

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

SYNTÉZA AKCELERANTŮ TRANSDERMÁLNÍ PERMEACE NA BÁZI
DERIVÁTŮ PIPERIDINKARBOXYLOVÝCH KYSELIN I.

Diplomová práce

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

Hradec Králové, 2008

Veronika Fratričová

PROHLÁŠENÍ O SAMOSTATNÉM VYPRACOVÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura, z níž jsem při zpracování čerpala, je uvedena v seznamu použité literatury a v práci řádně citována.

Veronika Fratričová
V Hradci Králové 15. května 2008

Děkuji Doc. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc. za vstřícný přístup, pomoc při řešení problémů a cenné rady. Za odborné konzultace dále děkuji PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. a Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc.

ABSTRAKT

Akceleranty transdermální permeace jsou chemické látky, které usnadňují přechod léčiva přes kůži. Ovlivňují stratum corneum jako vnější vrstvu epidermis. Základními požadavky akceleraantu jsou bezpečnost, kompatibilita s léčivem, biodegradabilita, musí být netoxické a nedráždivé.

Předlohou strukturou byla molekula účinného akceleraantu transkarbam 12, podle níž byly syntetizovány jeho cyklické analogy:

- Decylester kyseliny piperidin-3-karboxylové ve formě hydrobromidu
- Dodecylester kyseliny piperidin-3-karboxylové ve formě hydrobromidu
- N-acetylderivát decylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové
- N-acetylderivát dodecylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové
- 3-(decyloxykarbonyl)piperidinium-3-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát
- 3-(dodecylexykarbonyl)piperidinium-3-(dodecylexykarbonyl)piperidin-1-karbamát

Připravené látky byly charakterizovány a ověřeny dostupnými spektrálními metodami.

Následně byla testována permeační aktivita přes prasečí kůži ve Franzových difuzních celách za použití teofylinu jako modelového léčiva.

Stanovení aktivity bylo provedeno pomocí HPLC metody a následně vyhodnoceno v programu Microsoft Excel.

Testy ukázaly, že syntetizované látky, hlavně N-acetylderiváty a karbamáty, vykazují vyšší permeační aktivitu než transkarbam 12 a ostatní mnou syntetizované látky.

ABSTRACT

Transdermal permeation enhancers are chemical compounds which facilitate the drug delivery through the skin. They influence the stratum corneum, as the outer layer of the epidermis. Basic requirements for the enhancer are safety, drug compatibility, biodegradability, and that they must be non-toxic and non-irritating.

The model structure was effective transcarbamate 12, according to which have been synthesized its cyclic analogues:

- Hydrobromide of piperidine-3-carboxylic acid decylester
- Hydrobromide of piperidine-3-carboxylic acid dodecylester
- N-acetyl derivative of piperidine-3-carboxylic acid decylester
- N-acetyl derivative of piperidine-3-carboxylic acid dodecylester
- 3-(decyloxycarbonyl)piperidinium-3-(decyloxycarbonyl)piperidine-1-carbamate
- 3-(dodecylexycarbonyl)piperidinium-3-(dodecylexycarbonyl)piperidine-1-carbamate

Those compounds have been characterized by common spectral methods.

The transdermal permeation activity has been consequently evaluated on the porcine skin in the Franz cells, using theophylline as the model penetrating drug.

The activity has been evaluated using the HPLC method and determined by the Microsoft Excel. The results demonstrated higher activity, both of N-acetyl derivatives of piperidine-3-carboxylic acids, and of carbamates of those esters, then transcarbamate and compounds, which have synthesized, have.

CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je syntéza derivátů kyseliny piperidin-3-karboxylové, studium jejich akcelerační aktivity při permeaci teofylinu přes prasečí kůži v podmínkách in vitro a porovnání jejich aktivity s látkou transkarbam 12.

Cílem je syntetizovat a hodnotit tyto látky:

- Decylester kyseliny piperidin-3-karboxylové ve formě hydrobromidu
- Dodecylester kyseliny piperidin-3-karboxylové ve formě hydrobromidu
- N-acetylderivát decylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové
- N-acetylderivát dodecylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové
- 3-(decyloxykarbonyl)piperidinium-3-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát
- 3-(dodecylexykarbonyl)piperidinium-3-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

SC	stratum corneum
Chol.	cholesterol
TAG	triglyceridy
TEA	triethylamin
DEE	diethylether
AcBr	acetylbromid
Kys.	kyselina
IR	infračervené spektrum
NMR	nukleární magnetická rezonance
T 12	transkarbam 12

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. STAVBA KŮŽE	10
2.1. STRATUM CORNEUM	11
2.1.1. LIPIDY SC	11
2.1.1.1. Ceramidy	12
2.1.1.2. Volné mastné kyseliny	14
2.1.1.3. Cholesterol	15
2.1.1.4. Cholesterolsulfát	15
2.1.1.5. Estery sterolu	16
2.1.1.6. Estery cholesterolu	16
2.1.2. FOSFOLIPIDY	16
2.1.3. SFINGOLIPIDY	17
2.1.4. Organizace lipidů SC	17
3. AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE	19
3.1. MECHANISMUS ÚČINKU	19
3.1.1. Interakce s kožními lipidy	20
3.1.2. Interakce s proteiny	21
3.1.3. Tvorba dep	21
3.2. VZTAH STRUKTURA – AKTIVITA TRANSDERMÁLNÍCH AKCELERANTŮ	21
3.2.1. Hydrofobní řetězec	21
3.2.1.1. Nasycené řetězce	21
3.2.1.2. Nenasycené řetězce	22
3.2.1.3. Rozvětvené řetězce	22
3.2.1.4. Polární skupina v řetězci	22
3.2.1.5. Dva hydrofobní řetězce	23
3.2.2. Polární hlava	23
3.2.2.1. Role polární hlavy	29
3.3. BIODEGRADABILNÍ AKCELERANTY	30
3.4. VLIV STEREOSELEKTIVITY NA PERMEAČNÍ AKTIVITU AKCELERANTU	30

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1. CHEMIKÁLIE.....	31
4.2. VYBAVENÍ.....	31
4.3. DERIVÁTY KYSELINY PIPERIDIN-3-KARBOXYLOVÉ.....	31
4.3.1. Decylester kyseliny piperidin-3-karboxylové	31
4.3.1.1. Příprava 1-benzyloxykarbonylderivátu kyseliny piperidin-3-karboxylové: 31	
4.3.1.2. Esterifikace chráněné kyseliny piperidin-3-karboxylové:.....	32
4.3.1.3. Odstranění chránicí skupiny:.....	34
4.3.2. N-acetylderivát decylesteru kyseliny 3-piperidinkarboxylové.....	34
4.3.3. Dodecylester kyseliny piperidin-3-karboxylové	35
4.3.4. N-acetylderivát dodecylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové	37
4.3.5. 3-(decyloxykarbonyl)piperidinium-3-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát	38
4.3.6. 3- (dodecyloxykarbonyl)piperidinium-3-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát.....	39
5. HODNOCENÍ AKCELERAČNÍ AKTIVITY	40
5.1. PŘÍPRAVA KŮŽE PRO PERMEACE	40
5.2. PŘÍPRAVA DONOROVÝCH VZORKŮ.....	40
5.3. TESTOVÁNÍ PERMEAČNÍ AKTIVITY	40
5.4. STANOVENÍ TEOFYLINU POMOCÍ HPLC.....	41
5.5. HODNOCENÍ DAT	41
6. VÝSLEDKY	42
7. DISKUZE.....	46
8. ZÁVĚR.....	48
9. REFERENCE.....	49

1. ÚVOD

Transdermální přechod léčiv nabízí četné výhody oproti klasickým cestám podání. Jedná se především o vyhnutí se first-pass efektu v játrech, menší kolísání koncentrace léčiva v plasmě (důležité u léčiv s nízkým terapeutickým indexem), redukované množství nežádoucích účinků, prodlouženou dobu působení a pohodlné ukončení podávání léčiva. Všechny tyto výhody vedou k větší compliance pacienta ¹.

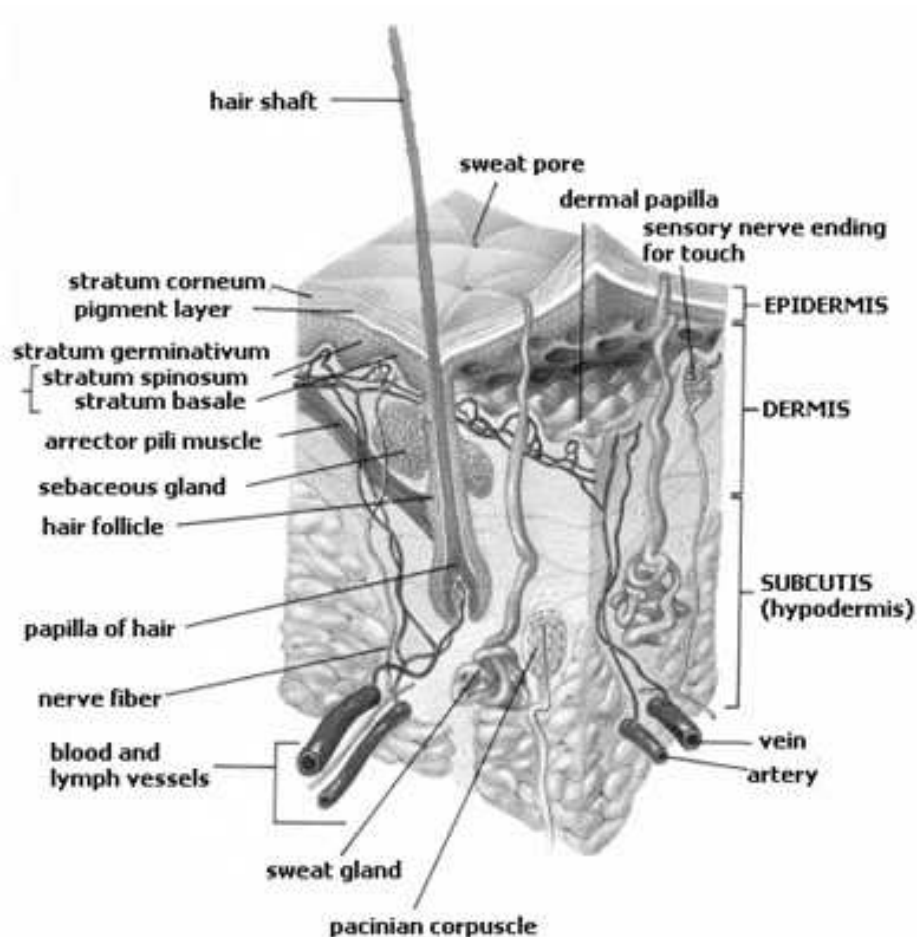
Hlavním omezením přechodu léčiva přes kůži je vnější vrstva nazývaná stratum corneum. Použití transdermálního akceleraantu je jednou z cest, jak tento přechod usnadnit. Enhancery mohou interagovat se složkami stratum corneum a reversibilně redukovat vlastnosti kožní bariéry. V důsledku kontinuálního uspořádání lipidové bariéry stratum corneum je interakce s lipidy rozhodující pro účinnost transdermálních akceleraantů. Díky své struktuře jsou schopny vmezeřit se mezi hydrofobní části ceramidové dvojvrstvy a tímto narušit jejich těsnost, zvýšit fluiditu a následně vést k jednodušší difuzi penetrujících léčiv ^{2,3}.

Pouze malý počet léčiv má optimální fyzikálně-chemické vlastnosti, které jim umožní přechod přes kůži v dostatečném množství a dosáhnouti terapeutické koncentrace. Léčiva, která jsou v současné době aplikována transdermálně, jsou např. testosteron, fentanyl, skopolamin nebo nitroglycerin. Mezi vlastnosti těchto snadno transdermálně procházejících látek můžeme jmenovat nízkou denní dávku, molární hmotnost do $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, nízkou teplotu tání a vyváženou lipofilitu ⁴.

Cílem této práce byla syntéza a testování aktivity amfifilních akceleraantů transdermální permeace, konkrétně derivátů esterů kyseliny piperidin-3-karboxylové.

2. STAVBA KŮŽE

Kůže savců je složena ze dvou hlavních vrstev: dermis a epidermis. Dermis je tvořena fibroblasty a extracelulární matrix, je bohatá na kapiláry a nervová vlákna⁵. Epidermis je tvořena keratinocyty (95 %), melanocyty, Langerhansovými buňkami a Merkelovými buňkami. Je rozdělena do čtyř vrstev: stratum basale, spinosum, granulosum a corneum⁶. Tyto vrstvy představují rozdílné fáze diferenciacce buněk, které jsou tvořeny kmenovými buňkami v basální vrstvě a které migrují vzhůru k povrchu kůže. V těchto místech je koncentrace kyslíku a živin snížena, buňky jsou ploché, orgány jsou degradované, kumulují se keratin a lipidy. Proces vedoucí k tvorbě kožní bariéry se nazývá keratinizace⁷.



Obrázek 1. Stavba kůže⁸

2.1. STRATUM CORNEUM

Funkce kožní bariéry je přisuzována stratum corneum (SC), což je nejsvrchnější vrstva epidermis. SC je tvořeno korneocyty a intracelulární lipidovou matrix. Tato struktura je nazývána cihly a malta⁹ a představuje klikatou cestu pro látky, které penetrují intercelulárně přes kůži. Lidské SC je tvořeno 18 - 21 vrstvami¹⁰. Korneocyty jsou ploché buňky hexagonálního tvaru, v průměru 20-40 μm . Hrany a vlnění korneocytů napomáhají zvýšení stability vrstvy. Dalším speciálním znakem korneocytů je korneocytální obálka, která je silná, neprostupná a hojně zesíťená. Koheze SC je zajištěna dezmozomy¹¹.

2.1.1. LIPIDY SC

Lipidy lidské kůže se skládají z ceramidů, triacylglyceridů (TAG), volných mastných kyselin (MK), skvalenu, cholesterolu (chol.) a esterů cholesterolu.

Epidermis obsahuje pouze množství celkových povrchových lipidů, jejichž výskyt je závislý na počtu mazových žláz^{12 13} přítomných v jednotlivých prozkoumaných místech. Oproti pokožce hlavy, která obsahuje kolem 900 mazových žláz obklopujících chlup na cm^2 , žádné se nevyskytují na dlaních a chodidlech. Tyto povrchové lipidy na pokožce hlavy (kde je produkce lipidů nejméně 100 μg na cm^2)¹⁴ vyjadřují rozumné přiblížení lipidového složení mazových žláz kolem chlupu, tzn. 43 % TAG, 16 % volných MK, 25 % esterů vosku, 12 % skvalenu a 2,5 % esterů chol. V opačném případě, kde lipidy dlaně nebo chodidla jsou produkovány pouze v množství 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, sebum chybí a povrchové lipidy zastupují lipidy epidermálního původu: variabilní množství TAG, 20-25 % ceramidů, 20 % volných MK, 15 % esterů chol. a 20 % chol.

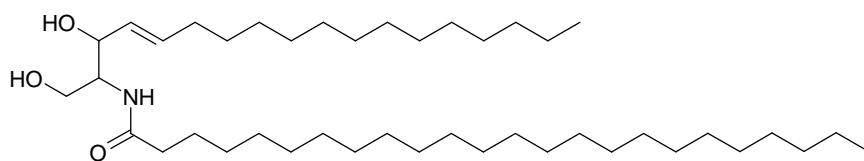
Vlastnosti kožní bariéry jsou založeny na specifickém obsahu a složení lipidů SC^{15 16}, tak jako na strukturním uspořádání intracelulární matrix, stejně i lipidické obálce obklopující korneocyty¹⁷. Ve SC zaujímají lipidy 10-15% celkové hmotnosti tkáně¹³. Lipidická fáze proniká SC a procházející substance interagují s touto fází, ať už penetrují intracelulárně nebo intercelulárně.

V případě kožního onemocnění s pozměněnou lipidickou složkou stoupá permeabilita v obou směrech^{18 19}, tzn. ztráta vody kůží a průnik exogenních látek je zvýšen. Topická aplikace kožních lipidů nebo jejich derivátů může obnovit funkci kožní bariéry^{20 21}.

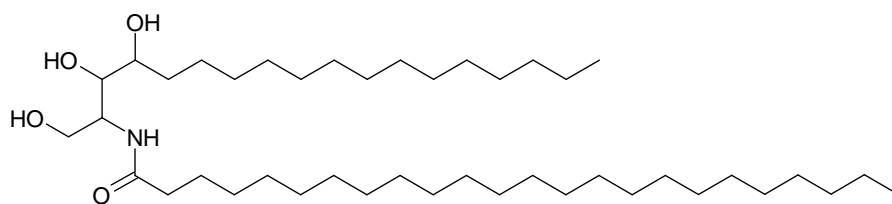
2.1.1.1. Ceramidy

Ceramidové lamely obsahují kolem 50 % chol., 25 % volných MK, 10 % celkové tukové hmoty²². V malém množství se zde vyskytují estery chol., cholesterolulfát a glukosylceramidy. Složení lipidické fáze se liší v závislosti na věku, typu a stavu kůže a na celkovém povrchu těla²³.

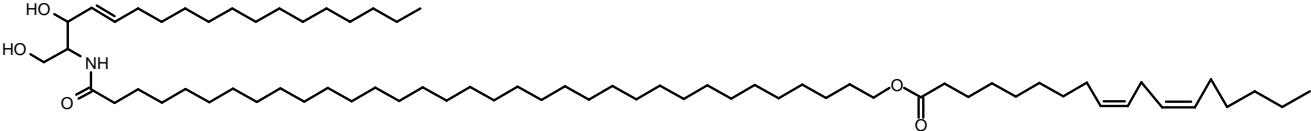
Hlavní skupinou lipidů tvořící bariéru SC jsou ceramidy²⁴, strukturálně heterogenní skupina 9 různých podtypů²⁵. Ceramidy jsou složeny z polární hlavy a dvou hydrofobních řetězců. Jádrem ceramidu tvoří aminoalkohol sfingosin (S), fyto sfingosin (P) nebo 6-hydroxysfingosin (H) s průměrnou délkou řetězce obsahujícího 18 uhlíků. MK je napojena na primární aminoskupinu v poloze 2 molekulou aminoalkoholu amidovou vazbou. MK může být nehydroxylovaná (N), anebo α - (A) nebo ω - hydroxylovaná (O), případně esterifikovaná kyselinou linolenovou (E)²⁶. Kyselina většinou obsahuje 24 uhlíků, kromě ω - hydroxylovaných ceramidů obsahujících kyselinu linolovou. V ceramidech typu EOS, EOP a EOH ω -hydroxykyselina obsahuje 30-34 uhlíků. Tyto druhy ceramidů jsou esenciálními složkami kožní bariéry, kterou formují a stabilizují. Mohou sloužit jako molekulární skelet, který stabilizuje multilamelární strukturu v intercelulárním prostoru SC^{24 27}. V případě deficitu esenciálních MK jsou produkovány glukosylceramidy a ceramidy typu EO, oleát nahrazuje linoleát, monosaturovaná ω - hydroxylovaná kyselina nahrazuje saturovanou²⁸. Bylo zjištěno, že takto pozměněný ceramid se dvěma cis dvojnými vazbami v určité vzdálenosti pracuje na bázi endogenního transdermálního permeantu²⁹.



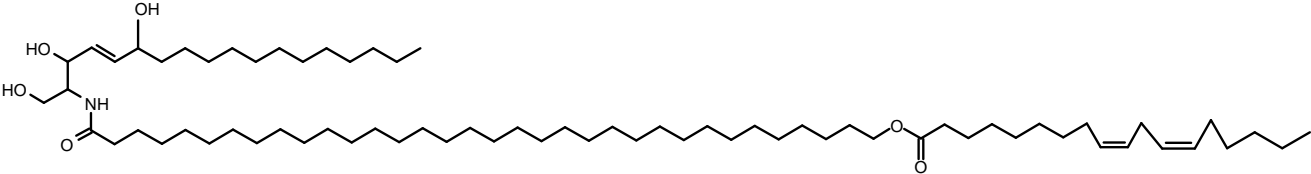
Ceramid NS



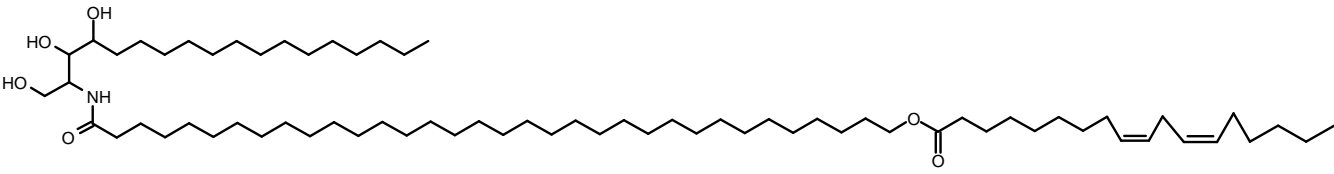
Ceramid NP



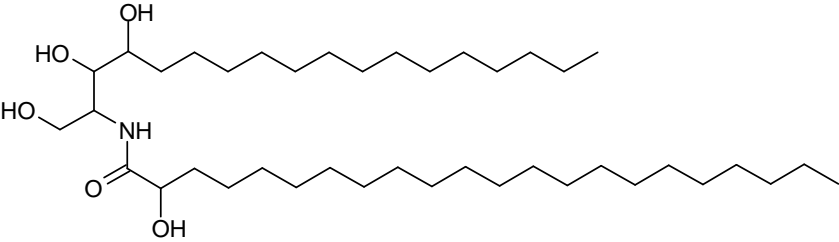
Sfingosin



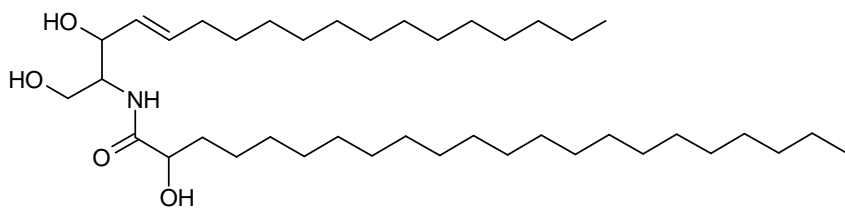
6-hydroxysfingosin



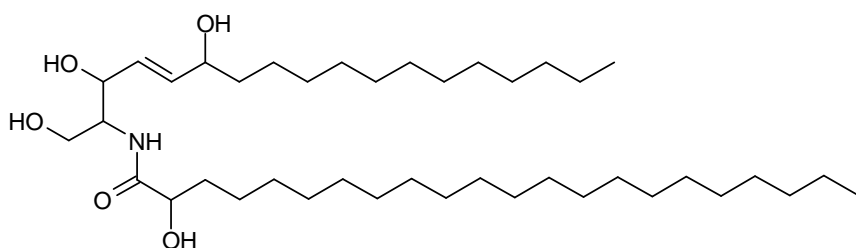
Ceramid EOH



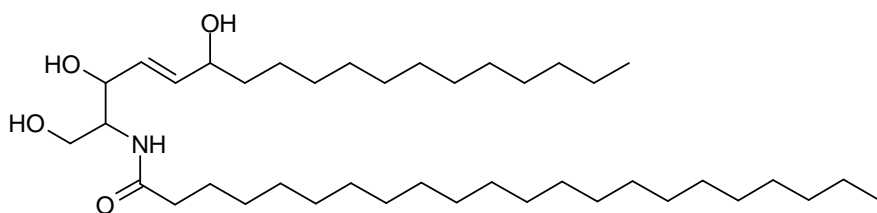
Ceramid AP



Ceramid AS



Ceramid AH



Ceramid NH

2.1.1.2. Volné mastné kyseliny

Volné MK jsou skoro vždy nasycené, nerozvětvené, většinou obsahující od C₁₂ do C₂₄, nejvíce vyskytující se kyseliny jsou dokosanová a tetrakosanová³⁰. Epidermis hojně syntetizuje MK za základních podmínek a jako odpověď na pozměněné požadavky bariéry. Navíc všechny epidermální vrstvy, zahrnující stratum granulosum, zadržují kapacitu pro syntézu MK³¹.

Množství volných MK se zvyšuje ve čtyřech nejsvrchnějších vrstvách, což by mohl být výsledek odbourávání ceramidů, hydrolýzy fosfolipidů (v menším množství i TAG)³² či kontaminace lipidy³³

2.1.1.3. Cholesterol

Hlavní složkou lipidů SC je cholesterol, který zaujímá kolem 20-25 % totální hmotnosti lipidů. Je to ubikvitární složka biologických membrán. Látka způsobuje mísení různých lipidů a napomáhá udržet stabilitu lamelárních struktur. Snižuje citlivost lamelárních struktur lipidické složky na změny v ceramidu a na přítomnost exogenních nečistot³⁴.

Zdá se, že chol. také zprostředkovává odlupování kůže. Většina epidermálního chol. pochází z lokální syntézy za bazálních podmínek. V místech, kde je bariéra porušena, dochází ke stimulaci syntetického aparátu.

Většina savčích buněk je vybavena povrchovými receptory pro řídicí komplex pro transport chol., tzn. LDL receptory. Tento receptor zprostředkovává zpětnovazebnou kontrolu syntézy chol.³⁵ regulací aktivity HMG-CoA reductázy³⁶ stejně tak i transkripce genu pro LDL receptor. První rozpoznáný ovlivňuje nedostatek LDL receptorů na keratinocytech, zatímco v normální lidské epidermis pouze bazální buňky vyjadřují LDL receptory³⁷. Navíc cirkulující chol. neovlivní kožní de novo syntézu chol.³⁸, pravděpodobně kvůli nedostatku LDL receptorů v plasmatické membráně ve více diferenciované buněčné populaci^{39 40 37}. Třebaže je stratum basale vybaveno LDL receptory, které umožňují uptake exogenního chol., bazální buňky jsou také aktivní součástí syntézy chol.^{41 42 43}. Ve skutečnosti syntéza sterolu v savčí kůži zaujímá kolem 30 % celkové syntézy sterolu v těle⁴⁴, ze kterých 70-80 % je lokalizováno v dermis a zbytek v epidermis⁴¹. Vnější jaderné vrstvy epidermis hojně syntetizují volné steroly^{41 42 43}.

Steroly jsou také důležitými prekurzory pro syntézu vitamínu D. Přesto náhrady vitamínu D v systému neovlivní epidermální sterogenezi⁴⁵.

2.1.1.4. Cholesterolsulfát

Cholesterolsulfát je méně významná složka SC a jeho přítomnost je spojována s procesem odlupování svrchní vrstvy kůže²⁷.

Menší část volného chol. je sulfátována enzymem cholesterolsulfotransferázou, který přenáší sulfátovou skupinu z aktivního sulfátu (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát) na chol⁴⁶. Je to jeden z mála polárních lipidů ve SC, zajímavíci kolem 3 - 5 % lipidů lidského SC^{47 48}. Díky svému amfifilnímu charakteru a fyzikálně-chemickým vlastnostem je důležitý pro výskyt interkorneocytární lipidické dvojvrstvy⁴⁸. Enzym steroidsulfatáza, který hydrolyzuje estery 3 β -hydroxysteroly, zahrnující cholesterolsulfát, je lokalizován v mikrozomech strata granulosa⁴⁹.

Díky enzymatické rovnováze mezi syntézou a degradací, je obsah cholesterolsulfátu nejvyšší ve stratum granulosum (5 %) a nejnižší ve vnějších vrstvách SC (1,5 %) ^{47, 50 51}. Pokročilý úbytek cholesterolsulfátu z kohezivního k odloupanému SC podporuje hypotézu, že kontrolovaná hydrolýza cholesterolsulfátu steroidsulfatázou může být jedním z faktorů, který destabilizuje interkorneocytární lipidické lamely, a tudíž vede k normálnímu odlupování kůže ⁵².

2.1.1.5. Estery sterolu

Frakce esterů sterolu primárně obsahuje řetězce MK s větvením na konci řetězce, MK s ethylovým větvením na konci řetězce, stejně tak i řetězce s lichým počtem uhlíků a mononenasyčené MK ⁵³. Zdá se, že estery sterolu ve SC vznikají z mazových žláz. U člověka je obecně přijato, že estery sterolu jsou syntetizovány v epidermis ⁵⁴ a tvoří 6-7 % všech lipidů ve SC ⁴⁷. Funkce esterů sterolu je stále neznámá. Jestliže jsou estery zakomponovány do struktur mezibuněčných membrán, mohou mít podíl na hydrofobicitě SC.

2.1.1.6. Estery cholesterolu

Nejčastějším esterem cholesterolu je oleát, který ale nepatří mezi lipidy tvořící dvojvrstvu a v podstatě není umístěn ani v dvojvrstvě, která je tvořena ostatními lipidy. Přesto může být přítomen v nelamelárních prostorách SC. To může poskytnout mechanismus pro oddělení zbytkových nenasycených MK a předcházení jejich zkapalnění na intercelulární membráně ²⁷.

2.1.2. FOSFOLIPIDY

Fosfolipidy jsou esenciální pro existenci membránové dvojvrstvy ve všech známých organelách. Stejně jako v ostatních tkáních tvoří 45 % celkových lipidů v basální a spinální vrstvě a 25 % celkových lipidů ve stratum granulosum ¹³. Hlavní typy fosfolipidů, které byly nalezeny v jaderných vrstvách lidské epidermis, zahrnují fosforylovaný cholin, ethanolamin, serin, inositol, a sfingomyelin a lysolecithin. Fosfatidylserin zůstává v malém množství v nižších vrstvách SC, kdy dochází k diferenciaci buněk, ale z vnějších vrstev SC mizí se všemi ostatními fosfolipidy ^{47 55 51 56}.

Tyto změny ve stavbě fosfolipidů mohou odrážet funkční požadavky, které jsou předepsány

terminální diferenciací. Fosfolipidy jsou také zásobárnou arachidonové kys. a následné kaskády regulatorních eikosanoidů⁵⁷. Epidermální MK odvozené od fosfolipidů mohou sloužit jako substráty pro acyltransferázy, které selektivně kompletují tyto MK uvnitř sfingolipidů akumulujících se během terminální diferenciaci⁵⁸. Velký podíl MK odvozených od fosfolipidů není redistribuován do ostatních lipidů, namísto toho mohou přispívat k vytvoření kapének MK, které zahrnují hlavní podíl směsi lipidů⁵¹

2.1.3. SFINGOLIPIDY

Sfingolipidy jsou prominentními složkami buněčných membrán, lipoproteidů a dalších struktur bohatých na lipidy. Epidermální sfingolipidy zastupují 7,3 % všech lipidů v bazálních vrstvách, 30 % ve stratum granulosum, 40 % ve SC⁴⁷. Tudíž je transformace stratum granulosum do SC doprovázena nejen deplecí fosfolipidů, ale také nárůstem sfingolipidů. Glykosfingolipidy jsou přesto přítomny v malých množstvích ve stratum basale a stratum granulosum, kde jsou lokalizovány v lamelárních tělískách, prakticky chybí ve SC^{59 60}.

Glykosfingolipidy i ceramidy jsou amfifilní molekuly, schopny plnit roli fosfolipidů v udržení stabilní membránové fáze v mezibuněčném prostoru SC. Dlouhý řetězec nasycených MK esterifikovaných ve formě glykosfingolipidů a ceramidů mají vysoké teploty tání a jsou stále vůči oxidaci, a proto mohou zvládnout velké výkyvy teplot, UV záření a oxidačních procesů. Ceramidy jsou strukturně heterogenní skupinou látek, která zastupuje hlavní polární lipidy, ze kterých jsou složeny extracelulární komplexy SC^{61 62}.

2.1.4. Organizace lipidů SC

Intercelulární lipidy ve SC tvoří multilamelární struktury uspořádané paralelně s povrchem kůže^{63 64}. V lamelární oblasti se počet a charakter lamel liší. V krajní části korneocytů je často viditelné trojpásové uspořádání (široké-úzké-široké vzorování) světlého pásu, oddělujícího se od tmavého úzkého pásu. Celková šířka této jednotky je přibližně 130 Å⁶⁵. Světlé pásy nižší elektronové hustoty odpovídají uhlovodíkovému řetězci lipidů SC, zatímco tmavé pásy o vyšší elektronové hustotě zastupují polární hlavu skupiny. Mezi širokým plochým povrchem

korneocytů jsou nejvíce zastoupeny 6- nebo 9- pásy. Tyto vzory jsou složeny z podobných třípásových jednotek⁶⁸.

Důvody malé prostupnosti SC ve srovnání s ostatními biologickými membránami jsou:

- Atypická délka volných MK a acylového řetězce ceramidu
- Relativně malá polární hlava ceramidu (ve srovnání např. s fosfolipidy), která umožňuje silnější stěsnání
- Vysoká přilnavost způsobená vodíkovými vazbami
- Uspořádání komplexů vícevrstevných lamel

Kůže musí zajistit optimálně fungující bariéru za jakýchkoli změn (teplota, pH, koncentrace solí, relativní vlhkost apod.)^{66 67}.

3. AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE

Tyto látky jsou také nazývány jako enhancery. Usnadňují absorpci léčiva přes kůži reversibilním snížením bariérového odporu ⁶⁸. Ideální akceleranty by měly být netoxické, nedráždivé a farmakologicky inertní. Měly by rychle účinkovat, aktivita a doba trvání by měla být předvídatelná a vratná. Při odstranění akcelerantu z kůže by vlastnosti bariéry měly být velmi rychle a plně obnoveny. Tyto látky by měly pracovat jednosměrně, tzn. měly by umožnit průchod terapeutických látek do těla a zároveň zamezit ztrátě endogenních látek. Měly by také být kompatibilní s léčivem a být kosmeticky akceptovatelné ^{69 70}.

Dosud byly objeveny a identifikovány stovky strukturně odlišných látek, které působí jako transdermální akceleranty.

V podstatě můžeme akceleranty rozdělit do dvou velkých skupin:

- polární rozpouštědla, jako ethanol, propylenglykol, dimethylsulfoxid, ethylacetát
- amfifilní látky obsahující polární hlavu a hydrofobní řetězec, jako MK a alkohol (Azon, SEPA 009, DDAIP).

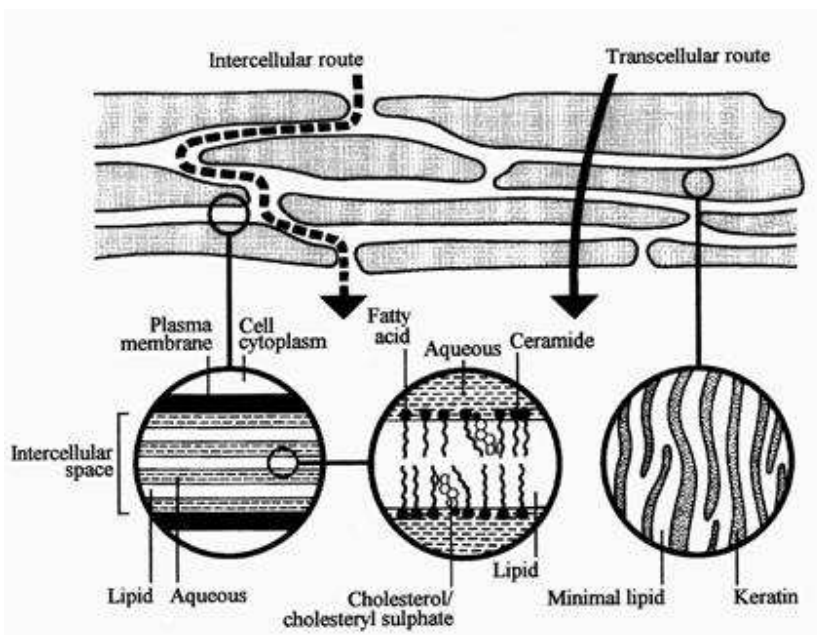
Malé polární akceleranty jsou většinou aktivní ve velmi vysokých koncentracích a mají tendenci pracovat na bázi různých mechanismů. Některé z nich způsobují nevratné změny v SC, proto jsou pro klinickou praxi nepoužitelné. Druhé zmiňované jsou často aktivní v menších koncentracích a jejich mechanismus účinku je založen na ztekucení intracelulární lipidické matrix. Některé z těchto látek jsou biodegradabilní ^{71 72 73 74}.

3.1. MECHANISMUS ÚČINKU

Mechanismus účinku transdermálních akceleraantů je rozdělen do dvou různých rovin. Penetrace akceleraantu do místa působení. Následné rozrušení specifické bariéry vede k jednoduššímu přestupu léčiva. Navíc mohou enhancery nepřímo ovlivnit chování léčiva v nosiči.

Přesný mechanismus, kterým mnoho akceleraantů pozměňuje vlastnosti kožní bariéry, nebyl ještě do detailů popsán, je ale téměř jisté, že účinek těchto látek se projeví hned po absorpci do SC.

Jednoduchá klasifikace akceleraantů je založena na lipidicko-proteinové teorii: působí na intracelulární keratin SC, ovlivňují desmosomy, pozměňují intercelulární lipidické domény nebo nahrazují rozpouštěcí vlastnost SC, to vše ústí ve snížení rezistence kožní bariéry^{71,72,73,74}.



Obrázek 2. Přechod látek přes kůži⁷⁵

3.1.1. Interakce s kožními lipidy

Tímto mechanismem působí většina akceleraantů, jedná se o interakci s intercelulárními lipidickými doménami SC⁷⁰.

Malé polární molekuly mohou rozštěpit vodíkovou vazbu, která drží molekuly ceramidů pohromadě. Amfifilní akceleraanty jsou pravděpodobně vsunuty do lamel, jejich polární hlavou na polární stranu a hydrofobní řetězec mezi hydrofobní řetězce SC lipidů. Toto může navodit narušení shlukování lipidů, zkapalnění lamel a následné snížení rezistence kožní bariéry⁷⁶. Některé akceleraanty, jako kys. olejová nebo terpeny, mohou ve vysokých koncentracích vytvářet separované fáze na lamelách⁷⁷. Tyto sloučeniny vytvářejí vysoce permeabilní póry pro polární látky^{78 79}.

3.1.2. Interakce s proteiny

Tyto akceleranty mohou ovlivnit utváření keratinu v korneocytech nebo proteinů v desmosomech. Tento mechanismus má ve srovnání s výše uvedenými akceleranty nižší účinek. Toto může být způsobeno přítomností lipidické fáze, která prochází celým SC a kterou tyto akceleranty neovlivňují ⁸⁰.

3.1.3. Tvorba dep

Vytvoření zásoby léčiva na kůži nebo ve SC vede ke zvýšené absorpci léčiva na základě difuze.

3.2. VZTAH STRUKTURA – AKTIVITA TRANSDERMÁLNÍCH AKCELERANTŮ

Do této doby bylo identifikováno mnoho akceleraantů, struktura polární hlavy je však limitována ^{81 82 83 84 85}.

3.2.1. Hydrofobní řetězec

Vztahy struktury a aktivity hydrofobního řetězce různých akceleraantů jsou velmi dobře a podrobně popsány ⁸⁶.

3.2.1.1. Nasycené řetězce

V nerozvětvených nasycených řetězcích byl zjištěn vztah mezi aktivitou a počtem uhlíků, jedná se zejména o MK a mastné alkoholy, deriváty aminokyselin, akceleraanty odvozené od laktamů apod. Optimální délka řetězce je mezi 8 a 14 uhlíky (nejčastěji 10 nebo 12) ⁸⁶, což je přibližně polovina délky ceramidu a MK ve SC. Zabudování těchto látek s kratším řetězcem by mohlo způsobit volné místo uvnitř lamely, tento prostor by mohl být vyplněn sousedními řetězci s následným zkapalněním těsně spojených lamelárních lipidů. Tyto látky mohou také oddělit fáze uvnitř lamely, poskytují permeabilnější cestu pro penetrující látky.

Bylo také zjištěno, že délka řetězce takového akcelerantu odpovídá délce molekuly cholesterolu a jeho působením může následně dojít k narušení interakce mezi ceramidem a cholesterolem nebo dvěma molekulami cholesterolu ⁸⁷.

3.2.1.2. Nenasycené řetězce

Ve srovnání s nasycenými řetězci jsou nejvíce aktivní delší nenasycené deriváty, s optimální délkou řetězce 18 až 20 uhlíků. Aktivita stoupá a klesá s následující délkou řetězce: $C_{20} > C_{22} = C_{18} = C_{16} > C_{14}$ ⁸⁸. Kyselina olejová byla z této skupiny studována nejvíce. Ve srovnání s nasycenými řetězci je aktivita nejaktivnějších zástupců podobná. Záleží ovšem také na použitém nosiči a léčivu, které penetruje ^{89 90}.

Během formování kožní bariéry jsou nenasycené MK také vytvářeny štěpením fosfolipidů. Zkapalnění lipidických lamel je bráněno tvořením esterů cholesterolu těchto nenasycených MK ²⁷.

Druhá dvojná vazba zpravidla zvyšuje akcelerační účinek (kys. linolová), zatímco další nenasycení řetězce nemá další výrazný efekt ^{91 92 93}.

3.2.1.3. Rozvětvené řetězce

Bylo zjištěno, že MK o délce řetězce $C_5 - C_{14}$, nezávisle na větvení isomerů, mají podobné účinky ⁹⁴.

Na druhé straně, co se týče rozvětvených alkoholů, permeační účinek klesá s vyšším stupněm větvení. Navíc se účinek zmenšuje, pokud dojde k přesunu OH skupiny z konce do centra řetězce ⁹⁵.

Bylo prokázáno, že větvení v řetězci nebo cyklizace mají negativní dopad na permeační aktivitu 6-aminohexanoátů ⁹⁷

Přesto nebyl pozorován žádný výrazný znak v délce řetězce, ve srovnání s lineárními řetězci. Je pravděpodobné, že relativně malý stupeň větvení těchto molekul je nechrání před interakcemi s lipidickými komponenty SC.

3.2.1.4. Polární skupina v řetězci

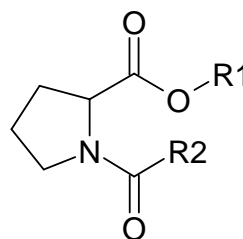
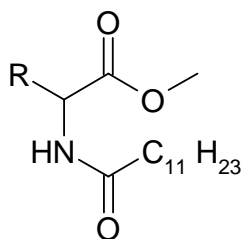
Bylo prokázáno, že hydroxylace kys. olejové a ricinolejové vede ke ztrátě permeační aktivity molekuly. Ta je tím výraznější, čím více se hydroxyl přibližuje dvojně vazbě v MK ⁹⁶.

3.2.1.5. Dva hydrofobní řetězce

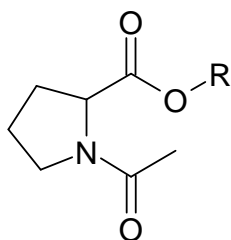
Zatímco většina akceleraantů obsahuje jeden hydrofobní řetězec^{97 98 99}, byly popsány i látky obsahující dva řetězce. Podobně jako u látek s jedním řetězcem, nejvíce aktivní dvouřetězcové molekuly jsou s délkou o C₁₂. Bylo potvrzeno, že délka řetězce je pro aktivitu důležitější než celková lipofilita molekuly. Dosud nebyly jedno- a dvouřetězcové akceleraanty z pohledu aktivity porovnány⁹⁸.

3.2.2. Polární hlava

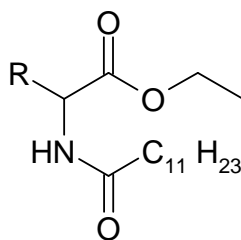
Methylestery kys. L-
amino-N-dodekanové



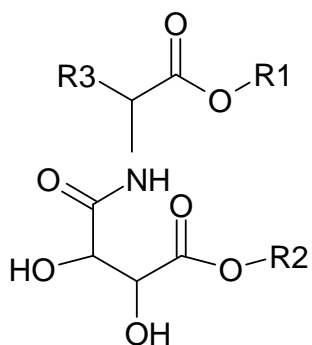
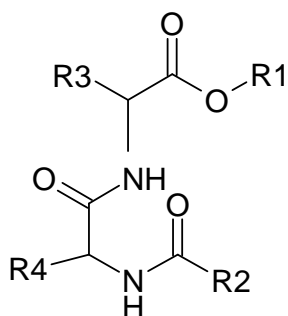
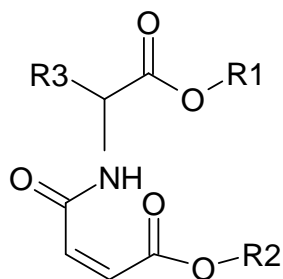
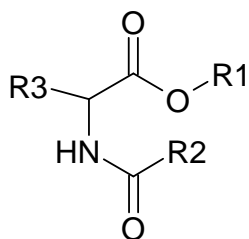
Estery N-acetylprolinu⁸⁹



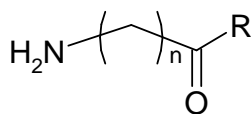
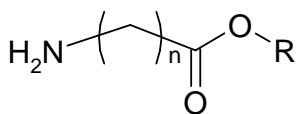
Ethylester kys.
aminododekanové⁹⁹



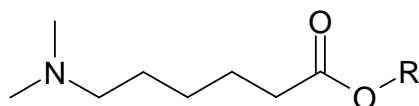
Analogy ceramidu
odvozené od glycinu a
serinu ⁹⁷



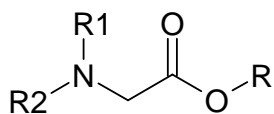
Estery ω -aminokys. a ω -
aminoalkylalkanoaty ⁹⁸
100 101



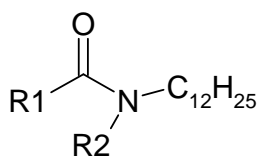
Estery kys. 6-
dimethylaminohexanové
102



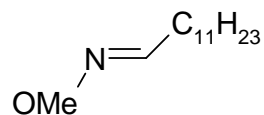
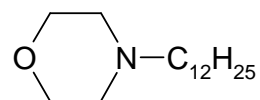
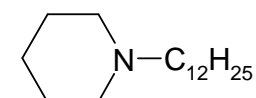
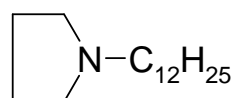
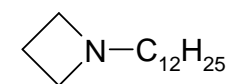
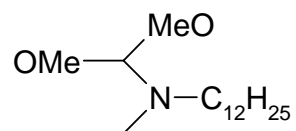
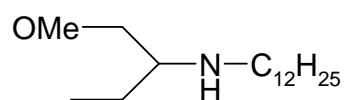
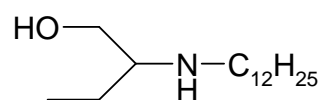
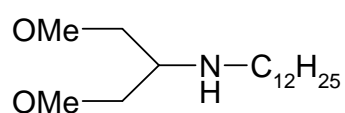
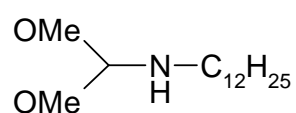
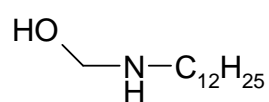
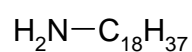
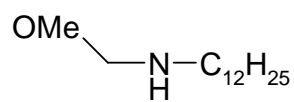
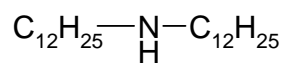
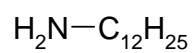
Estery N,N-
disubstituovaného alaninu
a glycinu ^{103 104 105 106}



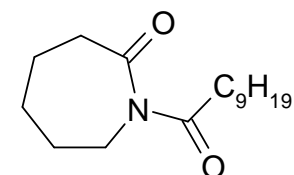
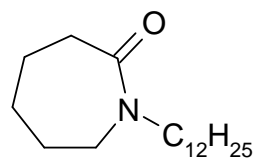
Acyklické amidy ⁹⁶

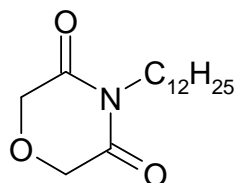
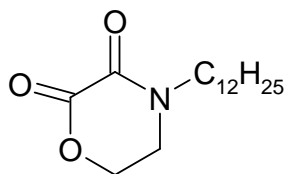
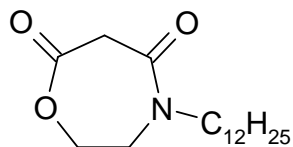
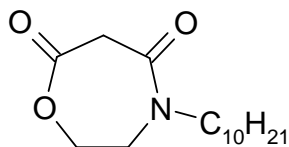
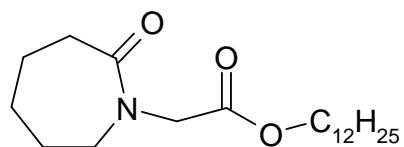
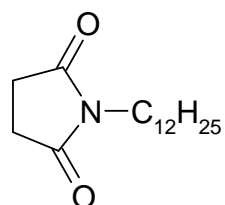
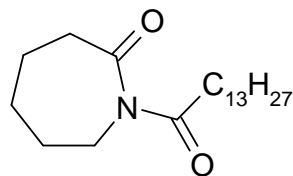
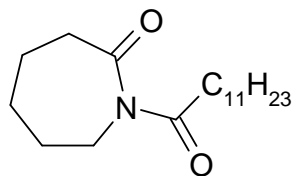


Aminy¹⁰⁷

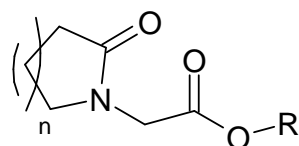


Analogy azonu¹⁰⁷

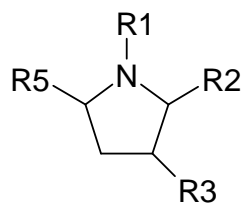




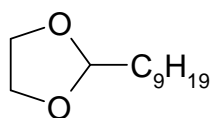
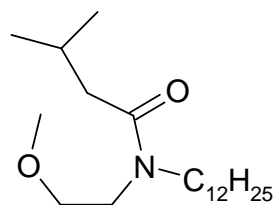
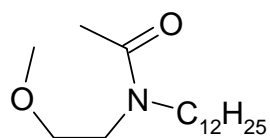
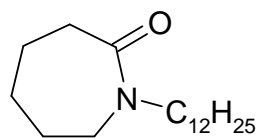
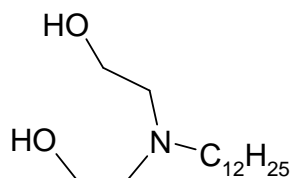
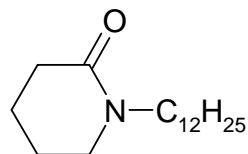
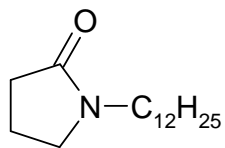
Estery laktam-1-yloctové
kys. ¹⁰⁸



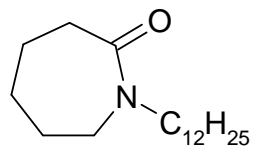
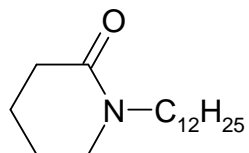
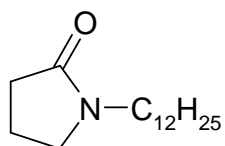
Pyrrolidiny ^{109 110}

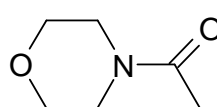
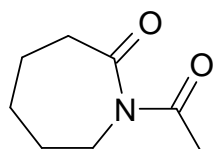
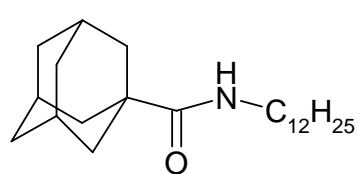
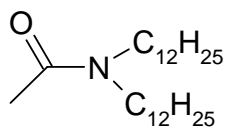
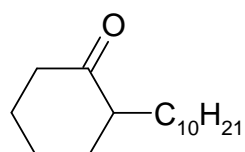
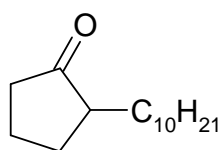
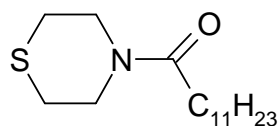
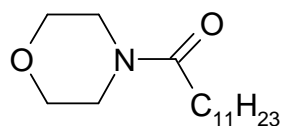
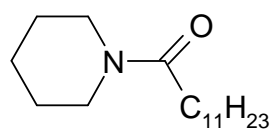
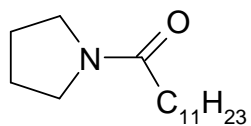
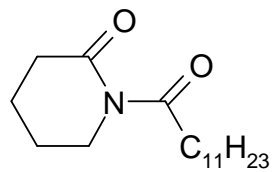
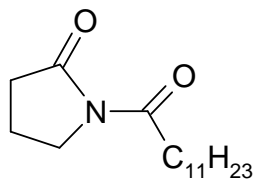


N-alkyl laktamy, amidy a
aminy ¹¹¹

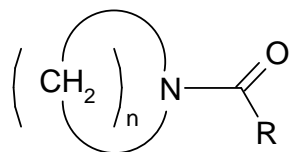


Laktamy, amidy a
cyklické ketony ¹¹²

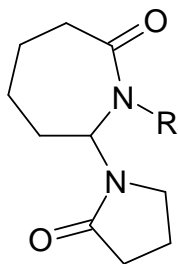




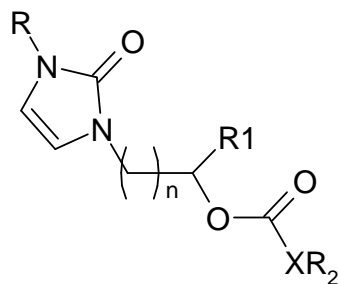
Cyklické amidy ¹¹³



N-substituované 7-(2-oxopyrrolidin-1-yl)azepan-2-ony ¹¹⁴



2,3-dihydroimidazol-2-ony – Nenasycené cyklické močoviny ^{115 116}
¹¹⁷



3.2.2.1. Role polární hlavy

Výše uvedené látky nemohou být porovnány, protože každá z nich byla testována za odlišných podmínek. Přesto můžeme najít několik společných znaků. Zdá se, že přítomnost vodíkové vazby spojující určité skupiny, lipofilita a velikost polární hlavy jsou ukazateli aktivity a musí být pečlivě vyváženy. Neaktivnější akceleranty obsahují pouze jednu (většinou disubstituovaný amin) nebo dvě polární skupiny. Polární hlava může být buď cyklická nebo acyklická, počet uhlíkových atomů v polární hlavě (zpravidla methylenové skupiny) je v průměru od 1,5 do 5 na jednu polární skupinu. Polární skupiny nejvíce aktivních akceleraantů jsou pouze akceptory vodíkové vazby, např. disubstituované amidy, estery, acetalu a terciární aminy. U mnohých látek s permeační aktivitou bylo prokázáno, že síla vodíkové vazby snižuje aktivitu.

Amfifilní akceleranty mohou buď oddělit fáze intercelulárního prostoru SC, nebo se inkorporovat mezi lipidické lamely. V druhém případě je hydrofobní část umístěna uprostřed hydrofobního řetězce ceramidu, polární hlava je v polárním prostředí lipidické lamely. Polární hlava by mohla pozměnit vodíkové vazby mezi lipidy, hlavně u ceramidů. Tyto H-vazby jsou nenahraditelné pro celistvé a rigidní uspořádání lipidů v intercelulárním prostoru SC ¹¹⁸. Narušení H-vazeb by mohlo být jedním z možných účinků těchto typů akceleraantů ¹¹⁹.

3.3. BIODEGRADABILNÍ AKCELERANTY

Výzkum biodegradabilních akcelera^o byl proveden z důvodu redukce jejich toxicity. Jejich odbouráváním se dosáhne dočasného působení¹²⁰. Tyto akceleranty jsou navrhovány tak, aby metabolickými produkty byly netoxické látky. Nejrozšířenější jsou látky typu esterů, protože je známo, že esterázy se vyskytují jak v lidské, tak ve zvířecí kůži^{121 122}. Logickým postupem je umístění biodegradabilní vazby mezi polární hlavu a hydrofobní řetězec. Amfifilní estery navodí permeační efekt a poté jsou štěpeny na malé molekuly, často polární alkoholy nebo kyseliny, či na mastný alkohol nebo MK, hned jak dosáhnou metabolicky aktivní vrstvy kůže.

3.4. VLIV STEREOSELEKTIVITY NA PERMEAČNÍ AKTIVITU AKCELERANTU

Ceramidy jsou látky vyskytující se ve SC a které obsahují dva, tři, nebo čtyři chirální uhlíky. Vzhledem k tomu, že látka prochází mezibuněčnou difuzní cestou, je výskyt interakcí možný. Tyto interakce s ceramidy byly provedeny s enantiomery efedrinu¹²³ bez rozdílů v permeační aktivitě.

Konformace akcelera^o by mohla ovlivnit permeační vlastnosti léčiva vzhledem k tomu, že složky SC nezbytně představují chirální prostředí. Racemát i oba enantiomery 2-oktylesteru kyseliny 6-aminohexanové⁹⁷ (s jedním chirálním centrem) byly použity jako modelové akceleranty pro ovlivnění penetrace teofylinu. Bylo zjištěno, že míra permeace jednotlivých enantiomerů a jejich racemátů nemá pravděpodobně spojitost se stereoselektivními interakcemi. Rozdílná rychlost přechodu teofylinu je spíše vysvětlitelná rozdílností ve fyzikálně chemických vlastnostech akcelera^o, či komplexu teofylin – akcelera^o.

Byly popsány mnohé stereoselektivní procesy v kůži^{124 125}, nebyl však prokázán enantiomerický rozdíl v permeaci propanololu^{126 127}, ketorolaku¹²⁸, efedrinu¹²³, metoprololu¹²⁹, ketoprofenu¹³⁰ a oxybutyninu¹³¹.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. CHEMIKÁLIE

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

4.2. 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 F₂₅₄) 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 ¹H a ¹³C NMR spektry (přístroj Varian Mercury-Vx BB 300 pracující na 300 MHz pro ¹H a 75 MHz pro ¹³C spektra). Bod tání byl určen na přístroji s automatickou detekcí teploty tání BÜCHI B – 545 (Švýcarsko).

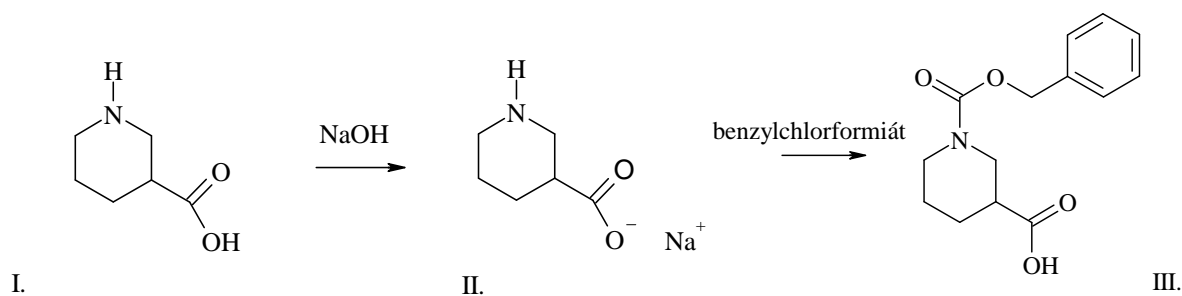
4.3. DERIVÁTY KYSELINY PIPERIDIN-3-KARBOXYLOVÉ

4.3.1. Decylester kyseliny piperidin-3-karboxylové

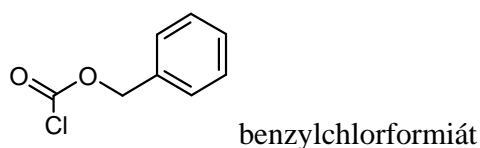
4.3.1.1. Příprava 1-benzyloxykarbonylderivátu kyseliny piperidin-3-karboxylové:

Metoda podle Bergmanna a Zervase¹³² slouží obvykle k reakcím aminokyselin při syntéze peptidů. Používá se ke chránění bazického dusíku proti nežádoucím doprovodným reakcím při esterifikaci.

Reakce se provádí za chlazení na 0 °C.



Reaktanty:



Označení: 3Br10

Ke 4,0 g (31 mmol) kys. piperidin-3-karboxylové bylo přidáno 2,6 g (62 mmol) NaOH. K roztoku bylo za chlazení na teplotu $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomalu přikapáváno 5,22 ml (31 mmol) benzylchlorformiátu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 10 minut a poté byla přidána voda do rozpuštění sraženin. Produkt byl třikrát vytřepán do diethyletheru (DEE), okyselen HCl, třikrát vytřepán do ethylacetátu a poté přebytek HCl třikrát vytřepán do vody. Produkt byl vykrystalizován ze směsi DEE/hexan, krystaly odfiltrovány a sušeny v exsikátoru.

Výtěžek 72 % (5,98 g)

$T_t = 95,5\text{ }^{\circ}\text{C}^{133}$

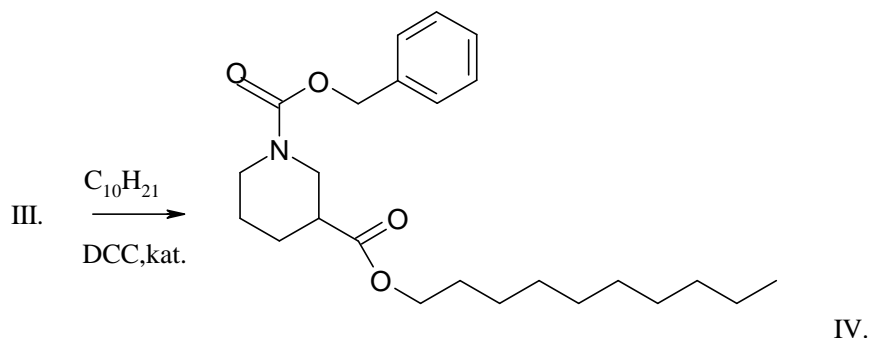
IR (0,9 mg/200 mg KBr): 2951, 2586, 1732, 1658, 1587, 1440 cm^{-1} .

$M = 263,12\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

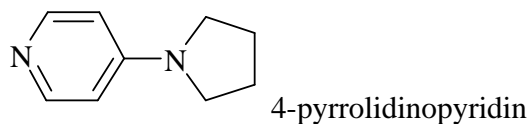
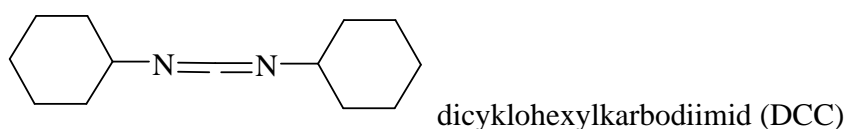
4.3.1.2. Esterifikace chráněné kyseliny piperidin-3-karboxylové:

Metoda podle Hassnera a Alexaniana¹³⁴ se používá při přípravě složitějších a chirálních esterů, resp. amidů.

Dicyklohexylkarbodiimid (DCC) usnadňuje esterifikaci karboxylu alkoholem, 4-pyrrolidinopyridin slouží jako katalyzátor reakce. Reakce je obvykle chlazená. Vedlejším produktem je N,N'-dicyklohexylmočovina, která se z reakční směsi snadno odfiltruje z DEE.



Reaktanty:



2,16 g (9,5 mmol) dicyklohexylcarbodiimidu, 2,5 g (9,5 mmol) chráněné kys. (III.) a 0,15 g (1 mmol) katalyzátoru bylo rozpuštěno ve 25 ml předestilovaného chloroformu a tato reakční směs byla chlazená na $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do této směsi byl pomalu za stálého míchání po čtyřech dílech přidáván chloroformový roztok decylalkoholu (1,51 g = 9,5 mmol). Reakce běžela 20 hodin, poté bylo přidáno několik kapek kys. octové, po 5 minutách byla reakce ukončena a N, N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována pomocí DEE. Produktem nažloutlá olejovitá kapalina, přečištěna chromatograficky – mobilní fází hexan/DEE 8:1.

Výtěžek: 91 % (3,5 g)

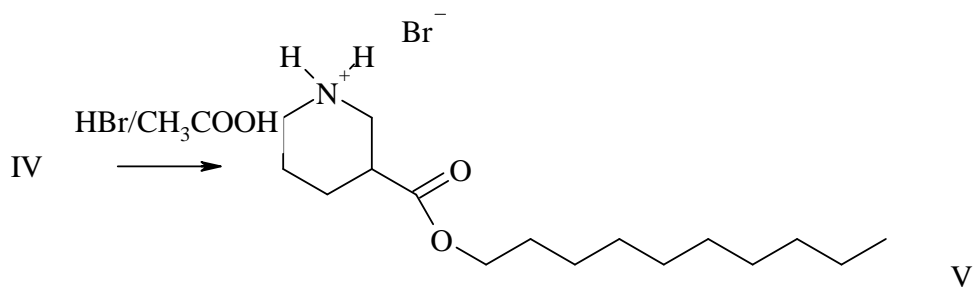
NMR: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,87 (t, $J = 6,5\text{Hz}$, 3H), 1,15-1,40 (m, 14H), 1,40-1,90 (m, 5H), 1,95-2,15 (m, 1H), 2,30-2,60 (m, 1H), 2,80-3,00 (m, 1H), 3,00-3,15 (m, 1H), 3,90-4,00 (m, 1H), 4,06 (t, $J = 6,5\text{Hz}$, 2H), 4,10-4,30 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 7,30-7,50 (m, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 173.281, 155.149, 136.715, 128.449, 127.952, 127.824, 127.795, 67.107, 64.761, 45.736, 44.167, 41.380, 31.853, 29.525, 29.497, 29.471, 29.264, 29.191, 28.520, 27.300, 25.835, 22.648, 14.090.

$M = 403,27\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{NO}_4$

4.3.1.3. Odstranění chránicí skupiny:

K 3,3 g (8,1 mmol) chráněného esteru (IV.) bylo přidáno 15 ml HBr/CH₃COOH, reakce probíhala za laboratorní teploty a bez míchání 20 hodin. Poté bylo přidáno 50 ml DEE. Filtrace a krystalizace DEE/hexan.



Výtěžek 79 % (2,25 g)

Tt = 80,6 °C.

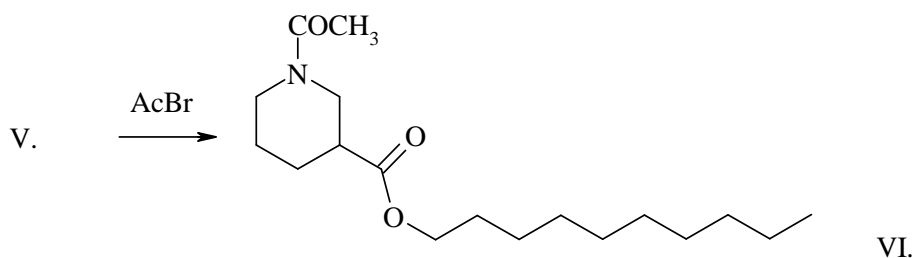
NMR:¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,86 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 1,20-1,40 (m, 14H), 1,50-1,80 (m, 3H), 1,90-2,40 (m, 3H), 2,70-3,20 (m, 2H+1H), 3,40-3,80 (m, 2H), 4,10 (t, J = 6,5Hz, 2H), 9,00-9,50 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 171.337, 65.608, 44.724, 44.023, 38.123, 31.865, 29.593, 29.538, 29.452, 29.304, 29.175, 28.432, 25.779, 25.579, 22.645, 21.214, 14.087.

IR (ATR): 2915, 2848, 1740, 1593, 1583, 1194 cm⁻¹.

M = 349,3 g.mol⁻¹.

C₁₆H₃₂NO₂.Br

4.3.2. N-acetylderivát decylesteru kyseliny 3-piperidinkarboxylové



Označení: 3A10

0,2 g (0,57 mmol) hydrobromidu esteru (V) zreagovalo s 2 ml chloroformu, 10 ml DEE, 0,07 ml (1 mmol) acetylbromidu (AcBr) a 0,25 ml (1,8 mmol) suchého triethylaminu (TEA). Reakce běžela 30 minut za laboratorní teploty a stálého míchání.

Po 30 minutách byl odpařen chloroform a DEE na vakuové odparce do sucha, poté byl produkt třikrát protřepán s 10 ml 3% roztoku NaHCO₃, poté pětkrát s 10 ml H₂O. Etherová vrstva byla 20 minut sušena Na₂SO₄. Filtrace přes vatu. Produkt přečištěn chromatograficky-mobilní fází DEE.

Výtěžek 65 % (0,1 g)

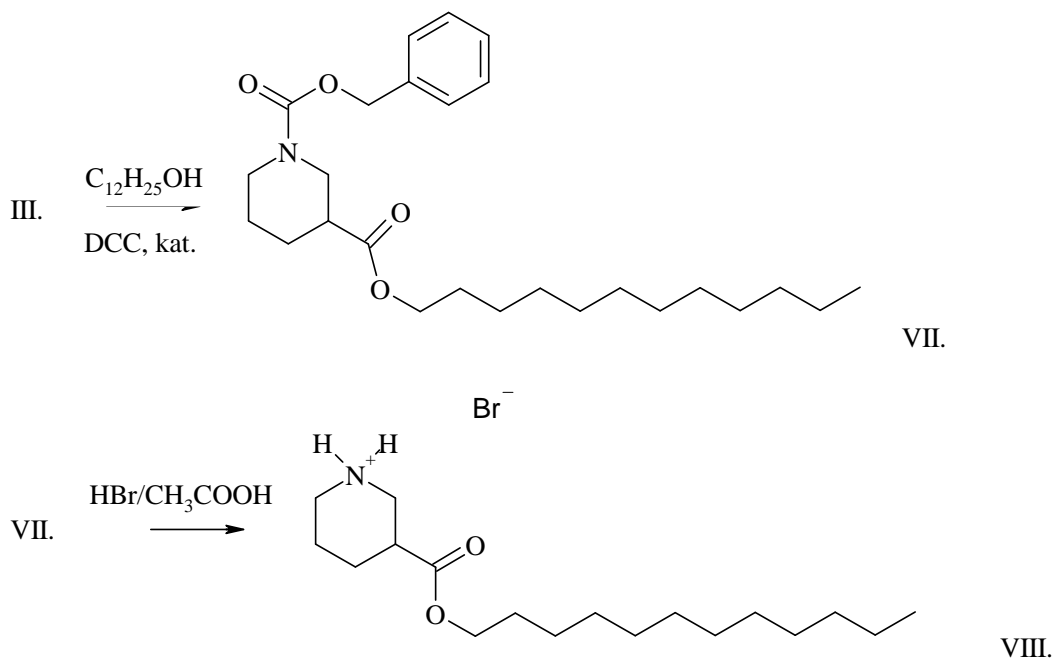
NMR: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,86 (t, 6,5Hz, 3H), 1,20-1,35 (m, 14H), 1,40-1,95 (m, 6H), 2,00-2,20 (s, 3H), 2,35-2,50 (m, 1H), 2,75-2,85 (m, 1H), 2,95-3,15 (m, 1H), 3,65-3,80 (m, 1H), 4,06 (t, J =6,5, 2H), 4,60-4,70 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.274, 169.101, 65.008, 64.784, 47.992, 46.672, 43.330, 41.699, 41.669, 41.187, 31.837, 29.457, 29.246, 29.183, 29.161, 28.513, 27.340, 27.158, 25.832, 24.998, 23.750, 22.631, 21.479, 21.430, 14.074 (izomer).

IR (ATR): 2923, 2854, 1729, 1649, 1173 cm⁻¹.

M= 311,25 g.mol⁻¹.

C₁₈H₃₃NO₃

4.3.3. Dodecylester kyseliny piperidin-3-karboxylové



Příprava probíhala analogicky jako příprava decylesteru kys. piperidin-3-karboxylové. Použit byl dodecylalkohol ekvimolárně (1,77 g = 9,5 mmol).

Výtěžek: 87 % (3,6 g)

NMR: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, 6,5 Hz, 3H), 1,20-1,35 (m, 18H), 1,40-1,80 (m, 6H), 2,00-2,20 (m, 1H), 2,80-3,00 (m, 2H), 3,90-4,10 (m, 4H), 5,13 (s, 2H), 7,20-7,40 (m, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 173.285, 155.160, 136.725, 128.457, 128.006, 127.958, 127.831, 67.121, 64.777, 45.752, 44.221, 44.186, 41.443, 41.402, 31.898, 29.841, 29.755, 29.730, 29.717, 29.623, 29.562, 29.491, 29.334, 29.214, 28.540, 27.322, 25.854, 22.676, 14.115.

$M = 431,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_4$

3,2 g (7,4 mmol) chráněného esteru (VII.) bylo smícháno s 15 ml $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ a necháno 2 hodiny ustát. 55 ml vychlazeného DEE bylo nadále chlazeno na $T = 0^\circ\text{C}$, na míchače do něj byla injekční stříkačkou kontinuálně přikapávána směs ester/ $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$. Krystaly byly ihned odfiltrovány přes Büchnerovu nálevku, vysušeny nad NaOH .

Výtěžek 72 % (2,0 g)

$T_t = 87,2^\circ\text{C}$.

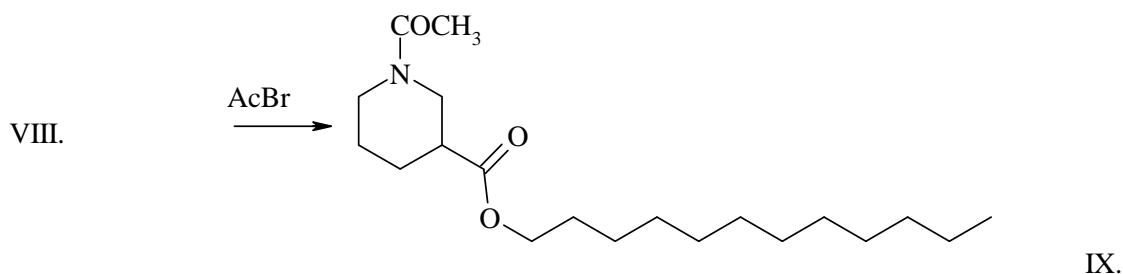
NMR: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,87 (t, 6,5 Hz, 3H), 1,20-1,40 (m, 18H), 1,50-1,80 (m, 3H), 1,90-2,30 (m, 3H), 2,80-3,20 (m, 3H), 3,40-3,70 (m, 2H), 4,09 (t, $J = 6,5\text{Hz}$, 2H), 9,00-9,50 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.337, 65.608, 44.724, 44.023, 38.123, 31.865, 29.593, 29.578, 29.538, 29.452, 29.304, 29.175, 28.432, 25.779, 25.579, 22.645, 21.214, 14.087.

IR (ATR): 2914, 2874, 1740, 1593, 1583, 1195 cm^{-1} .

$M = 378,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2\text{H}_2\cdot\text{Br}$

4.3.4. N-acetylderivát dodecylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové



Označení: 3A12

K 0,2 g (0,5 mmol) hydrobromidu dodecylesteru kys. piperidin-3-karboxylové (VIII) bylo přidáno 2 ml suchého chloroformu, 0,25 ml (1,8 mmol) suchého TEA a 10 ml suchého DEE. Vznikly sraženiny, do kterých bylo přidáno 0,07 ml (1 mmol) acetylbromidu (AcBr). Reakce probíhala 1 hodinu za stálého míchání. Odpaření acetylbromidu a vytřepání jednou 3% NaHCO₃. Poté vytřepání pětkrát malým množstvím H₂O a vysušení Na₂SO₄. Produkt jsme zfiltrovali přes vat, rozpouštědla odpařili a látku přečistili na koloně. Mobilní fáze DEE.

Výtěžek 82 % (0,13 g)

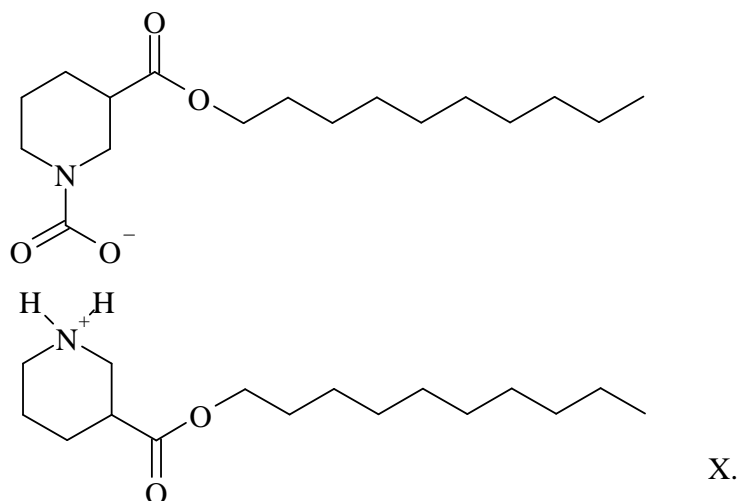
NMR: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,86 (t, 6,5Hz, 3H), 1,20-1,35 (m, 18H), 1,40-1,95 (m, 6H), 2,00-2,20 (s, 3H), 2,35-2,55 (m, 1H), 2,75-2,85 (m, 1H), 2,95-3,15 (m, 1H), 3,60-3,80 (m, 1H), 4,06 (t, J =6,5, 2H), 4,60-4,70 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 172.982, 169.103, 64.924, 48.019, 46.665, 43.368, 41.632, 31.866, 29.583, 29.522, 29.459, 29.301, 29.176, 28.517, 27.212, 25.834, 22.644, 21.403, 14.083.

IR (ATR): 2922, 2853, 1729, 1649, 1174 cm⁻¹.

M = 339,28 g.mol⁻¹

C₂₀H₃₇NO₃

4.3.5. 3-(decyloxykarbonyl)piperidinium-3-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát



Označení: 3K10

50 mg (0,8 mmol) hydrobromidu decylesteru piperidin-3-karboxylové kyseliny (V.) bylo rozpuštěno v 10 ml H₂O, k tomu byly přidány 0,5 ml (2 mmol) TEA. Poté 3 vytřepání s DEE, vysušení Na₂SO₄ a zfiltrováno, odpařeno na vakuové odparce. Vznikla olejovitá látka, která byla dosušena v exsikátoru nad P₂O₅ a H₂SO₄ konc., aby byl odstraněn zbylý TEA. Po 24 hodinách byl na vzniklý olej nafoukán CO₂ a baňka byla umístěna do mrazničky. Po 48 hodinách byla baňka vyjmuta a ponechána při laboratorní teplotě 2 hodiny. Vypadly nažloutlé krystaly.

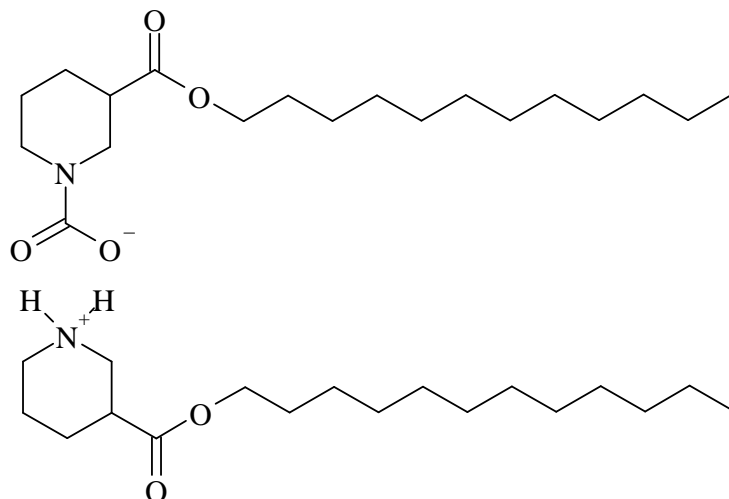
Výtěžek: 81 % (47 mg)

IČ: 2916, 2849, 1725, 1554, 1211 cm⁻¹. Na IČ byla prokázána přítomnost karbonylu karbamátové skupiny 1638 cm⁻¹.

M = 583,88 g.mol⁻¹.

C₁₇H₃₀NO₄ . C₁₆H₃₁NO₂H₂

4.3.6. 3-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-3-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát



Označení: 3K12

100 mg (0,13 mmol) hydrobromidu dodecylesteru kys. piperidin-3-karboxylové (VIII.) bylo rozsuspendováno v 15 ml H₂O. Bylo přidáno 0,9 ml (2 mmol) TEA, třikrát vytřepáno DEE, vysušeno Na₂SO₄ a ihned vakuově odpařeno. Baňka byla umístěna do exsikátoru nad P₂O₅ a H₂SO₄ konc., kterým jsme se zbavili zbytkového TEA. Po 24 hodinách byl na olej nafoukán CO₂ a baňka byla umístěna do mrazničky. Po 48 hodinách byla baňka z mrazničky vyjmuta a ponechána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Vypadly oranžové krystaly.

Výtěžek: 55 % (35 mg)

T_t = 49,3 °C.

IČ: 2915, 2848, 1725, 1555, 1211. Na IČ spektru byla prokázána přítomnost karbonylu karbamátové skupiny 1638 cm⁻¹.

M = 638,96 g.mol⁻¹.

C₁₉H₃₄N₂O₄ · C₁₈H₃₅N₂O₂H₂

5. HODNOCENÍ AKCELERAČNÍ AKTIVITY

5.1. PŘÍPRAVA KŮŽE PRO PERMEACE

Akcelerační aktivita syntetizovaných látek byla studována na prasečí kůži, která byla získána na místních jatkách. Kůže byla ze spodní strany uší opatrně oddělena skalpelem od podkožních tkání, chlupy byly odstraněny strojkem. Kvůli konzervaci byla kůže při uchovávání namočena 5 minut v 0,05% roztoku azidu sodného. Takto ošetřená kůže byla vakuově uzavřena a uskladněna v mrazničce. Maximální doba skladovatelnosti je 2 měsíce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Jeden z pokusů byl proveden na dermatomované kůži, která byla získána rovněž z prasečích uší pomocí dermatomu (Acculan II, Aesculap AG, Braun, Německo).

5.2. PŘÍPRAVA DONOROVÝCH VZORKŮ

Vzorek byl připraven jako 5% suspenze teofylinu s 1 % testovaného akceleračního činidla v 60% roztoku propylenglykolu. Suspenze byla míchána 5 minut na míchačce při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla na 24 hodin umístěna do termostatu ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) kvůli navození rovnovážného stavu.

Kontrolní vzorek obsahoval 5% roztok teofylinu. Byl připraven stejným postupem jako ostatní vzorky.

5.3. TESTOVÁNÍ PERMEAČNÍ AKTIVITY

Akcelerační vlastnost nasyntetizovaných látek byla zkoušena in vitro za použití Franzových difuzních cel a teofylinu jako modelového léčiva.

Prasečí kůže byla před použitím pomalu rozmrazena a pomocí skalpelu nařezána na malé kousky o rozměru přibližně $2 \times 2\text{ cm}$. Kůže byla upevněna do Franzovy cely tak, aby vznikla plocha 1 cm^2 . Každá cely byla naplněna akceptorovou fází (fosfátový pufr o pH 7,4, azid sodný 0,03% jako konzervans a NaCl jako izotonizační přísada). Byl zjištěn přesný objem každé cely (16 – 19 ml). Cely byly na 30 minut umístěny do vodní lázně o teplotě $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ kvůli navození rovnováhy. Následně bylo na každou kůži umístěnou v cely aplikováno $200\text{ }\mu\text{l}$ donorového

vzorku, který byl poté přikryt sklíčkem. Akceptorová fáze byla po celou dobu testování míchána a temperována na teplotu 32 °C.

V průběhu testování byly v intervalech po 16, 20, 24, 28, 40, 44 a 48 hodinách odebrány vzorky z každé cely ($V = 0,6$ ml) a nahrazeny akceptorovou fází ve stejném objemu.

5.4. STANOVENÍ TEOFYLINU POMOCÍ HPLC

Koncentrace teofylinu 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, 5 μ m, Merck, Darmstadt, Německo), RF – 10 A fluorescenčního detektoru (Shimadzu), SPD – M20 A diode array detektoru (Shimadzu) a softwaru Sigmastat. Methanol a 0.1M NaH₂PO₄ v poměru 6:4 byl použit jako mobilní fáze. Průtoková rychlost byla nastavena na 1,2 ml/min. Eluát byl monitorován při $\lambda = 272$ nm. Retenční čas teofylinu byl 3.3 \pm 0.1 min.

5.5. HODNOCENÍ DAT

Q_{24} (μ g/cm²) je kumulativní množství léčiva, které proniklo plochou 1 cm² za 24 hodin. Změřené hodnoty kumulativního množství teofylinu prošlého přes 1 cm² 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 (**AP**). AP vypovídá o efektivitě použitého akceleračního poměru je definován jako poměr fluxu látky v přítomnosti akceleračního poměru (J_x) a fluxu standardu tj. látky bez akceleračního poměru (J_0):

$$AP = \frac{J_x}{J_0}$$

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

6. VÝSLEDKY

Decylester kyseliny piperidin-3-karboxylové (3Br10) byl připraven několikastupňovou syntézou, která zahrnovala tyto kroky:

- Chránění dusíku benzylochlorformiátem, který byl přidán v ekvimolárním množství. Vznikl 1-benzyloxykarbonylderivát kys. piperidin-3-karboxylové s výtěžkem 72 %. Tato látka byla ověřena změřením teploty tání.
- Esterifikace karboxylové skupiny. Byl použit decylalkohol ekvimolárně. Reakce probíhala s výtěžkem 87 %. Byla provedena NMR analýza pro potvrzení struktury.
- Odstranění chránicí skupiny na dusíku pomocí směsi HBr/CH₃COOH. Výtěžek této reakce byl 79 %. Strukturu potvrdila NMR a IR analýza.

Tato látka byla připravena ve formě hydrobromidu. Akcelerační poměr je 4,7; tento derivát je nejméně účinný ze všech mnou syntetizovaných sloučenin.

Dodecylester kys. piperidin-3-karboxylové (3Br12) byl připraven analogicky, k syntéze byl použit dodecylalkohol.

- Esterifikace probíhala s výtěžkem 87 %
- Reakce vedoucí k odstranění chránicí skupiny měla výtěžek 72 %.

Akcelerační poměr této látky taktéž připravené ve formě hydrobromidu, je 8,1. Je tedy účinnější než decylester těžší kyseliny.

Kyseliny piperidin-3-karboxylová i benzyloxykarbonylpiperidin-3-karboxylová jsou látky popsány v literatuře.

N-acetylderivát decylesteru kys. piperidin-3-karboxylové (3A10) byl připraven reakcí hydrobromidu daného esteru s acetylbromidem v prostředí TEA a DEE. Reakce proběhla s výtěžkem 65 %. Struktura byla potvrzena NMR a IR analýzou. Akcelerační poměr této látky je 16,1, což znamená vyšší permeační aktivitu než hydrobromidu téhož esteru.

N-acetylderivát dodecylesteru kys. piperidin-3-karboxylové (3A12) byl připraven analogicky, reakce proběhla s výtěžkem 82 %. Struktura byla ověřena NMR a IR analýzou. Akcelerační poměr tohoto derivátu je 11,7, je tedy méně účinný než N-acetylderivát decylesteru této kyseliny, v porovnání s hydrobromidem dodecylesteru dané kyseliny je účinnější.

N-acetylderiváty obou esterů kys. piperidin-3-karboxylové nebyly popsány.

Největší akcelerační aktivity se očekávalo od karbamátů daných esterů:

3-(decyloxykarbonyl)piperidinium-3-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (3K10)

K reakci byl použit TEA k odstranění hydrobromidu, po získání volného dusíku byl na olejovitou látku nafoukán CO₂ a došlo k vytvoření karbamátu. Strukturu potvrdila IR analýza. Reakce proběhla s výtěžkem 60 %, akcelerační poměr je 46,3. Tato látka vykazuje nejvyšší aktivitu ze všech mnou syntetizovaných sloučenin.

3-(dodecyloxykarbonyl)piperidinium-3-(dodecyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát (3K12)

Látka byla připravena analogicky jako předchozí derivát. Strukturu potvrdila IR analýza. Výtěžek je 55 %, akcelerační poměr 32,7. V porovnání s výše uvedeným karbamátem je méně účinný, srovnání s ostatními dodecylestery je karbamát jednoznačně nejúčinnější.

Ani jeden karbamát nebyl popsán v literatuře.

Poslední pokus byl proveden na dermatomované kůži. Tato kůže je prosta větší části dermis. Jelikož akceleranty transdermální permeace ovlivňují pouze SC, neměla by mít přítomnost ostatních vrstev kůže vliv na přechod léčiva přes kůži. Testování na tomto typu kůže ukázalo, že odstranění části dermis neovlivní akcelerační poměr akceleračních látek, zkrátí pouze čas, který je potřeba k rovnoměrnému průchodu léčiva přes kůži.

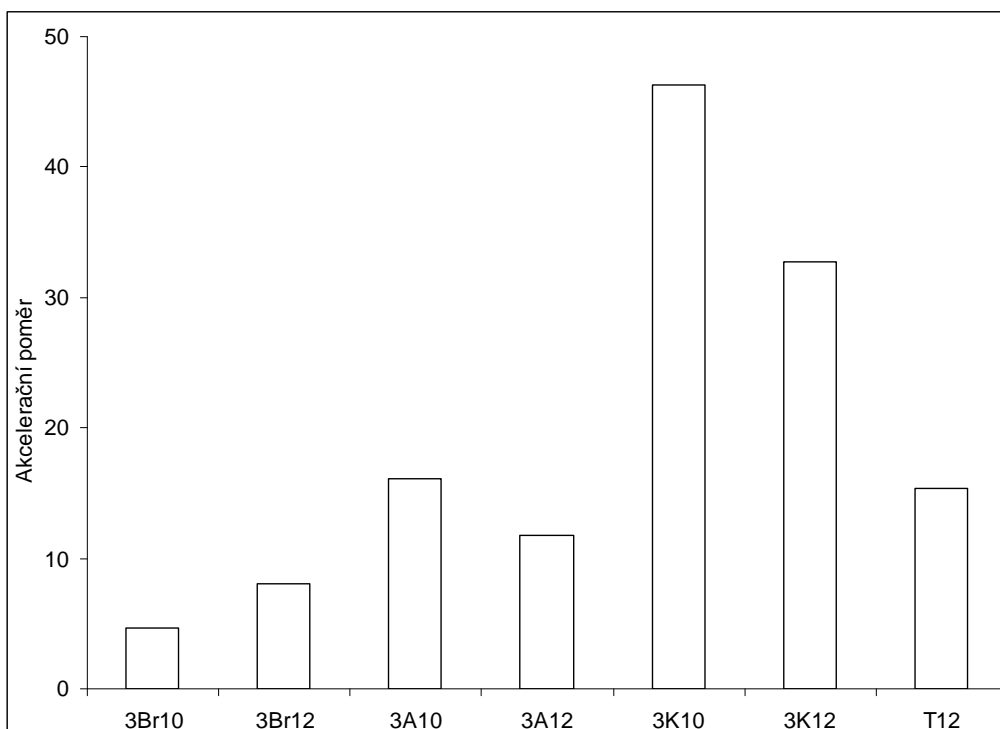
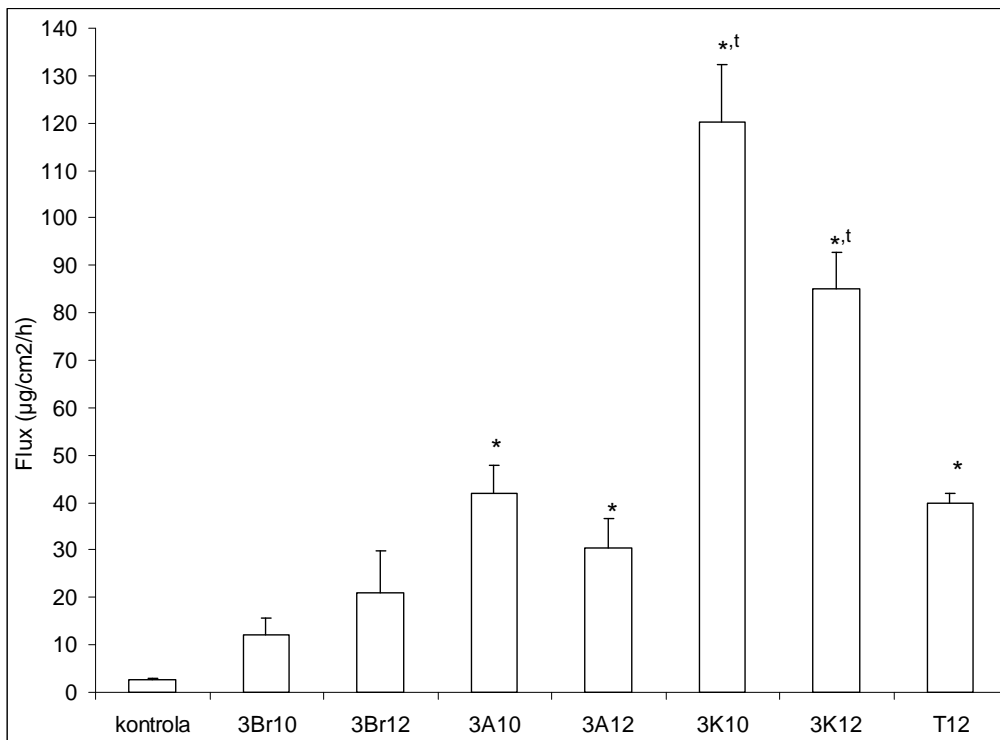
PG

	Kontrola	3Br10	3Br12	3A10	3A12	3K10	3K12	T12
14.4.2008	1	2	6	39	29			
	1	1	5	40	15			
		2	7	24	6			
	0							
23.4.2008	2	21	40	29	23	100	70	38
	3	8	16	28	12	130	45	36
	1					56	64	
	1					106	58	
28.4.2008	2	5	8	35	45	78	83	42
	3	26	66	43	45	60	62	44
	4					120	80	
						154	112	
5.5.2008	5	18		57	60	158	94	
	4	27		81	39	174	106	
						124	124	
	7					183	122	
	Kontrola	3Br10	3Br12	3A10	3A12	3K10	3K12	T12
Průměr fluxů	2,6	12,1	21,0	41,8	30,5	120,3	85,0	39,9
Průměrná odchylka	1,5	9,5	18,1	12,4	15,1	33,6	22,1	3,2
Směrod. odch. Průměru	0,5	3,6	8,8	5,9	6,0	12,0	7,6	1,9
Stat.význ. rozdíl proti kontrole				*	*	*	*	*
Akcelerační poměr		4,7	8,1	16,1	11,7	46,3	32,7	15,3

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

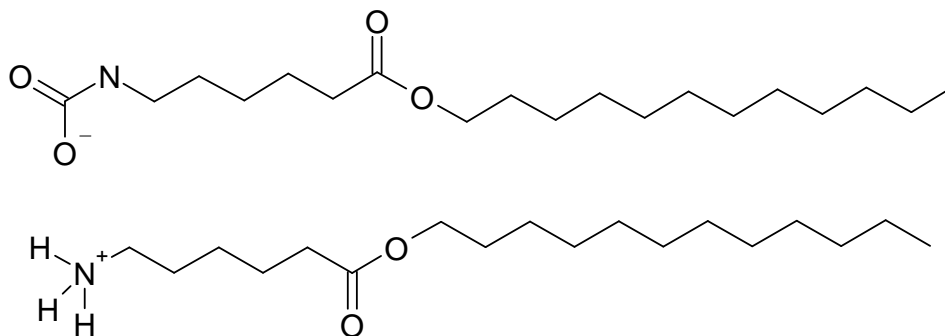
t = statistický významný rozdíl proti T12 ($p < 0,05$)

One Way Analysis of Variance se Student-Newman-Keulsovým post testem.



7. DISKUZE

Dle strukturní předlohy T 12 byly syntetizovány jeho cyklické analogy, deriváty kyseliny piperidin-3-karboxylové. Jedná se o estery s délkou lipofilního řetězce 10 a 12 C ve formě hydrobromidů, N-acetylderivátů a solí karbamových kyselin.



Obrázek 3 Vzorec transkarbamu 12

Ze srovnání aktivity u mnou syntetizovaných derivátů ve formě hydrobromidů (AP = 4 - 7) a karbamátů (AP = 33 - 45) mající shodnou kationickou skupinu vyplývá, že akcelerační účinek nese zřejmě anionická část karbamátu. Předpokladem je uvolnění CO₂ ze struktury karbamátu v mírně kyselém prostředí kůže. Tento výsledek potvrzuje domněnku, že účinek karbamátů je způsoben nejen narušením lamelárního uspořádání lipidů ve SC, ale i rozvolněním lamel kumulací CO₂, který je zřejmě netoxický a z kůže lehce uniká.

N-acetylované deriváty dosáhly neočekávaně vysokých hodnot AP (11 – 16) oproti N-acetylovanému T 12, jehož aktivita byla zanedbatelná. Mnou syntetizované N-acetylované deriváty mají shodné AP jako modelová látka T 12.

Současně byly syntetizovány deriváty kyseliny piperidin-4-karboxylové¹³⁶. Z porovnání aktivit derivátů těchto dvou izomerů vyplývá, že deriváty kys. piperidin-3-karboxylové mají vyšší účinnost. Důvodem by mohla být strukturní změna vlivem polohy karboxylové skupiny a z toho vyplývající prostorové uspořádání molekuly. Deriváty kyseliny piperidin-3-karboxylové obsahují chirální uhlík, jenž poskytuje optické izomery. Toto by mohlo vést k variabilním interakcím s různými typy lipidů SC.

Látky obsahující bazický sekundární dusík (hydrobromidy a karbamáty) jsou aktivnější a zřejmě i toxičtější, což potvrzuje myšlenku vztahu bazicity s aktivitou.

Z výše uvedených AP vyplývá, že pro účinek je vhodnější délka hydrofobního řetězce obsahujícího 10 C, což bylo dokázáno již dříve při syntéze transkarbámu 10 (AP = 33) ¹³⁵ s délkou řetězce o 10 C, který je strukturním analogem T 12.

Jelikož akceleranty transdermální permeace ovlivňují pouze SC, neměla by mít přítomnost ostatních vrstev kůže vliv na přechod léčiva přes kůži. Pro porovnání bylo provedeno i testování na dermatomované kůži, která je tenká a obsahuje především epidermis. Tento pokus ukázal, že barierovou funkci zajišťuje hlavně SC (AP dermatomované kůže a kůže plné tloušťky byly shodné).

8. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem nasyntetizovala 6 látek, jejichž strukturním základem byla kyselina piperidin-3-karboxylová. Byly připraveny tyto látky:

- Decylester kyseliny piperidin-3-karboxylové ve formě hydrobromidu
- Dodecylester kyseliny piperidin-3-karboxylové ve formě hydrobromidu
- N-acetylderivát decylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové
- N-acetylderivát dodecylesteru kyseliny piperidin-3-karboxylové
- 3-(decyloxykarbonyl)piperidinium-3-(decyloxykarbonyl)piperidin-1-karbamát
- 3-(dodecylexykarbonyl)piperidinium-3-(dodecylexykarbonyl)piperidin-1-karbamát

U výše zmíněných látek jsem testovala akcelerační aktivitu na teofylinu jako modelovém léčivu. K pokusům jsem použila kůži prasečích uší. Testy byly prováděny in vitro ve Franzových difuzních celách v prostředí 60% propylenglykolu.

Ze získaných výsledků jsem odvodila vztah mezi strukturou a účinkem:

- V případě hydrobromidů je dodecylester nepatrně účinnější než decylester
- Porovnáním hydrobromidů a N-acetylderivátů jsou druhé zmiňované jednoznačně účinnější, přičemž N-acetylovaný derivát decylesteru je aktivnější
- Karbamát decylesteru vykazuje vyšší aktivitu než karbamát dodecylesteru
- Karbamáty mají nejvyšší aktivitu ze všech tří strukturních obměn
- N-acetylované deriváty a karbamáty mají vyšší aktivitu než předlohová látka transkarbam 12, zatímco hydrobromidy esterů mají aktivitu nižší

Současně byly syntetizovány deriváty kyseliny piperidin-4-karboxylové¹³⁶, jejichž aktivita byla testována současně s deriváty kys. piperidin-3-karboxylové.

9. REFERENCE

- ¹ Buyuktimkin, N.; Buyuktimkin, S.; Rytting, J. H. In *Transdermal and Topical Drug Delivery Systeme*; Ghosh, T. K.; Pfister, W. R.; Eds.; Interpharm: Bufalo Grove, IL, **1997**; pp 357-476
- ² Barry, B.W. In *Pharmacology of the Skin*; Shroot, B.; Schaefer, H.; Eds; Karger: Basel, **1987**; p 121
- ³ Marjukka Suhonen, T.; Bouwstra, J. A.; Urtti, A. *J. Control. Release* **1999**, 59, 149
- ⁴ Prausnitz, M.R.; Mitragori, S.; Langer, R. *Nature Rev.*, **2004**, 3, 115
- ⁵ Odland, G.F. In *Biochemistry and Physiology of the Skin*; Goldsmith, L.A., Ed.; Oxford University Press: New York, **1983**, pp. 3-63.
- ⁶ Menon, G.K.: New Insights into Skin Structure: Scratching the Surface ; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54, Suppl. 1., S3.
- ⁷ Agache, P.; Hubert, P., Eds.: *Measuring the skin*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2004**
- ⁸ <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Skin.jpg>.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Elias, P.M.: Structure and Function of the Stratum-Corneum Permeability Barrier; *Drug Dev. Res.*, **1998**, 13, 97-105.
- ¹² Nicolaides, N.: Skin Lipids- Their Biochemical Uniqueness; *Science*, **1974**, 186, 19-26.
- ¹³ Gray, G.M.; Yardley, H.J.: Different Populations of Pig Epidermal-Cells – Isolation and Lipid-Composition, *J. Lipid Res.*, **1975**, 16, 441-447.
- ¹⁴ Ellis, R.A.; Hendrickson, R.C. In *Advances in Biology of the Skin* (W. Montagna *et al.*, eds.), **1963**; p. 94 Pergamon, Oxford.
- ¹⁵ Elias, P.M.: Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation, *J. Invest Dermatol.*, **1983**, 80, S44.

-
- ¹⁶ Grubauer, G.; Feingold, K.R.; Harris, R.M.; Elias, P.M.: Lipid-Content and Lipid Type as Determinants of the Epidermal Permeability Barrier, *J Lipid Res.*, **1989**, 30, 89.
- ¹⁷ Potts, R.O.; Francoeur, M.L. The Influence of Stratum-Corneum Morphology on Water Permeability, *J. Invest. Dermatol.*, **1991**, 96, 495-499.
- ¹⁸ 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.
- ¹⁹ 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.
- ²⁰ 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.
- ²¹ 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.
- ²² Lampe, M.A.; Burlingame, 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.
- ²³ Schurer, N.Y.; Elias, P.M.: The Biochemistry of Stratum-Corneum Lipids; *Adv. Lipid Res.*, **1991**, 24, 27.
- ²⁴ Wertz, P.W.; Downing, D.T.: Ceramides of Pig Epidermis- Structure Determination; *J. Lipid Res.*, **1983**, 24, 759.
- ²⁵ Ponec, M.: Skin Constructs for Replacement of Skin Tissues for in vitro Testing; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54, Suppl. 1, S19.
- ²⁶ Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Valuto, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R.: Ceramide Composition of the Psoriatic Scale; *Biochem. Biophys. Acta*, **1993**, 1182, 147.
- ²⁷ Wertz, P.W.: The Nature of the Epidermal Barrier: Biochemical Aspects; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, 18, 283.
- ²⁸ 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.
- ²⁹ Wertz, P.W.; Cho, E.S.; Downing, D.T.: Effect of Essential Fatty-Acid Deficiency of the Epidermal Sphingolipids of the Rat; *Biochem. Biophys. Acta*, **1983**, 753, 350.

-
- ³⁰ Ansari, M.N.A.; Nicolaides, N.; Fu, H.C.: Fatty Acid Composition of Living Layer and Stratum-Corneum Lipids of Human Sole Skin Epidermis; *Lipids*, **1970**, 5, 838-845.
- ³¹ Grubauer, G.; Feingold, K.R.; Elias, P.M.: Relationship of Epidermal Lipogenesis to Cutaneous Barrier Function; *J. Lipid. Res.*, **1987**, 28, 746-752.
- ³² Kondoh, H., Kanoh, H., Ono, T.: Deacylation of Ceramide, Triacylglycerol and Phospholipids in Guinea-pig Epidermal-Cells; *Biochem. Biophys. Acta*, **1983**, 753, 97-106.
- ³³ Weerheim, A.; Ponc, M.: Determination of Stratum-Corneum Lipid Profile by Tape Stripping in Combination with High-Performance Thin-Layer Chromatography; *Arch. Dermatol. Res.*, **2001**, 293, 191.
- ³⁴ Norlén, L.: Skin Barrier Structure and Function: The Single Gel Phase Model; *J. Invest. Dermatol.*, **2001**, 117, 830.
- ³⁵ Goldstein, J.L.; Brown, M.S.: Familial Hypercholesterolemia- Identification of a Defect in Regulation of 3- hydroxyl-3-methylglutaryl Coenzyme- A Reductase- Activity Associated with Overproduction of Cholesterol; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1973**, 70, 2804-2808.
- ³⁶ Mazzone, T.; Basheeruddin, K.; Ping, L.; Schick, C.: Relation of Growth- Related and Sterol- Related Regulatory Pathways for Low- Density Lipoprotein Receptor Gene- Expression; *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 5145-5149.
- ³⁷ Mommaas-Kienhuis, A.M.; Grayson, S.; Wijnsman, M.C.; Vermeer, B.J.; Elias, P.M.: Low- Density- Lipoprotein Receptor Expression on Keratinocytes in Normal and Psoriatic Epidermis; *J. Invest. Dermatol*, **1987**, 89, 513-517.
- ³⁸ Andersen, J.M.; Dietschy, J.M.: Regulation of Sterol Synthesis in 15 Tissues of Rat. 2. Role of Rat and Human High and Low- Density Plasma Lipoproteins and of Rat Chylomicron Remnants; *J. Biol. Chem.*, **1977**, 252, 3652-3659.
- ³⁹ Brannan, P.G.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S.: 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme-A Reductase- Activity in Human Hair- Roots; *J. Lipid. Res.*, **1975**, 16, 7-11.
- ⁴⁰ Williams, M.L.; Elias, P.M.: The Extracellular-Matrix of the Stratum-Corneum – Role of Lipids in Normal and Pathological Function; *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **1987**, 3, 95-122.
- ⁴¹ Feingold, K.R.; Wiley, M.H.; MacRae, R.; Lear, S.R.; Moser, A.H.; Zsigmond, G.; Siperstein, M.D.: Denovo Sterologenesi in the Intact Rat; *Metab. Clin. Exp.*, **1983**, 32, 75-81.

-
- ⁴² Monger, D.J.; Williams, M.; Feingold, K.R.; Brown, B.; Elias, P.: Localization of Sites of Lipid Biosynthesis in Mammalian Epidermis; *J. Lipid. Res.*, **1988**, 29, 603-612.
- ⁴³ Proksch, E.; Elias, P.M.; Feingold, K.R.: Localization and Regulation of Epidermal 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme-A Reductase- Activity by Barrier Requirements; *Biochim Biophys. Acta*, **1991**, 1083, 71-79.
- ⁴⁴ Feingold, K.R.; Wiley, M.H.; Moser, A.H.; Lau, D.T.; Lear, S.R.; Siperstein, M.D.: Denovo Sterologogenesis in Intact Primates; *J. Lab. Clin. Med.*, **1982**, 100, 405-410.
- ⁴⁵ Feingold, K.R.; Williams, M.L.; Pillai, S.; Menon, G.K.; Holleran, W.P.; Bikle, D.; Elias, P.M.: The Effect of Vitamin-D Status on Cutaneous Sterologogenesis Invivo and Invitro; *Biochem. Biophys. Acta*, **1987**, 930, 193-200.
- ⁴⁶ Epstein, E.; Bonifas, J.M.; Barber, T.L.; Harber, M.: Cholesterol Sulfotransferase of Newborne Mouse Epidermis; *J. Invest. Dermatol.*, **1984**, 83, 332-335.
- ⁴⁷ Lampe, M.A.; Williams, M.L.; Elias, P.M.: Human Epidermal Lipids – Characterization and Modulations During Differentiation; *J. Lipid. Res.*, **1983**, 24, 131-140.
- ⁴⁸ Williams, M.L.; Elias, P.M. Stratum-Corneum Lipids in Disorders of Cornification; *J Clin Invest.*, **1981**; 68, 1404-1410.
- ⁴⁹ Elias, P.M.; Williams, M.L.; Maloney, M.E.; Bonifas, J.A.; Brown, B.E.; Grayson, S.; Epstein, E.H.: Stratum-Corneum Lipids in Disorders of Cornification – Steroid Sulfatase and Cholesterol Sulfate in Normal Desquamation and the Pathogenesis of Recessive X-linked Ichthyosis; *J. Clin. Invest.*, **1984**, 74, 1414-1421.
- ⁵⁰ Ranasinghe, A.W., Wertz, P.W., Downing, D.T., Mackenzie, I.C.: Lipid Composition of Cohesive and Desquamated Corneocytes from Mouse Ear Skin; *J. Invest. Dermatol.*, **1986**, 86, 187-190.
- ⁵¹ 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.
- ⁵² Williams, M.L.: The Ichthyoses - Pathogenesis and Prenatal Diagnosis; A Review of Recent Advances; *Pediatr. Dermatol.*, **1983**, 1, 1-24.

-
- ⁵³ Carruthers, C.; Heining, A.: Fatty Acid Composition of Sterol-Wax Ester + Mono + Diglyceride Fractions of Mouse Epidermis Undergoing Normal + Abnormal Growth Changes; *Cancer Res.*, **1964**, 24, 1008-1011.
- ⁵⁴ Yardley, H.J.: Sterols and Keratinization; *Br. J. Dermatol.*, **1969**, 81, 29-38.
- ⁵⁵ 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.
- ⁵⁶ Yardley, H.J.: Sterols and Keratinization; *Br. J. Dermatol.*, **1969**, 81, 29-38.
- ⁵⁷ Ziboh, V.A.; Miller C.C.: Essentials Fatty- Acids and Polyunsaturated Fatty-Acids – Significance in Cutaneous Biology; *Annu. Rev. Nutr.*, **1990**, 10, 433-450.
- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ 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.
- ⁶⁰ 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.
- ⁶¹ Gray, M.G.; White, R.J.: Glycosphingolipids and Ceramides in Human and Pig Epidermis; *J. Invest. Dermatol.*, **1978**, 70, 336-344.
- ⁶² 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.
- ⁶³ Gardin, J.-C.; Doucet, J.; Leveque, J.-L.; Tsoucaris, G.: Oriented Structure in Human Stratum-Corneum Revealed by X-Ray-Diffraction; *J. Invest. Dermatol.*, **1991**, 96, 43.
- ⁶⁴ 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.
- ⁶⁵ 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.

-
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ Bouwstra, J.; Pilgram, G.; Gooris, G.; Koerten, H.; Ponc, M.: New Aspects of the Skin Barrier Organization; *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **2001**, 14 suppl. 1, 52-62.
- ⁶⁸ Williams, A.C.; Barry, B.W.: Penetration Enhancers; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 603-18.
- ⁶⁹ Barry, B.W.: *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*, Marcel Dekker: New York **1983**.
- ⁷⁰ Barry, B.W.: Novel Mechanisms and Devices to Enable Successful Transdermal Drug Delivery; *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, 14, 101.
- ⁷¹ Barry, B.W.: Action of Skin Penetration Enhancers – The Lipid-Protein- Partitioning Theory; *Int. J. Cosmet. Sci.*, **1988**, 10, 281.
- ⁷² Goodman M.; Barry, B.W.: Lipid- Protein- Partitioning (LPP) Theory of Skin Enhancer Activity – Finite Dose Technique; *Int. J. Pharm.*, **1989**, 57, 29.
- ⁷³ Barry, B.W.: Lipid-Protein-Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement; *J. Control. Release*, **1991**, 15, 237.
- ⁷⁴ 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.
- ⁷⁵ http://www.ijpr-online.com/Docs/20041/IJPR226_files/image002.jpg
- ⁷⁶ 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.
- ⁷⁷ 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.
- ⁷⁸ Menczel, E.M. In *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith E.W.; Maibach, H.I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**; pp. 383-392.
- ⁷⁹ 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.

-
- ⁸⁰ 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.
- ⁸¹ 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.
- ⁸² Borrás-Blasco, J.; Díez-Sales, O.; Polez, A.; Herráez-Domínguez, M.: A Mathematical Approach to Predicting the Percutaneous Absorption Enhancing Effect of Sodium Lauryl Sulphate; *Int. J. Pharm.*, **2004**, 269, 121.
- ⁸³ 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.
- ⁸⁴ 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.
- ⁸⁵ 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.
- ⁸⁶ 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.
- ⁸⁷ Brain, K.A.; Walters, K.A. *In Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*; Walters, K.A.; Hadgraft, J., Eds.; Dekker: New York, **1993**; pp. 389-416.
- ⁸⁸ 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.
- ⁸⁹ 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.
- ⁹⁰ 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.

-
- ⁹¹ 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.
- ⁹² Aungst, B.J.; Rogers, N.J.; Shefter, E.: Enhancement of Naloxone Penetration Through Human-Skin In Vitro Using Fatty-Acids, Fatty Alcohols, Surfactants, Sulfoxides and Amides; *Int. J. Pharm.*, **1986**, 33, 225.
- ⁹³ 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.
- ⁹⁴ Aungst, B.J.: Structure Effect Studies of Fatty-Acid Isomers as Skin Penetration Enhancers And Skin Irritants ; *Pharm. Res.*, **1989**, 6, 244.
- ⁹⁵ 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.
- ⁹⁶ 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.
- ⁹⁷ 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.
- ⁹⁸ 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**
- ⁹⁹ Suzuki, E.; Okabe, H.; Saito, T. EP 0552405A1, **1992**.
- ¹⁰⁰ Doležal, P.; Hrabálek, A.; Semecký, V.: Epsilon - Aminocaproic Acid-Esters as Transdermal Penetration Enhancing Agents; *Pharm. Res.* **1993**, 10, 1015.
- ¹⁰¹ Hrabálek, A.; Doležal, P.; Roman, M.; Macháček, M.; Šklubalová, Z.: Esters of Omega-Amino Acids as Flexible Penetration Enhancers; *Pharmazie*, **1994**, 49, 325.
- ¹⁰² Hrabálek, A.; Doležal, P.; Farsa, O.; Šklubalová, Z.; Kuneš, J.: Esters of 6-Dimethylaminohexanoic Acid as Skin Penetration Enhancers; *Pharmazie*, **2000**, 55, 759.

-
- ¹⁰³ 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.
- ¹⁰⁴ Fleeker, C.; Wong, O.; Rytting, J.H.: Facilitated Transport of Basic and Acidic Drugs in Solutions Through Snakeskin by a New Enhancer - Dodecyl N,N-Dimethylamino Acetate; *Pharm. Res.*, **1989**, 6, 443.
- ¹⁰⁵ Wong, O.; Nishiahta, T.; Rytting, J.H. US 4,980, 378, **1990**.
- ¹⁰⁶ Wong, O.; Nishiahtam T.: Biodegradable absorption enhancers; US 5,082,866: **1990**.
- ¹⁰⁷ 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.
- ¹⁰⁸ Michniak, B.B.; Player, M.R.; Sowell, J.W. Sr: Synthesis and In Vitro Transdermal Penetration Enhancing Activity of Lactam N-Acetic Acid Esters; *J. Pharm.Sci.*, **1996**, 85, 150.
- ¹⁰⁹ 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.
- ¹¹⁰ Abraham, M.H. Scales of Solute Hydrogen-Bonding: Their Construction and Application to Physicochemical and Biochemical Processes; *Chem. Soc. Rev.*, **1993**, 22, 73-83.
- ¹¹¹ 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.
- ¹¹² 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.
- ¹¹³ Mirejovski, D.; Takruri, H.: Compositions and Methods of Enhancing Transdermal and Transmembrane Penetration Systemic Agents; US 4,743,588, **1988**.
- ¹¹⁴ Kim, N.; El-Kattan, A.F.; Asbill, C.S.; Kenette, R.J.; Sowell, J.W.Sr; J.W. Latou, B.; Michniak, B.B.: Evaluation of Derivatives of 3-(2-Oxo-1-Pyrrolidine) Hexahydro-1H-Azepine-2-One as Dermal Penetration Enhancers: Side Chain Length Variation and Molecular Modeling; *J. Control. Release*, **2001**, 73, 183.
- ¹¹⁵ Wong, O.; Huntington, J.; Konishi, R.; Rettig, J.H.; Higuchi, T.J. *Pharm. Sci.*, **1998**, 77, 967.

-
- ¹¹⁶ Wong, O.; Tsuzuki, N.; Nghiem, B.; Kuehnhoff, J.; Itoh, T.; Masaki, K.; Huntington, J.; Konishi, R.; Rytting, J.H.; Higuchi, T.: Unsaturated Cyclic Ureas as New Non-Toxic Biodegradable Transdermal Penetration Enhancers .2. Evaluation Study; *Int. J. Pharm.*, **1989**, *52*, 191.
- ¹¹⁷ Higuchi, T.; Wong, O.: Imidazolin-2-ones; US 4,845,233, **1989**.
- ¹¹⁸ 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.
- ¹¹⁹ 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.
- ¹²⁰ 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.
- ¹²¹ Montagna, W.; Histology and Cytochemistry of Human Skin IX. The Distribution of Non-Specific Esterases; *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1955**, *1*, 13-16.
- ¹²² 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.
- ¹²³ Heard, C.M.; Brain, K.R.: Does Solute Stereochemistry Influence Percutaneous Penetration?; *Chirality*, **1995**, *7*:305-309.
- ¹²⁴ Benezra, C.; Stampf, J.L.; Barrier, P.; Ducombs, G.: Enantiospecificity in Allergic Contact Dermatitis; *Contact Dermatitis*, **1985**, *13*:110-114.
- ¹²⁵ Amin, S.; Huie, K.; Balanikas, G.; Hecht, S.S.; Pataki J.; Harvey, R.G.: High Stereoselectivity in Mouse Skin Metabolic Activation of Methylchrysenes to Tumorigenic Dihydrodiols; *Cancer Res*, **1987**, *47*:3613-3617.
- ¹²⁶ Heard, C.M.; Watkinson, A.C.; Brain, K.R.; Hadgraft, J.: In Vitro Skin Penetration of Propranolol Enantiomers; *Int. J. Pharm.*, **1993**, *90*: R5-R8.
- ¹²⁷ Touitou, E.; Chow, D.D.; Lawter, J.R.: Chiral B-Blockers for Transdermal Delivery; *Int J Pharm*, **1994**, *104*: 987-990.
- ¹²⁸ Roy, S.D.; Chatterjee, D.J.; Manoukian, E.; Divor, A.: Permeability of Pure Enantiomers of Ketorolac through Human Cadaver Skin; *J Pharm Sci*, **1995**, *84*:987-840.

-
- ¹²⁹ Komturu, T.R.; Khan, M.A.; Reddy, I.K.: Effect of Chiral Enhancers on the Permeability of Optically Active and Racemic Metoprolol across Hairless Mouse Skin; *Chirality*, **1999**, 11:536.
- ¹³⁰ Kommuru, T.R.; Khan, M.A.; Reddy, I.K.: Racemate and Enantiomers of Ketoprofen: Hase Diagram, Thermodynamic Studies, Skin Permeability, and Use of Chiral Permeation Enhancers; *J. Pharm. Sci.*, **1998**, 87:833-840.
- ¹³¹ Zobrist, R.H.; Schmidt, B.; Feick, A.; Juan, D.; Sanders, S.W.: Pharmacokinetics of the R- and S-Enantiomers of Oxybutynin and N-Desethyloxybutynin Followin Oral and Transdermal Administration of The Racemate in Healthy Volunteers; *Pharm Res*, **2001**, 18:1029-97.
- ¹³² Bergmann M., Zervas L.: Uber ein allgemeines Verfahren der Peptid-synthese; *Ber Deut Chem Ges*, **1932**, 65:1192-1201.
- ¹³³ 658952: Journal; Imamora, Shinichi, Nishikawa, Youichi, Ichikawa, Takashi, Hattori, Taeko, Matsushita, Yoshihiro, Hashiguchi, Shohei, Kanzaki, Naoyuki, Baba, Masanori, Sugihara: *Bioogr. Med. Chem.*, EN, **13.2.2005**, 397-416.
- ¹³⁴ Hassner A., Alexanian V.; Direct Room Temperature Esterification of Carboxylic Acids; *Tetrahedron Lett*, **1978**, 46:4475-4478.
- ¹³⁵ 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
- ¹³⁶ Michal Kořínek: Diplomová práce; 2008