem a opláchnuty destilovanou vodou a bylo provedeno druhé měření dermální elektrické impedance opět stejným způsobem (tj. po aplikaci akcelerantu formou pretreatmentu). Po dalších 30 minutách byly na kůži nanášeny vzorky s léčivými (5% suspenze theofylinu resp. 2% suspenze hydrokortizonu) a v určených časových intervalech byly odebrány vzorky z akceptorového kompartmentu cel. Koncentrace léčiva prošlého přes kůži byla hodnocena pomocí HPLC.

5.4.7. *HPLC analýza*

Koncentrace léčiv ve vzorcích akceptorové fáze byla stanovena pomocí HPLC za využití LCP vysokotlakého čerpadla (ECOM, Praha, Česká republika), autosampleru (ECOM, Praha, Česká republika), SP 8440 UV detektoru (Spectra Physics) a softwaru CSW verze 1.7; nově také pomocí HPLC sestavy Shimadzu Prominence instrument (Shimadzu, Kyoto, Japan) zahrnující dvě vysokotlaká čerpadla (LC-20AD) s odplyňovačem (DGU-20A3), autosampler (SIL-20A HT), kolonový termostat (CTO-20AC), UV/VIS detektor (SPD-20A), komunikační modul (CBM-20A) a integrační software LCsolutions V1.22.

Stanovení fluxu léčiv probíhalo s použitím kolony LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100, RP 18, 5 μm , Merck, Darmstadt, Německo) a HPLC parametry modelových léčiv jsou přehledně uvedeny v Tab. 2. Pro vyhodnocení permeačních experimentů byla použita metoda HPLC, jejíž metodika byla vypracována již dříve a pro potřebu této doktorské disertační práce byla přejata.⁴⁰

Tab. 2. HPLC parametry modelových léčiv.

léčivo	teplota kolony (°C)	HPLC parametry modelových léčiv			mobilní fáze
		průtok (ml/min)	vlnová délka (nm)	retenční čas (min)	
theofylin	35	1,2	272	3,3 \pm 0,1	methanol/0.1 M NaH ₂ PO ₄ 4:6 (v/v)
hydrokortizon	40	1,2	252	4,2 \pm 0,1	methanol/voda/THF 6:4:1 (v/v/v)

5.4.8. Kalibrační standardy

Kalibrační standardy pro stanovení theofylinu a hydrokortizonu byly připraveny naředěním zásobního roztoku příslušného léčiva (o koncentraci 10 mg/10 ml) v PBS s přidavkem azidu sodného. Byly použity vzorky o koncentraci léčiva 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,1 a 0,05 mg/ml.

5.4.9. Výpočet fluxů a akceleračních poměrů

Kumulativní množství léčiva, které prošlo kůží do akceptorové fáze, bylo přepočítáno vzhledem k odběrům a doplňování akceptorové fáze a přesnému objemu Franzových cel. Hodnoty byly vyneseny do grafů v závislosti na čase. Pro výpočet příslušných fluxů J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) byla použita oblast ustáleného toku léčiva (lineární oblast křivky) a flux byl odečten jako hodnota směrnice této přímky. Ke statistickému zpracování dat byla použita jednosměrná analýza rozptylu (ANOVA) s Dunnettovým post testem, případně neparametrický Kruskal-Wallisový test s Dunnovým post testem. Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba (SEM); počet opakování pokusu a počet použitých kůží z různých zvířat jsou uvedeny ve výsledcích u daných tabulek či grafů.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Deriváty dikarboxylových kyselin

V rámci syntetických obměn polární hlavy akceleraantu byly hodnoceny estery s odlišnou geometrickou izomerií na dvojně vazbě – estery kyseliny fumarové (*trans-/E*) v porovnání s estery kyseliny maleinové (*cis-/Z*); deriváty, které měly dvojnou vazbu nahrazenou vazbou jednoduchou – estery kyseliny jantarové; a také sloučeniny s hydroxylovými skupinami schopnými tvorby vodíkových vazeb – estery kyseliny (*2R,3R*)-vinné a kyseliny *meso*-vinné. V souvislosti se strukturními obměnami v oblasti polární hlavy byly dále hodnoceny změny v hydrofobním řetězci akceleraantu. Byly připraveny didodecylestery, monododecylestery a dodecyl-methylestery všech uvedených dikarboxylových kyselin.

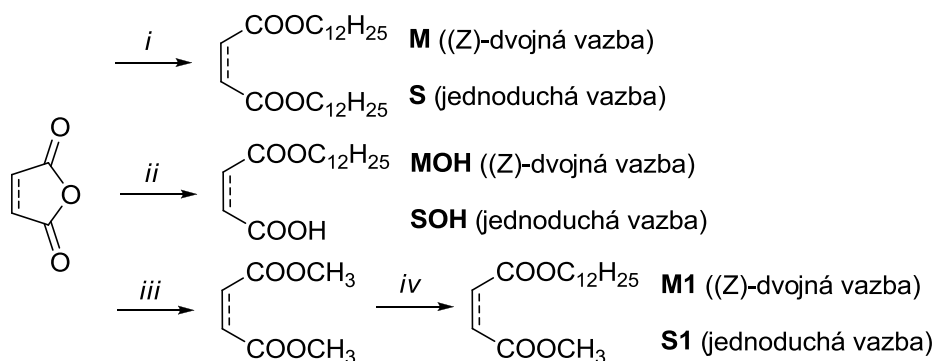
6.1.1. Příprava derivátů dikarboxylových kyselin

6.1.1.1. Deriváty kyseliny maleinové a jantarové

Dvouřetězcové didodecylestery odvozené od kyselin maleinové a jantarové (**M**, **S**, Obr. 39.) byly připraveny z odpovídajících anhydridů a 2 ekvivalentů dodekanolu za kyselé katalýzy (H_2SO_4) v prostředí toluenu¹⁶¹ s výtěžky 80 % resp. 60 %. Jde o krystalické látky v literatuře popsání, avšak z hlediska urychlovací schopnosti doposud nestudované.^{162,163}

Pro přípravu jednořetězcových monododecylesterů odvozených od kyselin maleinové a jantarové (**MOH**, **SOH**, Obr. 39.) byla využita stejná kysele katalyzovaná reakce (H_2SO_4) avšak s 1 ekvivalentem dodekanolu bez přítomnosti rozpouštědla¹⁶⁴ a reakční doba byla podstatně zkrácena na 10 minut. Reakce poskytly krystalické produkty s výtěžky 70 % resp. 75 %. Tyto látky jsou v literatuře popsány.^{165,163}

Sloučeniny s jedním krátkým a jedním dlouhým řetězcem typu dodecyl-methylesterů (**M1**, **S1**, Obr. 39.) byly připraveny kysele katalyzovanou (*p*-TsOH) parciální reesterifikací příslušného dimethylesteru. Produkty reakce byly bezbarvé oleje ve výtěžcích 35 % resp. 20 %. Tyto látky nejsou dosud v literatuře popsány.



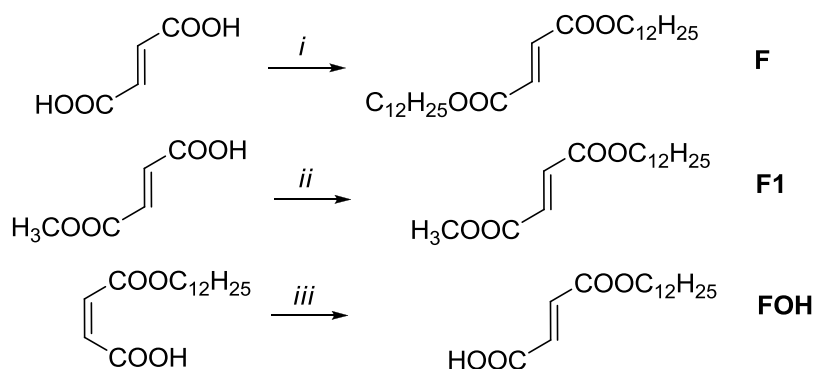
Obr. 39. Příprava derivátů kyseliny maleinové a jantarové. Reagencie a podmínky: (i) $C_{12}H_{25}OH$, H^+ , reflux, toluen, 4 h; (ii) $C_{12}H_{25}OH$, H^+ , 130-140 °C, 10 min; (iii) $MeOH$, H^+ , reflux, 3 h; (iv) $C_{12}H_{25}OH$, H^+ , reflux, 3 h.

6.1.1.2. Deriváty kyseliny fumarové

Didodecylester kyseliny fumarové (**F**, Obr. 40.) byl připraven kyselé katalyzovanou esterifikací (H_2SO_4) kyseliny fumarové s 2 ekvivalenty dodekanolu. Reakce probíhala s výtěžkem mírně převyšujícím 70 % a tato látka je v literatuře popsána.¹⁶⁶

Pro přípravu methyl-dodecyl fumarátu (**F1**, Obr. 40.) se bohužel nedařilo využít metodu parciální reesterifikace, vždy se tvořil dvouřetězcový diester **F**. Proto byla pro přípravu látky **F1** zvolena reakce s dodekanolem v prostředí *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu a 4-dimethylaminopyridinu vycházející z komerčně dostupného monomethyl-fumarátu. Reakce poskytovala bezbarvý olej ve výtěžku 70 %. V literatuře není sloučenina popsána.

Syntéza jednořetězcového monododecylesteru (**FOH**, Obr. 40.) se z výchozí kyseliny fumarové nedařila. I přesto, že jde o látku publikovanou¹⁶⁷ a byly dodrženy postupy v literatuře uváděné, vždy se tvořil dvouřetězcový diester. Monoester byl úspěšně připraven jodem katalyzovanou izomerizací látky **MOH**. Reakce probíhala v uzavřené baňce za nepřístupu světla s výtěžkem 30 % krystalického produktu.

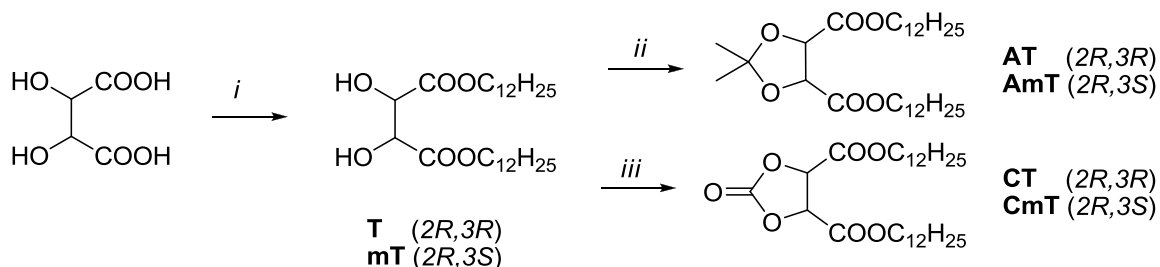


Obr. 40. Příprava derivátů kyseliny fumarové. Reagencie a podmínky: (i) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OH}$, H^+ , reflux, toluen, 4 h; (ii) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OH}$, DCC, DMAP, 0 °C až RT, 24 h; (iii) I_2 , CHCl_3 reflux, 1 h.

6.1.1.3. Deriváty kyseliny (2R,3R)-vinné a meso-vinné

Didodecylestery kyseliny (2R,3R)-vinné a meso-vinné (**T**, **mT**, Obr. 41.) byly připraveny kysele katalyzovanou (*p*-TsOH) esterifikací příslušné dikarboxylové kyseliny 4 ekvivalenty dodekanolu. Reakce probíhala s výtěžky 52 % resp. 64 %. Látka **T** je v literatuře popsána,¹⁶⁸ látka **mT** nikoliv.

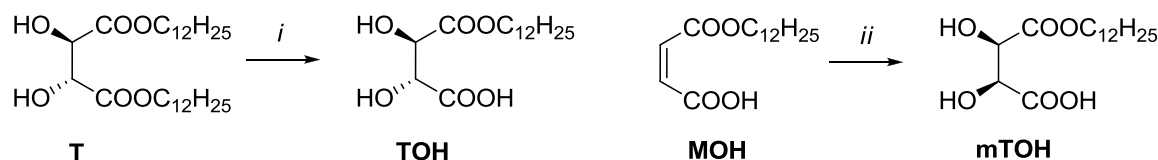
Pro přípravu acetonidů (**AT** a **AmT**, Obr. 41.) a karbonátů (**CT**, **CmT**, Obr. 41.) byly výchozími látkami diestery **T** a **mT**. Kysele katalyzovanou reakcí (*p*-TsOH) s 2,2-dimethoxypropanem byly připraveny acetonidy **AT** (krystalická látka) a **AmT** (bezbarvý olej) ve výtěžku 45 % resp. 37 %. Obě látky nejsou dosud v literatuře popsány. Karbonáty **CT** a **CmT** byly připraveny reakcí příslušných diesterů **T** a **mT** s dimethylkarbonátem a katalytickým množstvím kovového sodíku. Reakce poskytly produkty (bezbarvé oleje) ve výtěžcích 30 % a 57 %. Sloučeniny nejsou v literatuře popsány.



Obr. 41. Příprava derivátů kyselin (2R,3R)-vinné a meso-vinné. Reagencie a podmínky: (i) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OH}$, H^+ , 100 °C, 2 h; (ii) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$, H^+ , CH_2Cl_2 , RT, 2 h; (iii) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CO}$, Na, toluen, 90 °C.

Syntéza monododecylesteru kyselin (2*R*,3*R*)-vinné (**TOH**, Obr. 42.) vychází z diesteru **T**, který byl podroben parciální bazické hydrolyze. Reakce proběhla s výtěžkem 30 % a připravená krystalická látka nebyla v literatuře dosud popsána.

Pro přípravu monoesteru kyseliny *meso*-vinné (**mTOH**, Obr. 42.) nebylo použití bazické parciální hydrolyzy úspěšné. Proto byla zvolena metoda dihydroxylace dvojně vazby látky **MOH** pomocí KMnO₄ (*syn*-adice). Reakcí byla připravena krystalická látka ve výtěžku 25 % a v literatuře není popsána.



Obr. 42. Příprava monododecyl esterů kyselin (2*R*,3*R*)-vinné a *meso*-vinné. Reagencie a podmínky: (i) 1-OH/H₂O, 2-H⁺; (ii) 1-KMnO₄/aceton/H₂O, 2-Na₂SO₃, H⁺.

6.1.2. Urychlovací aktivita derivátů dikarboxylových kyselin

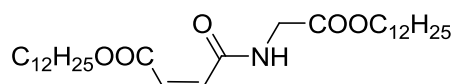
S cílem nalézt souvislosti mezi strukturou potenciálního permeačního akceleračního a jeho schopností urychlit absorpci modelového léčiva theofylinu byla série připravených derivátů dikarboxylových kyselin podrobena *in vitro* permeačním experimentům na prasečí kůži plně tloušťky s použitím Franzovy difúzní cely. Studie byla provedena ze tří vehikul různé polarity: voda, 60% propylenglykol/voda (6:4) a isopropylmyristát (IPM). Souhrnné výsledky dosažených fluxů a akceleračních poměrů všech připravených derivátů jsou přehledně shrnuty v Tab. 3.

Tab. 3. Aktivita derivátů dikarboxylových kyselin. Data v tabulce jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu J_{TH} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a akceleračního poměru (AP). PG – propylenglykol/voda (6:4), IPM – isopropylmyristát, SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 4 až 12.

látko	$J_{TH} \pm \text{SEM}$			AP			
	H ₂ O	PG	IPM	H ₂ O	PG	IPM	
kontrola	3,7±2,4	1,7±1,1	3,3±1,2	-	-	-	
estery kyseliny maleinové	M	2,2±1,0	0,5±0,3	2,2±0,5	0,6	0,3	0,7
	M1	13,2±7,2*	6,8±3,7*	5,1±1,8	3,6*	4,0*	1,5
	MOH	50,4±11,1*	46±8,2*	27,0±8,1*	13,6*	27,1*	8,2*
estery kyseliny fumarové	F	2,4±1,7	0,2±0,1	2,5±0,6	0,6	0,1	0,8
	F1	12,2±2,7	8,1±2,7	6,4±2,1	3,3	4,8	1,9
	FOH	30,6±5,8*	15,3±1,2*	16,1±1,9*	8,3*	9,0*	4,9*
estery kyseliny jantarové	S	1,6±1,0	2,3±1,2	3,2±0,1	0,4	1,4	1,0
	S1	6,9±1,8	6,2±2,7	2,2±0,6	1,9	3,6	0,7
	SOH	5,4±1,0	42,8±8,7*	2,3±0,4	1,5	25,2*	0,7
estery kyselin (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-vinné a <i>meso</i> -vinné	T	7,2±3,3	3,0±2,7	2,7±0,8	1,9	1,8	0,8
	mT	6,2±2,1	3,8±2,1	2,1±1,0	1,7	2,2	0,6
	TOH	5,4±2,4	7,0±1,8*	5,1±0,3	1,5	4,1*	1,5
	mTOH	1,9±0,2	4,0±0,8	5,1±2,1	0,5	2,4	1,5
	AT	8,6±3,1*	3,4±1,7	4,6±1,6	2,3*	2,0	1,4
	AmT	5,7±2,4	2,9±1,2	7,2±2,6	1,5	1,7	2,2
	CT	1,8±0,6	5,8±3,3*	4,2±1,1	0,5	3,4*	1,3
	CmT	3,8±2,1	3,7±1,9	6,9±3,1	1,0	2,2	2,1

6.1.2.1. Aktivita dvouřetězcových derivátů

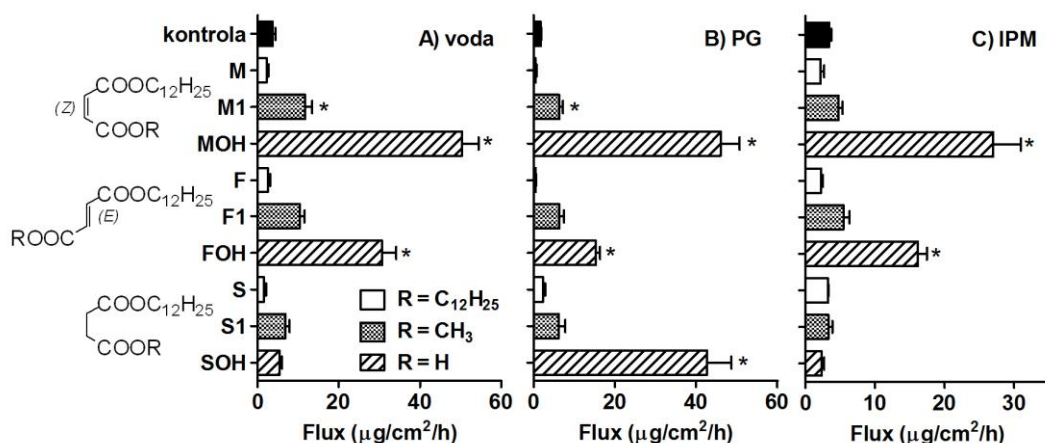
Schopnost urychlit průnik theofylinu přes kůži je u derivátů kyselin maleinové, fumarové a jantarové přehledně znázorněna na Obr. 44. Látky ze skupiny amfifilních dvouřetězcových akceleračních – didodecylestery **M**, **F** a **S** nezvýšily permeaci léčiva přes kůži v žádném z výše uvedených vehikul. To je zajímavé zjištění, neboť dříve popsany strukturně podobný derivát **12GM12** (Obr. 43.)¹ se ukázal jako velmi dobrý akcelerační.



Obr. 43. 12GM12.

Rozdíl mezi látkou **M** a **12GM12** je ve spojovacím „glycylovém článku“ – ten u sloučeniny **M** chybí. Tento rozdíl by mohl ukazovat na to, že permeační aktivita

látek není spjata pouze s velikostí polární hlavy či schopností tvořit vodíkové vazby, jak bylo popsáno dříve,¹ ale vyžaduje u potenciálního akceleraantu jisté strukturní „optimum“.



Obr. 44. Urychlovací schopnost derivátů kyseliny maleinové, fumarové a jantarové v (A) H₂O, (B) PG/H₂O – 6:4 a (C) IPM. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu±SEM (standardní chyba), * znamená statisticky významný rozdíl oproti kontrole (p<0,5), počet opakování permeací byl 4 až 12.

Možným vysvětlením neúčinnosti těchto sloučenin může být to, že se dvouřetězcové amfifilní akceleraanty vmezeří do lipidické vrstvy SC takovým způsobem, že se polární hlava akceleraantu umístí do polární oblasti vrstvy a hydrofobní řetězec do hydrofobní části membrány SC a toto uspořádání nezpůsobí ve SC významné rozrušení struktury.

Didodecylester kyseliny fumarové **F** při našem hodnocení dokonce snížil kožní permeabilitu a to ve všech 3 prostředích (Obr. 44.). Rozdíl mezi jednotlivými vehikuly ovšem není statisticky významný. V odborné literatuře lze najít informace o tom, že podobné amfifilní sloučeniny obsahující *trans*-dvojnou vazbu by mohly být předlohou při návrhu potenciálních permeačních retardantů. Transdermální retardanty jsou v současnosti velmi diskutované sloučeniny, a to především pro jejich schopnost omezit průnik nežádoucích látek přes kůži.¹⁶⁹

6.1.2.2. Aktivita jednořetězcových derivátů

Jak je vidět na Obr. 44., urychlovací aktivita jednořetězcových amfifilních akceleračních látek v porovnání s dvouřetězcovými podstatně vzrostla. Vůbec nejaktivnější látkou byl akcelerační **MOH**, u kterého v prostředí PG/H₂O (6:4) vzrostl flux theofylinu 26krát.

Prvotní vysvětlení, že za výrazné zvýšení aktivity monoesterů by mohl být zodpovědný volný karboxyl, vyvrací fakt, že při hodnocení urychlovací schopnosti kyseliny laurové (za dodržení stejných podmínek) dochází ke zvýšení fluxu theofylinu pouze dvakrát.¹⁷⁰ Námí dosažené výsledky při permeačním hodnocení dodecyl-methyl derivátu **M1** tuto teorii také vyvracejí. Derivát **M1** žádnou volnou karboxylovou skupinu nemá a přitom dosahuje pro theofylin velmi významné urychlovací schopnosti.

Vysvětlením vyšší urychlovací schopnosti jednořetězcových derivátů v porovnání s dvouřetězcovými by mohlo být to, že u jednořetězcových sloučenin jsou podstatně sníženy možné hydrofobní interakce, které jsou u dvouřetězcových látek zodpovědné za poměrně těsné uspořádání bez porušení lipidových membrán SC.

6.1.2.3. Aktivita geometrických izomerů

Vysoké hodnoty fluxů jednořetězcových geometrických izomerů **M1**, **MOH** (*cis*-/*Z*) a **F1**, **FOH** (*trans*-/*E*) nám dovolují jejich vzájemné srovnání. Aktivity dodecyl-methyl esterů **M1** a **F1** jsou ve všech hodnocených prostředích srovnatelné.

Zajímavých výsledků bylo dosaženo s látkou **MOH** (*cis*-derivát), která je statisticky významně aktivnější než *trans*-izomer – látka **FOH** a to ve všech donorových mediích (Obr. 44.). Je známo, že oba monoestery se liší svojí aciditou, ovšem ne v takovém rozsahu jako původní kyseliny maleinová a fumarová. Disociační konstanty **MOH** a **FOH** jsou 4,87 resp. 4,40.¹⁷¹ Vzhledem k tomu, že méně kyselý derivát kyseliny jantarové, látka **SOH**, se ukázal ve vodném i IPM prostředí jako neaktivní, ale v prostředí PG/H₂O (6:4) vykázal aktivitu srovnatelnou s derivátem **MOH**, nelze proto plně vysvětlit rozdíly v aktivitách geometrických izomerů pouze na základě rozdílných acidit.

Nejpravděpodobnějším vysvětlením pozorovaného rozdílu v aktivitách derivátů **MOH** a **FOH** je rozdílné prostorové uspořádání těchto geometrických izomerů. Podobné vztahy byly pozorovány u nenasycených mastných kyselin, které měly dvojnou vazbu zhruba uprostřed dlouhého nenasyceného řetězce.¹⁷² Například kyselina olejová byla mnohem účinnějším akceleračním než její *trans*-izomer kyselina elaidová.¹⁷³ V tomto případě autoři uvádí, že k porušení unikátního uspořádání lipidů ve SC či k fázové

separaci vede vznik zlomu, jenž je dán právě přítomností *cis*-dvojně vazby uvnitř hydrofobního řetězce.¹⁷⁴

I přesto, že u derivátů **MOH** a **FOH** není dvojná vazba součástí hydrofobního řetězce, kde je vliv na uspořádání lipidů SC zřejmý, může vysvětlovat rozdílnou urychlovací aktivitu právě jejich odlišné prostorové uspořádání. Tvar polární hlavy *cis*-izomerů zřejmě nedovoluje těsné uspořádání hydrofobních řetězců s řetězcí ceramidů a lipidů SC. To znamená, že intermolekulární síly navzájem mezi hydrofobními řetězci nejsou tak silné a léčivo může permeovat skrz lipidickou matrix mnohem snadněji.

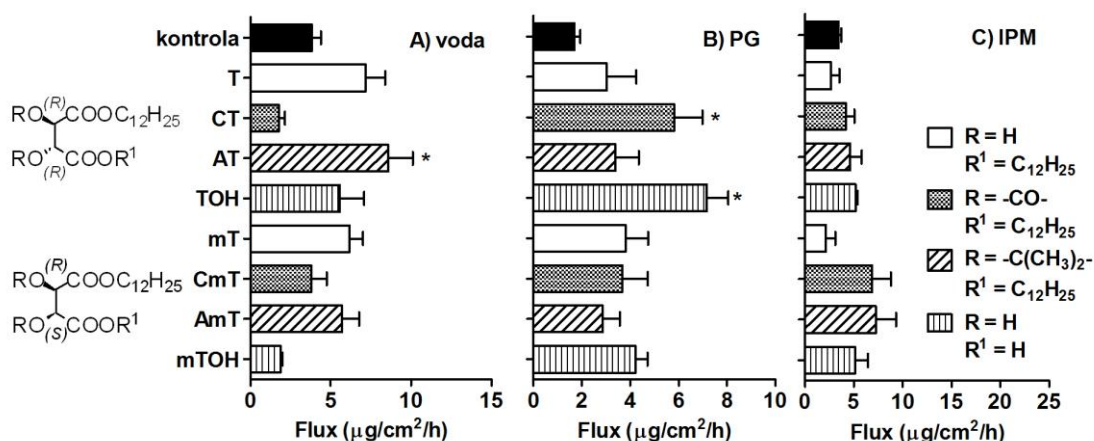
6.1.2.4. Aktivita derivátů s jednoduchou a dvojnou vazbou

Aktivita derivátů kyseliny jantarové, tj. látek majících neomezenou rotaci kolem C2-C3 jednoduché vazby, je v porovnání se svými nenasycenými analogy (deriváty kyseliny fumarové a maleinové) významně závislá na donorovém médiu. Zatímco chování derivátu **SOH** je v PG/H₂O (6:4) velice podobné chování derivátu **MOH**, v prostředí IPM a vodném je derivát **SOH** neaktivní (Obr. 44.). Synergistické působení rozpouštědla a permeačního akceleračního je v odborné literatuře již dobře popsáno^{175,176} a mohlo by objasňovat vysokou urychlovací schopnost amfifilní sloučeniny **SOH** v přítomnosti PG/H₂O (6:4). Tento synergistický jev se vysvětluje jako kombinace různých mechanismů účinku **SOH** a PG, například změna rozdělovací rovnováhy se současnou fluidizací lipidů.

6.1.2.5. Aktivita derivátů kyseliny (2R,3R)-vinné a meso-vinné

Urychlovací aktivity všech připravených derivátů kyseliny (2R,3R)-vinné a *meso*-vinné jsou přehledně shrnuty na Obr. 45. Některé ze sloučenin vykázaly statisticky významné urychlení prostupu theofylinu přes kůži, ale obecně je aktivita celé série derivátů nízká. Vzdělání permeační aktivity látky neovlivnily ani různé strukturní modifikace jako ochránění hydroxylových skupin formou acetonidu či cyklického karbonátu. Úspěch nepřinesla ani příprava jednořetězcového derivátu odvozeného od zmíněných kyselin.

Navíc nebyl pozorován významný rozdíl v aktivitě diastereoizomerních derivátů kyseliny (2R,3R)-vinné (**T**, **CT**, **AT** a **TOH**) a kyseliny *meso*-vinné (**mT**, **CmT**, **AmT** a **mTOH**). To je ve shodě s našimi dříve publikovanými výsledky, kdy ve skupině akceleračních odvozených od aminokyselin vliv stereoselektivity na akcelerační aktivitu látky nebyl pozorován.^{40,43}



Obr. 45. Urychlovací schopnost derivátů kyseliny (2*R*,3*R*)-vinné a *meso*-vinné v (A) H₂O, (B) PG/H₂O – 6:4 a (C) IPM. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu±SEM (standardní chyba), * znamená statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování permeací byl 4 až 11.

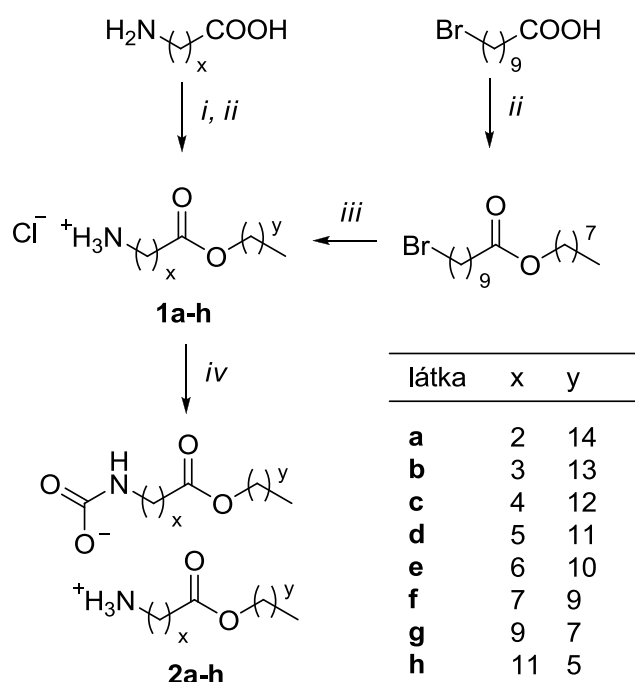
6.2. T12 a jeho analoga

Z předchozích publikovaných prací vyplývá, že přítomnost esterové skupiny je pro T12 a jeho schopnost urychlit prostup léčiva přes kůži nezbytná.^{49,50} S cílem ověřit hypotézu o možném duálním mechanismu účinku T12 a významu polohy esterové funkce byly navrženy a *in vitro* hodnoceny dva typy sloučenin: jednořetězcové amonium-chloridy (**1**) a dvouřetězcové amonium-karbamáty (**2**). Dále jsme si kladli za cíl studovat vliv pH donorového vzorku na aktivitu T12 a jeho metabolitu DDEAC, tedy amoniové soli vzniklé po rozkladu T12 v kyselém prostředí, pomocí dvou modelových léčiv a dermální elektrické impedance.

6.2.1. Příprava polohových izomerů T12

Amonium-karbamáty (**2a-h**, Obr. 46.) byly připraveny z odpovídajících aminokyselin resp. bromkyseliny. Nejprve byly aminokyseliny protonizovány a převedeny na acylchloridy, které reakcí s příslušným alkoholem poskytly amonium-chloridy **1a-f** a **1h**.^{41,52} Vzhledem k tomu, že kyselina 10-aminodekanová není běžně komerčně dostupná, byla syntéza látky **1g** odlišná a vycházela z 10-bromdekanové

kyseliny resp. z jejího acylchloridu. Reakcí acylchloridu s alkoholem vznikl ester 10-bromkyseliny, který Gabrielovou syntézou následovanou hydrazinolýzou¹⁷⁷ poskytl aminoester. Působením plynného chlorovodíku vznikl amonium-chlorid **1g**. Amonium-chloridy **1a-h** byly alkalizovány triethylaminem (TEA) a reakcí s oxidem uhličitým poskytl cílové amonium-karbamáty **2a-h**.^{41,52}



Obr. 46. Příprava Transkarbamu 12 a jeho polohových izomerů **2a-c** a **2e-h**. Reagencie a podmínky: (i) HCl, RT, 1 h; (ii) 1-SOCl₂, RT, 1 h, 2-CH₃(CH₂)_yOH, CHCl₃, 60 °C, 2 h; (iii) 1-ftalimid draselný, DMF, 40 °C, 4 h, 2-N₂H₄.H₂O, EtOH, reflux, 4 h, 3-HCl(g), Et₂O, 30 min; (iv) 1-Et₃N, H₂O/Et₂O, 15 min, 2-CO₂, RT, 15 min.

6.2.2. Urychlovací aktivita DDEAC a T12 a jeho analog

6.2.2.1. Aktivita polohových izomerů T12

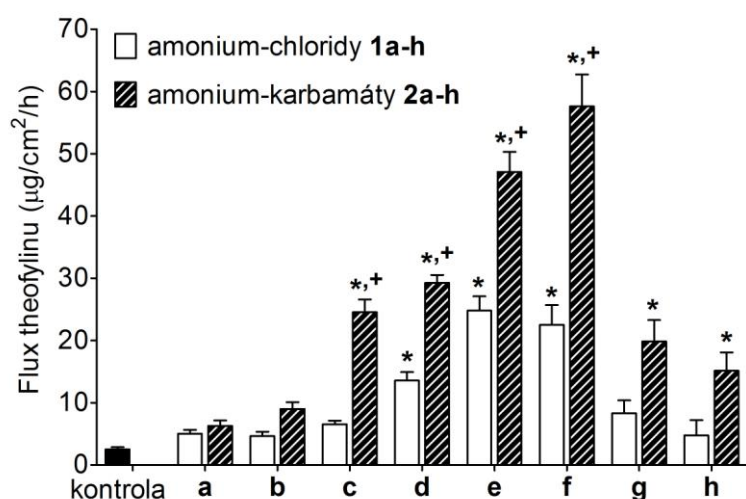
Obě skupiny látek (tj. amonium-chloridy **1** a amonium-karbamáty **2**) byly navrženy jako série polohových izomerů stejného sumárního vzorce lišících se vzdáleností esterové skupiny od dusíkového atomu. Zároveň každému jednořetězcovému amonium-chloridu **1** odpovídá dvouřetězcový amonium-karbamát **2**. Výsledky dosažených fluxů a vypočítaných akceleračních poměrů pro léčivo theofylin jsou shrnuty v Tab. 4.

Zvonovitá závislost mezi pozicí esterové skupiny v molekule a urychlovací aktivitou u obou sérií připravených analog T12 je dobře patrná na Obr. 47. Sloučeniny

1a-c a **2a-b**, které mají esterovou skupinu nejbližše dusíkovému atomu a mají nejdelší hydrofobní řetězec, byly neaktivní. „Posunem“ esterové skupiny směrem ke konci řetězce urychlovací schopnost látek roste a u sloučenin **e-f** se 6- a 7-uhlíkatým spojovacím řetězcem a decylovým a undecylovým hydrofobním řetězcem dosahuje svého maxima. Dalším prodlužováním spojovacího řetězce aktivita rapidně klesá.

Tab. 4. Aktivita amonium-chloridů **1a-h** a odpovídajících amonium-karbamátů **2a-h**. Data v tabulce jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu J_{TH} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a akceleračního poměru (AP). 1 – amonium-chloridy, 2 – amonium-karbamáty, SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti odpovídajícímu amonium-chloridu ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 5 až 20.

látka	$J_{TH} \pm \text{SEM}$		AP	
	1	2	1	2
kontrola	2,6±1,6		-	
a	5,0±1,5	6,3±1,6	1,9	2,4
b	4,7±1,6	9,0±2,9	1,8	3,5
c	6,6±1,2	24,6±6,0* ⁺	2,5	9,5*
d	13,6±5,0*	26,9±6,2* ⁺	5,2*	10,3*
e	23,7±9,7*	44,7±11,4* ⁺	9,1*	17,2*
f	20,0±11,8*	51,0±19,5* ⁺	7,7*	19,6*
g	5,2±4,2	12,7±11,1*	2,0	4,9*
h	2,6±3,3	11,8±7,0*	1,0	4,5*



Obr. 47. *In vitro* urychlovací aktivity amonium-chloridů **1a-h** a odpovídajících amonium-karbamátů **2a-h**. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu±SEM (standardní chyba), * znamená statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti odpovídajícímu amonium-chloridu ($p < 0,5$), počet opakování permeací byl 5 až 20.

Důvod pro tak velké rozdíly v aktivitách mezi těmito izomerními sloučeninami není dosud znám. Z literatury však víme, že z hlediska urychlit prostup látky přes kůži se délka hydrofobního řetězce 10-12 uhlíků u amfifilních akcelerantů považuje za ideální.^{178,179} To by mohlo být nejpravděpodobnějším vysvětlením pro tak vysoké aktivity izomerů **1d-f** a **2d-f** majících ve svých molekulách 10- až 12-uhlíkatý hydrofobní řetězec. Molekula takového akcelerantu má zřejmě polární hlavu umístěnou v polární oblasti mezibuněčných lipidových lamel SC a hydrofobní řetězec (řetězce) je (jsou) v hydrofobní oblasti těchto membrán. Tyto 10- až 12-uhlíkaté řetězce jsou přibližně poloviční délky než je běžná délka acylového řetězce ceramidů či mastných kyselin fyziologicky přítomných ve SC, což způsobí porušení uspořádání lipidů ve SC a propustnost kůže se pro endogenní látky podstatně zvýší.²⁷

Na základě dosažených vysokých aktivit látek **1d-f** a **2d-f** bychom mohli vyslovit hypotézu, že esterová skupina je stejně jako amoniiová sůl ve skutečnosti umístěná v polární oblasti lipidových lamel SC. Pokud bychom dále uvažovali, že je řetězec dostatečně flexibilní, tak by mohly obě skupiny být umístěny blízko sebe. Při studiu látek typu amonium-karbamátů (transkarbamů) byla autory navržena tvorba intramolekulární vodíkové vazby mezi esterovým karbonylem a N-H skupinou.^{49,50} Vzniká tedy „cyklická polární hlava“, která je strukturně velmi podobná Azonu, což je výborný permeační akcelerant s dodecylovým hydrofobním řetězcem v poloze 1 sedmičlenného azepan-2-onového kruhu.^{100,180} Toto seskupení by bránilo těsnému uspořádání hydrofobních řetězců ceramidů a mastných kyselin a byla by tak narušena fyziologická architektura SC. Výsledkem by pak byla větší propustnost SC pro léčiva. Tato hypotéza je v souladu s dřívější domněnkou, že spojovací řetězec musí být flexibilní. Dále ji potvrzuje naše předchozí studie, kde byla zjištěna nízká urychlovací aktivita derivátů kyseliny tranexamové.⁴⁸

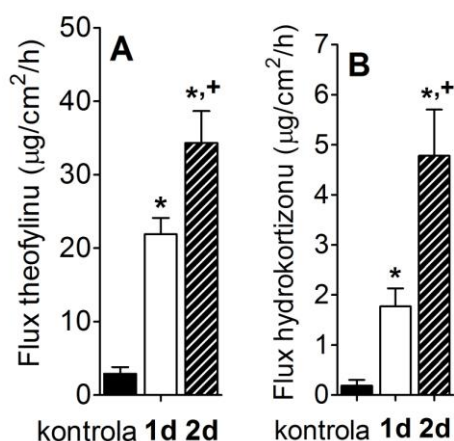
6.2.2.2. Aktivita amonium-chloridů a amonium-karbamátů

Dalším úkolem při studiu polohových izomerů stejného sumárního vzorce, odvozených od předlohy molekuly Transkarbamu 12, bylo srovnání aktivit jednořetězcových amonium-chloridů **1** s odpovídajícími dvouřetězcovými amonium-karbamáty **2** (Obr. 47.). Podobný experiment již byl v minulosti prováděn. Jednalo se o porovnání aktivity Transkarbamu 12 (**2d**) a odpovídajícího aminoesteru (volné báze, nikoliv amonné soli). Autoři v práci uvádí, že volný aminoester nevykázal žádnou aktivitu.⁴⁴

Proto byly velmi zajímavé studie vlivu T12 na transdermální podání adefoviru.⁴⁷ Nejvyšší urychlovací schopnosti bylo v tomto případě dosaženo při pH 4. Vzhledem k tomu že víme, že při pH 4 donorového vzorku může být T12 (**2d**) přítomen pouze

ve formě protonizovaného DDEAC (**1d**), musí tedy i látka **1d** mít vlastní urychlovací aktivitu. Rozhodli jsme se provést přímé srovnání urychlovací schopnosti protonizovaného DDEAC (**1d**) a T12 (**2d**), resp. celé série připravených analog T12 a osvětlit tak rozdíly ve zjištěných aktivitách.

Na Obr. 47. je patrná vyšší akcelerační účinnost u amonium-karbamátů **2** v porovnání s odpovídajícími amonium-chloridy **1**. Nicméně i amonium-chloridy **1d-f** v našem hodnocení dosáhly významných aktivit. Abychom v donorových vzorcích látek **1** vyloučili jejich případnou reakci se vzdušným oxidem uhličitým a tím tedy případnou tvorbu amonium-karbamátů **2**, byly všechny vzorky připraveny pod dusíkovou atmosférou (i donorový kompartment Franzových cel byl nasycen dusíkem). Na základě námi získaných výsledků můžeme tedy považovat amoniiovou sůl vzniklou rozpadem T12 v kyselém prostředí SC za další aktivní formu tohoto akceleraantu. Především neúčinnost volného báze lze tedy pravděpodobně vysvětlit intramolekulární aminolýzou esteru (díky přítomné volné primární aminoskupině) za vzniku kaprolaktamu a *n*-dodekanolu.



Obr. 48. *In vitro* urychlovací aktivita T12 (**1d**) a protonizovaného DDEAC (**2d**) pro theofylin (A) a hydrokortizon (B) při pH 7,0. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu léčiva±SEM (standardní chyba), * znamená statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti odpovídajícímu amonium-chloridu ($p < 0,5$), počet opakování permeací byl 5 až 14.

K vyloučení možnosti, že za vyšší aktivitu amonium-karbamátů **2** v porovnání s amonium-chloridy **1** může rozdílné pH donorového vzorku, bylo provedeno hodnocení při pH 7,0. Abychom dále vyloučili, že tyto výsledky platí pouze pro theofylin, použili jsme další modelové léčivo hydrokortizon (Obr. 48.). Výsledky ukazují, že amonium-chloridy **1** mají opravdu vlastní urychlovací schopnost, ale urychlovacích aktivit odpovídajících karbamátů **2** nedosahují. Proto tedy lze říci, že karbamátová polární hlava akceleraantu je zodpovědná za část aktivity amonium-karbamátů **2** a část aktivity

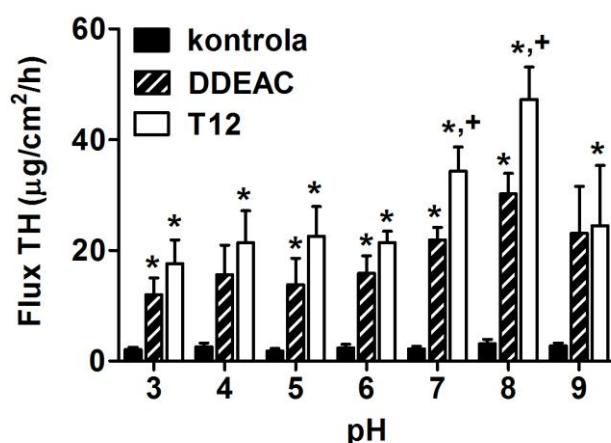
je spojená s vlastní účinností amonium-chloridu **1** uvolňovaného z karbamátu v mírně kyselém prostředí SC.

6.2.3. Vliv pH na aktivitu akceleraantu

Výsledky permeace hydrokortizonu a theofylinu při pH 7,0 nás přiměly detailněji studovat závislost urychlovací schopnosti T12 a DDEAC na pH. Stanovovali jsme aktivitu T12 a DDEAC při pH 3 až 9 s dvěma modelovými léčivy: theofylinem (Tab. 5.) a hydrokortizonem (Tab. 6.).

Tab. 5. Aktivita T12 a DDEAC při pH 3 až 9. Data v tabulce jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu J_{TH} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a akceleračního poměru (AP). SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti DDEAC ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 10 až 14.

pH	$J_{TH} \pm \text{SEM}$			AP	
	kontrola	DDEAC	T12	DDEAC	T12
3	2,1±0,4	12,0±3,0*	17,6±4,3*	5,7*	8,4*
4	2,6±0,7	15,6±5,3	21,4±5,8*	6,0	8,2*
5	1,8±0,5	13,8±4,7*	22,6±5,4*	7,7*	12,6*
6	2,4±0,7	15,9±3,2*	21,4±2,1*	6,6*	8,9*
7	2,2±0,5	21,9±2,2*	34,3±4,4* ⁺	10,0*	15,6*
8	3,1±0,8	30,2±3,7*	47,3±5,8* ⁺	9,7*	15,3*
9	2,7±0,6	23,1±8,5	24,5±10,9*	8,6	9,1*

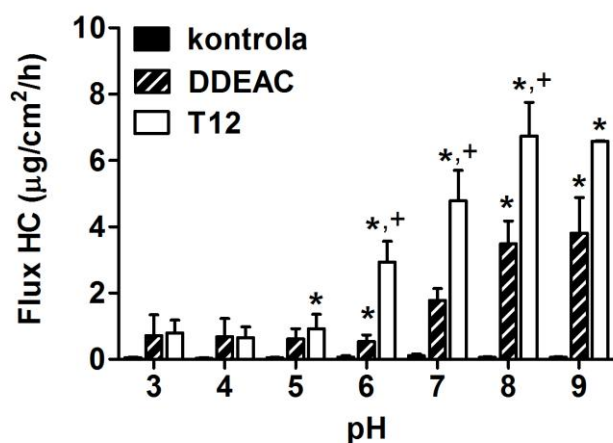


Obr. 49. *In vitro* urychlovací schopnost T12 a DDEAC při pH 3 až 9. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu J_{TH} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti DDEAC ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 10 až 14.

V kyselém prostředí (pH 3 až 6) je schopnost urychlit prostup prvního modelového léčiva theofylinu přes kůži u obou permeačních akceleračních poměrů porovnatelná. Rozdíl pozorujeme v pH neutrálním a mírně alkalickém (pH 7 a 8), kde je aktivita T12 oproti aktivitě DDEAC statisticky významně vyšší a dosahuje maxima (ER = 15). V alkalickém prostředí (pH 9) aktivita T12 klesla a nelišila se od aktivity DDEAC (Obr. 49.).

Tab. 6. Aktivita T12 a DDEAC při pH 3 až 9. Data v tabulce jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu hydrokortizonu J_{HC} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a akceleračního poměru (AP). SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti DDEAC ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 8 až 12.

pH	$J_{HC} \pm \text{SEM}$			AP	
	kontrola	DDEAC	T12	DDEAC	T12
3	0,05±0,02	0,72±0,62	0,80±0,38	14,4	16,0
4	0,03±0,02	0,68±0,55	0,65±0,33	22,7	21,7
5	0,04±0,02	0,61±0,31	0,92±0,43*	15,3	23,0
6	0,07±0,04	0,54±0,19*	2,93±0,63* ⁺	7,7*	41,9*
7	0,11±0,06	1,77±0,36	4,78±0,92* ⁺	16,1	43,5*
8	0,06±0,02	3,48±0,69*	6,74±1,02* ⁺	58,0*	112,3*
9	0,06±0,02	3,81±1,08*	6,58±0,02*	63,5*	109,7*

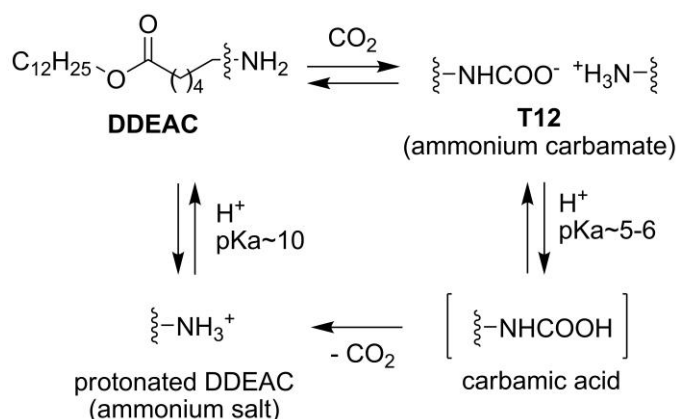


Obr. 50. *In vitro* urychlovací schopnost T12 a DDEAC při pH 3 až 9. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu hydrokortizonu J_{HC} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti DDEAC ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 8 až 12.

Druhým modelovým léčivem byl hydrokortizon. U tohoto permeantu jsme pozorovali výraznější závislost aktivity akceleračního poměru na pH donorového vzorku (Obr. 50). Zatímco v silně kyselém prostředí (pH 3 až 5) bylo urychlení prostupu léčiva malé, tak s rostoucím pH rostla také urychlovací schopnost T12 a maxima bylo dosaženo

při pH 8 (ER = 112). Aktivita DDEAC byla podstatně nižší, ovšem vykázala podobný trend jako aktivita T12.

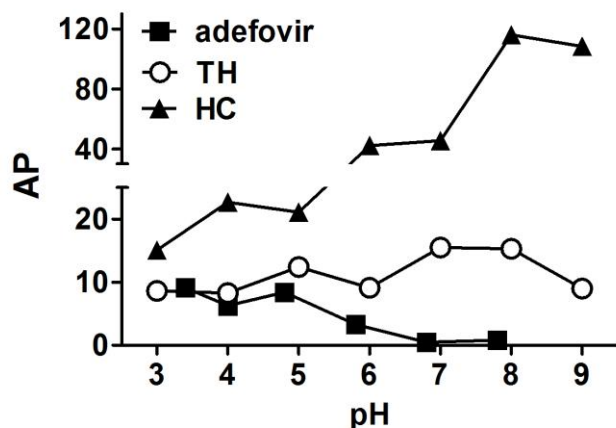
Z výsledků permeací theofylinu i hydrokortisonu plyne, že T12 je účinnějším akcelerantem než DDEAC při pH neutrálním a slabě bazickém, kdežto při pH kyselém se jejich aktivita neliší. To je ve shodě se stabilitou karbamátového aniontu. Jak je schematicky naznačeno na Obr. 51, protonizace karbamátu v kyselém prostředí vede ke vzniku kyseliny karbámové, která se okamžitě rozkládá za vzniku CO₂ a dvou molekul protonizovaného DDEAC. Je tedy logické, že v donorových vzorcích o kyselém pH připravených jak s DDEAC, tak s T12, byl přítomen pouze protonizovaný DDEAC a jejich aktivita se tudíž neliší. Se stabilitou karbamátu se shoduje také pozorovaný pokles aktivity při pH 9. To je dáno tím, že rovnováha mezi karbamátem a hydrogenuhličitanem, která se vždy vytváří ve vodných roztocích karbamátů, je při vyšším pH posunuta ve prospěch hydrogenuhličitanu.



Obr. 51. Rozklad T12 v kyselém prostředí.

Tyto výsledky dále potvrdily, že DDEAC, respektive jeho protonizovaná forma, je také aktivním akcelerantem, jak bylo navrženo v předchozích pokusech.¹⁸¹ Protože tento akcelerant vzniká z T12 ve stratum corneum, potvrdili jsme, že účinek T12 je skutečně duální.

Výsledky této práce a výsledky předchozí studie zabývající se permeací adefoviru⁴⁷ dovolují zajímavé srovnání vlivu T12 na permeaci třech modelových léčiv s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Jak bylo řečeno dříve, T12 urychluje průnik vysoce hydrofilního adefoviru pouze v kyselém prostředí, zatímco jeho aktivita při vyšších hodnotách pH je silně potlačena. Opačný trend byl nalezen v této práci v případě lipofilního hydrokortisonu, urychlovací schopnost roste se stoupajícím pH. A při permeaci theofylinu je aktivita T12 relativně nezávislá na pH donorového vzorku, s tím že při pH neutrálním se mírně zvyšuje (Obr. 52).



Obr. 52. Srovnání urychlovací schopnosti T12 pro tři různá modelová léčiva: adefovir, theofylin (TH) a hydrokortizon (HC) při pH 3 až 9. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty akceleračního poměru (AP).

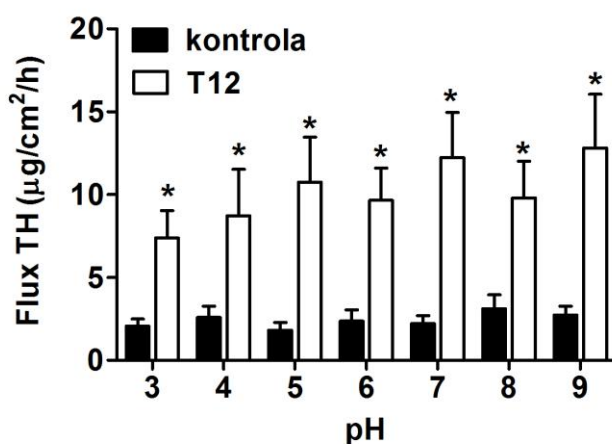
Jinými slovy, schopnost Transkarbamu 12 usnadňovat permeaci léčiv různých fyzikálně-chemických vlastností je relativně podobná v kyselém prostředí, zatímco v prostředí neutrálním či mírně alkalickém se významně liší. Možná příčina tohoto rozdílu byla zkoumána v následujících pokusech.

6.2.4. *Pretreatment experiment a změny v dermálních elektrických impedancích*

Pretreatment experiment a hodnocení změn v dermálních elektrických impedancích bylo provedeno se snahou objasnit, zda pozorovaný rozdíl v aktivitě T12 při permeaci léčiv odlišných fyzikálně-chemických vlastností souvisí pouze s interakcí léčiva a akceleraantu v donorovém vzorku nebo zda je T12 schopný různě ovlivnit různé cesty léčiva přes SC. Vliv 2 h pretreatment aplikace T12 na permeaci theofylinu a hydrokortizonu a je shrnut v Tab. 7. resp. v Tab. 8.

Tab. 7. Pretreatment experiment T12 a DDEAC při pH 3 až 9. Data v tabulce jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu J_{TH} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a akceleračního poměru (AP). SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), + značí statisticky významný rozdíl oproti DDEAC ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 8 až 12.

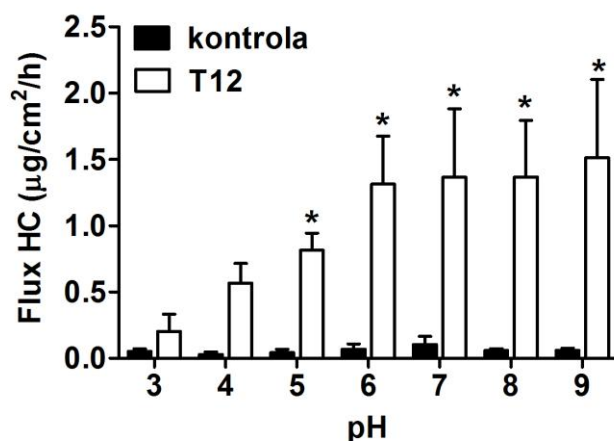
pH	$J_{TH} \pm \text{SEM}$			AP	
	<i>kontrola</i>	<i>DDEAC</i>	<i>T12</i>	<i>DDEAC</i>	<i>T12</i>
3	2,1±0,4	2,4±0,6	7,4±1,7* ⁺	1,1	3,5*
4	2,6±0,7	3,4±0,8	8,7±2,8*	1,3	3,3*
5	1,8±0,5	3,7±0,8	10,7±2,7* ⁺	2,1	5,9*
6	2,4±0,7	5,2±1,2	9,7±2,0* ⁺	2,2	4,0*
7	2,2±0,5	4,9±1,1	12,2±2,7* ⁺	2,2	5,5*
8	3,1±0,8	5,6±1,9	9,8±2,2*	1,8	3,2*
9	2,7±0,6	16,3±1,7*	12,8±3,2*	6,0*	4,7*



Obr. 53. Pretreatment experiment T12 při pH 3 až 9. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu theofylinu \pm SEM (standardní chyba). * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 6 až 12.

Tab. 8. Pretreatment experiment T12 a DDEAC při pH 3 až 9. Data v tabulce jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu hydrokortizonu J_{HC} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a akceleračního poměru (AP). SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 6 až 9.

pH	$J_{HC} \pm \text{SEM}$			AP	
	<i>kontrola</i>	<i>DDEAC</i>	<i>T12</i>	<i>DDEAC</i>	<i>T12</i>
3	0,05±0,02	0,14±0,08	0,59±0,29*	2,8	4,2*
4	0,03±0,02	0,40±0,13	0,94±0,47*	13,3	2,4*
5	0,04±0,02	0,53±0,16*	0,71±0,18*	13,3*	1,3*
6	0,07±0,04	0,90±0,31	1,18±0,39*	12,9	1,31*
7	0,11±0,06	0,94±0,40	0,75±0,18	8,6	0,8
8	0,06±0,02	0,93±0,35	1,34±0,33*	15,5	22,3*
9	0,06±0,02	1,15±0,49	2,33±0,29*	19,2	38,8*



Obr. 54. Pretreatment experiment T12 při pH 3 až 9. Data v grafu jsou uvedena ve formě hodnoty fluxu hydrokortizonu \pm SEM (standardní chyba). * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 6 až 12.

Po dvouhodinové expozici kůže akceleračním resp. kontrolním vzorkem o daném pH a po jejich šetrném odstranění z kožního povrchu, bylo aplikováno léčivo adjustované na stejné pH ovšem bez akceleračního. I přesto, že fluxy obou léčiv jsou v porovnání s klasickým permeačním experimentem nižší, vykazují tyto výsledky pro obě léčiva stejný trend. Efekt T12 je při permeaci theofylinu (Obr. 53) relativně nezávislý na pH, zatímco při permeaci hydrokortizonu roste urychlovací schopnost akceleračního s rostoucím pH (Obr. 54.).

Tyto výsledky naznačují, že pozorované rozdíly v urychlovací aktivitě T12 jsou opravdu závislé na jeho přímém ovlivnění různých permeačních cest přes kožní bariéru. Mitragotri například popisuje čtyři odlišné permeační cesty skrz SC: difúze přes volné prostory ("kapsy") vznikající pohybem lipidových řetězců v lamelách SC, laterální difúze

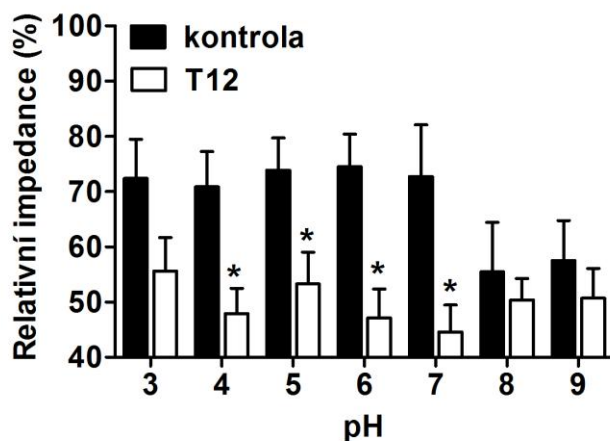
podél těchto lipidových lamel, difúze skrz póry a difúze mazovými žlázkami a vlasovými folikuly.¹⁸² Theofylin jako malá molekula (180 g.mol^{-1}) s vyváženou lipofilitou ($\log P \sim 0$) bude pravděpodobně upřednostňovat difúzi skrz přechodné volné prostory v lipidech SC. Hydrokortizon je molekula přibližně dvakrát větší než theofylin (362 g.mol^{-1}) a také mnohem lipofilnější ($\log P \sim 1,6$). Proto by pravděpodobně prostupoval přes SC kombinací difúze volnými prostory v lipidech a laterální difúze. Adefovir je hydrofilní léčivo ($\log P \sim -2,0$) se středně velkou molekulou (273 g.mol^{-1}); bude tudíž permeovat skrz SC vodními póry.

Na základě těchto dat a výsledků prezentovaných na Obr. 51 se můžeme domnívat, že první krok účinku T12, tedy účinek ammonium-karbamátu, spočívá v jeho interakci s lipidovými cestami přes SC, nikoliv s vodními póry. Druhý krok, tedy účinek DDEAC uvolněného po rozpadu karbamátu, je pak zřejmě kombinací vlivu na lipidové i vodní cesty a významně tak rozšiřuje účinek tohoto akcelarantu.

K potvrzení domněnky, že ammonium karbamát neovlivňuje permeabilitu vodními póry, byla před a po aplikaci akcelarantu změřena dermální elektrická impedance (při rozmezí pH 3 až 9) a v Tab. 9 je přehledně shrnuta ve formě relativních hodnot impedance tj. procentuálního poklesu impedance způsobeného účinkem T12, DDEAC resp. kontrolním vzorkem (při stejném pH).

Tab. 9. Výsledky hodnocení dermální elektrické impedance ve formě procentuálního poklesu kožního odporu, SEM – standardní chyba, * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování byl 14 až 16.

pH	% pokles \pm SEM		
	<i>kontrola</i>	<i>DDEAC</i>	<i>T12</i>
3	72,4 \pm 7,1	55,2 \pm 6,1	55,6 \pm 6,0
4	70,9 \pm 6,4	64,9 \pm 7,8	47,9 \pm 4,6*
5	73,9 \pm 5,9	61,3 \pm 4,3	53,3 \pm 5,7*
6	74,5 \pm 5,8	66,0 \pm 6,3	47,1 \pm 5,2*
7	72,7 \pm 9,4	64,9 \pm 4,7	44,6 \pm 4,9*
8	55,5 \pm 8,9	57,2 \pm 4,8	50,4 \pm 3,9
9	57,5 \pm 7,3	53,0 \pm 4,9	50,7 \pm 5,4



Obr. 55. Pretreatment experiment T12 - výsledky dermální elektrické impedance při pH 3 až 9. Data v grafu jsou uvedena ve formě relativních hodnot impedance \pm SEM (standardní chyba). * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,5$), počet opakování jednotlivých permeací byl 14 až 16.

Výsledky pokusu ukázaly, že aplikace T12 významně snížila dermální elektrickou impedanci pouze při pH 4-7, tedy při pH, kde v donorovém vzorku převažuje protonizovaný DDEAC nad karbamátem. V alkalickém prostředí sice došlo ke snížení impedance, ale to bylo způsobeno pouze vlivem pH, nikoliv T12 (Obr. 55.). Vzhledem k tomu, že impedance, která představuje poměrně efektivní, snadnou a neinvazivní metodu ke zjišťování neporušenosti kožní bariéry, vyjadřuje pohyb iontů skrz póry přes kožní bariéru, tyto výsledky potvrzují předchozí závěry o vlivu T12 na různé cesty léčiva přes SC.

Závěrem lze říci, že Transkarbam 12 usnadňuje prostup látek přes kožní bariéru duálním mechanismem a je schopen ovlivnit rozdílnými permeační cesty přes SC. Část jeho účinku je spojená s rozkladem karbamátové polární hlavy v SC tj. s uvolněním oxidu uhličitého či strukturálními změnami spojenými s touto reakcí. Druhá část jeho účinku je spojená s vlastní aktivitou protonovaného DDEAC, který vzniká z T12 v kyselém prostředí SC. Dále jsme zjistili, že T12 usnadňuje permeaci léčiv nejen cestou skrz lipidy SC, ale také vodními póry, a právě tato druhá cesta je spojována s aktivitou protonovaného DDEAC.

7. Závěr

Tato práce se zabývala problematikou chemických permeačních akceleračních látek. Byl studován vliv chemické struktury připravených potenciálních permeačních akceleračních látek na jejich schopnost urychlit průnik modelových léčiv přes prasečí kůži plné tloušťky *in vitro* u dvou chemicky odlišných skupin látek: u derivátů dikarboxylových kyselin a u Transkarbamu 12 a jeho analog.

Deriváty dikarboxylových kyselin

V rámci první části doktorské práce bylo navrženo, připraveno a hodnoceno 17 potenciálních permeačních akceleračních látek, jejichž strukturním základem byly dikarboxylové kyseliny: maleinová, fumarová, jantarová, (2*R*,3*R*)-vinná a *meso*-vinná. Konkrétně byly připraveny jejich didodecylestery, monododecylestery a dodecylmethylestery. U hydroxykyselin byly navíc syntetizovány deriváty, které měly hydroxylové skupiny maskovány jednak formou acetonidu a karbonátu. Struktura a čistota všech připravených sloučenin byla ověřena pomocí ¹H NMR, ¹³C NMR a IČ spektroskopie. Permeační experimenty byly prováděny *in vitro* přes prasečí kůži plné tloušťky za pomoci Franzovy difúzní cely s donorovými vehikuly různé polarity (H₂O, PG/H₂O – 6:4 a IPM). Modelovým léčivem byl theofylin.

Při studiu vztahů mezi chemickou strukturou látky a její schopností urychlit průnik léčiva přes kůži byly nalezeny tyto souvislosti: jednořetězcové amfifilní sloučeniny byly podstatně aktivnější než dvouřetězcové amfifilní akcelerační látky. Nejaktivnější látka celé série – monododecylester kyseliny maleinové tj. derivát s *cis*-dvojnou vazbou, v porovnání s příslušným *trans*- derivátem vykázal mnohem větší schopnost urychlit přestup theofylinu přes kůži. Aktivita látek s jednoduchou vazbou (derivátů kyseliny jantarové) je silně závislá na donorovém médiu. U diastereoizomerních sloučenin odvozených od kyselin (2*R*,3*R*)-vinné a *meso*-vinné nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v urychlovacích schopnostech.

Kompletní výsledky získané při řešení první části této práce byly prezentovány na jedné domácí a jedné zahraniční vědecké konferenci a byly publikovány: Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůsová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K. Dicarboxylic acid esters as transdermal permeation enhancers: effects of chain number and geometric isomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19(2), 344-347 (**viz příloha I.**)

Transkarbam 12 a jeho analoga

Transkarbam 12 (T12) je vysoce účinný permeační akcelerační přípravek připravený a popsán na našem pracovišti již dříve. Vzhledem k jeho výjimečným vlastnostem se vyplatí hledat vztahy mezi strukturou a účinkem a pátrat po mechanismu akceleračního účinku. Výchozí modelovou strukturou byla proto právě molekula T12. Celkově bylo připraveno 16 analog T12, z toho 10 jich nebylo v literatuře dosud popsáných. Obecně lze tyto látky klasifikovat jako polohové izomery stejného sumárního vzorce lišící se vzdáleností esterové skupiny a dusíkového atomu. Byly připraveny dvě odlišné skupiny těchto izomerů: dvouřetězcové amonium-karbamáty a jednořetězcové amonium-chloridy. Struktura a čistota všech připravených sloučenin byla ověřena pomocí IČ spektroskopie, CHN analýzy a v případě amonium-chloridů i ^1H NMR a ^{13}C NMR. Permeační experimenty byly prováděny *in vitro* přes prasečí kůži plné tloušťky za pomoci Franzovy difúzní cely. Modelovými léčivy byly theofylin a hydrokortizon.

Námi dosažené výsledky ukazují na to, že mechanismus účinku T12 resp. obecně transkarbamů by mohl být duální. Z předchozích studií víme,^{45,46} že část aktivity je spjata se solí karbámové kyseliny tj. se schopností uvolňovat oxid uhličitý, což jsme také potvrdili. V této práci bylo zjištěno, že touto reakcí vznikající amonium-chlorid má také vlastní urychlovací schopnost a podílí se tedy na celkovém akceleračním účinku T12. Současně bylo zjištěno, že aktivita těchto sloučenin je přímo závislá na poloze esterové skupiny v molekule.

Zajímavým zjištěním je, že při permeačních experimentech v širokém rozmezí pH je aktivita T12 pro léčiva rozdílných fyzikálně-chemických vlastností (theofylin a hydrokortizon) různá. Zatímco při kyselém pH se neliší, při pH neutrálním a slabě bazickém je statisticky významně odlišná. To by mohlo ukazovat na to, že různá léčiva preferují při transdermálním podání různé permeační cesty přes kůži. Tuto hypotézu podporují i výsledky hodnocení dermální elektrické impedance. Výsledky získané při řešení druhé části této doktorské práce byly prezentovány na pěti domácích a jedné zahraniční vědecké konferenci.

První část výsledků byla publikována: Novotný, M., Hrabálek, A., Janůsová, B., Novotný, J., Vávrová, K. Transkarbams as transdermal permeation enhancers; Effects of ester position and ammonium carbamate formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 9(1), 2726-2728 (**viz příloha II.**).

Druhá část výsledků byla zaslána k publikaci do zahraničního impaktovaného časopisu: Novotný, M., Klimentová, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action. *Under review.* (**viz příloha III.**)

8. Seznam zkratek

2P	pyrrolidin-2-on
AP	akcelerační poměr
DDAA	dodecylester <i>N,N</i> -dimethylglycinu
DDAIP	dodecylester <i>N,N</i> -dimethylalaninu
DDAK	dodecylester kyseliny <i>N,N</i> -dimethyl-6-aminohexanové
DDEAC	dodecylester kyseliny 6-aminohexanové
DDK	deriváty dikarboxylových kyselin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
FTIR	infračervená spektroskopie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IČ	infračervená spektroskopie
IPM	isopropylmyristát
J	flux
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidin-2-on
PBS	fosfátový pufr
PG	propylenglykol
RT	laboratorní teplota
SC	stratum corneum
T12	Transkarbam 12
TDD	transdermální podání léčiv (transdermal drug delivery)
TEA	triethylamin
TGA	termogravimetrická analýza
THF	tetrahydrofuran

9. Literatura

- ¹ Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šámalová, L.; Palát, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5381.
- ² Kanikkannan, N.; Kandimalla, K.; Lamba, S.S.; Singh, M. *Curr. Med. Chem.*, **2000**, *7*, 593-608.
- ³ Hrabálek, A.; Doležal, P.; Farsa, O.; Krebs, A.; Kroutil, A.; Roman, M.; Šklubalová, Z. U.S. 6,187,938 (2001).
- ⁴ Barry, B.W. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*; Marcel Dekker: New York, **1983**.
- ⁵ Guy, R.H.; Hadgraft, J. *Pharm. Int.*, **1985**, *6*, 112.
- ⁶ Kanikkannan, N. *Cur. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 593-608.
- ⁷ Prausnitz, M.R.; Mitragori, S.; Langer, R. *Nature Rev.*, **2004**, *3*, 115.
- ⁸ Barry, B.W. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, *14*, 101.
- ⁹ Odland, G.F. In *Biochemistry and physiology of the skin*; Goldsmith, L.A., Ed.; Oxford University Press: New York, **1983**; 3-63.
- ¹⁰ Menon, G.K. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, Suppl. 1, 3.
- ¹¹ Agache, P. In *Measuring the skin*; Humbert, P., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2004**.
- ¹² http://www.genome.gov/Pages/Research/DIR/GenomicsinAction/ga_segre_skin2.htm
- ¹³ Barry, B.W.; Williams, A.C. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J.; Boylan, J.C., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1995**, 449-493.
- ¹⁴ Cleary, G.W. In *Medical Applications of Controlled Release*; Langer, R.S.; Wise D.L., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **1984**, vol. I, 203-245.
- ¹⁵ http://www.scf-online.com/english/37_e/images37_e/Skinpenetration37_03_large.jpg
- ¹⁶ Potts R.O.; Guy, R.H. *Pharm. Res.*, **1995**, *12*, 1628.
- ¹⁷ Guy R.H.; Hadgraft, J. *Pharm. Res.*, **1988**, *5*, 753.
- ¹⁸ Pugh, W.J.; Roberts, M.S.; Hadgraft, J. *Int. J. Pharm.*, **1996**, *138*, 149.
- ¹⁹ Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šklubalová, Z.; Farsa, O.; Krebs, A. *Chem. Listy*, **1999**, *93*, 107-119.
- ²⁰ Williams, A.C.; Barry, B.W. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, *56*, 603-618.
- ²¹ Chattaraj, S.C.; Walker, R.B. In *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E.W.; Maibach, H.I., Eds.; Boca Raton, Florida, **1995**; 5-20.
- ²² Barry, B.W. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **1998**, *10*, 281.
- ²³ Goodman, M.; Barry, B.W. *Int. J. Pharm.*, **1989**, *57*, 29.
- ²⁴ Barry, B.W. *J. Control. Release*, **1991**, *15*, 237.
- ²⁵ Barry, B.W. In *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals, and Applications*; Bronaugh, R.L.; Maibach, H.I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **1991**; 165-185.
- ²⁶ Moser, K.; Kriwet, K.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2001**, *52*, 103.
- ²⁷ Suhonen, T.M.; Bouwstra, J.A.; Urtti, A. *J. Controll. Release*, **1999**, *59*, 149.
- ²⁸ Fix, J. A.; Pogony, S. A. EP 85400771
- ²⁹ Fleeker C.; Wong O.; Rytting J. H. *Pharm. Res.*, **1989**, *6*, 443.
- ³⁰ Wong, O.; Huntington, J.; Nishihata, T.; Rytting, J.H. *Pharm. Res.*, **1989**, *6*, 286.
- ³¹ Wong, O.; Nishihata, T.; Rytting, J.H. US 4,980,378 (1990).
- ³² Wong, O.; Nishihata, T. US 5,082,866 (1992).
- ³³ Hirvonen, J.; Sutinen, R.; Paronen, P.; Urtti, A. *Int. J. Pharm.*, **1993**, *99*, 259.
- ³⁴ Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Holas, T.; Zbytovská, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2351.

-
- ³⁵ Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Sámalová, L.; Palát, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 5381.
- ³⁶ Turunen, T.M.; Büyüktimkin, S.; Büyüktimkin, N.; Urtti, A.; Paronen, P.; Rytting, J.H. *Int. J. Pharm.*, **1993**, *92*, 89.
- ³⁷ Büyüktimkin, S.; Büyüktimkin, N.; Rytting, J.H. *Pharm Res.*, **1993**, *10*, 1632.
- ³⁸ Büyüktimkin, S.; Büyüktimkin, N.; Rytting, J.H. *Int. J. Pharm.*, **1995**, *118*, 113.
- ³⁹ Pfister, W.; Li, M.; Frank, D. *AAPS J.*, **2006**, *8*.
- ⁴⁰ Novotný, J.; Kovaříková, P.; Novotný, M.; Janůšová, B.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. *Pharm. Res.*, **2009**, *26*, 811-821.
- ⁴¹ Doležal, P.; Hrabálek, A.; Semecky, V. *Pharm. Res.*, **1993**, *10*, 1015.
- ⁴² Hrabálek, A.; Doležal, P.; Roman, M.; Macháček, M.; Sklupalová, Z. *Pharmazie*, **1994**, *49*, 325.
- ⁴³ Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P. *Arch. Dermatol. Res.*, **2002**, *294*, 383-385.
- ⁴⁴ Hrabálek, A.; Doležal, P.; Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J.; Novotný, J. *Pharm. Res.*, **2006**, *23*, 912-918.
- ⁴⁵ Holas, T.; Zbytovská, J.; Vávrová, K.; Berka, P.; Mádlová, M.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. *Thermochim. Acta*, **2006**, *441*, 116-123.
- ⁴⁶ Klimentová, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.; Holas, T.; Kroutil, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 1981-1984.
- ⁴⁷ Vávrová, K.; Lorencová, K.; Klimentová, J.; Holý, A.; Hrabálek, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *69*, 597-604.
- ⁴⁸ Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Holas, T.; Klimentová, J. *J. Control. Release*, **2005**, *104*, 41-49.
- ⁴⁹ Holas, T.; Vávrová, K.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 2896-2903.
- ⁵⁰ Holas, T.; Vávrová, K.; Šíma, M.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 7671-7680.
- ⁵¹ Hrabálek, A.; Vávrová, K.; Doležal, P.; Macháček, M. *J. Pharm. Sci.*, **2005**, *94*, 1494-1499.
- ⁵² Klimentová, J.; Kosák, P.; Vávrová, K.; Holas, T.; Novotný, J.; Hrabálek, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1712-1715.
- ⁵³ Klimentová, J.; Kosák, P.; Vávrová, K.; Holas, T.; Hrabálek, A. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 7681-7687.
- ⁵⁴ Farsa, O.: Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2000.
- ⁵⁵ Biotest s.r.o.: DDAK, Skin Irritation Study in Rabbits (26/09/C; 2010; according OECD 404); DDAK, Skin Sensitization Test in Guinea Pig (27/09/C; 2010; according OECD 406); DDAK, Acute Dermal Toxicity, Limit Test in Rat (25/09/C; 2010); DDAK, Maximum, Tolerated Dose (MTD) Study after Single Oral Administration in Rats (28/09/C; 2010)
- ⁵⁶ Hrabálek, A.; Doležal, P.; Roman, M.; Šklupalová, Z.; Macháček, M. *Sborník příspěvků, 49. Sjezd chemických společností*, **1995**, *3*, 287.
- ⁵⁷ Hadgraft, J. *Pharm. Intl.*, **1984**, *5*, 325.
- ⁵⁸ Stoughton, R. B. US 3,932,653 (**1976**).
- ⁵⁹ Sasaki, H.; Kojima, M.; Mori, Y.; Nakamura, J.; Shibasaki, J. *J. Pharm. Sci.*, **1991**, *80*, 533.
- ⁶⁰ Barry, B.W.; Bennet, S.L. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1987**, *39*, 535-546.
- ⁶¹ Bennett, S. L.; Barry, B. W.; Woodford, R. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1985**, *37*, 298-304.
- ⁶² Resh, W.; Stoughton, R. B. *Arch. Dermatol.*, **1976**, *112*, 182.
- ⁶³ Příborský, J.; Takayama, K.; Nagai, T.; Waitzová, D.; Elis, J. *Drug. Des. Deliv.*, **1987**, *2*, 91-7.
- ⁶⁴ Seki, T.; Toeda, CH.; Kawaguchi, T.; Juni, K.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y. *Chem. Pharm. Bul.*, **1990**, *38*, 3086.
- ⁶⁵ Park, E.S.; Chang, S.J.; Rhee, Y.S.; Chi, S.C. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2001**, *27*, 975-980.
- ⁶⁶ Akhter, S.A.; Barry, B. W. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1985**, *37*, 27-37.
- ⁶⁷ Nair, A.; Reddy, C.; Jacob, S.; *Skin Res. Technol.*, **2009**, *15*, 187-94.

-
- ⁶⁸ Kakubari, I.; Nakamura, N.; Takayasu, T.; Yamauchi, H.; Takayama, S.; Takayama, K. *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, *29*, 146-9.
- ⁶⁹ Zhang, J.Y.; Fang, L.; Tan, Z.; Wu, J.; He, Z.G. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2009**, *35*, 663-670.
- ⁷⁰ Ren, C.; Fang, L.; Li, T.; Wang, M.; Zhao, L.; He, Z. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *350*, 43-47.
- ⁷¹ Limpingsa, E.; Umprayn, K. *AAPS PharmSciTech.*, **2008**, *9*, 464-470.
- ⁷² Babu, R.J.; Dhanasekaran, M.; Vaithiyalingam, S.R.; Singh, P.N.; Pandit, J.K. *Life Sci.*, **2008**, *30*, 273-278.
- ⁷³ Babu, R.J.; Pandit, J.K. *Drug Deliv.*, **2005**, *12*, 165-169.
- ⁷⁴ Shishu; Aggarwal, N. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *326*, 20-24.
- ⁷⁵ Femenía-Font, A.; Padula, C.; Marra, F.; Balaguer-Fernández, C.; Merino, V.; López-Castellano, A.; Nicoli, S.; Santi, P. *J. Pharm. Sci.*, **2006**, *95*, 1561-1569.
- ⁷⁶ Lee, P.J.; Ahmad, N.; Langer, R.; Mitragotri, S.; Prasad Shastri, V. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *308*, 33-39.
- ⁷⁷ Irwin, W.J.; Sanderson, F. D.; Po, A.; Li, Wan. *Int. J. Pharm.*, **1990**, *66*, 243.
- ⁷⁸ Sasaki, H.; Kojima, M.; Nakamura, J.; Shibasaki, J. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1990**, *42*, 196.
- ⁷⁹ Rachakonda, V.K.; Yerramsetty, K.M.; Madihally, S.V.; Robinson, R.L., Jr; Gasem, K.A. *Pharm. Res.*, **2008**, *25*, 2697-2704.
- ⁸⁰ Michniak, B. B.; Player, M. R.; Sowell, J. W., Sr. *J. Pharm. Sci.*, **1996**, *85*, 150-154.
- ⁸¹ Lambert, W. J.; Kudla, R. J.; Holland, J. M.; Curry, J. T. *Int. J. Pharm.*, **1991**, *95*, 181-192.
- ⁸² Aoyagi, T.; Yamamura, M.; Matsui K.; Nagase Y. *Drug. Des. Discovery*, **1991**, *8*, 37.
- ⁸³ JP 06,72,879; Chem. Abstr. 720, 331130y, **1994**.
- ⁸⁴ US 4,879,275; Chem. Abstr. 773, 103404r, **1990**.
- ⁸⁵ Santus, G. C.; Baker, R. W. *J. Controll. Rel.*, **1993**, *25*, 1-20.
- ⁸⁶ Stoughton, R. B. In *Progress in Biological Sciences in Relation to Dermatology*; Rook A.; Champion R. H., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, **1984**, 263.
- ⁸⁷ Sasaki, H.; Kojima, M.; Nakamura, J.; Shibasaki, J. *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, *38*, 2308 – 2310.
- ⁸⁸ Okamoto, H.; Hashida, M.; Sezaki, H. *J. Pharm. Sci.*, **1988**, *77*, 418-424.
- ⁸⁹ Yano, T.; Higo, N.; Fukuda, K.; Tsuji, M.; Noda, K.; Otagiri, Y. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1993**, *45*, 775.
- ⁹⁰ US 4,973,708; In Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C.; Baker R. W. J. *Controlled Release*, **1993**, *25*, 1.
- ⁹¹ Godavarthy, S.S.; Yerramsetty, K.M.; Rachakonda, V.K.; Neely, B.J.; Madihally, S.V.; Robinson, R.L., Jr; Gasem, K.A. *J. Pharm. Sci.*, **2009**, *98*, 4085-4099.
- ⁹² Quan, D.Y.; Higuchi, R. I.; Takayama, K.; Higashiyama, K.; Nagai, T. *Drug Des. Deliv.*, **1990**, *6*, 61-71.
- ⁹³ Philips, C. A.; Michniak, B. B. *J. Pharm. Sci.*, **1995**, *84*, 1427-1433.
- ⁹⁴ Michniak, B. B.; Player, M. R.; Sowell, J. W. Sr. *J. Pharm. Sci.*, **1996**, *85*, 150-154.
- ⁹⁵ Ito, Y.; Ogiso, T.; Iwaki, M. *J. Pharmacobiodyn.*, **1988**, *11*, 749-757.
- ⁹⁶ Zhou, J. X.; Dai, Z. Q.; Yu, Y. G.; Xu, J. Y.; Yuan, X. J.; Shen X. I. *Chung Kuo Li Hsueh Pao*, **1989**, *10*, 447-449.
- ⁹⁷ Engblom J. *Chem. Phys. Lipids*, **1996**, *84*, 155-164.
- ⁹⁸ Kai, T.; Nakazono, M.; Kurosaki, Y.; Nakayama, T.; Kimura, T. *Biol. Pharm. Bull.*, **1993**, *16*, 801-805.
- ⁹⁹ Turunen, T. M.; Urtti, A.; Paronen, P.; Audus, K. L.; Rytting, J. H. *Pharm. Res.*, **1994**, *11*, 288-294.
- ¹⁰⁰ Sugibayashi, K.; Nakayama, S.; Seki, T.; Hosoya, K.; Morimoto, Y. *J. Pharm. Sci.*, **1992**, *81*, 58-64.
- ¹⁰¹ Boddé, H. E.; Ponc, M.; Ijzerman, A. P.; Hoogstraate, A. J.; Salomons, M. A. I.; Bouwstra, J. A. In *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*; Walters, K. A.; Hadgraft, J. eds., M. Decker: New York, **1993**, 198.
- ¹⁰² Baker, E. J.; Hadgraft, J. *Pharm. Res.*, **1995**, *72*, 993.
- ¹⁰³ Hou, S. Y. E.; Flynn, G. L. *J. Pharm. Sci.*, **1997**, *86*, 85.
- ¹⁰⁴ Stoughton, R. R.; McClure, W. O. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1983**, *9*, 725-744.

-
- ¹⁰⁵ Goodman, M.; Barry, B. W. *J. Invest. Dermatol.*, **1988**, *91*, 323-327.
- ¹⁰⁶ Ghosh, T. K.; Bagherian, A. *Pharm. Dev. Technol.*, **1996**, *1*, 285-291.
- ¹⁰⁷ Sugibayashi, K.; Sakanoue, C.; Morimoto, Y. *Sel. Cancer. Ther.*, **1989**, *5*, 119-128.
- ¹⁰⁸ Ogiso, T.; Iwaki, M.; Tsuji, S. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, *39*, 1609-1611.
- ¹⁰⁹ Kai, T.; Nakazono, M.; Kurosaki, Y.; Nakayama, T.; Kimura, T. *Biol. Pharm. Bull.*, **1993**, *16*, 801-805.
- ¹¹⁰ Agrawala, P.; Ritschel, W. A. *J. Pharm. Sci.*, **1988**, *77*, 776-778.
- ¹¹¹ Seki, T.; Sugibayashi, K.; Juni, K.; Morimoto, Y. *Drug. Des. Deliv.*, **1989**, *4*, 69-75.
- ¹¹² Ruan, L. P.; Zheng, J. M. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **1991**, *26*, 286-292.
- ¹¹³ Kuramoto, M.; Tanaka, T.; Makita, H.; Nakamura, Y.; Yata, N. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1996**, *48*, 680-684.
- ¹¹⁴ Ogiso, T.; Iwaki, M.; Paku, T. *J. Pharm. Sci.*, **1995**, *84*, 482-488.
- ¹¹⁵ Afouna, M. I.; Fincher, T. K.; Zaghoul, A. A. A.; Reddy, I. K. *Int. J. Pharm.*, **2003**, *253*, 159-168.
- ¹¹⁶ Godwin, D. A.; Michniak, B. B.; Creek, K. F. *J. Pharm. Sci.*, **1997**, *86*, 1001-1005.
- ¹¹⁷ Přiborský, J.; Takayama, K.; Nagai, T.; Waitzová, D.; Elis J. *Drug. Des. Deliv.*, **1987**, *2*, 91-97.
- ¹¹⁸ Chaterjee, D. J.; Li, W. Y.; Koda, R. T. *Pharm. Res.*, **1997**, *14*, 1058-1065.
- ¹¹⁹ Tenjarla, S.; Puranajoti, P.; Mandal, T. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1996**, *48*, 1138-1142.
- ¹²⁰ Hu, J. H.; Zhu, Y. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **1996**, *31*, 48-53.
- ¹²¹ Ogiso, T.; Ito, Y.; Iwaki, M.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 442-445.
- ¹²² Ogiso, T.; Ito, Y.; Iwaki, M.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 446-449.
- ¹²³ Touitou, E. *Int. J. Pharm.*, **1986**, *33*, 37-43.
- ¹²⁴ Niazy, E. M.; Molokhiaa, A. M.; El-Gorashia, A. S. *Int. J. Pharm.*, **1989**, *56*, 181-185.
- ¹²⁵ Sacchini, V.; Melloni, E.; Marchesini, R.; Fabrizio, T.; Cascinelli, N.; Santoro, O.; Zunino, F.; Andreola, S.; Bandieramonte, G. *Tumori*, **1987**, *73*, 19-23.
- ¹²⁶ Tang Liu, D. D.; Richman, J. B.; Weikam, R. J.; Takruri, H. *J. Pharm. Sci.*, **1994**, *83*, 85-90.
- ¹²⁷ Li, L.; Fang, L.; Xu, X.; Liu, Y.; Sun, Y.; He, Z. *Biopharm. Drug Dispos.*, **2010**, *31*(2-3), 138-149.
- ¹²⁸ Balaguer-Fernández, C.; Padula, C.; Femenía-Font, A.; Merino, V.; Santi, P.; López-Castellano, A. *Drug Deliv.*, **2010**, *17*, 83-91.
- ¹²⁹ Zhang, J.Y.; Fang, L.; Tan, Z.; Wu, J.; He, Z.G. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2009**, *35*, 663-670.
- ¹³⁰ Merino, V.; Micó-Albiñana, T.; Nácher, A.; Díez-Sales, O.; Herráez, M.; Merino-Sanjuán, M. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2008**, *60*, 415-420.
- ¹³¹ He, W.; Guo, X.; Zhang, M. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *356*, 82-87.
- ¹³² Shen, Q.; Li, W.; Li, W. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2007**, *33*, 1369-1374.
- ¹³³ Svozil, M.; Doležal, P.; Hrabálek, A.; Mericka, P. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2007**, *33*, 559-567.
- ¹³⁴ Xu, D.H.; Zhang, Q.; Feng, X.; Xu, X.; Liang, W.Q. *Pharmazie*, **2007**, *62*, 316-318.
- ¹³⁵ Parikh, D.K.; Ghosh, T.K. *AAPS PharmSciTech.*, **2005**, *30*, 144-149.
- ¹³⁶ Tan, Z.; Zhang, J.; Wu, J.; Fang, L.; He, Z. *AAPS PharmSciTech.*, **2009**, *10*, 967-976.
- ¹³⁷ Singh, B.N.; Singh, R.B.; Singh, J. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *298*, 98-107.
- ¹³⁸ Wiechers, J. W.; Drenth, B. F.; Jonkman, J. H.; de Zeeuw, R. A. *J. Pharm. Sci.*, **1990**, *79*, 111-115.
- ¹³⁹ Wiechers, J. W.; Drenth, B. F.; Adolfsen, F. A.; Prins, L.; de Zeeuw, R. A. *Pharm. Res.*, **1990**, *7*, 496-499.
- ¹⁴⁰ Wiechers, J. W. *In Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E. W.; Mailbach, H. I., eds.; CRC-Press, Boca Raton: New York, London, Tokyo, **1995**.
- ¹⁴¹ US 4,879,275; *Chem. Abstr.* 773, 103404r (1990).
- ¹⁴² Michniak, B. B.; Player, M. R.; Chapman J. M. Jr.; Sowell J. W. Sr. *Int. J. Pharm.*, **1993**, *91*, 85.
- ¹⁴³ Kim, N.; El-Kattan, A.F.; Asbill, C.S.; Kennette, R.J.; Sowell, J.W. Sr.; Latour, R.; Michniak, B.B. *J. Control Release*, **2001**, *73*, 183-96.
- ¹⁴⁴ Okamoto, H.; Hashida, M.; Sezaki, H. *J. Pharm. Sci.*, **1988**, *77*, 418.

-
- ¹⁴⁵ Michniak, B.B.; Player, M.R.; Fuhrman, L.C.; Christensen, C.A.; Chapman, J.M. Jr.; Sowell J.W. Sr. *Int. J. Pharm.*, **1994**, *110*, 231.
- ¹⁴⁶ Dexter, M.; Manor, B.; Schafer, K. D. US 3345327 (1967).
- ¹⁴⁷ Shereshefsky, J. L.; Wall, A. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, *66*, 1072.
- ¹⁴⁸ McGee, H. L.; Crimi, J. S.; Schwartz, P. M. *J. Chem. Eng. Data*, **1962**, *7*, 102.
- ¹⁴⁹ Zecher, W.; Merten, R. EP 0069926 (1983).
- ¹⁵⁰ Abe, Y.; Shoji, T.; Kobayashi, M.; Wang, Q.; Asai, N.; Nishizawa, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, *43*, 262-265.
- ¹⁵¹ Lengfeld, F.; Stieglitz, *J. Am. Chem. J.* **1893**, *15*, 508
- ¹⁵² Buc, S; Ford, J; Wise, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 93
- ¹⁵³ Loudon, G. M.; Radhakrishna, A. S.; Almond, M. R.; Blodgett, J. K.; Boutin, R. H. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4272-4276.
- ¹⁵⁴ Abderhalden, E.; Kautzsch, K. *Physiol. Chem.* **1912**, *81*, 297
- ¹⁵⁵ Schniepp, L. E.; Marvel, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1557-1558
- ¹⁵⁶ Woods, L. L.; Colver, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 653-654
- ¹⁵⁷ Müller, A.; Bleier, P. *Monatshfte für Chemie*, **1930**, *56*, 391-405
- ¹⁵⁸ Gaeumann, T.; Guenthard, Hs. H. *Helv. Chim. Act.* **1952**, *35*, 53-56
- ¹⁵⁹ Le Sueur, H. R.; Withers, J. Ch. *J. Chem. Soc., Trans.*, **1914**, *105*, 2800-2819
- ¹⁶⁰ Limanov, V. E.; Sobol, A. F.; Vorontsova, L. M. *Pharm. Chem. J.* **1971**, *5*, 7-10
- ¹⁶¹ Matsumoto, J.; Ishizu, M.; Kawano, R.-i.; Hesaka, D.; Shiragami, T.; Hayashi, Y.; Yamashita, T.; Yasuda, M. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 5735.
- ¹⁶² Dexter, M.; Manor, B.; Schafer, K. D. US 3,345,327 (1967).
- ¹⁶³ McGee, H. L.; Crimi, J. S.; Schwartz, P. M. *J. Chem. Eng. Data* **1962**, *7*, 102.
- ¹⁶⁴ Huber, W. F.; Lutton, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3919.
- ¹⁶⁵ Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Holas, T.; Zbytovská, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2351.
- ¹⁶⁶ Shereshefsky, J. L.; Wall, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 1072.
- ¹⁶⁷ Zecher, W.; Merten, R. EP 0069926 (1983).
- ¹⁶⁸ Abe, Y.; Shoji, T.; Kobayashi, M.; Wang, Q.; Asai, N.; Nishizawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 262-265.
- ¹⁶⁹ Asbill, C. S.; Michniak, B. B. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 36.
- ¹⁷⁰ Klimentová, J.; Kosak, P.; Vávrová, K.; Holas, T.; Hrabálek, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7681.
- ¹⁷¹ Dymicky, M.; Bencivengo, M.; Buchanan, R. L.; Smith, J. L. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 110.
- ¹⁷² Morimoto, K.; Tojima, H.; Haruta, T.; Suzuki, M.; Kakemi, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 1133.
- ¹⁷³ Golden, G. M.; McKie, J. E.; Potts, R. O. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 25.
- ¹⁷⁴ Potts, R. O.; Francoeur, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 3871.
- ¹⁷⁵ Cornwell, P. A.; Barry, B. W.; Stoddart, C. P.; Bouwstra, J. A. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 938.
- ¹⁷⁶ Holas, T.; Vávrová, K.; Sima, M.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7671.
- ¹⁷⁷ Shehan, J. C.; Bolhofer, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2786.
- ¹⁷⁸ Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Hrabálek, A. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2273.
- ¹⁷⁹ Kanikkannan, N.; Kandimalla, K.; Lamba, S. S.; Singh, M. *Curr. Med. Chem.*, **2000**, *7*, 793.
- ¹⁸⁰ Stoughton, R.B. *Arch. Dermatol.* **1982**, *118*, 474.
- ¹⁸¹ Klimentová, J. *Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové* 2006.
- ¹⁸² Mitragotri, S. *J. Control. Release*, **2003**, *86*, 69-92.

10. Seznam publikovaných prací

10.1. Publikace (první autor):

Příloha I.

Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůsová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K. Dicarboxylic acid esters as transdermal permeation enhancers: effects of chain number and geometric isomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19(2), 344-347.

Příloha II.

Novotný, M., Hrabálek, A., Janůsová, B., Novotný, J., Vávrová, K. Transkarbams as transdermal permeation enhancers; Effects of ester position and ammonium carbamate formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 9(1), 2726-2728.

Příloha III.

Novotný, M., Klimentová, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action. *Under review*.

10.2. Publikace (spoluautor) a abstrakty z konferencí:

Novotný, J.; Janůsová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2009**, 22(1), 22-30.

Novotný, J.; Kováříková, P.; Novotný, M.; Janůsová, B.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination. *Pharm. Res.*, **2009**, 26(4), 811-821.

Novotný, M. Transkarbam 12: vliv pH na transdermální permeaci teofylinu a hydrokortisonu. *Chem. Listy*, **2009**, 11, 977-977 (44. konference „Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii“, Nymburk, 2009).

Novotný, M. Transkarbam 12: vliv pH na transdermální permeaci teofylinu a hydrokortisonu. *Chemzi.*, **2009**, 5, 181-182 (Konference 61. zjazd chemikov, Tatranské Matliare, 2009).

Novotný, M. Transkarbam 12: vliv pH na transdermální permeaci teofylinu a hydrokortisonu. *Sborník abstraktů*, **2009**. (38. Konference „Syntéza a analýza léčiv“, Hradec Králové, 2009).

Novotný, M. Vliv struktury na akcelerační aktivitu u derivátů transkarbamu 12. *Chem. listy*, **2008**, 11, 1060–1060 (43. konference „Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii“, Nymburk, 2008).

Novotný, M. Deriváty transkarbamu: Vliv struktury na akcelerační aktivitu. *Chem. listy S*, **2008**, 236–237 (37. konference „Syntéza a analýza léčiv“, Brno, 2008).

Novotný, M. Syntéza a hodnocení derivátů dikarboxylových kyselin jako akceleračních transdermálních permeací. *Chem. listy*, **2007**, 117, 871–986 (42. konference „Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii“, Nymburk, 2007).

Novotný, M. Syntéza a hodnocení derivátů dikarboxylových kyselin jako akceleračních transdermálních permeací. *Zborník*, **2007**, 104. (36. konference „Syntéza a analýza léčiv“, Bratislava, 2007).

Příloha I.

Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůsová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K. Dicarboxylic acid esters as transdermal permeation enhancers: effects of chain number and geometric isomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*(2), 344-347.

Příloha II.

Novotný, M., Hrabálek, A., Janůsová, B., Novotný, J., Vávrová, K. Transkarbams as transdermal permeation enhancers; Effects of ester position and ammonium carbamate formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *9(1)*, 2726-2728.

Příloha III.

Novotný, M., Klimentová, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action. *Under review.*