UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

Syntéza akcelerantů transdermální permeace na bázi derivátů piperidinkarboxylových kyselin II.

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

Hradec Králové

2008 **Michal Kořínek**

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

*Rád bych poděkoval **doc. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc.** za odborné vedení a cenné rady při vzniku této práce.*

Děkuji také celé jeho výzkumné skupině zabývající se **vývojem nových a*kcelerantů transdermální penetrace***. *Především **PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D.**, Mgr. Jaroslavu Rohovi, Mgr. Michalu Novotnému a Mgr. Jakubovi Novotnému za jejich pomoc v syntetické, resp. biologické experimentální části práce i za odborné rady. Speciální poděkování si zaslouží Veronika Fratričová.*

Dále děkuji paní Kateřině Kolovratníkové za změření teplot tání, paní Ivě Vencovské za změření IR spekter, doc. PharmDr. Jiřímu. Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter.

Abstrakt

Akceleranty transdermální permeace jsou látky usnadňující průnik léčiva přes kůži. Reversibilně ovlivňují stratum corneum, vnější ochrannou vrstvu epidermis. Předlohovou látkou pro syntézu byla vysoce účinná látka transkarbam 12. Cílem bylo zjistit vliv cyklizace molekuly na jeho akcelerační aktivitu.

Byly syntetizovány tyto deriváty esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny:

- 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-bromid
- 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-bromid
- decylester kyseliny 1-acetylpiperidin-4-karboxylové
- dodecylester kyseliny 1-acetylpiperidin-4-karboxylové
- 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-4-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát
- 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-4-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát

Tyto dříve nepopsané látky byly charakterizovány spektrálními metodami. Hodnocení akcelerační aktivity připravených sloučenin bylo provedeno *in vitro* testy na prasečí kůži v modifikované Franzově difúzní cele za použití theofylinu jako modelového permeantu. Množství theofylinu bylo stanoveno metodou HPLC s UV detekcí.

Z výsledků vyplývá výrazná akcelerační aktivita nejen solí karbamových kyselin, ale i *N*-acetylderivátů odvozených od esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny. Jejich aktivita je na úrovni transkarbamu 12. Decylestery připravených látek jsou účinější než dodecylestery. Byla potvrzena nezastupitelná role karbamátové aniontu při interakci s lipidy stratum corneum. Ovšem zároveň vysoká akcelerační aktivita *N*-acetylovaných derivátů dokazuje důležitost zachování základní struktury amfifilního enhanceru s odpovídající vzdáleností mezi dusíkem a karbonylem polární hlavy, esterovou vazbou a vhodnou délkou hydrofobního řetězce.

Ze studie vyplývá, že rigidní analogy účinných flexibilních akcelerantů transdermální permeace neztrácí aktivitu.

Abstract

Transdermal permeation enhancers are substances facilitating penetration of drugs through the skin. They temporarily influence stratum corneum, the outermost protective layer of epidermis. Highly effective transkarbam 12 served as a model substance. The aim of my work was to find out the effect of cyclization on its enhancing activity.

The following derivatives of piperidine-4-carboxylic acid esters were synthesized:

- 4-(decyloxycarbonyl)piperidinium bromide
- 4-(dodecyloxycarbonyl)piperidinium bromide
- 1-acetylpiperidine-4-carboxylic acid decyl ester
- 1-acetylpiperidine-4-carboxylic acid dodecyl ester
- 4-(decyloxycarbonyl)piperidinium 4-(decyloxycarbonyl)piperidine-1-carbamate
- 4- (dodecyloxycarbonyl)piperidinium 4-(dodecyloxycarbonyl)piperidine-1-carbamate

These unknown substances were characterized by spectral methods.
The biological activity of the prepared compounds was evaluated *in vitro* on porcine skin in modified Franz diffusion cell with theophylline as a model permeant. The amount of theophylline was measured by HPLC method with UV detection.

The results showed a significant permeation-enhancing activity of both the carbamic acid salts and *N*-acetyl derivatives of piperidin-4-carboxylates. Their activity was comparable to transkarbam 12. The decyl esters of the prepared compounds were more effective than dodecyl esters. The essential role of the carbamate anion for the interaction of these enhancers with the stratum corneum lipids was confirmed. However, the high activity of the *N*-acetyl derivatives demonstrated the importance of the basic structural features of amphiphilic enhancer such as an appropriate linking chain of polar head between the nitrogen and carbonyl, ester bond, and a suitable hydrophobic chain length.

The study presented that the rigid analogues of the effective flexible transdermal permeation enhancers do not lose their activity.

Obsah

1 Cíl práce 10
2 Úvod 11
3 Teoretická část 12
3.1 Stavba kůže 12
3.1.1 Stratum corneum 13
3.1.1.1 Lipidy SC - složení 14
3.1.1.1.1 SFINGOLIPIDY 14
3.1.1.1.2 Cholesterol 18
3.1.1.2 Lipidy SC – seskupení 18
3.1.2 Stratum granulosum, spinosum a basale 19
3.1.2.1 Lipidy živých vrstev epidermis 19
3.1.2.1.1 FOSFOLIPIDY 20
3.2 Možnosti permeace látek 20
3.3 Akceleranty transdermální permeace 22
3.4 Mechanismus účinku akcelerantů 23
3.4.1 Interakce s intercelulárními lipidy 24
3.4.2 Interakce s proteinovými strukturami 24
3.4.3 Oddělování léčiva 25
3.5 Vztah struktury a účinku akcelerantů transdermální permeace 25
3.5.1 Hydrofobní řetězec 25
3.5.1.1 Nasycený řetězec 25
3.5.1.2 Nenasycený řetězec 26
3.5.1.3 Větvený řetězec 26
3.5.1.4 Polární skupina v řetězci 26
3.5.1.5 Dva hydrofobní řetězce 27
3.5.2 Polární hlava a její role 27
3.5.3 Biodegradabilita akcelerantů 29
4 Metodická část 30
4.1 Esterifikace aminokyselin a jiných dusíkatých karboxylových kyselin 30

4.1.1 Zavedení chránící benzyloxokarbonylové skupiny na bazický dusík molekuly 30
4.1.2 Příprava složitějších esterů 31
5 Experimentální část 32
5.1 Chemikálie a instrumentální vybavení 32
5.2 Syntéza derivátů piperidin-4-karboxylové kyseliny 33
5.2.1 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylová kyselina 33
5.2.2 Decylester 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny 34
5.2.3 Dodecylester 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny 35
5.2.4 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-bromid 36
5.2.5 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-bromid 37
5.2.6 Decylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny 38
5.2.7 Dodecylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny 39
5.2.8 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-4-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát 40
5.2.9 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-4-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát 41
5.3 Hodnocení akcelerační aktivity 42
5.3.1 Příprava kůže pro permeace 42
5.3.2 Příprava donorových vzorků 42
5.3.3 Permeační experimenty 42
5.3.4 HPLC stanovení theofylinu 44
5.3.5 Zpracování dat 44
6 Výsledky 45
7 Diskuse 50
8 Závěr 53
9 Literatura 54

1 Použité zkratky

SC	**stratum corneum**
AP	**akcelerant permeace**
PG	**propylenglykol**
IR	**infračervené spektrum**
NMR	**nukleární magnetická rezonance**
T 12	**transkarbam 12**
UP	**urychlovací poměr (syn. akcelerační poměr)**
I	**1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylová kyselina**
II	**decylester 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny**
III	**dodecylester 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny**
IV	**4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-bromid**
V	**4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-bromid**
VI	**decylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny**
VII	**dodecylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny**
VIII	**4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-4-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát**
IX	**4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-4-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát**

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zhodnotit vztah struktury a účinku derivátů piperidinkarboxylových kyselin jako potenciálních akcelerantů transdermální permeace.

Podle předlohových látek syntetizovaných a testovaných na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové v předešlých letech byly navrženy nové potenciálně účinné akceleranty transdermální penetrace. Již dříve byla patentována velmi účinná látka transkarbam 12 (**T 12**) s flexibilní acyklickou strukturou. Hlavní myšlenkou proto bylo syntetizovat cyklické formy **T 12**, tedy deriváty esterů piperidinkarboxylové kyseliny. V této práci bylo syntetizováno šest derivátů esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny. Délka hydrofobního řetězce látek byla zvolena na základě předchozích prací[1], podle kterých se optimální délka řetězce akcelerantu pohybuje mezi 10 až 12 uhlíky.

Jsou to látky těchto struktur:

- 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-bromid (**IV**)
- 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-bromid (**V**)
- decylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (**VI**)
- dodecylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (**VII**)
- 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-4-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (**VIII**)
- 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-4-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (**IX**)

Cílem bylo provést test akcelerační aktivity těchto látek při permeaci přes prasečí kůži za použití theofylinu jako modelového léčiva. Dále vzájemně porovnat účinnost jednotlivých derivátů navzájem i ve vztahu k aktivitě **T 12**. Účelem bylo zhodnotit potenciál akcelerace u látek s rigidním cyklickým řetězcem mezi dusíkem a esterem u tohoto typu látek.

3 Úvod

Transdermální aplikace léčiv skýtá mnohé výhody oproti běžným cestám podání.[2, 3] Mezi ně patří vyloučení first-pass efektu v játrech a v trávicím traktu, které vede k vyšší biologické dostupnosti, nižším lékovým i potravním interakcím a nižším nežádoucím účinkům. Také je dosaženo stabilní plasmatické hladiny, což je důležité především u léčiv s úzkým terapeutickým indexem. Transdermální aplikace je pohodlná, náplast může být kdykoli jednoduše odstraněna, pokud se vyskytne nežádoucí reakce. Toto vše vede k větší compliance pacienta.

Nicméně velice nízký počet léčiv má optimální fyzikálně chemické vlastnosti pro permeaci přes kůži v dostatečné koncentraci, aby bylo dosaženo terapeutické hladiny v krvi. Toto limituje použití a rozšíření transdermální aplikace u běžných léčiv. Mezi látky v současné době používané v aplikaci přes kůži patří např. klonidin, fentanyl, lidokain, nikotin, nitroglycerin, estradiol, testosteron. Tyto, skrz kůži lehce procházející látky, musí splňovat určité podmínky. Musí mít nízkou denní dávku (do jednotek miligramů), molekulovou hmotnost do 500 $g.mol^{-1}$, nízkou teplotu tání a vyváženou lipofilitu. Látky s jinými vlastnostmi jsou pro přímou transdermální aplikaci nevhodné. Proto je rozšíření možnosti této aplikace i pro větší a hydrofilnější molekuly obrovskou výzvou. [4]

Tuto situaci lze řešit použitím metod, které dočasně snížují bariérovou funkci kůže. Proto byly vyvinuty urychlovače transdermální permeace (akceleranty permeace = AP), tedy látky usnadňující průnik léčiv skrz kůži. Existují ale i jiné metody: ultrazvuk, iontoforéza, elektroporace, magnetoforéza, fotoakustické vlny, mikrojehly, cílená folikulární absorpce, užití lipozómů a jiných „kavit“, eutektické systémy, iontové páry atd.[5]

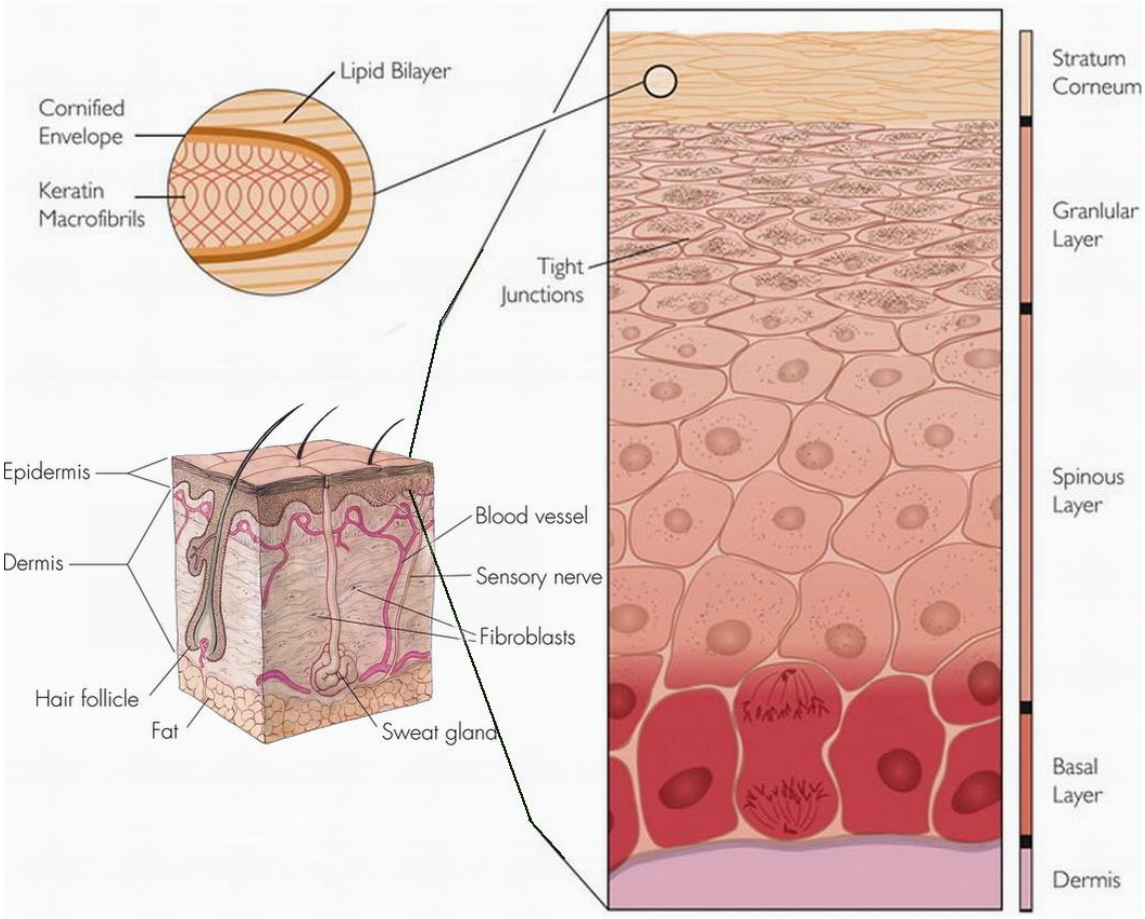
Tato práce je zaměřena na syntézu a zjištění permeační aktivity amfifilních AP, konkrétně derivátů esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny. Látky tohoto typu mohou působit různými mechanismy účinku, které jsou stále studovány.

4 Teoretická část

4.1 Stavba kůže

Kůže člověka má povrch průměrně 1,8 m^2 a hmotnost 4,3–5 kg.[6] Kůže odolává tlaku až 0,176 MPa při celkové tloušťce 1 až 4 mm podle místa na těle. Kyselá reakce kůže kolem pH 5,5 brání růstu mikroorganismů. Kůže je prostupná pro vzdušný kyslík a oxid uhličitý, účastní se tak dýchání. Periferní cévy a potní žlázy se podílejí na termoregulaci organismu.[7] Kůže savců je složena ze dvou hlavních vrstev a to dermis a epidermis, jejichž průměrná tloušťka je 1,2 mm. Dermis je tvořena fibroblasty a mimobuněčnou matrix. Ta je složena z kolagenu, elastinu a glykosaminoglykanů. Dermis je bohatá na krevní kapiláry a nervy. Tak zásobuje živinami avaskulární epidermis.

Epidermis o tloušťce 100 až 150 μm[8, 9] má celkovou hmotnost asi 0,45 kg.[7] Je tvořena z 95% keratinocyty, dále melanocyty, Langerhansovými (nervové buňky) a Merkelovými buňkami (mechanoreceptory). Můžeme ji rozdělit do čtyř vrstev, a to stratum basale, spinosum, granulosum a konečně stratum corneum (SC),[9] viz. **Obr. 1**. Tyto vrstvy představují různé stupně diferenciace buněk, které se vyvíjejí z kmenových buněk ve stratum basale a migrují vzhůru na povrch. Směrem k horním vrstvám koncentrace kyslíku a živin klesá, buňky se stávají plošší, organely degradují a dochází k akumulaci keratinu a lipidů. Tento proces utváření vlastní kožní bariéry se nazývá „keratinizace“.[10] Při poškození se kompletní epidermis vytvoří za 30 dní, z toho 15 dní trvá obnova SC.[9]



Obr. 1. Stavba kůže[11, 12]

4.1.1 Stratum corneum

Funkce kožní bariéry je striktně přisuzována SC, tedy nejsvrchnější vrstvě epidermis. SC je tvořeno korneocyty, což jsou keratinocyty v poslední fázi diferenciace, a mezibuněčnou lipidovou matrix. Tato struktura je často nazývána „cihly a malta“[13] a představuje komplikovanou cestu pro penetrující látky. U člověka má SC obvykle 18 až 21 vrstev.[14] Korneocyty jsou zploštělé, nepravidelně šestihranné buňky, které mají v průměru 20 až 40 μm na délku (v porovnání s 6 až 8 μm u buněk ve stratum basale). Nerovnosti a zvlnění povrchu korneocytů pomáhají překrývajícím se buňkám vzájemně zapadnout a zvyšují tak pevnost vrstvy. Další specifikací těchto buněk je ztluštělá, vysoce zesítěná a neprostupná „korneocytální obálka“, která se u membrán živých buněk epidermis nevyskytuje.[15] Navíc je soudržnost SC posílena desmozomy.

4.1.1.1 Lipidy SC - složení

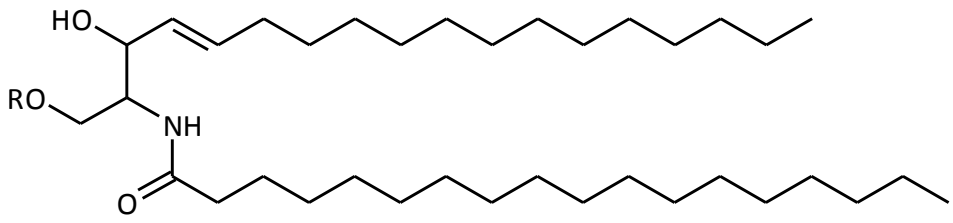
Bariérové vlastnosti kůže závisí na specifickém obsahu a stavbě lipidů SC,[16, 17] především tedy na jedinečném uspořádání intercelulární lipidové matrix a na vlastnostech „korneocytální obálky“ obklopující korneocyt.[18] Lipidy tvořící největší část SC jsou rozprostřeny skrz celé SC, a tedy každá penetrující látka musí interagovat s touto fází, ať už prochází intercelulárně nebo intracelulárně přes korneocyty. Je-li lipidická vrstva porušena kožní chorobou[19, 20] nebo vyjmuta, prostupnost kůže se zvýší, a to oboustranně. Stoupají transkutánní ztráty vody i permeace cizorodých látek. Aplikace topických lipidů kůže a jejich analog pak pomůže obnovení bariérové funkce kůže.[21, 22]

Lipidickou část SC tvoří z 50 % (hmotnostně) ceramidy, 25 % cholesterol, 10 % volné mastné kyseliny (MK),[23] dále menší množství estery cholesterolu, cholesterol sulfát a glukosylceramidy. Neobsahuje žádné fosfolipidy. Toto lipidické složení se u člověka individuálně liší v závislosti na věku, typu a stavu kůže či lokalizaci na těle.[24]

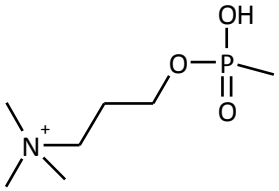
4.1.1.1.1 SFINGOLIPIDY

Sfingolipidy, viz. **Obr. 2**, jsou základními složkami buněčných membrán, membrán organel, lipoproteinů a dalších struktur. Sfingolipidy epidermis zastupují 7,3 % všech lipidů ve stratum basale, 30 % ve stratum granulosum a 40 % ve SC.[25] Je zřejmé, že diferenciace korneocytů směrem k povrchu kůže je doprovázena deplecí fosfolipidů a přírůstkem sfingolipidů. Glykosfingolipidy jsou naproti tomu přítomny ve stratum basale a granulosum v lamelárních tělískách, prakticky však chybí ve SC [26, 27].

Glykosfingolipidy a ceramidy jsou amfifilní molekuly plnící důležitou funkci v mezibuněčném prostoru SC. Udržují zde stabilitu mezibuněčných lipidových lamel. Glykosfingolipidy a ceramidy esterifikované dlouhým řetězcem nasycené MK mají vysoké teploty tání, jsou stálé proti oxidaci, a proto mohou jako důležitá součást kožní bariéry odolávají velkým výkyvům teplot, působení UV záření a oxidačních procesů.



R = H ⟶ ceramid



R = ⟶ sfingomyelin

R = sacharid ⟶ glykosfingolipid

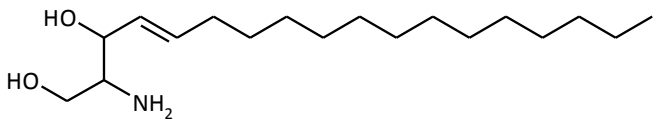
Obr. 2. Obecná struktura sfingolipidů

Ceramidy

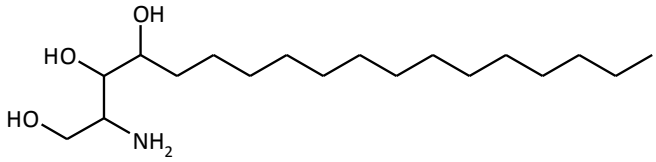
Ceramidy patří do rodiny sfingolipidů, viz. **Obr. 2**. Ceramidy jsou strukturně heterogenní skupinou látek formující hlavní polární lipidy, ze kterých jsou složeny intercelulární části SC.[28, 29] Jako hlavní lipidická složka SC[30, 31] se vyskytují v devíti různých strukturálních typech[32], viz. **Tab. 1.** Kožní ceramidy jsou všeobecně složeny z polární hlavy a dvou hydrofobních řetězců. Základem každého ceramidu je 18-ti uhlíkatý aminoalkohol sfingosin (S), fytosfingosin (F) nebo 6-hydroxysfingosin (H). MK je navázána vždy k primární aminoskupině „S“, „F“ či „H“ v poloze 2 amidickou vazbou. MK může být nehydroxylovaná (N), α–hydroxylovaná (A) nebo ω–hydroxylovaná (O). „O“ je navíc vždy esterifikovaná linolovou kyselinou.[33] MK ceramidu je 24 uhlíků dlouhá kromě 30 až 34 uhlíkaté „O“. Skupina ceramidů, tvořených „O“ MK s navázanou linolovou kyselinou, je esenciální komponentou pro tvorbu kožní bariéry a její stabilizaci.[34] Tyto ceramidy mohou na molekulární úrovni upevňovat a stabilizovat vícelamelární struktury v intercelulárním prostoru SC.[31, 35] Navíc bylo zjištěno, že modifikovaný ceramid s dvěmi *cis* dvojnými vazbami v odlehlých částech molekuly funguje jako endogenní AP.[34]

Jednotlivé složky ceramidů:

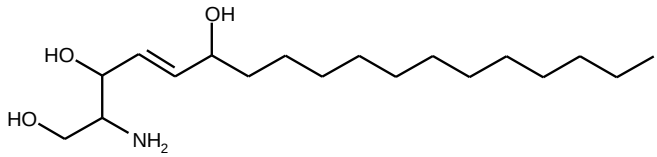
1. aminoalkohol



sfingosin (S)



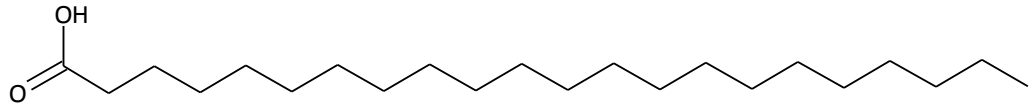
6-hydroxysfingosin (H)



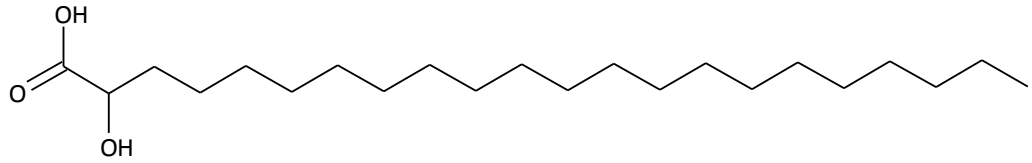
fytosfingosin (F)

2. mastná kyselina

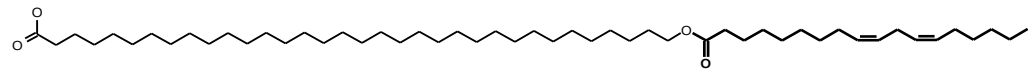
„N“ nehydroxylovaná MK



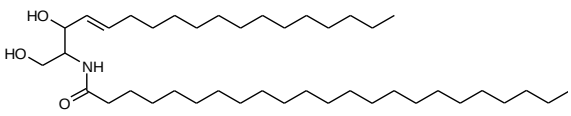
„A“ α-hydroxylovaná MK



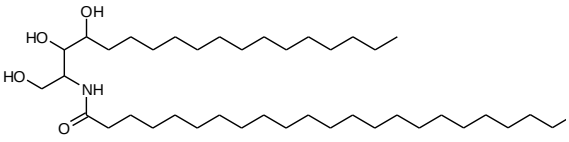
„O“ ω–hydroxylovaná MK esterifikovaná ***kyselinou linolovou***



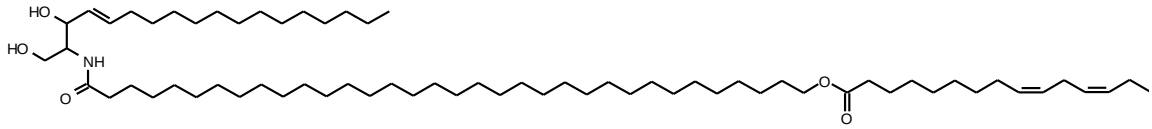
Typy ceramidů:



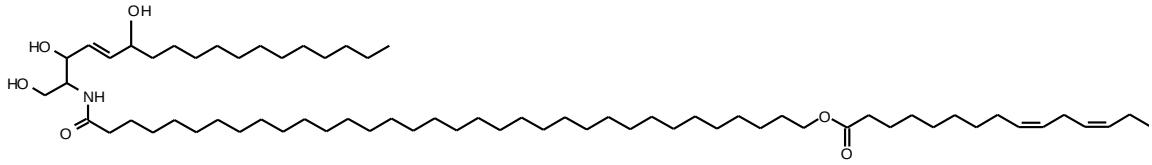
Ceramid „NS“



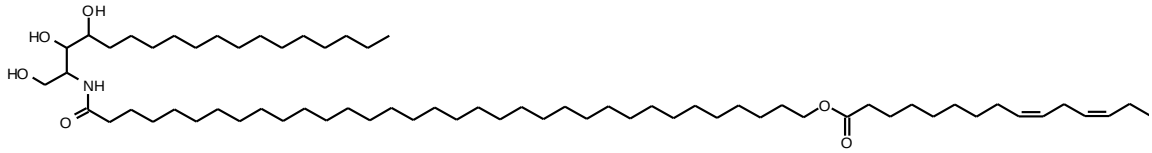
„NF“



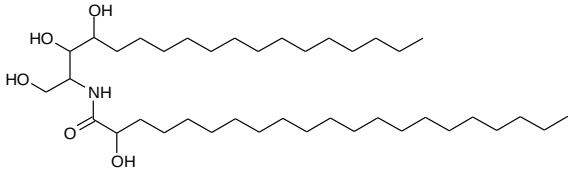
Ceramid „OS“



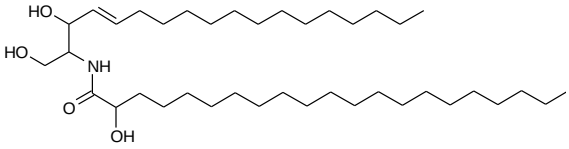
„OF“



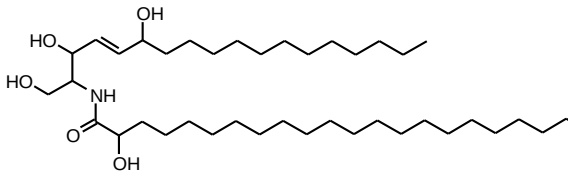
„OH“



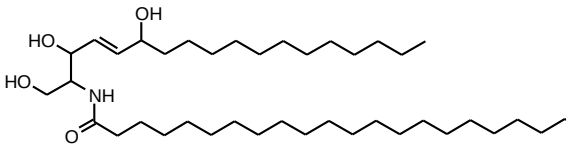
“AF“



Ceramid „AS“



„AH“



„NH“

Tab. 1 Typy ceramidů ve SC člověka[32]

Volné mastné kyseliny

Volné MK jsou většinou nasycené, nevětvené a více než 18-ti uhlíkaté. Nejrozšířenější je behenová (C_{22}) a lignocerová (C_{24}) kyselina. Množství MK se výrazně zvyšuje ve čtyřech nejsvrchnějších vrstvách SC, což je zřejmě důsledek degradace ceramidů nebo také kontaminace mazovými lipidy.[36]

4.1.1.1.2 Cholesterol

Cholesterol je běžnou složkou biologických membrán. Svými amfifilními vlastnostmi napomáhá mísení různých lipidů a podporuje udržování stability lamelárních struktur SC. Cholesterol rozšiřuje přechodové oblasti lamel, a tím činí seskupení lamel méně citlivé k obměnám v ceramidovém složení a k přítomnosti cizorodých látek. [37]

Cholesterolsulfát

Cholesterolsulfát je mezi lipidy SC obsažen v minimálním množství. Jeho obsah je připisován procesu odlupování kůže.

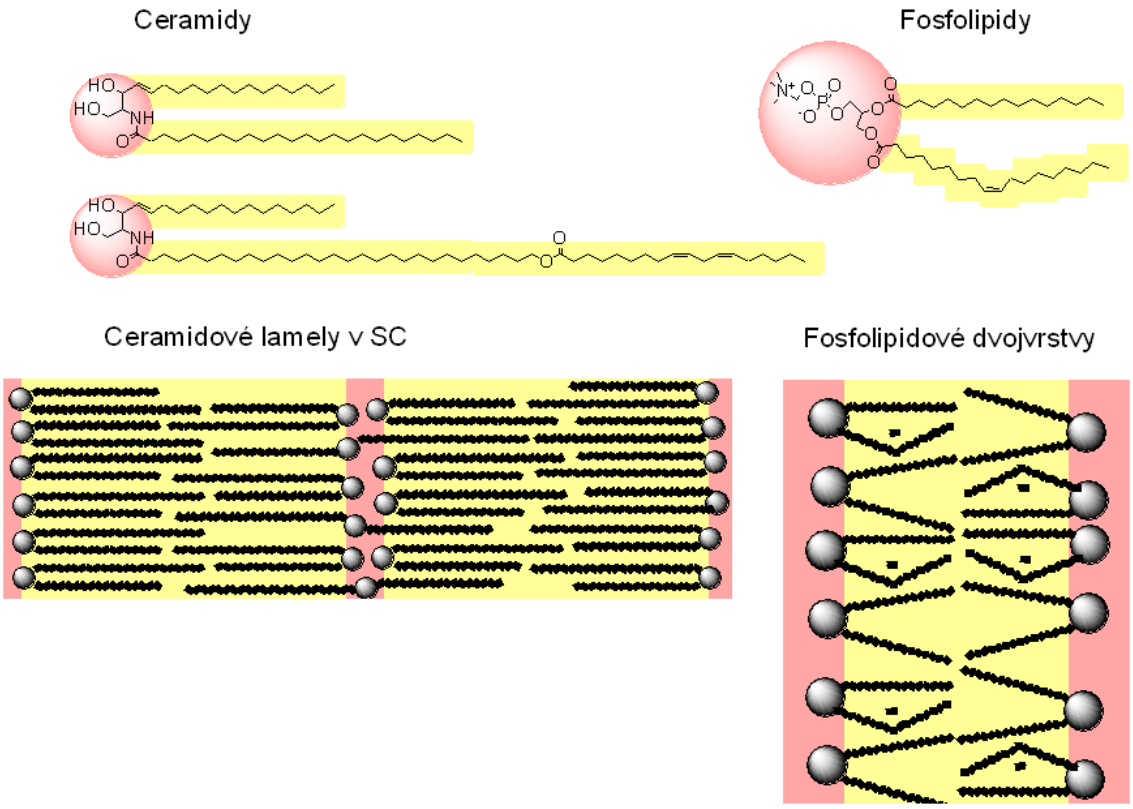
Estery cholesterolu

Estery cholesterolu (především oleáty) netvoří lipidickou dvojvrstvu samy ani spolu s jinými lipidy. Mohou být proto přítomny v nelamelárních částech SC. Tak zřejmě tyto látky zachytávají přebytečné nenasycené MK a tím zabraňují jejich fluidizačnímu efektu na domény mezibuněčné membrány.[34]

4.1.1.2 Lipidy SC – seskupení

Intercelulární lipidy SC tvoří vícelamelární vrstvy uspořádané rovnoběžně s povrchem kůže.[38, 39] V různých interceluláních oblastech se počet lamel i forma lamelární organizace liší. Tak se na okraji korneocytů vyskytuje třípásé „široké-úzké-široké“ (Š-Ú-Š) seskupení, kdy dva široké světlé pásy hydrofóbních lipidických řetězců SC jsou odděleny úzkým tmavým pásem hydrofilních hlav lipidů, viz. **Obr. 3**. Široké jasné pásy mají nízkou elektronovou hustotu, kdežto úzké tmavé pásy vysokou. Tloušťka celé této třípásé vrstvy je 130 Å (Ångström).[40] Podél korneocytů jsou

pak převážně šestipásé (Š-Ú-Š-Š-Ú-Š) a devítipásé (Š-Ú-Š-Š-Ú-Š-Š-Ú-Š) vrstvy. Lipidy SC se nachází nejčastěji ve dvou krystalických fázích za fyziologických podmínek, a to v kosočtverečné krystalové mřížce a zároveň ve volnější šestihranné mřížce tvořící tekuté krystaly.[41, 42]



Obr. 3. Srovnání prostorového uspořádání ceramidů a fosfolipidů.[43]

4.1.2 Stratum granulosum, spinosum a basale

Tyto vrstvy jsou místem produkce keratinu. Ve stratum basale se z melanodendrocytů vyvíjí pigment melanin, jehož tvorba je ovlivněna působením UV záření. Do této části kůže vyúsťují mazové a potní žlázy.[7]

4.1.2.1 Lipidy živých vrstev epidermis

V živých vrstvách epidermis je přítomno velké množství fosfolipidů. Tento fakt souvisí s postupnou diferenciací a vývojem keratinocytů v korneocyt odlupující se vrstvy SC. Směrem k povrchu kůže přibývá sfingolipidů na úkor fosfolipidů.[24]

4.1.2.1.1 FOSFOLIPIDY

Fosfolipidy jsou nezbytné složky membránové dvojvrstvy v plasmatických membránách i ve všech organelách buňky. Podobně jako v ostatních živých buňkách a tkáních tvoří podstatnou část celkových lipidů živých vrstev epidermis. Ve stratum basale a spinosum je to 45 % celkových lipidů a ve stratum granulosum 25 %.[44] Jsou tvořeny polární kationickou částí, fosfátem, glycerolem a dvěma hydrofobními řetězci MK, viz. **Obr 3**.[45] Fosfolipidy živé části epidermis obsahují fosforylovaný cholin, ethanolamin, serin či inositol, dále sfingomyelin a lysolecithin. Fosfolipidy směrem k vrchním vrstvám epidermis postupně s proliferací keratinocytů mizí, jsou nahrazovány sfingolipidy.[46, 47] Fosfolipidové MK epidermis mohou být totiž substráty acyltransferázy. Tyto enzymy pomáhají zakomponovat MK do sfingolipidů, které se tvoří a kumulují při diferenciaci keratinocytů.[48] Velký podíl fosfolipidových MK však není podroben dalším přeměnám a zůstává zde ve formě kapének MK.[49]

Fosfolipidy obsahují ve svých molekulách množství arachidonové kyseliny a tím mohou mít vliv na pochody eikosanoidů, sloučenin s regulatorní funkcí. [50]

Důvody výjimečně nízké propustnosti přes SC v porovnání s jinými biologickými membránami jsou:

- Neobvyklá délka volných MK a acylových řetězců ceramidů
- Relativně malá polární hlava ceramidů (oproti fosfolipidům) umožňující těsnější spojení vrstev
- Vysoká soudržnost díky vodíkovým vázbám[51]
- Formování kompaktnějších vícevrstevných lamel

Kůže musí zajistit optimální bariéru i za extrémních a náhle se měnících podmínek (teplota, pH, koncentrace solí, vlhkost prostředí atd.)[52]

4.2 Možnosti permeace látek

Transdermální absorpce do systémové cirkulace zahrnuje prostup nejen přes SC, ale i živé vrstvy epidermis a vrchní část dermis. Nejdůležitějším prvkem určujícím

rychlost permeace je nejméně prostupná vrstva, tedy SC. Avšak i živá část epidermis tvoří bariéru, a to hlavně pro látky vysoce lipofilní.[53, 54]

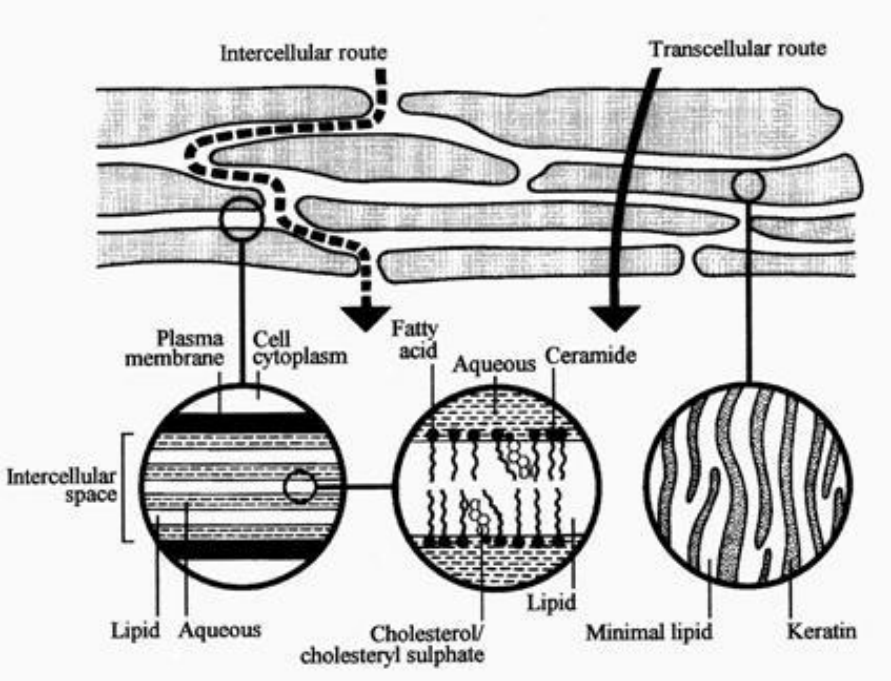
Existují tři potenciální cesty permeace látek přes kůži:

- SC
- vlasové folikuly
- mazové a potní žlázky[5]

Cesta vlasových folikulů a mazových či potních žlázek je limitována, protože tyto tvoří pouze 0,1 % povrchu kůže a navíc počet vhodných látek pro cestu „póry“ je vymezena pro vysokomolekulární substance.[55, 5] Například molekula DNA může imunizovat člověka při topické aplikaci touto cestou.[56]

Přes SC jsou možné dvě cesty, viz. **Obr. 4.** Intracelulární (syn. transcelulární) skrz korneocyty či intercelulární přes mezibuněčné lipidy.

Velké množství různě polárních látek jde cestou interceluláří.[57, 58] Byly určeny nejdůležitější fyzikálně-chemické vlastnosti ovlivňující rychlost permeace látek. Těmi jsou velikost, lipofilita molekuly a akceptor-donorové vlastnosti vodíkových vazeb.[59, 60]



Obr. 4 Cesty permeace látek přes stratum corneum[61]

4.3 Akceleranty transdermální permeace

AP ulehčují léčivu průnik skrz kůži reversibilním snížením bariérové resistence. Byly popsány mechanismy účinku, [62] fyzikálně-chemické koncepty modulace funkce kožní bariéry a transportu xenobiotik,[63] vliv AP na strukturální změny SC,[64] ale také potenciál AP při aplikaci veterinárních léčiv.[65]

Ideální AP by měl být

- netoxický
- nedráždivý
- nealergizující
- s nulovou farmakologickou aktivitou
- s velmi rychlým nástupem účinku
- s předpovídatelnou a reprodukovatelnou aktivitou i trváním účinku
- kompatabilní s léčivy i pomocnými látkami v léčivém přípravku
- kosmeticky přijatelný
- bariérové vlastnosti kůže musí být po odstranění AP z pokožky rychle a plně obnovitelné
- účinek musí být jednosměrný, tedy umožňující prostup pouze léčiva do těla (bránící ztrátě endogenního materiálu)[66, 2]

Dodnes bylo připraveno velké množství AP různých struktur. Nicméně žádná z těchto látek nesplňuje požadavky „ideálního“ AP. Proto se stále hledají nové, vhodnější sloučeniny. Příspěvkem budiž i tato práce.

AP můžeme obecně rozdělit do dvou velkých skupin.

- Jsou to malá polární rozpouštědla

Např. ethanol, propylenglykol, dimethylsulfoxid, ethylacetát atd. Jsou obvykle účinná až při vysokých koncentracích a působí různými mechanismy. Některá z nich ovšem způsobují nevratné změny ve strukturách SC, a proto nejsou vhodná pro klinické užití.

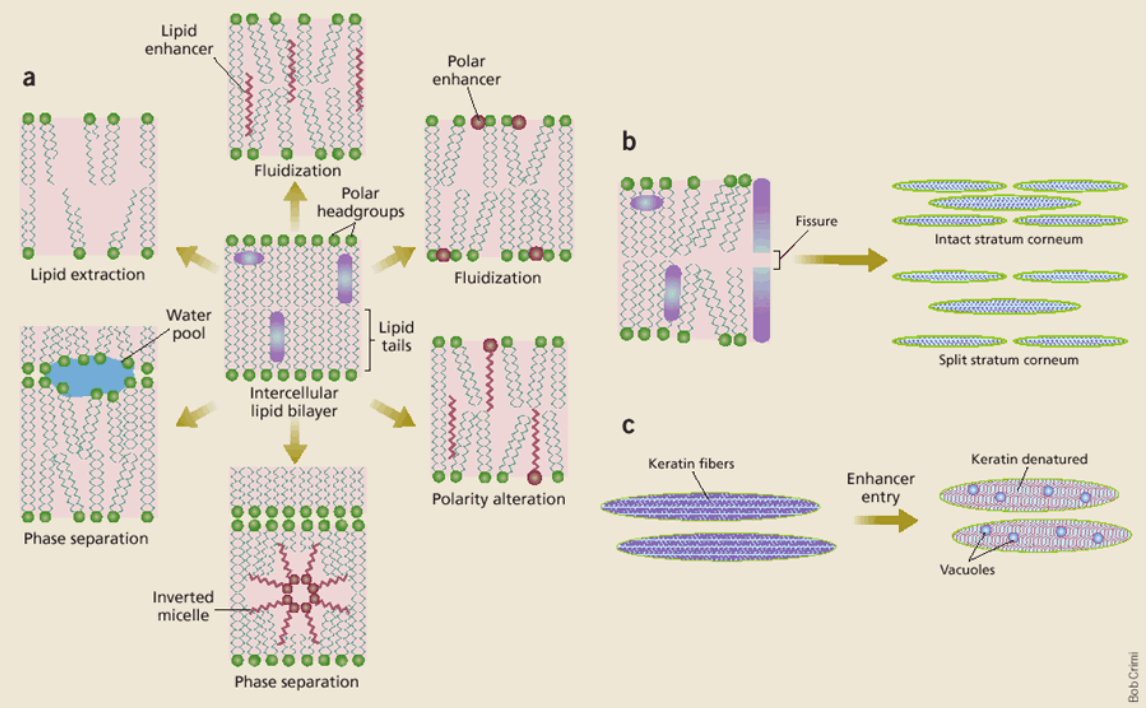
- Amfifilní sloučeniny obsahující polární hlavu a hydrofóbní řetězec

Např. MK a alkoholy, Azone (= 1-dodecylazepan-2-on), DDAIP (= dodecyl-2-dimethylaminopropanoát), T12 atd. Jsou účinné již při nízkých koncentracích. Jejich mechanismus účinku zřejmě zahrnuje reversibilní fluidizaci lipidů intercelulární matrix. Některé z nich jsou biodegradabilní.[67, 68, 69, 70]

4.4 Mechanismus účinku akcelerantů

Účinek AP na kůži zahrnuje penetraci enhanceru do místa účinku a následně rozrušení specifických bariérových struktur, které vede k ulehčení průniku léčiva přes kůži. Navíc mohou AP působit nepřímo ovlivněním léčiva ve vehikulu.

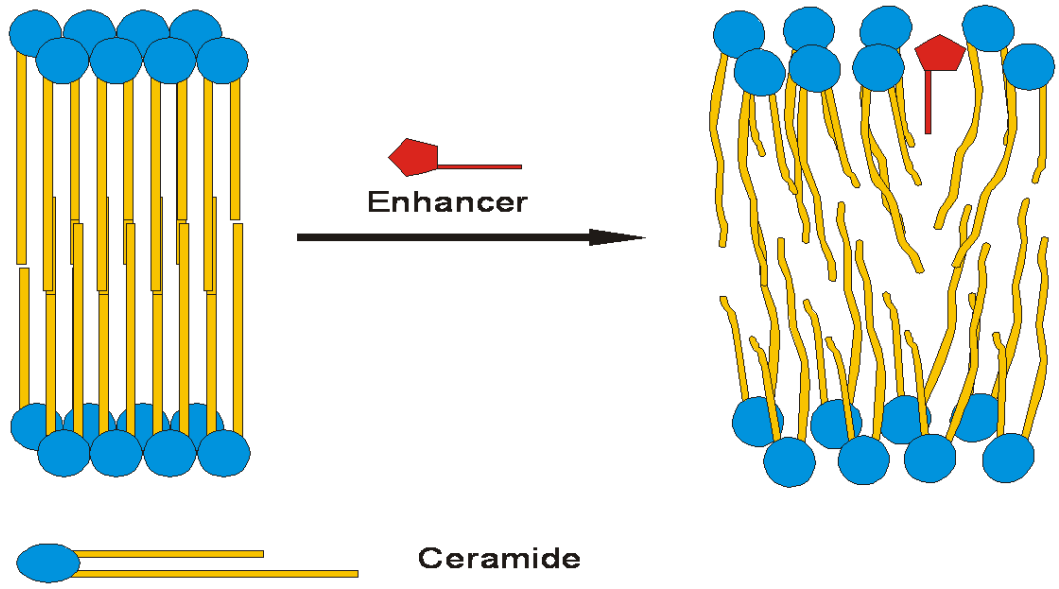
Přesný mechanismus snížení bariérových vlastností kůže akcelerantem není zatím detailně objasněn. Je téměř jisté, že po absorpci do SC působí AP více efekty, které se podílejí na celkovém účinku. Klasifikace AP je založena na tzv. lipid - protein - oddělovací teorii: urychlovače působí na intracelulární keratin SC, ovlivňují desmozomy, modifikují mezibuněčné lipidické domény či pozměňují rozpouštěcí podmínky ve SC. Všechny efekty, viz. **Obr. 5**, vedou k oslabení kožní bariérové rezistence.[67, 68, 69, 70]



Obr. 5 Možné ovlivnění lipidů SC enhancery[43]

4.4.1 Interakce s intercelulárními lipidy

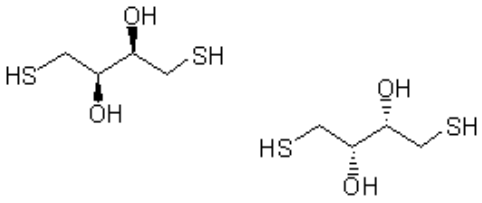
V klinicky vhodných koncentracích většina AP interaguje s mezibuněčnými lipidickými strukturami SC.[66] Malé polární molekuly mohou narušit vodíkové vazby, které drží molekuly ceramidů pohromadě. Amfifilní enhancery mají tendenci vstoupit do lamely s polární hlavou v hydrofilní části lipidů a s hydrofobním řetězcem mezi lipofilními částmi lipidů SC. Takto vmezeřené mohou navodit rozrušení stálého lipidického uspořádání, navodit fluidizaci lamel a tak snížit odolnost kožní bariéry, viz. **Obr. 6**.[71] Některé AP, např. kyselina olejová či terpeny vytvářejí póry prostupné pro polární sloučeniny.[72] Rozpouštědla jako je ethanol či dimethylsulfoxid mohou působit mechanismem lipidové extrakce.[73,74]



Obr. 6 Mechanismus účinku enhanceru v intercelulární lipidické lamele[43]

4.4.2 Interakce s proteinovými strukturami

Tyto AP mohou ovlivnit konformaci keratinu v korneocytech nebo proteiny v desmozómech. Například látka dithiothreitol (**Obr. 7**), která redukuje disulfidické můstky v keratinu, spolehlivě urychluje prostup hydrofilních látek do kůže. Přesto je efekt těchto látek v porovnání s intercelulárně působícími enhancery relativně nízký.[64] To je zřejmě způsobeno kontinuální přítomností intercelulární lipidické fáze v celé tloušťce SC, která není ovlivněna těmito akceleranty. Navíc jsou některé konformační změny proteinů irreversibilní.



Obr. 7 Dithiothreitol[75]

4.4.3 Oddělování léčiva

Pozměnění rozpouštěcích vlastností SC vlivem enhanceru vede ke kumulaci léčiva v kůži. Látka pak lépe difunduje přes kůži.[76]

4.5 Vztah struktury a účinku akcelerantů transdermální permeace

Dodnes bylo syntetizováno velké množství AP, ovšem vztah aktivity a účinku, týkající se především polární hlavy enhanceru, je limitována. Největším problémem při hodnocení a vzájemném srovnání jednotlivých látek v dané studii je fakt, že každá výzkumná skupina používá jiné podmínky testování, jiný druh kůže, rozdílné modelové léčivo, jiné vehikulum a odlišné koncentrace. Byly snahy porovnat akcelerační účinnost látek pomocí počítačových metod a modelování.[77 78 79 80 81].

4.5.1 Hydrofobní řetězec

Vliv hydrofobního řetězce různých AP je dostatečně prozkoumán a zdokumentován, především u MK a alkoholů[82].

4.5.1.1 Nasycený řetězec

Byla popsána parabolická závislost akcelerační aktivity na počtu uhlíků v nevětveném nasyceném řetězci MK, alkoholů, derivátů aminokyselin, laktamů atd. Optimální délka se pohybuje mezi 8 a 14 uhlíky, většinou lépe 10 až 12 uhlíků.[82] To je přibližně polovina délky ceramidů a MK ve SC. Vmezeření enhanceru s kratším hydrofobním řetězcem oproti fyziologickým částem lipidických lamel SC zde vytváří volný prostor, který je pravděpodobně vyplněn sousedními řetězci přítomných

lipidů. Tak dochází k fluidizaci a rozvolnění těsně spojených lamelárních lipidů. Tyto enhancery zde mohou také tvořit separované fáze formující prostupnou zkratku pro penetrující sloučeniny. Je možné, že délka hydrofobního řetězce AP, která odpovídá molekule cholesterolu, oslabuje vzájemnou interakci mezi ceramidy, ceramidem a cholesterolem či mezi dvěma molekulami cholesterolu.[83].

4.5.1.2 Nenasycený řetězec

Na rozdíl od nasycených, u nenasycených řetězců byla určena optimální aktivita délky od 18 do 20 uhlíků.[84]. Nejvíce byla studována olejová kyselina. Akcelerační aktivita nejvhodnějších AP z této skupiny odpovídá látkám s nasyceným hydrofobním řetězcem. Výsledky studií se liší podle použitého modelového permeantu[85] a vehikula.[86]

Fyziologicky při tvorbě kožní bariéry jsou nenasycené MK produkovány degradací fosfolipidů. Ovšem případné fluidizaci lipidové lamely působením těchto MK je zabráněno tvorbou esterů cholesterolu a jejich oddělením.[34]

Druhá dvojná vazba většinou zvyšuje urychlovací aktivitu (linolová MK), zatímco další dvojné vazby v řetězci nevykazují lepší efekt[87 88 89].

4.5.1.3 Větvený řetězec

Větvené i nevětvené 5 až 14 uhlíkaté MK mají shodný akcelerační efekt.[90] Nicméně ze srovnání větvených a nevětvených alkoholů vyplynula snižující se aktivita s vyšším stupněm větvení.[91] Navíc se akcelerační schopnost AP snižuje, pokud je hydroxylová skupina přesunuta z konce ke středu hydrofobního řetězce.

U látek typu 6-aminohexanoátu byl dokázán negativní vliv větvení i cyklizace molekuly na akcelerační poměr.[92]

Je pravděpodobné, že malý stupeň větvení v molekule nebrání její interakci s lipidy SC.

4.5.1.4 Polární skupina v řetězci

Hydroxylace v centru řetězce kyseliny olejové vedla ke ztrátě akceleračního účinku.[93]

4.5.1.5 Dva hydrofobní řetězce

Stejně jako u látek s jedním hydrofobním řetězcem v molekule je optimální délka AP s dvěma nasycenými řetězci 12 uhlíků. Je možné se domnívat, že pro akcelerační aktivitu je důležitá délka řetězce, nikoliv celková lipofilita molekuly.[94]

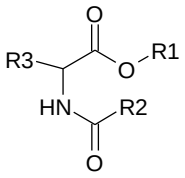
4.5.2 Polární hlava a její role

Odlišnost podmínek při hodnocení vlivu polární hlavy na aktivitu AP ztěžuje vzájemné porovnání amfifilních enhancerů. Nicméně, některé běžné strukturální předpoklady byly stanoveny. Rozhodujícími znaky polární části amfifilních akcelerantů jsou: přítomnost vazby poskytující vodíkové můstky, lipofilita a velikost polární hlavy. Tyto vlastnosti musí být pečlivě vyváženy. Nejaktivnější AP obsahují jednu (např. disubstituovaný amin) nebo dvě polární skupiny. Řetězec polární hlavy může být cyklický nebo alifatický. Počet uhlíkových atomů v polární hlavě (obvykle methylenové skupiny) vztažených na jednu polární skupinu se pohybuje mezi 1,5 (DDAA = dodecyldimethylaminoacetát) a 5 (Azone = 1-dodecylazepan-2-on). Polární skupiny nejaktivnějších akcelerantů tvoří hlavně akceptory vodíkové vazby, tedy disubstituované amidy, estery, acetaly a terciární aminy. Síla vodíkové vazby snižuje aktivitu akcelerantu.

Mechanismus účinku není dosud přesně znám. Amfifilní typ akcelerantů může vytvořit separovanou fázi v intercelulárního prostoru SC, nebo se vmezeřit do lipidické lamely (viz. kapitola 4.4.1). Polární hlava může ovlivnit vodíkové vazby mezi lipidy v polární části lamely, kterou tvoří převážně ceramidy. Tyto H-vazby jsou esenciální pro stabilitu a pevnost lipidické lamely intercelulárního prostoru SC [95]. Narušení H-vazeb by proto mohlo být jedním z možných účinků těchto typů akcelerantů [96].

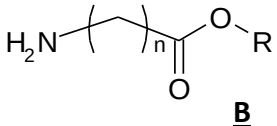
Mezi látky studované v rámci výzkumu AP patří:

- Rozpouštědla, alkoholy, MK (kyselina olejová)
- Estery *N*-acetylprolinu[89]
- Analogy ceramidu odvozené od glycinu a serinu (**A**)[97]

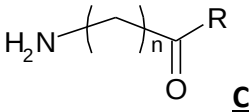


A

- Estery *ω*-aminokyselin (**B**) a jejich reverzní analogy *ω*-aminoalkylalkanoaty (**C**)[97,98]

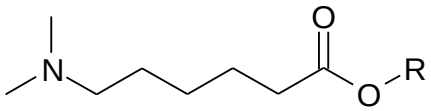


B



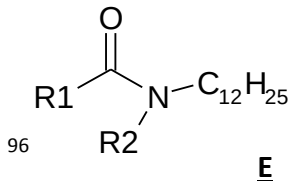
C

- Estery kyseliny 6-dimethylaminohexanové (**D**)[99]



D

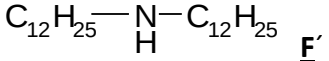
- Estery *N*,*N*-disubstituovaného alaninu a glycinu (např. DDAA = dodecyl dimethylaminoacetát) (**E**) [100]



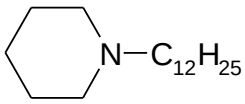
96

E

- Acyklické amidy
- Aminy (**F´**, **F´´**) [101]

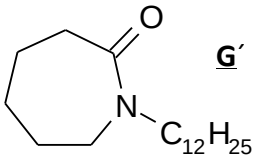


F´

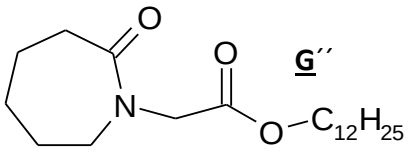


F´´

- Analogy Azonu (= 1-dodecylazepan-2-on) (**G´**, **G´´**)[107]

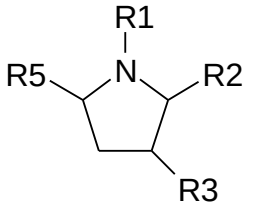


G´



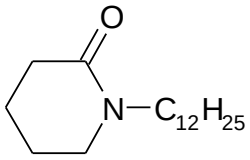
G´´

- Pyrrolidiny (**H**)[102]



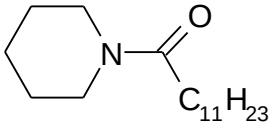
H

- N-alkyl laktamy, amidy a aminy (**CH**)[103]



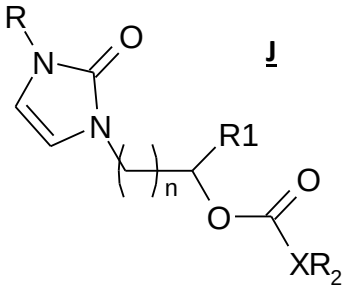
CH

- Laktamy, amidy a cyklické ketony (**I**)[104]



I

- Nenasycené cyklické močoviny (**J**) [105]



J

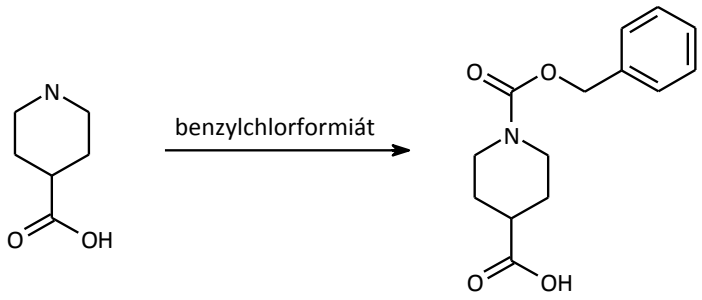
4.5.3 Biodegradabilita akcelerantů

Aby byla zajištěna bezpečnost, je vhodné, aby byla polární hlava AP spojena s hydrofobním řetězcem pomocí biodegradabilní vazby. Nejvhodnější se ukazuje vazba esterová pro hojný výskyt esteráz v kůži. Amfifilní estery se tak krátce po vyvolání akceleračního účinku rozpadnou na volný alkohol a kyselinu.[106, 107, 108]

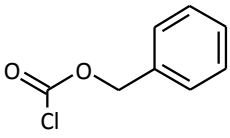
5 Metodická část

5.1 Esterifikace aminokyselin a jiných dusíkatých karboxylových kyselin

5.1.1 Zavedení chránící benzyloxokarbonylové skupiny na bazický dusík molekuly



reaktanty:

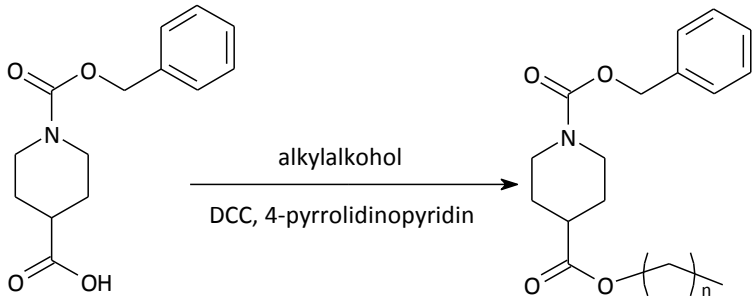


benzylchlorformiát

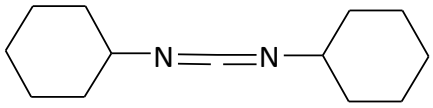
Metoda podle Bergmanna a Zervase[109] obvykle dobře slouží k reakcím aminokyselin při syntéze peptidů. Používá se k ochránění bazického dusíku proti nežádoucím doprovodným reakcím při esterifikaci

Reakce se provádí za chlazení na -2 °C. Při reakci vzniká HCl jako vedlejší produkt.

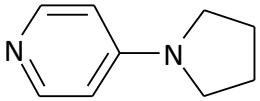
5.1.2 Příprava složitějších esterů



reaktanty:



dicyklohexylkarbodiimid (DCC)



4-pyrrolidinopyridin

Metoda podle Hassnera a Alexaniana[110] se používá při přípravě složitějších a chirálních esterů, resp. amidů.

Dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) usnadňuje esterifikaci karboxylu i méně reaktivním alkoholem a 4-pyrrolidinopyridin slouží jako katalyzátor reakce. Reakce je obvykle chlazena ledem na 0 °C. Vedlejším produktem je N,N´-dicyklohexylmočovina, která se z reakční směsi snadno odstraní odfiltrováním z diethyletheru.

Tyto metody ochránění bazického dusíku pomocí právě benzyloxokarbonylové skupiny a následné esterifikace v přítomnosti DCC a 4-pyrrolidinopyridinu jsou na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové osvědčeny a hojně používány. Sloužily k přípravě mnoha AP na bázi esterů syntetizovaných na katedře. Proto byly tyto reakce za daných podmínek použity také při syntéze esterů piperidin-4-karboxylových kyselin.

6 Experimentální část

6.1 Chemikálie a instrumentální vybavení

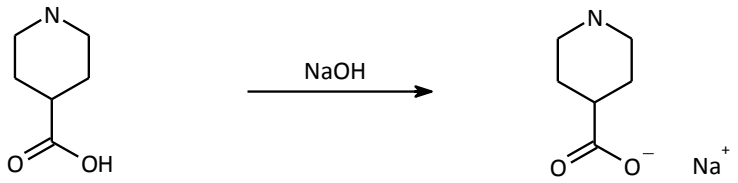
Chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Silikagel 60 (velikost zrn 0,015 až 0,040 mm) pro sloupcovou chromatografii, TLC desky (silikagel 60 F_{254}) a HPLC kolony byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Struktura a čistota syntetizovaných látek byla potvrzena FTIR (Nicolet Impact 400 Spektrofotometr, Madison, USA) a ^{1}H a ^{13}C NMR spektry (přístroj Varian Mercury-Vx BB 300 pracující na 300 MHz pro ^{1}H a 75 MHz pro ^{13}C spektra). Bod tání byl určen na přístroji s automatickou detekcí teploty tání BÜCHI B-545 (Švýcarsko).

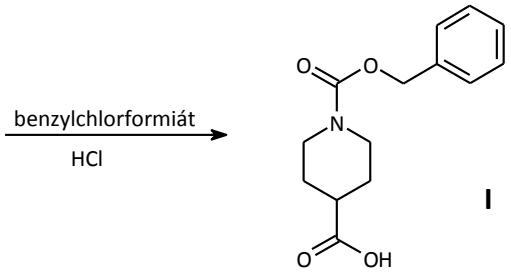
6.2 Syntéza derivátů piperidin-4-karboxylové kyseliny

6.2.1 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylová kyselina (I)

syn. chráněná piperidin-4-karboxylová kyselina, M=263,3 g.mol^{-1}, $C_{14}H_{17}NO_4$



K 4,00 g (31 mmol, M=129,14 g.mol^{-1}) kyseliny piperidin-4-karboxylové bylo přidáno 2,48 g (62 mmol) NaOH za vzniku sodné soli piperidin-4-karboxylové kyseliny (M=151,15 g.mol^{-1}).



I

K roztoku sodné soli kyseliny bylo za chlazení na ledové lázni přidáno pomalu po kapkách 5,29 g (31 mmol benzylchloroformiátu). Reakční směs byla míchána 10 minut. Vzniklé sraženiny byly rozpuštěny přidáním odpovídajícího množství vody. Přebytečný benzylchlorformiát byl třikrát vytřepán do diethyletheru. Posléze byla vodná fáze okyselena přídavkem HCl. Produkt byl třikrát vytřepán do ethylacetátu a poté přebytek HCl třikrát třepán do vody. Zbytek vody byl odstraněn pomocí Na_2SO_4 a sušidlo bylo odfiltrováno. Ethylacetát byl odpařen.

Krystalizace produktu proběhla ze směsi diethylether/hexan. Krystaly byly odfiltrovány a vysušeny v exsikátoru.

Závěr: Bylo získáno 3,21 g produktu ve formě krystalů.

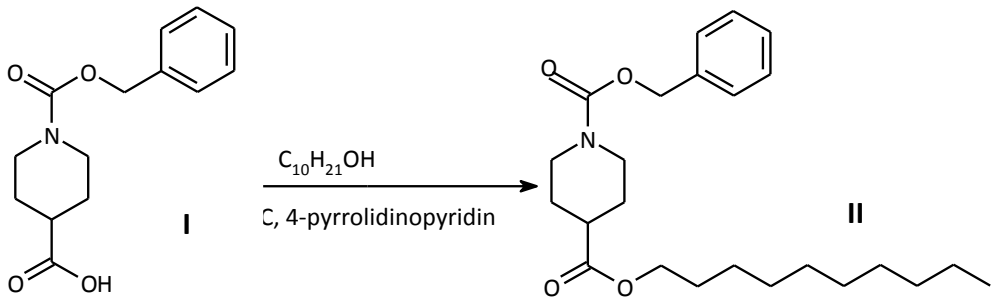
Výtěžek 82 %.

T_t = 75,6 °C[111].

Důkaz byl proveden podle teploty tání.

6.2.2 Decylester 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny (II)

M= 403,27 g.mol^{-1}. $C_{24}H_{37}NO_4$



1,30 g (5 mmol) "**I**", 1,13.g (5,5 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) a 0,074 g (0,5 mmol) katalyzátoru (4-pyrrolidinopyridin) bylo rozpuštěno ve 20ml předestilovaného chloroformu. Tato reakční směs byla chlazena na ledové lázni. Do směsi bylo pomalu za stálého míchání přidáváno 0,79 g (5 mmol) decylalkoholu rozpuštěného v chloroformu. Reakce probíhala 20 hodin. Poté bylo přidáno několik kapek ledové kyseliny octové pro ukončení reakce. Vedlejší produkt N,N´ - dicyklohexylmočovina, izolovatelný díky špatné rozpustnosti v diethyletheru, byl odfiltrován.

Produktem byla nažloutlá olejovitá kapalina, přečištěna chromatograficky mobilní fází hexan/diethylether 8:1.

Závěr: Bylo získáno 1,5 g produktu ve formě oleje.

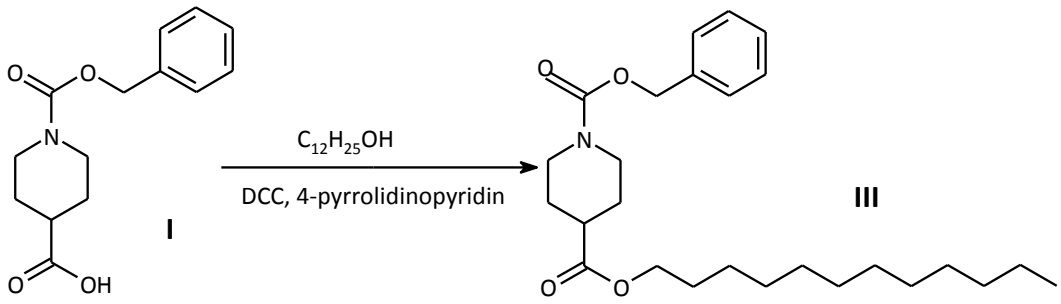
Výtěžek 75 %.

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,88 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,15-1,40 (m, 14H), 1,55-1,75 (m, 4H), 1,80-1,95 (m, 2H), 2,40-2,55 (m, 1H), 2,93 (t, J = 11Hz, 2H), 4,07 (t, J = 6,7Hz, 2H), 4,11 (překryv předchozím signálem, 2H), 5,13 (s, 2H), 7,25-7,45 (m, 5H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.423, 155.162, 136.732, 128.464, 128.443, 127.969, 127.847, 127.828, 67.081, 64.734, 43.235, 43.114, 40.992, 31.848, 29.520, 29.476, 29.258, 29.190, 29.044, 28.560, 27.885, 25.885, 22.646, 14.089.

6.2.3 Dodecylester 1-(benzyloxykarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny (III)

M= 431,30 g.mol^{-1}. $C_{26}H_{41}NO_4$



Reakce probíhala analogicky jako u "**II**" za použití 1,3 g (5 mmol) "**I**", 1,13.g (5,5 mmol DCC) a 0,074 g (0,5 mmol) 4-pyrrolidinopyridinu. Posléze bylo přidáno 0,93 g (5 mmol) dodecylalkoholu.

Produktem byla nažloutlá olejovitá kapalina, přečištěna chromatograficky mobilní fází hexan/diethylether 8:1.

Závěr: Bylo získáno 1,7 g produktu ve formě oleje.

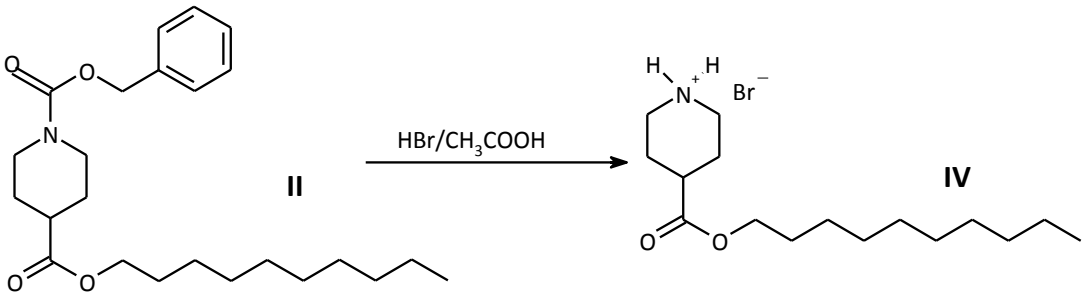
Výtěžek 80 %.

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,88 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,15-1,40 (m, 18H), 1,55-1,75 (m, 4H), 1,80-2,00 (m, 2H), 2,40-2,55 (m, 1H), 2,93 (t, J = 11Hz, 2H), 4,07 (t, J = 6,7Hz, 2H), 4,11 (překryv předchozím signálem, 2H), 5,125 (s, 2H), 7,25-7,45 (m, 5H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.400, 155.144, 136.720, 128.645, 128.449, 127.953, 127.833, 127.788, 67.066, 64.718, 43.255, 43.222, 40.976, 31.867, 29.675, 29.612, 29.582, 29.528, 29.469, 29.304, 29.187, 28.551, 27.865, 25.856, 22.648, 14.086.

6.2.4 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-bromid (IV)

M= 349,3 g.mol^{-1}. $C_{16}H_{32}NO_2$.Br



1,17 g (2,90 mmol) "**II**" bylo smíseno s 5 ml (2,90 mmol HBr) HBr/CH_3COOH. Do baňky s 20 ml v mrazničce předem vychlazeného suchého diethyletheru byla injekční stříkačkou tato směs po kapkách přidána. Produkt se z roztoku ihned vysrážel. Kyselina octová byla odpařena.

Krystaly byly odfiltrovány pomocí Büchnerovy nálevky. Přebytečný HBr byl odstraněn a produkt vysušen v exsikátoru nad NaOH.

Závěr: Bylo získáno 0,65 g produktu ve formě krystalů.

Výtěžek 65 %.

T_t = 77,9 °C.

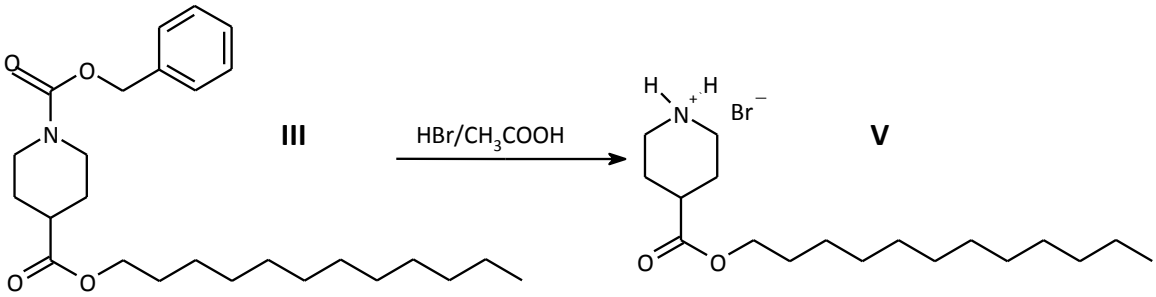
NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,86 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,15-1,40 (m, 14H), 1,50-1,70 (m, 2H), 2,05-2,35 (m, 4H), 2,55-2,75 (m, 1H), 3,00-3,20 (m, 2H), 3,35-3,50 (m, 2H), 4,08 (t, J = 6,7Hz, 2H), 8.50-9.50 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 172.464, 65.363, 42.965, 42.810, 37.808, 31.814, 29.497, 29.466, 29.432, 29.226, 29.160, 28.467, 25.811, 24.340, 22.616, 14.064.

IR (ATR): 2921, 2854, 1731, 1595, 1585, 1193 cm^{-1}.

6.2.5 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-bromid (V)

M= 378,30 g.mol^{-1}. $C_{18}H_{36}NO_2Br$



Reakce probíhala analogicky jako u "**IV**". K 1,1 g (2,55 mmol) "**III**" bylo přidáno 5ml (2,55 mmol HBr) HBr/CH_3COOH.

Krystaly byly odfiltrovány pomocí Büchnerovy nálevky. Přebytečný HBr byl odstraněn a produkt vysušen v exsikátoru nad NaOH.

Závěr: Bylo získáno 0,62 g produktu ve formě krystalů.

Výtěžek 65 %.

T_t = 88,3 °C.

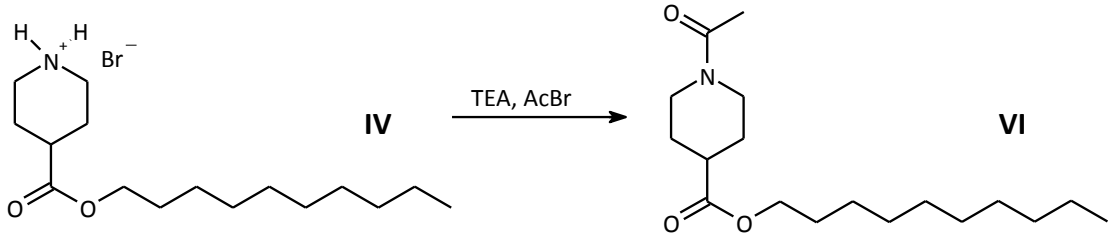
NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,86 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,15-1,40 (m, 18H), 1,50-1,70 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 4H), 2,55-2,70 (m, 1H), 3,00-3,20 (m, 2H), 3,30-3,50 (m, 2H), 4,08 (t, J = 6,7Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 172.490, 65.358, 42.729, 42.578, 37.811, 31.842, 29.573, 29.559, 29.513, 29.433, 29.280, 29.163, 28.458, 25.806, 24.322, 22.623, 18.350, 14.063.

IR (ATR): 2920, 2849, 1731, 1595, 1585, 1194 cm^{-1}.

6.2.6 Decylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (VI)

M= 311,25 g.mol^{-1}, $C_{18}H_{33}NO_3$



0,2 g (0,57 mmol) "**IV**" bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého chloroformu. Bylo přidáno 0,25 ml (1,8 mmol) suchého triethylaminu a 10 ml suchého diethyletheru. Vznikly sraženiny TEA^+Br^-. Do směsi bylo přikapáno 0,07 ml (1,14 mmol) acetylbromidu (AcBr). Reakce byla míchána 1 hodinu za laboratorní teploty. Poté byl odpařen acetylbromid. Směs byla vytřepána třikrát s 10 ml 3% $NaHCO_3$ a následně pětkrát malým množstvím H_2O. Etherová fáze byla vysušena pomocí Na_2SO_4. Produkt byl dosušen v exsikátoru.

Látka byla přečištěna chromatograficky pomocí mobilní fáze diethylether. Produktem byla za laboratorní teploty hnědá olejovitá kapalina.

Závěr: Bylo získáno 0,110 g produktu ve formě oleje.

Výtěžek 72 %.

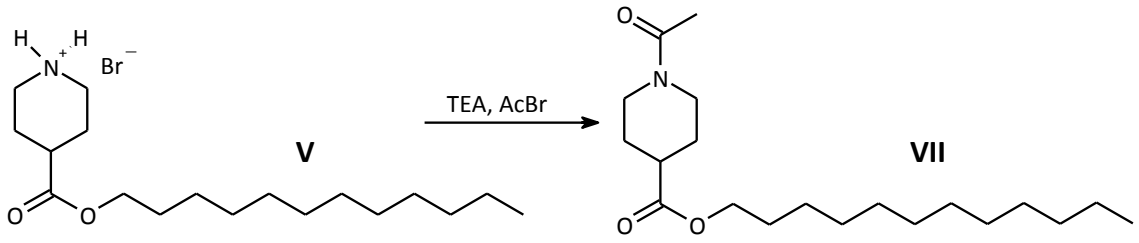
NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,86 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,15-1,40 (m, 14H), 1,50-1,75 (m, 4H), 1,85-2,00 (m, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,45-2,60 (m, 1H), 2,70-2,85 (m, 1H), 3,05-3,20 (m, 1H), 3,70-3,85 (m, 1H), 4,06 (t, J = 6,7Hz, 2H), 4,30-4,50 (m, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.177, 168.771, 64.765, 45.591, 40.952, 40.754, 31.817, 29.635, 29.454, 29.225, 29.153, 28.522, 28.365, 27.784, 25.831, 22.612, 21.407, 14.058.

IR (ATR): 2918, 2850, 1725, 1637, 1174 cm^{-1}.

6.2.7 Dodecylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (VII)

M= 339,28 g.mol^{-1}, $C_{20}H_{37}NO_3$



Reakce probíhala obdobně jako příprava "**VI**". Na reakci se podílelo 0,10 g (0,26 mmol) "**V**", 0,12 ml (0,82 mmol) TEA a 0,03 ml (0,52 mmol) AcBr.

Produktem byly ovšem krystaly. Přečištěna byla látka opět chromatograficky pomocí mobilní fáze diethylether.

Závěr: Bylo získáno 0,050 g produktu ve formě krystalů.

Výtěžek 64 %.

T_t = 43,0 °C.

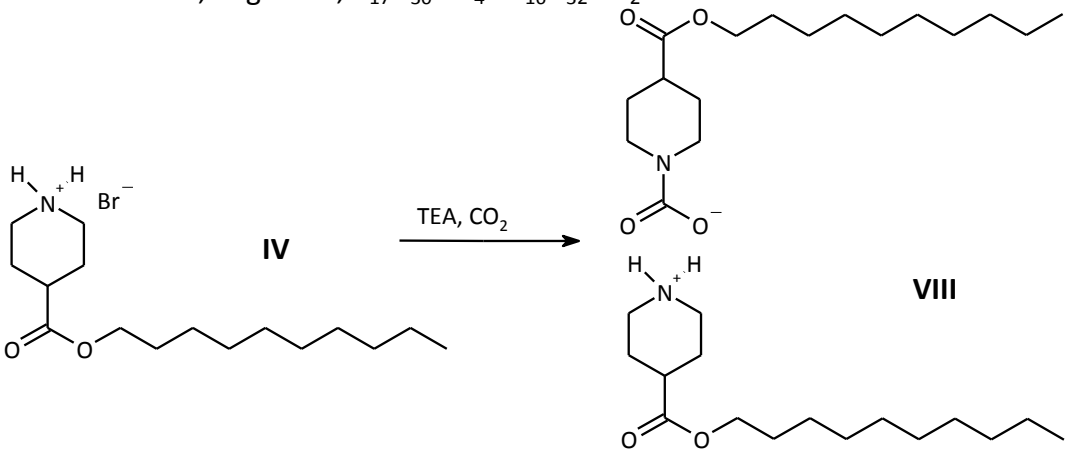
NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,86 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,15-1,40 (m, 18H), 1,50-1,75 (m, 4H), 1,85-2,00 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,45-2,60 (m, 1H), 2,70-2,90 (m, 1H), 3,05-3,20 (m, 1H), 3,70-3,85 (m, 1H), 4,07 (t, J = 6,7Hz, 2H), 4,30-4,50 (m, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.173, 168.871, 64.800, 45.638, 40.939, 40.841, 31.861, 29.688, 29.578, 29.520, 29.461, 29.297, 29.176, 28.539, 28.371, 27.794, 25.849, 22.640, 21.413, 14.078.

IR (ATR): 2917, 2850, 1725, 1636, 1174 cm^{-1}.

6.2.8 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-4-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (VIII)

M= 583,88 g.mol^{-1}, $C_{17}H_{30}NO_4$. $C_{16}H_{32}NO_2$



0,15 g (0,429 mmol) "**IV**" bylo pomalu rozpuštěno v 10 ml destilované H_2O. Do roztoku byl přidán 0,15 ml (1,1 mmol) TEA. Poté byl bazický ester třikrát vytřepán do 10 ml diethyletheru. Organická fáze byla vysušena pomocí Na_2SO_4. Síran byl odfiltrován přes vatu. Etherová fáze byla zahuštěna na vakuové odparce. Baňka byla umístěna na 24 hodin do exsikátoru s oxidem fosforečným pro dosušení a s koncentrovanou kyselinou sírovou pro odstranění přebytečného TEA. Poté byl do oleje rozlitého po co největším povrchu baňky foukán CO_2. Ihned se tvořila vrstvička produktu. Baňka byla umístěna v mrazničce.

Produktem byla bílá krystalická látka.

Závěr: Bylo získáno 0,090 g produktu ve formě krystalů.

Výtěžek 72 %.

T_t = 69,6 °C.

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,92 (t, J = 6,5Hz, 6H), 1,15-1,40 (m, 30H), 1,40-1,80 (m, 12H), 2,05-2,35 (m, 6H), 2,70-2,85 (m, 4H), 4,00 (t, J = 6,7Hz, 4H)

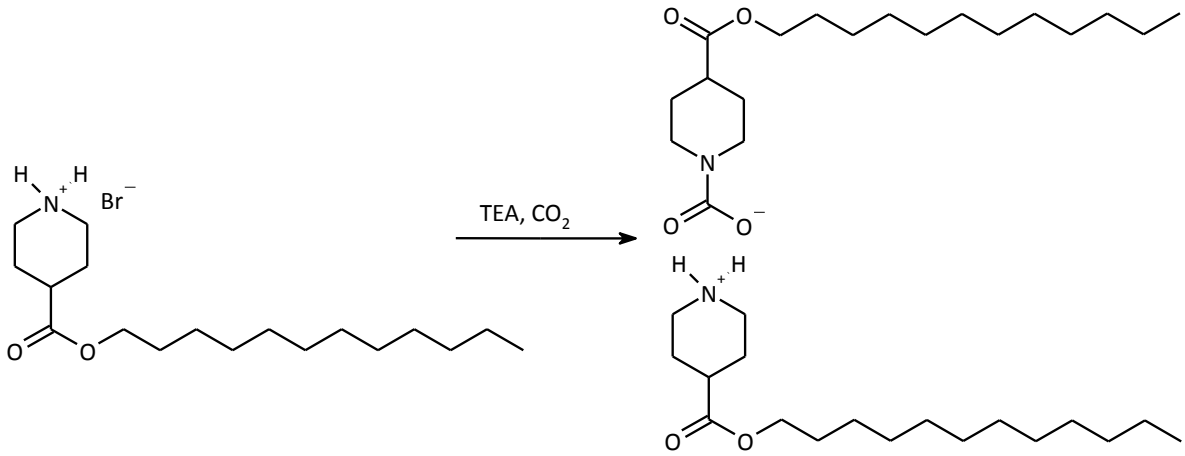
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.857, 64.555, 46.559, 42.477, 32.750, 30.414, 30.206, 30.105, 29.565, 26.734, 23.524, 21.524, 21.267, 21.012, 20.757, 20.502, 20.247, 19.993, 14.722,

V NMR spektru není důkaz karbamátu, ten je ovšem v IR spektru.

IR (ATR): 2919, 2851, 1727, 1632!, 1538, 1174 cm^{-1}.

6.2.9 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-4-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (IX)

M= 638,96 g.mol^{-1}, $C_{19}H_{34}NO_4$. $C_{18}H_{36}NO_2$



Tato reakce probíhala analogicky jako příprava "**VIII**". Bylo použito 0,10 g (0,264 mmol) "**V**", 10 ml destilované vody, 0,1 ml (0,65 mmol) TEA a třikrát 10 ml diethyletheru.

Produktem byla bílá krystalická látka.

Závěr: Bylo získáno 0,065 g produktu ve formě krystalů.

Výtěžek 67 %.

T_t = 77,1 °C.

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,92 (t, J = 6,5Hz, 6H), 1,15-1,40 (m, 38H), 1,40-1,80 (m, 12H), 2,05-2,35 (m, 6H), 2,70-2,85 (m, 4H), 4,00 (t, J = 6,7Hz, 4H)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.816, 64.578, 46.449, 42.372, 32.787, 30.564, 30.499, 30.443, 30.278, 30.127, 30.057, 29.571, 26.746, 23.544, 21.521, 21.266, 21.011, 20.756, 20.502, 20.246, 19.992, 14.732,

V NMR spektru není důkaz karbamátu, je ovšem v IR spektru.

IR (ATR): 2916, 2848, 1725, 1632!, 1541, 1174 cm^{-1}.

6.3 Hodnocení akcelerační aktivity

6.3.1 Příprava kůže pro permeace

Pro testování akcelerační aktivity syntetizovaných látek byla použita prasečí kůže plné tloušťky a pro jeden pokus i kůže dermatomovaná. Kůže ze zadní strany prasečích uší získaných z jatek byla opatrně odříznuta skalpelem od ostatních tkání. Chlupy byly zastřiženy. Tak byla připravena kůže plné tloušťky. Dermatomovaná kůže pak byla získána za použití elektrického dermatomu (Acculan II, Aesculap AG, Braun, Německo). Poté byla kůže namočena na 5 minut v 0,05% roztoku azidu sodného. Vakuově uzavřené části kůže byly uskladněny v mrazničce. Maximální doba uchovávání je 2 měsíce při teplotě –18 °C.

6.3.2 Příprava donorových vzorků

Každý donorový vzorek byl připraven jako 5% suspenze modelového léčiva theofylinu s 1 % testovaného AP v 60% propylenglykolu (PG). Suspenze byla 3 minuty míchána při 50 °C a poté byla přenesena do termostatu a uskladněna 48 hodin při teplotě 37 °C pro navození rovnovážného stavu.

Byl připraven kontrolní vzorek, který obsahoval 5 % theofylinu bez akcelerantu v 60% PG. Další postup byl totožný.

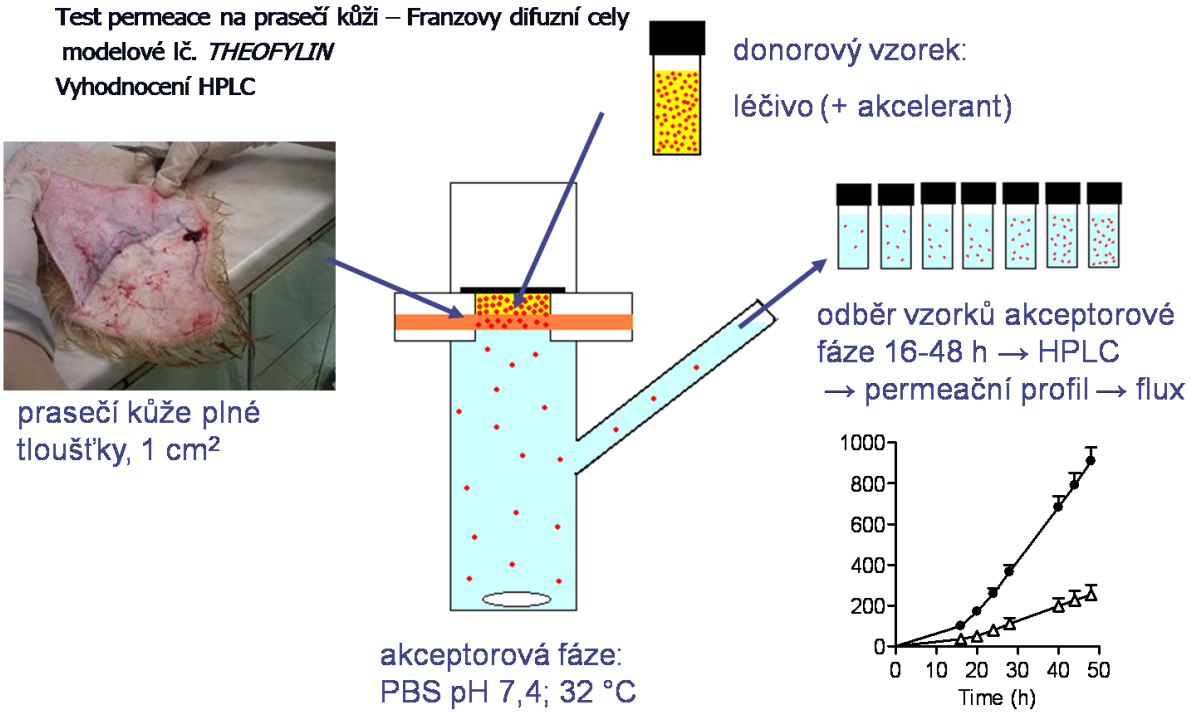
6.3.3 Permeační experimenty

Urychlovací schopnost připravených látek byla hodnocena in vitro za použití Franzových difúzních cel a theofylinu jako modelového permeantu.

Prasečí kůže byla před použitím rozmražena, ihned opatrně nakrájena na kousky o velikosti zhruba 2 x 2 cm a co nejdříve umístěna do Franzových difúzních cel. Každá cela byla řádně upevněna a byla připravena tak, aby vznikla plocha kůže pro permeaci 1 cm^2.

Každá z Franzových cel s míchadlem byla naplněna akceptorovou fází. Ta byla připravena smísením fosfátového pufru o pH 7.4 s přídavkem konzervační látky 0.03 % azidu sodného a izotonizační látky NaCl. Byl změřen přesný objem akceptorové fáze (16 až 18 ml) každé z Franzových difúzních cel. Tento údaj byl potom zahrnut do výpočtů. Cely byly umístěny alespoň na 30 minut do vodní lázně o teplotě 32 °C kvůli ustavení rovnováhy. Poté bylo 200 μl donorového vzorku či kontrolního donorového vzorku aplikováno na kůži do komůrky nad kůží ve Franzově cele, viz. **Obr. 8**. Vzorek byl přikryt krycím sklíčkem. Akceptorová fáze byla po celou dobu trvání experimentu míchána a temperována na teplotu 32 °C ve vodní lázni.

Jednotlivé vzorky byly z Franzových difúzních cel odebírány v přesných časových intervalech v průběhu 48 hodin, konkrétně po 16, 20, 24, 28, 40, 44 a 48 hodinách. Odebrané porce měly objem 0,6 ml a vždy byly nahrazeny přesným objemem čerstvé akceptorové fáze. Tyto objemové změny byly zohledněny při výpočtech.



Obr. 8. Franzova cela[46]

6.3.4 HPLC stanovení theofylinu

Koncentrace theofylinu ve vzorcích akceptorové fáze byla stanovena pomocí HPLC Shimadzu (Japonsko) za použití LC – 20AD vysokotlakého čerpadla (Shimadzu), SIL – 20 A HT autosampleru (Shimadzu), LiChroCART 250-4 kolony (LiChrospher 100, RP - 18, 5μm, Merck, Darmstadt, Německo), RF – 10 A fluorescenčního detektoru (Shimadzu), SPD – M20 A diode array detektoru (Shimadzu) a softwaru Sigmastat. Jako mobilní fáze byl použit methanol a 0.1M NaH_2PO_4 v poměru 6:4. Průtoková rychlost kolony byla nastavena na 1,2 ml/min. Eluát byl monitorován při 272 nm. Retenční čas theofylinu byl 3.3 ± 0.1 min.

6.3.5 Zpracování dat

Změřené hodnoty kumulativního množství theofylinu v μg prošlého přes 1 cm^2 byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Hodnota fluxu byla získána jako směrnice lineární části této křivky.

Všechny testované sloučeniny byly charakterizovány pomocí urychlovacího (akceleračního) poměru (UP)**.** UP vypovídá o efektivitě použitého akcelerantu. Je definován jako poměr fluxu látky v přítomnosti akcelerantu ($\mathbf{J_X}$) a fluxu standardu, tedy látky bez akcelerantu ($\mathbf{J_0}$):

$$UP = \frac{J_x}{J_o}$$

Statistické zpracování bylo provedeno za použití One Way Analysis of Variance se Student-Newman-Keulsovým post testem (program SigmaStat).

7 Výsledky

Dle strukturní předlohy **T 12** byly syntetizovány jeho cyklické analogy, deriváty kyseliny piperidin-4-karboxylové. Jedná se o estery s délkou lipofilního řetězce 10 a 12 C ve formě hydrobromidů, N-acetylderivátů a solí karbamových kyselin.

Prvním krokem syntézy bylo zavedení chránící benzyloxokarbonylové skupiny na bazický dusík molekuly komerčně dostupné kyseliny piperidin-4-karboxylové. Reakce byla provedena podle Bergmanna a Zervase (viz. Metodická část). Byla získána krystalická chráněná kyselina piperidin-4-karboxylová (**I**) s výtěžkem 82 %. Totožnost byla dokázána podle teploty tání.

Dále byla ochráněná kyselina esterifikována podle Hassnera a Alexaniana v přítomnosti DCC a 4-pyrrolidinopyridinu (viz. Metodická část). A to dekanolem za vzniku decylesteru chráněné kyseliny (**II**) s výtěžkem 75 %. Byl použitdodekanol 80 % výtěžku dodecylesteru chráněné piperidin-4-karboxylové kyseliny (**III**). Obě olejovité látky byly přečištěny chromatograficky. Vzhledem k tomu, že tyto meziprodukty nebyly dosud v literatuře popsané, jejich totožnost byla popsána NMR a IR spektry.

Chránící skupina těchto esterů byla odstraněna pomocí 33% HBr. Byl připraven krystalický decylester kyseliny piperidin-4-karboxylové ve formě hydrobromidu (**IV**) s výtěžkem 65 %. Také hydrobromidu dodecylesteru (**V**) bylo získáno 65 % krystalické látky. Tyto látky byly rovněž dokázány spektrálními metodami.

Hydrobromidy (**IV**,**V**) byly podrobeny dalším substitučním reakcím na piperidinovém dusíku. Byla to jejich acetylace acetylbromidem na bazickém piperidinovém dusíku po reakci s TEA. Bylo získáno 72 % acetylovaného decylesteru (**VI**) ve formě oleje a 64 % krystalického acetylovaného dodecylesteru (**VII**). Látky byly opět dokázány NMR a IR spektry.

Poté byla provedena reakce hydrobromidů (**IV**,**V**) s TEA a následně s CO_2. Byla syntetizována sůl karbamové kyseliny decylesteru (**VIII**) s výtěžkem 72 % a karbamát dodecylesteru kyseliny piperidin-4-karboxylové (**IX**) při výtěžku 67 %. Bílé krystaly se při této reakci tvořily ihned po aplikaci CO_2. Tyto nepopsané látky byly charakterizovány NMR spektrem, které ani u jednoho z karbamátů (**VIII**,**IX**) neprokázaly

přítomnost podvojné soli. Avšak provedená IR spektra pak u obou potvrdili přítomnost karbamátového karbonylu (1632 cm^{-1}).

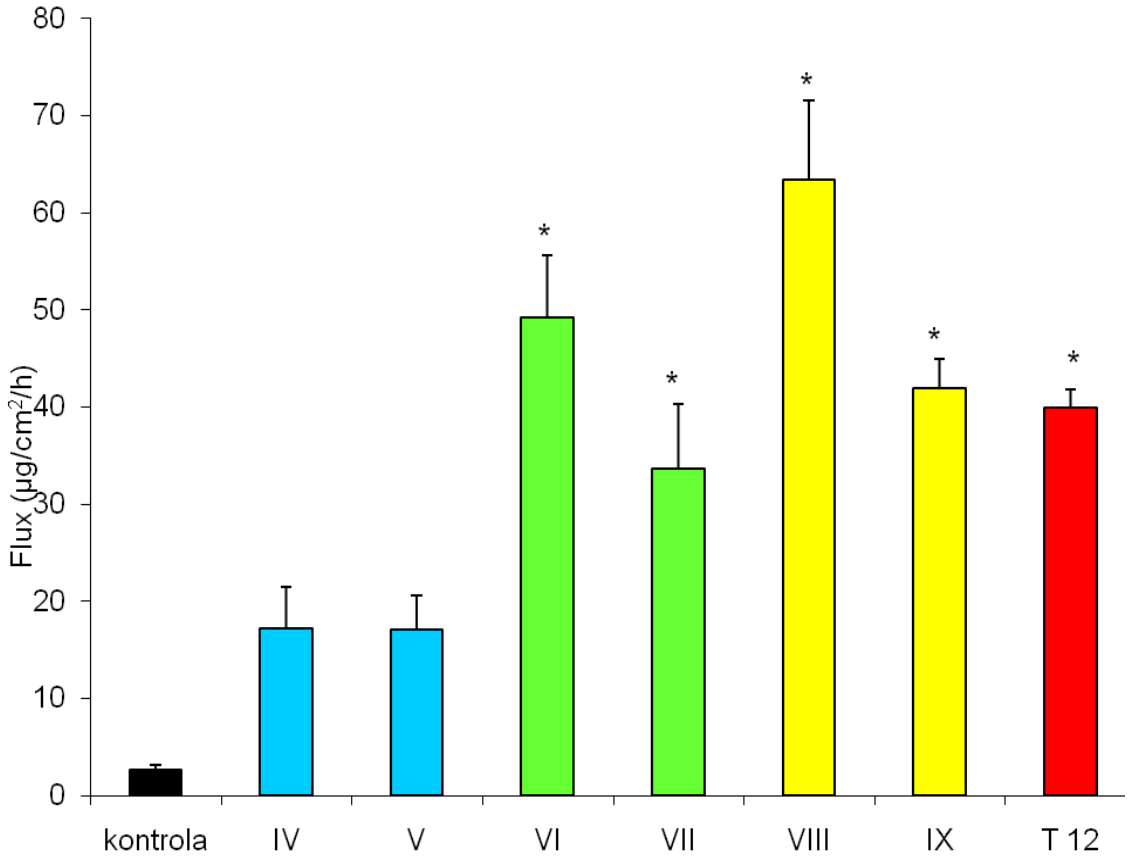
Testování akcelerační aktivity připravených sloučenin bylo provedeno in vitro testy na prasečí kůži v modifikované Franzově difúzní cele za použití theofylinu jako modelového permeantu. Vehikulem byl 60% propylenglykol.

Detekce množství teofylinu prošlého kůží byla provedena HPLC metodou. Hodnoty akcelerační aktivity byly stanoveny pomocí statistických výpočtů v programu SigmaStat, viz. **Tab. 2**.

Vehikulum PG	*kontrola*	*IV*	*V*	*VI*	*VII*	*VIII*	*IX*	*T 12*
14.4.2008	*1*	*4*	*13*	*33*	*17*	*36*	*22*	
Kůže plné tloušťky	*1*	*6*	*12*	*52*	*15*	*27*	*36*	
		5	*7*	*26*	*19*	*38*	*33*	
	0							
23.4.2008	*2*	*32*	*22*	*56*	*19*	*82*		*38*
Kůže plné tloušťky	*3*	*22*	*2*	*40*	*29*	*57*		*36*
	1					*34*		
	1							
28.4.2008	*2*	*40*	*12*	*40*	*33*	*43*	*32*	*42*
Kůže plné tloušťky	*3*	*19*	*28*	*41*	*59*	*69*	*51*	*44*
	4						*60*	
							44	
							41	
5.5.2008	*5*	*18*	*21*	*89*	*44*	*102*	*53*	
Dermatomovaná kůže	*4*	*10*	*35*	*65*	*69*	*77*	*46*	
						110	*48*	
	7					*85*	*39*	
	kontrola	*IV*	*V*	*VI*	*VII*	*VIII*	*IX*	*T 12*
Průměr fluxů	*2,6*	*17,3*	*17,0*	*49,2*	*33,7*	*63,5*	*42,0*	*39,9*
Průměrná odchylka	*1,5*	*9,9*	*8,5*	*14,6*	*15,9*	*24,1*	*8,1*	*3,2*
Směrod. odch. průměru	*0,5*	*4,2*	*3,5*	*6,4*	*6,6*	*8,1*	*3,0*	*1,9*
Stat. význ. rozdíl proti kontrole				*	*	*	*	*
Akcelerační poměr		*6,6*	*6,6*	*18,9*	*13,0*	*24,4*	*16,1*	*15,3*

*** = statistický významný rozdíl proti kontrole (p<0,05)**

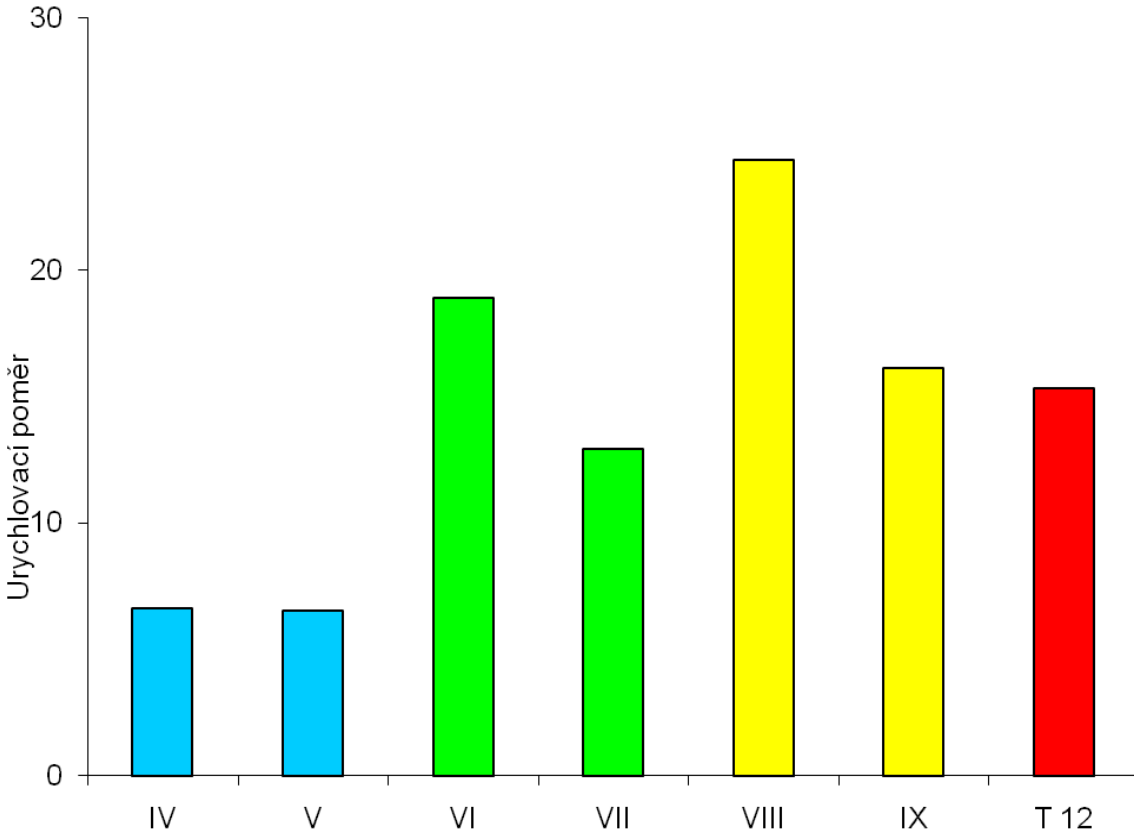
Tab 2. Statistické vyhodnocení akcelerační aktivity látek



*** = statistický významný rozdíl proti kontrole (p<0,05)**

Graf 1. Flux a směrodatná odchylka syntetizovaných látek a transkarbamu 12

Graf 1 ukazuje naměřené hodnoty theofylinu prošlého 1cm^2 kůže za hodinu (flux) při aplikaci léčiva s testovanými potenciálními AP (**IV až IX**), léčiva s účinným akcelerantem **T 12** či samotného léčiva (**kontrola**). Je nutné si všimnout, že hodnoty látek označené „*****“ (**VI** až **IX**) vykazují statisticky významný rozdíl proti kontrole. O látce „**IV**“ a „**V**“ toto říci nelze pro vysokou směrodatnou odchylku z průběhu jednotlivých měření. Podobně látky, které mají vyšší flux než modelová látka **T 12**, nevykazují při statistickém vyhodnocení dostatečný rozdíl této hodnoty oproti **T 12**. Důvodem jsou znovu odchylky u dílčích měření. Proto nelze tvrdit, že látka „**VI**“, resp. „**VIII**“ má vyšší aktivitu než **T 12**.



Graf 2. Urychlovací poměr syntetizovaných látek a transkarbamu 12

Graf 2 Vyjadřuje urychlovací poměr, hodnotu fluxu látky vztaženou k fluxu kontrole. UP umožňuje pohodlné srovnání aktivit jednotlivých látek.

Při biologickém testování akcelerační aktivity hydrobromidů (**IV**,**V**) se ukázal jejich nezanedbatelný, ale ve srovnání s dalšími syntetizovanými látkami slabý účinek (UP u obou 6,6). Akcelerační aktivita acetylovaných derivátů byla nad očekávání výrazná. Predevším decylester (UP = 18,9) vykazoval vysokou aktivitu. Dodecylester pak UP = 13,0. Decylester soli karbamové kyseliny odvozené od piperidin-4-karboxylové kyseliny (**VIII**) pak vykázal v pokusech nejvyšší akcelerační aktivitu vůbec (UP = 24,4). Dodecylester (**IX**) měl urychlovací poměr 16,1. Tyto hodnoty UP byly při statistickém vyhodnocení porovnány s **T 12** (UP = 15,3).

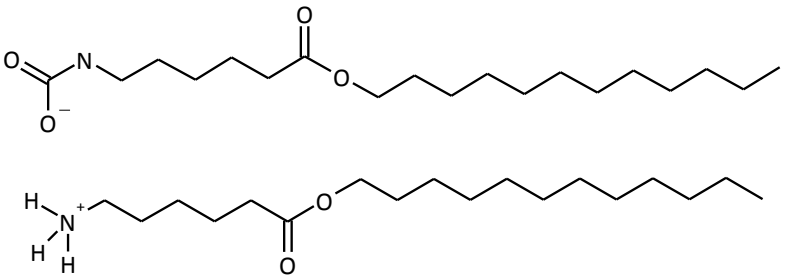
Ze zjištěných aktivit jednotlivých látek (viz. **Graf 1. a 2**.) lze vyčíst tyto poznatky:

- Je zde určitá aktivita hydrobromidů esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny (**IV**, **V**), avšak je nízká oproti **T 12** i ostatním testovaným látkám

- Aktivita *N*-acetylovaných derivátů (**VI**, **VII**) a karbamátů solí esterů karbamových kyselin (**VIII**, **IX**) je vysoká, na úrovni **T 12**
- Akcelerační schopnosti decylesterů těchto derivátů (**VI**, **VIII**) jsou vyšší než u dodecylesterů (**VII**, **IX**), a to i oproti **T 12**. Při statistickém vyhodnocení však rozdíl aktivity decylesterů a **T 12** není významný
- Při srovnání *N*-acetylovaných derivátů a solí esterů karbamových kyselin, vyšší účinnost mají karbamáty (**VII**, **IX**). Výraznější je tento rozdíl u decylesteru. Ten má jednoznačně nejvyšší aktivitu ze všech testovaných látek.

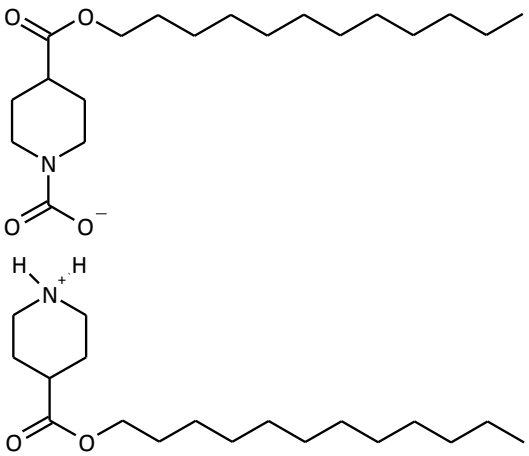
8 Diskuse

Cílem této práce bylo připravit sérii derivátů esterů piperidin-4-karboxylových kyselin a zhodnotit jejich případnou akcelerační aktivitu při permeaci teofylinu přes prasečí kůži *in vitro*.



Transkarbam 12 „T 12“

Struktury látek byly odvozeny od již dříve patentovaného velice účinného akcelerantu permeace (AP) transkarbamu 12 (**T 12**). Myšlenkou bylo připravit látky s rigidní cyklickou částí řetězce mezi dusíkem a karbonylem oproti flexibilní acyklické této části v molekule **T 12**.



Karbamát soli dodecyesteru kyseliny piperidin-4-karboxylové „IX“

Piperidin-4-karboxylová kyselina jako potenciální AP byla již dříve prezentována ve studii transdermální náplasti s estradiolem.[112]

Proto byly syntetizovány deriváty esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny, a to hydrobromidy, *N*-acetylované deriváty a soli karbamových kyselin esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny s 10 a 12 uhlíkatým hydrofobním řetězcem.

Při důkazu karbamátů (**VIII**,**IX**) NMR spektry nebyla spolehlivě prokázána přítomnost jejich struktury. Avšak provedená IR spektra pak u obou solí esterů karbamových kyselin potvrdily přítomnost karbamátového karbonylu (1632 cm^{-1}).

Ze srovnání aktivity hydrobromidů (UP decylesteru i dodecylesteru = 6,6) a karbamátů (UP = 24,4 u decylesteru, resp. 16,1 u dodecylesteru), které mají totožnou kationickou skupinu vyplývá, že akcelerační účinek nese pravděpodobně karbamový anion. To potvrzuje předchozí domněnku nezastupitelné role karbamátového aniontu při interakci s lipidy stratum corneum. Předpokladem mechanismu účinku těchto látek je uvolnění CO_2 ze struktury karbamátu v mírně kyselém prostředí kůže. Vlastní účinek akcelerantu této struktury je zřejmě způsoben nejen narušením uspořádání lipidických lamel lipidů ve SC, ale snad i rozvolněním intercelulárních struktur kumulací CO_2.[113] Ten by mohl jako malá molekula plynu lehce a rychle z kůže unikat. Lze se také domnívat, že zároveň vzniklé degradační produkty karbamátů mohou mít stále určitou aktivitu (viz. aktivita hydrobromidů). Ester je pak esterázami přítomnými ve tkáních snadno degradován.

Akcelerační aktivita *N*-acetylovaných derivátů dosáhla překvapivě vysokých hodnot (UP = 18,9 u decylesteru, resp. 13,0 u dodecylesteru) oproti zanedbatelné aktivitě *N*-acetylovaných derivátů **T 12**. Vysoká aktivita těchto látek poukazuje také na důležitost zachování základní struktury amfifilního enhanceru s odpovídající vzdáleností mezi dusíkem a karbonylem polární hlavy, s esterovou vazbou a vhodnou délkou hydrofobního řetězce.

Uspokojivá aktivita syntetizovaných derivátů piperidin-4-karboxylové kyseliny s bazičtějším sekundárním aminem oproti **T 12** s primárním aminem v molekule naznačuje určitý vliv bazicity na účinek akcelerantu.

Aktivita decylesterů hydrobromidů a karbamátů je zřetelně vyšší, optimální délka hydrofobního řetězce je tedy zřejmě 10 uhlíků u látek tohoto typu. To bylo také potvrzeno již dříve při syntéze transkarbamu 10 (AP = 33)[114], který je strukturním analogem **T 12**.

Ze srovnání aktivit derivátů esterů piperidin-4-karboxylové kyseliny s deriváty esterů piperidin-3-karboxylové, prezentované v diplomové práci Veroniky Fratričové[115], vyplývají některé zajímavé poznatky. Obecně se tyto látky chovají

obdobně jako deriváty deriváty piperidin-4-karboxylové kyseliny. Aktivita hydrobromidů (nízká), *N*-acetylderivátů (vyšší, na stejné úrovni jako výsledky prezentované v této práci). Avšak akcelerační poměry solí karbamátů odvozených od piperidin-3-karboxylové kyseliny dosahují více než dvojnásobku hodnot UP jejich 4-isomerů (UP = 46 u decylesteru, resp. UP = 32 u dodecylesteru). Tyto látky mají pak prokazatelně (i statisticky) vyšší aktivitu než **T 12.** Důvodem jejich vysoké účinnosti by mohlo být rozdílné uspořádání molekuly esterů piperidin-3-karboxylové kyseliny oproti pravidelnější struktuře jejich 4-isomerů. Může tak docházet k odlišným interakcím s různými typy lipidů SC.

V jednom z experimentů bylo použito tenké dermatomované kůže. Té chybí značná část dermis oproti kůži plné tloušťky. Tento pokus ukázal, že barierovou funkci zajišťuje hlavně SC, protože flux, resp. UP nevykazovaly u dermatomované či kůže plné tloušťky výrazné rozdíly. Přítomnost dalších vrstev kůže (plná dermis, podkožní vazivo) neovlivnila účinek AP. Bylo tak potvrzeno, že akceleranty transdermální permeace účinkují pouze ve SC.

Lze konstatovat, že zacyklené formy **T 12**, v tomto případě deriváty esterů piperidin-4-karboxylových kyselin vykazují výraznou akcelerační aktivitu a rozšiřují tak spektrum látek vhodných k použití při transdermální systémové i lokální aplikaci léčiv.

9 Závěr

Cílem mé práce bylo připravit a otestovat cyklické analogy účinného amfifilního akcelerantu transdermální permeace Transkarbamu 12 (**T 12**).

Podařilo se mi syntetizovat 6 nových dosud nepopsaných látek, a to:

- 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-bromid (**IV**)
- 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-bromid (**V**)
- decylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (**VI**)
- dodecylester 1-acetylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (**VII**)
- 4-(decyloxykarbonyl)piperidinium-4-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (**VIII**)
- 4-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-4-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (**IX**)

Struktura těchto látek byla ověřena pomocí spektrálních metod, NMR i IR. Byly stanoveny některé jejich vlastnosti (T_t, skupenství, barva).

U daných látek jsem studoval jejich schopnost urychlit prostup theofylinu jako modelového léčiva přes prasečí kůži. Experimenty byly provedeny in vitro pomocí Franzovy difúzní cely. Jako vehikulum sloužil 60% propylenglykol.

Srovnáme-li aktivity jednotlivých látek s aktivitou **T 12**, je zřejmé, že urychlovací schopnost *N*-acetylovaných derivátů (**VI**, **VII**) a karbamátů solí esterů karbamových kyselin (**VIII**, **IX**) je vysoká. Aktivita decylesterů těchto derivátů je zřetelně vyšší než u dodecylesterů. Nejaktivnější byl akcelerant se strukturou karbamátu soli decylesteru piperidin-4-karboxylové kyseliny (**VIII**). Při porovnání nepatrně účinných hydrobromidů (**IV**, **V**) s akceleračně efektivními karbamáty (**VIII**, **IX**) se stejnou kationickou částí molekuly, je zřejmý vliv karbamátového aniontu na akcelerační aktivitu.

Byla dokázána vysoká permeační aktivita cyklických, tedy rigidních analogů **T 12**. Byla tak vyvrácena obava ze ztráty účinku při stabilizaci struktury akcelerantu zacyklením řetězce polární hlavy mezi dusíkem a karbonylem.

10 Literatura

[1] Vávrova, K.; Zbytovská, J; Hrabálek, A.: Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships; *Curr Med Chem.* **2005**; 12 (19), 2273-91.

[2] Barry, B. W. Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption, Marcel Dekker: New York, **1983.**

[3] Guy, R. H. and Hadgraft, J.:Transdermal drug delivery; the ground rules are emerging. *Pharm. Int.* **1985**, **6**, pp. 112–118.

[4] Prausnitz, M.R.; Mitragori, S.: Determination of the *in vitro* and *in vivo* Oral Drug Delivery Capabilities of Complexation Hydrogels; *R. Nature Rev.,* **2004**, 3, 115.

[5] Barry, B.W. Eur. Drug Delivery Systems; *J. Pharm. Sci.,* **2001**, 14, 101.

[6] Elias, P. M.; Cullander, C.; Mauro, T.; Rassner, U.; Komuves, L.; Brown, B. E.; Menon G. K.: The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell; *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **1998**, 3, pp. 87–100.

[7] Komárek P., Rabišková M. et al; *Technologie léků*, **2006**, 174-176.

[8] Odland, G.F.; Goldsmith, L.A., Ed.; Oxford University Press: New York; *In Biochemistry and Physiology of the Skin,* **1983**, pp. 3-63.

[9] Menon, G.K.: New insights into skin structure: scratching the surface ; *Adv. Drug Deliv. Rev*., **2002**, 54, Suppl. 1., S3.

[10] Agache, P.; Hubert, P., Eds. *Measuring the skin*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2004.**

[11] http://www.genome.gov/Images/feature_images/ga_segre_skin2.jpg

[12] http://www.nigms.nih.gov/NR/rdonlyres/0037E7BB-97A3-4EC6-904A-61CEEE4352EF/0/skin2.jpg

[13] Williams, M.L.; Elias, P.M.: From Basket Weave To Barrier – Unifying Concepts for the Pathogenesis of the Disorders of Cornification; *Arch. Dermatol*., **1993**, 129, 626.

[14] Ya-Xian, Z.; Suetake, T.; Tagami, H.: Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters; *Arch. Dermatol. Res*., **1999**, 291, 555.

[15] Elias, P. M: Structure and funtion of the stratum corneum permeability barrier; *Drug Dev. Res.* **1988**, 13: 97–105.

[16] Elias, P.M.: Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation; *J. Invest Dermatol*., **1983**, 80, S44.

[17] Grubauer, G.; Feingold, K.R.; Hartus, R.M.; Elias, P.M.: Lipid-Content and Lipid Type as Determinants of the Epidermal Permeability Barrier; *J. Lipid Res*., **1989**, 30, 89.

[18] Potts, R.O.; Francoeur, M.L., Pharmaceutical skin permeation enhancement, *J. Invest. Dermatol*., **1991**, 96, 495.

[19] Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J. Invest Dermatol.* **1991**; 96(4):523–526.

[20] Paige, D.G.; Morse-Fisher, N.; Harper, J.I.: Quantification of Stratum-Corneum Ceramides and Lipid Envelope Ceramides in the Hereditary Ichtyoses; *Br. J. Dermatol*., **1994**, 131, 23.

[21] Mao-Qiang, M.; Feingold, K.R.; Elias, P.M.: Exogenous Lipids Influence Permeability Barrier Recovery in Acetone-Treated Murine Skin, *Arch. Dermatol*., **1993**, 129, 728.

[22] Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Palát, K.; Holas, T.; Klimentová, J.; Hrabálek, A.; Doležal, P.: Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro; *Eur. J. Pharm. Sci*., **2004**, 21, 581.

[23] Long, S.A.; Wertz, P.W.; Strauss J.S.; Downing, D.T.: Human Stratum-Corneum Polar Lipids and Desquamation; *Arch Dermatol. Res*., **1985**, 277, 284.

[24] Lampe, M.A.; Burlingname, A.L.; Whitney, J.; Williams, M.L.; Brown, B.E.; Roitman, E.; Elias, P.M.: Human Stratum-Corneum Lipids- Characterization and Regional Variations; *J. Lipid Res*., **1983**, 24, 120.

[25] Lampe, M.A.; Williams, M.L.; Elias, P.M.: Human Epidermal Lipids – Characterization and Modulations During Differentiantion; *J. Lipid. Res*., **1983**, 24, 131-140.

[26] Wertz, P.W.; Downing, D.T.; Freinkel, R.K.; Traczyk, T.N.: Sphingolipids of the Stratum- Corneum and Lamellar Granules of Fetal-Rat Epidermis; *J. Invest. Dermatol*., **1984**, 83, 193-195.

[27] Grayson, S.; Johnson-Winegar, A.G.; Wintroub, B.U.; Isseroff, R.R.; Epstein, E.H.; Elias, P.M.: Lamellar Body-Enriched Fractions from Neonatal Mice – Preparative Techniques and Partial Characterization; *J. Invest. Dermatol*., **1985**, 85, 289-294.

[28] Gray, M.G.; White, R.J.: Glycosphingolipids and Ceramides in Human and Pig Epidermis; *J. Invest. Dermatol.*, **1978**, 70, 336-344.

[29] Wertz, P.W.; Swartzendruber, D.C.; Madison, K.C.; Downing, D.T.: Composition and Morphology of Epidermal Cyst Lipids; *J. Invest. Dermatol*., **1987**, 89, 419-425.

[30] Schurer, N.Y.; Elias, P.M.: The Biochemistry of Stratum-Corneum Lipids; *Adv. Lipid Res*., **1991**, 24, 27.

[31] Wertz, P.W.; Downing, D.T.: Ceramides of Pig Epidermis- Structure Determination; *J. Lipid Res*., **1983**, 24, 759.

[32] Ponec, M.: Skin Constructs for Replacement of Skin Tissues for in vitro Testing; *Adv. Drug Deliv. Rev*, **2002**, 54, Suppl. 1, S19.

[33] Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Valuto, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R.: Ceramide Composition of the Psoriatic Scale; *Biochem. Biophys. Acta,* **1993**, 1182, 147.

[34] Wertz, P.W.: The nature of the epidermal barrier: Biochemical aspects; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, 18, 283.

[35] Wertz, P.W.; van den Bergh, B.: The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers; *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 91, 85.

[36] Weerheim, A.; Ponec, M.: Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography; *Arch. Dermatol. Res*., **2001**, 293, 191.

[37] Norlén, L.: Skin barrier structure and function: The single gel phase model; *J. Invest. Dermatol*., **2001**, *117*, 830.

[38] Garson, J. C.; Doucet, J.; Leveque, J.-L.; Tsoucaris, G: Structure and Function of Human Stratum corneum under Deformation; *J. Invest. Dermatol.* **1991**, 96, 46.

[39] Bouwstra, J.A.; Gooris, G.S.; Salomons-de Vries, M.A.; van der Spek, J.A.; Bras, W.: Structure of Human Stratum-Corneum as a Function of Temperature and Hydration – a Wide-Angle X-ray-Diffraction Study; *Int. J. Pharm*., **1992**, 84, 205.

[40] Madison, K.C.; Swartzendruber, D.T.; Wertz, P.W.; Downing, D.T.: Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper-Layers of the Stratum-Corneum; *J. Invest. Dermatol*., **1987**, 88, 714.

[41] Cornwell, P.A.; Barry, B.W.; Stoddard, C.P.;Bouwstra, J.A.: Wide-Angle X-ray Diffraction of Human Stratum-Corneum - Effects of Hydration and Terpene Enhancer Treatment; *J. Pharm Pharmacol*., **1994**, 46, 938.

[42] Bouwstra, J.; Pilgram, G.; Gooris, G.; Koerten, H.; Ponec, M: New aspects of the skin barrier organization; *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol*., **2001**, 14 suppl. 1, 52.

[43] S laskavým svolením PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D.

[44] Gray, G.M.; Yardley, H.J.: Different Populations of Pig Epidermal-Cells – Isolation and Lipid-Composition, *J. Lipid Res*., **1975**, 16, 441-447.

[45] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=cooper.figgrp.258

[46] Bowser, P.A.; White, R.J.: Isolation, Barrier Properties and Lipid Analysis of Stratum Compactum, a Discrete Region of the Stratum Corneum; *Br. J. Dermatol*, **1985**, 112, 1-14.

[47] Yardley, H. J.: Sterols and Keratinization; *Br. J. Dermatol.,* **1969**, 81, 29-38.

[48] Hedberg, C. L.; Hertz, P. W.; Downing, D. T.: The Time Course of Lipid Biosynthesis in Pig Epidermis; *J. Invest. Dermatol*., **1988**, 91, 169-174.

[49] Elias, R. A.; Menon, G. K.; Grayson, S.; Brown, B. S.: Membrane Structural Alterations in Murine Stratum-Corneum: Relationship to the Localization of Polar Lipids and Phospholipases; *J. Invest. Dermatol*., **1988**; 91, 3-10.

[50] Ziboh, V. A.; Miller C. C.: Essentials Fatty- Acids and Polyunsaturated Fatty-Acids – Significance in Cutaneous Biology; *Annu. Rev. Nutr.,* **1990**, 10, 433-450.

[51] Williams, ML; Elias, P. M.: The extracellular matrix of stratum corneum: role of lipids in normal and pathological function; *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,* **1987**, 3, 95–122.

[52] Norlén, L.: Skin Barrier Structure and Function: The Single Gel Phase Model; *J. Invest. Dermato.*, **2001**, 117, 830–836.

[53] Flynn, G. L.; Bronaugh, R. L.; Maibach, H; Editors, Marcel Dekker, New York: "Mechanism of Percutaneous Absorption from Physiocochemical Evidence"; *Percutaneous Absorption: Mechanisms--Methology--Drug Delivery*, **1989**, 27-51.

[54] Kou, J. H.; Roy, S. D.; Du. J.; Fujiki, J.: Effect of receiver fluid pH on in vitro skin flux of weakly ionizable drugs; *Pharm. Res.,* **1993**, 10, 986; 11 (8), 1222.

[55] Hueber, F.; Schaefer, H.; Wepierre, J.: Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: In vitro studies on human skin.; *Skin Pharmacol*., **1994**, 7, 237.

[56] Barry, B.W.: Drug delivery routes in skin: a novel approach; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, Suppl. 1, S31-40.

[57] Albery, W.J.; Hadgraft, J.: Percutaneous absorption: In vivo experiments; *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, 31, 140-147.

[58] Potts, R. O.; Guy, R. H.: Predicting skin permeability; *Pharm. Res.,* **1992**, 9, 663–669.

[59] Guy, R.H.; Hadgraft, J: Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement; *Pharmaceut Res.,* **1988**, 5, 753–758.

[60] Pugh, W. J.; Roberts, M. S.; Hadgraft, J.: Epidermal permeability-penetrant structure relationships. 3. The effect of hydrogen-bonding interactions and molecular-size on diffusion across the stratum-corneum; *Int. J. Pharm.,* **1996**, 138, pp. 149–165.

[61] http://www.ijpr-online.com/Docs/20041/IJPR226_files/image002.jpg

[62] Williams, A. C.; Barry, B. W.: Penetration Enhancers; *Adv. Drug Deliv. Rev*., **2004**, 56, 603-18.

[63] Hadgraft, J.: Modulation of the Barrier Function of the Skin; *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol*., **2001,** 14, Suppl. 1, 72-81.

[64] Suhonen, T. M.; Bouwstra, J.A.; Urtti, A.: Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations; *J. Controll. Release*, **1999**, 59, 149–161.

[65] Magnusson, B. M.; Walters, K. A.; Roberts, M. S.: Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement, *Adv. Drug. Deliv. Rev.,* **2001**, 50 (3), 205-27.

[66] Barry, B. W.: Novel Mechanisms and Devices to Enable Successful Transdermal Drug Delivery; *Eur. J. Pharm. Sci*., **2001**, 14, 101.

[67] Barry, B. W.: Action of Skin Penetration Enhancers – The Lipid-Protein- Partitioning Theory; *Int. J. Cosmet. Sci*., **1988,** 10, 281.

[68] Goodman M.; Barry, B. W.: Lipid- Protein- Partitioning (LPP) Theory of Skin Enhancer Activity – Finite Dose Technique; *Int. J. Pharm*., **1989**, 57, 29.

[69] Barry, B. W.: Lipid-Protein-Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement; *J. Control. Release*, **1991**, 15, 237.

[70] Barry, B. W.: In *In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals, and Applications;* Bronaugh R.L.; Maibach, H.I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1991**; pp. 165-185.

[71] Moser, K.; Kriket, K.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.: Passive Skin Penetration Enhancement and its Quantification in vitro; *Eur. J. Pharm. Biopharm*., **2001**, 52, 103.

[72] Ongpipattanakul, B.; Burnette, R. R.; Potts, R. O.; Francoeur, M. L.: Evidence that Oleic-Acid Exists in a Separate Phase within Stratum-Corneum Lipids; *Pharm. Res*., **1991**, *8*, 350.

[73] Menczel, E. M. *In Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith E.W.; Maibach, H.I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**; pp. 383-392.

[74] Menon, G. K.; Lee, S.H.; Roberts, M.S. In Ultrastructural Effects of Some Solvents and Vehicles on the Stratum-Corneum and Other Skin Components: Evidence for an "Extended Mosaic-Partitioning Model of the Skin Barrier"; *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*; Roberts, M.S.; Walters, K.A., Eds.; Marcel Dekker: New York; **1998**; pp. 727-751.

[75] http://www.cfmot.de/images/bild-dtt.gif

[76] Suhonen, M.; Bouwstra, J. A.; Urtti, A.: Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations; *J. Control. Rel.*, **1999**, 59, 149-161.

[77] Manitz, R.; Lucht, W.; Strehmel, K.; Weiner, R.; Neubert, R.: On Mathematical Modeling of Dermal and Transdermal Drug Delivery; *J. Pharm. Sci*., **1998**, 87, 873.

[78] Borras-Blasco, J.; Diez-Sales, O.; Polez, A.; Herraez-Dominguez, M.: A Mathematical Approach to Predicting the Percutaneous Absorption Enhancing Effect of Sodium Lauryl Sulphate; *Int. J. Pharm.*, **2004**, 269, 121.

[79] Warner, K. S.; Li., K. S.; Higuchi, W. I.: Influences of Alkyl Group Chain Length and Polar Head Group on Chemical Skin Permeation Enhancement; *J. Pharm. Sci*., **2001,** 90, 1143.

[80] Warner, K.S.; Li., K.S.; He, N.; Suhonen, T.M.; Chantasart, D.; Blikal, D.; Higuchi, W.I.: Structure-Activity Relationship for Chemical Skin Permeation Enhancers: Probing the Chemical Microenvironment of the Site of Action; *J. Pharm. Sci*., **2003**, 92, 1305.

[81] Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šámalová, L.; Palát, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J.: Synthetic Ceramide Analogues as Skin Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships; *Bioorg. Med. Chem*., **2003**, 11, 5381.

[82] Kanikkannan, N.; Kandimalla, K.; Lamba S. S.; Singh,: Structure-Activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery; M. *Curr. Med. Chem*., **2000**, 7, 593.

[83] Brain, K.A.; Walters, K.A.; Hadgraft, J.; Eds.; Dekker, New York: *In Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*;, **1993**; pp. 389-416.

[84] Morimoto,K.; Tojima, T.; Kakemi,M.: Enhancing Effects Of Unsaturated Fatty Acids with Various Structures on The Permeation of Indomethacin through Rat Skin; *J. Pharm. Pharmacol*., **1996**, 48, 1133.

[85] Tenjarla, S.N.; Kasina, R.; Puranajoti, P.; Omar, M.; Hartus, W.T.: Synthesis and Evaluation of N-Acetylprolinate Esters - Novel Skin Penetration Enhancers; *Int. J. Pharm*., **1999**, 192, 147.

[86] Lee, C.K.; Uchida, T.; Noguchi, E.; Kim, N-S.; Goto, S.: Skin Permeation Enhancement of Tegafur by Ethanol Panasate 800 or Ethanol-Water Binary Vehicle and Combined Effect of Fatty-Acids and Fatty Alcohols; *J. Pharm. Sci*.; **1993**, 82, 1155.

[87] Tanojo, H.; Bowstra, J.; Junginger, H.E.; Bodde, H.A.: In Vitro Human Skin Barrier Modulation by Fatty Acids: Skin Permeation and Thermal Analysis Studies; *Pharm. Res*., **1997**, 17, 42.

[88] Aungst, B.J.; Rogers, N.J.; Shefter, E.*:* Enhancement of Naloxone Penetration Through Human-Skin Invitro Using Fatty-Acids, Fatty Alcohols, Surfactants, Sulfoxides and Amides; *Int. J. Pharm*., **1986**, 33, 225.

[89] Carelli, V.; Di Colo, G.; Nannipieri, E.; Sefarini, M.F.: Bile-Acids as Enhancers of Steroid Penetration Through Excised Hairless Mouse Skin; *Int. J. Pharm*., **1992**, 88,89.

[90] Aungst, B.J.: Structure Effect Studies of Fatty-Acid Isomers as Skin Penetration Enhancers And Skin Irritants ; *Pharm. Res*., **1989**, 6, 244.

[91] Chantasart, D.; Li, S.K.; He, N.; Warner, K.S.; Prakongpan, S.; Higuchi, W.I.: Mechanistic Studies of Branched-Chain Alkanols as Skin Permeation Enhancers; *J. Pharm. Sci*., **2004**, 93, 762.

[92] Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Holas, T.; Zbytovská: L-Serine and Glycine Based Ceramide Analogues as Transdermal Permeation Enhancers: Polar Head Size and Hydrogen Bonding; *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2351.

[93] Song, J.F.; Lau-Cam, C.A.; Kim, K.H.: Monohydroxylation and Esterification as Determinants of The Effects of Cis- and Trans-9-Octadecenoic Acids on the Permeation of Hydrocortisone and 5-Fluorouracil across Hairless Mouse Skin In Vitro; *Int. J. Pharm*., **2001**, 212, 153.

[94] Hrabálek, A.; Doležal, P.; Farsa, O.; Krebs, A.; Kroutil, A.; Roman, M.; Šklubalová, Z.: Omega-amino Acid Derivatives, Processes of their Preparation and their Use**;** US 6, 187, 938, **2001**

[95] Pascher, I.: Molecular Arrangements in Sphingolipids Conformation and Hydrogen-Bonding of Ceramide and Their Implication on Membrane Stability and Permeability; *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, 455, 433.

[96] Hadgraft, J; Peck, J.; Williams, D.G.; Pugh, W.J.; Allan, G.: Mechanisms of Action of Skin Penetration Enhancers Retarders: Azone and Analogues; *Int. J. Pharm*., **1996**, 141, 17.

[97] Doležal, P.; Hrabálek, A.; Semecký, V.: Epsilon - Aminocaproic Acid-Esters as Transdermal Penetration Enhancing Agents; *Pharm. Res*. **1993,** 10, 1015.

[98] Hrabálek, A.; Doležal, P.; Roman, M.; Macháček, M.; Sklubalová, Z.: Esters of Omega-Amino Acids as Flexible Penetration Enhancers; *Pharmazie*, **1994**, 49, 325.

[99] Hrabálek, A.; Doležal, P.; Farsa, O.; Šklubalová, Z.; Kuneš, J.: Esters of 6-Dimethylaminohexanoic Acid as Skin Penetration Enhancers; *Pharmazie,* **2000**, 55, 759.

[100] Wong, O.; Huntignton, J.; Nishiahta, T.; Rytting, J.H.: New Alkyl N,N-Dialkyl-Substituted Amino Acetates as Transdermal Penetration Enhancers; *Pharm. Res*., **1989**, 6, 286.

[101] Michniak, B.B.; Player, M.R.; Chapman, J.M.; Sowell. J.W.Sr: Invitro Evaluation of a Series of Azone Analogs as Dermal Penetration Enhancers; *Int. J. Pharm*., **1991**, 93, 85.

[102] Godwin, D.A.; Michniak, B.B.; Player, M.R.; Sowell, J.W.Sr: Transdermal and Dermal Enhancing Activity of Pyrrolidinones in Hairless Mouse Skin; *Int. J. Pharm*., **1997**, 155, 241-250.

[103] Fuhrman Jr., L.C.; Michniak, B.B.; Behl, C.R.; Malick, A.W.: Effect of Novel Penetration Enhancers on the Transdermal Delivery of Hydrocortisone: An In Vitro Species Comparison; *J. Control Release*, **1997**, 45, 199.

[104] Michniak, B.B.; Player, M.R.; Godwin, D.A; Lockhart, C.C.; Sowell, J.W.Sr: In Vitro Evaluation of Azone Analogs as Dermal Penetration Enhancers - V. Miscellaneous Compounds; *Int. J. Pharm*., **1998**, 161, 169.

[105] Wong, O.; Huntington, J.; Konishi, R.; Rettig, J.H.; Higuchi, TJ. *Pharm. Sci.,* **1998**, 77, 967.

[106] Buyuktimkin, N.; Buyuktimkin, N.; Rytting, J.H. In *Percutaneous penetration enhancers*; Smith, E.W.; Maibach, H.I.; Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**; pp. 95-102.

[107] Montagna, W.; Histology and Cytochemistry of Human Skin IX. The Distribution of Non-Specific Esterases; *J. Biophys. Biochem. Cytol*., **1955,** 1, 13-16.

[108] Tauber, U.; Rost, K.L. In *Pharmacology of the Skin, Vol. 1., Skin Pharmacokinetics*; Shroot, B.; Schaefer. H.; Eds.; S. Karger: Basel, **1987**; p. 170.

[109] Bergmann M., Zervas L.; Uber ein allgemeines Verfahren der Peptid-synthese; Ber Deut Chem Ges, **1932**, 65:1192-1201

[110] Hassner A., Alexanian V.; Direct room temperature esterification of carboxylic acids; Tetrahedron Lett, 1978, 46:4475-4478

[111] Maligres, Peter E., Houpis, Ioannis, Rossen, Kai, Molina, Audrey, Sager, Jess, et al.; TETRAB; Tetrahedron, EN; 53, 32, **1997**, 10983-10992

[112] Meconi, Reinhold; Seibertz, Frank: Transdermal plaster containing carboxylic acid penetration enhancer for controlled release of estradiol, *LTS Lohmann Therapie-Systeme GmbH and Co. KG*, Germany, **1995**

[113] Holas, T.; Vávrová, K.; Klimentová, J.; Hrabálek, A.: Synthesis and Transdermal Permeation – Enhancing aktivity of ketone, amide, and alkane analog s of Transkarbam 12, Bioorg. Med. Chem, **2006**, 14, 2896-2903.

[114] Klimentová, J.; Kosák, P.; Vávrová, K.; Holas, T.; Novotný, J.; Hrabálek, A.: Transkarbams with Terminal Branching as Transdermal Permeation Enhancers; Bioorg. Med. Chem. Letters, **2008**, 18, 1712-1715

[115] Fratričová V., Syntéza akcelerantů transdermální permeace na bázi derivátů piperidinkarboxylových kyselin I., **2008**