

Historie a současný stav ve vývoji akceleračních transdermálních permeací na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové – od esterů 6-aminohexanové kyseliny k transkarbamům (I. část)

doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.,
doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.,
PharmDr. Kateřina Vávrová, PhD.

Problematika akceleračních transdermálních permeací je na UK-FaF řešena od roku 1989. Byl zde vyvinut originální akcelerační nazvaný transkarbam 12 a v současnosti probíhají práce na objasnění jeho mechanismu účinku. Během 17 let bylo připraveno a na transdermálně akcelerační aktivitu otestováno několik stovek sloučenin různých struktur – analogů transkarbamu – s cílem získat znalosti o vztazích mezi strukturou a účinkem v této skupině urychlovačů transdermálního přenosu. Tento článek se zabývá strukturálními obměnami týkajícími se především uhlíkatého skeletu předlohy molekuly. Klíčová slova: transkarbam, soli karbamových kyselin, estery aminokyseliny, theofylin.

Problematika akceleračních transdermálních permeací je na FaF UK řešena od roku 1989 a tato fakulta je doposud jediným pracovištěm

v ČR, na kterém probíhá základní výzkum v této oblasti farmaceutické chemie a farmaceutické technologie. Tehdy byla na základě

dosud publikovaných perspektivních akceleračních vytipována struktura původní skupiny látek, u které se daly tyto vlastnosti očekávat. Předlohou se stal Azone®, látka patentovaná v roce 1976 v USA (obrázek 1a.).

Myšlenka spočívala v tom, nahradit v první řadě laktamovou (amidickou) skupinu za isosterní skupinu esterovou a díky tomu rigidní cyklickou strukturu vycházející z ε-kaprolaktamu zaměnit za strukturu lineární, která bude mnohem flexibilnější, což by mohlo znamenat dokonalejší interakci s intercelulárními lipidy rohové vrstvy epidermis, stratum corneum (SC) – předpokládaným místem působení akceleračních transdermálních permeací. Tak vznikla již v roce 1989 první série látek – lipofilních esterů 6-aminohexanové kyseliny (EAK), u kterých byla v souladu s předpokladem zjištěna pozoruhodná akcelerační aktivita (obrázek 1b). Látky tohoto typu překonávaly Azon až 40krát (1).

Akcelerační látky byly a jsou testovány na lidské a nebo prasečí kůži za použití modifikovaných Franzových cel. Jako modelový permeant – látka, jejíž urychlení se sleduje – slouží theofylin, který sám proniká kůží velmi neochotně. Účinnost akceleračních látek se vyjadřuje pomocí tzv. akceleračního poměru AP, který vyjadřuje množství theofylinu prošlého přes kůži ze vzorku s akceleračním vztažené na množství theofylinu prošlého ze vzorku bez akcelerační látky.

Vzhledem k vysoké aktivitě prvních připravených sloučenin bylo přistoupeno k obměnám struktury s cílem připravit sérii látek, na základě jejichž biologické aktivity bude možné stanovit první a základní vztahy mezi strukturou a účinkem.

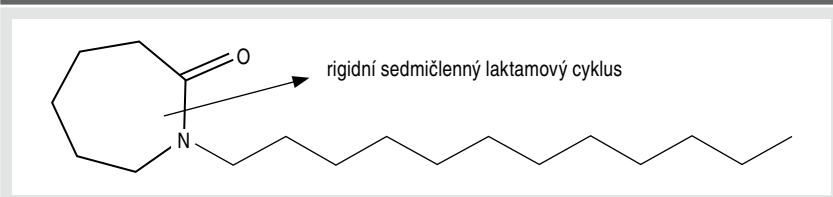
Tyto změny bylo možno teoreticky provést na několika místech molekuly, jak je patrné z obrázku 2:

Změny znamenaly:

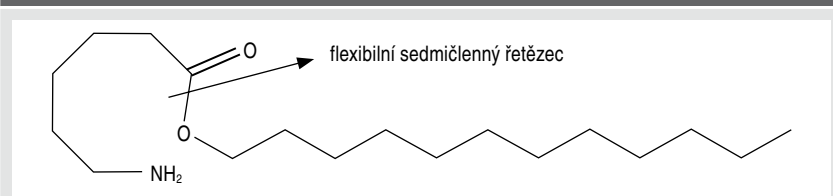
1. Změnit délku spojovacího řetězce mezi karboxylovou a aminovou skupinou ($n = 4, 5, 6$).
2. Změnit délku alifatického řetězce v alkoholické části esteru ($m = 4 - 14$).
3. Změnit tvar alifatického řetězce v alkoholické části esteru ($R^1 = -H$ nebo $C_1 - C_4$ alkyl).
4. Zjistit vliv substituce na aminoskupině (R^2 a $R^3 = -H, \text{methyl-}, \text{ethyl-}, \text{acyl-}$).
5. Zjistit vliv lokalizace aminoskupiny na alkylovém řetězci aminokyseliny ($R^4 = -H, \text{methyl-}$).

S cílem zodpovědět otázku, jak se na akceleračním účinku projeví změna délky řetězce

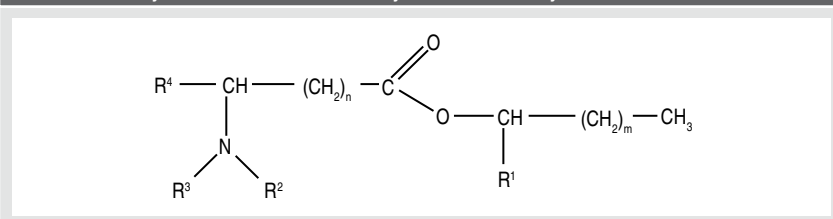
Obrázek 1a. Azone



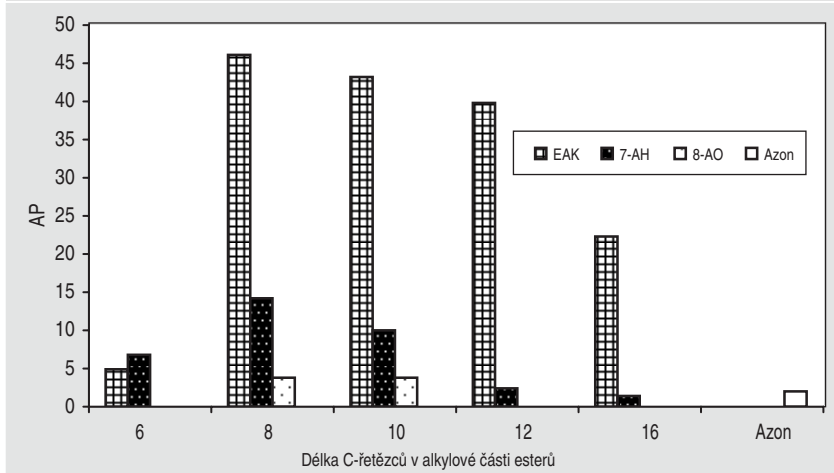
Obrázek 1b. Ester EAK



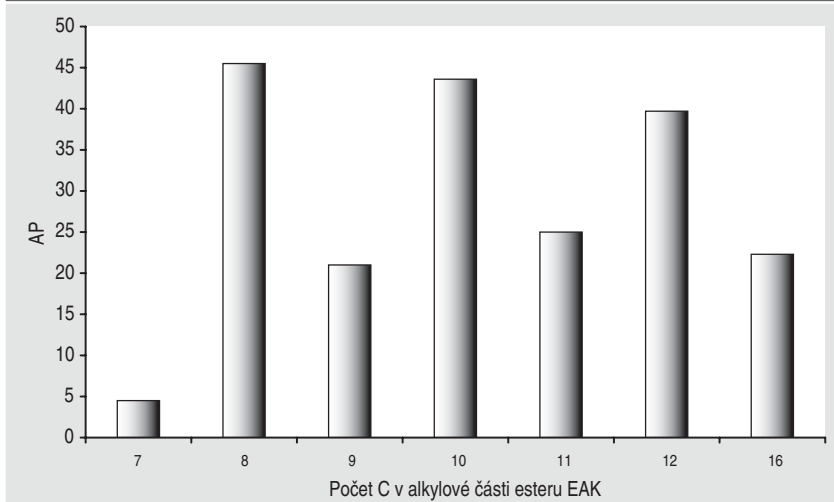
Obrázek 2. Zamýšlené strukturální obměny aktivní molekuly



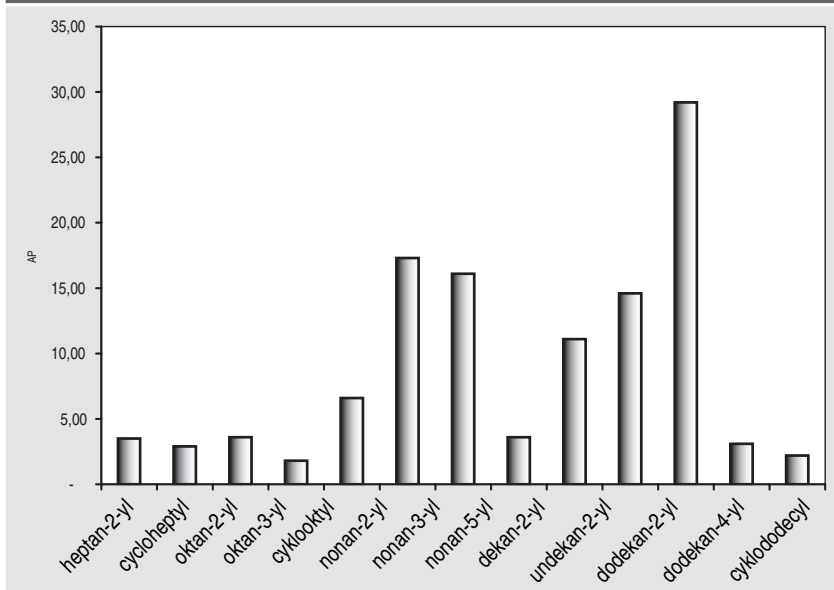
Obrázek 3. Akcelerační aktivita esterů ω -aminoalkanových kyselin EAK = 6-aminohexanová; 7-AH = 7-aminoheptanová; 8-AO = 8-aminooktanová



Obrázek 4. Akcelerační aktivita esterů ω -aminoalkanových kyselin EAK = 6-aminohexanová; 7-AH = 7-aminoheptanová; 8-AO = 8-aminooktanová



Obrázek 5. Akcelerační aktivita esterů EAK v závislosti na tvaru alkylového řetězce esterové části molekuly



ω -aminokyseliny, byly připraveny estery kyselin 7-aminoheptanové a 8-aminooktanové. Z výsledků bylo patrné, že tato změna struktury při zachování stejné délky alkylových řetězů v

alkoholické části esterů (tedy alkoholy C_8-C_{12}) nepřinesla zvýšení aktivity, ale naopak její prudký pokles (2). Estery 8-aminooktanové kyseliny postrádaly aktivitu téměř úplně.

Zároveň s touto etapou prací probíhalo prověření vlivu délky alkoholické části molekuly. Byly připraveny estery EAK s alkoholy C_7 až C_{16} (3). Výsledek byl velmi překvapivý, neboť kromě výrazně zvlnivé závislosti délky řetězce na aktivitě se projevil také významný vliv „sudého a lichého“ řetězce. Estery s lichým počtem uhlíků měly výrazně nižší aktivitu, než estery s počtem uhlíků sudým. Nejvyšší aktivitu vykázaly oktyl-, decyl- a dodecylestery EAK.

Další, podstatně náročnější fází syntéz byla příprava esterů s rozvětvenými alkoholy. Náročnější z toho důvodu, že celou řadu rozvětvených alkoholů bylo nutné syntetizovat. Výsledky testů ukázaly, že rozvětvení snižuje akcelerační aktivitu a toto snížení je prakticky úměrné stupni rozvětvení. Současně s rozvětvením byl sledován i vliv uspořádání a tvaru alkoholické části esterů s jednoznačným závěrem – cyklizace vede k úplnému vymizení akcelerační aktivity (4).

Předposlední variantou struktury, kterou bylo nutné prověřit, zůstávala substituce primární aminoskupiny, především vliv její bazicity. Proto byla připravena série acylovaných decyl- a dodecylesterů EAK – tedy neaktivnějších sloučenin ze všech, které byly do té doby připraveny. Výsledek byl opět jednoznačný – acylace (tedy ztráta bazicity) aminoskupiny vede k vymizení aktivity. Naopak její alkylace vedla k mimořádnému vzestupu aktivity. O. Farsa v rámci své dizertace připravil řadu sloučenin, ve kterých byl bazický dusík součástí cyklu a také tato změna vedla k relativně účinným urychlovačům (5). Aktivita byla ovšem vázána na jednotlivé sloučeniny a nepodařilo se připravit větší sérii takto substituovaných sloučenin s podobnou akcelerační účinností.

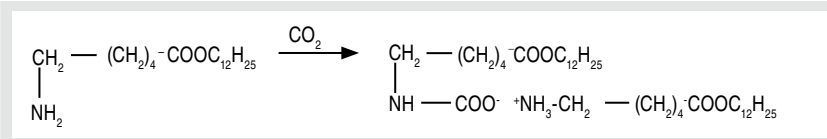
Poslední fází prověřování prvotních závislostí vztahů struktury a účinku provedl A.Kroutil ve své diplomové práci, ve které připravil sérii esterů 6-aminoheptanové kyseliny (viz. obrázek 2 – $n = 4$, $m = 6-10$, $R^1, R^2, R^3 = -H$, $R^4 = -CH_3$). Tyto sloučeniny téměř úplně postrádaly jakýkoliv náznak urychlení průniku modelového léčiva přes neporušenou lidskou kůži (6).

Prvotní vztahy mezi strukturou a účinkem v této skupině látek bylo možno na základě provedených syntéz zformulovat takto:

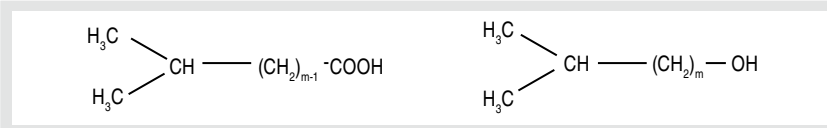
- 1) Vzdálenost aminoskupiny od karbonylu musí být tvořena pětiuhlíkatým řetězcem
- 2) Esterovou část musí tvořit alkyl se sudým počtem uhlíků o délce C_8 až C_{12} .



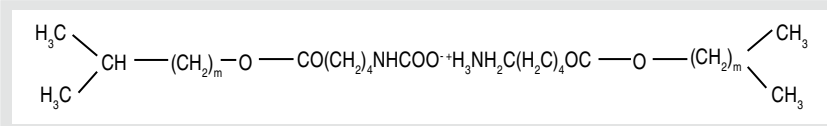
Obrázek 6. Reakce esterů EAK s oxidem uhličitým



Obrázek 8. Struktura terminálně rozvětvených alkoholů a karboxylových kyselin



Obrázek 9. Terminálně rozvětvené transkarbamy



3) Aminoskupina musí být bazická a terminální.

Přelomem ve výzkumu akceleračtů tohoto typu bylo zjištění, že aktivní sloučeniny neexistují ve formě aminoesterů, ale ve formě solí karbamových kyselin. Terminální aminoskupina představující primární amin je totiž značně bazická a v důsledku toho má enormní afinitu k oxidu uhličitému a podléhá, i vlivem oxidu uhličitého obsaženého v atmosféře, reakci uvedené na obrázku 6.

To, že látky fungují pouze ve formě solí karbamových kyselin bylo prověřeno celou řadou hodnocení s vyloučením přítomnosti CO₂.

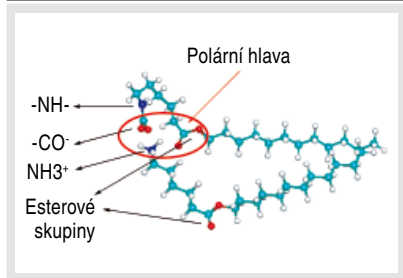
Počítačovým modelováním byl získán pravděpodobný tvar molekuly, která byla nazvána transkarbam 12 (obrázek 7). Podrobným studiem fyzikálních a spektrálních vlastností tohoto akceleračtů byla jeho značně neobvyklá struktura potvrzena a zároveň byla odhalena další místa v molekule, která je nutno strukturně obměnit, neboť velmi výhodné vlastnosti této nové pomocné látky ukazují, že se vyplatí transkarbamy dále a velmi podrobně studovat.

Jak vyplývá z práce, kterou jsme v tomto časopise uveřejnili v minulém roce (7), mechanismus účinku akceleračtů tohoto typu spočívá v jejich interakci s ceramidovými lamelami intercelulárních prostor SC. Transkarbam má podobné vlastnosti i rozměry jako některé z ceramidů, a proto existuje předpoklad, že jeho účinek spočívá právě v interakci s těmito kožními lipidy. S cílem potvrdit hypotézu o jeho účinku ve SC, byly syntetizovány alkoholy a kyseliny s terminálně rozvětveným alkylovým řetězcem, tak aby bylo možné předpokládat maximální interakci těchto sloučenin s ceramidy uvnitř lamel. Struktura těchto sloučenin je uvedena na obrázku 8.

Literatura

1. Doležal P, Hrabálek A, Semecký V. ε-Aminocaproic Acid Esters as Transdermal Penetration Enhancing Agents. *Pharm Res.* 10, 1015 (1993).
2. Hrabálek A, Doležal P, Roman M, Macháček M, Šklubalová Z. Esters of ω-Amino Acids as Flexible Penetration Enhancers. *Pharmazie* 49, 325 (1994).
3. Hrabálek A. Dizertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1992.
4. Hrabálek A, Vávrová K, Doležal P, Macháček M. Esters of 6-Aminohexanoic Acid as Skin Permeation Enhancers: The Effect of Branching in the Alkanol Moiety. *J Pharm Sci.* 2005, 94 (7), 1494–1499.
5. Farsa O. Dizertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2000.
6. Kroutil A. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1995.
7. Hrabálek A, Vávrová K. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. lékařství* 1, 8–11 (2005).
8. Klimentová J, Kosák P, Vávrová K, Holas T, Hrabálek A. Influence of Terminal Branching on the Transdermal Permeation Enhancing Activity in Fatty Alcohols and Acids. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 7681–7687.

Obrázek 7. Popis a tvar molekuly transkarbamu 12



Z nich pak byly připraveny sloučeniny analogické transkarbamům, tedy soli karbamových kyselin podle obrázku 9.

Všechny tři typy terminálně větvených sloučenin vykázaly významnou transdermálně akcelerační aktivitu, ale je možné říci, že nedosahovala úrovně aktivity transkarbamů (8).

Provedené studie vztahů struktury a biologické aktivity mohou sloužit jako typická ukázka myšlenkových a syntetických postupů farmaceutického chemika a přiblížit tak veřejnosti práci, která se skrývá za výzkumem nových biologicky aktivních struktur.

doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: hrabalek@faf.cuni.cz