

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Asymetricky substituované močoviny jako akceleranty
transdermální permeace

Hradec Králové, 2006

Mgr. Martin Šíma

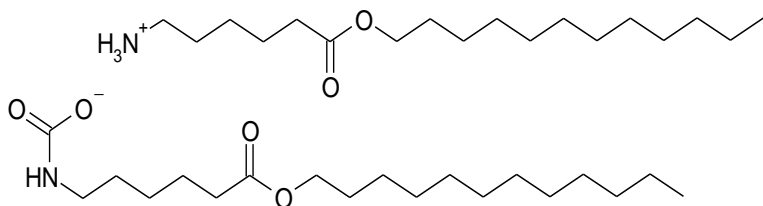
Na tomto místě bych chtěl poděkovat doc. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc., pod jehož odborným vedením tato rigorózní práce vznikla. Dále děkuji Mgr. Jakubu Novotnému za cenné rady při laboratorní činnosti, PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za statistické zpracování výsledků z testování biologických aktivit, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter a paní Ivě Vencovské za změření IR spekter mých produktů.

OBSAH

1. CÍL PRÁCE.....	4
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1. ÚVOD.....	6
2.2. VÝVOJ TRANSKARBAMŮ.....	6
2.3. VLIV FUNKČNÍ SKUPINY UPROSTŘED LIPOFILNÍHO ŘETĚZCE NA AKTIVITU TRANSKARBAMŮ.....	7
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	11
3.1. SYNTÉZA	11
3.1.1. Přístroje, chemikálie	11
3.1.2. Metodologie	11
3.1.3. Postup.....	12
3.2. BIOLOGICKÁ AKTIVITA	16
3.2.1. Příprava kůže pro testování.....	16
3.2.2. Příprava donorových fází.....	16
3.2.4. Stanovení theofilinu ve vzorcích akceptorové fáze	18
3.2.5. Vyhodnocení naměřených hodnot	18
4. VÝSLEDKY	19
5. DISKUZE.....	21
6. ZÁVĚR.....	24
7. LITERATURA	25

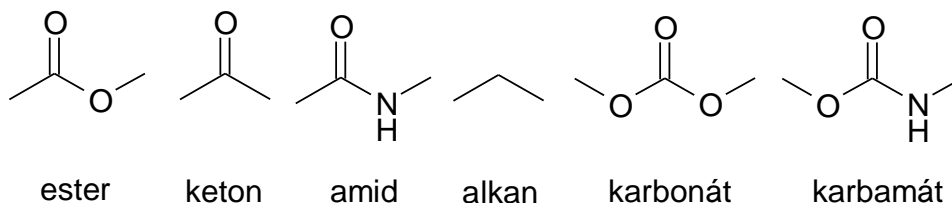
1. CÍL PRÁCE

K okruhům, řešeným na katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze patří problematika akceleračních transdermálních penetračních. Během výzkumu na tomto pracovišti byl vyvinut Transkarbam 12 (5-(dodecyloxykarbonyl)pentylamonium-5-(dodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát) (obr.1.1.), akcelerační vykazující vysokou biologickou účinnost.



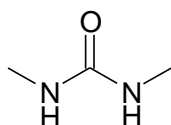
Obr. 1.1.: Transkarbam 12.

Za účelem prozkoumání významu funkční skupiny uprostřed uhlovodíkového řetězce na aktivitu této látky byly syntetizovány a testovány isostery, které vznikly záměnou esterové funkční skupiny za keton, amid, alkan¹, karbonát a karbamát² (obr 1.2.).



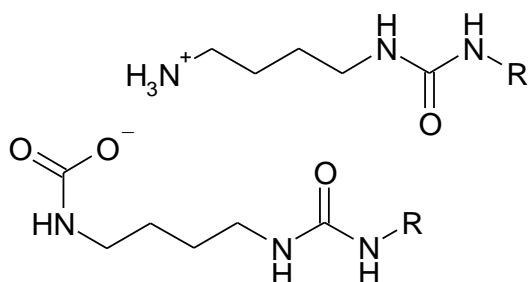
Obr. 1.2.: Funkční skupiny v T 12 a jeho isosterech.

Cílem této rigorózní práce je syntetizovat a ověřit biologickou aktivitu isosterů Transkarbamu 12 s močovinovou funkční skupinou uprostřed uhlovodíkového řetězce (obr. 1.3.), a uzavřít tak sérii výše uvedených analogů.



Obr. 1.3.: Močovinová funkční skupina.

Výstupem této rigorózní práce jsou tedy 4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-4-(alkylkarbamoylamino)butylkarbamáty (obr. 1.4.):



Obr. 1.4.: Isostery T 12 s močovinnou funkční skupinou, R = nonyl, decyl, undecyl, dodecyl.

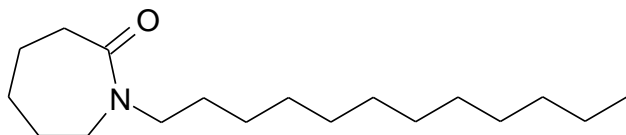
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ÚVOD

Transdermální podání léčiv přináší oproti konvenčním způsobům aplikace řadu výhod. Tato aplikační cesta je však limitována kožní bariérou, za kterou je odpovědná nejsvrchnější část pokožky, stratum corneum. Přes kožní bariéru většina léčiv prochází jen velmi omezeně, nebo dokonce vůbec. Tento problém lze vyřešit aplikací akceleračních transdermálních penetračních, pomocných farmaceutických látek, které reverzibilně snižují bariérové schopnosti pokožky. Činí tak porušením organizace lipidů v mezibuněčném prostoru stratum corneum, či interakcí s proteiny v buněčných membránách, což způsobí botnění buněk, kterými pak polární léčiva snáze proniknou, nebo snížením rozdělovacího koeficientu mezi vehikulem a pokožkou, popřípadě kombinací těchto mechanismů.

2.2. VÝVOJ TRANSKARBAMŮ

Akceleranty transdermální penetrace jsou chemicky velmi heterogenní skupina látek. Dosud byla schopnost urychlovat průnik léčiv přes kůži popsána u látek typu alkoholů, sulfoxidů, mastných kyselin, esterů, terpenů, derivátů ω -aminokyselin, amidů, derivátů močoviny, a mnoha dalších struktur³. Za neúčinnější, a proto také nejstudovanější skupinu lze považovat deriváty ω -aminokyselin. Velmi efektivním akceleračním, patřícím do této skupiny látek, je např. Azone®, N-dodecyl- ϵ -kaprolaktam (obr. 2.1.), patentovaný v USA v roce 1976⁴.

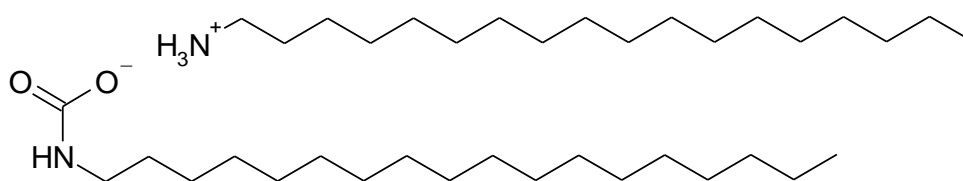


Obr. 2.1.: Azone®.

Jako jeho otevřené analogy byly od Azonu® odvozeny estery 6-aminohexanové kyseliny, vykazující také vysokou účinnost. Teprve později se přišlo na fakt, že aminoskupina těchto látek má obrovskou afinitu k oxidu uhličitému, takže reaguje na

vzduchu za vzniku amonium-karbamátového seskupení, které je za vysoký akcelerační účinek těchto struktur odpovědné, zatím co samotný aminoester je zcela neúčinný, jak prokázalo jeho testování pod argonovou atmosférou. Takto vznikl český patentovaný akcelerační Transkarbam 12, 5-(dodecyloxykarbonyl)pentylamonium-5-(dodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát (obr. 1.1.).

Na základě výše uvedených zjištění byla vyslovena hypotéza, že nositelem účinku Transkarbamu 12 je pravděpodobně karbamátové uskupení, a že zbytek molekuly pouze modifikuje její biologickou aktivitu. Tuto teorii mělo potvrdit prověření biologické aktivity oktadecylamonium-oktadecylkarbamátu¹ (obr. 2.2.), tedy struktury s amonium-karbamátovým uskupením, ale bez esterové funkční skupiny uprostřed lipofilních řetězců.



Obr. 2.3.: Oktadecylamonium-oktadecylkarbamát.

Tato struktura však nevykázala téměř žádný akcelerační účinek, což ukazuje, že se na vysoké akcelerační aktivitě Transkarbamu 12 podílí také esterová funkční skupina. Tato skutečnost dala podnět k syntéze a hodnocení biologické aktivity dalších isosterů Transkarbamu 12, se zaměněnou esterovou funkční skupinou za keton, amid¹, karbamát a karbonát², za účelem objasnění významu funkční skupiny uprostřed lipofilních řetězců.

2.3. VLIV FUNKČNÍ SKUPINY UPROSTŘED LIPOFILNÍHO ŘETĚZCE NA AKTIVITU TRANSKARBAMŮ

Tabulka 2.1. uvádí isostery Transkarbamu 12 s zaměněnou funkční skupinou uprostřed lipofilního řetězce a jejich biologickou aktivitu^{1, 2}, vyjádřenou akceleračními poměry (za použití směsi propylenglykol/voda v poměru 6/4 jako donorového média).

Isoster	Struktura	n	R	AP
ester (T 12)		-	dodecyl	22,8 ± 1,1
alkan		17	-	1,8 ± 0,6
ketony		-	undecyl	3,8 ± 1,2
			dodecyl	3,4 ± 0,7
amidy		-	hexyl	3,8 ± 0,5
			heptyl	3,8 ± 0,7
			oktyl	5,0 ± 1,2
			nonyl	8,6 ± 2,8
			decyl	6,0 ± 1,4
			dodecyl	2,2 ± 0,5
			oktadecyl	0,9 ± 0,4
karbamáty		4	oktyl	3,2 ± 0,8
			nonyl	6,3 ± 1,8
			decyl	5,6 ± 0,5
			undecyl	2,9 ± 0,4
		5	decyl	5,3 ± 0,9
			undecyl	2,3 ± 0,5
			dodecyl	1,7 ± 0,5
		6	decyl	4,3 ± 0,6
			undecyl	3,7 ± 0,3
			decyl	11,8 ± 0,7

Isoster	Struktura	n	R	AP
karbonáty		5	oktyl	12,4 ± 2,6
			decyl	11,8 ± 0,7
			dodecyl	7,4 ± 0,2
		6	oktyl	7,1 ± 0,4
			decyl	7,9 ± 1,6
			dodecyl	8,4 ± 3,3

Tab. 2.1.: Isostery T 12 a jejich aktivita.

Z výsledků uvedených v tabulce 2.1. vyplývá, že aktivita isosterů (se stejně dlouhým uhlovodíkovým řetězcem) klesá v pořadí ester, karbonát, keton, amid, karbamát, alkan.

Také porovnání rozpustnosti jednotlivých isosterů (se stejnou délkou uhlovodíkového řetězce) v donorovém médiu (směs propylenglykol/voda v poměru 6/4) a rozpustnosti theofilinu (jako modelového léčiva) v přítomnosti těchto isosterů mělo přispět k objasnění vlivu funkční skupiny na akcelerační působení². Výsledky uvádí tabulka 2.2. Rozpustnost je vyjádřena koncentrací: C(A) = koncentrace akceleračního činidla v donorovém médiu, C(Th) = koncentrace theofilinu v donorovém médiu.

Isoster	AP	C(A) [mg / ml]	C(Th) [mg / ml]
-	1,0	-	35,0 ± 0,0
Ester (T 12)	22,8 ± 1,1	3,5 ± 0,1	42,8 ± 1,5
Alkyl	1,8 ± 0,6	0,5 ± 0,1	39,6 ± 1,6
Keton	3,4 ± 0,7	1,0 ± 0,1	42,7 ± 3,9
Amid	2,2 ± 0,5	1,8 ± 0,0	40,6 ± 1,5
Karbamát	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,0	37,8 ± 0,6
Karbonát	8,4 ± 3,3	6,4 ± 0,3	39,6 ± 0,9

Tab. 2.2.: Rozpustnost isosterních akceleračních činidel v donorovém médiu a rozpustnost theofilinu v donorovém médiu za přítomnosti těchto akceleračních činidel

Z tabulky 2.2. je patrné, že přidavkem akceleraantu se zvýší rozpustnost theofilinu v donorovém médiu, ale rozdíly v jeho rozpustnosti s užitím jednotlivých akceleraantů nejsou významné. Rozpustnost isosterů Transkarbamu 12 a tudíž jejich dostupnost z donorového média lineárně koreluje s jejich aktivitou, která není příliš rozdílná, a lze tak vysvětlit relativně vysokou aktivitu isosterů s karbonátovou funkční skupinou. Rozpustnost Transkarbamu 12 je však velmi nízká, vzhledem k jeho vysoké aktivitě. Byla proto vyslovena hypotéza, že Transkarbam 12 působí ne zcela stejným mechanismem jako jeho isostery.

Akceleraanty na bázi solí karbámových kyselin se ve slabě kyselém prostředí rozkládají na amin a oxid uhličitý, jak prokázala práce A. Hrabálka⁵ a kol., což je zřejmé z IR spekter směsi Transkarbamu 12 a kyseliny palmitové (postupný nárůst vibrace oxidu uhličitého (2334 cm^{-1}) za současného úbytku vibrace karbamátové skupiny (1626 cm^{-1})). TGA (termogravimetrické analýzy) ukazují, že isostery Transkarbamu 12 se chovají stejným způsobem. Proto se i u těchto substancí předpokládá stejný mechanismus účinku spočívající v uvolnění oxidu uhličitého při kontaktu těchto molekul s kyselým prostředím ve stratum corneum (mastné kyseliny vyplňující mezibuněčný prostor). Uvolněný oxid uhličitý, a s tím spojené konformační změny molekuly akceleraantu pak způsobí rozvolnění uspořádané struktury lipidů této vrstvy kůže, což urychlí průnik léčiv.

Výše uvedenou hypotézu, že Transkarbam 12 působí ne zcela stejným mechanismem jako jeho isostery, potvrdil i rozbor jeho IR spektra, kde zdvojená vibrace C=O vazby esterové skupiny (1735 a 1743 cm^{-1})⁶ prokazuje přítomnost dvou neekvivalentních esterových skupin v lipofilních řetězcích, zatím co na IR spektrech ostatních isosterů ke zdvojení C=O absorpčního pásu nedochází. Předpokládá se, že jedna z esterových skupin tvoří vodíkové můstky s amonium-karbamátovou skupinou, což zásadním způsobem ovlivní stabilitu polární hlavy akceleraantu. Toto tvrzení podporuje fakt, že při výše zmiňovaném rozkladu soli karbámové kyseliny na amin a oxid uhličitý, dochází vedle úbytku vibrace karbamátu a nárůstu vibrace oxidu uhličitého také k vymizení dubletu C=O vazby esteru. Prostorové uspořádání Transkarbamu 12, podmiňující jeho stabilitu, se z velkou pravděpodobností podílí na jeho vysoké akcelerační aktivitě. V úvahu přichází také možnost odlišného včlenění molekuly T 12 do struktur mezibuněčného prostoru stratum corneum. S největší pravděpodobností je však rozklad amonium-karbamátu v kyselém prostředí doprovázen změnou konformace (způsobené vodíkovým můstkem mezi esterem a karbamátem), která společně s uvolněním oxidu uhličitého způsobí rozvolnění mezibuněčných struktur stratum corneum.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

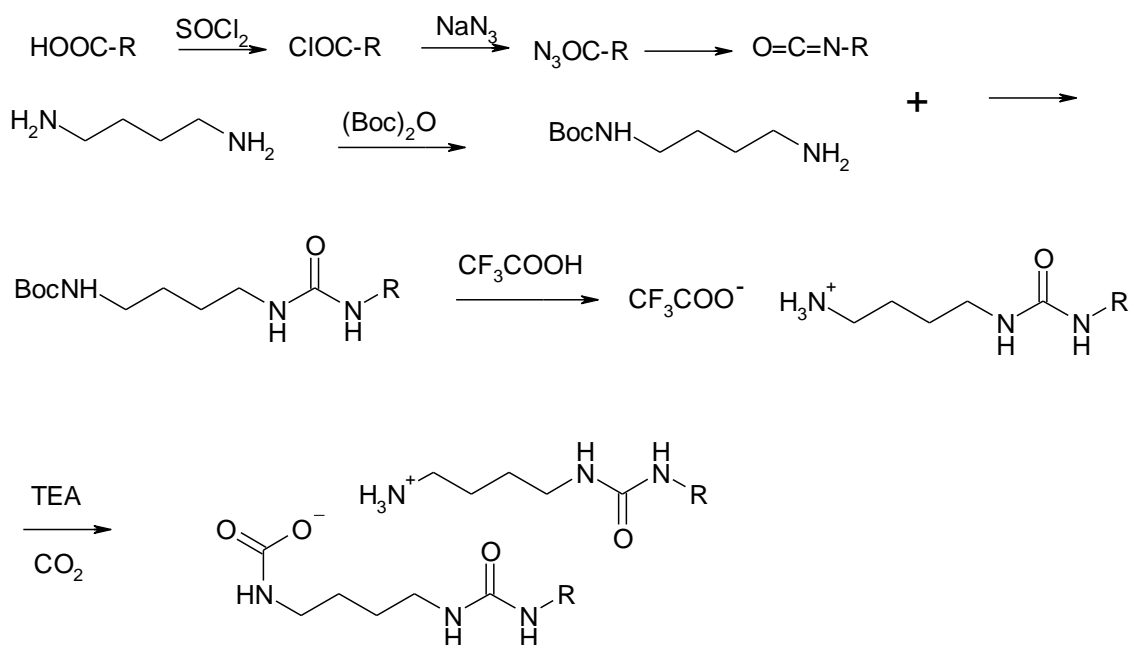
3.1. SYNTÉZA

3.1.1. Přístroje, chemikálie

Všechny chemikálie byly pořízeny u firmy Sigma - Aldrich. Sloupcová chromatografie byla provedena na Silica gelu 60 (230–400 mesh) a chromatografie na tenké vrstvě na TLC deskách (silica gel 60 F₂₅₄) firmy Merck. Teploty tání byly měřeny na Koflerově přístroji. Struktura a čistota připravených sloučenin byla prověřena IR spektrofotometrií (Nicolet Impact 400 spectrophotometer) a spektry ¹H a ¹³C NMR (Varian Mercury-Vx BB 300 instrument: ¹H při 300 MHz, ¹³C při 75 MHz).

3.1.2. Metodologie

4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-4-(alkylkarbamoylamino)butylkarbamáty byly syntetizovány podle následujícího schématu: (obr. 3.1.)



Obr. 3.1.: Schéma syntézy, R = nonyl, decyl, undecyl, dodecyl.

Syntéza vycházela z příslušných karboxylových kyselin - dekanová, undekanová, dodekanová, tridekanová. Jejich reakcí s chloridem thionylu vznikaly acylchloridy, ty pak s azidem sodným poskytovaly acylazidy. Zahříváním acylazidů docházelo ke Curtiovu přesmyku za vzniku alkylisokyanátů s alkyly vždy o jeden uhlík kratšími, než byly výchozí karboxylové kyseliny. Parciální chránění 1,4-diaminobutanu *tert*-butoxykarbonylovou skupinou bylo provedeno podle Wakisaki⁷ reakcí s *diterc*-butoxy-dikarbonátem v příslušném molárním poměru. Alkyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močoviny vznikaly spontánně reakcí isokyanátů s parciálně chráněným 1,4-diaminobutanem. Za působení kyseliny trifluoroctové pak docházelo k odštěpení *tert*-butoxykarbonylové chránicí skupiny za vzniku 4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-trifluoracetátů. Jejich amoniová skupina byla pomocí triethylaminu převedena na primární amin, který pak byl probubláván oxidem uhličitým. Z této reakce vzešly výsledné produkty – 4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-4-(alkylkarbamoylamino)butylkarbamáty.

3.1.3. Postup

Příprava alkylisokyanátů:

0,03 molu příslušné karboxylové kyseliny (o jeden uhlík delší než potřebný alkyl) bylo mícháno s chloridem thionylu (ve 40% přebytku) po dobu jedné hodiny při teplotě 50 °C a poté predestilováno za sníženého tlaku (použité tlaky a teploty varu acylchloridů při těchto tlacích jsou v tabulce 3.1.):

R	T.v. (R-COCl) / tlak (Pa)
Nonyl	100°C / 40 Pa
Decyl	121°C / 50 Pa
Undecyl	126°C / 30 Pa
Dodecyl	129°C / 20 Pa

Tabulka 3.1. Použité tlaky a teploty varu acylchloridů při těchto tlacích.

Předestilovaný acylchlorid byl rozpuštěn v malém množství suchého acetonu a tento roztok byl po kapkách přidáván k nasycenému vodnému roztoku azidu sodného za stálého míchání při teplotě nepřekračující 5 °C. Po přidání celého množství acylchloridu byla směs ještě 20 minut promíchávána a poté byla pomocí injekční stříkačky odsáta vrchní olejová

fáze, která byla ihned pomalu překapána do suchého toluenu předehřátého na teplotu 60 °C, za současného vyvíjení plynu (N₂). Směs byla ještě asi hodinu promíchávána a udržována při této teplotě. Toluén byl pak odstraněn odpařením za sníženého tlaku a zbylý isokyanát byl přečištěn destilací za sníženého tlaku (použité tlaky a teploty varu isokyanátů při těchto tlacích jsou uvedeny v tabulce 3.2.):

R	T. v. (R-N=C=O) / tlak (Pa)
Nonyl	90°C / 40 Pa
Decyl	106°C / 30 Pa
Undecyl	117°C / 50 Pa
Dodecyl	118°C / 20 Pa

Tabulka 3.2.: Použité tlaky a teploty varu isokyanátů při těchto tlacích.

Produkty byly lehce nažloutlé čiré viskózní kapaliny. Výtěžky isokyanátů se pohybovaly od 45 do 65 %.

Příprava N-(4-aminobutyl)-*tert*-butylkarbamátu:

K roztoku 0,3 molu 1,4-diaminobutanu v 850 ml suchého chloroformu byl pomalu přikapáván roztok 0,15 molu *diterc*-butoxy-dikarbonátu v 850 ml suchého chloroformu při teplotě 0 °C za stálého míchání. Směs pak byla při stejné teplotě ještě 1 hodinu intenzivně míchána. Poté byla směs zfiltrována, z filtrátu byl za sníženého tlaku odpařen chloroform a zbylá směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze – chloroform/methanol/triethylamin v poměru 80/20/3). Produkt byl mírně nažloutlá viskózní kapalina. Výtěžek činil 20 %.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.75 (1H, bs, NH), 3.17-3.03 (2H, m, CH₂), 2.70 (2H, t, *J*=6.7 Hz, CH₂), 2.17 (2H, bs, NH₂), 1.55-1.44 (4H, m, CH₂), 1.41 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 156.0, 79.0, 41.5, 40.3, 30.3, 28.4, 27.4.

Příprava alkyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovin:

0,01 molu příslušného isokyanátu bylo rozpuštěno v 5 ml diethyletheru. Stejně tak 0,1 molu N-(4-aminobutyl)-*tert*-butylkarbamátu bylo rozpuštěno v 5 ml diethyletheru. Oba roztoky pak byly slity za intenzivního míchání. Vzniklý bílý precipitát byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku v exsíkátoru. Výtěžky se pohybovaly od 80 do 95 %.

Nonyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovina.

T. t. = 76 – 78 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.04 (3H, bs, NH), 3.18-3.04 (6H, m, CH₂), 1.54-1.43 (6H, m, CH₂), 1.41 (9H, s, CH₃), 1.31-1.18 (12H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, *J*=6.5 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 158.8, 156.3, 79.1, 40.4, 40.1, 39.9, 31.8, 30.3, 29.5, 29.4, 29.2, 28.4, 27.5, 27.3, 26.9, 22.6, 14.1; IR (KBr): ν 3350 (N-H), ν 1681 (NHC=ONH).

Decyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovina.

T. t. = 81 – 83 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.75 (2H, bs, NH), 3.22-3.03 (6H, m, CH₂), 1.51-1.45 (6H, m, CH₂), 1.42 (9H, s, CH₃), 1.33-1.19 (14H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, *J*=6.6 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 158.7, 156.3, 79.2, 40.5, 40.0, 31.8, 30.2, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.4, 27.5, 27.2, 26.9, 22.6, 14.1; IR (KBr): ν 3347 (N-H), ν 1681 (NHC=ONH).

Undecyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovina.

T. t. = 85 – 87 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.69 (2H, bs, NH), 3.23-3.05 (6H, m, CH₂), 1.56-1.45 (6H, m, CH₂), 1.43 (9H, s, CH₃), 1.33-1.19 (16H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, *J*=6.6 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 158.6, 156.3, 79.3, 40.7, 40.1, 31.9, 30.2, 29.6, 29.3, 28.4, 27.6, 27.0, 26.9, 22.7, 14.1; IR (KBr): ν 3347 (N-H), ν 1682 (NHC=ONH).

Dodecyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovina.

T. t. = 87 – 88 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.74 (2H, bs, NH), 3.20-3.07 (6H, m, CH₂), 1.56-1.45 (6H, m, CH₂), 1.42 (9H, s, CH₃), 1.35-1.16 (18H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, *J*=6.7 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 158.7, 156.3, 79.2, 40.5, 40.0, 31.9, 30.3, 23.6, 29.6, 29.4, 29.3, 28.4, 27.6, 27.2, 26.9, 22.6, 14.1; IR (KBr): ν 3347 (N-H), ν 1682 (NHC=ONH).

Příprava 4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium trifluoracetátů:

4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-trifluoracetáty byly připraveny z příslušných alkyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovín jejich smícháním s malým množstvím suchého chloroformu a pomalým přikapáváním kyseliny trifluoroctové (v 900% přebytku) do této směsi chlazené na teplotu 0 °C v ledové lázni. Směs pak byla ještě míchána při této teplotě 10 minut. Chloroform a většina přebytečné trifluoroctové kyseliny pak byly odstraněny odpařením za sníženého tlaku v exsikátoru nad

hydroxidem draselným. Reakce probíhaly kvantitativně, produktem byly slabě nažloutlé viskózní olejovité kapaliny.

4-(nonylkarbamoylamino)butylamonium trifluoracetát.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.71 (3H, bs, NH_3), 7.63 (2H, bs, NH), 3.24-2.97 (6H, m, CH_2), 1.81-1.41 (6H, m, CH_2), 1.36-1.17 (12H, m, CH_2), 0.87 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3); IR (nujol): ν 3343 (N-H), ν 1691 (NHC=ONH), ν 1641 (COO^-).

4-(decylkarbamoylamino)butylamonium trifluoracetát.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.98 (3H, bs, NH_3), 7.53 (2H, bs, NH), 3.26-2.94 (6H, m, CH_2), 1.81-1.42 (6H, m, CH_2), 1.37-1.14 (14H, m, CH_2), 0.87 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 161.3 (q, $J=38.7$ Hz), 159.8, 115.3 (q, $J=280.3$ Hz), 41.3, 40.0, 39.7, 31.8, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 26.6, 25.7, 24.1, 22.6, 14.0; IR (nujol): ν 3346 (N-H), ν 1690 (NHC=ONH), ν 1626 (COO^-).

4-(undecylkarbamoylamino)butylamonium trifluoracetát.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.79 (3H, bs, NH_3), 3.41-2.81 (6H, m, CH_2), 1.88-1.39 (6H, m, CH_2), 1.39-1.11 (16H, m, CH_2), 0.87 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 161.6 (q, $J=39.2$ Hz), 159.8, 115.6 (q, $J=289.5$ Hz), 41.1, 39.8, 39.5, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 28.3, 26.7, 26.0, 24.2, 22.6, 14.0; IR (nujol): ν 3344 (N-H), ν 1691 (NHC=ONH), ν 1626 (COO^-).

4-(dodecylkarbamoylamino)butylamonium trifluoracetát.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.78 (1H, bs, NH), 6.36 (3H, bs, NH_3), 3.39-2.88 (4H, m, CH_2), 1.94-1.41 (4H, m, CH_2), 1.37-1.08 (14H, m, CH_2), 0.87 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH_3); IR (nujol): ν 3161 (N-H), ν 1678 (NHC=ONH), ν 1620 (COO^-).

Příprava 4-(alkylkarbamoylamino)butyl-4-(alkylkarbamoylamino)butylkarbamátů:

Příslušný 4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-trifluoracetát byl rozpuštěn ve vodě a třikrát extrahován do roztoku triethylaminu (v 50% přebytku) v diethyletheru. Spojené etherové extrakty byly zbaveny zbytků vody pomocí bezvodého síranu sodného a po jeho odfiltrování probublávány oxidem uhličitým po dobu 10 minut. Vzniklý bílý precipitát byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku v exsikatoru nad kyselinou sírovou (odstranění zbylého triethylaminu). Výtěžky se pohybovaly od 45 do 60 %.

4-(nonylkarbamoylamino)butylamonium-4-(nonylkarbamoylamino)butylkarbamát.

T. t. = 101 – 104 °C; IR (KBr): ν 3339 (N-H), ν 1681 (NHC=ONH), ν 1622 (NHC=OO^-), δ 1524 (N-H).

4-(decylkarbamoylamino)butylamonium-4-(decylkarbamoylamino)butylkarbamát.

T. t. = 97 – 101 °C; IR (KBr): ν 3343 (N-H), ν 1679 (NHC=ONH), ν 1622 (NHC=OO⁻), δ 1555 (N-H).

4-(undecylkarbamoylamino)butylamonium-4-

(undecylkarbamoylamino)butylkarbamát.

T. t. = 107 – 109 °C; IR (KBr): ν 3335 (N-H), ν 1684 (NHC=ONH), ν 1621 (NHC=OO⁻), δ 1494 (N-H).

4-(dodecylkarbamoylamino)butylamonium-4-

(dodecylkarbamoylamino)butylkarbamát.

T. t. = 74 – 77 °C; IR (KBr): ν 3343 (N-H), ν 1681 (NHC=ONH), ν 1623 (NHC=OO⁻), δ 1523 (N-H).

3.2. BIOLOGICKÁ AKTIVITA

3.2.1. Příprava kůže pro testování

Pro testování byla použita prasečí kůže v plné síle (tj. obsahující všechny vrstvy), odpreparovaná z dorzální strany uší (prasečí kůže se svým složením nejvíce podobá kůži lidské, na níž se pokusy v současné době vzhledem ke stávající legislativě neprovádějí). Prasečí uši byly získány z jatek (Skaličan – Česká Skalice). Kůže byla očištěna a byly z ní oholeny chlupy. Poté byla ponořena do 0,05% roztoku azidu sodného ve fyziologickém roztoku na cca 5 minut z důvodu konzervace. Takto získané preparáty byly skladovány ve vakuovaných obalech v mrazničce při teplotě -18 °C, nejdéle však 2 měsíce. Rozmrazeny pak byly těsně před použitím.

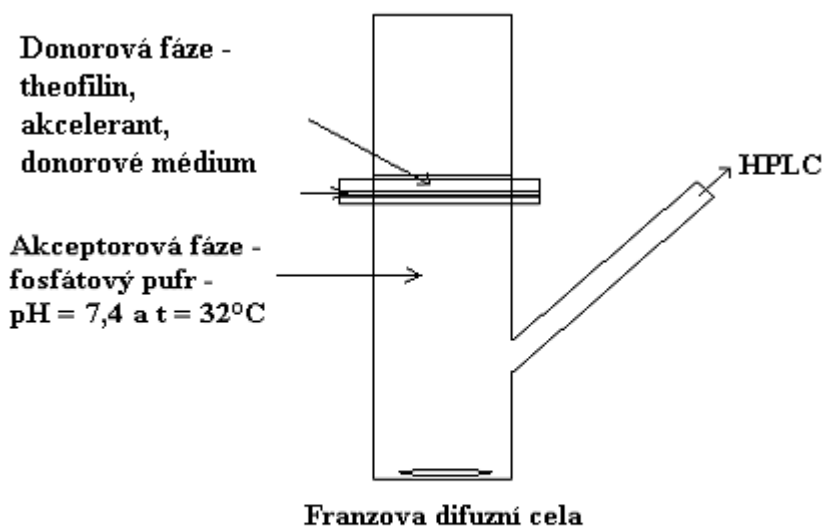
3.2.2. Příprava donorových fází

Donorové vzorky byly připraveny jako 5% suspenze theofilinu coby modelového léčiva a současně 1% suspenze akceleratoru v donorovém médiu. Jako donorové médium byla použita směs propylenglykol / voda v poměru 6 / 4. Suspenze byly míchány 5 minut při 50 °C, a poté ponechány 96 hodin při teplotě 37 °C v inkubátoru.

Volba modelového léčiva není náhodná: theofilin má molekulu přibližně střední velikosti a polaritu a sám proniká kůží velmi špatně.

3.2.3. Vlastní testování (obr. 3.2.)

Akcelerační aktivity potenciálních akceleračních transdermální penetrace byly měřeny *in vitro* pomocí Franzových difúzních cel. Vzorky kůže o rozměrech cca 2 x 2 cm byly vloženy do Franzovy cely mezi její donorovou a akceptorovou část s výřezem pro permeační prostor 1 cm². Akceptorová část Franzovy cely byla pomocí injekční stříkačky naplněna fosfátovým pufr (17,4 – 18,8 ml) o pH 7,4 (odpovídá pH plazmy), v němž byl rozpuštěn azid sodný (0,03%) jako konzervans. V tomto stavu byly cely ponechány cca 30 minut ve vodní lázni za účelem vytemperování na 32 °C (odpovídá teplotě povrchu lidského těla). Poté bylo do donorové části difúzní cely aplikováno pomocí mikropipety 200 µl donorového vzorku a donorová část byla překryta krycím sklíčkem. Akceptorová část byla během celého pokusu udržována při teplotě 32 °C a promíchávána pomocí elektromagneticky řízených míchadel. Během následujících 48 hodin bylo sedmkrát odebráno pomocí injekční stříkačky 0,6 ml a toto množství bylo vždy hned doplněno novou akceptorovou fází. Odebrané vzorky byly analyzovány pomocí HPLC. Každý akcelerační byl testován ve čtyřech celách a čtyři cely byly bez jakéhokoliv akceleračního – jako slepý vzorek pro porovnání.



LiChroCART 250-4 column, UV detekce - 272 nm,
methanol/0.1M NaH₂PO₄ 6:4 v/v 1.2 ml/min

Obr. 3.2. Franzova cely.

3.2.4. Stanovení theofilinu ve vzorcích akceptorové fáze

Obsah theofilinu ve vzorcích akceptorové fáze byl stanoven pomocí HPLC s autosamplerem (Shimadzu SIL-20AC, Kyoto, Japonsko), vysokotlakou pumpou (Shimadzu LC-20AD, Kyoto, Japonsko), kolonou LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100, RP 18, 5 μm , Merck, Darmstadt, Německo), UV detektorem ECOM LCD 2083 a softwarem CSW 1,7. Byla použita mobilní fáze methanol/0,1 molární dihydrogenfosforečnan sodný v poměru 3/2 (v/v). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,2 ml/minutu. Obsah theofilinu v efluentu byl stanovován UV detektorem při vlnové délce 272 nm. Retenční čas theofilinu byl $2,9 \pm 0,1$ minuty.

3.2.5. Vyhodnocení naměřených hodnot

Byl sestrojen graf závislosti kumulativního množství [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] theofilinu v akceptorové fázi na čase. Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$] byl vypočítán z lineární oblasti křivky. Dále byl spočítán akcelerační poměr (AP) jako poměr fluxu theofilinu ze vzorku s daným akcelerantem a fluxu theofilinu ze slepého vzorku (tj. bez akcelerantu). Statistická významnost získaných dat byla prověřena pomocí Studentova t – testu.

4. VÝSLEDKY

Jako akceleranty transdermální penetrace byly testovány všechny finální produkty (viz tabulka 4.1.):

4-(nonylkarbamoylamino)butylamonium-4-(nonylkarbamoylamino)butylkarbamát
4-(decylkarbamoylamino)butylamonium-4-(decylkarbamoylamino)butylkarbamát
4-(undecylkarbamoylamino)butylamonium-4-(undecylkarbamoylamino)butylkarbamát
4-(dodecylkarbamoylamino)butylamonium-4-(dodecylkarbamoylamino)butylkarbamát

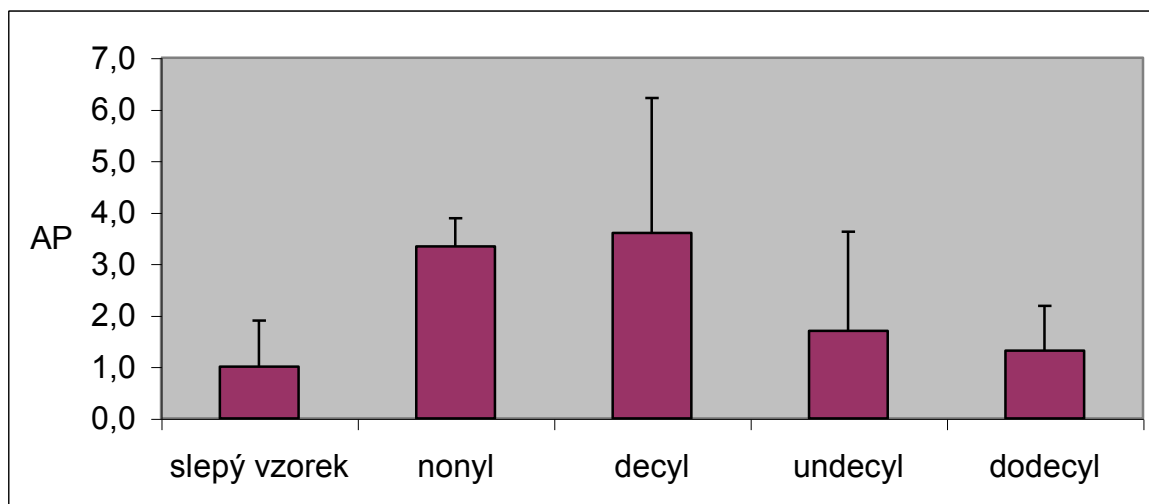
Tab. 4.1.: Finální produkty

Následuje tabulka 4.2., která uvádí účinnost látek z tabulky 4.1. vyjádřenou akceleračním poměrem se směrodatnou odchylkou v porovnání s předlohovou strukturou, Transkarbamem 12, od které jsou tyto látky odvozeny.

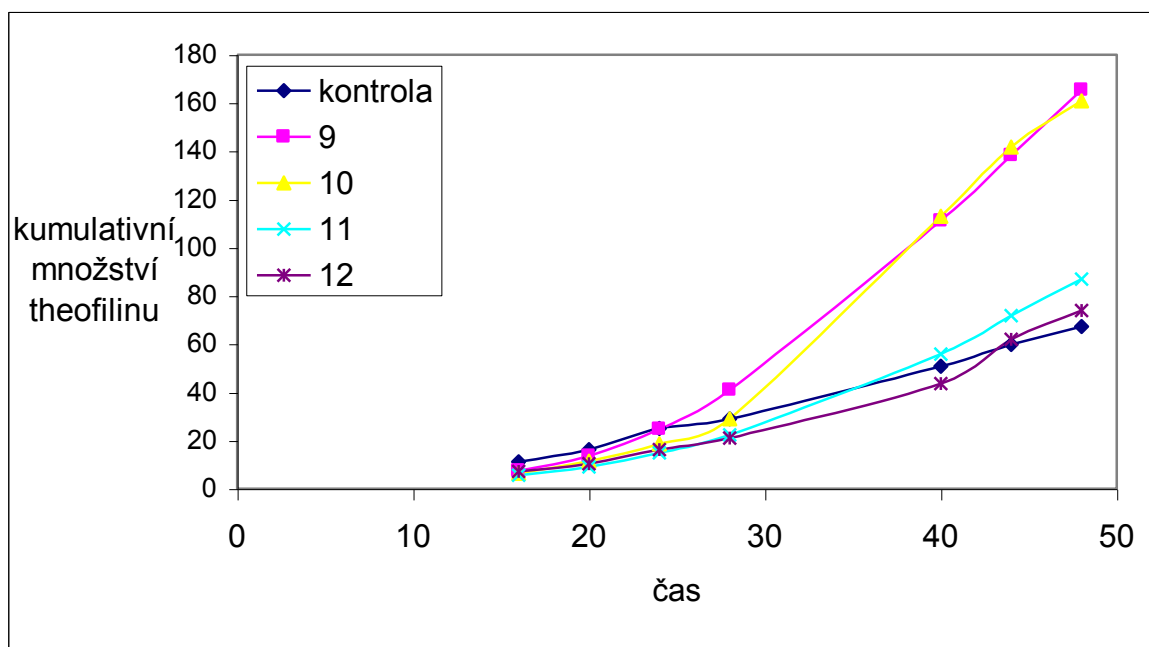
Struktura	R	Akcelerační poměry ± směrodatná odchylka
	nonyl	3,3 ± 0,5
	decyl	3,6 ± 2,6
	undecyl	1,7 ± 1,9
	dodecyl	1,3 ± 0,9
	T 12	22,8 ± 1,1

Tab. 4.2.: Účinnost finálních produktů ve srovnání s Transkarbamem 12, vyjádřená akceleračními poměry se směrodatnou odchylkou.

Účinnost finálních produktů v porovnání se slepým vzorkem vyjadřuje grafické znázornění akceleračního poměru se směrodatnými odchylkami a graf závislosti kumulativního množství theofilinu na čase (obr. 4.1. a 4.2.):



Obr. 4.1.: Grafické znázornění akceleračního poměru se směrodatnými odchylkami finálních látek v porovnání se slepým vzorkem.

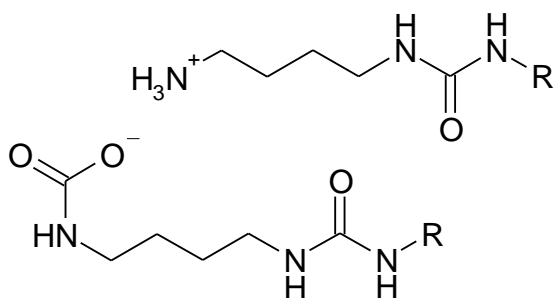


Obr. 4.2.: Graf závislosti kumulativního množství theofilinu [$\mu\text{g} / \text{cm}^2$] na čase [hod].

5. DISKUZE

Strukturní předlohou pro látky syntetizované a hodnocené jako akceleranty transdermální penetrace v experimentální části této rigorózní práce byl Transkarbam 12 (obr. 1.1.), akcelerant vyvinutý na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, vykazující vysokou akcelerační aktivitu.

Cílem této rigorózní práce bylo syntetizovat isostery Transkarbamu 12, které mají zaměněnou esterovou funkční skupinu za močovinovou (obr. 5.1.), prověřit jejich akcelerační schopnosti, a přispět tak ke stanovení vlivu funkční skupiny uprostřed lipofilních řetězců těchto struktur na jejich akcelerační působení. Navíc byly syntetizovány a hodnoceny homology s různou délkou koncového řetězce, což umožňuje pozorovat vliv délky koncového řetězce na jejich aktivitu.



Obr. 5.1.: Struktura isosterů s močovinovou funkční skupinou; R = nonyl, decyl, undecyl, dodecyl.

Látky byly syntetizovány v laboratořích na katedře anorganické a organické chemie, podle postupu popsáném v kapitole 3.

Struktura všech finálních látek byla prověřena IR spektry, NMR spektra nebyla získána, neboť se při jejich proměřování amonium-karbamátové uskupení rozkládalo za vzniku příslušné výchozí aminomočoviny. Pomocí NMR spekter byly ale prokázány struktury všech 4-(alkylkarbamoylamino)butylamonium-trifluoracetátů i alkyl[4-(*tert*-butoxykarbonylamino)butyl]močovín, tedy posledních a předposledních meziproductů.

Hodnocení biologické aktivity proběhlo rovněž na katedře anorganické a organické chemie, metodikou vypracovanou na katedře farmaceutické technologie pod vedením doc. RNDr. Pavla Doležala, CSc. Tato metodika je uvedena v kapitolách 3.2.1. až 3.2.5. Při testování akceleračního působení těchto látek byla jako donorové médium použita pouze

směs propylenglykol/voda v poměru 3/2, vzhledem k tomu, že Transkarbam 12 i všechny jeho dosud syntetizované a jako akceleranty prověřované isostery vykazovaly největší aktivitu právě z tohoto média.

Seznam finálních produktů a výsledky hodnocení jejich aktivity je uveden v kapitole 4. Záměnou esterové funkční skupiny za močovinou se schopnost těchto látek urychlovat průnik léčiv přes kůži značně snížila. Tento výsledek tedy podporuje hypotézu, uvedenou v kapitole 2, že se esterová funkční skupina Transkarbamu 12 podílí na mechanismu účinku této vysoce aktivní látky a její záměnou dojde ke snížení aktivity. Lze sledovat také vliv délky koncového řetězce na aktivitu. S prodlužujícím se koncovým řetězcem aktivita nejprve roste, maxima dosahuje u homologu s decylovým koncovým řetězcem, a poté opět klesá, což odpovídá vztahům, pozorovaným i u ostatních isosterů.

Následující tabulka 5.1. porovnává akcelerační aktivity isosterů Transkarbamu 12 se zaměněnou funkční skupinou uprostřed lipofilních řetězců.

Isoster	Spojovací řetězec – počet uhlíků	Koncový řetězec – počet uhlíků	AP
ester	5	12	22,8 ± 1,1
karbonát	5	8	12,4 ± 2,6
		10	11,8 ± 0,7
		12	7,4 ± 0,2
	6	8	7,1 ± 0,4
		10	7,9 ± 1,6
		12	8,4 ± 3,3
keton	5	11	3,8 ± 1,2
		12	3,4 ± 0,7
amid	5	6	3,8 ± 0,5
		7	3,8 ± 0,7
		8	5,0 ± 1,2
		9	8,6 ± 2,8
		10	6,0 ± 1,4
		12	2,2 ± 0,5
		18	0,9 ± 0,4

Isoster	Spojovací řetězec – počet uhlíků	Koncový řetězec – počet uhlíků	AP
karbamát	4	8	3,2 ± 0,8
		9	6,3 ± 1,8
		10	5,6 ± 0,5
		11	2,9 ± 0,4
	5	10	5,3 ± 0,9
		11	2,3 ± 0,5
		12	1,7 ± 0,5
	6	10	4,3 ± 0,6
		11	3,7 ± 0,3
		12	1,9 ± 0,3
močovina	4	9	3,3 ± 0,5
		10	3,6 ± 2,6
		11	1,7 ± 1,9
		12	1,3 ± 0,9
alkyl	-	18	1,8 ± 0,6

Tab. 5.1.: Srovnání akcelerační aktivity isosterů Transkarbamu 12.

Závěrem lze konstatovat, že funkční skupina uprostřed lipofilních řetězců má vliv na aktivitu těchto látek, která klesá v pořadí ester > karbonát > keton > amid > karbamát > močovina > alkyl.

6. ZÁVĚR

V rámci této rigorózní práce byly připraveny čtyři finální produkty, látky v literatuře dosud nepopsané. Jejich struktura byla potvrzena IR spektry. Během jejich syntézy bylo izolováno devět meziproductů, osm z nich nebylo v literatuře dosud popsáno. Také jejich struktura byla prověřena pomocí IR, a také ^1H NMR a ^{13}C NMR spekter. Finální produkty byly hodnoceny *in vitro* jako akceleranty transdermální penetrace. Tato práce doplnila sérii isosterů Transkarbamu 12, vyvinutých na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, a její výsledky tak přispěly ke stanovení vlivu funkční skupiny uprostřed lipofilních řetězců těchto látek na jejich akcelerační aktivitu.

7. LITERATURA

1. T. Holas, K. Vávrová, J. Klimentová, A. Hrabálek: Synthesis and transdermal permeation-enhancing activity of ketone, amide, and alkane analogs of Transkarbam 12. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. in print. (2006)
2. T. Holas, K. Vávrová, M. Šíma, J. Klimentová, A. Hrabálek: Sythesis and transdermal permeation – enhancing aktivty of carbonate and carbamate analogs of Transkarbam 12. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. in print. (2006)
3. O. Farsa: Disertační práce. Faf UK. Hradec Králové. (2000)
4. M. Chalabala et al.: Technologie léků. 315 – 318. (2001)
5. 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. *Pharmaceutical Research*. **23**. 912 – 918. (2006)
6. J. Zbytovská, S. Raudenkolb, S. Wartewig, W. Hübner, W. Rettig, P. Pissis, A. Hrabálek, P. Doležal, R. H. H. Neubert. Phase behaviour of Transkarbam 12. *Chemistry and Physics of Lipids*. **129**. 97 – 109. (2004)
7. Wakisaka et al.: a Novel Plasma - Stable Metabolizable Linkage. *Journal of Medicinal Chemistry*. **40**. 2649 – 2650. (1997)