

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



Diplomová práce

**Studium transdermální a dermální absorpce acyklických nukleosidfosfonátů
ze skupiny 2,6-diaminopurinu**

Denisa Diblíková

Školitel: Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Chtěla bych poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. Veliké díky patří především mé školitelce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za cenné rady, milý přístup a zároveň vysoce profesionální a odborné vedení při vypracování této diplomové práce. Za poskytnutí studovaných látek děkuji Prof. RNDr. Antonínu Holému, Dr.Sc., Dr.h.c.mult. a RNDr. Marcele Krečmerové, Ph.D. z Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. Dále také děkuji všem, kteří mi ochotně pomáhali, radili a byli celou dobu oporou.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá použitá literatura a další zdroje, z nichž jsem při práci čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného titulu.

V Hradci Králové 2013

Denisa Diblíková

Obsah

Obsah	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. Stavba kůže	11
2.2. Kožní bariéra	14
2.3. Transdermální podání léčiv	16
2.4. Akceleranty transdermální permeace	18
2.4.1. Vlastnosti akceleraantů	18
2.4.2. Mechanismus účinku	18
2.4.3. DDAK	19
2.5. Acyklické nukleosidfosfonáty	21
2.5.1. Definice	21
2.5.2. Účinky ANP	22
2.5.3. Testované látky	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1. Franzovy difúzní cely	36
3.2. Kůže	37
3.3. Donorová fáze	37
3.4. Akceptorová fáze	38
3.5. Permeační pokusy	38
3.6. Stanovení léčiva ve vzorcích	39
3.6.1. Analytická metoda	39

3.6.2. Kalibrační křivka.....	40
3.6.3. Analýza dat	41
4. VÝSLEDKY.....	42
4.1. Transdermální podání	42
4.1.1. Permeační profily jednotlivých ANP bez a s 1 % akcelerantem DDAK ..	42
4.1.1.1. Látka č. 1. (R)-PMPDAP	43
4.1.1.2. Látka č. 2. (S)-PMPDAP	43
4.1.1.3. Látka č. 4. (S)-HPMPDAP	44
4.1.1.4. Látka č. 5. (S)-cHPMPDAP	44
4.1.1.5. Látka č. 7. (S)-8-azaHPMPDAP.....	45
4.1.2. Flux ANP přes kůži bez a s 1 % akcelerantem DDAK a akcelerační poměry (AP) DDAK.....	46
4.2. Dermální podání	49
4.2.1. Obsah ANP v jednotlivých vrstvách kůže po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK.....	49
4.2.1.1. Celkový přehled ve všech vrstvách kůže	49
4.2.1.2. Stratum corneum.....	50
4.2.1.3. Epidermis	51
4.2.1.4. Dermis	52
4.2.2. Koncentrace ANP v jednotlivých vrstvách kůže po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK.....	53
4.2.2.1. Stratum corneum.....	53
4.2.2.2. Epidermis	54
4.2.2.3. Dermis	55
5. DISKUZE	56
5.1. Transdermální podání	56
5.2. Topická aplikace.....	58

6. ZÁVĚR.....	60
7. POUŽITÉ ZKRATKY	61
8. LITERATURA	63

ABSTRAKT

Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP) jsou látky patřící do skupiny širokospektrých antivirotik s vysokým účinkem na herpes-, hepadna- a retroviry. Vykazují také rozsáhlou cytostatickou, antiparasitickou a imunomodulační aktivitu. Transdermální aplikací těchto látek se nabízí atraktivní a výhodná cesta podání, která je ovšem limitována polárním charakterem sloučenin, zejména jejich fosfonátovou skupinou.

Cílem práce bylo studovat možnosti transdermální i dermální aplikace látek ze série 2,6-diaminopurinu, konkrétně (*R*)-PMPDAP a (*S*)-PMPDAP, (*S*)-HPMPDAP, 8-aza-(*S*)-HPMPDAP, cyklického (*S*)-HPMPDAP a dále lipofilních proléčiv hexadecyloxypropyl (HDP) esterů (*R*)-HDP-PMPDAP a

(*S*)-HDP-HPMPDAP. Schopnost ANP procházet samostatně kůží je však velmi nízká. Z tohoto důvodu jsme studovali také vliv permeačního akceleraantu dodecylesteru kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (DDAK) na prostup těchto látek přes i do kůže. Hodnocení bylo prováděno *in vitro* za použití Franzových difúzních cel a vzorků lidské kůže.

Výsledky práce potvrdily, že ANP (60 mM v 60 % propylenglykolu) procházejí v malém množství kůží (flux 0,53–1,40 nmol/cm²/h), kromě lipofilních proléčiv (*R*)-HDP-PMPDAP a (*S*)-HDP-HPMPDAP, které jsme v akceptorové fázi vůbec nedetekovali. Nepozorovali jsme žádný rozdíl mezi (*R*) a (*S*) enantiomery.

1 % DDAK urychluje prostup ANP kůží 16-31krát, nemá však vliv na permeaci lipofilních proléčiv esterového typu (*R*)-HDP-PMPDAP a (*S*)-HDP-HPMPDAP.

Co se týče topického podání, nejvyšší koncentrace léčiv byla ve stratum corneum, kde dosahovala mM hodnot, v epidermis a dermis byly koncentrace v desítkách až stovkách μM. I v případě dermální aplikace zvyšuje permeační akceleraant DDAK koncentraci léčiv v epidermis více než 5,5krát. HDP estery dosáhly poměrně vysokých koncentrací v epidermis i dermis.

Spojením vysoce biologicky účinných látek a syntetického permeačního akceleraantu DDAK lze transdermálním podáním dosáhnout žádoucích koncentrací léčiv v systémové cirkulaci. Naopak využití lipofilních proléčiv je výhodné pro topické podání, protože vede ke kumulaci těchto látek v kůži bez systémové absorpce.

ABSTRACT

Acyclic nucleoside phosphonates (ANP) are broad-spectrum antivirals highly effective against herpes-, retro- and hepadnaviruses. They also exhibit cytostatic, antiparasitic, immunomodulatory activities. Their transdermal delivery offers an attractive and advantageous route of administration, but is limited due to the polar character of their phosphonate moiety.

The aim of this work was to study the possibility of both transdermal and dermal application of a series of 2,6-diaminopurine derivatives including (*R*)-PMPDAP and (*S*)-PMPDAP, (*S*)-HPMPDAP, (*S*)-8-azaHPMPDAP, cyclic (*S*)-HPMPDAP and lysolipid prodrugs, i.e., hexadecyloxypropyl (HDP) esters of (*R*)-HDP-PMPDAP and (*S*)-HDP-HPMPDAP. Ability of ANP to penetrate through the skin by themselves is generally very low. For this reason the influence of permeation enhancer dodecylester of 6-(dimethylamino)hexanoic acid (DDAK) through and into human skin was investigated. The evaluation was performed *in vitro* by using Franz diffusion cells and human skin.

The results of this work confirm that ANP (60 mM in 60 % propylene glycol) delivery through the skin is very low (flux 0.53-1.40 nmol/cm²/h), except for the lysolipid prodrugs (*R*)-HDP-PMPDAP and (*S*)-HDP-HPMPDAP, which were not detected in the acceptor phase at all. 1 % DDAK enhanced transdermal flux of ANP through skin approximately 16-31 times. However, it did not have any influence on the flux of the lysolipid prodrugs (*R*)-HDP-PMPDAP and (*S*)-HDP-HPMPDAP. There was no statistically significant difference between (*R*)-PMPDAP and (*S*)-PMPDAP isomers.

Concerning the topical application, maximal skin concentrations reached mM values in the stratum corneum. Epidermal and dermal concentrations reached values of ten up to hundred μ M. Also in the case of topical administration, DDAK increased the concentration of drugs in epidermis up to 5.5 times. HDP esters reached relatively high concentrations both in epidermis and dermis.

By a combination of highly effective antiviral compounds with synthetic permeation enhancer DDAK, desirable drug concentrations in the systemic circulation can be successfully obtained by transdermal delivery. On the other hand, usage of lysolipid prodrugs can be advantageous for the topical administration of antivirals, because it leads to their skin accumulation without systemic absorption.

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP) jsou látky vyvinuté v laboratoři Prof. Antonína Holého. Jedná se o analoga přirozených nukleotidů, která jsou chemicky velmi stabilní a fungují na principu antimetabolitu. Zmíněné acyklické analogy nukleosidů vykazují širokou biologickou aktivitu. Mají zejména antivirový, cytostatický, antiparazitální a imunomodulační účinek.¹ Mezi nové ANP s výhodnými vlastnostmi patří také látky ze skupiny 2,6-diaminopurinu, které vykazují aktivitu mimo jiné na *Poxvirus*, *Bacillus anthracis* nebo *Bordetella pertusis*.²

Transdermální podání látek nabízí široký potenciál pro aplikaci látek přes kůži. Nejenže se vysoce zvyšuje pacientova compliance, ale také se snižuje incidence systémových nežádoucích účinků, léčiva udržují stabilnější plazmatické koncentrace a také se snadno aplikují.³ ANP ovšem samostatně kůži přecházejí jen velmi málo, což je zapříčiněno zejména polárním charakterem jejich molekuly.⁴

Cílem této práce bylo studovat možnosti jak transdermální, tak i dermální aplikace ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu a zároveň určit vliv dodecylesteru kyseliny 6-dimethylaminohexanové (DDAK), tedy sloučeniny, která se řadí mezi akceleranty transdermální permeace, což jsou látky zvyšující flux (tok) ostatních látek kůží.

Seznam studovaných látek ze skupiny 2,6-diaminopurinu v této práci:

- **Látka č. 1. (R)-PMPDAP**
(R)-9-(2-Fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurin
- **Látka č. 2. (S)-PMPDAP**
(S)-9-(2-Fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurin
- **Látka č. 3. HDP-(R)-PMPDAP**
Hexadecyloxypropyl ester
(R)-9-(2-fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurinu
- **Látka č. 4. (S)-HPMPDAP**
9-(S)-[3-Hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
- **Látka č. 5. Cyclic (S)-HPMPDAP**
Cyklická forma
9-(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurinu

- **Látka č. 6. HDP-(S)-HPMPDAP**
Hexadecyloxypropyl ester
9-(S)-[3-Hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin-
-sodná sůl
- **Látka č. 7. 8-aza-(S)-HPMPDAP**
8-Aza-9-{(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]}-2,6-
-diaminopurin

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Stavba kůže

Největší a velmi pozoruhodnou částí lidského těla je kůže. Jedná se o unikátně zorganizovaný orgán, který regulací teploty a vodní ztráty umožnil suchozemský život.⁵ Celková plocha kůže u dospělého člověka je 1,5-2 m² a celková hmotnost je v průměru 18-20 kg.⁶

Mezi základní funkce kůže patří:

- zabránit ztrátám vody
- ochrana před fyzikálním a chemickým poškozením, před alergeny
- smyslová
- termoregulační
- exkreční (maz, pot)
- resorpční
- estetická a sociálně-komunikační
- barva kůže.⁷

Kůže (cutis, dermis) je složena ze tří hlavních vrstev - pokožky (epidermis), škůry (dermis, corium) a podkožního vaziva (hypodermis, tela subcutanea).

Epidermis histologicky sestává ze čtyř vrstev – stratum basale, spinosum, granulosum a stratum corneum (SC), která je pro bariérové funkce kůže rozhodující.³ Někdy se ještě uvádí vrstva stratum lucidum, ležící těsně pod SC.

Stratum basale (cylindricum, germinativum) – zde probíhá buněčné dělení a vznik nových buněk, obsahuje typické organely jako mitochondrie a ribozomy.⁵

Stratum spinosum – v této vrstvě se buňky (keratinocyty) ve 2-6 vrstvách směrem k povrchu oplošťují do tvaru kolmého na řezu, spojeny jsou desmozomy.⁷

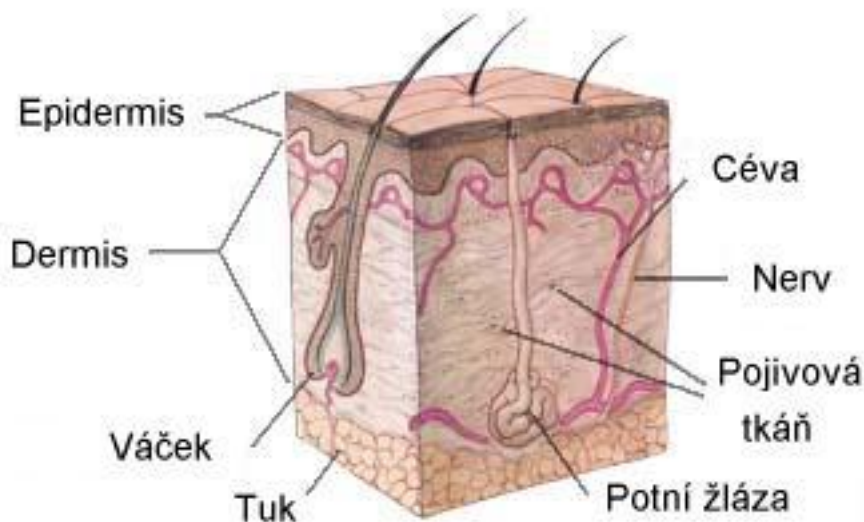
Stratum granulosum – tvoří ji přibližně 3 vrstvy buněk, ve kterých se vytváří prekurzor keratinu, z této vrstvy buňky migrují směrem k povrchu, diferencují se a následně podléhají buněčné smrti.⁷

Stratum corneum (SC) – je složeno z bezjaderných odumřelých keratinocytů (korneocytů) sestavených v 15-25 vrstvách⁷, jde o konečný produkt kožní diferenciaci.⁵

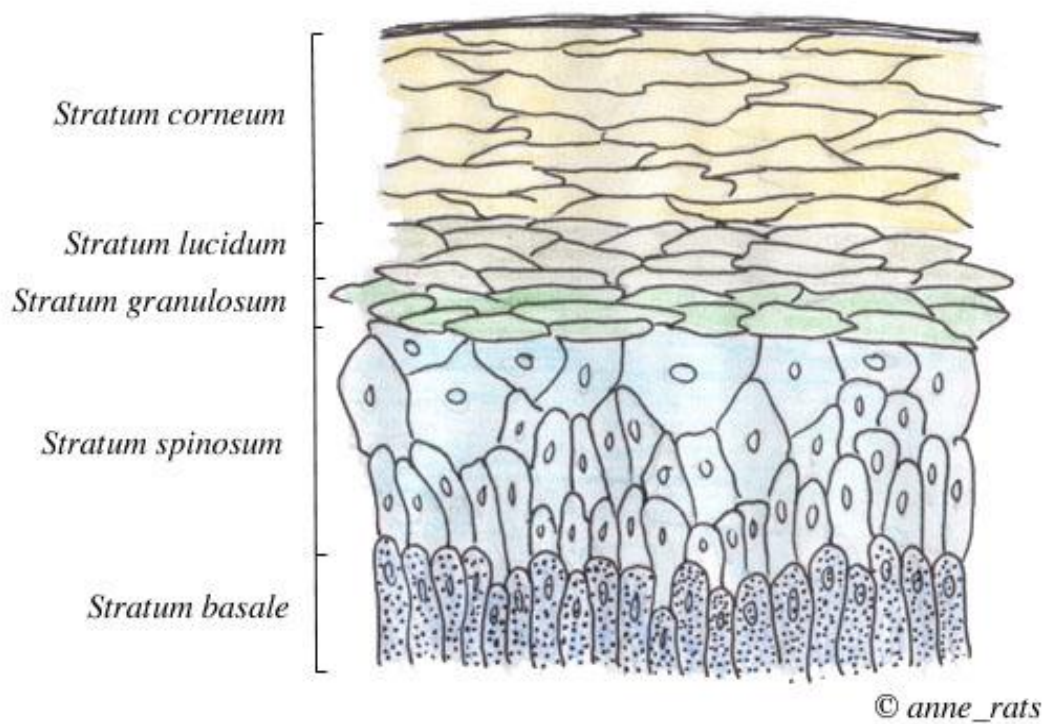
Buňky jednotlivých vrstev kůže procházejí neustálou diferenciací, ukládá se do nich keratin a migrují ze spodních vrstev kůže směrem k povrchu. Typicky trvá přeměna dceřiných buněk stratum basale na buňky stratum corneum 14 dní a stejnou dobu trvá obnova stratum corneum.⁵ Celý proces se nazývá keratinizace neboli rohovatění. Jejím výsledkem je tvorba kožní bariéry - stratum corneum.

Dermis, která je tvořena fibroblasty a extracelulární matrix je bohatě zásobena kapilárami.³ Tloušťka dermis je přibližně 3-5 mm. Její krevní zásobení je nezbytné pro udržení a regulaci tělesné teploty. Dále obsahuje nervová zakončení, tukové buňky, lymfatické žlázy, aromatické buňky, mazové a potní žlázy, Langerhansovy buňky a také vlasové folikuly.⁵

Mezi škárkou a podkožím není ostrá hranice. **Hypodermis** je tvořena vazivem, obsahuje různě velké množství tukových buněk, další cévní a nervové pleteně. Význam podkoží, jako bariéry z hlediska průniku chemických látek, je zanedbatelný.⁶ Podkožní vazivo obsahuje husté vazivové pruhy, jejichž úkolem je spojit kůži s periostem.



Obr. 1. Stavba kůže.⁸

Obr. 2. Stavba epidermis.⁹

2.2. Kožní bariéra

Bariérová funkce lidské kůže silně závisí na nejsvrchnější vrstvě kůže - stratum corneum (SC). SC je složeno ze 75-80 % proteiny, 5-15 % tvoří lipidy a zbylou část další organické sloučeniny.³ Proteinová část je zastoupena především v korneocytech, které jsou obklopeny vysoce organizovanou lipidovou matrix. Mezibuněčná lipidová matrix je považovaná za vlastní kožní bariéru.¹⁰

Samostatná struktura stratum corneum nám může připomínat postavenou zeď. Toto uskupení je často nazýváno „cihly a malta“.¹¹ „Cihly“ (korneocyty) jsou základním stavebním prvkem rohové vrstvy kůže. Jsou vyplněny keratinem a přesně do sebe zapadají.¹² Charakteristikou korneocytů je jejich vysoká nerozpustnost a velmi dobrá odolnost vůči působení chemikálií.³ „Malta“ tvoří velmi hydrofobní lipidy, které se spojují do těsných organizovaných lipidových lamel. Tyto lipidové lamely vyplňují prostor mezi korneocyty a brání prostupu cizích látek přes stratum corneum do lidského organismu. Soudržnost buněk SC je navíc zajištěna desmozomy.¹² Toto celkové uspořádání zajišťuje složitý přístup látek přes SC, čímž přispívá k bariérové funkci kůže.¹³

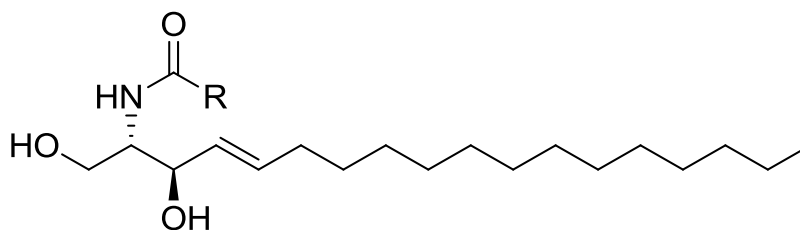
Pro bariérovou funkci SC má pravděpodobně největší význam složení mezibuněčných lipidů a především jejich výjimečné strukturální uspořádání.¹¹

Nejdůležitější a nejvíce (50 % hmotnosti lipidů) zastoupenou částí jsou ceramidy. Fakt, že ceramidy jsou hlavní složkou bariérových lipidů, bylo prokázáno již v roce 1975.¹⁴ Jedná se o nejhydrofobnější lipidy v biologických membránách s logP 11-21. Strukturálně mají polární hlavu a 2 hydrofobní řetězce. Jsou tvořeny bazickými nenasycenými alkoholy sfingosinem, fytosfingosinem, dihydrosfingosinem nebo 6-hydroxysfingosinem, které jsou acylovány buď nehydroxylovanou, alfa-hydroxylovanou nebo velmi dlouhou omega-linoleoxyloxy kyselinou.³ Hlavní funkcí ceramidů je snížit propustnost kůže pro vodu a udržovat vodní bilanci kůže.¹⁵ V klinické praxi můžeme běžně pozorovat stavy spojené s nedostatkem ceramidů jako je atopická dermatitida¹⁶ nebo psoriáza.¹⁷ Suchá a stárnoucí kůže je také projevem nižšího obsahu a nedostatečné regenerace ceramidů a může vést k exacerbaci původního onemocnění (atopický ekzém, psoriáza).¹⁸

Cholesterol je nejvíce individuálně obsažený lipid ve stratum corneum zabírající asi 25 % celkové lipidové hmoty. Jeho hlavní rolí v epidermální bariéře je zřejmě poskytovat určitý stupeň fluidity, což je nezbytné pro pružnost kůže.¹⁹

Vyšší mastné kyseliny (VMK) jsou zastoupeny zhruba 10 %, největší podíl zaujímají převážně nasycené kyseliny s dlouhými řetězci (např. kyselina lignocerová nebo kyselina behenová).³

Nicméně i přes značné poznatky je stále diskutováno úplné lipidové složení bariéry, iontové gradienty, stejně tak metabolické odpovědi a skrytá celulární signalizace vedoucí k opravě bariéry a udržení její homeostázy.¹² SC se díky jedinečnému složení lipidů naprosto vymyká jakékoliv jiné biologické bariéře. Nepoškozená, intaktní kůže je vysoce odolná vůči vnějším vlivům a velmi nízce propustná.



Obr. 3. Struktura ceramidu.

2.3. Transdermální podání léčiv

Transdermálním podáním rozumíme aplikaci léčiva přes nebo do kůže³ jak pro lokální, tak i systémovou léčbu.²⁰ Jedná se o moderní způsob terapie.

Tato aplikační cesta existuje již dlouhou dobu. V minulosti byla ovšem omezena pouze na masti a krémy pro dermatologické použití.²¹ Potřeba najít lékové formy s kontinuálním řízeným uvolňováním léčiva s cílem zajistit dlouhodobě vyrovnané terapeutické hladiny vedla k vývoji transdermálních terapeutických systémů (TTS).²² První transdermální náplast s obsahem skopolaminu Transderm Scop pro léčbu kinetóz byla schválena Food and Drug Administration (FDA) v roce 1981.²³

Postupně se začalo využívat této aplikace čím dál více a v dnešní době se můžeme setkat s celou řadou léčivých látek podávaných ve formě náplastí. Patří mezi ně estradiol, kombinace estradiol- norethindron acetát, testosteron, klonidin, fentanyl, bupenorfin, nitroglycerin, nikotin²⁴, dále také flurbiprofen, diklofenak, propranolol²², rivastigmin²⁵ a další. V terapii se často využívá náplastí s obsahem nikotinu na odvykání kouření, náplastí s obsahem opioidních analgetik pro léčbu chronické bolesti a kombinovaných hormonálních náplastí. Ve vývoji, nebo dokonce již ve fázi klinického testování, je celá řada nových léčiv – fysostigmin nebo cytostatikum 5-fluorouracil.²²

Výhod transdermálního podání je hned několik:

- zvyšuje se pacientova compliance
- nedochází k first-pass efektu v játrech
- zvyšuje se biologická dostupnost léčiva
- dochází ke stabilizaci plazmatických hladin léčiva
- snižují se interakce a nežádoucí účinky
- snadnost aplikace a ukončení podávání.³

Pochopitelně transdermální podání léčiv má také své **nevýhody**:

- přes kožní bariéru je schopno proniknout jen omezené množství látky
- možnost alergizace a lokálního podráždění
- vyšší výrobní náklady
- nepřilíš estetický vzhled

- vliv individuálních rozdílů ve struktuře a hydrataci kůže, vliv kožních onemocnění pacientů
- v případě odlepení náplasti nelze zaručit spolehlivost a účinnost preparátu
- zatím je v této formě dostupné jen malé množství léčivých látek.²⁶

Léčiva, která dobře prostupují kůží, splňují několik kritérií:

- molekulová hmotnost do 500 g/mol
- logP 1-3
- teplota tání do 200 °C
- neionizované léčivo má větší schopnost permeace přes kůži než ionizované
- omezena max. denní dávka do 20 mg/den^{5, 27}, některé zdroje uvádí dokonce terapeutickou denní dávku max. 10 mg/den.²⁸

Existuje celkem pět možných cest průniku (penetrace) léčiva do kůže a průchodu přes její struktury (permeace) do cévního řečiště. Jedná se o cesty:

- potní žlázou
- mazovou žlázou
- transfolikulární
- intercelulární
- transcelulární.²⁹

Jelikož kožní a mazové žlázy zaujímají pouze 0,1 % povrchu kůže, jsou pro transdermální podání většiny látek nevýznamné. Naprostá většina látek prostupuje cestou intercelulární.⁵

2.4. Akceleranty transdermální permeace

Většina léčiv není schopna proniknout kůží v dostatečném množství, proto se využívá celá řada metod k dočasnému snížení bariérové funkce kůže. Společně s iontoforézou, elektroporací, ultrazvukem, mikrojehlami, nanočásticemi a liposomy patří akceleranty transdermální permeace do široké skupiny metod usnadňující přístup látek přes kůži.

2.4.1. Vlastnosti akceleraantů

Akceleranty transdermální permeace jsou sloučeniny, které usnadňují průnik jiných látek kůží (permeace) nebo do kůže (penetrace). Předlohou pro syntézu dnešních moderních akceleraantů se stal Azone (*N*-dodecylazacykloheptan-2-on) patentovaný již v roce 1976 v USA.³⁰ Na povahu akceleraantů jsou kladeny poměrně vysoké požadavky.

Měly by mít následující vlastnosti:

- netoxické a nedráždivé
- samostatně neúčinné, tj. bez farmakologické aktivity
- chemicky inertní
- rychlý nástup účinku
- po odstranění se musí okamžitě obnovovat bariérové vlastnosti kůže
- umožňovat pouze jednosměrný přístup léčiva
- snadno vyrobitelné
- levné.²⁹

2.4.2. Mechanismus účinku

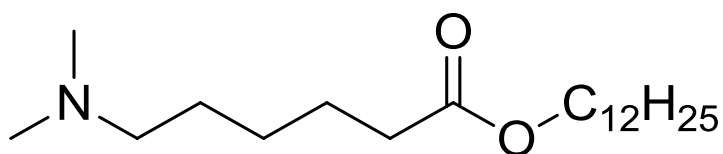
Mechanismus účinku akceleraantů v současné době není plně znám. Nejpravděpodobnější se jeví teorie nespecifických interakcí akceleraantu s lipidy či bílkoviny ve SC nebo změna rozdělovacích rovnováh, kterou shrnul Barry již v roce 1987. Jde o kombinaci tří následujících efektů:

- akceleranty rozrušují pravidelně uspořádané lipidy především ve stratum corneum
- interagují s intracelulárními proteiny kůže, především s α -keratinem, čímž dochází k nabobtnání buněk a lepšímu prostupu léčiv
- akcelerant optimalizuje hodnotu rozdělovacího koeficientu mezi přípravkem a lipidovými membránami SC.³¹

Účinnost akceleračních látek je testována na lidské, popřípadě prasečí kůži za použití Franzových difuzních cel.³² Výsledky se hodnotí pomocí tzv. akceleračního poměru (AP) - tedy poměrem fluxu léčiva s akceleračním činidlem a bez akceleračního činidla. Po chemické stránce jsou akceleranty neobvykle nejednotnou skupinou.²⁹

2.4.3. DDAK

DDAK=dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové je akcelerační činidlo transdermální permeace³³, který prokazatelně snižuje odolnost kožní bariéry.³⁴ DDAK vznikl kombinací strukturálních znaků dvou již známých akceleračních činidel. První část je tvořena z ionizovatelné polární hlavy odvozené od dodecyl esteru kyseliny 2-(dimethylamino)propanové (DDAIP)³⁵. Druhou část potom tvoří pětiuhlíkatý spojovací řetězec mezi atomem dusíku a esterovým karbonylem, který se osvědčil u akceleračního činidla Transkarbamu 12.³⁶



Obr. 4. Struktura DDAK.

DDAK je schopno usnadnit absorpci širokého spektra látek a je výrazně účinnější, než původní akcelerační činidlo DDAIP.³⁷ Akcelerační poměr DDAK je téměř 80 pro teofylin³⁸, 13,6 pro adefovir^{37, 1, 39} a 43,2 pro hydrokortison.³⁷ Původně se předpokládalo, že takto účinná látka musí být spojena s vysokou toxicitou. Pokusy na prasečí kůži ovšem prokázaly, že DDAK je rychle metabolizován kožními esterázami s poločasem rozpadu 17,2 min. Žádné toxické projevy nebyly pozorovány

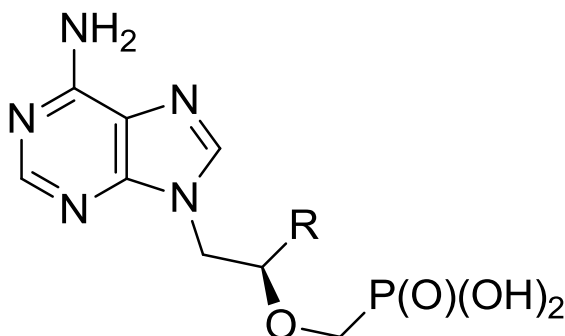
po perorálním podání dávky až 2 g/kg myším a potkanům. Obnovení kožní bariéry po podání zmiňovaného akcelerantu bylo potvrzeno měřením elektrické rezistence.³⁷

V souvislosti s touto prací je důležité, že DDAK zvyšuje flux látek ze skupiny ANP (adefoviru^{1, 39} a cPr-PMEDAP⁴⁰) kůží až o dva řády, i jejich koncentraci v kůži více než 6,5 krát. Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo u 1 % DDAK při pH 6.⁴⁰

2.5. Acyklické nukleosidfosfonáty

2.5.1. Definice

Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP) jsou látky vyvinuté Prof. Antonínem Holým. Jedná se o analoga přirozených mononukleotidů, u kterých byla cukerná jednotka nahrazena $-OCHRCH_2-$ skupinou a fosfátová skupina fosfonátem (Obr. 5).



Obr. 5. Příklad struktury ANP.

Díky těmto změnám jsou ANP chemicky stabilnější a odolné proti enzymovým degradacím. Přirozeně se vyskytující nukleosidy musí být aktivovány fosforylací katalyzovanou enzymem nukleosidkinásou až do stádia trifosfátu. Tento enzym ovšem v některých buňkách vykazuje sníženou aktivitu, nebo chybí úplně a v takovém případě je lék neúčinný. Aktivované přirozené nukleotidy dále nelze použít z důvodu jejich rychlé degradaci během transportu do buněk i v krevním řečišti. ANP ovšem nepotřebují tento první stupeň fosforylace a mohou tedy působit i v buňkách, kde klasická antivirotika selhávají.²

ANP fungují na principu antimetabolitu. To znamená, že jejich mechanismus účinku je vždy spojen s ovlivněním nějaké enzymové reakce. Nejčastěji se jedná o inhibice reverzní transkriptázy nebo DNA-polymerázy. Nukleové báze, nukleosidy a nukleotidy tvoří nejvýznamnější skupinu antimetabolitů, ovlivňující pouze děje probíhající v buňkách. ANP jsou označovány jako tzv. druhá generace analogů nukleosidů. Na ně již není kladen požadavek maximální podobnosti s přirozeným metabolitem, jako u první generace. Naopak molekula by měla být schopna tvořit četné konformace s aktivním centrem enzymu, aby se mohla lépe adaptovat.⁴¹

Jako neefektivní se jeví přímé použití modifikovaných 5'-nukleotidů. Díky jejich enzymatické nestabilitě by docházelo k rychlé defosforylaci nespecifickými fosfomonoesterázami přímo v krevní plazmě a vzhledem k jejich polaritě nepronikají přes buněčnou membránu. Z tohoto důvodu došlo k vývoji neutrálních nukleotidových prolečiv, které se po transportu do buněk fosforylují na monofosfát (ANPp) a dále na difosforylované deriváty (ANPpp). Ty následně uvolňují požadované difosfonáty přímo do buněčné cytoplasmy, kde za reakce s polymerázami předčasně ukončují růst nové DNA. Za velmi důležité je považována přítomnost atomu kyslíku v blízkosti vazby atomu fosforu.¹

Pro přehlednost uvádím příklady celosvětově používaných léčivých přípravků obsahujících ANP Prof. Holého: Duviragel® ((S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin, DHPA), Vistide® (cidofovir), Viread® (tenofovir disoproxil fumarát), Truvada® (tenofovir disoproxil fumarát a emtricitabin), Hepsera® (adefovir dipovoxil), Atripla® (tenofovir disoproxil fumarát, efavirenz a emtricitabin), Complera®/Eviplera® (tenofovir disoproxil fumarát, rilpivirin a emtricitabin) a Stribild® (tenofovir disoproxil fumarát, emtricitabin, elvitegravir, cobicistat).

2.5.2. Účinky ANP

Všechny ANP vykazují širokou biologickou aktivitu, která je ovšem značně rozdílná od klasických nukleosidových analogů jako je acyclovir, ganciklovir nebo penciklovir.⁴² Již řadu let se po celém světě ANP využívají jako protivirová léčiva. V Evropě byl v roce 1997 schválen cidofovir ((S)-HPMPC) v podobě léčivého přípravku VistideTM⁴³ pro léčbu retinitidy způsobené cytomegalovirem u HIV pozitivních pacientů.⁴¹ ANP působí proti DNA virům, avšak *in vitro* nemají žádný efekt na RNA viry.¹

Látky působí na:

Papillomaviry:

- HPV (human papillomavirus) – původce různých typů bradavic

Herpesviry:

- HSV-1 (Herpes simplex typu 1) - způsobující klasické rtové opary
- HSV-2 (Herpes simplex typu 2) - původce genitálních oparů a molusek

- VZV (varicella zoster virus) – virus pravých neštovic
- CMV (cytomegalovirus) – způsobující cytomegalovirovou retinitidu
- HHV-6 (human herpesvirus typu 6)
- EBV (virus Epsteinova a Barrova) - vyvolávající infekční mononukleózu

Iridoviry:

- ASFV (African swine fever virus) - virus africké horečky prasat

Poxviry:

- MCV (molluscum contagiosum virus) – způsobuje molusky
- Variola virus – původce pravých neštovic
- VV (vaccinia virus)

Hepadnaviry:

- HBV (human hepatitis B virus) - vyvolávající žloutenku typu B

Retroviry:

- HIV-1,2 (human immunodeficiency syndrom) - syndrom získané lidské imunodeficiency typu 1 a 2
- FIV (feline immunodeficiency virus) - kočičí virus ztráty imunity
- Moloney murine virus

Adenoviry: horečnaté onemocnění dýchacích cest.^{1, 41, 42, 44}

Některé látky mají **antiparasitickou aktivitu** na:

- *Plasmodium falciparum* – přenašeč malárie
- *Trypanosoma brucei* – původce spavé nemoci
- *Leishmania donovani* - způsobující leishmaniózu.⁴¹

ANP prokázaly *in vitro* také silný **imunomodulační i imunostimulační účinek**. Mají schopnost zvyšovat sekreci TNF- α , interleukinu-10, chemokinů, makrofágů, lymfocytů a indukovat tvorbu prostatické molekuly NO v lidských buňkách.⁴⁵ Adefovir a jeho profarmakum adefovir dipivoxil podané *per os* potkanům výrazně snižují otoky způsobené adjuvantní artritidou.⁴¹

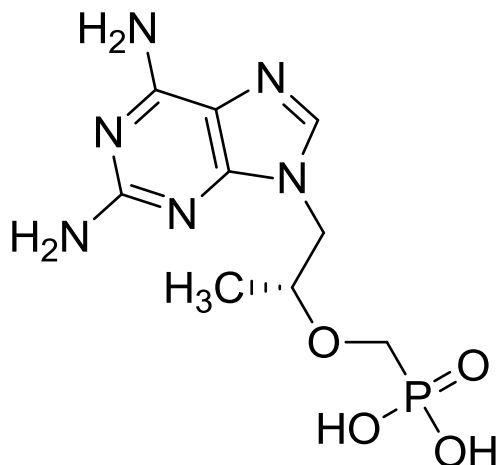
Dále je také nutno zmínit **cytostatický účinek** ANP. Nejúčinnější látkou je v tomto případě PMEG (9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin), konkrétně tedy jeho proléčivo N6-cyklopropyl PMEDAP.⁴¹

Novější typy ANP, kterými se zabývala také tato práce, předpokládají vysoké využití v budoucnosti především v boji proti bioterorismu. Cílem je například nalézt proléčivo s účinkem proti *Poxvirum* vyvolávající pravé neštovice.

Vedoucí strukturou je v tomto případě cyklický (S)-HPMPDAP. Mezi nové druhy biologických účinků patří aktivita na *Bacillus anthracis* – vyvolávající antrax a také na *Bordetella pertussis*, tedy původce černého kašle. V současné době také probíhá mezinárodní projekt se zaměřením na malárii.²

2.5.3. Testované látky

Následuje přehled s podrobnými údaji o ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu, které byly testovány v této práci. EC₅₀ (střední účinná koncentrace) vyjadřuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50% úhyn či 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku.

Látka č. 1.Vzorec:Zkratka: (R)–PMPDAP

Chemický název (vždy jsou uvedeny názvy dva, první je název běžně používaný v literatuře): (R)–9-(2-Fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurin,

(R)-[1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl]oxymethylfosfonová kyselina

Molekulová hmotnost (MW)=302.23 g/mol

Účinek na:

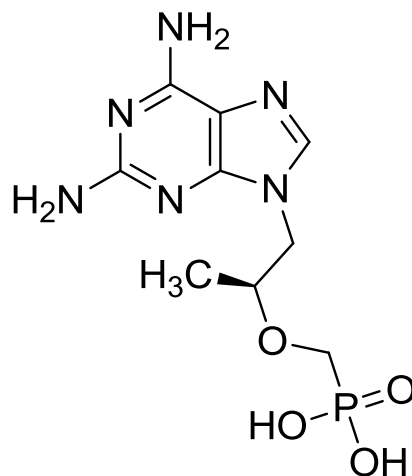
- **HIV** – inhibiční efekt této látky na HIV replikaci byl testován na periferních krevních lymfocytech a monocytech. EC_{50} byla stanovena 0,01 μM pro inhibici HIV-1/BAL-L replikace až 1-2,8 μM pro HIV-1/IIIB buňky. Bylo prokázáno, že (R)–PMPDAP je 10-100x aktivnější, než jeho S- izoforma. ⁴⁶ Konkrétní hodnoty EC_{50} viz Tab. 1.
- **HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, VV, HIV-1 a 2** - EC_{50} jsou uvedeny v Tab. 1. současně s porovnáním hodnot pro optický izomer této látky (S)–PMPDAP a s (R)-PMPA (Tenofovir)-9(R)-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninem. ⁴⁷
- **HHV-6** – pro tuto látku byla EC_{50} stanovena >300 μM , čímž vykazuje srovnatelnou aktivitu s látkou č. 7. 8-aza-(S)-HPMPDAP. Nicméně při koncentracích v těchto řádech hovoříme spíše o inaktivitě vůči viru HHV-6. (R)–PMPDAP je totiž přinejmenším 10x méně účinný při porovnání s PMEA (Adefovir)–9-2-(fosfonylmethoxyethyl)adeninem ($EC_{50}=30\pm 14,3 \mu\text{M}$). ⁴⁸
- **FIV** - (R)–PMPDAP byl testován *in vitro* na FIV-infikovaných asymptomatických kočkách a vykazuje nižší toxicitu, než ostatní ANP. ⁴⁹

EC₅₀ byla stanovena 0,07±0,02 μM pro thymocyty, čímž vykazuje srovnatelnou aktivitu jako AZT (3'-azido-3'-deoxythymidin) s EC₅₀=0,05±0,02 μM. Je více účinný při porovnání s PME A s EC₅₀=0,5±0,09 μM i s (R)-PMPA s EC₅₀=0,8±0,11 μM.⁵⁰

- **MSV** - (R)-PMPDAP je 15–40x účinnější, než (S)-PMPDAP, EC₅₀=0,1–0,6 μM.⁴⁷
- **imunomodulační** – látka byla testovaná v koncentraci 100 μM/den na krysích hepatocytech a makrofázích *in vitro* a zvyšovala expresi NO a produkci cytosinů.⁵¹

Látka č. 2.

Vzorec:



Zkratka: **(S)-PMPDAP**

Chemický název: (S)-9-(2-fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurin,

(S)-[1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl]oxymethylfosfonová kyselina

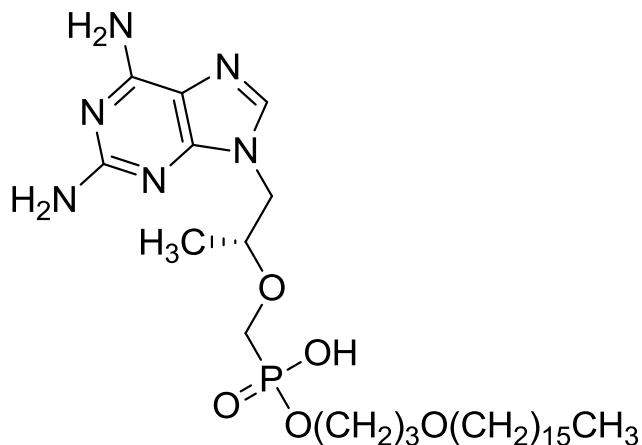
MW=302.23 g/mol

Účinek na:

- **HSV-1, HSV-2, VV, HIV-1 a 2** - EC₅₀ jsou uvedeny v Tab.1. současně s porovnáním hodnot pro (R)-PMPDAP, (R)-PMPA. Účinek na CMV a VZV pro (S)-PMPDAP nebyl stanoven. Z výsledků je patrné, že (R)-PMPDAP je v inhibici HSV-1 replikace 2x účinnější, než jeho optický izomer (S)-PMPDAP.⁴⁷ Zdůraznění si také zaslouží velké rozdíly v EC₅₀ obou izomerů v účinku na HIV replikaci. R-enantiomery jsou totiž všeobecně *in vitro* více účinné, než jejich S – izoformy.⁴⁶

účinek na:	(R)-PMPDAP	(S)-PMPDAP	(R)-PMPA
HSV-1	496	993	522
HSV-2	232	232	244
CMV	>30	-	>300
VZV	>30	-	±160
VV	>1,200	>1,200	>1,200
HIV-1	0,170±0,08	7,4±1,8	5,9±0,45
HIV-2	0,179±0,04	7,9±1,8	4,9±0,45

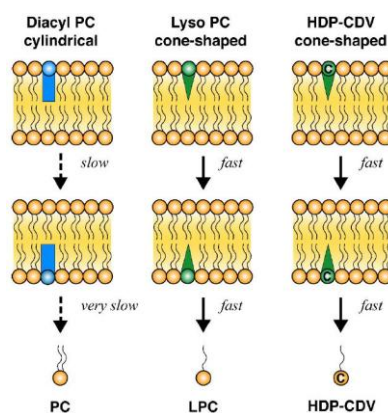
Tab. 1. Hodnoty EC₅₀ v μM pro (R)-PMPDAP, (S)-PMPDAP a (R)-PMPA.⁴⁷

Látka č. 3.Vzorec:Zkratka: **HDP-(R)-PMPDAP**Chemický název: Hexadecyloxypropyl ester

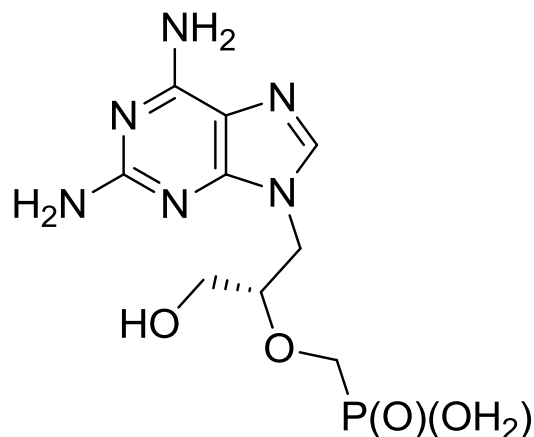
(R)-9-(2-fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurinu, 3-(hexadecyloxy)propylester
 kyseliny (R)-[1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl]oxymethylfosfonové

MW=584.74 g/mol

Účinek na: Jelikož ANP vykazují při fyziologickém pH dva negativní náboje a do buněk vstupují velmi pomalu prostřednictvím endocytózy⁵², byla syntetizována proléčiva ANP. Mezi ně řadíme také látku č. 3. HDP-(R)-PMPDAP a č. 6. HDP-(S)-HPMPDAP. Lipidová analoga byla syntetizována za účelem zvýšit biologickou dostupnost po *per os* podání. Díky podobnosti s lysofosfolipidy je usnadněn vstup látky do buňky přes fosfolipidovou membránu, což je schématicky vyjádřeno na Obr. 6. Esterifikací se také zvyšuje *in vitro* antivirová aktivita oproti parentním látkám.⁵³



Obr. 6. Interakce fosfatidylcholinu, lysofosfatidylcholinu a esterového proléčiva cidofoviru s lipidovou dvojvrstvou.⁵³

Látka č. 4.Vzorec:Zkratka: (S)-HPMPDAP

Chemický název: (S)-9-[3-Hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin, (S)-[1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-yl]oxymethylfosfonová kyselina

MW=318.23 g/mol

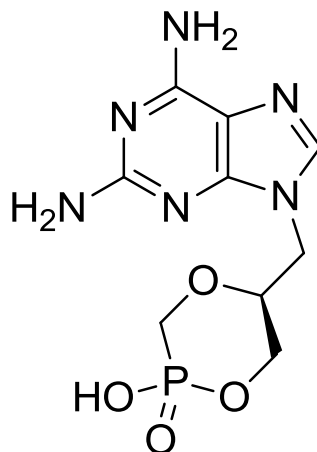
Účinek na:

- **HIV-1** - s $EC_{50}=2,3 \mu\text{M}$ je tato látka méně účinná, než AZT s $EC_{50}=0,02 \mu\text{M}$.⁵⁴ Při srovnání hodnot z jiného zdroje vykazuje $EC_{50} \geq 62 \mu\text{M}$ a je tedy méně aktivní na replikaci HIV-1 viru, než (R)-PMPA s $EC_{50}=5,9 \pm 0,45 \mu\text{M}$. Ve srovnatelných hladinách se pohybují také hodnoty EC_{50} obou sloučenin na HIV-2.⁴⁷
- **HHV-6** – testovaná látka je s $EC_{50}=26 \pm 3,1 \mu\text{M}$ svojí aktivitou na inhibici replikace HHV-6 viru srovnatelná s PMEAs ($EC_{50}=30 \pm 14,3 \mu\text{M}$), ale výrazně účinnější než ACV (Acyclovir)-(2-amino-1,9-dihydro-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6H-purin-6-on) s $EC_{50}=179 \pm 52 \mu\text{M}$.⁴⁸
- **HSV-1, HSV-2** – v obou případech je látka účinnější, než (R)-PMPA.⁴⁷
- **CMV** - EC_{50} byla stanovena $7,8 \pm 4,7 \mu\text{M}$, pro (R)-PMPA větší než $300 \mu\text{M}$.⁴⁷
- **VZV** - $EC_{50}=2,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$, pro (R)-PMPA $EC_{50} \pm 160 \mu\text{M}$ ⁴⁷, (S)-HPMPC (Cidofovir)-((S)-9[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosine) vykazuje $EC_{50}=0,13 \pm 0,13 \mu\text{M}$.⁵⁵ Výsledky jsou shrnuty v Tab. 2.

účinek na:	(S)-HPMPDAP	(R)-PMPA
HSV-1	0,22±0,22	522
HSV-2	1,0±0,56	244
CMV	7,8±4,7	>300
VZV	2,0±1,1	±160

Tab. 2. Hodnoty EC₅₀ v μM pro (S)-HPMPDAP a (R)-PMPA. ⁴⁷

- **VV** - EC₅₀ pro tuto látku byla stanovena na 0,50±0,19 μM. Pro srovnání lze uvést EC₅₀ pro (S)-HPMPC (7,3±4,3 μM), z čehož vyplývá prokazatelně vyšší účinnost látky (S)-HPMPDAP na virus pravých neštovic. ⁵⁵ (S)-HPMPDAP je jednou z vůbec neúčinnějších látek proti *Poxvirum*, vykazujete také aktivitu na MCV. ⁵⁶
 - **CMV** - EC₅₀ byla stanovena 7,8±64,7 μM, pro (R)-PMPA větší než 300 μM. ⁴⁷
- Pozn: Účinky látky č. 4. (S)-HPMPDAP na VV, CMV, HHV-6, HSV-1, HSV-2 a VZV byly také v jiném experimentu ⁵⁵ hodnoceny a srovnávány s její cyklickou formou (S)-cHPMPDAP, (S)-HPMPC a ACV. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 3.*
- **EBV** - EC₅₀=2,0 μM, inhibiční efekt tedy výrazně nižší, než při použití PMEDAP (9-(2-fosfonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurin) s EC₅₀=0,16 μM. ⁵⁷
 - *Trypanosoma brucei brucei* – aktivita prokázána vůči multirezistentní *T. b. brucei* jak *in vitro*, tak také na myších modelech. ¹

Látka č. 5.Vzorec:Zkratka: cyclic (S)-HPMPDAPChemický název: Cyklická forma

(S)-9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurinu,

(5S)-5-((2,6-diamino-9H-purin-9-yl)methyl)-2-hydroxy-1,4,2-dioxafosfinan-2-oxid

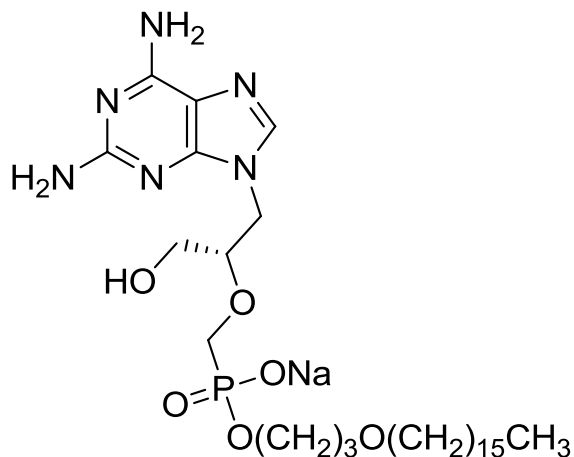
MW=300.21 g/mol

Účinek na:

- **HSV-1** – cyklizací se snižuje účinnost látky na herpes virus ($EC_{50}=3,60\pm 1,77 \mu\text{M}$), pro (S)-HPMPC je $EC_{50}=1,62\pm 1,08 \mu\text{M}$ a pro (S)-HPMPDAP $EC_{50}=2,86\pm 1,76 \mu\text{M}$.⁵⁵
- **VV** - $EC_{50}=0,53\pm 0,20 \mu\text{M}$, látka je účinnější, než (S)-HPMPC ($EC_{50}=7,3\pm 0,3 \mu\text{M}$), ovšem srovnatelně aktivní se svým mateřským léčivem (S)-HPMPDAP s $EC_{50}=0,50\pm 0,19 \mu\text{M}$.⁵⁵
- **CMV** – zde je zapotřebí vyšších koncentrací ($EC_{50}=15,0\pm 2,4 \mu\text{M}$), než u (S)-HPMPC ($EC_{50}=1,14\pm 0,19 \mu\text{M}$), který je tedy výrazně aktivnější a účinnější při léčbě cytomegalovirové retinitidy. Cyklická forma je také méně účinná než (S)-HPMPDAP s $EC_{50}=11,2\pm 6,4 \mu\text{M}$.⁵⁵
- **VZV** - $EC_{50}=0,37\pm 0,53 \mu\text{M}$, pro (S)-HPMPC je $EC_{50}=0,13\pm 0,13 \mu\text{M}$ a pro (S)-HPMPDAP je $EC_{50}=0,22\pm 7,68 \mu\text{M}$.⁵⁵

účinek na:	(S)-HPMPDAP	(S)-cHPMPDAP	(S)-HPMPC	ACV
HSV-1	2,86±1,76	3,60±1,77	1,62±1,08	0,16±0,05
HSV-2	2,83±1,35	4,33±4,03	2,19±1,46	0,30±0,09
HHV-6	17,6±3,7	-	-	-
VV	0,50±0,19	0,53±0,20	7,3±4,3	-
CMV	11,2±6,4	15,0±2,4	1,14±0,19	-
VZV	0,22±7,68	0,37±0,53	0,13±0,13	3,69±1,69

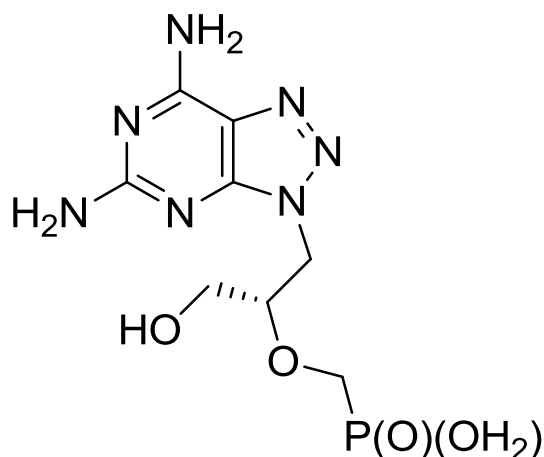
Tab. 3. Hodnoty EC_{50} v μ M pro (S)-HPMPDAP, (S)-cHPMPDAP, (S)-HPMPC a ACV. ⁵⁵

Látka č. 6.Vzorec:Zkratka: HDP-(S)-HPMPDAPChemický název: Hexadecyloxypropyl ester

(S)-9-[3-Hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin sodná sůl,
sodium-3-(hexadecyloxy)propyl-(S)-[1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)-
-3-hydroxypropan-2-yl]oxymethylfosfonát

MW=622.71 g/molÚčinek na:

- **HIV-1** - EC₅₀ této látky pro inhibici replikace HIV-1 v MT-2 buňkách je 0,04±0,02 μM, pro PMEa byla naměřena koncentrace EC₅₀=1,1±0,6 μM.⁵⁸
- Tato látka je stejně jako látka č. 3. HDP-(R)-PMPDAP esterovým lipofilním prolečivem. Mechanismem účinku je napodobovat lysolipidy a usnadňovat vstup látky do buňky.⁵³

Látka č. 7.Vzorec:Zkratka: 8-aza-(S)-HPMPDAPChemický název:

(S)-8-Aza-9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin,
 (S)-[1-(5,7-diamino-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-3-hydroxypropan-2-yl]oxymethylfosfonová kyselina

MW=319.22 g/mol

Účinek na:

- **HHV-6** - tento derivát se svojí hodnotou EC_{50} větší jak 300 μ M řadí k méně účinným sloučeninám v porovnání s látkou č. 4. (S)-HPMPDAP ($EC_{50}=26\pm 3,1$ μ M) a s PMEAs ($EC_{50}=30\pm 14,3$ μ M). Jeho aktivita je srovnatelná s látkou č. 1. (R)-MPDAP s $EC_{50}>300\mu$ M.⁴⁸
- v Tab. 4. je seznam naměřených hodnot IC_{50} pro studovanou látku 8-aza-(S)-HPMPDAP a porovnáno s IC_{50} pro ACV, popřípadě pro AZT.⁵⁹ IC_{50} (střední inhibiční koncentrace) vyjadřuje koncentraci zkoušené látky potřebné k 50% inhibici viru v jednotkách μ g/ml ve vztahu ke kontrolnímu vzorku. Pro možnost srovnání jsou hodnoty v závorce převedeny na μ M. Látka 8-aza-(S)-HPMPDAP substituovaná navíc atomem dusíku v základním purinovém cyklu vykazuje v porovnání s ostatními testovanými sloučeninami mnohem nižší aktivitu vůči všem typům virových původců.

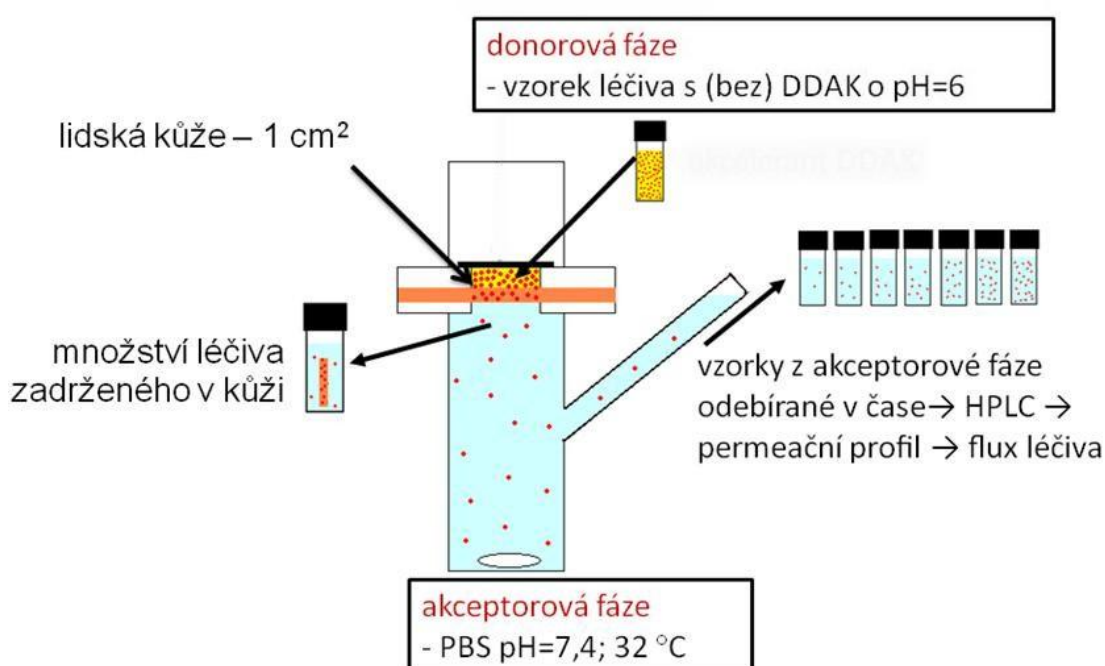
účinek na:	8-aza-(S)- HPMPDAP	ACV	AZT
HSV-1	20 (65,74)	0,015 (0,07)	-
HSV-2	20 (65,74)	0,02 (0,09)	-
CMV	>100 (328,72)	13 (57,78)	-
VZV (TK	9 (29,58)	0,18 (3,64)	-
MSV	1,0±0,22 (3,29±0,72)	-	0,020 (0,075)
HIV-1	>100 (328,72)	-	-
HIV-2	>100 (328,72)	-	-
VV	20 (65,74)	-	-

Tab. 4. Antivirová aktivita vyjádřená pomocí IC_{50} pro látky 8-aza-(S)-HPMPDAP, ACV a AZT v jednotkách $\mu\text{g/ml}$, v závorce v jednotkách μM .⁵⁹

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Franzovy difúzní cely

Veškeré permeační pokusy probíhaly v těchto schématicky znázorněných modifikovaných Franzových difúzních celách.



Obr. 7. Schéma Franzovy cely

Franzovy cely jsou skleněné nádoby skládající se z dvou hlavních částí. Horní (menší) část slouží k aplikaci donorové fáze léčiva. Spodní (větší) část je naplněna pufrem s teflonovým míchadlem a funguje jako akceptorová fáze léčiva. Spodní část má také delší postranní raménko, kterým se v pravidelných předem stanovených intervalech po celou dobu pokusu odebíraly vzorky akceptorové fáze. Mezi výše zmíněné dvě části se umístila lidské kůže dermální stranou směrem dolů a pomocí dvou plexiskel o tloušťce 0,50 cm a 0,20 cm vymezena kruhová permeační plocha 1 nebo 2 cm². Pro zajištění nepohyblivosti a lepší přilnavosti kůže byla fixační

plexiskla předem natřena z obou stran silikonovou vazelínou. Kompletně sestavené Franzovy cely byly nakonec spojeny umělohmotnou gumičkou a nad vrchní část kůže jsme po aplikaci testovaných roztoků připevnili podložní sklíčko. Cely byly ihned umístěny do vodní lázně temperované na 32°C se zapnutým mícháním pro zajištění homogenity akceptorové fáze a vytvoření co nejbližšího fyziologického prostředí lidského organismu.

3.2. Kůže

Pro všechny pokusy byla použita kůže pacientů bělošské rasy, kteří podstoupili plastickou operaci v oblasti břicha či prsu. Veškerý proces odběru lidské kůže probíhal v souladu s pravidly vydanými Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (č. 200609 S09P) a dle principů Helsinské Deklarace.³⁴ Po transportu byly kůže zbaveny pomocí skalpelu tukové tkáně a zmrazeny, až do zahájení pokusu. Pro umístění do Franzových cel se kůže nařezávala na čtverečky o přibližné velikosti 2x2 cm.

3.3. Donorová fáze

Jako léčiva aplikovaná v donorové fázi byly použity sloučeniny popsané v kapitole 2.5.3. Příprava vzorků spočívala v rozpuštění koncentrace testovaných látek ve směsi propylenglykolu a isotonického fosfátového pufru v poměru 6:4 (v/v). K polovině takto připravených vzorků se ještě přidávalo 1 % permeačního akceleratoru DDAK. Po homogenizaci suspenzí a úpravě jejich pH na hodnotu 6 pomocí NaOH nebo H₃PO₄ byly vzorky umístěny na 24 hodin do termostatu při teplotě 32°C.

3.4. Akceptorová fáze

Akceptorová fáze, kterou se naplnila spodní část Franzovy cely, byla tvořena fosfátovým pufrům o pH 7,4. Izotonický fosfátový pufr funguje jako rozpouštědlo pro zkoumané látky. Byl připraven z 8 g NaCl ($M=58,4$ g/mol), 2,865 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ($M=358$ g/mol), 0,201 g KCl ($M=74,55$ g/mol) a 0,312 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($M=156$ g/mol) a doplněno destilovanou vodou pro HPLC na celkový objem 1 litru pufru. Po důkladném rozpuštění všech solí bylo přidáno 50 mg gentamicinu na litr pufru pro zajištění antimikrobiální nezávadnosti. Optimální hodnota pH pro tento fosfátový pufr odpovídá $\text{pH}=7,4$ při teplotě 32°C , což bylo na závěr zkontrolováno a popřípadě doladěno přidáváním koncentrovaných roztoků NaOH nebo H_3PO_4 . Pro každou celu byl určen její přesný objem zvlášť. Tyto hodnoty byly využity pro pozdější přepočet výsledné koncentrace prostoupeného léčiva.

3.5. Permeační pokusy

Na samém začátku pokusu byly opatrně rozmražené vzorky kůže umístěny do Franzovy difúzní cely dle návodu, který je uveden v kapitole 3.1. Spodní část cely byla naplněna tak, aby hladina fosfátového pufru dosahovala samotného okraje postranního raménka cely. Přesný objem pufru byl zaznamenán a jeho hodnota použita pro pozdější výpočty. Takto sestavené cely byly 30 min ponechány při 32°C ve vodní lázni.

Poté byly na kůži pipetou naneseny předem připravené a temperované vzorky testovaných látek v objemu $50 \mu\text{l}$ pro testování dermálního podání a $200 \mu\text{l}$ pro transdermální. V případě transdermálního podání byl donorový vzorek přikryt sklíčkem, v případě topického podání byly vzorky studovány bez okluze.

Celková délka pokusu pro transdermální aplikaci byla 72 hodin. Pro průnik látky do systémové cirkulace bylo nutno čekat až do ustálení rovnovážného stavu. Pro topickou aplikaci léčiv byla doba pokusu stanovena na 8 hodin. Vzorky léčiv byly z akceptorové fáze odebírány postranním raménkem v časových intervalech 16h, 20h, 24h, 28h, 40h, 44h, 48h, 52h, 64h, 68h a 72 hodin. Odebráno bylo vždy $300 \mu\text{l}$ vzorku a stejným množstvím pufru byla Franzova cela ihned doplněna.

Vzorky byly přeneseny do vialek s vloženými inserty a uzavřeny plastovým víčkem s teflonovým septem. Po každém odběru následovala stanovení koncentrace látek v akceptorové fázi pomocí HPLC.

Permeační pokus byl ukončen v okamžiku posledního odběru vzorku. Franzovy cely byly následně demontovány. Kůže byla omyta pufrem, v případě lipofilních esterových proléčiv metanolem, a vysušena k odstranění zbytků donorového vzorku. Následovalo mechanické vyseknutí části kůže, která byla vystavena působení léčiva. Pro zjištění přesného množství látky ve stratum corneum jsme použili stripování. Stratum corneum bylo postupně strháno pomocí lepicí pásky typu UrgoFilm přitlačené konstantním tlakem přibližně $1,5 \text{ kg/m}^2$ po dobu 5 sekund na plochu kůže, kterou procházelo testované léčivo. Jednotlivé stripy byly louhovány v 1 ml mobilní fáze a získané extrakty analyzovány pomocí HPLC. K validaci této stripovací metody jsme izolovali samostatně stratum corneum pomocí trypsinu⁶⁰ a provedli pokusy ve Franzových celách pouze s touto vrstvou kůže. Touto metodou bylo nakonec určeno celkové množství léčiva ve stratum corneum.

Zbylé množství tkáně bylo zabaleno do aluminiové fólie a vystaveno teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 min. Po vyjmutí z alobalu byla opatrně oddělena epidermis od dermis. Pečlivě jsme zvážili obě části kůže a hmotnost si zaznamenali. Epidermis i dermis jsme potom samostatně umístili do skleněných vialek. Každý vzorek epidermis byl extrahován v 1 ml směsi metanol/fosfátový pufr v poměru 1:1 (HDP estery v 1 ml metanolu), dermis v 5 ml směsi metanol/fosfátový pufr v poměru 1:1 (HDP estery v 5 ml metanolu) 24 hodin při 32°C . Extrakty byly zfiltrány a analyzovány pomocí HPLC. Takto byla určena celková koncentrace léčiva v kůži po přepočtu na její hmotnost a také obsah léčiva v jednotlivých vrstvách kůže.

3.6. Stanovení léčiva ve vzorcích

3.6.1. Analytická metoda

Veškeré vzorky z pokusu byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

HPLC systém Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) byl složen z vysokotlakých pump LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampleru SIL-20AHT kolonového termostatu CTO-20AC, diode array detektoru SPD-M20A

a fluorescenčního detektoru RF10AXL a komunikačního modulu CBM-20A. Data byla analyzována pomocí software LCsolutions 1.22.

Separace látek č. 1., č. 2., č. 4., č. 5. a č. 7. byla dosažena na koloně SeQuant™ ZIC®-HILIC o rozměrech 150 x 4,6 mm s velikostí částic 5 µm a porozitou 200 Å (Merck, Darmstadt, Německo) pomocí mobilní fáze složené z 25 % 50mM roztoku octanu amonného a 75 % acetonitrilu (v/v) při teplotě 30 °C. Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min a látky byly detekovány při vlnové délce 284 nm (látky č. 1. a č. 2.), 286 nm (látky č. 4.), 289 nm (látky č. 5.) a 253 nm (látky č. 7.) a zároveň fluorescenčně (excitace 280 nm, emise 350 nm). Nástřik vzorku byl 20 µl.

Separace lipofilních proléčiv (látky č. 3. a 6.) byla dosažena na reverzní fázi C8 (kolona LiChroCART 125-4 a s náplní LichroSpher C8, 5 µm, Merck, Darmstadt, Německo) při 30 °C. Mobilní fáze byla složena z 40% 50 mM octanu sodného a 60 % acetonitrilu (v/v) a průtok byl nastaven na 1 ml/min. Látky byly detekovány při vlnové délce 280 nm a zároveň fluorescenčně (excitace 280 nm, emise 350 nm). Nástřik vzorku byl 20 µl.

3.6.2. Kalibrační křivka

Před zahájením pokusu bylo nutno ze zásobních roztoků vzorků naředit kalibrační standardy pro tvorbu kalibrační křivky a validaci metody.

Reálně byl připraven zásobní roztok o koncentraci 200 µM rozpuštěním příslušného množství látky v 50 ml akceptorové fáze pro látky č. 1. (*R*)-PMPDAP; č. 2. (*S*)-PMPDAP; č. 4. (*S*)-HPMPDAP, č. 5. (*S*)-cHPMPDAP a látky č. 7. (*S*)-8-azaHPMPDAP. V ředění pufrem se pokračovalo a ke kalibraci byly použity vzorky o koncentraci 200; 100; 50; 20; 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; a 0,01 µM. Látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP se rozpustily ve 250 ml methanolu na základní koncentraci 20 µM. Postupným ředěním fosfátovým pufrem vznikla řada o koncentracích 20; 15; 10; 5; 2,5; 1 a 0,5 µM.

3.6.3. Analýza dat

Pomocí HPLC bylo určeno kumulativní množství léčiva, které prošlo přes kůži. Ze získaných dat jsme vytvořily grafy tzv. permeačních profilů pro jednotlivé látky, tedy závislost kumulativního množství ANP prošlého přes 1 cm^2 kůže (nmol/cm^2) na čase (h). Proložením přímkou vzniklémi grafy jsme určily tzv. oblast lineárního ustáleného toku permeantů. Ze směrnice této přímkou jsme odečetly flux (tok) J jednotlivých léčiv v jednotkách $\text{nmol/cm}^2/\text{h}$. Porovnáním fluxů s a bez permečního akceleračního DDAK jsme dále zjišťovali hodnoty akceleračního poměru: $AP = J_{\text{s akceleračním}} / J_{\text{bez akceleračního}}$.

Dále jsme pomocí HPLC stanovily množství léčiva v jednotlivých vrstvách kůže. Koncentrace léčiva v kůži byla přepočítána na přesně známou hmotnost kůže.

Data jsou prezentována jako průměr z naměřených hodnot se standardní chybou (SEM). Počet opakování (n) je uveden u jednotlivých grafů. K hodnocení statistické významnosti rozdílů mezi skupinami dat s akceleračním a bez akceleračního byl použit Studentův t-test.

4. VÝSLEDKY

4.1. Transdermální podání

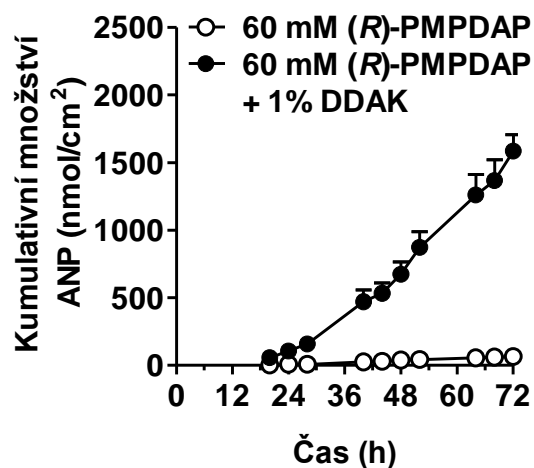
4.1.1. Permeační profily jednotlivých ANP bez a s 1 % akcelerantem DDAK

Permeační profily jednotlivých ANP vyjadřují závislost celkového kumulativního množství léčiva prošlého přes 1 cm^2 kůže v závislosti na čase. Všechny uvedené výsledné hodnoty jsou prezentovány jako průměr ze tří samostatných měření a standardní chyba.

Při porovnání hodnot kumulativního množství prošlého léčiva s 1 % akcelerantem DDAK po ukončení pokusu v čase $t=72 \text{ h}$ lze říci, že nejlépe kůží procházela látka č. 2. (*S*)-PMPDAP s hodnotou kumulativního množství $1982,1 \text{ nmol/cm}^2$. U jejího optického izomeru látky č. 1. (*R*)-PMPDAP výsledné hodnoty nejsou statisticky rozdílné ($1586,3 \text{ nmol/cm}^2$). Přítomnost hydroxylové skupiny u látky č. 4. (*S*)-HPMPDAP se projevila snížením prostupu látky kůží ($777,0 \text{ nmol/cm}^2$). Naopak cyklizací u látky č. 5. (*S*)-cHPMPDAP dochází k výraznému zvýšení ($1114,6 \text{ nmol/cm}^2$) oproti parentní látce. Překvapivě nejnižší výsledků vykazuje látka č. 7. (*S*)-8-azaHPMPDAP s kumulativním množstvím $592,3 \text{ nmol/cm}^2$.

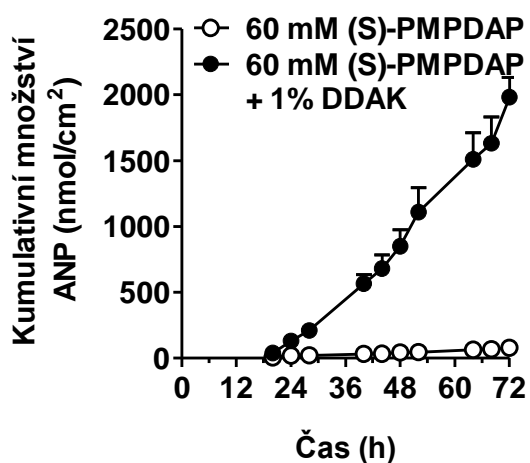
Látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP v tomto přehledu nejsou uvedeny, jelikož pod kůží nebyly detekovány.

4.1.1.1. Látka č. 1. (*R*)-PMPDAP



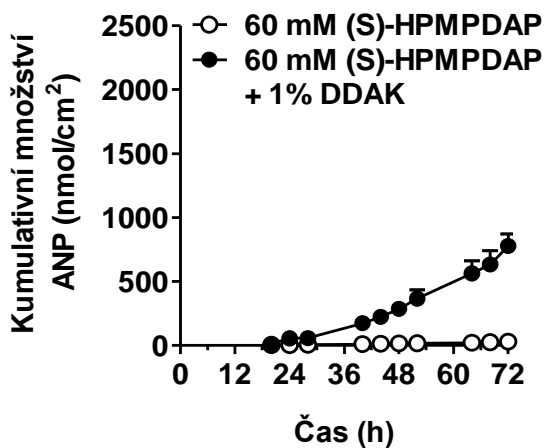
Obr. 8. Kumulativní množství (*R*)-PMPDAP prošlé přes lidskou kůži v závislosti na čase bez akcelarantu a s 1 % DDAK.

4.1.1.2. Látka č. 2. (*S*)-PMPDAP



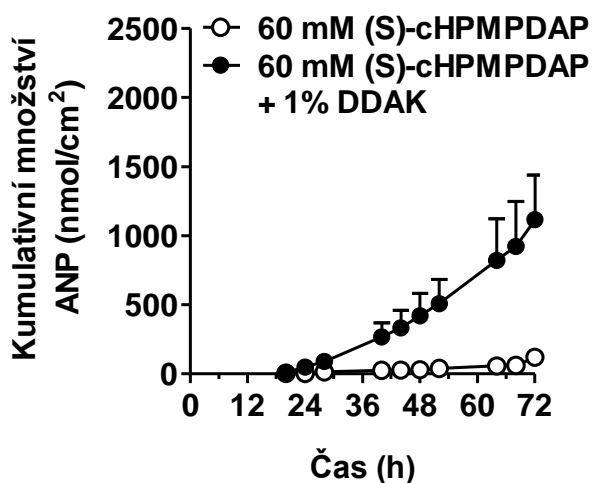
Obr. 9. Kumulativní množství (*S*)-PMPDAP prošlé přes lidskou kůži v závislosti na čase bez akcelarantu a s 1 % DDAK.

4.1.1.3. Látka č. 4. (S)-HPMPDAP

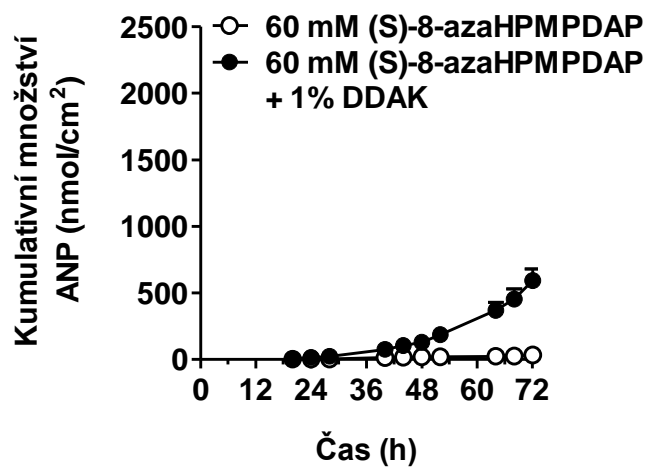


Obr. 10. Kumulativní množství (S)-HPMPDAP prošlé přes lidskou kůži v závislosti na čase bez akceleraantu a s 1 % DDAK.

4.1.1.4. Látka č. 5. (S)-cHPMPDAP



Obr. 11. Kumulativní množství (S)-cHPMPDAP prošlé přes lidskou kůži v závislosti na čase bez akceleraantu a s 1% DDAK.

4.1.1.5. Látka č. 7. (S)-8-azaHPMPDAP

Obr. 12. Kumulativní množství (S)-8-azaHPMPDAP prošlé přes lidskou kůži v závislosti na čase bez akcelarantu a s 1 % DDAK.

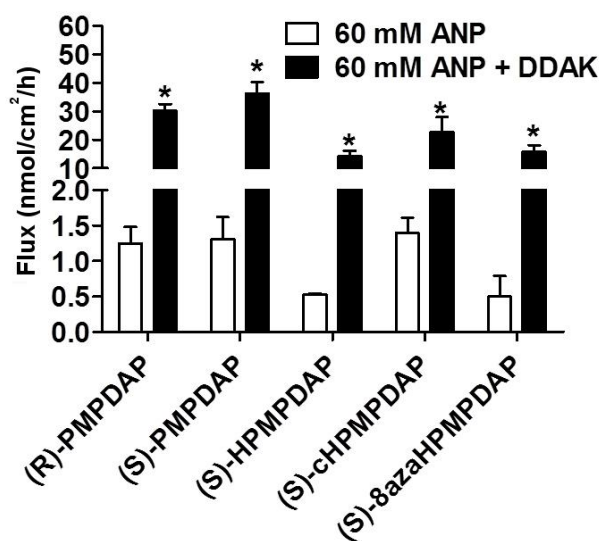
4.1.2. Flux ANP přes kůži bez a s 1 % akcelerantem DDAK a akcelerační poměry (AP) DDAK

Flux (tok) J je veličina vyjádřená v jednotkách $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ popisující ustálený tok permeantu. Z předchozích grafů na Obr. 8 – Obr. 12 se pro jednotlivé látky odečítá jako směrnice přímků. Světlé sloupce vyjadřují tok léčiva přes kůži bez akceleračního poměru, které sloužily jako kontrola. Tmavé vyjadřují tok léčiva přes kůži v kombinaci s 1 % akcelerantem DDAK.

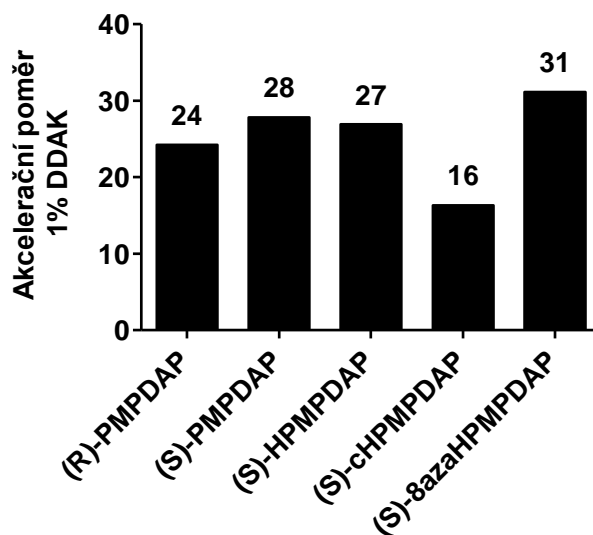
AP vyjadřuje kolikrát ve skutečnosti permeační akcelerační poměr DDAK urychlil průstup léčiva kůží oproti podání bez akceleračního poměru. Jde o podíl hodnot fluxů s akceleračním poměrem a bez akceleračního poměru DDAK ($AP = J_{\text{s akceleračním poměrem}}/J_{\text{bez akceleračního poměru}}$) z Obr. 13.

Hodnoty fluxů léčiv přes kůži bez použití 1% DDAK se pohybují v rozmezí 0,50–1,40 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$, po přidání akceleračního poměru dosahují hodnot 14,1–36,3 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$. Nejvyšší hodnoty fluxu přitom bylo dosaženo u látky č. 2. (*S*)-PMPDAP $J=(36,3 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}, AP=28)$. Naopak nejnižší hodnoty vykazuje látka č. 4. (*S*)-HPMPDAP ($J=14,1 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}, AP=27$), což je dáno zvýšenou hydrofilitou sloučeniny. Díky významné podobnosti výsledků pro látku č. 1. (*R*)-PMPDAP a látku č. 2. (*S*)-PMPDAP lze opět potvrdit, že optické izomerie nemá vliv na průstup těchto látek kůží.

Největšího efektu akcelerační poměr DDAK prokazuje u látky (*S*)-8-azaHPMPDAP s $AP=31$. Souhrně lze říci, že DDAK zvýšil permeaci testovaných léčiv kůží v rozmezí 16-31krát. Flux studovaných ANP je znázorněn na Obr. 13., akcelerační poměry v grafu na Obr. 14. Všechny výsledky jsou shrnuty v Tab. 5.



Obr. 13. Flux studovaných ANP přes lidskou kůži s akcelerantem a bez akcelerantu. Průměr \pm SEM, $n=3$, * značí statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$.



Obr. 14. Akcelerační poměry DDAK pro jednotlivé studované ANP.

látka	flux (nmol/cm ² /h)		akcelerační poměr
	bez DDAK	s DDAK	
(<i>R</i>)-PMPDAP	1,25±0,23	30,2±2,3	24
(<i>S</i>)-PMPDAP	1,31±0,31	36,3±4,1	28
(<i>S</i>)-HPMPDAP	0,53±0,02	14,1±2,1	27
(<i>S</i>)-cHPMPDAP	1,40±0,22	22,7±5,3	16
(<i>S</i>)-8-azaHPMPDAP	0,50±0,29	15,7±2,5	31

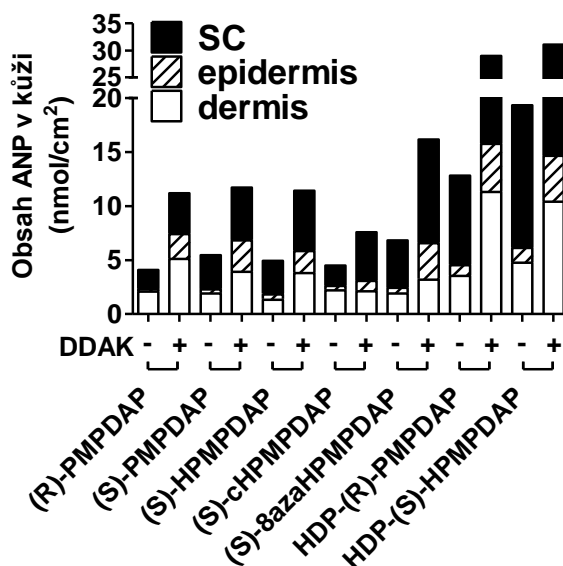
Tab. 5. Hodnoty fluxů a akceleračních poměrů všech látek.

4.2. Dermální podání

4.2.1. Obsah ANP v jednotlivých vrstvách kůže po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK

Obsah S vyjadřuje celkové množství látky v kůži v jednotkách nmol/cm^2 . Výsledné hodnoty jsou opět dány aritmetickým průměrem nejméně ze tří samostatných pokusů. Nejvyššího obsahu dosahují všechny látky ve SC. Prokazatelně nejvíce se zde kumulují látky č. 3. HDP-(R)-PMPDAP č. 6. HDP-(S)-HPMPDAP s obsahem $13,24 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ a $16,37 \text{ nmol}/\text{cm}^2$. Tato esterová proléčiva dosahují ovšem nejvyšších hodnot také v epidermis ($S=4,44 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ a $S=4,25 \text{ nmol}/\text{cm}^2$) i dermis ($S=11,32 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ a $S=10,39 \text{ nmol}/\text{cm}^2$). Přehled souhrnných výsledků je uveden v Tab. 6.

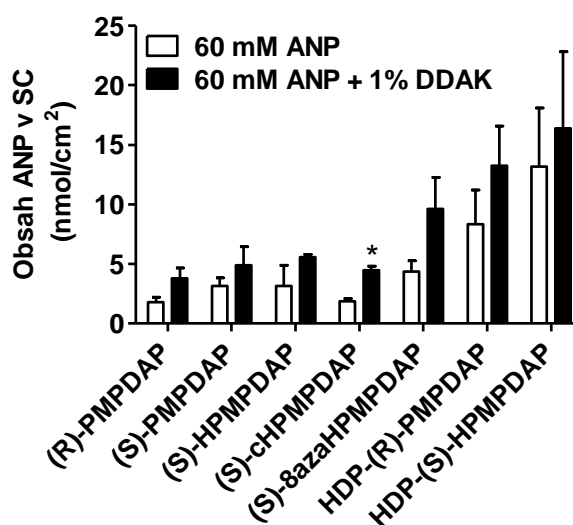
4.2.1.1. Celkový přehled ve všech vrstvách kůže



Obr. 15. Znázornění obsahu v jednotkách nmol/cm^2 všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK.

4.2.1.2. Stratum corneum

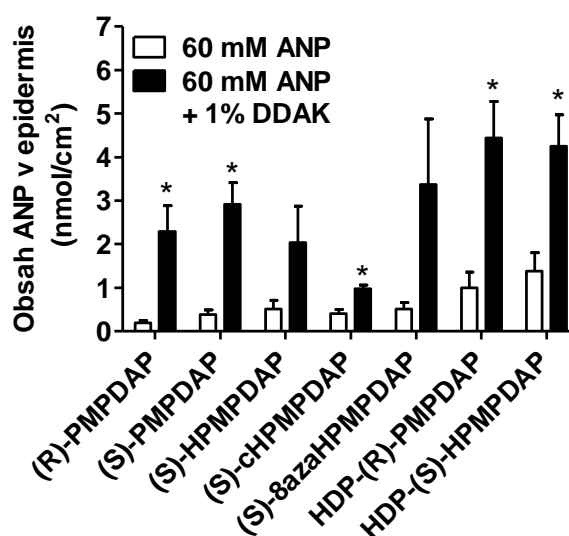
Hodnoty obsahu léčiv ve SC bez přítomnosti 1 % DDAK se pohybují v rozmezí 1,78–13,17 nmol/cm². Po přidání akceleraantu dosahují rozmezí 3,78–16,37 nmol/cm².



Obr. 16. Znázornění obsahu v jednotkách nmol/cm² všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1 % akceleraantem DDAK ve stratum corneum.

4.2.1.3. Epidermis

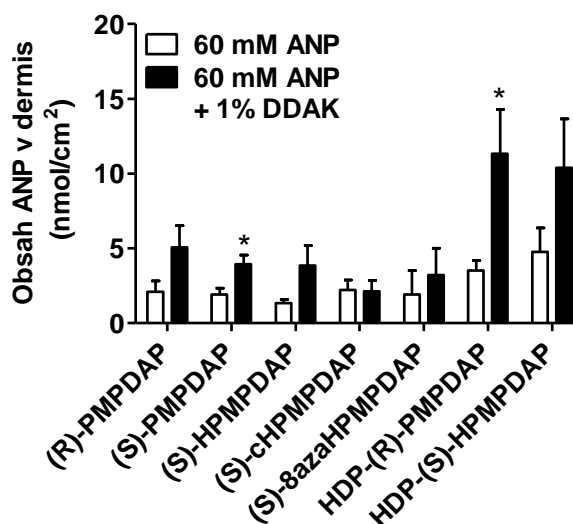
Obsah studovaných ANP v epidermis byl v rozmezí 0,20–1,38 nmol/cm² bez 1 % akcelerantem DDAK. Po jeho přidání bylo dosaženo hodnot v rozmezí 0,98–4,44 nmol/cm².



Obr. 17. Znázornění obsahu v jednotkách nmol/cm² všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK v epidermis.

4.2.1.4. Dermis

Obsah látek v dermis bez 1 % DDAK byl 1,33–4,76 nmol/cm², přidáním akcelerantu se obsah zvyšuje více než 2x až na hodnoty 2,13–11,32 nmol/cm².



Obr. 18. Znázornění obsahu v jednotkách nmol/cm² všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1% akcelerantem DDAK v dermis.

látka	SC		epidermis		dermis	
	bez	s	bez	s	bez	s
	DDAK		DDAK		DDAK	
(R)-PMPDAP	1,78	3,78	0,20	2,29	2,09	5,07
(S)-PMPDAP	3,15	4,90	0,38	2,91	1,90	3,93
(S)-HPMPDAP	3,13	5,55	0,51	2,03	1,33	3,83
(S)-cHPMPDAP	1,87	4,58	0,41	0,98	2,20	2,13
(S)-8-azaHPMPDAP	4,37	9,60	0,52	3,37	1,90	3,20
HDP-(R)-PMPDAP	8,33	13,24	1,00	4,44	3,52	11,32
HDP-(S)-HPMPDAP	13,17	16,36	1,38	4,25	4,76	10,39

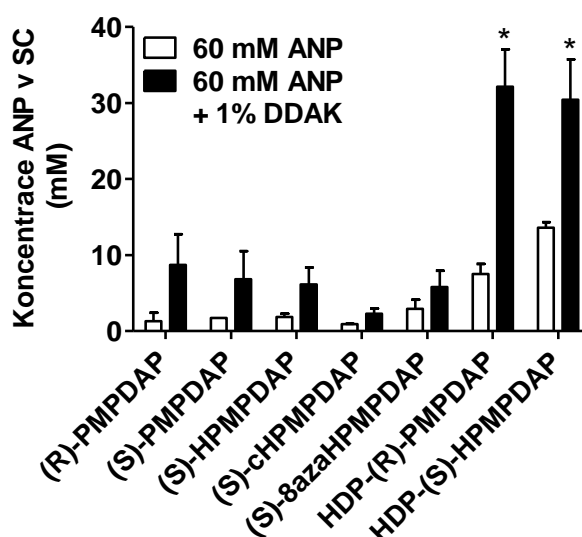
Tab. 6. Obsah ANP v jednotkách nmol/cm² v jednotlivých vrstvách kůže.

4.2.2. Koncentrace ANP v jednotlivých vrstvách kůže po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK

Koncentrace c vyjadřuje celkové množství látky prostoupené kůží přepočtené na přesně známou hmotnost této kůže v jednotkách mM nebo μM . Výsledné hodnoty jsou opět dány aritmetickým průměrem ze tří samostatných pokusů. Přehled souhrnných výsledků je uveden v Tab. 7.

4.2.2.1. Stratum corneum

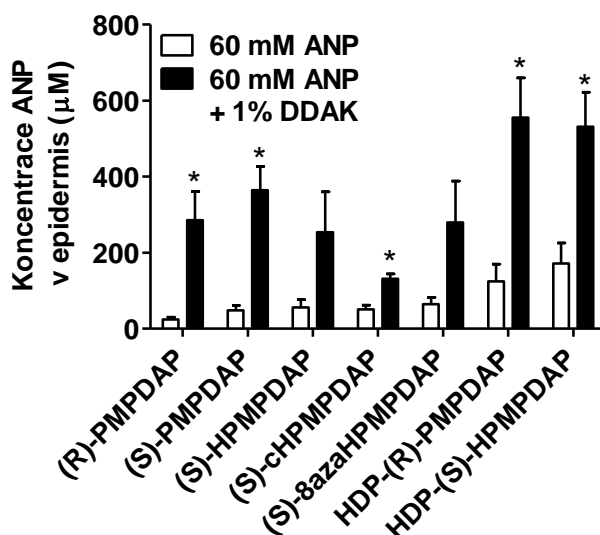
Všechny testované látky dosahovaly nejvyšších výsledků ve stratum corneum, kde se koncentrační hodnoty pohybují v řádech mM. Bez přítomnosti 1 % DDAK se byly stanoveny koncentrace v rozmezí 0,91–13,62 mM. Hodnoty byly zvýšeny více než 2x po přidání 1% DDAK. Nejvyšší koncentrace přitom mají látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP ($c=32,13$ mM a $c=30,43$ mM). Výraznou podobnost můžeme sledovat u látek č. 2 (*S*)-PMPDAP s $c=6,80$ mM, č. 4. (*S*)-HPMPDAP s $c=6,13$ mM a č. 7. (*S*)-8-azaHPMPDAP s $c=5,80$ mM. Nejnižší hodnota ve všech vrstvách po celou dobu pokusu byla naměřena u látky č. 5. (*S*)-cHPMPDAP($c=2,30$ mM ve SC).



Obr. 19. Znárodnění koncentrace v jednotkách mM všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK ve stratum corneum.

4.2.2.2. Epidermis

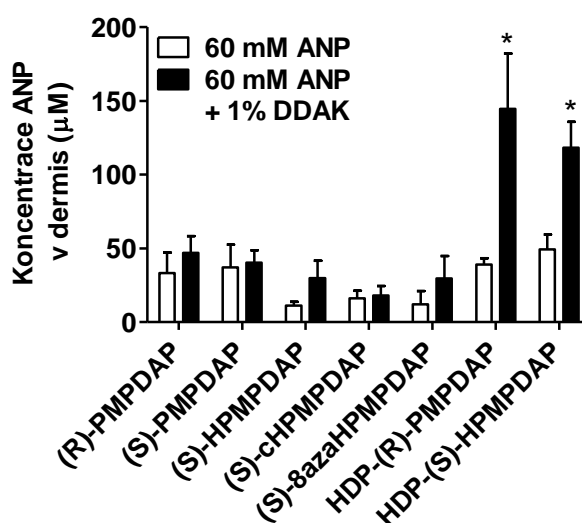
Nejvíce nás zajímala epidermis, jakožto místo nejčastějšího výskytu kožních infekcí. Koncentrační hodnoty se pohybovaly v řádech μM a bez akcelerantu byly naměřeny v rozmezí 24,46–172,08 μM . Použitím akcelerantu ovšem bylo dosaženo až 3násobného zvýšení. I zde byly opět získány nejvyšší hodnoty pro látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP s $c=554,81 \mu\text{M}$ a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP s $c=531,25 \mu\text{M}$. Při porovnání izomerie dosahuje v epidermis vyšších koncentrací (*S*)-PMPDAP s $c=364,29 \mu\text{M}$, než (*R*)-PMPDAP s $c=285,71 \mu\text{M}$.



Obr. 20. Znárodnění koncentrace v jednotkách μM všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1 % akcelerantem DDAK v epidermis.

4.2.2.3. Dermis

Bez přítomnosti 1 % permeačního akceleračního DDAK se koncentrace v epidermis pohybují v hodnotách 11,27–49,34 μM . DDAK zvýšil koncentraci v epidermis více než 2x až na hodnoty 18,20–144,60 μM . Pro dermis taktéž platí největší kumulace lipofilních proléčiv č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP s $c=144,60 \mu\text{M}$ a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP s $c=118,26 \mu\text{M}$.



Obr. 21. Znázornění koncentrace v jednotkách μM všech testovaných ANP po 8h podání bez a s 1 % akceleračním DDAK v dermis.

látka	SC (mM)		epidermis (μM)		dermis (μM)	
	bez	s	bez	s	bez	s
	DDAK		DDAK		DDAK	
(<i>R</i>)-PMPDAP	1,33	8,73	24,46	285,71	33,23	47,07
(<i>S</i>)-PMPDAP	1,74	6,80	47,92	364,29	37,10	40,30
(<i>S</i>)-HPMPDAP	1,86	6,13	56,42	254,17	11,27	29,77
(<i>S</i>)-cHPMPDAP	0,91	2,30	51,25	131,46	16,10	18,20
(<i>S</i>)-8-azaHPMPDAP	2,93	5,80	64,58	279,43	12,05	29,60
HDP-(<i>R</i>)-PMPDAP	7,52	32,13	124,41	554,81	39,08	144,60
HDP-(<i>S</i>)-HPMPDAP	13,6	30,43	172,08	531,25	49,34	118,26

Tab. 7. Koncentrace ANP v jednotlivých vrstvách kůže.

5. DISKUZE

Z dřívějších pokusů bylo zjištěno, že schopnost ANP procházet samostatně je obecně velmi nízká. Hodnoty permeace ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu studovaných v této práci se pohybují v hodnotách 0,5-1,4 nmol/cm²/h. Jelikož se jedná o látky s vysokým využitelným potenciálem, bylo cílem práce usnadnit a urychlit jejich prostupnost kůží za pomoci permeačního akceleraantu DDAK.

Pro transdermální i dermální studium aplikace látek jsme používali Franzovy difúzní cely, které umožňují jednak stanovení ANP v akceptorové fázi, tak i jejich stanovení v kůži. Studována byla vždy řada 60 mM vzorků v 60 % propylenglykolu jako kontrolní skupina a s přidáním 1 % DDAK jako testovaná skupina. Propylenglykol byl přidáván jako akcelerační činidlo zvyšující účinek DDAK.⁴

5.1. Transdermální podání

Celkem bylo pro transdermální podání studováno 7 sloučenin ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu. Sledovali jsme flux jednotlivých léčiv, k jehož výpočtu jsme použili směrnice přímků z permeačních profilů. Účinnost 1 % DDAK byla vždy srovnávána s kontrolní skupinou vzorků a je vyjádřena akceleračním poměrem (AP). Výsledky jsou shrnuty v grafech na Obr. 13. a Obr. 14. a v Tab. 5.

Bylo zjištěno, že optická izomerie pravděpodobně nebude mít vliv na transport látek kůží. Nebyly totiž zjištěny žádné statisticky významné rozdíly hodnot fluxů za přítomnosti 1% DDAK v čase t=72h u látky č. 1. (R)-PMPDAP (J=30,2±2,3 nmol/cm²/h, AP=24) a látky č. 2. (S)-PMPDAP (J=36,3±4,1 nmol/cm²/h, AP=28). Látka č. 2. přitom dosáhla nejvyšší hodnoty J ze všech testovaných látek.

Přítomnost hydroxyly ve spojovacím řetězci mezi purinovým cyklem a fosfonátem zvyšuje hydrofilitu sloučeniny a tedy snižuje její průnik přes kůži. Látka č. 4. (S)-HPMPDAP vykazuje dokonce celkově nejnižší hodnotu fluxu

ze všech testovaných látek ($J=14,1\pm 2,1$ nmol/cm²/h). Zajímavý ovšem je výrazný vliv akceleraantu 1 % DDAK s $AP=27$.

Cyklizací za tvorby esterů se zvyšuje flux látky č. 5. (*S*)-cHPMPDAP až na úroveň $J=22,7\pm 5,3$ nmol/cm²/h. V tomto případě ale 1 % DDAK vykazuje nejmenší vliv ($AP=16$). Zajímavé je, že tato sloučenina měla nejvyšší flux ze všech testovaných ovšem bez použití 1 % DDAK ($J=1,40\pm 0,22$ nmol/cm²/h).

DDAK vykazuje nejvyšší akcelerační poměr 31 ($J=15,7\pm 2,5$ nmol/cm²/h) u látky č. 7. (*S*)-8-azaHPMPDAP.

U transdermálního podání námi testovaných látek jsme tedy zjistili, že permeační akceleraant 1% DDAK urychluje prostupnost testovaných látek kůží 16-31krát, tedy až na hodnoty $J=36,3\pm 4,1$ nmol/cm²/h.

Látky typu esterových proléčiv č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP nebyly pod kůží detekovány. Ani 1 % DDAK nebyl schopný zvýšit jejich průchod kůží na měřitelné hodnoty.

Pro porovnání lze uvést efekt 1 % DDAK na flux adefoviru při $pH=5,8$. Při testování na prasečí kůži 1% DDAK zvýšil flux 42krát na hodnotu 27 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, tedy 98,8 nmol/cm²/h. V testech na lidské kůži (stejně jako v případě této práce) potom došlo ke zvýšení fluxu 179krát na $J=8,9\pm 2,4$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ($=32,6\pm 8,8$ nmol/cm²/h).³⁴ Dosažený flux pro adefovir je tedy nižší, než hodnota maximálního fluxu u látky č. 2. (*S*)-PMPDAP ($J=36,3\pm 4,1$ nmol/cm²/h). Pro kombinaci 1 % DDAK a adefoviru je AP 13,6.³⁴ AP pro 1 % DDAK pro námi testované látky byl přitom až 31, z čehož vyplývá výraznější efekt permeačního akceleraantu na permeaci látek ze skupiny 2,6-diaminopurinu, než pro adefovir.

Z fluxů pro jednotlivá léčiva lze spočítat, kolik látky se vstřebá z náplasti o velikosti 30 cm² za 24 hodin. Pro látku č. 1. (*R*)-PMPDAP 21,7 μmol , látku č. 2 (*S*)-PMPDAP 26,1 μmol , látku č. 4. (*S*)-HPMPDAP 10,2 μmol , látku č. 5 (*S*)-cHPMPDAP 16,3 μmol a látku č. 7. (*S*)-8-azaHPMPDAP 11,3 μmol .

(*R*)-PMPA se jako tenofovir disoproxil fumarát ($M_w=635,5$ g/mol) podává v dávce 300 mg/den (472 μmol) HIV-pozitivním pacientům. Jeho biodostupnost je 25 %, z čehož vyplývá, že jen 118 $\mu\text{mol}/\text{den}$ stačí pro léčbu HIV. Látka č. 1. (*R*)-PMPDAP s $EC_{50}=0,170\pm 0,08$ μM je přitom vůči HIV-1 více než 30x účinnější, než (*R*)-PMPA s $EC_{50}=5,9\pm 0,45$ μM .⁴⁷ Z uvedeného tedy vyplývá, že látka č. 1. (*R*)-PMPDAP by se teoreticky mohla transdermálně aplikovat velmi dobře, jelikož by poskytovala systémové účinky potřebné pro inhibici viru HIV-1.

Bohužel toto tvrzení neplatí pro žádnou jinou testovanou látku. Ostatní sloučeniny jsou vůči HIV-1 výrazně méně účinné než (*R*)-PMPA.

5.2. Topická aplikace

Pro topické podání je aplikována tzv. konečná dávka léčiva. Opět bylo studováno všech 7 sloučenin ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu. Pro topické podání je aplikována tzv. konečná dávka léčiva. Při dermálním způsobu podání se totiž předpokládá působení látek pouze lokálně v podobě mastí či krémů. Není tedy potřeba detekovat léčivo pod kůží a dosáhnout systémových koncentrací. Výsledné koncentrace léčiv v jednotlivých vrstvách kůže s 1% DDAK jsou znázorněny na Obr. 19., Obr. 20., Obr. 21. a v Tab. 7.

Celkově největších koncentrací námi testovaných ANP bylo dosaženo ve stratum corneum, kde se hodnoty pohybují v řádech mM. Nejvyšších hodnot zde dosáhly látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP $c=32,13$ mM a látky č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP $c=30,43$ mM. Nejnižší hodnoty ve SC, stejně jako u transdermální aplikace, byly naměřeny u látky č. 5. (*S*)-cHPMPDAP $c=2,3$ mM. Koncentrace pro látku č. 1. (*R*)-PMPDAP je 8,73 mM, zatímco pro látku č. 2. (*S*)-PMPDAP jen 6,80 mM.

Stěžejní pro nás bylo určení koncentrace látek v epidermis. Tato vrstva kůže je totiž místem nejčastějšího výskytu infekcí. Hexadecyloxypropyl ester (*R*)-PMPDAP a hexadecyloxypropyl ester (*S*)-HPMPDAP zde dosahují vyšších koncentrací než jejich parentní látky (pro látku č. 3. $c=554,81$ μ M a pro látku č. 6. $c=531,25$ μ M). Tato esterová proléčiva totiž napodobují lysolipidy a kumulují se v buněčných membránách. Vzhledem k tomu, že jsme nedetekovali tyto látky v akceptorové fázi, se zdá být velmi výhodná především jejich dermální aplikace, jelikož nebudou vykazovat prvky systémové toxicity. Při pokusech ovšem nebylo pozorováno jejich štěpení na původní látky. Studium metabolismu bude vyžadovat pokusy na viabilní kůži.

Zajímavý je fakt vyšší koncentrace látky č. 2. (*S*)-PMPDAP s $c=364,29$ μ M, než látky č. 1. (*R*)-PMPDAP s $c=285,71$ μ M. Nejhorší průnik do epidermis vykazuje látka č. 5. (*S*)-cHPMPDAP s $c=131,46$ μ M. Bylo prokázáno, že permeační akcelerační 1 % DDAK zvyšuje koncentraci všech ANP v epidermis 5,5krát.

Taktéž v dermis jeví největší kumulaci látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP $c=144,60 \mu\text{M}$ a látky č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP $c=118,26 \mu\text{M}$.

Při srovnání účinnosti vzájemných optických izomerů lze potvrdit všeobecně vyšší aktivitu *R*-izomerů. Koncentrace látky č. 1. (*R*)-PMPDAP celkově ve všech vrstvách kůže byla $9062,78 \mu\text{M}$, pro látku č. 2. (*S*)-PMPDAP jen $7204,59 \mu\text{M}$.

Celkově nejvyšších koncentrací v kůži dohromady ve SC, epidermis a dermis s 1 % DDAK bylo naměřeno u látky č. 3 HDP-(*R*)-PMPDAP ($c=32,83 \text{ mM}$). Při aplikaci adefoviru v kombinaci s 1 % DDAK bylo v kůži dosaženo $c=778 \mu\text{g/g}$ (tedy $c=2,85 \text{ mM}$).³⁴ Z uvedených výsledků lze vyvodit závěr, že látka č. 3 bude po podání s 1 % DDAK v kůži dosahovat více než 10ti násobné koncentrace ve srovnání s adefovirem a bude tedy jednoznačně výhodnější pro topické podání. Zmíněný závěr lze také podpořit faktem, že všechny testované látky dosáhly v kůži celkově vyšších koncentrací, než adefovir. Výjimkou je pouze látka č. 4 (*S*)-HPMPDAP. Jestliže je koncentrace testované látky dosažená v kůži vyšší, než její EC_{50} proti daným typům virů vyskytujících se v kůži, pak tato dosažená koncentrace bude také pravděpodobně dostatečná pro účinek. Velmi perspektivně se jeví látka č. 4. (*S*)-HPMPDAP s koncentrací v epidermis $254,17 \mu\text{M}$ jak pro léčbu HHV-6 ($\text{EC}_{50}=26\pm 3,1 \mu\text{M}$)⁴⁸, HSV-1 ($\text{EC}_{50}=0,22\pm 0,22 \mu\text{M}$), HSV-2 ($\text{EC}_{50}=1,0\pm 0,56 \mu\text{M}$) i VZV ($\text{EC}_{50}=2,0\pm 1,1 \mu\text{M}$).⁴⁷ Taktéž koncentrace $c=131,46 \mu\text{M}$ pro látku č. 5. (*S*)-cHPMPDAP bude stačit pro účinek na HSV-1, HSV-2 i VZV, kdy převýšila jejich EC_{50} .⁵⁵ Naopak látka č. 1. (*R*)-PMPDAP ($c=285,71 \mu\text{M}$), ani látka č. 2 (*S*)-PMPDAP ($c=364,29 \mu\text{M}$) nebudou v získaných koncentracích postačovat pro inhibici HSV-1 ($\text{EC}_{50}=496 \mu\text{M}$, $\text{EC}_{50}=993 \mu\text{M}$).⁴⁷ Látky typu esterových proléčiv č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP ($c=554,81 \mu\text{M}$) a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP ($c=531,25 \mu\text{M}$) dosahují v kůži daleko vyšších koncentrací, než by bylo potřeba pro léčbu HIV-1 ($\text{EC}_{50}=0,04\pm 0,02 \mu\text{M}$).⁵⁸ Nicméně ani v těchto koncentracích nehrozí u HDP esterů systémové účinky.

6. ZÁVĚR

V této práci bylo testováno celkem 7 známých sloučenin ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu se širokým spektrem biologických účinků. Studovali jsme možnosti jejich transdermální a dermální aplikace a také vliv permeačního akceleraantu DDAK.

Pokud jde o transdermální podání, je schopnost těchto látek samostatně procházet kůží obecně velmi nízká a jejich využití v terapii tedy nereálné. Naopak při současné aplikaci s permeačním akceleraantem DDAK dosahují studované látky hodnot fluxu až 36,3 nmol/ cm²/h. Tyto látky by bylo možno v praxi použít v podobě transdermálních náplastí.

Nejzajímavější výsledky pro topickou aplikaci jeví látky č. 3. HDP-(*R*)-PMPDAP a č. 6. HDP-(*S*)-HPMPDAP. Tato esterová prolečiva se výrazně kumulují v epidermis a nedochází k systémové absorpci. Z tohoto důvodu bude velmi výhodné jejich dermální podání.

Závěrem lze říci, že kombinací velmi účinných ANP ze skupiny 2,6-diaminopurinu s permeačním akceleraantem DDAK se nabízí jejich široké využití pro transdermální i dermální formu aplikace.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

ACV (Acyclovir)-2-amino-1,9-dihydro-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6*H*-purin-6-on

AIDS - syndrom získané lidské imunodeficiencie

ANP - acyklické nukleosidfosfonáty

ANPp - acyklický nukleosidfosfonát monofosfát

ANPpp - acyklický nukleosidfosfonát difosfát

AP - akcelerační poměr

ASFV – African swine fever virus

AZT (Zidovudin) – 3'-azido-3'-deoxythymidin

CMV - cytomegalovirus

Cyclic-(*S*)-HPMPDAP-cyklická forma

9-(*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurinu

DDAK - dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové

DDAIP – dodecyl ester kyseliny 2-(dimethylamino)propanové

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EBV - virus Epsteina-Barrové

EC₅₀ – střední účinná koncentrace

FDA - Food and Drug Administration

FIV - feline immunodeficiency virus

HBV – human hepatitis B virus

HDP – hexadecyloxypropyl

HIV - human immunodeficiency virus

HHV-6 - human herpesvirus typu 6

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSV - herpes simplex virus

IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace

MCV - virus molluscum contagiosum

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MK - mastná kyselina

MK-686 - hexadecyloxypropyl ester (*S*)-HPMPDAP-sodná sůl

MK-735 - hexadecyloxypropyl ester (*R*)-PMPDAP

MW - molekulová hmotnost

PMEA (Adefovir) – 9-2-(fosfonylmethoxyethyl)adenin
PMEDAP – 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurin
RNA - ribonukleová kyselina
(*R*)-PMPA (Tenofovir) – 9(*R*)-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
(*R*)-PMPDAP - (*R*)-9-(2-fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurin
SC - stratum corneum
(*S*)-HPMPA – (*S*)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adenine
(*S*)-HPMPDAP - 9-(*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
(*S*)-HPMPC (Cidofovir) - (*S*)-9[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosine
(*S*)-PMPDAP - (*S*)-9-(2-fosfonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurin
TNF- α - tumor nekrotizující faktor α
TTS – transdermální terapeutický systém
T12 – Transkarbam 12
VMK - vyšší mastná kyselina
VV – vaccinia virus
VZV - varicella zooster virus
8-aza HPMPDAP- 8-aza-9-{(*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]}-2,6-diaminopurin

8. LITERATURA

- ¹ A. Holý. Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides. *Curr Pharm Design* 2003, Sv. 9, stránky 2567-2592.
- ² P. Jansa. Acyklické nukleosidfosfonáty po dvaceti letech: Současný stav a perspektivy aneb co jsou zázračné léky prof. A. Holého. Seminář experimentální a klinické hepatologie. *Hepin* 2011, stránka 8.
- ³ A. Hrabálek, K. Vávrová. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt lékáren* 2005, Sv. 1, stránky 8-10.
- ⁴ K. Vávrová, K. Lorencová, J. Klimentová, J. Novotný, A. Holý, A. Hrabálek. Transdermal and dermal delivery of adefovir: effects of pH and permeation enhancers. *Eur J Pharm Biopharm* 2008, Sv. 69, stránky 597-604.
- ⁵ A. C. Williams. Transdermal and Topical Drug Delivery. *Pharmaceutical Press*. 2003, stránky 35-40. ISBN: 0-85369-489-3.
- ⁶ L. Kotingová, L. Borská, Z. Fiala, Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. *Chem Listy* 2009, Sv. 103, stránky 533-539.
- ⁷ R. Čihák. Anatomie 3. *Grada Publishing a.s.* 2004, stránky 559-564. ISBN: 978-80-247-1132-4.
- ⁸ z <http://files.playpiercing.webnode.cz/200000021-4cf764df0d/kuze001.jpg> ze dne 19.11. 2012
- ⁹ z <http://www.infobarrel.com/media/image/95636.jpg> ze dne 19.11. 2012
- ¹⁰ M. Janssens, J. Smeden, G. S. Gooris, W. Bras, G. Portale, P. J. Caspers, R. J. Vreeken, T. Hankemeier, S. Kezic, R. Wolterbeek, A. P. Lavrijsen, J. A. Bouwstra. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* 2012, Sv. 53, stránky 2755-2766.
- ¹¹ K. Vávrová, A. Hrabálek. Role ceramidů v kůži. *Prakt lékáren* 2006, Sv. 2, stránky 55-58.
- ¹² G. K. Menon, G.W. Cleary M. E. Lane. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharmaceut* 2012, Sv. 435, stránky 3-9.
- ¹³ R. H. Guy, J. Hadgraft. Physiochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. *Pharm Res* 1988, Sv. 5, stránky 753-758.

- ¹⁴ S. Law, P. W. Wertz, D. C. Swartzendruber, C. A. Squier. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1995, Sv. 40, stránky 1085–1091.
- ¹⁵ A. Žák a kolektiv. Ateroskleróza. *Grada Publishing a.s.* 2003, stránka 61, ISBN: 8024730529, 9788024730523.
- ¹⁶ E. Dastychová. Atopický ekzém. *Med Pro Praxi* 2009, Sv. 6, stránky 67-78.
- ¹⁷ K. Macháčková. Bariérová funkce kůže-nový pohled při péči o dětskou pokožku. *Pediatr Praxi* 2012, Sv. 13, stránky 16–18.
- ¹⁸ J. Záhejský. Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické. *Grada Publishing a.s.* 2006, stránka 33, ISBN: 80-247-1551-1
- ¹⁹ P. W. Wertz. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm-Venereol* 2000, Sv. 208, stránky 7-11.
- ²⁰ H. A. E. Benson. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* 2005, Sv. 2, stránky 23-33.
- ²¹ V. V. Ranade. Drug delivery systems. 6. Transdermal drug delivery. *J Clin Pharmacol* 1991, Sv. 31, stránky 401-418.
- ²² M. Dostálek. Farmakokinetika. *Grada Publishing a.s.* 2006, stránky 77-78, ISBN: 8024714647, 9788024714646.
- ²³ J. Urquhart, K. Chandrasekaran, J. Shaw. Method and therapeutic system for administering skopolamine transdermally. US 4262003. 1981.
- ²⁴ M. F. Wilkosz, R. H. Bogner. Transdermal Drug Delivery. *U S Pharmacist* 2008, Sv. 28.
- ²⁵ R. Jiráček. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt lékařem* 2012, Sv. 8, stránky 107-108.
- ²⁶ B. J. Thomas, B. C. Finnin. The transdermal revolution. *Drug Discov Today* 2004, Sv. 9, stránky 697-703.
- ²⁷ H. Abraham, S. Chanda, C. Mitchell. The factors that influence skin penetration of solutes. *J Pharm Pharmacol* 1995, Sv. 47, stránky 8-16.
- ²⁸ M. R. Prausnitz, S. Mitragotri, R. Langer. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004, Sv. 3, stránky 115-123.
- ²⁹ A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Šklubalová, O. Farsa, A. Krebs. Akceleranty transdermální penetrace. *Chem Listy* 1999, Sv. 93, stránky 107-119.

- ³⁰ V. J. Rajadhyaksha, Vehicle composition containing 1-substituted azacycloheptan-2-ones. US patent 3,989,816. 1976.
- ³¹ B. W. Barry. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Controlled Release*. 1987, Sv. 6, stránky 85-97.
- ³² T. J. Franz. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 1975, Sv. 64, stránky 190-195.
- ³³ A. Hrabálek, P. Doležal, O. Farsa, Z. Šklubalová, J. Kuneš. Esters of 6-dimethylaminohexanoic acid as skin penetration enhancers. *Pharmazie* 2000, Sv. 55, stránky 759-761.
- ³⁴ K. Vávrová, K. Lorencová, J. Novotný, A. Holý, A. Hrabálek. Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: Influence of pH, ion-pairing and skin species. *Eur J Pharm Biopharm* 2008, Sv. 70, stránky 901-907.
- ³⁵ S. Buyuktimkin, N. Buyuktimkin, J. H. Rytting. Synthesis and enhancing effect of dodecyl 2-(N,N-dimethylamino)proprionate on the transepidermal delivery of indometacin, clonidine, and hydrocortisone. *Pharm Res* 1993, Sv. 10, stránky 1632-1637.
- ³⁶ A. Hrabálek, P. Doležal, K. Vávrová, J. Zbytovská, T. Holas, J. Klimentová, J. Novotný. Synthesis and enhancing effect of transkarbam 12 on the transdermal delivery of theophylline, clotrimazole, flobufen, and griseofulvin. *Pharm Res* 2006, Sv. 23, stránky 912-919.
- ³⁷ J. Novotný, P. Kovaříková, M. Novotný, B. Janůšová, A. Hrabálek, K. Vávrová. Dimethylamino Acid Esters as Biodegradable and Reversible Transdermal Permeation Enhancers: Effects of Linking chain Length, Chirality and Polyfluorination. *Pharm Res* 2008, Sv. 26, stránky 811-821.
- ³⁸ O. Farsa, P. Doležal, A. Hrabálek. Esters and amides of hexanoic acid substituted with tertiary amino group in terminal position and their activity as transdermal permeation enhancers. *J Serb Chem Soc* 2010, Sv. 75, stránky 595-603.
- ³⁹ M. Danta, G. Dusheiko, Adefovir dipivoxil: review of a novel acyclic nucleoside analogue. *In. J Clin Pract* 2004, Sv. 58, stránky 877-886.
- ⁴⁰ K. Vávrová, P. Kovaříková, B. Školová, M. Libalová, J. Roh, R. Čáp, A. Holý, A. Hrabálek. Enhanced topical and transdermal delivery of antineoplastic and antiviral acyclic nucleoside phosphonate cPR-PMEDAP. *Pharm Res* 2011, Sv. 28, stránky 3105-3115.

- ⁴¹ A. Holý. Habilitační práce. Acyklické nukleosidfosfonáty: představy a skutečnost. Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. 2003.
- ⁴² E. De Clercq. Clinical potential of acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Mikrobiol Rev* 2003, Sv. 16, stránky 569-596.
- ⁴³ A. Holý, N-Phosphonylmethoxyalkyl Derivates of Pyrimidine and Purine Bases and a Therapeutical Composition Therefrom with Antiviral Activity. US patent 5, 142, 051. 1992.
- ⁴⁴ E. De Clercq. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: Historical perspective. *Antivir Res* 2007, Sv. 75, stránky 1-13.
- ⁴⁵ Z. Zidek, P. Potměšil, E. Kmoníková, A. Holý. Immunobiological activity of N-[2-(phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of N⁶-substituted adenines, and 2,6-diaminopurines. *Eur J Pharm* 2003, Sv. 475, stránky 149-159.
- ⁴⁶ J. Balzarini, S. Aquaro, C. F. Perno, M. Witvrouw, A. Holý, E. De Clercq. Activity of the (R)-Enantiomers of 9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)-Adenine and 9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine against Human Immunodeficiency Virus in Different Human Cell Systems. *Biochem Bioph Res Co* 1996, Sv. 219, stránky 337-341.
- ⁴⁷ J. Balzarini, Holý, J. Jindrich, L. Naesens, R. Snoeck, D. Schols, E. De Clercq. Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective in vitro and *in vivo* antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993, Sv. 3, stránky 332-338.
- ⁴⁸ D. Reymen, L. Naesens, J. Balzarini, A. Holý, H. Dvořáková, E. De Clercq. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antivir Res* 1995, Sv. 28, stránky 343-357.
- ⁴⁹ N. Justa, K. Weber, D. Klein, R. S. Mueller, C. Sauter-Louis, K. Hartmann. Efficacy and Adverse Effects of (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine in Feline Immunodeficiency Virus-Infected Cats. *J Vet Intern Med* 2012, Sv. 10.1111, stránky 1267-1273.

- ⁵⁰ T. W. Vahlenkamp, A. De Ronde, J. Balzarini, L. Naesens, E. De Clercq, M. J. van Eijk, M. C. Horzinek, H. F. Egberink (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine is a potent inhibitor of feline immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, Sv. 39, stránky 746-749.
- ⁵¹ P. Kostecká, A. Holý, H. Farghali, Z. Zidek, E. Kmoníčková . Differential effects of acyclic nucleoside phosphonates on nitric oxide and cytokines in rat hepatocytes and macrophages. *Int Immunopharmacol* 2012, Sv. 12, stránky 342-349.
- ⁵² M. C. Conelly, B. L. Robbins, A. Fridland. Mechanism of uptake of the phosphonate analog (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) in Vero cells. *Biochem Pharmacol* 1993, Sv. 46, stránky 1053-1057.
- ⁵³ K. Y. Hostetler. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antivir Res* 2009, Sv. 82, stránky 84-98.
- ⁵⁴ M. S. Smith, E. L. Brian, E. De Clercq, J. S. Pagano. Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro to acyclic adenosine analogs and synergy of the analogs with 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1989, Sv. 33, stránky 1482-1486.
- ⁵⁵ M. Krečmerová, A. Holý, G. Andrei, K. Pomeisl, T. Tichý, P. Brehová, M. Masojídková, M. Dracínský, R. Pohl, G. Laflamme, L. Naesens, H. Hui, T. Cihlar, J. Neyts, E. De Clercq, J. Balzarini, R. Snoeck. Synthesis of Ester Prodrugs of 9-(S)-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurine (HPMPDAP) as Anti-Poxvirus Agents. *J Med Chem* 2010, Sv. 53, stránky 6825-6837.
- ⁵⁶ D. B. Gammon, R. Snoeck, P. Fiten, M. Krečmerová, A. Holý, E. De Clercq, G. Opdenakker, D. H. Evans, G. Andrei. Mechanism of antiviral drug resistance of vaccinia virus: identification of residues in the viral DNA polymerase conferring differential resistance to antipoxvirus drugs. *J Virol* 2008, Sv. 82, stránky 12520-12534.
- ⁵⁷ J. C. Lin, E. De Clercq, J. S. Pagano. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogs, including (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine, on Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 1991, Sv.35, stránky 2440-2443.

⁵⁸ N. Valiaeva, J. R. Beadle, K. A. Aldern, J. Trahan, K. Y. Hostetler. Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of acyclic purine and pyrimidine nucleoside phosphonates against HIV-1 in vitro. *Antivir Res* 2006, Sv. 72, stránky 10-19.

⁵⁹ A. Holý, H. Dvořáková, J. Jindřich, M. Masojídková, M. Buděšínský, J. Balzarini, G. Andrei, E. De Clercq. Acyclic nucleotide analogs derived from 8-azapurines: synthesis and antiviral activity. *J Med Chem* 1996, Sv. 39, stránky 4073-4088.

⁶⁰ A. M. Kligman, E. Christophers. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch. Dermatol.* 1963, Sv. 88, stránky 709-712.