

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej



Monika Agnieszka Leśniewska

**Analiza porównawcza lipofilowości oraz trwałości
aktywnej przeciwwirusowo pochodnej
9-okso-5*H*-imidazo-[1,2-*a*]puryny, jej estrów
oraz estrów acyklowiru**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: dr hab. Izabela Muszalska

Poznań 2016

Słowa kluczowe:

Analogi acyklowiru

Estry

HPLC

Hydroliza kwasowa

Lipofilowość

Modyfikacje strukturalne

Stabilność enzymatyczna

Praca została wykonana we współpracy z:

- Instytutem Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu – synteza, analiza elementarna, $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ związku XXVII i jego estrów
- Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – analiza HPLC-MS/MS roztworów badanych związków.

Część pracy została wykonana w ramach projektów *Badań młodych naukowców* finansowanych przez Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu:

- *Porównawcza ocena trwałości estrów - proleków acyklowiru* – nr 502-14-03305411-99674
- *Analiza podatności proleków – estrów acyklowiru – na rozkład enzymatyczny* – nr 502-14-03305411-41057.

Pozostałe badania wykonano dzięki środkom finansowym przyznanych na utrzymanie potencjału badawczego Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego.

Część wyników została opublikowana:

- M. A. Lesniewska, T. Ostrowski, J. Zeidler, I. Muszalska: *Ester Groups as Carriers of Antivirally Active Tricyclic Analogue of Acyclovir in Prodrugs Designing: Synthesis, Lipophilicity – Comparative Statistical Study of the Chromatographic and Theoretical Methods, Validation of the HPLC Method*, Comb. Chem. High Throughput Screen. 2014, 17, 639 – 650; IF = 1,222; MNiSW = 25
- M. A. Lesniewska, P. Dereziński, A. Klupczyńska, Z. J. Kokot, T. Ostrowski, J. Zeidler, I. Muszalska: *HPLC and HPLC/MS/MS Studies on Stress, Accelerated and Intermediate Degradation Tests of Antivirally Active Tricyclic Analog of Acyclovir*, J. AOAC Int. 2015, 98, 1240 – 1247; IF = 1,120; MNiSW = 20
- M. A. Lesniewska, Z. Gdaniec, I. Muszalska: *Calculation procedures and HPLC method for analysis of the lipophilicity of acyclovir esters*, Drug Dev. Ind. Pharm. 2015, 41, 663 – 669; ; IF = 2,101; MNiSW = 20
- M. A. Lesniewska, M. Gola, Z. Dutkiewicz, I. Muszalska: *Comparative Analysis of Acyclovir Esters Stability in Solutions: The Influence of the Substituent Structure, Kinetics, and Steric Effects*, Int. J. Chem. Kinet. 2015, 47, 724 – 733; IF = 1,517; MNiSW = 20.

Składam serdeczne podziękowania

Pani dr hab. Izabeli Muszalskiej za cierpliwość, zaangażowanie, przekazaną wiedzę i wszelkie wsparcie w trakcie przygotowywania pracy

Pani prof. dr hab. Annie Jelińskiej za umożliwienie wykonania pracy, cenne rady i życzliwość

Panu dr. hab. Tomaszowi Ostrowskiemu i Pani prof. dr. hab. Joannie Zeidler za udostępnienie substancji do badań

Panu dr. hab. Tomaszowi Goślińskiemu za cenne rady dotyczące syntezy estrów acyklowiru

Panu prof. dr. hab. Zenonowi Kokotowi za udostępnienie aparatu do badań HPLC-MS/MS

Panu dr. Jackowi Kujawskiemu za cenne uwagi dotyczące wykorzystania technik obliczeniowych

Koleżankom i kolegom z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej za miłą atmosferę oraz pomoc podczas wykonywania badań

Rodzicom, Bratu i Przyjaciołom za wiarę i wsparcie

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	4
Wykaz skrótów i symboli dotyczących analizy statystycznej.....	6
I. WSTĘP	7
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	12
1. Acyklowir	12
1.1. Budowa i właściwości fizykochemiczne [13, 14].....	13
1.2. Mechanizm działania i farmakokinetyka [15].....	13
1.3. Działania niepożądane.....	15
1.4. Zastosowanie acyklowiru w leczeniu.....	16
2. Modyfikacje części pseudocukrowej acyklowiru.....	18
2.1. Estry aminokwasowe.....	18
2.1.1. Walacyklowir	19
2.2. Estry dipeptydowe.....	20
2.3. Estry alifatyczne	23
2.4. Estry acyklowiru z glikolem polietylenowym	24
3. Modyfikacje części zasadowej acyklowiru	25
3.1. Pochodne trójcykliczne	27
3.2. Mechanizm działania przeciwwirusowego analogów trójcyklicznych.....	33
3.3. Aktywność cytotoksyczna.....	34
3.4. Lipofilowość pochodnych acyklowiru	35
4. Inne trójcykliczne analogi guanozyny.....	38
5. Proleki.....	44
5.1. Enzymy aktywujące proleki zawierające ugrupowanie estrowe.....	47
5.2. Nowe terapie oparte na prolekach.....	52
III. CEL PRACY	56
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA I WYNIKI	58
6. Substancje badane	58
7. Odczynniki	58
8. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	60
9. Charakterystyka związku XXVII i jego estrów.....	62
10. Synteza estrów acyklowiru.....	64

10.1. Ester acetylowy acyklowiru (Ac-I)	64
10.2. Ester izobutyrylowy acyklowiru (<i>i</i> But-I)	65
10.3. Ester piwaloilowy acyklowiru (Piv-I)	65
10.4. Ester etoksykarbonylowy acyklowiru (Etc-I)	66
10.5. Ester nikotynowy acyklowiru (Nic-I)	66
11. Wyznaczanie lipofilowości.....	67
11.1. Przygotowanie roztworów.....	67
11.2. Metodyka wyznaczania lipofilowości związku XXVII i jego estrów.....	68
11.3. Metodyka wyznaczania lipofilowości estrów acyklowiru	70
11.4. Wyznaczenie lipofilowości badanych związków z zastosowaniem technik obliczeniowych.....	72
12. Ocena trwałości badanych związków w środowisku kwasowym	73
12.1. Przygotowanie roztworów.....	73
12.2. Metoda HPLC oznaczania związku XXVII i jego estrów	75
12.3. Ocena trwałości XXVII i jego estrów w środowisku kwasowym	82
12.3.1. Wpływ glikolu propylenowego i dimetylosulfotlenku na hydrolizę kwasową.....	82
12.3.2. Badanie trwałości XXVII i jego estrów w kwasie solnym	84
12.3.3. Obserwowane stałe szybkości hydrolizy związku XXVII i jego estrów.....	85
12.3.4. Obserwowane stałe szybkości tworzenia i rozkładu związku XXVII jako produktu hydrolizy badanych estrów	89
12.4. Metoda HPLC oznaczania estrów acyklowiru	91
12.5. Badanie trwałości estrów acyklowiru w środowisku kwasowym.....	97
12.5.1. Obserwowane stałe szybkości hydrolizy estrów acyklowiru.....	98
12.5.2. Obserwowane stałe szybkości tworzenia acyklowiru w reakcji hydrolizy jego estrów	100
13. Test stresowy, przyspieszony i pośredni oceny trwałości związku XXVII	102
13.1. Parametry analizy zmian stężenia związku XXVII – trójcyklicznego analogu ACV.....	102
13.2. Test stresowy.....	103
13.2.1. Środowisko kwasowe, zasadowe i obojętne	103
13.2.2. Rozkład pod wpływem środka utleniającego.....	105
13.2.3. Wpływ temperatury.....	105

13.2.4.	Badanie fototrwałości związku XXVII w roztworze	106
13.2.5.	Badanie fototrwałości związku XXVII w fazie stałej	106
13.2.6.	Analiza HPLC-MS/MS	107
13.3.	Test przyspieszony i pośredni	109
14.	Ocena trwałości badanych estrów w osoczu ludzkim i w obecności esterazy z wątroby wieprzowej	109
14.1.	Przygotowanie roztworów	109
14.2.	Metoda HPLC oznaczania związku XXVII i jego estrów w osoczu	110
14.3.	Metoda HPLC oznaczania estrów acyklowiru w osoczu	119
14.4.	Trwałość substancji badanych w roztworach biologicznych	127
14.4.1.	Obserwowane stałe szybkości rozkładu	128
14.4.2.	Analiza HPLC-MS/MS roztworów XXVII i jego estrów poddanych hydrolizie w środowisku osocza i w obecności esterazy wieprzowej	135
V.	Omówienie i dyskusja wyników	139
15.	Synteza estrów i wyznaczenie ich lipofilowości	139
16.	Ocena trwałości badanych związków w środowisku kwasowym	149
17.	Test stresowy, przyspieszony i pośredni oceny trwałości związku XXVII	159
18.	Ocena trwałości estrów w osoczu ludzkim i w obecności esterazy z wątroby wieprzowej	163
19.	Podsumowanie	168
VI.	Wnioski	177
VII.	Streszczenie	179
	Summary	182
VIII.	Spis rycin i tabel	185
	Spis rycin	185
	Spis tabel	189
IX.	Piśmiennictwo	193

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

8-OH-ACV	8-hydroksyacyklowir
A-5021	enancjomer 1'S,2'R związku RA-5021
AChE	acetylocholinoesteraza (ang. <i>Acetylcholinesterase</i>)
ACN	acetonitryl
ACV	acyklowir
ADAPT	abzymowa terapia prolekowa kierowana przeciwciałem (ang. <i>Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy</i>)
ADEPT	enzymatyczna terapia prolekowa kierowana przeciwciałem (ang. <i>Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>)
AZG	3'-azydo-3'-deoksyguanozyna
β -CD	β -cyklodekstryna
BChE	butyrylocholinoesteraza (ang. <i>Butyrylcholinesterase</i>)
Caco-2	ludzkie komórki nabłonkowe gruczołakoraka odbytnicy
CBV	9-[4- α -(hydroksymetylo)cyclopent-2-en-1- α -ylo]guanina
c_{max}	stężenie maksymalne
CMMG	9-[(karboksymetoksy)metylo]guanina
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dThd	deoksytymidyna
DXG	(-)- β -D-(2R,4R)-1,3-dioksolanoguanozyna
EBV	wirus Epsteina-Barr (ang. <i>Epstein-Barr virus</i>), HHV-4
EC ₅₀	stężenie hamujące tempo namnażania komórek o 50% (ang. <i>Half Maximal Effective Concentration</i>)
FaSSIF	symulowany płyn jelitowy dla stanu na czczo (ang. <i>Fasted State Simulated Intestinal Fluid</i>)
G	szczep HHV-2
GCV	gancyklowir
GDEPT	enzymatyczna terapia prolekowa kierowana genem (ang. <i>Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>)
GMP	guanozynomonofosforan
HAV	wirus zapalenia wątroby typu A (ang. <i>Hepatitis A virus</i>)
HBV	wirus zapalenia wątroby typu B (ang. <i>Hepatitis B virus</i>)
HCMV	ludzki cytomegalowirus (ang. <i>Human cytomegalovirus</i>), HHV-5
HCV	wirus zapalenia wątroby typu C (ang. <i>Hepatitis C virus</i>)
HEL	(ang. <i>Human embryonic lung</i>)
HeLa	linia komórkowa raka szyjki macicy
HHV-1	wirus opryszczki wargowej (ang. <i>Human herpesvirus 1</i>)
HHV-1-F	szczep HHV-1

HHV-1-KOS	szczep HHV-1
HHV-1-McIntyre	szczep HHV-1
HHV-2	wirus opryszczki genitalnej (ang. <i>Human herpesvirus 2</i>)
HHV-2-G	szczep HHV-2
HHV-5-Davis	szczep HHV-5 (HCMV)
HHV-6	wirus rumienia nagłego (ang. <i>Human herpesvirus 6</i>)
HHV-8	wirus mięsaka Kaposiego (ang. <i>Human herpesvirus 8</i>)
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HP- β -CD	hydroksypropylo- β -cyklodekstryna
HP- γ -CD	hydroksypropylo- γ -cyklodekstryna
hPEPT1	ludzki jelitowy transporter białkowy 1 (ang. <i>Human Intestinal Peptide Transporter 1</i>)
HPT1	ludzki transporter peptydowy 1 (ang. <i>Human Peptide Transporter 1</i>)
HPV	wirus brodawczaka ludzkiego (ang. <i>Human papilloma virus</i>)
Huh-7	linia komórkowa ludzkiego raka wątroby (ang. <i>Human Hepatoma Cell Line</i>)
KB	linia komórkowa raka naskórkowego lub linia raka jamy nosowo-gardłowej
L 1210	komórki mysiej białaczki (ang. <i>mouse lymphocytic leukemia</i>) wywodzące się z płynu puchlinowego 8-miesięcznych samic myszy
LEAPT	aktywowana enzymatycznie terapia prolekowa kierowana lektyną (ang. <i>Lectin-Directed Enzyme-Activated Prodrug Therapy</i>)
M- β -CD	metylo- β -cyklodekstryna
MCC	minimalne stężenie cytotoksyczne (ang. <i>Minimal Cytotoxic Concentration</i>)
MCMV	mysi cytomegalowirus (ang. <i>Mouse cytomegalovirus</i>)
MIC	minimalne stężenie hamujące (ang. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
Me	grupa metylowa
MFO	oksydazy o funkcji mieszanej (ang. <i>Mixed Function Oxidases</i>)
MG	2'-C-metyloguanozyna
MO	orbitale cząsteczkowe (ang. <i>Molecular Orbital</i>)
MM	mechanika molekularna (ang. <i>Molecular Mechanics</i>)
NDP	nukleozydodifosforan
OST	kostniakomięsak (ang. <i>osteosarcoma</i>)
P	współczynnik podziału olej/woda
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEG	glikol polietylenowy
Ph	grupa fenyłowa
RA-5021	9- $\{$ [cis-1',2'-bis(hydroksymetylo)-cycloprop-1'-ylo]metylo $\}$ guanina
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>Ribonucleic Acid</i>)

RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>Reserved-Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
RSV	wirus syncytium nabłonka oddechowego (ang. <i>Respiratory syncytial virus</i>)
SAR	zależność struktura – aktywność (ang. <i>Structure – Activity Relationship</i>)
SCID	ciężkie złożone niedobory odporności (ang. <i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
TACV	trójcykliczny analog acyklowiru
TGCV	trójcykliczny analog gancyklowiru
TK ⁻	szczep z niedoborem kinazy tymidynowej
TK ⁺	szczep z normalną ekspresją kinazy tymidynowej
TRA-5021	trójcykliczny analog RA-5021
tt.	temperatura topnienia
VDEPT	enzymatyczna terapia prolekowa kierowana wirusem (ang. <i>Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>)
Vero	linia komórkowa tkanki nabłonkowej nerki afrykańskiego koczkodana zielonego
VSV	wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (ang. <i>Vesicular stomatitis virus</i>)
VZV	wirus ospy wietrznej i półpaśca (ang. <i>Varicella zoster virus</i>), HHV-3
VZV-OKA	szczep VZV
VZV-YS	szczep VZV TK ⁺
VZV-YSR	szczep VZV TK ⁻
VV	wirus krowianki (ang. <i>Vaccinia virus</i>)

Wykaz skrótów i symboli dotyczących analizy statystycznej

a	współczynnik nachylenia linii regresji do osi X
b	punkt przecięcia dopasowanej linii regresji z osią Y
n	liczba elementów w próbie
NS	nieistotne statystycznie
r	współczynnik korelacji liniowej Pearsona
S	odchylenie standardowe próby
t	test istotności t-Studenta
$t_{\alpha} (f = n-2)$	wartość krytyczna dla testu t-Studenta z $n-2$ stopniami swobody przy założonym poziomie istotności α
W_z	współczynnik zmienności
W_{zr}	współczynnik zmienności powtarzalności
\bar{x}	średnia arytmetyczna próby

I. WSTĘP

Wirus (łac. *virus* – jad, trucizna) to zgodnie z definicją André M. Lwoffa „zakaźny, potencjalnie patogenny nukleoproteid, istniejący tylko pod postacią jednego kwasu nukleinowego, który reprodukuje materiał genetyczny. Jest niezdolny do podziałów poza komórką i zazwyczaj nie posiada enzymów (a zatem nie wykazuje metabolizmu)” [1].

Chociaż istnienie wirusów stwierdzono dopiero w drugiej połowie XIX wieku, choroby wirusowe znane były ludzkości znacznie wcześniej. Najstarszy dokument opisujący człowieka z objawami *poliomyelitis* pochodzi z około 1400 r. p.n.e., a odnaleziony został w Memfis w Egipcie [2]. Za odkrywcę wirusów uznaje się Dymitra Iwanowskiego, który w 1892 roku zaobserwował, że mozaikę tytoniową wywołują zarazki mające zdolność przechodzenia przez pory filtrów bakteryjnych. Niezależnie to samo zauważyli w 1898 r. Martinus Beijerinck, a później także Fryderyk Loeffler i Paul Frosch podczas badań nad pryszczycą. Idea „przesączalnych zarazków” budziła jednak spore wątpliwości. W 1909 r. Karl Landsteiner i Edward Poper udowodnili, na przykładzie *poliomyelitis*, że ten typ zarazków wywołuje choroby także u ludzi [2].

Rozwój wirusologii nastąpił dzięki wprowadzeniu przez Francisa Parkera i Roberta N. Neya metody hodowli komórkowych i namnażania w nich wirusów. Umożliwiło to otrzymanie i dokonanie charakteryzacji linii komórkowych wielu wirusów [2]. Natomiast określenie struktury tych zarazków zapoczątkował w 1935 r. Stanley, który oczyścił i uzyskał krystaliczną postać wirusa mozaiki tytoniowej. Okazał się on mieć strukturę białkową. Frederic Bawden oraz Norman Pirie w 1937 r. odkryli, że wirusy zawierają również małe fragmenty RNA (kwas rybonukleinowy, ang. *Ribonucleic Acid*). Dalsze badania udowodniły, że wirusy są nukleoproteinami, w których frakcję kwasów nukleinowych stanowić może także DNA (kwas deoksyrybonukleinowy, ang. *Deoxyribonucleic acid*) [3]. Ogromną rolę w badaniach wirusologicznych odegrało również skonstruowanie w 1939 r. mikroskopu elektronowego. Dzięki niemu możliwe stało się bezpośrednio oglądanie cząstek wirusowych. Skonstruowane później, elektronowy mikroskop skaningowy i elektronowy mikroskop transmisyjny, umożliwiły analizowanie trójwymiarowych obrazów cząstek wirusów oraz obliczanie liczby cząstek w badanym materiale [2].

Jednocześnie na początku XX wieku pojawiła się koncepcja, że wirusy mogą powodować raka. Przedstawił ją w 1911 r. Peyton Rous opisując wirusy wywołujące

mięśaka u kur. Podobne wnioski dotyczące występowania białaczek zaprezentowali w 1908 r. Vilhelm Ellerman i Olaf Bang. Wkrótce odkryto również istnienie bakteriofagów – wirusów infekujących bakterie. Dokonali tego Frederick Twort w 1915 r. oraz niezależnie Felix d'Herelle w 1917 roku [3]. Koncepcja o wpływie wirusów na rozwój chorób nowotworowych wywołała sprzeciw środowiska biologów i lekarzy. Dopiero w latach 50. XX wieku, Ludwik Gross niepodważalnie udowodnił związek wirusów z chorobami nowotworowymi [2].

Istnieje kilka kryteriów podziału wirusów. Najczęściej spotykany jest podział ze względu na rodzaj kwasu nukleinowego stanowiącego materiał genetyczny, jego jedno- lub dwuniciowość oraz obecność lub brak osłonki lipoproteinowej [2]. W związku z tym wyróżniamy:

- wirusy DNA – zawierające w wirionie kwas deoksyrybonukleinowy
 - jednociowy (ssDNA) – m.in. parwowirusy, inowirusy
 - dwunociowy (dsDNA) – m.in. herpeswirusy, adenowirusy, papillomawirusy, pokswirusy
- retrowirusy, pseudowirusy – wirusy używające odwrotnej transkryptazy
- wirusy RNA – zawierające w wirionie kwas rybonukleinowy
 - jednociowy
 - o polarności dodatniej (ssRNA(+)) – m.in. pikornawirusy, kalciwirusy, koronawirusy, flawiwirusy
 - o polarności ujemnej (ssRNA(-)) – m.in. ortomyksowirusy, paramyksowirusy, rabdowirusy, bornawirusy
 - dwunociowy (dsRNA) – reowirusy, birnawirusy [2].

Wyróżniamy wirusy roślinne i zwierzęce. Możliwy jest także podział ze względu na symetrię wirionu (kubiczna, helikalna lub złożona). Często spotyka się również podział uwarunkowany wielkością:

- wirusy duże (150 – 300 nm) – należą tu pokswirusy
- wirusy średnie (50 – 150 nm) – m.in. herpeswirusy, adenowirusy, togawirusy i myksowirusy
- wirusy małe (20 – 50 nm) – pikornawirusy i parwowirusy [4].

Wirusy to czynniki wywołujące choroby nie tylko u roślin i zwierząt, ale także u ludzi. Najbardziej znane z uwagi na powszechność wywoływanych infekcji lub związane z nimi zagrożenia dla życia są wirusy grypy, opryszczki, ospy wietrznej, odry, HAV (ang. *Hepatitis A virus*, wirus zapalenia wątroby typu A), HBV (ang. *Hepatitis B virus*, wirus

zapalenia wątroby typu B), HCV (ang. *Hepatitis C virus*, wirus zapalenia wątroby typu C), HPV (ang. *Human papilloma virus*, wirus brodawczaka ludzkiego), HIV (ang. *Human immunodeficiency virus*, ludzki wirus niedoboru odporności) oraz Ebola.

Odkrycie wirusów jako czynników chorobotwórczych zapoczątkowało intensywne poszukiwania sposobów zwalczania tych mikroorganizmów. Powstały i rozwinęły się dwie metody walki z chorobami wirusowymi. Jedną z nich jest zapobieganie infekcjom przez stosowanie szczepionek lub leków zwiększających odporność organizmu. Druga natomiast polega na podawaniu osobie już zainfekowanej leków przeciwwirusowych, blokujących replikację wirusa w ustroju. Historia zapobiegania chorobom jest znacznie dłuższa, ponieważ w Chinach już około 1000 r. p.n.e. rozpoczęły się pierwsze próby szczepień przeciwko ospie na zasadzie wariolizacji. Pierwszą typową szczepionkę przeciwko ospie krowiej wprowadził jednak dopiero w 1796 r. Edward Jenner. Kolejna, przeciwko wścieklicznie, została stworzona w XIX wieku przez Ludwika Pasteura. Rozwój tej dziedziny nastąpił jednak w XX wieku, kiedy powstały szczepionki m.in. przeciwko żółtej gorączce, *poliomyelitis*, ospie, czy HBV [2].

Leki o działaniu przeciwwirusowym pojawiły się znacznie później. Pierwszym była 5-jodo-2'-deoksyurydyna, otrzymana w 1959 r., a stosowana w postaci kropli i maści do miejscowego leczenia opryszczkowego zapalenia rogówki [5]. Przez kolejne kilkadziesiąt lat otrzymano wiele substancji o różnych strukturach wykazujących aktywność przeciwwirusową. Niektóre z nich okazały się na tyle użyteczne, a jednocześnie bezpieczne, że znalazły szerokie zastosowanie w lecznictwie.

Leki przeciwwirusowe dzielimy w zależności od mechanizmu działania na następujące grupy:

- leki hamujące wnikanie wirusów do komórek – należą do nich np. enfuwirtyd blokujący wnikanie wirusa HIV, dokonazol hamujący wnikanie wirusa opryszczki, pawilizumab hamujący wnikanie syncytialnych wirusów oddechowych,
- leki hamujące uwalnianie genomu wirusowego – to pochodne adamantanu (amantadyna i rimantadyna działające na wirusy grypy A oraz tromantadyna stosowana w zakażeniach opryszczkowych),
- leki hamujące replikację wirusów wewnątrz komórek gospodarza – najliczniejsza grupa, w obrębie której wyróżniamy
 - leki antysensowne – fomiwirsen hamujący replikację cytomegalowirusa
 - inhibitory enzymów wirusa
 - hamujące aktywność wirusowej polimerazy DNA

- ◆ ribawiryna aktywna wobec wirusów grypy, syncytialnych wirusów oddechowych, opryszczki, odry, WZW typu A, B i C
- ◆ foskarnet działający na wirusy grypy, opryszczki oraz HBV
- ◆ antymetabolity
 - analogi 2'-deoksyguanozyny – acyklowir i walacyklowir działające na wirusy opryszczki, gancyklowir stosowany w zwalczaniu cytomegalii, famcyklowir oraz pencyklowir
 - analogi adenozyiny – widarabina stosowana w infekcjach opryszczkowych
 - analogi tymidyny – idoksurydyna i triflurydyna aktywne wobec wirusów opryszczki oraz ospy i półpaśca
 - analogi 2'-deoksycytydyny – cytarabina działające na wirusy opryszczki oraz cidofowir aktywny wobec wirusów HHV (ang. *Human herpesvirus*, wirus opryszczki), VZV (ang. *Varicella zoster virus*, wirus ospy wietrznej i półpaśca), HCMV (ang. *Human cytomegalovirus*, ludzki cytomegalowirus) i EBV (ang. *Epstein-Barr virus*, wirus Epsteina-Barr)
- hamujące aktywność odwrotnej transkryptazy – stosowane w leczeniu zakażeń HIV
 - ◆ nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy
 - analogi tymidyny – zidowudyna, stawudyna
 - analogi cytozyny – zalcitabina, lamiwudyna
 - analogi puryn – didanozyna, abakawir
 - ◆ nukleotydropodobne inhibitory odwrotnej transkryptazy – tenofowir, adefowir
 - ◆ nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy – efawirenz, newirapina, delawirdyna
- hamujące aktywność proteazy – stosowane w terapii HIV: amprenawir, atazanawir, fosamprenawir, indinawir, lopinawir, nelfinawir, ritonawir oraz sakwinawir
- interferony – w leczeniu infekcji wirusowych, głównie HBV i HCV, stosuje się Interferon α -2 α i Interferon α -2b

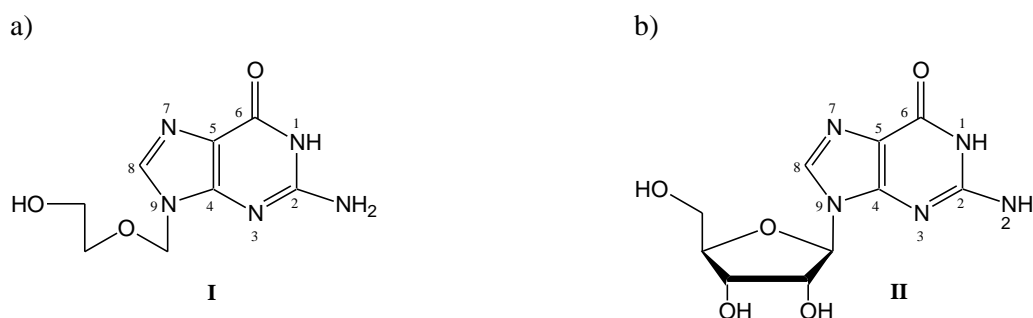
- leki hamujące uwalnianie wirusów z zakażonych komórek – inhibitory neuraminidazy: zanamiwir i oseltamiwir, stosowane w leczeniu zakażeń wirusami grypy A i B
- leki o innych mechanizmach działania – do których należą
 - denotiwir – stosowany miejscowo w opryszczce, ospie wietrznej i półpaścu
 - imikwimod – stosowany miejscowo w leczeniu kłykcin wewnętrznych
 - izoprynozyna – stosowana jako immunomodulator w zakażeniach wirusami HHV-1 (ang. *Human herpesvirus 1*, wirus opryszczki wargowej) i HHV-2 (ang. *Human herpesvirus 2*, wirus opryszczki genitalnej)
 - eperwudyna – stosowana miejscowo w leczeniu infekcji herpeswirusowych [6 – 8].

Mimo opracowania wielu leków przeciwwirusowych, terapia zakażeń wywołanych przez te patogeny nadal stanowi wyzwanie. Obecnie stosowane leki przeciwwirusowe często wykazują ograniczoną biodostępność, a z ich stosowaniem wiążą się liczne działania niepożądane. Bywają one na tyle poważne, że niektóre leki (np. idoksurydyna) mogą być stosowane wyłącznie miejscowo. Ponadto obserwuje się rozwój oporności na najpowszechniej stosowane preparaty przeciwwirusowe. Powyższe niedogodności lub ograniczenia sprawiają, że poszukiwanie nowych substancji o aktywności przeciwwirusowej lub modyfikacja znanych struktur w celu otrzymania analogów o korzystniejszych właściwościach jest ciągle istotnym zagadnieniem współczesnej farmacji.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Acyklowir

Analogi nukleozydowe stanowią istotną grupę leków przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych, przeciw pasożytniczych i stymulujących funkcje układu immunologicznego. Ich najważniejszym przedstawicielem jest acyklowir (ACV, I) – pierwszy selektywny lek przeciwwirusowy z grupy analogów guanozyny (Ryc. 1). ACV jest pochodną deoksyguanozyny, posiadającą w części cukrowej niecykliczny łańcuch boczny zamiast cyklicznej deoksyrybozy.



Ryc. 1. Wzór strukturalny: a) acyklowiru; b) guanozyny (II).

ACV, początkowo nazywany acykloguanozyną, został zsyntetyzowany przez zespół Gertrude B. Elion w ramach programu *Burroughs Wellcome* mającego na celu otrzymanie analogów guanozyny odpornych na rozkład pod wpływem fosforylasy [9, 10]. Badania te rozpoczęto wkrótce po odkryciu w 1964 r. przeciwwirusowego działania widarabiny, która stała się pierwszym analogiem nukleozydowym wykazującym istotne działanie kliniczne i jednocześnie wystarczająco mało toksycznym, by móc być stosowanym układowo. Niestety przy udziale deaminazy adenozykowej widarabina wyjątkowo szybko ulega w organizmie deaminacji, do nieaktywnego arabinozydu hipoksantyny. W związku z tym rozpoczęto poszukiwanie związków o charakterze inhibitorów deaminazy adenozykowej [11]. Jednym z otrzymanych wtedy związków był acyklowir, który okazał się posiadać własną aktywność przeciwwirusową, co jako pierwsi udowodnili Peter Collins i John Bauer w 1974 roku [12].

1.1. Budowa i właściwości fizykochemiczne [13, 14]

Acyklowir występuje w postaci białego lub prawie białego krystalicznego proszku. Substancja jest trudno rozpuszczalna w wodzie (1,3 mg/ml w 25°C) i bardzo trudno rozpuszczalna w etanolu (0,2 mg/ml). Jest natomiast rozpuszczalna w rozcieńczonych roztworach kwasów nieorganicznych i wodorotlenków litowców, łatwo rozpuszczalna w dimetylosulfotlenku. Nazewnictwo oraz wybrane właściwości fizykochemiczne acyklowiru przedstawiono w tabeli 1.

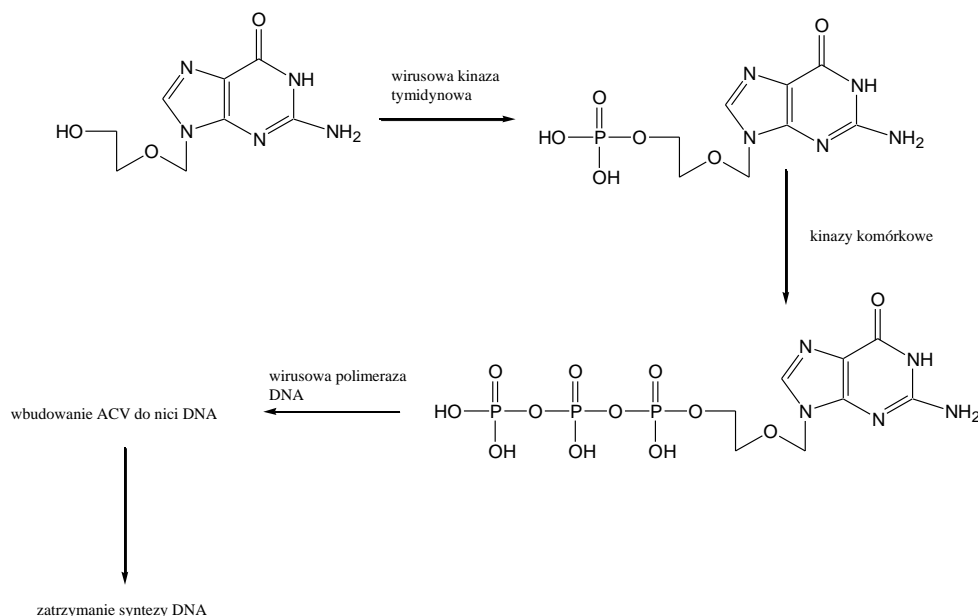
Tabela 1. Charakterystyka acyklowiru

Nazwa chemiczna wg IUPAC	2-amino-9-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-1,9-dihydro-6 <i>H</i> -puryn-6-on
Stosowane nazwy	ACV, aciclovirum, aciclovir, acyclovir, acykloguanozyna, 9-[(2-hydroksyetoksy)metylo]guanina, BW-248U
Numer CAS	59277-89-3
Wzór sumaryczny	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃
Masa cząsteczkowa	225,21
Stałe dysocjacji	pKa ₁ = 2,27 pKa ₂ = 9,25
Temperatura topnienia (tt.)	256,5 – 257,0°C z rozkładem

1.2. Mechanizm działania i farmakokinetyka [15]

Acyklowir, tak jak pozostałe analogi nukleozydowe, hamuje replikację wirusów (Ryc. 2). Jest on wprowadzany do komórki przy udziale białka transportującego nukleozydy [16, 17], a następnie ulega przekształceniu w pochodną monofosforanową za pomocą wirusowej kinazy tymidynowej, występującej tylko w komórkach zainfekowanych. ACV nie stanowi substratu dla kinaz komórkowych, co wyjaśnia selektywność jego działania [18]. W kolejnym etapie, kinazy komórkowe przekształcają monofosforan acyklowiru w difosforan, a następnie w trifosforan, który jest formą aktywną leku. Stanowi on substrat dla wirusowej polimerazy DNA, enzymu uczestniczącego w wydłużaniu łańcucha DNA. Trifosforan ACV współzawodniczy z trifosforanem deoksyguanozyny i zastępuje go w syntetyzowanej nici kwasu nukleinowego [19]. Wbudowanie cząsteczki trifosforanu acyklowiru do łańcucha DNA przy końcu 3' powoduje nieodwracalne zatrzymanie dalszej replikacji, na skutek powstałego braku fragmentu w deoksyguanozynie, do którego mógłby zostać przyłączony następny trifosforan nukleozydu. Ponadto ACV hamuje bezpośrednio aktywność polimerazy DNA [20]. Warto zauważyć, że stopień hamowania przez ACV aktywności polimerazy DNA

jest około 20-krotnie większy dla enzymu wirusowego w porównaniu z ludzkim, co tłumaczy bezpieczeństwo jego stosowania [21]. Acyklowir hamuje replikację wirusów, nie działa jednak wirusobójczo, w związku z czym dla skuteczności terapii niezbędna jest również aktywność układu immunologicznego zainfekowanego organizmu [7].



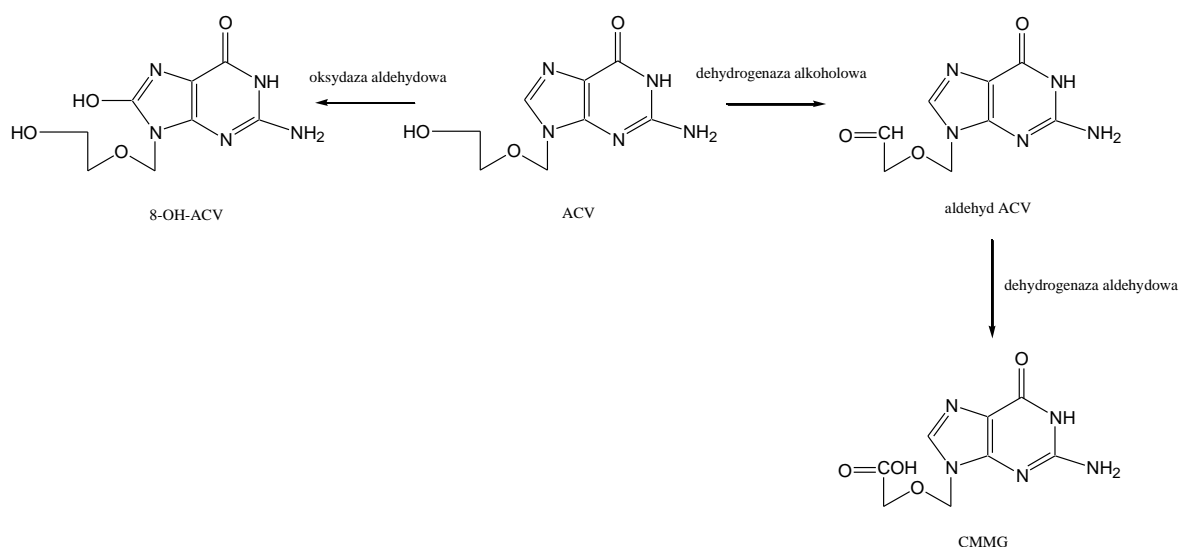
Ryc. 2. Mechanizm działania acyklowiru (wg [15]).

Biodostępność acyklowiru po podaniu doustnym wynosi 15 – 30%. Nie jest to wartość wysoka, jednak przy zastosowaniu wystarczająco dużych dawek, pozwala na uzyskanie we krwi stężeń terapeutycznych leku [22]. Stopień wiązania ACV z białkami osocza wynosi 9 – 33%, a objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym jest zbliżona do 2/3 masy ciała [23]. Acyklowir stosowany układowo dobrze przenika do tkanek i płynów ustrojowych: mózgu, nerek, płuc, wątroby, śledziony, mięśni, śliny, płynu mózgowo-rdzeniowego, żółci, nasienia, błony śluzowej i wydzieliny pochwy. Przenika także przez łożysko na wszystkich etapach ciąży oraz jest wydzielany do mleka. Natomiast jego podanie miejscowe skutkuje uzyskaniem wykrywalnych stężeń w miejscach zmienionych chorobowo, przy niewielkim stopniu absorpcji systemowej. Jednocześnie penetracja warstwy rogowej jest niewielka [24, 25].

Stężenie maksymalne w osoczu, ACV osiąga po około 1,4 h. Charakteryzuje się też krótkim okresem półtrwania wynoszącym 2 – 3 h. Tak szybka eliminacja z ustroju powoduje problemy z utrzymaniem wystarczającego stężenia leku w ustroju. Dla skuteczności terapii konieczne jest podawanie ACV nawet 5 – 6 razy w ciągu doby [22,

26]. Niedogodności związane z tak częstym stosowaniem przekładają się na gorszą współpracę pacjenta i często obniżają skuteczność leczenia.

Eliminacja acyklowiru następuje głównie w postaci niezmienionej przez nerki na drodze przesączania kłębuszkowego i wydzielenia kanalikowego [22]. W związku z tym czynność nerek pacjenta znacząco wpływa na szybkość usuwania leku z ustroju. Tylko około 10 – 15% podanej dawki leku ulega metabolizmowi w wątrobie (Ryc. 3). Reakcje utleniania ACV przez dehydrogenazę alkoholową, a następnie dehydrogenazę aldehydową prowadzą do powstania 9-[(karboksymetoksy)metylo]guaniny (CMMG; < 15% zastosowanej dawki). Natomiast oksydaza aldehydowa warunkuje utworzenie 8-hydroksyacyklowiru (8-OH-ACV; ok. 1%) [27, 28]. W przypadku występowania zaburzeń czynności nerek, ilość leku ulegająca metabolizmowi wątrobowemu może być nawet dwukrotnie większa. Ponadto warto zauważyć, że w osoczu stężenie 8-OH-ACV jest zdecydowanie mniejsze niż CMMG, natomiast ich zawartość w płynie mózgowo-rdzeniowym jest zbliżona [29]. Mniej niż 2% pojedynczej dawki acyklowiru jest wydalone w postaci niezmienionej z kałem, a tylko śladowe ilości z wydychanym powietrzem [25].



Ryc. 3. Metabolizm acyklowiru w wątrobie (wg [28]).

1.3. Działania niepożądane

Ze względu na swoją budowę i mechanizm działania, acyklowir jest lekiem nietoksycznym i stosunkowo bezpiecznym. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi związanymi z jego stosowaniem są reakcje miejscowe w miejscu podania dożylnego, takie jak podrażnienie wynikające z zasadowego odczynu roztworu leku, czy zapalenie żył [30]. Ponadto możliwe są bóle i zawroty głowy, uczucie zmęczenia, nudności, wymioty,

wysypka, obrzęki, a w przypadku stosowania doustnego również biegunki u pacjentów nietolerujących laktozy, czy nieprzyjemny posmak w ustach [31].

Istotniejszym działaniem niepożądanym ACV są zaburzenia pracy nerek. Mają one często postać ostrej niewydolności nerek i charakteryzują się gwałtownym wzrostem poziomu kreatyniny w osoczu w czasie 12 – 48 godzin po przyjęciu leku [32]. Zazwyczaj są spowodowane podaniem dużej dawki, przy jednoczesnym zbyt małym nawodnieniu pacjenta. Można więc im zapobiec dbając o odpowiednią podaż płynów oraz stosując powolne wlewy leku [7]. Zaburzenia te wynikają prawdopodobnie z krystalizacji acyklowiru w cewkach nerkowych mając zwykle charakter przejściowy (ustępują po kilku dniach) [33]. Sporadycznie rozwija się przewlekła niewydolność nerek [34]. Niektóre badania dowodzą jednak, że zaburzenia pracy nerek po stosowaniu acyklowiru spowodowane są jego metabolitem powstającym w wyniku utlenienia ACV przez dehydrogenazę alkoholową [35].

Wykazano ponadto korelację między stężeniem głównego metabolitu acyklowiru – CMMG – w surowicy, a występowaniem neuropsychiatrycznych objawów związanych ze stosowaniem ACV. Zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego, znacznie częściej występują u pacjentów z nieprawidłową czynnością nerek, kiedy to istotnie zwiększa się stopień metabolizmu ACV do CMMG [36, 37]. Najczęstsze objawy to pobudzenie, splątanie, niepokój, ataksja, senność, zawroty głowy, śpiączka, zaburzenia mowy, mioklonie, halucynacje wzrokowe i słuchowe [37]. Objawy te ustępują po zastosowaniu hemodializy i obniżeniu poziomu CMMG.

1.4. Zastosowanie acyklowiru w leczeniu

Acyklowir wykazuje aktywność przeciwwirusową głównie w odniesieniu do wirusów opryszczki wargowej HHV-1, opryszczki genitalnej HHV-2 oraz wirusa ospy wietrznej i półpaśca VZV. Skuteczność zwalczania pozostałych wirusów z rodziny *Herpesviridae*, takich jak wirus Epsteina-Barr oraz cytomegalowirus, jest znacznie mniejsza [15].

Aktywność w odniesieniu do powyższych rodzajów wirusów warunkuje zastosowanie leku. Cechą charakterystyczną związaną z użyciem acyklowiru, niezależnie od schorzenia, jest konieczność wielokrotnego podawania leku w ciągu doby. W leczeniu opryszczki wargowej acyklowir stosowany jest doustnie w dawce 200 mg 5 razy na dobę przez 5 – 10 dni lub miejscowo na skórę (w postaci 5% maści) co 3 godziny przez 7 dni [15]. U dzieci

w wieku od 3 miesięcy do 12 lat często stosowane bywa podanie dawki 250 mg/m^2 co 8 godzin, natomiast u noworodków z taką samą częstotliwością podaje się 10 mg/kg [38].

Kuracja opryszczki narządów płciowych może być prowadzona dla infekcji pierwotnej w postaci doustnej (200 mg 5 razy na dobę lub 400 mg 3 razy na dobę przez 5 – 10 dni) lub dożylniej (5 mg/kg co 8 godzin przez przynajmniej tydzień) – w zależności od stanu pacjenta [15]. Natomiast w sytuacji kolejnych nawrotów acyklowir podaje się wyłącznie drogą doustną przez okres 5 dni przy zastosowaniu identycznego schematu dawkowania. W celu zapobiegania nawrotom opryszczki genitalnej kurację prowadzi się przez 6 – 12 miesięcy podając 400 mg acyklowiru 2 razy dziennie [15]. Istnieją także doniesienia o skuteczności stosowania acyklowiru w formie pierścieni dopochwowych, w leczeniu i zapobieganiu zakażeniom dróg rodnych wirusem HHV-2. Taka postać leku umożliwia osiągnięcie efektywnego stężenia substancji czynnej w miejscu działania, unikając jednocześnie działania systemowego [39]. Ponadto zastosowanie pierścieni dopochwowych z acyklowirem wydaje się nie wpływać na skład mikroflory bakteryjnej pacjentek [40].

Leczenie ciężkich zakażeń mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii α -herpeswirusowej, np. opryszczkowego zapalenia mózgu, polega na podawaniu 15 mg/kg acyklowiru co 8 godzin przez 14 dni w przypadku osób dorosłych [15]. W tej samej sytuacji u dzieci w wieku od 3 miesięcy do 12 lat najczęściej stosuje się dawkowanie 500 mg/m^2 co 8 godzin [38].

Ponadto acyklowir stosowany jest u pacjentów z immunosupresją w celu profilaktyki zakażeń. Dorośli i dzieci z chorobami nowotworowymi, którzy doświadczają długotrwałej mielosupresji, z uwagi na stosowanie cytostatyków lub przygotowanie do przeszczepu szpiku, są szczególnie narażeni na inwazyjne infekcje wirusowe. Podobnie osoby po transplantacji narządów, u których acyklowir stosuje się jako profilaktykę zakażenia cytomegalowirusem [41]. W powyższych sytuacjach lek podaje się doustnie w dawce 200 – 400 mg 4 razy dziennie [15].

Lek ten może być również stosowany w zakażeniach narządu wzroku, spowodowanych wirusem opryszczki. Najczęściej w zapaleniu rogówki wywołanym wirusem HHV-1, stosuje się ACV w postaci 3% maści, podawanej 5 razy dziennie aż do 3 dni po wygojeniu zmian na rogówce [14].

Ze względu na aktywność w odniesieniu do wirusa VZV, acyklowir stosowany jest u dorosłych i dzieci w leczeniu ospy wietrznej oraz półpaśca. W przypadku dzieci, dawki ACV stosowane w zakażeniach *Varicella zoster virus* są zazwyczaj dwukrotnie większe

niż w zakażeniach wirusem opryszczki – to jest zbliżone do dawek stosowanych w opryszczkowym zapaleniu mózgu [38].

Podjęcie udziału wirusa HHV-6 (ang. *Human herpesvirus 6*, wirus rumienia nagłego) w patogenezie powstawania łupieżu różowego skłoniło badaczy do sprawdzenia wpływu podawania acyklowiru na przebieg choroby. Stwierdzono, że zastosowanie dużych dawek ACV (u dorosłych 800 mg 5 razy dziennie, u dzieci 20 mg/kg 4 razy dziennie, przez 7 dni) istotnie przyspiesza zmniejszanie się zmian skórnych i skraca czas choroby [42].

Podczas terapii acyklowirem należy pamiętać o konieczności redukcji dawek w przypadku chorych z niewydolnością nerek [14].

2. Modyfikacje części pseudocukrowej acyklowiru

Ze względu na przedstawione wcześniej ograniczenia terapii przeciwwirusowej przy użyciu acyklowiru, nieustannie trwają badania nad nowymi, skutecznymi substancjami leczniczymi. Popularnym kierunkiem badań są proste modyfikacje łańcucha pseudocukrowego ACV prowadzące do otrzymania proleków. Na przestrzeni szeregu lat zsyntetyzowano wiele pochodnych acyklowiru. Początkowo badania koncentrowały się na prostych estrach ACV z aminokwasami. Z upływem czasu podejmowano również próby syntezy estrów dipeptydowych, alifatycznych, tiazolowych, z kwasami tłuszczowymi oraz estrów z glikolem polietylenowym. Nadzieje pokładane w estrach acyklowiru dotyczą głównie poprawy rozpuszczalności w wodzie, zwiększenia biodostępności i możliwości zmniejszenia częstotliwości podawania leku. Ze względu jednak na nietrwałość wiązania estrowego konieczna jest ocena odporności poszczególnych związków na hydrolizę, tak by uwalnianie substancji aktywnej zachodziło we właściwym miejscu organizmu oraz z odpowiednią prędkością.

2.1. Estry aminokwasowe

Estry aminokwasowe stanowiły jeden z pierwszych kierunków badań nad pochodnymi acyklowiru. Ze względu na brak wolnej grupy hydroksylowej estry nie mogą być fosforylowane. Spodziewano się więc, że nie będą wykazywać aktywności przeciwwirusowej przed hydrolizą do acyklowiru. Jedne z pierwszych otrzymanych estrów

to połączenia z prostymi aminokwasami, takimi jak glicyna czy alanina. Pomimo dobrej rozpuszczalności w wodzie i szybkiej hydrolizy do leku wyjściowego, okazały się one zbyt nietrwałe w fizjologicznym pH, by mogły stać się skutecznymi lekami. W roztworach o pH 7,4, około 50% substancji ulegało hydrolizie w czasie czterech godzin [43].

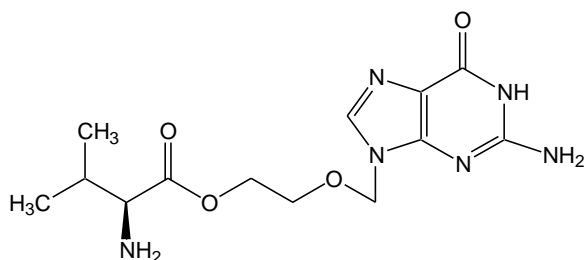
Kolejne lata wiązały się z otrzymywaniem kolejnych estrów aminokwasowych. W 1992 roku zsyntetyzowano szereg pochodnych estrowych, spośród których najbardziej obiecującymi właściwościami charakteryzował się walacyklowir [43].

Porównano estry: L-alaninowy (AACV), γ -glutaminowy (EACV), L-izoleucynowy (IACV), L-serynowy (SACV) oraz L-walinowy (VACV, walacyklowir) pod względem zdolności do penetracji monowarstwy komórek Caco-2 (ludzkich komórek nabłonkowych gruczołakoraka odbytnicy), trwałości w homogenizacie Caco-2, komórek wątrobowych, jelitowych i osoczu oraz biodostępności po podaniu doustnym u szczurów [44]. AACV w każdej z badanych tkanek, ulegał zbyt szybkiej hydrolizie ($t_{0,5}$ w zakresie od 0,110 h do 4,8 h), by substancja ta mogła być stosowana jako prolek. Jej całkowity rozkład do leku macierzystego następował przed przeniknięciem do krwioobiegu. Ester EACV okazał się najbardziej trwały we wszystkich warunkach, oprócz osocza ($t_{0,5}$ w homogenizacie jelitowym i wątrobowym to odpowiednio 8,2 h i 223 h). Najwyższą trwałość w osoczu wykazały natomiast estry SACV i VACV ($t_{0,5}$ odpowiednio 195 h i 226 h). W badaniach *in vivo*, po podaniu doustnym, estry te wykazały również najbardziej wyraźne zwiększenie pola powierzchni pod krzywą zależności stężenia jako funkcji czasu (AUC) w porównaniu do ACV. Ester L-serynowy osiągał również najwyższe stężenie maksymalne (C_{max}) uwolnionego acyklowiru i najwyższe stężenie w ostatnim punkcie pomiaru. Było ono dwukrotnie wyższe od C_{max} VACV i trzykrotnie wyższe od C_{max} acyklowiru. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowano oba estry – SACV i VACV, jako obiecujących kandydatów do doustnego leczenia zakażeń herpeswirusowych [44].

2.1.1. Walacyklowir

Najpopularniejszym i najlepiej poznanym estrem aminokwasowym acyklowiru jest walacyklowir (III, Ryc. 4). Jest on wprowadzonym do lecznictwa prolekiem ACV. Po podaniu doustnym szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, a jego biodostępność wynosi około 55%, jest więc zdecydowanie większa niż acyklowiru [15, 45]. Lepsza biodostępność wynika z lepszej rozpuszczalności w wodzie, ale przede wszystkim z wchłaniania na drodze transportu aktywnego. VACV stanowi bowiem substrat dla białek

transportujących peptydy i aminokwasy znajdujących się w ścianie jelita cienkiego hPEPT-1 (ang. *Human Intestinal Peptide Transporter 1*, ludzki jelitowy transporter białkowy 1) oraz HPT1 (ang. *Human Peptide Transporter 1*, ludzki transporter peptydowy 1) [46]. Ze względu na zbliżoną polarność i stopień jonizacji walacykwiru i acyklowiru w fizjologicznym pH, zwiększenie transportu VACV na drodze dyfuzji biernej wydaje się mało prawdopodobne [46].



Ryc. 4. Wzór strukturalny walacykwiru (III).

W wątrobie, dzięki efektowi pierwszego przejścia, walacykwir ulega szybkiej przemianie do acyklowiru z wydajnością sięgającą 99% [47]. Powyższe właściwości sprawiają, że po podaniu doustnym VACV, uzyskuje się we krwi stężenia acyklowiru zbliżone do stężeń ACV po podaniu dożylnym. Ma to istotne znaczenie w leczeniu infekcji o cięższym przebiegu [43] oraz umożliwia zmniejszenie częstotliwości podawania leku. Mimo znacznej poprawy biodostępności, wciąż jest ona daleka od 100%, czego przyczyną jest prawdopodobnie częściowa hydroliza związku III już w świetle jelita, pod wpływem znajdujących się tam enzymów oraz wysokiego pH. Lek ten jest bowiem stabilny w środowisku kwasowym, natomiast ze wzrostem pH jego trwałość drastycznie maleje [46]. Stężenie walacykwiru w osoczu osiąga maksymalnie 3% podanej dawki, jedynie po zastosowaniu dużych dawek jednorazowych [48]. Okres półtrwania leku w ustroju jest więc w głównej mierze uwarunkowany czasem eliminacji acyklowiru, skutkiem czego obie substancje są usuwane z organizmu w podobnym tempie.

2.2. Estry dipeptydowe

Mimo istotnej poprawy biodostępności, walacykwir nie jest prolekiem idealnym. Znaczna część podanej dawki ulega rozkładowi do ACV już w świetle jelita. W związku z powyższym, badania dotyczące proleków skierowały się w stronę połączeń bardziej odpornych na działania esteraz i hydrolaz. Wiedząc, że wchłanianie aminokwasowych estrów ACV odbywa się przy udziale transporterów peptydowych i białkowych,

zainteresowano się pochodnymi dipeptydowymi. Jednocześnie uwzględniając, że esterazy i hydrolazy to enzymy stereospecyficzne o wysokim powinowactwie do L-izomerów, sprawdzono możliwość użycia do syntezy D-izomerów.

Zaprojektowano następujące dipeptydowe estry acyklowiru: L-walinowo-L-walinowy (LLACV), L-walinowo-D-walinowy (LDACV), D-walinowo-L-walinowy (DLACV) i D-walinowo-D-walinowy (DDACV). Otrzymane substancje zostały porównane pod względem trwałości chemicznej i enzymatycznej, powinowactwa do receptorów hPEPT-1 oraz przenikalności przez warstwę komórek Caco-2, które charakteryzują się ekspresją hPEPT-1 [49]. Badania trwałości chemicznej prowadzono inkubując związki w buforze fosforanowym o pH 5,0, 6,0, 7,4 oraz 8,5 w temperaturze 37°C przez okres siedmiu dni. W zastosowanych warunkach, jedynie ester LDACV w buforze o pH 8,5 uległ istotnemu rozkładowi. Pozostałe estry okazały się trwałe, zwłaszcza w pH kwasowym. Badania stabilności enzymatycznej wykonano w szczurzym homogenizacie jelitowym, wątrobowym oraz symulowanym płynie jelitowym dla stanu na czczo (FaSSIF, ang. *Fasted State Simulated Intestinal Fluid*). Większą trwałość wykazały pochodne zawierające na N-końcu D-walinę. Ester DDACV nie uległ rozkładowi w żadnym z zastosowanych środowisk. Natomiast ester LLACV wykazał najmniejszą stabilność w homogenizatach tkankowych i sztucznym płynie jelitowym. Wszystkie badane estry, poza DDACV, wykazały zdolność do interakcji z białkiem transportowym hPEPT-1. Ich powinowactwo uszeregowano w kolejności: DLACV > LLACV > LDACV. Badania przenikalności estrów przez monowarstwę komórek Caco-2 wykazały, że zdolność penetracji kształtowała się następująco: LDACV > LLACV > DDACV > DLACV. Spośród analizowanych estrów LDACV został uznany za najbardziej obiecujący do dalszych badań [49].

Kolejne badanie dotyczące dipeptydowych pochodnych acyklowiru obejmowało trwałość w buforze fosforanowym pH 7,4 w 37°C, aktywność przeciwwirusową wobec HVV-1, HVV-2, VZV, HCMV i VSV (ang. *Vesicular stomatitis virus*, wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej) oraz cytotoksyczność [50]. Badaniu porównawczemu poddano związki przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Wybrane dipeptydowe pochodne acyklowiru [50]

Związek	Budowa
IV	Val-Val-ACV
V	Ala-Val-ACV
VI	Phe-Val-ACV
VII	Gly-Val-ACV
VIII	Gly-Ala-ACV
IX	Gly-Phe-ACV
X	Phe-Gly-ACV

Analizując trwałość estrów w buforze fosforanowym zauważono, że jest ona zależna od C-końcowego aminokwasu w strukturze związku. Wpływ aminokwasu N-końcowego ma zdecydowanie mniejsze znaczenie. Pochodne IV – VII, w których ACV był bezpośrednio związany z walina, okazały się znacznie bardziej stabilne od pozostałych. Ich trwałość kształtowała się następująco: IV > VI > V > VII. Estrы IX i X były 40-krotnie mniej trwałe, natomiast związek VIII ponad 130-krotnie mniej trwały od najstabilniejszego związku IV. Badane związki wykazały aktywność przeciwko tym samym szczepom wirusów co lek macierzysty. Jednocześnie prezentowały istotnie niższe wartości MCC (minimalne stężenie cytotoksyczne, ang. *Minimal Cytotoxic Concentration*), MIC (minimalne stężenie hamujące, ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) oraz EC₅₀ (stężenie hamujące tempo namnażania o 50%, ang. *Half Maximal Effective Concentration*) w porównaniu z ACV [50].

Spośród badanych związków najkorzystniejsze parametry prezentowała pochodna IV. Związek ten wykazuje ponadto 100-krotnie lepszą rozpuszczalność w wodzie w porównaniu z acyklowirem [51]. Inne badania wykazały, że pochodna IV jest metabolizowana przy udziale peptydaz do walacyklowiru, a następnie przez esterazy do acyklowiru [49]. Po podaniu dożylnym około 32% dawki jest wydalane drogą nerkową w formie niezmienionej, 11% w postaci VACV, natomiast 48% jako ACV. W przypadku podania doustnego stężenie substancji IV w osoczu szybko malało, natomiast w moczu niezmieniona jego forma występowała jedynie w niewielkich ilościach, co prawdopodobnie było skutkiem intensywnego metabolizmu w efekcie pierwszego przejścia [51].

2.3. Estry alifatyczne

Najprostszą metodą otrzymywania pochodnych acyklowiru wydaje się być synteza prostych estrów z alifatycznymi kwasami karboksylowymi. Otrzymano pochodne ACV i następujących kwasów: masłowego, piwalowego, walerianowego i kapronowego [52]. Badania właściwości fizykochemicznych estrów wykazały spadek temperatury topnienia oraz rozpuszczalności w wodzie wraz z wydłużaniem łańcucha bocznego. Natomiast wartość współczynnika podziału oktanol/bufor fosforanowy wyznaczona metodą ekstrakcyjną w temperaturze 37°C rosła wraz z długością łańcucha bocznego estrów.

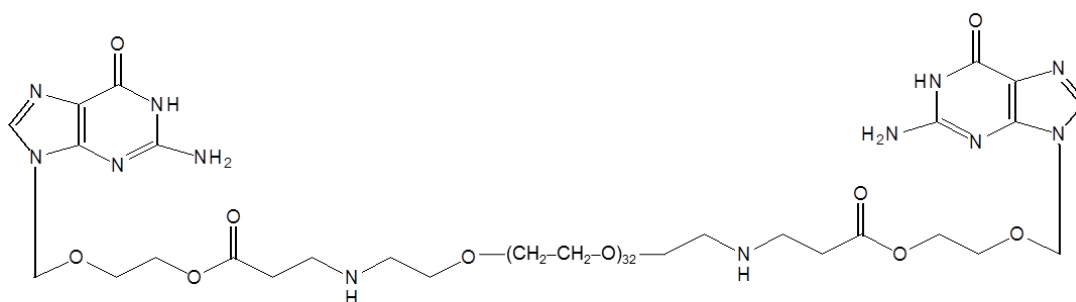
Otrzymane pochodne zbadano również pod kątem możliwości zastosowania do podawania donosowego, jako metody omijającej słabą biodostępność po podaniu doustnym a jednocześnie nieinwazyjnej dla organizmu. Substancje rozpuszczone w buforze fosforanowym podawano na śluzówkę nosa szczurzego, a następnie na podstawie ilości pozostałej substancji oraz ilości ACV, pochodzącego z jej rozkładu przez esterazy śluzówki, oceniono ich absorpcję do ustroju. Zaobserwowano, że acyklowir nie przenikał przez śluzówkę. Natomiast jego estry wykazały częściową penetrację, w stopniu proporcjonalnym do długości łańcucha bocznego. W największym stopniu i z największą szybkością transportowany był ester kapronowy. Był on również najszybciej hydrolizowany przez esterazy śluzówkowe [52].

Oceniono również trwałość estrów ACV w osoczu szczurzym. W zastosowanych warunkach godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C substancja macierzysta zachowała trwałość. Estry natomiast uległy hydrolizie enzymatycznej przy udziale karboksyoesteraz. Szybkość rozkładu była proporcjonalna do długości łańcucha bocznego. Najbardziej trwałe okazał się ester piwalowy ($t_{0,5}$ wynoszący 105 minut), co wynika z obecności zawady przestrzennej w postaci grupy *tert*-butylowej. Pozostałe estry charakteryzowały się znacznie szybszym rozkładem z $t_{0,5}$ wynoszącym 26 (ester masłowy), 16 (ester walerianowy) i 4 minuty (ester kapronowy) [52]. Na podstawie uzyskanych wyników najbardziej obiecujący pod względem przenikalności przez śluzówkę nosa okazał się ester kapronowy. Ulegał on jednak zbyt szybko hydrolizie, zarówno w śluzówce, jak i w osoczu. Konieczna byłaby więc dalsza modyfikacja długości i stopnia rozgałęzienia łańcucha bocznego w celu uzyskania pochodnej o zadowalającej lipofilowości i trwałości.

2.4. Estry acyklowiru z glikolem polietylenowym

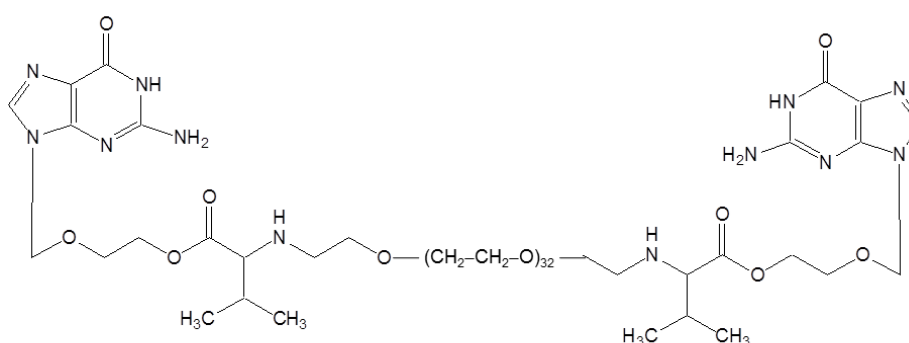
Odminnym sposobem otrzymania pochodnych ACV o korzystniejszych właściwościach było połączenie go z glikolem polietylenowym (PEG). Ten polimer jest substancją rozpuszczalną zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalnikach organicznych. PEG może więc pozytywnie wpływać na biodostępność przyłączonych do niego związków. Jednocześnie ze względu na swoją nietoksyczność, nieimmunogenność i brak właściwości teratogennych, PEG cechuje się bezpieczeństwem stosowania. Przed połączeniem z acyklowirem, PEG musiał zostać poddany modyfikacji chemicznej, ze względu na brak grup funkcyjnych umożliwiających utworzenie wiązania estrowego. Otrzymano dwie pochodne stanowiące połączenia PEG z dwoma cząsteczkami ACV lub VACV (Ryc. 5) [53].

a)



XI

b)



XII

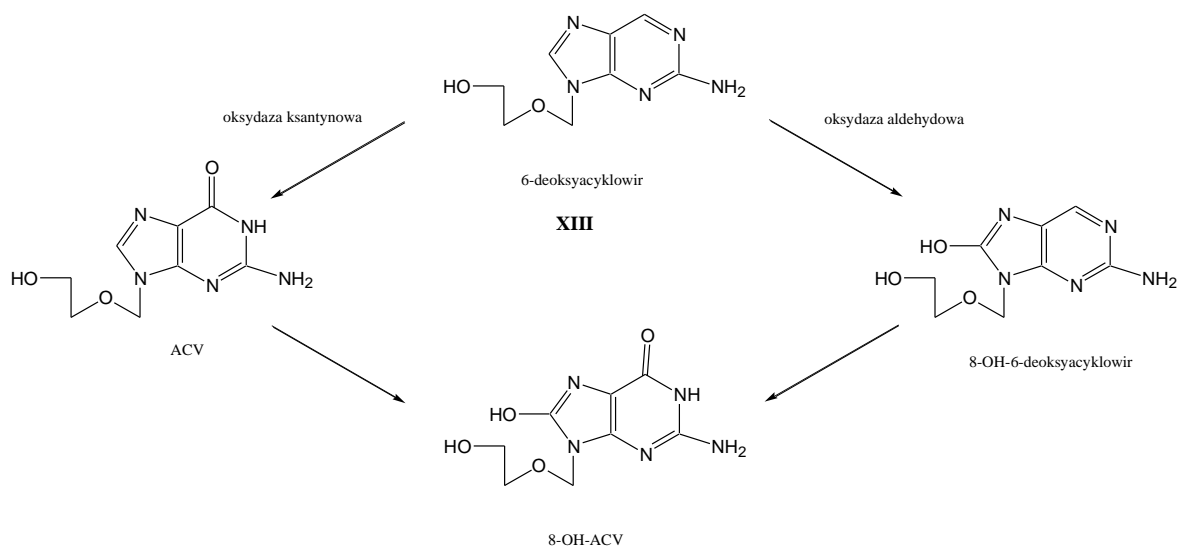
Ryc. 5. Struktura: a) PEG-ACV₂; b) PEG-VACV₂.

Pochodne oceniono pod względem trwałości w buforach stanowiących sztuczny sok żołądkowy (pH 1,2), płyny endosomalne (pH 5,5) i zewnątrzkomórkowe (pH 7,4) oraz w roztworze α -chymotrypsyny (pH 8,0) i w ludzkim osoczu. W środowisku kwasowym (pH 1,2) PEG-ACV₂ (XI, Ryc. 5a) okazał się nietrwały ulegając rozkładowi do ACV na poziomie 60% w czasie 6 godzin, podczas gdy PEG-VACV₂ (XII, Ryc. 5b) rozłożył się do acyklowiru jedynie w 2%. Wraz ze wzrostem pH środowiska szybkość rozkładu XII wyraźnie wzrastała, co stwarza nadzieję na szybkie uwalnianie substancji aktywnej po przeniknięciu do ustroju. Tendencja ta nie była wyraźnie obserwowana dla XI, jednak szybkość jego hydrolizy w wyższym pH pozostała zadowalająca. Analiza trwałości w ludzkim osoczu wykazała niemal całkowity rozkład XI w czasie 24 godzin. W tym samym czasie rozkładowi uległo jedynie 40% XII. Wykazano ponadto, że obecność α -chymotrypsyny przyspieszała rozkład substancji, zwłaszcza w przypadku XII [53].

Dzięki dużej trwałości w środowisku kwasowym, pochodna PEG-VACV₂ wydaje się możliwa do stosowania doustnego. Pochodna ta jest dość trwała we wszystkich badanych warunkach, jednocześnie wykazując dobrą rozpuszczalność w wodzie i odpowiednią lipofilowość. Stawarza to szansę na poprawę biodostępności i wydłużenie okresu półtrwania substancji we krwi. Natomiast pochodna PEG-ACV₂ może znaleźć zastosowanie w sytuacjach gdy wymagany jest szybszy efekt, np. w iniekcjach domięśniowych, podaniu na błony śluzowe czy skórę [53].

3. Modyfikacje części zasadowej acyklowiru

Pierwsze modyfikacje części cyklicznej acyklowiru przeprowadzono na początku lat osiemdziesiątych dwudziestego wieku. Obejmowały one usunięcie lub zamianę na inne ugrupowanie grupy karbonylowej w pozycji C6. Otrzymany w wyniku eliminacji grupy karbonylowej 6-deoksyacyklowir (XIII, Ryc. 6) charakteryzuje się 18-krotnie większą rozpuszczalnością w stosunku do związku macierzystego oraz biodostępnością na poziomie 65%. Pochodna ta w ustroju ulega przekształceniu przez oksydazę ksantynową do ACV. Równolegle może być również utleniana i przekształcana do pozbawionego aktywności przeciwwirusowej 8-OH-ACV (Ryc. 6) [54 – 56].



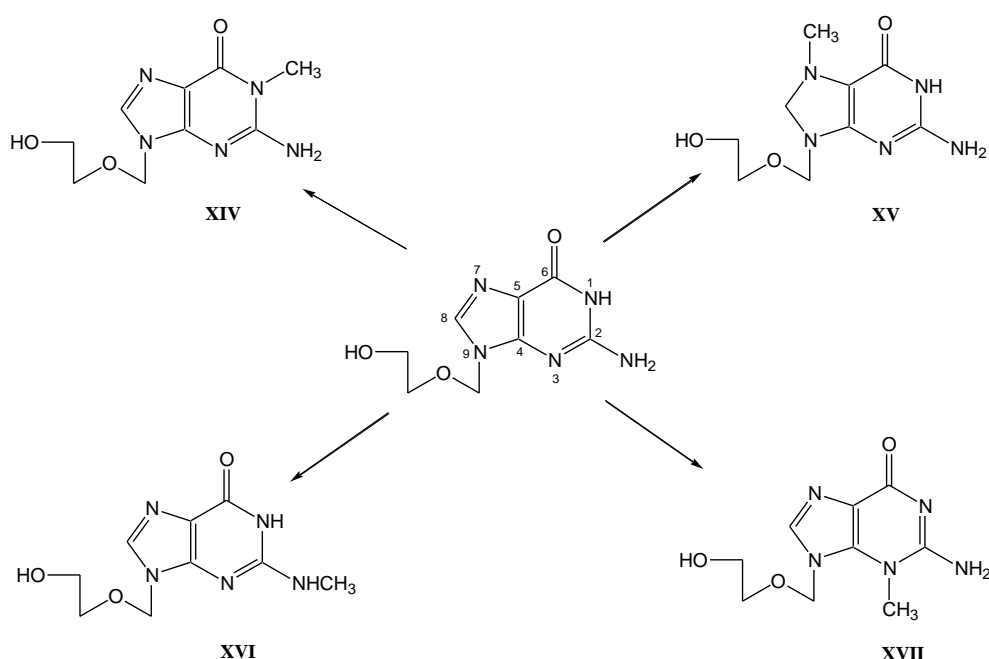
Ryc. 6. Możliwe przekształcenia 6-deoksyacyklowiru w ustroju (wg [54]).

Zastąpienie grupy karbonylowej podstawnikiem aminowym doprowadziło do otrzymania 6-deoksy-6-aminoacyklowiru. Związek ten wykazuje biodostępność na poziomie 26%. Jest ona więc porównywalna z substancją wyjściową, do której jest przekształcany przy udziale deaminazy adenozykowej [56, 57]. Ponadto zbadano również wpływ wprowadzenia niewielkich podstawników w pierścieniu ACV na aktywność przeciwwirusową. Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że wprowadzenie w pozycję C8 grupy aminowej, metylowej lub atomu fluorowca (Br, I) skutkuje otrzymaniem związków aktywnych przeciwwirusowo [58].

Kolejne modyfikacje w obrębie struktury guanozyny obejmowały uzyskanie szeregu analogów monocyklicznych (pochodne izocytozyny, triazolu, imidazolu), bicyklicznych (pochodne 8-azapuryny, pirolo[2,3-*d*]pirymidyny, pirazolo[3,4-*d*]pirymidyny) oraz trójcyklicznych (pochodne benzoguaniny) [59]. Zbadano aktywność otrzymanych związków wobec wirusa HHV-1. Spośród analizowanych analogów tylko pochodna 8-azapuryny wykazała pewną, niewielką aktywność przeciwwirusową. Związek ten, podobnie jak pochodna trójcykliczna, rywalizował z ACV o wiązanie z wirusową kinazą tymidynową. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że brak istotnej aktywności przeciwwirusowej w badanej grupie analogów spowodowany jest brakiem możliwości ich fosforylacji do aktywnej formy trifosforanowej. W związku z tym uważano, że do prawidłowego oddziaływania z wirusowym układem enzymatycznym, jak i zachowania aktywności przeciwwirusowej tej grupy związków, konieczna jest obecność struktury guanozyny w cząsteczce [59].

3.1. Pochodne trójcykliczne

Zmiana poglądu o niezbędności układu guanozyny w strukturze aktywnych przeciwwirusowo pochodnych acyklowiru stała się możliwa dopiero dzięki badaniom, w których do substancji wyjściowej dobudowano sześcioczłonowy pierścień triazynowy lub pięcioczłonowy pierścień imidazolowy [60, 61]. Początkowo, chcąc określić cechy strukturalne istotne dla aktywności przeciwwirusowej, zbadano znaczenie centrów azowych. W tym celu zablokowano atomy azotu N3, N², N7 i N1 poprzez ich metylację lub wbudowanie do dołączonego trzeciego pierścienia (Ryc. 7) [61, 62].

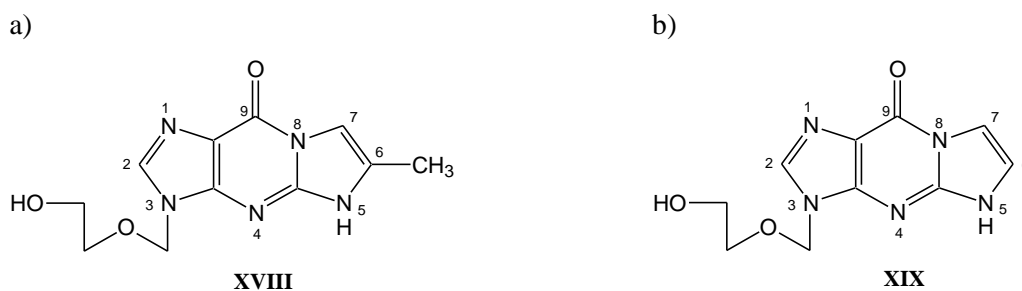


Ryc. 7. Pochodne acyklowiru otrzymane przez zablokowanie atomów azotu.

Określono zdolność hamowania przez otrzymane pochodne, replikacji DNA wirusów HHV-1 (szczepy KOS, F, McIntyre), HHV-2 (szczepy G, 196, Lyons), HHV-3 (szczepy YS, OKA), HHV-5 (szczepy Davis, AD-169) oraz posiadających niedobór kinazy tymidynowej (TK⁻) wirusów HHV-1 (szczepy B2006, VMW 1837) i HHV-3 (szczepy YSR, 07-01) [61, 62]. Stwierdzono, że efekt działania przeciwwirusowego jest zależny od miejsca metylacji i ważności centrów azotowych zgodnie z istotnością: N3 ≥ N² > N7 > N1. Metylacja azotu w pozycji N3 (XVII) i azotu grupy aminowej przyłączonej do węgla C2 (N²) (XVI) skutkuje całkowitą utratą aktywności. Metylacja w pozycji N7 (XV) prowadzi do osłabienia aktywności, podczas gdy w pozycji N1 (XIV) daje pochodną o najwyższej aktywności przeciwwirusowej [62]. Ustalono ponadto, że hydroliza pierścienia

triazyny wraz z uwolnieniem acyklowiru zachodzi w organizmie w jelicie, jeszcze przed absorpcją substancji [60].

Interesujący efekt dało zablokowanie grupy aminowej w pozycji C2 (N²) acyklowiru poprzez utworzenie pierścienia imidazolu podstawionego w pozycji C6. Powstała pochodna trójcykliczna (3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-6-metylo-9-okso-5*H*-imidazo-[1,2-*a*]puryna) (XVIII) (Ryc. 8a, Tabela 3) zgodnie z przewidywaniami miała być nieaktywna. Okazało się jednak, że związek ten wykazuje dużą aktywność i selektywność [61, 63]. Spektrum działania pochodnej jest węższe niż acyklowiru i ogranicza się do wirusów HHV-1 oraz HHV-2. Z większą selektywnością związana jest ponadto niższa cytotoksyczność otrzymanego analogu [61]. Wyodrębnioną strukturę trójcyklicznej pochodnej acyklowiru opisano w piśmiennictwie symbolem TACV (XIX) (Ryc. 8b, Tabela 3).



Ryc. 8. Struktura: a) pierwszej aktywnej przeciwwirusowo trójcyklicznej pochodnej acyklowiru; b) TACV.

Interesujące wyniki badań spowodowały rozszerzenie ich o kolejne związki trójcykliczne obejmujące analogi zawierające w łańcuchu bocznym ugrupowanie (1,3-dihydroksy-2-propoksy)metylowe (analogi gancyklowiru, GCV) oraz pochodne z pierścieniem imidazolowym niepodstawionym w pozycji C6 [63]. Stwierdzono, że podstawnik (1,3-dihydroksy-2-propoksy)metylowy, jako łańcuch boczny (trójcykliczna pochodna gancyklowiru – TGCV (XX)) w pochodnych trójcyklicznych, zwiększa aktywność w stosunku do TACV bardziej niż modyfikacja acyklowir – gancyklowir (Tabela 3). Ponadto zaobserwowano 6 – 100-krotny spadek aktywności pochodnych pozbawionych podstawnika 6-metylowego. Dowiodło to jego istotności oraz stworzyło możliwość modyfikacji właściwości fizycznych i biologicznych trójcyklicznych analogów acyklowiru oraz gancyklowiru poprzez zastosowanie różnych podstawników w obrębie ugrupowania trójcyklicznego [63].

Tabela 3. Wybrane trójcykliczne pochodne ACV i GCV [64, 65]

Związek	R ₁	R ₂	b)	
			R ₃	R ₄
XXVIII	a	Me	H	H
TACV (XIX)	a	H	H	H
TGCV (XX)	b	H	H	H
XXI	a	H	Me	H
XXII	a	Ph	H	H
XXIII	a	4-PhPh	H	H
XXIV	b	Ph	H	H
XXV	b	4-PhPh	H	H
XXVI	a	4-MePh	H	H
XXVII	a	4-MeOPh	H	H
XXVIII	b	4-MeOPh	H	H
XXIX	a	2-MeOPh	H	H
XXX	a	3-MeOPh	H	H
XXXI	a	4-NO ₂ Ph	H	H
XXXII	a	2,4-diMeOPh	H	H
XXXIII	a	2,5-diMeOPh	H	H
XXXIV	a	Ph	Me	H
XXXV	b	Ph	Me	H
XXXVI	a	Ph	Ph	H
XXXVII	a	Ph	H	CH ₂ Ph
XXXVIII	a	2-napht	H	H
XXXIX	a	4-FPh	H	H
XL	a	4-CF ₃ Ph	H	H
XLI	a	4-FPh	Me	H
XLII	a	4-(PhOCOO)Ph	H	H
XLIII	b	4-(PhOCOO)Ph	H	H
XLIV	b	(4'-HOCH ₂)PhPh	H	H

Otrzymano serię pochodnych TACV oraz TGCV zawierających różne podstawniki w pozycji C2, C6 lub C7 (Tabela 3) [66]. Stwierdzono, że obecność podstawnika w dobudowanym pierścieniu wpływa pozytywnie na aktywność biologiczną. Wielkość tego efektu zależy od rodzaju i położenia podstawnika, rodzaju wirusa oraz rodzaju acyklicznego ugrupowania w pozycji N3 pierścienia. Wykazano, że dla aktywności przeciwwirusowej TACV niezbędna jest obecność podstawnika w pozycji C6 lub C7 (np.

grupy metylowej lub *tert*-butylowej). Wpływ podstawnika na aktywność zależy nie tylko od rodzaju ugrupowania, ale również od natury wirusa. Badania przeprowadzono na wirusach HHV-1 (szczepy KOS, F), HHV-2 (szczep G) i HHV-3 (szczep YS oraz OKA) [66, 67]. Zaobserwowano między innymi, że zwiększenie aktywności przeciwwirusowej w odniesieniu do HHV-2 w wyniku wprowadzenia grupy metylowej w pozycji C6 (XVIII) lub C7 (XXI) jest porównywalne. Natomiast aktywność wobec wirusa HHV-3 jest dla pochodnej 6-metylowej 6 – 10-krotnie większa niż dla 7-metylowej [20]. Stwierdzono, że wprowadzenie do struktury wyjściowej podstawnika w pozycji C6 zwiększa aktywność przeciwwirusową. Dołączenie grupy 6-metylowej wpływa ponadto na poprawę rozpuszczalności. Natomiast ugrupowanie fenyłowe (XXII, XXIV) lub 4-bifenyłowe (XXIII, XXV), znajdujące się w tej pozycji, powodują największy wzrost aktywności oraz warunkują właściwości fluorescencyjne uzyskanych pochodnych [66]. Najistotniejszy wzrost aktywności zaobserwowano dla trójcyklicznych analogów gancyklowiru. Fenyłowa (XXIV) i 4-bifenyłowa (XXV) pochodna TGCV są około 100-krotnie bardziej aktywne od analogicznych pochodnych TACV (XXII i XXIII), natomiast dla związków macierzystych różnica ta jest jedynie 10-krotna [65]. Natomiast fenyłowe i 4-bifenyłowe pochodne zarówno TACV, jak i TGCV mają zwiększoną względem związków macierzystych lipofilowość, co może przyczyniać się do lepszego pokonywania przez nie bariery krew-mózg [64, 68, 69].

Za najbardziej obiecujące związki uznano pochodne z podstawnikiem fenyłowym w pozycji C6. Analog acyklowiru XXII wykazywał aktywność wobec szczepów TK+ HSV-1, TK+ HSV-2 oraz TK+ VZV w zakresie stężeń 0,2 – 2,0 µg/ml, czyli znacznie poniżej granicy cytotoksyczności (50 do ponad 100 µg/ml). Natomiast pochodna gancyklowiru – XXIV, wykazywała działanie przeciwwirusowe na szczepy TK+ HSV-1, TK+ HSV-2 w zakresie stężeń 0,005 – 0,300 µg/ml, a na TK+ VZV w stężeniu 0,4 – 3,0 µg/ml. Granica cytotoksyczności dla tego związku wynosiła ponad 200 µg/ml. Dzięki właściwościom fluorescencyjnym powyższe pochodne zostały ponadto uznane za obiecujących kandydatów nieinwazyjnej diagnostyki zakażeń herpeswirusami [66]. Substancje te oraz ich metabolity mogłyby być stosowane do oznaczania zainfekowanych komórek organizmu lub enzymów specyficznych dla wirusów. Poza tym zastosowanie tych związków w leczeniu umożliwiłoby również łatwe i szybkie monitorowanie stężenia leku w materiale biologicznym [65].

Odkrycie, że wprowadzenie do trójcyklicznej struktury ugrupowania aromatycznego warunkuje zarówno właściwości fluorescencyjne, jak i zwiększa aktywność,

ukierunkowało prace w kierunku syntezy kolejnych pochodnych posiadających powyższe właściwości [64, 70]. Z uwagi na pojawianie się lekoopornych herpeswirusów oraz w połączeniu z ciągłą koniecznością rozwoju i odkrywania nowych leków przeciwwirusowych kontynuowanie podjętych wcześniej badań stało się zasadne. Badania zależności struktura chemiczna – aktywność biologiczna wykonano dla dwudziestu 6-arylopodstawionych analogów TACV oraz TGCV [64]. Zaobserwowano, że aktywność pochodnych zależy od struktury i efektów sterycznych podstawników w pozycjach C6 i C7. Tolerancja na zmiany podstawnika w pozycji C6 jest bardzo mała. Dopuszczalne są jedynie modyfikacje podstawnika w pozycji *para* ugrupowania fenyłowego. Wzrost lub zachowanie aktywności przeciwwirusowej ACV na ogół obserwuje się po wprowadzeniu grupy metylowej (XXVI) lub metoksyłowej (XXVII) w pozycję *para* pierścienia 6-fenyłowego TACV [64].

Natomiast wprowadzenie powyższych ugrupowań w pozycję *orto* (XXIX) lub *meta* (XXX), bądź wprowadzenie grupy nitrowej (XXXI) do pierścienia 6-fenyłowego TACV, prowadzi do obniżenia ich aktywności przeciwwirusowej przy możliwości wzrostu aktywności cytotoksycznej. Przykładem są tu pochodne 6-(2-MeOPh)-TACV (XXIX) oraz 6-(3-MeOPh)-TACV (XXX), które okazały się 10 – 20-krotnie mniej aktywne od izomeru 6-(4-MeOPh)-TACV (XXVII) [64]. Również wprowadzenie dodatkowej grupy metoksyłowej w pozycji *orto* do struktury 6-(4-MeOPh)-TACV (XXXII) lub 6-(2-MeOPh)-TACV (XXXIII) powoduje spadek aktywności, a jednocześnie wzrost cytotoksyczności [64]. Wprowadzenie grupy metylowej w pozycję C7 6-fenyłowej pochodnej TACV daje związek o silnej fluorescencji (XXXIV), aktywniejszy przeciwwirusowo od acyklowiru. Jednak umieszczenie w tej pozycji jakiegokolwiek innego podstawnika powoduje znaczny spadek aktywności (XXXVI). Natomiast umieszczenie podstawnika w pozycji N5 skutkuje całkowitą utratą aktywności przeciwwirusowej (XXXVII) [64].

Spośród szeregu przebadanych 6-arylo podstawionych analogów TACV za najbardziej obiecujące uznano 6-(4-MeOPh)-TACV (XXVII) oraz 7-Me-6-Ph-TACV (XXXIV), charakteryzujące się 2-krotnie wyższą od ACV aktywnością i selektywnością przeciwwirusową w odniesieniu do HHV-1 i HHV-2 [64, 65]. W przypadku modyfikacji gancyklowiru za najbardziej interesujące uznano analogiczne pochodne TGCV (XXVIII i XXXV) [64, 65]. Warto jednocześnie zauważyć, że wysokiej aktywności przeciwwirusowej powyższych związków nie towarzyszył wzrost intensywności

fluorescencji, natomiast 6-(2-napht)-TACV (XXXVIII) o najlepszych właściwościach fluorescencyjnych okazał się praktycznie nieaktywny biologicznie [65].

Trójcykliczne pochodne TACV – XXVII, XXXIV oraz analogiczne pochodne TGCV poddano dalszym modyfikacjom przyłączając w pozycji C4 pierścienia 6-fenyłowego atom fluoru lub grupę trifluorometylową [71]. Otrzymane związki XXXIX – XLI okazały się znacznie mniej aktywne przeciwwirusowo. Wszystkie zsyntetyzowane analogi posiadające w strukturze fluor (zarówno atom fluoru, jak i grupę trifluorometylową) nie wykazały aktywności przeciwko wirusom VZV, HCMV, VV (ang. *Vaccinia virus*, wirus krowianki) oraz VSV, natomiast wobec wirusów HHV-1 i HHV-2 ich aktywność była znacznie zredukowana w porównaniu z substancjami niemodyfikowanymi. Analogi te pozbawione były również aktywności w odniesieniu do szczepów TK⁻. Najmniejszy spadek aktywności, w zależności od szczepu 3 – 30-krotny, przy zachowaniu selektywności działania, odnotowano dla pochodnej 6-(4-FPh)-7-Me-TACV (XLI). Zaobserwowano ponadto wzrost cytotoksyczności otrzymanej grupy związków [71].

Zakładając, że wprowadzenie grupy estrowej lub amidowej w pozycję *para* pierścienia fenyłowego może zwiększyć fluorescencję, zsyntetyzowano kolejną grupę pochodnych TACV i TGCV. Otrzymano serię intensywnie fluoryzujących trójcyklicznych analogów pochodnych 6-(4-HOPh)-TACV oraz 6-(H₂NPh)-TACV, a następnie analogicznych pochodnych TGCV [72]. Okazało się, że amidy wykazały jedynie niewielką aktywność. Spośród uzyskanych pochodnych najlepszym połączeniem aktywności i właściwości fluorescencyjnych charakteryzowały się pochodne z podstawnikiem 6-[4-(fenoksykarbonyloksy)fenyłowym]: 6-[4-(PhOCOO)Ph]-TACV (XLII) i 6-[4-(PhOCOO)Ph]-TGCV (XLIII) [72].

Przewidywano, że pochodne estrowe mogą być rozkładane przez esterazy do związków macierzystych. W tej sytuacji fluorescencja byłaby niewielka, zbliżona do pochodnych z podstawnikiem 6-(4-HOPh). Jednak atutem takich analogów jest możliwość wykorzystania ich jako proleków. Związki takie stanowiłyby nową klasę proleków, ponieważ nie miałyby zablokowanej grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym. Zatem uwolnienie tej grupy nie byłoby kluczowe dla ich aktywności przeciwwirusowej [65].

W celu polepszenia właściwości fluorescencyjnych i rozszerzenia zakresu emisji w zakresie widzialnym otrzymano serię pochodnych 6-[(4'-R)-4-bifenylo]-TACV i -TGCV [73]. Zaobserwowano, że zastąpienie pierścienia fenyłowego układem bifenyłowym skutkuje istotnym tzn. około 2-krotnym, wzrostem absorpcji oraz przesunięciem maksimum absorpcji o około 10 nm w kierunku fal dłuższych. Jako związek o

najkorzystniejszych parametrach wybrano 6-[(4'-hydroksymetylo)-4-bifenylo]-TGCV (XLIV), wykazujący wysoką selektywność wobec HHV-1, a jednocześnie zadowalającą fluorescencję i znaczną intensywność absorpcji w zakresie widzialnym [73].

Kontynuując badania, otrzymano serię 6-heteroarylowych oraz 6-heteroarylofenylowych pochodnych TACV. Przyłączano następujące podstawniki: pirydyno-4-yłowy, 4-(pirydyno-4'-ylo)fenyłowy, 4-(pirymidyno-5'-ylo)fenyłowy oraz 4-(tiazolo-2'-ylo)fenyłowy [74]. Spośród otrzymanych substancji, jedynie pochodna posiadająca ugrupowanie tiazolowe wykazała fluorescencję w roztworach wodnych. Pozostałe analogi były pozbawione tej właściwości. Zbadano również aktywność otrzymanych pochodnych wobec wirusów HHV-1, HHV-2, VV oraz VSV, która okazała się umiarkowana. Ponadto związki te wykazały bardzo słabą zdolność hamowania proliferacji komórek kostniakomięsaka (ang. *osteosarcoma*): OST TK⁺, OST TK/HHV-1 TK⁺ [74].

3.2. Mechanizm działania przeciwwirusowego analogów trójcyklicznych

Mechanizm działania trójcyklicznych pochodnych ACV i GCV, zawierających pierścień imidazolowy nie został wyjaśniony. Wiadomo, że kinaza tymidynowa jest niezbędna do ich aktywacji, ponieważ szczepy TK⁻ nie wykazują wrażliwości na działanie tych substancji. Wykazano ponadto, na przykładzie niektórych analogów, że są one efektywnie przekształcane do trifosforanów po ekspozycji na czystą HHV-1 TK oraz w mieszaninie zawierającej również kinazę GMP (guanozynomonofosforan) i kinazę NDP (nukleozydodifosforan). Jest więc jasne, że kinaza tymidynowa uznaje analogi trójcykliczne za substrat do fosforylacji, chociaż proces ten jest mniej wydajny niż dla macierzystego acyklowiru i gancyklowiru [75].

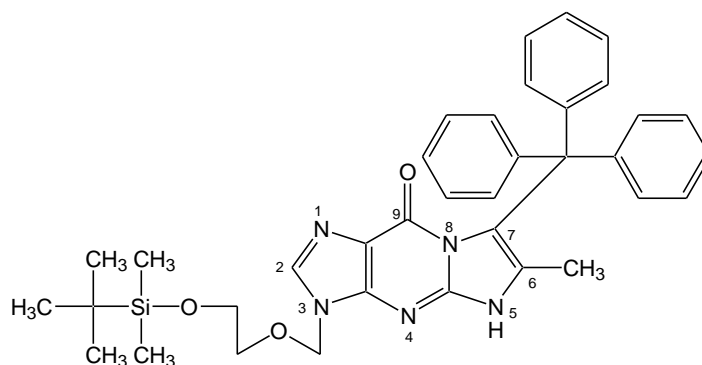
Oddziaływanie acyklowiru i gancyklowiru z kinazą tymidynową wirusów *Herpesviridae* jest dość dokładnie zbadane. Zostało ustalone na podstawie struktury krystalograficznej kompleksów enzymu z jego naturalnym substratem – deoksytymidyną (dThd), oraz powyższymi lekami. Stwierdzono, że w kompleksie z enzymem ACV i GCV znajdują się w kieszeni wiążącej substrat, oraz że pierścień purynowy leku częściowo pokrywa się z pierścieniem pirymidynowym dThd. Zarówno pierścień purynowy, jak i pirymidynowy, znajdują się pomiędzy Tyr-172 a Met-128 i tworzą dwa wiązania wodorowe z Gln-125 [75, 76].

Jednak podczas modelowania układu trójcyklicznego z dołączonym pierścieniem fenylowym do kieszeni wiążącej substrat wirusowej kinazy tymidynowej, okazało się że

nie ma możliwości aby zmieściła się tam tak rozbudowana struktura. Dlatego zaskakująca jest aktywność przeciwwirusowa tych substancji i to, w jaki sposób wiążą się one z wirusowym enzymem. W związku z tym przypuszcza się, że w strukturze kinazy tymidynowej istnieje lipofilowa kieszeń, która umożliwia skuteczne przyłączenie 6-fenyłowych pochodnych TACV i TGCV [75]. Natomiast badając wiązanie z kinazą tymidynową jednego z trójcyklicznych analogów ACV, stwierdzono, że orientacja synperiplanarna alifatycznego łańcucha bocznego względem układu cyklicznego jest taka sama dla substancji związanej i niezwiązanej. Jednak w stanie niezwiązanym z enzymem struktura łańcucha jest stosunkowo nieuporządkowana, natomiast dla postaci związanej korzystna jest tylko jedna konformacja [77].

3.3. Aktywność cytotoksyczna

Acyklowir, poza działaniem przeciwwirusowym, wykazuje również, nawet w niskim stężeniu (13 µg/ml), zdolność hamowania wzrostu komórek mysiej białaczki L 1210 [58]. Aktywność ta wydawała się specyficzna dla ACV, ponieważ spośród serii 8-podstawionych pochodnych, tylko analog 8-jodo-ACV hamował proliferację komórek L 1210 w stężeniu mniejszym niż 300 µg/ml [58]. Tym niemniej postanowiono zbadać selektywną aktywność cytostatyczną wybranych analogów ACV w odniesieniu do ludzkiej linii komórkowej KB. Do badań wytypowano wspomniane wcześniej pochodne acyklowiru podstawione w pozycji 8 oraz niektóre analogi trójcykliczne. Analiza zależności SAR (ang. *Structure – Activity Relationship*, zależność struktura – aktywność) 8-podstawionych analogów ACV wykazała, że dla aktywności cytotoksycznej wobec komórek KB najistotniejsza jest obecność w tej pozycji atomu bromu. Zmiana 8-Br na grupę 8-SH powodowała wyraźny spadek aktywności. Modyfikacje ugrupowania pseudocukrowego wywierają mniejszy wpływ na działanie cytotoksyczne. Zastąpienie łańcucha alifatycznego pierścieniem rybozy lub deoksyrybozy skutkowało spadkiem aktywności, jednak mniej istotnym niż w przypadku zmian w pozycji 8 [78]. Badania aktywności pochodnych trójcyklicznych obejmowały analogi z różnymi podstawnikami w pozycji C6. Stwierdzono, że obecność podstawnika w tej pozycji prowadzi do zmniejszenia lub utraty aktywności cytotoksycznej. Najbardziej aktywny z tej serii analogów okazał się związek w ugrupowaniu tritylowym w pozycji C7 (XLV) (Ryc. 9) [78].



Ryc. 9. Najbardziej cytotoksyczna pochodna TACV – XLV.

Zauważono jednak, że podstawnik tritylowy występujący w pozycji C7 TACV wpływa na wzrost toksyczności również w odniesieniu do normalnych komórek [64]. Wpływ rodzaju ugrupowania cukrowego lub pseudocukrowego na cytotoksyczność w tej grupie okazał się zróżnicowany. Podobnie nie udało się uzyskać jednoznacznych wyników dotyczących wpływu na aktywność jednoczesnego zastosowania podstawników w pozycji C2 i C6 [78].

Najbardziej aktywne substancje z analizowanej grupy pochodnych ACV i TACV poddano badaniu cytotoksyczności w obecności preparatów mikrosomalnych wątroby szczura. Spośród nich jedynie związki posiadające niepodstawiony łańcuch pseudocukrowy 2-hydroksyetoksymetylowy (8-Br-ACV oraz TACV) wykazały istotnie większą aktywność *in vitro* wobec komórek HeLa w obecności indukowanego systemu wytwarzającego mikrosomy. Sugeruje to, że ich aktywność cytotoksyczna jest zależna od transformacji metabolicznej do aktywnych metabolitów przy udziale układu oksydaz o funkcji mieszanej (ang. *Mixed Function Oxidases*, MFO) oraz że wspomniany łańcuch pseudocukrowy jest elementem strukturalnym niezbędnym do tej aktywacji [78].

3.4. Lipofilowość pochodnych acyklowiru

Zwiększenie lub modyfikacja aktywności biologicznej to niezmiernie ważny, lecz nie jedyny, powód tworzenia nowych modyfikacji acyklowiru. Dla prawidłowego wchłaniania i działania substancji bardzo ważna jest również jej rozpuszczalność oraz lipofilowość. Zbyt mała rozpuszczalność w środowisku wodnym uniemożliwia stosowanie substancji w postaci iniekcji, czy kropli ocznych oraz utrudnia uwalnianie z zastosowanej postaci leku w przewodzie pokarmowym. Z kolei lipofilowość wpływa na parametry farmakokinetyczne (transport leku przez bariery biologiczne, dystrybucję w tkankach i jego eliminację) oraz oddziaływanie z receptorem. Jednocześnie lipofilowość, której miarą

jest wartość P (współczynnika podziału olej/woda) i jego postaci logarytmicznej (logP), powinna mieścić się określonych granicach. Zgodnie z „regułą pięciu” Lipińskiego wartość logP nie powinna przekraczać 5 (wartość MLogP nie powinna być większa od 4,15) [79].

Zsyntetyzowane trójcykliczne analogi ACV i GCV, szczególnie 6-arylopodstawione, okazały się znacznie bardziej lipofilowe od związków macierzystych. Ich rozpuszczalność została wyznaczona w wodzie w temperaturze 25, 35 oraz 45°C oraz w oktanolu, wodzie wysyconej oktanołem i oktanolu wysyconym wodą w 25°C. Współczynnik podziału *n*-oktanol/woda wyznaczono klasyczną metodą wytrząsania w temperaturze 25°C [69]. Stwierdzono, że grupa metylowa dołączona do układu trójcyklicznego w pozycji C6 poprawia rozpuszczalność w wodzie i oktanolu, względem ACV oraz TACV, a jednocześnie zwiększa wartość P. Wzrost lipofilowości w tym przypadku nie jest jednak zbyt duży (P dla ACV wyniosło 0,0363, dla TACV 0,138, dla 6-metylowej pochodnej TACV 0,205). Przyłączenie w tym samym miejscu grupy *tert*-butylowej skutkuje obniżeniem rozpuszczalności w wodzie, wzrostem rozpuszczalności w oktanolu i podnosi wartość P do 4,13. Z kolei dołączenie pierścienia fenyłowego wpływa na spadek rozpuszczalności i wzrost lipofilowości (P wyniosło 3,51). Natomiast w przypadku podstawienia atomem bromu efekt jest zależny od miejsca podstawienia. Przyłączenie Br w pozycji C8 ACV lub C2 6-Me-TACV skutkuje spadkiem rozpuszczalności w wodzie i oktanolu oraz wzrostem lipofilowości, z kolei w pozycji *para* dołączonego pierścienia fenyłowego nie wywiera istotnego wpływu na powyższe parametry. Również ugrupowania bifenyłowe i naftyłowe przyłączone zamiast pierścienia fenyłowego nie wpływają znacząco na rozpuszczalność i lipofilowość. Jednak podstawienie pierścienia fenyłowego grupą metoksyłową w pozycji *para* powoduje obniżenie wartości P do 2,43 [69]. Kolejne badania rozpuszczalności pozwoliły stwierdzić, że pochodne z podstawnikami alkilowymi lub chlorowcowymi są lepiej rozpuszczalne w wodzie (rozpuszczalność między 10^{-2} a 10^{-3} mol/dm³) niż pochodne z podstawnikami aromatycznymi (rozpuszczalność w zakresie 10^{-4} – 10^{-5} mol/dm³) [80]. Odwrotnie przedstawia się rozpuszczalność związków w 1-oktanolu.

W innych badaniach lipofilowość wyznaczono w układzie *n*-oktanol/bufor PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem, ang. *Phosphate Buffered Saline*) o pH 7,5 i porównano z wartościami czasów retencji w metodzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) [75]. Uzyskano wysoką korelację wyników otrzymanych obiema metodami. Wartość *r* dla ACV i jego pochodnych wynosiła 0,986, natomiast dla GCV i jego analogów 0,967. Wszystkie analizowane związki, TACV,

TGCV i ich pochodne okazały się bardziej lipofilowe niż ACV i GCV. Jednocześnie analogi z przyłączonym pierścieniem fenylowym okazały się co najmniej 2 – 3-krotnie bardziej lipofilowe niż związki macierzyste [75].

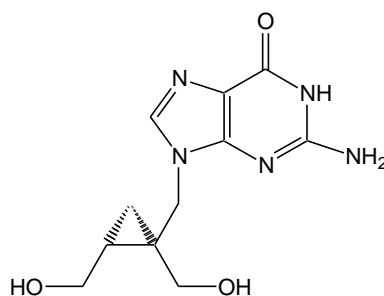
Niska rozpuszczalność w wodzie większości trójcyklicznych analogów stanowi poważne ograniczenie w ich terapeutycznym stosowaniu. Jednocześnie dobra rozpuszczalność w oktanolu często wiąże się z dobrym przenikaniem przez błony biologiczne. Skłoniło to badaczy do poszukiwania metod zwiększenia rozpuszczalności w wodzie, bez utraty właściwości lipofilowych. Jedną z takich metod jest tworzenie kompleksów związków aktywnych z cyklodekstrynami. Poza zwiększeniem rozpuszczalności, kompleksowanie może zmienić właściwości fizykochemiczne i biochemiczne, zwiększać trwałość, aktywność biologiczną, czy biodostępność [81]. TACV oraz jego wybrane pochodne były łączone w kompleksy z hydroksypropylo- β -cyklodekstryną (HP- β -CD) [80, 81]. Stwierdzono, że rozpuszczalność w wodzie analizowanych substancji wzrasta liniowo dla większości pochodnych wraz ze wzrostem stężenia cyklodekstryny. Ustalono również, że rozpuszczalność związków i jej zwiększenie dla otrzymanych kompleksów są zależne od pH środowiska oraz temperatury. Największy wzrost rozpuszczalności po skompleksowaniu z HP- β -CD zaobserwowano dla pochodnych posiadających przy strukturze trójcyklicznej podstawnik aromatyczny, który w wyniku utworzenia kompleksu sytuował się w hydrofobowej wnęce cyklodekstryny. Proces kompleksowania związany był z protonowaniem cząsteczek gościa i asocjacją molekuł cyklodekstryny i gościa w roztworze. W związku z tym trwałość kompleksów była większa w pH 5,5 niż w pH 7,0 [81]. Zgodnie z zaproponowanym modelem kompleksu inkluzyjnego, grupa fenyłowa wnika głęboko do wnętrza wnęki, natomiast łańcuch pseudocukrowy słabo oddziałuje z krawędzią pierścienia cyklodekstryny. Stosunek stechiometryczny powstałego kompleksu wynosi 1:1 [80]. Obecność podstawnika fenyłowego wydaje się kluczowa dla możliwości tworzenia kompleksów. Pochodne nieposiadające tego ugrupowania wiążą się z HP- β -CD znacznie słabiej. Stałe trwałości kompleksów TACV oraz jego alkilowych pochodnych są niewielkie ($6 - 27 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$). Natomiast dla aryłowych pochodnych TACV mają wartości ($100 - 300 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) wystarczające do poprawy właściwości terapeutycznych substancji leczniczych, ponieważ stwarzają możliwość łatwego uwalniania substancji aktywnych w organizmie [80, 81].

Ciekawe zjawisko zaobserwowano dla rozpuszczalności 6-(4-MeOPh)-TACV. Porównano rozpuszczalność związku w buforach (o pH 5,5 oraz o pH 7,0) buforach zawierających HP- β -CD, buforach wysyconych 1-oktanołem (z dodatkiem HP- β -CD lub bez) oraz 1-oktanolu wysyconym buforem. Niezależnie od pH buforu, największe stężenie 6-(4-MeOPh)-TACV stwierdzono w 1-oktanolu wysyconym buforem i w buforze z cyklodekstryną, najmniejsze natomiast w buforze wysyconym oktanołem i zawierającym HP- β -CD. Jest to związane z kompleksowaniem 1-oktanolu we wnęce cyklodekstryny, co uniemożliwia wnikanie związku do wnętrza HP- β -CD. Jest to obserwacja cenna dla możliwości wykorzystania kompleksu 6-(4-MeOPh)-TACV z HP- β -CD jako leku. Kompleksowanie związku przez cyklodekstrynę zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie. Jednak w kontakcie z oktanołem, który naśladuje błonę komórkową, substancja jest łatwo uwalniana z kompleksu wskutek konkurencyjnego kompleksowania oktanolu. Wartość współczynnika podziału badanego związku (2,43) wskazuje na dobrą przenikalność, więc uwolniony z kompleksu może on przedostać się przez błonę komórkową [80]. Jednocześnie zaobserwowano, że trwałość kompleksów inkluzyjnych 6-(4-MeOPh)-TACV z HP- β -CD zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury [82]. Sprawdzone również możliwość zastosowania innych cyklodekstryn (β -CD, M- β -CD oraz HP- γ -CD) do kompleksowania 6-(4-MeOPh)-TACV. Zdecydowanie największy wzrost rozpuszczalności obserwowano dla hydroksypropylo-cyklodekstryn, zwłaszcza dla HP- β -CD. Najmniejszą poprawę rozpuszczalności odnotowano natomiast dla β -CD [82].

4. Inne trójcykliczne analogi guanozyny

Otrzymanie aktywnych przeciwwirusowo trójcyklicznych analogów acyklowiru i gancyklowiru zainspirowało do sprawdzenia wpływu dodatkowego pierścienia na właściwości biologiczne innych związków bazujących na strukturze guanozyny. Interesującym analogiem guaniny jest 9-[[cis-1',2'-bis(hydroksymetylo)-cycloprop-1'-ylo]metylo}guanina (RA-5021), związek charakteryzujący się znaczną selektywnością oraz aktywnością w odniesieniu do wirusów HHV-1 (badanie na szczepach KOS oraz Tomioka), HHV-2 (szczepy 186 oraz UW268) i VZV (szczep Kawaguchi) oraz umiarkowaną wobec HMCV, na które działa w znacznie mniejszych stężeniach niż acyklowir czy pencyklowir. Szczególnie aktywny jest jego enancjomer 1'S,2'R (A-5021, XLVI, Ryc. 10) [83, 84]. Aktywność przeciwwirusowa A-5021 uwarunkowana jest jego

fosforylacją (przy udziale wirusowej kinazy tymidynowej) oraz znaczną trwałością wewnątrzkomórkową powstałego trifosforanu. Ze względu na konieczność fosforylacji, aktywność A-5021 wobec szczepów TK⁻ jest znacznie mniejsza. Enancjomer ten wykazuje ponadto zbliżoną do ACV aktywność wobec EBV i HMCV oraz, podobnie jak acyklowir, nie działa na HHV-8 (ang. *Human herpesvirus 8*, wirus mięsaka Kaposiego). Związek A-5021 charakteryzuje się podwyższoną, prawie 10-krotnie większą niż ACV, aktywnością w stosunku do HHV-6. Mniejsza jest natomiast jego aktywność wobec MCMV (ang. *Mouse cytomegalovirus*, myszy cytomegalowirus). Udowodniono również znacznie większą, w porównaniu z ACV, zdolność protekcyjną A-5021 przeciwko indukowanej HHV-1 śmiertelności u myszy z ciężkimi złożonymi niedoborami odporności (SCID, ang. *Severe Combined Immunodeficiency*), zarówno w odniesieniu do średniego dnia śmierci, jak i śmiertelności [85]. Ponadto badana substancja charakteryzuje się aktywnością cytostatyczną w kierunku transferowanych genem HHV-1 TK komórek ludzkiego kostniakomięsaka oraz ludzkiego raka płuc. Jednocześnie, w porównaniu z GCV, jest ona mniej toksyczna w odniesieniu do komórek szpiku [86].



Ryc. 10. Struktura A-5021 (XLVI).

Tak obiecujące właściwości sprawiły, że postanowiono zsyntetyzować, analogiczne do TACV i TGCV, trójcykliczne pochodne omawianego związku tak, by uzyskać połączenie zalet związku RA-5021 i zwiększonej rozpuszczalności, lipofilowości i właściwości fluorescencyjnych 6-podstawionych trójcyklicznych modyfikacji ACV i GCV [86]. Otrzymano cztery pochodne, posiadające jako podstawnik w pozycji C6 ugrupowanie metylowe, etylowe, fenyłowe lub 4-metoksyfenylowe (XLVII – L, Tabela 4). Zbadano ich aktywność wobec: HHV-1, HHV-1 TK⁻, HHV-2, VZV, VZV TK⁻, HCMV, VV, VSV na linii komórkowej HEL (ang. *Human embryonic lung*), wirusa Coxsackie B4 i RSV (ang. *Respiratory syncytial virus*, wirusa syncytium nabłonka oddechowego) na linii komórkowej HeLa oraz wirusa paragrypy 3, reowirusa 1, wirusa Sindbis i wirusa Punta Toro na linii komórkowej Vero. Sprawdzone również aktywność cytostatyczną

otrzymanych analogów wobec komórek ludzkiego kostniakomięsaka, zarówno komórek OST TK, jak i HHV-1 TK⁺ [86]. Zaobserwowano, że dołączenie trzeciego pierścienia do części zasadowej związku RA-5021 powoduje we wszystkich przypadkach zmniejszenie aktywności przeciwwirusowej oraz cytostatycznej. Natomiast wielkość tego efektu zależy od typu wirusa oraz rodzaju podstawnika w pozycji C6. Najbardziej istotne zmniejszenie aktywności wystąpiło w przypadku pochodnej z podstawnikiem etylowym (XLVIII) dla wirusa HHV-2 oraz dla działania pochodnej z podstawnikiem metylowym (XLVII) na wirusa VZV. Mimo, że wszystkie otrzymane pochodne są mniej aktywne niż substancja wyjściowa, ich działanie przeciwwirusowe w dalszym ciągu jest większe niż acyklowiru. Ponadto analogi z podstawnikiem 6-fenylowym (XLIX) oraz 6-(4-metoksyfenylowym) (L) posiadają właściwości fluorescencyjne oraz są bardziej lipofilowe niż ACV i RA-5021, co może wpływać na lepsze przekraczanie przez nie bariery krew-mózg oraz umożliwiać łatwiejsze oznaczanie stężenia w organizmie [86].

Tabela 4. Trójcykliczne pochodne A-5021

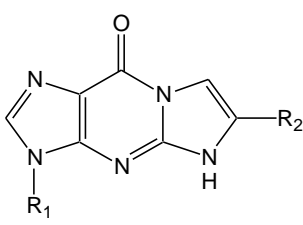
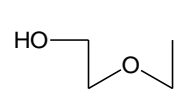
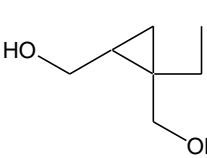
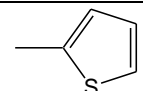
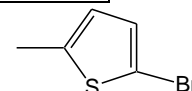
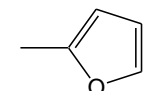
Związek	R
XLVII	Me
XLVIII	CH ₂ CH ₃
XLIX	Ph
L	4-MeOPh

Observacje aktywności związków XLVII – L pokrywają się z wnioskami uzyskanymi wcześniej dla trójcyklicznych analogów ACV i GCV. Najistotniejsze zmniejszenie aktywności stwierdza się dla pochodnych 6-alkilowych. Aktywność analogów z podstawnikiem 6-fenylowym i 6-(4-metoksyfenylowym) zmienia się nieznacznie. Jednocześnie zaobserwowano, że zmiana aktywności, towarzysząca przekształceniu układu dwupierścieniowego w trójpierścieniowy, różni się dla pochodnych RA-5021, ACV i GCV. 6-(4-metoksyfenylo)-TACV jest 2-krotnie bardziej aktywny, 6-(4-metoksyfenylo)-TGCV 2-krotnie mniej aktywny, natomiast 6-(4-metoksyfenylo)-TRA-5021 aż 7-krotnie

mniej aktywny w porównaniu do związku macierzystego [86]. Powyższa obserwacja skłania do przypuszczeń, że analogi trójcykliczne nie ulegają w organizmie przekształceniu do dwucyklicznych, lecz wykazują własną aktywność biologiczną. Możliwe jest również, że przekształcanie następuje, jednak rozkład zachodzi dla poszczególnych analogów z różną szybkością [86].

Ciekawymi właściwościami biologicznymi charakteryzują się pochodne purynowe i pirymidynowe, także analogi nukleozydowe, podstawione grupami furanyleowymi lub tienyleowymi. Niektóre z tych związków wykazują aktywność przeciwwirusową (HHV-1, VZV [87, 88] oraz HCV [89, 90]), przeciwpierwotniakową (*Trypanosoma brucei* oraz *Leishmania Mexiana* [91]) lub przeciwbakteryjną (*Mycobacterium tuberculosis* [92]). Biorąc pod uwagę właściwości trójcyklicznych pochodnych ACV, GCV oraz RA-5021 zbadano wpływ niektórych podstawników heteroarylowych w pozycji C6 na aktywność. Analizowano efekt przyłączenia do struktury trójcyklicznej ugrupowania 2-tienylewego, 5-bromo-2-tienylewego i 2-furanylowego zamiast pierścienia fenylowego (Tabela 5) [93].

Tabela 5. Trójcykliczne analogi ACV i RA-5021

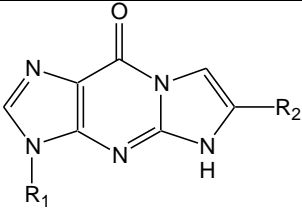
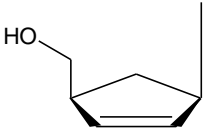
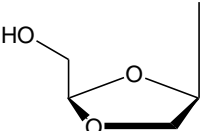
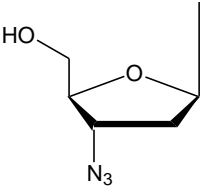
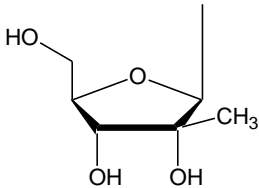
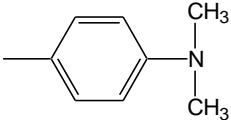
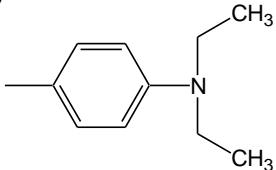
		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>a)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>b)</p>  </div> </div>		
<p>c)</p> 	<p>d)</p> 	<p>e)</p> 
Związek	R ₁	R ₂
LI	a	c
LII	b	c
LIII	a	d
LIV	b	d
LV	a	e
LVI	b	e

Wszystkie otrzymane związki (LI – LVI) okazały się mniej aktywne od macierzystego acyklowiru i RA-5021 w odniesieniu do szczepów YS oraz OKA wirusa HHV-3.

Stwierdzono, że zastąpienie podstawnika 6-fenyloвого przez 6-heteroaryłowy, nie wpływa w istotny sposób na aktywność trójcyklicznych pochodnych ACV i RA-5021. Ponadto zaobserwowano, że pochodne 5-bromo-2-tienylowe (LIII i LIV) utraciły właściwości fluorescencyjne, natomiast w przypadku pochodnych 2-tienylowych (LI i LII) oraz 2-furanyłowych (LV i LVI) zostały one zredukowane [93].

Inna grupa badaczy zsyntetyzowała trójcykliczne analogi guanozyny, będące modyfikacjami struktur 9-[4- α -(hydroksymetylo)cyclopent-2-en-1- α -ylo]guaniny (CBV), (-)- β -D-(2R,4R)-1,3-dioksolanoguanozyny (DXG), 3'-azydo-3'-deoksyguanozyny (AZG) lub 2'-C-metyloguanozyny (MG) (Tabela 6) [94].

Tabela 6. Struktura najbardziej aktywnych przeciwwirusowo trójcyklicznych analogów CBV, DXG, AZG oraz MG

		
a)	b)	c)
		
d)	e)	f)
		
Związek	R ₁	R ₂
LVII	a	e
LVIII	b	f
LIX	c	f
LX	d	e

Stwierdzono, że selektywność działania przeciwwirusowego skorelowana jest ze strukturą ugrupowania cukrowego. Trójcykliczne pochodne MG wykazywały aktywność przeciwko HCV, podobnie jak związek macierzysty. Również pochodne aktywnych przeciwko wirusowi HIV związków CBV, DXG oraz AZG zachowały kierunek działania substancji wyjściowych. Zauważono ponadto, że aktywność przeciwwirusowa związana

jest z zasobnością w elektrony dołączonego ugrupowania trójcyklicznego. Pochodne zawierające ugrupowania elektronodonorowe, takie jak 4-MeO-Ph, 4-NMe₂-Ph (Tabela 6, podstawnik e), 4-NEt₂-Ph (Tabela 6, podstawnik f), czy podstawnik 2-tiofenylowy, charakteryzowały się aktywnością zbliżoną do związków macierzystych. Natomiast podstawienie elektronoakceptorową grupą etylową, 4-CN-Ph lub 4-Cl-Ph skutkowało spadkiem lub utratą aktywności [94]. Powyższe obserwacje są zgodne z wynikami wcześniejszych badań trójcyklicznych pochodnych ACV i GCV, gdzie przyłączenie grupy 4-NO₂-Ph, 3-MeO-Ph, czy 4-CF₃-Ph wywierało niekorzystny wpływ na aktywność otrzymanych pochodnych [65]. W analizowanej grupie związków najbardziej aktywne pochodne 4-NMe₂-Ph-TCBV (LVII), 4-NEt₂-Ph-TDXG (LVIII), 4-NEt₂-Ph-TAZG (LIX) oraz 4-NMe₂-Ph-TMG (LX) charakteryzowały się aktywnością nieznacznie większą od substancji wyjściowych [94].

Zbliżona aktywność niektórych pochodnych trójcyklicznych i ich związków macierzystych skłoniła do wysunięcia hipotezy, że ta grupa związków może stanowić proleki. Zbadano zawartość najbardziej aktywnego przeciwko HCV związku LX oraz jego mono- di- i trifosforanów w komórkach Huh-7 (linia komórkowa ludzkiego raka wątroby, ang. *Human Hepatoma Cell Line*). Po trwającej cztery godziny inkubacji stwierdzono brak któregośkolwiek z powyższych związków. Odnotowano natomiast istotny poziom związku macierzystego MG oraz jego form ufosforylowanych, zarówno wewnątrz komórek, jak i w przestrzeni pozakomórkowej. Obserwacja sugeruje, że aktywność trójcyklicznej pochodnej MG wynika z konwersji najpierw do MG, a następnie do trifosforanu MG. Określając szybkość przemiany innych pochodnych trójcyklicznych do ich związków macierzystych stwierdzono, że najbardziej aktywny LIX, w środowisku wodnym jest nietrwały, a jego t_{0,5} wynosi 25 minut. Natomiast w roztworze etanolowym, w czasie 72 godzin ulega konwersji jedynie 1% tej substancji. Mniej aktywne pochodne AZG i MG wykazywały znacznie większą trwałość w roztworach wodnych.

Wynika z tego, że bardziej trwałe analogi są wolniej przekształcane do aktywnych związków macierzystych, wykazują więc słabsze działanie w porównaniu z pochodnymi szybciej konwertowanymi do substancji aktywnych [94]. Jednak oceniając trwałość aktywnego przeciwwirusowo 6-(4-MeOPh)-TACV w środowisku wodnym okazało się, że powoli ulega on konwersji do acyklowiru (4% w ciągu 4 dni, 35% w ciągu 3 tygodni), więc jego aktywność nie daje się łatwo wyjaśnić przyjętym założeniem [94].

5. Proleki

Proleki to substancje o aktywności biologicznej bardzo niskiej lub zupełnie jej pozbawione. Właściwą aktywność uzyskują uwalniając substancje czynne na drodze przemian chemicznych lub enzymatycznych w organizmie. Uwalnianie substancji czynnej z proleku zachodzi przed, w czasie lub po jego absorpcji, czasem dopiero po dotarciu do miejsca działania [95, 96]. Termin „prolek” został po raz pierwszy użyty przez Adriena Alberta w 1958 roku [97]. Jednak idea proleku powstała znacznie wcześniej. Najprawdopodobniej pierwszym celowo zaprojektowanym prolekiem była metenamina wprowadzona do leczenia w 1899 roku [98, 99]. Natomiast pierwszą substancją spełniającą kryteria proleku był acetanilid stosowany od 1867 roku jako lek przeciwgorączkowy. Dopiero późniejsze odkrycie, że za jego aktywność odpowiada powstający w wyniku hydroksylacji pierścienia aromatycznego paracetamol, sprawiło że acetanilid został sklasyfikowany jako prolek [100].

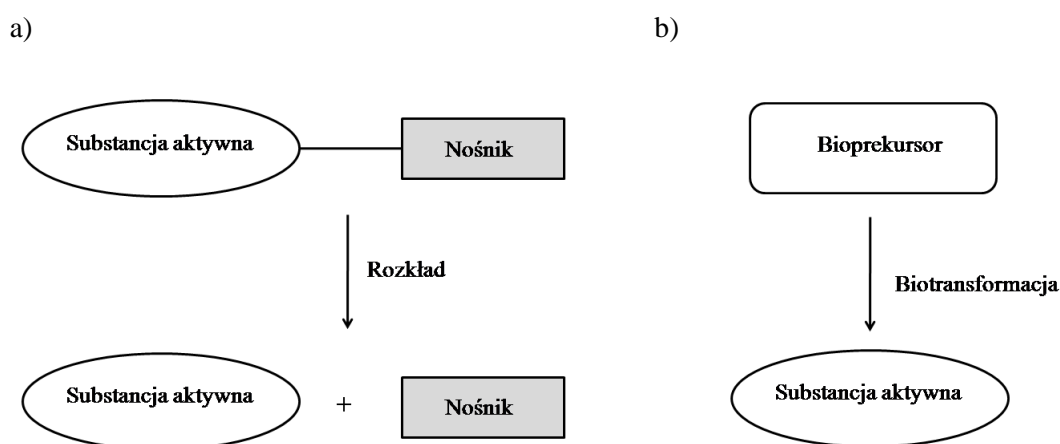
Od lat 60. dwudziestego wieku obserwuje się stały wzrost zainteresowania otrzymywaniem i stosowaniem proleków. Szacuje się, że obecnie około 10% dostępnych na całym świecie środków leczniczych należy do proleków, natomiast w 2008 roku stanowiły one 1/3 wszystkich zarejestrowanych leków o małej masie cząsteczkowej [101].

Celem projektowania proleków jest optymalizacja, tych właściwości związków wywierających pożądane działanie farmakologiczne, które powodują problemy z dalszym rozwojem leku. Wyróżnia się trzy podstawowe, często nakładające się, cele związane z otrzymywaniem proleków:

- farmaceutyczne – zmniejszenie niedogodności dotyczących technologii postaci leku poprzez poprawę rozpuszczalności, trwałości chemicznej, właściwości organoleptycznych (smak, zapach), zmniejszenie działania drażniącego i bólu po podaniu miejscowym
- farmakokinetyczne – poprawa właściwości ADME (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja) polegająca m.in. na zwiększeniu wchłaniania (przy podaniu doustnym a także innymi drogami), ograniczeniu metabolizmu leku przed osiągnięciem miejsca działania, zwiększeniu selektywności dostarczania leku do miejsca działania, modyfikacji przekraczania bariery krew-mózg, optymalizacji długości czasu działania

- farmakodynamiczne – zmniejszenie toksyczności, poprawa indeksu terapeutycznego, tworzenie leków zawierających dwie substancje czynne (strategia ko-leków) [95, 100, 102].

Większość stosowanych obecnie proleków stanowią tzw. proleki związane z cząsteczką nośnika chemicznego (ang. *carrier-linked prodrugs*) (Ryc. 11a). Są to związki otrzymane w wyniku prostej modyfikacji grupy funkcyjnej substancji czynnej, poprzez utworzenie estru, amidu, węglanu, karbaminianu, oksymu, fosforanu, zasady N-Mannicha, iminy, czy koniugatu z PEG [100, 103]. W organizmie prolek ulega przekształceniu odłączając nośnik i uwalniając substancję aktywną. Istotny jest wybór odpowiedniego nośnika, który powinien odpowiednio zabezpieczać substancję czynną, być trwały podczas przechowywania i podawania leku, a po uwolnieniu związku aktywnego ulegać biodegradacji do nieaktywnych metabolitów oraz być szybko eliminowany z organizmu. Idealny nośnik powinien ponadto być niedrogi, łatwy do otrzymania i pozbawiony właściwości immunogennych [95, 100, 104, 105].



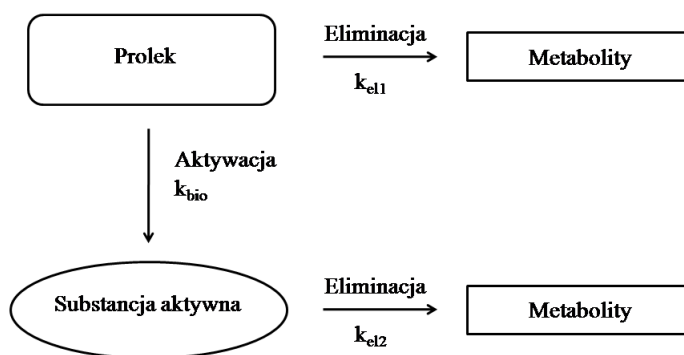
Ryc. 11. Budowa i schemat aktywacji a) proleków związanych z cząsteczką nośnika; b) bioprekursorów (wg [106]).

Proleki związane z nośnikiem można podzielić na dwuczęściowe (ang. *bipartate*), gdzie nośnik przyłączony jest bezpośrednio do substancji aktywnej oraz trzyczęściowe (ang. *tripartate*), w których nośnik połączony jest z lekiem za pomocą łącznika. Wyróżniamy ponadto ko-leki (ang. *co-drugs*, *mutual prodrugs*) tworzone przez połączone ze sobą dwie substancje aktywne, które stanowią dla siebie nawzajem nośniki [100, 103]. Ko-lek stanowi między innymi połączenie L-DOPA i entakaponu w postaci karbaminianu, które poprawia skuteczność dostarczania dopaminy do mózgu. Innym przykładem jest ester kwasu L-askorbinowego i kwasu retinowego, dzięki któremu zwiększa się

przezskórne przenikanie obu leków [107]. Innym rodzajem substancji, które wymagają aktywacji w organizmie są bioprekursory (Ryc. 11b). Związki te nie zawierają nośnika, a ich struktura jest inna niż budowa substancji aktywnej. W związku z tym aktywacja bioprekursorów nie polega na prostym usunięciu grupy funkcyjnej, lecz na przekształceniu do innego związku, najczęściej na drodze reakcji utlenienia lub redukcji. W wyniku reakcji powstaje substancja, która posiada aktywność biologiczną lub jest dalej przekształcana do aktywnego metabolitu [100, 103, 108]. Do bioprekursorów należą m.in. dekspantenol, sulindak, czy nabumeton [96, 100, 109].

Poznanie procesów biotransformacji przyczynia się do otrzymywania nowych substancji leczniczych. Wiele leków ulega w organizmie przekształceniu do aktywnych metabolitów. Często charakteryzują się one lepszym profilem bezpieczeństwa od substancji macierzystych i stają się samodzielnymi kandydatami na leki. Najlepszym przykładem jest paracetamol, stanowiący metabolit fenacetyny. W porównaniu z substancją wyjściową wykazuje on lepsze działanie przeciwbólne, a jednocześnie nie wywołuje methemoglobinemii i niedokrwistości hemolitycznej [108, 110].

Dla efektywności działania zarówno w przypadku proleków, jak i bioprekursorów, istotna jest szybkość biotransformacji do substancji aktywnej po osiągnięciu miejsca działania (stała szybkości k_{bio}). Musi być ona większa od szybkości eliminacji niezmienionego proleku (stała szybkości k_{el1}) i szybkości eliminacji substancji aktywnej (stałą szybkości k_{el2}). Tylko wtedy substancja posiadająca aktywność biologiczną może uzyskać stężenie większe od wartości progowej (Ryc. 12).



Ryc. 12. Zależności między stałą biotransformacji a stałymi eliminacji (wg [6]).

Alternatywnym sposobem otrzymywania proleków jest wewnątrzcząsteczkowe podejście chemiczne, w którym projektowanie następuje w oparciu o obliczenia z wykorzystaniem metod orbitali cząsteczkowych (MO, ang. *Molecular Orbital*) i mechaniki

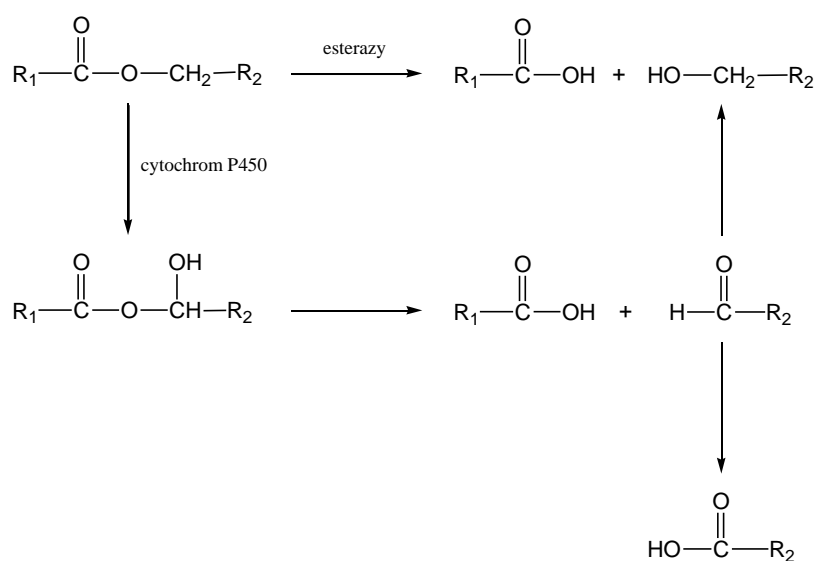
molekularnej (MM, ang. *Molecular Mechanics*) oraz korelację między wartościami doświadczalnymi a obliczonymi. W tej metodzie żaden enzym nie bierze udziału w konwersji proleku do substancji macierzystej. Interkonwersja proleku jest kontrolowana wyłącznie przez etap ograniczający szybkość reakcji wewnątrzcząsteczkowej [103].

5.1. Enzymy aktywujące proleki zawierające ugrupowanie estrowe

Zgodnie z definicją, prolek jest nieaktywną formą leku. W związku z tym kluczowa dla uzyskania efektu farmakologicznego jest jego aktywacja w organizmie. Zdecydowana większość proleków ulega aktywacji enzymatycznej, najczęściej przy udziale hydrolaz lub enzymów cytochromu P450 [95, 111]. Należy pamiętać, że aktywność wielu enzymów zaangażowanych w aktywację proleków podlega zmienności osobniczej. Przyczyny tej zmienności wynikają zarówno z polimorfizmu genetycznego, jak również z wpływu stosowanych równocześnie innych leków czy ksenobiotyków, wieku, płci, czy współistniejących chorób [112]. Powyższe czynniki utrudniają przewidywanie stopnia i szybkości konwersji proleku do postaci aktywnej. Występują ponadto międzygatunkowe różnice w aktywacji enzymatycznej, co również stanowi przeszkodę do przewidywania losów proleku w ustroju człowieka na podstawie obserwacji u zwierząt [95].

Projektując prolek należy zadbać, by wprowadzona modyfikacja strukturalna nie tylko wpłynęła korzystnie na parametry farmakokinetyczne czy farmakodynamiczne substancji aktywnej, lecz także umożliwiła aktywację proleku przez odpowiedni enzym. W przypadku leków macierzystych działających układowo zwykle dąży się by otrzymany prolek był substratem dla powszechnie występujących i akceptujących różnorodne substancje hydrolaz, takich jak peptydazy, fosfatazy, a zwłaszcza esterazy.

Wiele proleków posiada w strukturze ugrupowanie estrowe. Należą do nich m.in. penicyliny (bakampicylina, piwampicylina), cefalosporyny (aksetyl cefuroksymu, piwoksyf cefetamet), makrolidy (cykliczny węglan erytromycyny), witaminy (octan retinolu, octan α - tokoferolu), leki β -adrenolityczne (benzoesan timololu) i β -adrenergiczne (ibuterol, bambuterol) [6]. Usunięcie wiązania estrowego następuje najczęściej przy udziale powszechnie występujących w organizmie esteraz takich jak karboksyloesterazy, acetylocholinoesterazy, butyrylocholinoesterazy, paraoksonazy i aryloesterazy (Ryc. 13). Możliwy jest również rozpad wiązania estrowego w efekcie utlenienia katalizowanego enzymami cytochromu P450 (Ryc. 13) [111].



Ryc. 13. Usunięcie wiązania estrowego przy udziale esteraz lub enzymów cytochromu P450 (wg [111]).

Karboksyloesterazy, acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy należą do α/β -hydrolaz. Wykazują zbliżoną budowę i mechanizm działania. Ze względu na niezbędną dla aktywności obecność seryny, bywają nazywane esterazami serynowymi. Reakcje przez nie katalizowane wykorzystują tzw. triadę katalityczną składającą się z reszt aminokwasowych seryny, kwasu glutaminowego oraz histydyny [113, 114]. Enzymy te są niezależne od kafaktorów, takich jak np. jony nieorganiczne, są jednak hamowane przez związki fosforoorganiczne. Szacuje się, że przez tę grupę enzymów rozkładane jest 50% stosowanych obecnie proleków [100].

Karboksyloesterazy odgrywają istotną rolę w metabolizmie ksenobiotyków oraz substancji endogennych (np. palmityno-CoA). Wykazują szeroką specyficzność substratową, poza estrami kwasów karboksylowych, hydrolizują też m.in. tioestry. Ponadto demonstrują aktywność aryloesteraz, acetyloesteraz, amidaz, czy lipaz oraz biorą udział w procesach transestryfikacji [111]. Ponieważ karboksyloesterazy są rozmieszczone w całym organizmie uważa się, że prawdopodobieństwo ich wysycenia oraz możliwość interakcji substratu z innymi lekami są mało istotne [95, 111]. Większość karboksyloesteraz można przyporządkować do jednej z dwóch rodzin: CES1 lub CES2. Poziom enzymów grupy CES1 u ludzi jest bardzo wysoki w wątrobie. Występują jednak również w innych tkankach, za wyjątkiem jelit. Natomiast ekspresja karboksyloesteraz CES2 jest znacznie mniejsza i zachodzi głównie w nerkach i jelitach [115]. Obie grupy charakteryzują się również odmiennością substratową. CES1 preferuje hydrolizę estrów o dużej części

acylowej i małej alkoholowej, np. temokaprylu. Z kolei grupa CES2 wydajniej hydrolizuje estry o niewielkim ugrupowaniu acylowym i większej części alkoholowej, takie jak irynotekan [116]. Powyższe różnice w rozmieszczeniu i specyficzności substratowej sprawiają, że wykorzystanie karboksyloesteraz jest użyteczne w trakcie projektowania proleków, zwłaszcza estrowych i amidowych. Prolekami aktywowanymi przez karboksyloesterazy są m.in. kapecytabina [117], 2-etylowęglan paklitakselu [118], estrowe proleki propranololu [119].

Cholinoesterazy to określenie stosowane zarówno w odniesieniu do acetylocholinoesterazy (AChE, ang. *Acetylcholinesterase*), jak i butyrylocholinoesterazy (BChE, ang. *Butyrylcholinesterase*), nazywanej także pseudocholino-esterazą. Enzymy te różnią się specyficznością substratową i niektórymi inhibitorami. Acetylocholinoesteraza wykazuje wysoką aktywność katalityczną, jest jednym z najszybciej działających enzymów. Głównym substratem dla tego enzymu jest acetylocholina, którą rozkłada w synapsach cholinergicznym i połączeniach nerwowo-mięśniowych. Ponadto AChE występuje we krwi, w obrębie błon komórkowych erytrocytów. Jej substraty stanowią także niektóre estry, amidy i anilidy. AChE bierze również udział w aktywacji proleków [111, 120], takich jak estry propranololu [119], acyklowiru [121], chlorowodorek dipiwefryny [122]. W przeciwieństwie do karboksyloesteraz, enzym ten wykazuje wysoką specyficzność substratową. Wynika to prawdopodobnie z różnic w budowie miejsca aktywnego enzymów [114]. W ostatnich latach sugeruje się istotną rolę acetylocholinoesterazy w wielu procesach biologicznych. Bada się m.in. zależność między stężeniami w surowicy AChE i paraoksonazy, a niepokojem i stanami lękowymi [123]. Inne badania sugerują związek acetylocholinoesterazy z rozwojem miażdżycy [124].

Butyrylocholinoesteraza również wykazuje wysoką aktywność katalityczną, jest jednak selektywna wobec butyrylocholiny i propionylcholiny. Charakteryzuje się ona szerszą niż AChE swoistością substratową. Wytwarzana jest w wątrobie, a największe stężenie osiąga w osoczu. BChE hydrolizuje wiele estrów, w związku z czym jest zaangażowana również w procesy detoksykacji ksenobiotyków oraz odgrywa istotną rolę w metabolizmie m.in. leków miejscowo znieczulających [125], sukcylocholiny [126], aspiryny [127], czy heroiny [128]. Ponadto uczestniczy w aktywacji proleków, takich jak estry propranololu [119], bambuterol [129], octan metyloprednizolonu [130], diaspirynian izosorbidu [131].

Ważną grupą enzymów są również paraoksonazy. Wykazują one odmienny od opisanych wcześniej, mechanizm działania. Ich aktywność jest bowiem zależna od jonów

wapnia. Trzy enzymy z tej grupy: PON1, PON2 oraz PON3, katalizują reakcje hydrolizy szerokiego spektrum związków, takich jak estry aromatycznych kwasów karboksylowych, laktonów, cyklicznych węglanów, organicznych fosforanów i fosfinianów [111]. Enzym PON1 wytwarzany jest głównie w wątrobie, a obecny we krwi i mikrosomalnej frakcji wątroby. PON3 występuje głównie w wątrobie, w mniejszym stężeniu w surowicy, natomiast PON2 wydaje się być rozmieszczony we wszystkich tkankach oprócz osocza. PON1 odgrywa istotną rolę w aktywacji szeroko stosowanego leku przeciwplatekowego – kłopidogrelu. Odpowiada za drugi etap przekształcania tego proleku do postaci aktywnej. Jednocześnie aktywność PON1 jest silnie zależna od polimorfizmu jej genu, którego zidentyfikowano prawie 200 wariantów, co tłumaczy różny stopień odpowiedzi pacjentów na terapię kłopidogrelem [132, 133]. Również pozostałe paraoksonazy wykazują znaczny polimorfizm. Inne proleki ulegające aktywacji pod wpływem paraoksonaz, to prulifloksacyna [134, 135], simwastatyna czy lowastatyna [134]. Ta grupa enzymów wykazuje ponadto aktywność antyoksydacyjną, wydaje się więc odgrywać istotną rolę w detoksykacji oraz prewencji miażdżycy tętnic i chorób układu krążenia [111]. Na aktywność paraoksonaz, poza czynnikami genetycznymi, wpływają ponadto czynniki środowiskowe. Niektóre leki (np. fenobarbital), alkohol oraz związki rtęci hamują, natomiast dym papierosowy zwiększa aktywność PON.

Biorąc pod uwagę szeroką częstość swoistość substratową enzymów, staje się oczywiste, że nie tylko esterazy biorą udział w rozkładzie substancji o budowie estrowej. Albuminy surowicy krwi ludzkiej występują w osoczu i płynach zewnątrzkomórkowych. Ich główną rolą jest wiązanie i transport we krwi licznych substratów. Wykazują one również aktywność katalityczną i biorą udział w aktywacji proleków [136]. Ich aktywność jest jednak znacznie mniejsza niż typowych esteraz. Dla estrów kwasu nikotynowego stałe szybkości hydrolizy reakcji katalizowanych przez albuminy były 4000 – 900000 razy mniejsze niż dla reakcji katalizowanych przez karboksyoesterazy [136]. Poza albuminami aktywność esteraz wykazują również: karboksypeptydaza A [137], dehydrogenaza aldehydowa [138], anhidrazy węglanowe B i C [139], trypsyna [140] i lipaza [141], co należy uwzględnić projektując proleki o budowie estrowej.

Drugi istotny szlak aktywacji proleków estrowych w organizmie opiera się na działaniu cytochromu P450. Szacuje się, że rodzina enzymów cytochromu P450 bierze udział w 75% wszystkich enzymatycznych reakcji metabolizmu leków, również wielu proleków. Istnieją liczne dowody, że polimorfizm genetyczny enzymów cytochromu P450 przyczynia się do zmienności aktywacji proleków, a w związku z tym również do różnic w

skuteczności i bezpieczeństwie stosowania proleków aktywowanych na tej drodze [95, 142, 143]. Izoenzymy charakteryzujące się polimorfizmem, to: CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, a zwłaszcza CYP2D6 (w jego obrębie występuje 75 alleli). Niektóre spośród alleli CYP2D6 warunkują zmniejszoną aktywność lub nawet utratę funkcji enzymatycznej [144]. Proleki ulegające aktywacji przy udziale enzymów cytochromu P450 to m.in. losartan dzięki CYP2C9 [145], lowastatyna i simwastatyna – CYP3A4 [146], klopidogrel – CYP2C19 [147], kodeina i tramadol – CYP2D6 [148], cyklofosfamid – CYP2B6, CYP3A4, CYP2C19 [111, 149], tegafur – CYP2A6, CYP1A2, CYP2C8 [149], tamoksyfen – CYP2D6, CYP3A4 [111, 149, 150].

Projektując proleki o budowie estrowej trzeba wziąć pod uwagę, wspomniane wcześniej, trudności w przenoszeniu informacji z badań na zwierzętach na spodziewane efekty u ludzi. Gryzonie często odznaczają się większą aktywnością hydrolaz osoczowych niż ludzie, z kolei aktywność hydrolaz z jelicie cienkim psów jest znacznie mniejsza [151]. Karboksyoesterazy występują zarówno w mózgach ludzkich, jak i szczurzych. Jednak tylko u ludzi wchodzi w skład bariery krew-mózg i odgrywają rolę w ograniczaniu przenikania substancji przez błony komórkowe [111, 152]. Paraoksonaza PON1 u większości ssaków występuje we wszystkich tkankach, natomiast u ludzi tylko we krwi i wątrobie. Należy też uwzględnić różnice w ekspresji tkankowej enzymów i to, że esterazy często występują w organizmie w różnych formach. Cholinoesterazy AChE i BChE mogą istnieć w następujących formach

- typ I – amfililowe dimery,
- typ II – amfililowe monomery i dimery
- typ III – tetrametry z resztą hydrofobową
- typ IV – formy z resztą kolagenowo-podobną i formy asymetryczne
- typ V – tetrameryczne formy rozpuszczalne [153, 154].

W mózgu dominują formy monomeryczne i tetrameryczne, których aktywność ma związek z chorobą Alzheimera [111]. W ludzkim mózgu wyodrębniono trzydzieści rodzajów karboksyoesteraz, natomiast w wątrobie tylko pięć. Zaobserwowano, że cykliczne węglany oraz γ -laktony glikokortykosteroidów, które są szybko inaktywowane w ludzkim osoczu i mają ograniczoną ogólnoustrojową ekspozycję i działania niepożądane, wykazują zadowalającą stabilność w docelowej tkance płuc [111, 155]. Poza tym, w przypadku nowotworów obserwuje się różnice w ekspresji np. karboksyoesteraz pomiędzy tkanką raka okrężnicy a przyległymi tkankami zdrowymi [156]. Różnice ekspresji międzygatunkowej można ograniczyć stosując enzymy rekombinowane lub ekstrakty

tkanek ludzkich. Natomiast różnice w aktywności enzymów w chorobach nowotworowych są wykorzystywane podczas tworzenia selektywnie działających leków przeciwnowotworowych.

Pewien problem związany z użyciem proleków będących substratami dla esteraz stanowi też ich przedwczesna hydroliza. Często zachodzi ona podczas wchłaniania w enterocytach przewodu pokarmowego. Uwolnienie w enterocytach substancji aktywnej, która zazwyczaj jest bardziej polarna i słabiej przenika przez błony biologiczne, ogranicza możliwość przedostania się jej do krwi. Skutkuje to zmniejszoną biodostępnością niektórych proleków, m.in. z grupy cefalosporyn czy inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę [157].

5.2. Nowe terapie oparte na prolekach

Nowym podejściem wykorzystującym proleki są terapie ADEPT (ang. *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*, enzymatyczna terapia prolekowa kierowana przeciwciałem), GDEPT (ang. *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*, enzymatyczna terapia prolekowa kierowana genem) i LEAPT (ang. *Lectin-Directed Enzyme-Activated Prodrug Therapy*, aktywowana enzymatycznie terapia prolekowa kierowana lektyną) [108]. Ich celem jest selektywne dostarczanie związków cytotoksycznych do komórek nowotworowych. Metoda ADEPT używa przeciwciał monoklonalnych lub ich fragmentów do przenoszenia enzymów mających zdolność specyficznego aktywowania nietoksycznych proleków do związków cytotoksycznych [108, 158]. W pierwszym etapie podaje się koniugat enzym-przeciwciało, który wiąże się ze specyficznym, obecnym tylko na powierzchni komórek nowotworowych, antygenem. Po czasie potrzebnym do usunięcia z organizmu niezwiązanego z antygenem koniugatu, podaje się prolek. Jego aktywacja enzymatyczna zachodzi w przestrzeni zewnątrzkomórkowej tkanki nowotworowej. Dzięki temu efekt cytotoksyczny wywierany jest też na sąsiednie komórki nowotworowe, nieposiadające na powierzchni antygeny (tzw. *bystander effect*). Jednocześnie zdolność cząsteczki enzymu do aktywacji wielu cząsteczek proleku sprawia, że stężenie leku w tkance nowotworowej jest znacznie większe niż w zdrowej [159 – 162]. Modyfikacją metody ADEPT jest system ADAPT (ang. *Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy*, abzymowa terapia prolekowa kierowana przeciwciałem), w którym enzym zastąpiony jest przeciwciałem katalitycznym [163].

Prolek w metodzie ADEPT powinien charakteryzować się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, stabilnością w fizjologicznym pH oraz odpowiednimi parametrami farmakokinetycznymi. Ponadto musi być dobrym substratem dla użytego enzymu aktywującego i być znacznie mniej toksyczny od substancji aktywnej [161]. Określone wymagania stawiane są również enzymom stosowanym do tworzenia koniugatów w systemie ADEPT. Powinny odznaczać się one wysoką aktywnością katalityczną w miejscu działania, dobrą stabilnością i zdolnością aktywacji dużej liczby cząsteczek proleku [161].

Proleki wykorzystywane w terapii ADEPT to zazwyczaj pochodne znanych, wysoce aktywnych leków przeciwnowotworowych, których stosowanie ogranicza znaczna toksyczność systemowa i wąski indeks terapeutyczny. Terapia ADEPT nie jest jednak wolna od ograniczeń. Najistotniejszymi są zbyt mała dla osiągnięcia efektu terapeutycznego ilość antygenów nowotworowych oraz wysoka immunogenność koniugatów, uniemożliwiająca powtarzanie terapii. Problem może stanowić również zewnątrzkomórkowa aktywacja proleku, która wymaga zastosowania substancji mających zdolność przenikania przez błony biologiczne [158, 161, 162]. Większość otrzymanych systemów ADEPT znajduje się w fazie badań przedklinicznych, niektóre na etapie I fazy badań klinicznych. Obiecujący wydaje się system tworzony przez koniugat fragmentu scFv przeciwciała MFE-23 anti-CEA i bakteryjnej karboksypeptydazy G₂ oraz kwasu 4{[di(2-jodoetylo)amino]fenylo}oksy-karbonylo-L-glutaminowego jako proleku. System ten, w przeciwieństwie do większości pozostałych, charakteryzuje się niską immunogennością koniugatu i szybką eliminacją jego niezwiązanej części z organizmu [164, 165]. Ponadto konstruuje się systemy ADEPT m.in. dla proleków doksorubicyny (fosforan [166], fenoksyacetamid [167], glukuronid [168], połączenia z cefalosporyną [169]), iperytu azotowego (połączenie z cefalosporyną [170]), melfalanu (fenoksyacetamid [167]), metotreksatu (α -alaninowa pochodna [171]), 5-fluorouracylu (5-fluorocytozyna [172]) oraz etopozydu (fosforan [173]).

Innym przykładem terapii wykorzystującej proleki i gwarantującej selektywne zabijanie komórek nowotworowych jest GDEPT, nazywany również terapią genu samobójczego. W tej metodzie do komórek nowotworowych wprowadzane są geny kodujące enzymy, które mają zdolność aktywacji dostarczonego następnie proleku do substancji cytotoksycznych [108, 174 – 176]. Najczęściej wprowadza się geny enzymów wirusowych lub bakteryjnych, niewystępujących normalnie u ssaków, lub enzymów ludzkich, które w komórkach nowotworowych są nieobecne bądź występują jedynie w niskich stężeniach [100, 158]. Wprowadzanie genów do komórek w metodzie GDEPT

następuje przy użyciu peptydów, lipidów kationowych lub „nagiego” DNA. Wykorzystanie wektorów wirusowych (np. adenowirusów lub retrowirusów) jest natomiast charakterystyczne dla systemu VDEPT (ang. *Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy*, enzymatyczna terapia prolekowa kierowana wirusem) [174 – 176]. W obu tych metodach aktywacja proleku zachodzi dopiero po jego przeniknięciu przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Istotne jest więc by właściwości fizykochemiczne substancji stosowanej jako prolek pozwalały na przekraczanie barier biologicznych. Korzystna dla efektywności terapii jest również zdolność przenikania aktywnego leku do okolicznych komórek (*bystander effect*) oraz oddziaływanie na komórki nowotworowe w każdym etapie cyklu komórkowego [108, 177]. Ograniczenia związane z GDEPT i VDEPT polegają na braku wydajnych, i selektywnych wobec komórek nowotworowych wektorów przenoszących geny kodujące enzymy. Częstym problemem jest również nieefektywny *in vivo* proces transdukcji komórek [176].

Prolekami najczęściej wykorzystywanymi w metodzie GDEPT są analogi nukleozydowe oraz związki alkilujące [158, 174]. W terapii glejaka wielopostaciowego i guzów mózgu bada się wprowadzenie do komórek nowotworowych genu kodującego kinazę tymidynową wirusa HHV. Dzięki temu możliwe jest przekształcenie podanego gancyklowiru w aktywny trifosforan, który po wbudowaniu się do DNA komórki powoduje zahamowanie syntezy kwasu nukleinowego, a następnie śmierć komórki [178, 179]. Z kolei w chemioterapii nowotworów przewodu pokarmowego, piersi, głowy i szyi często stosowany jest 5-fluorouracyl (5-FU). Zastąpienie 5-FU 5-fluorocytozyną (5-FC), poprzedzone wprowadzeniem do komórek nowotworowych genu deaminazy cytozynowej bakterii *Escherichia coli*, prowadzi do obniżenia ogólnoustrojowej cytotoksyczności leku przy zwiększeniu stężenia substancji aktywnej w zmienionej chorobowo tkance [180 – 182]. Ponadto bada się skuteczność wprowadzenia do komórek nowotworowych szczurzego izoenzymu CYP2B1 w celu selektywnego zwiększenia ekspozycji tych komórek na cytotoksyczne metabolity (iperytowe pochodne amidu kwasu fosforowego) będących prolekami cyklofosfamidu i ifosfamidu [108, 183, 184].

Terapia LEAPT jest natomiast dwuczęściowym systemem składającym się z dostarczanego selektywnie do komórek nowotworowych glikozylowanego enzymu oraz proleku połączonego z ugrupowaniem cukrowym. W metodzie tej wykorzystuje się enzymy nie występujące naturalnie u danego gatunku, np. nieobecną u ssaków α -ramnozydazę, które są syntetycznie glikozylowane [108, 185, 186]. W takiej formie enzym wiąże się ze specyficznym dla węglowodanów receptorem i na drodze endocytozy jest

dostarczany do komórek docelowych. Następnie podaje się prolek z przyłączonym fragmentem cukrowym (np. ramnozą), stanowiącym substrat dla użytego enzymu. Po osiągnięciu przez prolek komórek docelowych, następuje odszczepienie reszty cukrowej i uwolnienie substancji aktywnej [186]. Skuteczność terapii LEAPT wykazano dla połączenia doksorubicyny z ramnozą zastosowanego w celu zmniejszenia guza w modelu raka wątrobowokomórkowego (Hep2). Wykazano, że wykorzystany model pozwala uzyskać większe stężenie leku w miejscu działania [186]. Ze względu na liczne zachodzące w organizmie procesy wiązania węglowodanów, prawdopodobna wydaje się możliwość użycia powyższej metody także dla innych typów komórek. Konieczna jest jedynie identyfikacja receptorów potencjalnego znaczenia medycznego i zastosowanie węglowodanów specyficznych dla receptorów komórek docelowych. Potencjalnie możliwe jest m.in. wykorzystanie receptorów węglowodanowych na powierzchni makrofagów [187, 188] w terapii chorób związanych z funkcjonowaniem makrofagów, np. lizosomalnych chorób spichrzeniowych [189] czy infekcji HIV [190].

III. CEL PRACY

Celem podjętych badań jest ocena wpływu modyfikacji strukturalnych w obrębie części zasadowej i pseudocukrowej acyklowiru na trwałość chemiczną, enzymatyczną oraz lipofilowość wybranych nowych pochodnych ACV. Badaniami objęto dwie grupy związków – XXVII (3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5*H*-imidazo-[1,2-*a*]puryna) i jego estry oraz estry acyklowiru. Do badań wybrano pięć estrów obu związków (acetylowy, izobutyrylowy, piwaloilowy, etoksykarbonylowy i nikotynowy).

W ramach zamierzonych badań zaplanowano syntezę pięciu estrów acyklowiru. W kolejnym etapie postanowiono określić lipofilowość związku XXVII, ACV (I) oraz ich estrów metodą chromatograficzną (HPLC-UV). Otrzymane estry powinny charakteryzować się zwiększoną lipofilowością względem substancji wyjściowych, co mogłoby pozytywnie wpływać na zwiększenie ilości leku wchłoniętego do ustroju. Planuje się również porównać wyniki uzyskane eksperymentalnie z wartościami c logP uzyskanymi za pomocą technik obliczeniowych (ALOGPS 2.1 program) w celu sprawdzenia możliwości zamiennego stosowania obu metod do określania lipofilowości związków należących do tej grupy.

Dla każdego z analizowanych związków opracowana zostanie metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detekcją UV, do rejestrowania zmian stężenia w obecności produktów jego rozkładu i wzorca wewnętrznego w warunkach rozkładu w środowisku kwasowym, w osoczu ludzkim oraz w osoczu w obecności esterazy. Opracowane metody poddane zostaną walidacji poprzez ocenę takich parametrów jak: selektywność, liniowość, precyzja, dokładność, powtarzalność, zakres i czułość metody, granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), a dla metod opracowanych dla badań trwałości w materiale biologicznym także stabilność analitu.

Planuje się dokonać oceny trwałości związku XXVII za pomocą testu stresowego, przyspieszonego i pośredniego zgodnie z wytycznymi ICH. Na podstawie uzyskanych wyników dokonana zostanie klasyfikacja badanego związku i możliwe stanie się ustalenie dla niego odpowiednich warunków przechowywania.

Badania kinetyczne reakcji hydrolizy kwasowej wykonane zostaną w środowisku kwasu solnego w zakresie stężeń od 0,05 mol/l do 0,50 mol/l (pH 0,42 – 1,38) przy stałej

wartości siły jonowej ($\mu = 0,50$ mol/l). Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność związku XXVII oraz jego estrów w kwasie solnym sprawdzona zostanie możliwość wykonania powyższych badań dla tej grupy związków w roztworach wodno-organiczych (z użyciem glikolu propylenowego i dimetylosulfotlenku). Wyznaczone zostaną obserwowane stałe szybkości reakcji hydrolizy, a następnie opisane odpowiednimi równaniami kinetycznymi zależności $\log k_{pH} = f(pH)$. Na ich podstawie ustalony zostanie ogólny schemat obserwowanych reakcji oraz wyznaczone katalityczne stałe szybkości reakcji. Dla wybranych estrów wyznaczone będą również obserwowane stałe szybkości tworzenia i rozkładu obserwowanego produktu hydrolizy – prawdopodobnie XXVII lub ACV.

Badania kinetyczne hydrolizy analizowanych związków w 80% osoczu ludzkim wykonane zostaną w temperaturze 37°C. Obejmować będą wyznaczenie parametrów kinetycznych: obserwowanych stałych szybkości ($k_{obs.}$) i biologicznych okresów półtrwania ($t_{0,5}$) poszczególnych związków.

Wykonana zostanie również ocena podatności badanych związków na hydrolizę enzymatyczną zachodzącą w obecności esterazy z wątroby wieprzowej w środowisku osocza ludzkiego. Dla obserwowanych reakcji rozkładu wyznaczone zostaną parametry kinetyczne reakcji: $k_{obs.}$ i $t_{0,5}$. Sprawdzane będzie ponadto czy poszczególne związki różnią się podatnością na hydrolizę pod wpływem esterazy i w jaki sposób podatność na działanie enzymu uwarunkowana jest ich budową chemiczną. W celu identyfikacji związku XXVII oraz ACV jako potencjalnych produktów rozkładu estrów trójcyklicznych w płynach ustrojowych, wykonana zostanie również analiza HPLC-MS/MS mieszanin produktów reakcji.

Uzyskane wyniki badań lipofilowości oraz trwałości chemicznej i enzymatycznej pozwolą ocenić wpływ budowy chemicznej estrów ACV i XXVII na ich podatność na rozkład hydrolityczny pod wpływem jonów H^+ , enzymów osoczowych, czy esterazy.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA I WYNIKI

6. Substancje badane

Udostępnione przez dr. hab. Tomasza Ostrowskiego (Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań) (Rozdział 9, Tabela 7):

- XXVII: 3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetyloksy)metylo]-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryna
- Ac-XXVII: 3-[(2-acetoksyetyloksy)metylo]-3,9-dihydro-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryna
- *i*But-XXVII: 3,9-dihydro-3-[(2-izobutyryloksyetyloksy)metylo]-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryna
- Piv-XXVII: 3,9-dihydro-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-3-[(2-piwaloiloksyetyloksy)metylo]-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryna
- Etc-XXVII: 3,9-dihydro-3-[(2-etoksykarbonyloksyetyloksy)metylo]-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryna
- Nic-XXVII: 3,9-dihydro-6-(4-metoksyfenylo)-3-[(2-nykotoiloksyetyloksy)metylo]-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryna

Otrzymane w wyniku syntezy własnej (Rozdział 10, Tabela 8):

- Ac-I: 2-amino-9-[(2-acetoksyetyloksy)metylo]-1,9-dihydro-6*H*-puryn-6-on
- *i*But-I: 2-amino-9-[(2-izobutyryloetoksy)metylo]-1,9-dihydro-6*H*-puryn-6-on
- Piv-I: 2-amino-9-[(2-piwaloiloksyetyloksy)metylo]-1,9-dihydro-6*H*-puryn-6-on
- Etc-I: 2-amino-9-[(2-etoksykarbonyloksyetyloksy)metylo]-1,9-dihydro-6*H*-puryn-6-on
- Nic-I: 2-amino-9-[(2-nykotoiloksyetyloksy)metylo]-1,9-dihydro-6*H*-puryn-6-on

7. Odczynniki

- Acetonitryl do HPLC chromatograficznie czysty (POCh, Gliwice, Polska)
- Acyklowir (Jelfa S.A., Jelenia Góra, Polska)
- Argon sprężony (Air Products, Warszawa, Polska)
- Bezwodnik kwasu izomasłowego 97% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)

- Bezwodnik kwasu nikotynowego > 97% (Tokyo Chemical Industry, Boereveldseweg, Belgia)
- Bezwodnik kwasu piwalowego 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- 4-*N,N*-Dimetyloaminopirydyna (DMAP) 99% (Acros, Geel, Belgia)
- *N,N*-Dimetyloformamid (DMF) cz.d.a., odczynnik FP (POCh, Gliwice, Polska)
- Dimetylu sulfotlenek (DMSO) cz.d.a., odczynnik FP (POCh, Gliwice, Polska)
- Dimetylu sulfotlenek bezwodny (DMSO) 99,7% (Fisher BioReagents, Pittsburgh, USA)
- Dipotasu wodorofosforan cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Disodu wodorofosforan cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Etanol bezwodny 99,8% cz.d.a., odczynnik FP (POCh, Gliwice, Polska)
- Etylu 4-hydroksybenzoesan (nipagina A) 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Guanina 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Kwas octowy 99,5 – 99,9% cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Kwas ortofosforowy(V) 85% cz.d.a., odczynnik FP (POCh, Gliwice, Polska)
- Metanol do HPLC (POCh, Gliwice, Polska)
- Metylu 4-hydroksybenzoesan (nipagina M) \geq 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- 1-Naftol \geq 99% (POCh, Gliwice, Polska)
- Nikotynamid 99% (POCh, Gliwice, Polska)
- Nitrazepam \geq 98,0% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Octowy bezwodnik cz.d.a., odczynnik FP (POCh, Gliwice, Polska)
- Osocze wolne od wirusów HIV, WZW, niehemolizowane (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Poznań, Polska)
- Pirowęglan dietylowy 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Pirydoksyna \geq 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Potasu azotan \geq 99% cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Potasu bromek IR grade do spektroskopii \geq 99%, (POCh, Gliwice, Polska)
- Potasu chlorek \geq 99,5% cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Potasu diwodorofosforan cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- 1,2-Propanodiol Ph Eur. \geq 99,5% (POCh, Gliwice, Polska)
- Ryboflawina 98% (POCh, Gliwice, Polska)
- Sodu azotyn cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Sodu chlorek cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)

- Sodu octan trójwodny cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Sodu wodorotlenek cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Sulfadimetoksyna $\geq 98,5\%$ (TLC) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Sulfafurazol $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Sulfamerazyna reagent plus $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- Sulfatiazol $\geq 98,0\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- TitraFix(TM) odważka analityczna kwas solny 0,1 mol/l (0,1 N) (ciecz), (POCh, Gliwice, Polska)
- TitraFix(TM) odważka analityczna sodu wodorotlenek 0,1 mol/l (0,1 N) (ciecz), (POCh, Gliwice, Polska)
- Tymol 99% (POCh, Gliwice, Polska)
- Wodoru nadtlenek 30% cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)

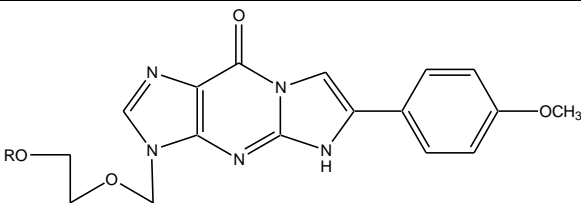
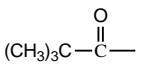
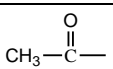
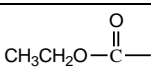
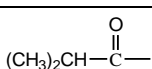
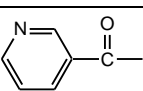
8. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Zestaw 1 – Wysokosprawny chromatograf cieczowy Shimadzu (Kioto, Japonia)
 - 2 pompy LC-20AT
 - pętla dozująca Rheodyne 20 μ l
 - przedkolumna Phenomenex C18 4 x 3,0 mm ID
 - kolumna LiChrospher 100 RP-18 (250 \times 4 mm, 10 μ m) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
 - detektor SPD-20A UV/VIS
 - termostat do kolumny CTO-10AS UP
 - oprogramowanie Chromax 2006, wersja 2.0d
- Zestaw 2 – Wysokosprawny chromatograf cieczowy Merck Hitachi (Tokio, Japonia)
 - 4 pompy L-7100
 - autosampler L-7200
 - termostat do kolumny L-7360
 - kolumna LiChrospher 100 RP-18 (250 \times 4 mm, 5 μ m) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
 - odgazowywacz fazy L-7612
 - detektor DAD L-7455
 - oprogramowanie HPLC System Manager D-7000, wersja 4.1.

- Zestaw 3 – Wysokosprawny chromatograf cieczowy
 - pompa L-6000 A, Merck Hitachi
 - dozownik z pętlą dozującą Rheodyne 20 µl
 - kolumna LiChrospher 100 RP-18, (250 × 4 mm, 5 µm) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
 - detektor LC-3 UV (Pye Unicam, Cambridge, Anglia)
 - przetwornik A/C (Medson, Poznań, Polska)
 - komputer z oprogramowaniem (Medson, Poznań, Polska)
- FTIR spektrofotometr IRAffinity-1 (Shimadzu, Kioto, Japonia)
- Prasa hydrauliczna (Pye Unicam, Cambridge, Anglia) z zestawem do tabletkowania 13 mm (International Crystal Laboratories, Garfield, USA)
- Atlas Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht-Altenhasslau, Niemcy) z termostatem ST-1+ (Pol-Eko, Wodzisław Śląski, Polska)
- Komory klimatyczne (Wamed, Warszawa, Polska)
- Waga analityczna XA 110/X min. 1 mg, dokładność 0,01 mg (Radwag, Poznań, Polska)
- Wirówka Mikro 200 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Niemcy)
- Łaźnia wodna FBH 612 (Fisherbrand, Schwerte, Niemcy)
- pHmetr HI-110 (Hanna Instruments, Cluj-Napoca, Rumunia)
- Naczynka reakcyjne z nakrętką 2 ml i 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- Zestaw pipet automatycznych 0,1-500 µl (Topscien, Ningbo, Chiny)
- Naczynka reakcyjne z nakrętką 2 ml i 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- Płuczka ultradźwiękowa RK 510H (Bandelin electronic, Berlin, Niemcy)
- Filtr do wody demineralizowanej USF 800 (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- Lodówka z zamrażalnikiem Polar typ TS136U (Whirlpool Polska, Warszawa, Polska)
- Zestaw do sączenia (Merck Millipore, Billerica, USA)
- Mieszadło REAX top 451 (Heidolph Brinkman, Elk Grove Village, USA)
- Stoper
- Szkło laboratoryjne

9. Charakterystyka związku XXVII i jego estrów

Tabela 7. Wzory strukturalne badanych związków trójcyklicznych

			
Związek	R	Związek	R
XXVII	H	Piv-XXVII	
Ac-XXVII		Etc-XXVII	
<i>i</i> But-XXVII		Nic-XXVII	

XXVII – kremowy proszek, tt. 246°C (z rozkładem), czystość HPLC 99,3%, UV (MeOH): λ_{\max}/nm , 262, 309, IR (KBr): $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, 1690, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm : 13,02 (1H, s, N5-H), 8,10 (1H, s, 7-H), 8,06 (1H, s, 2-H), 7,86, 7,05 (2 × 2H, 2 × d, fenyl), 3,81 (3H, s, OCH₃), 4,69 (1H, t, OH), 5,52 (2H, s, NCH₂O), 3,52 (4H, 2m, CH₂CH₂), analiza elementarna obl. dla C₁₇H₁₇N₅O₄ (355,35) × 0,25 H₂O: C, 56,74; H, 4,90; N, 19,46, dośw.: C, 56,93; H, 4,78; N, 19,48.

Ac-XXVII – jasnożółty krystaliczny proszek, tt. 249 – 250°C (z rozkładem), czystość HPLC 98,5%, UV (MeOH): λ_{\max}/nm , 262, 308, IR (KBr): $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, 1724, 1680 (C=O), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm : 13,03 (1H, s, N5-H), 8,10 (1H, s, 7-H), 8,07 (1H, s, 2-H), 7,86, 7,06 (2 × 2H, 2 × d, fenyl), 3,82 (3H, s, OCH₃), 5,53 (2H, s, NCH₂O), 4,10, 3,74 (2 × 2H, 2 × m, CH₂CH₂), 1,96 (3H, s, CH₃), ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 170,23 (C=O), 159,65, 126,54, 120,30, 114,48 (fenyl), 151,22 (C-9), 150,28 (C-3a), 146,39 (C-4a), 139,22 (C-2), 129,13 (C-6), 115,43 (C-9a), 101,88 (C-7), 72,14 (NCH₂O), 66,65, 62,73 (CH₂CH₂), 55,27 (OCH₃), 20,54 (CH₃), analiza elementarna obl. dla C₁₉H₁₉N₅O₅ (397,39): C, 57,43; H, 4,82; N, 17,62, dośw.: C, 57,27; H, 4,81; N, 17,43.

*i*But-XXVII – żółty krystaliczny proszek, tt. 253 – 254°C (z rozkładem), czystość HPLC 98,3%, UV (MeOH): λ_{\max}/nm , 262, 308, IR (KBr): $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, 1734, 1690 (C=O), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 13,01 (1H, s, N5-H), 8,09 (1H, s, 7-H), 8,06 (1H, s, 2-H), 7,84, 7,04

(2 × 2H, 2 × d, fenyl), 3,81 (3H, s, OCH₃), 5,52 (2H, s, NCH₂O), 4,10, 3,73 (2 × 2H, 2 × m, CH₂CH₂), 2,42 (1H, m, CH), 0,98 (3H, d, (CH₃)₂), ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 175,99 (C=O), 159,65, 126,53, 120,29, 114,48 (fenyl), 151,22 (C-9), 150,27 (C-3a), 146,38 (C-4a), 139,21 (C-2), 129,11 (C-6), 115,46 (C-9a), 101,87 (C-7), 72,13 (NCH₂O), 66,70, 62,61 (CH₂CH₂), 55,27 (OCH₃), 32,99 (CH(CH₃)₂), 18,60 (CH(CH₃)₂), analiza elementarna obl. dla C₂₁H₂₃N₅O₅ (425,45): C, 59,29; H, 5,45; N, 16,46, dośw.: C, 59,08; H, 5,30; N, 16,23.

Piv-XXVII – jasnożółty proszek, tt. 263 – 264°C (z rozkładem), czystość HPLC 99,1%, UV (MeOH): λ_{max}/nm, 262, 308, IR (KBr): ν_{max}/cm⁻¹, 1730, 1686 (C=O), ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 13,01 (1H, s, N5-H), 8,09 (1H, s, 7-H), 8,06 (1H, s, 2-H), 7,84, 7,05 (2 × 2H, 2 × d, fenyl), 3,81 (3H, s, OCH₃), 5,52 (2H, s, NCH₂O), 4,10, 3,72 (2 × 2H, 2 × m, CH₂CH₂), 1,03 (3H, s, C(CH₃)₃), ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 177,27 (C=O), 159,66, 126,53, 120,29, 114,49 (fenyl), 151,22 (C-9), 150,26 (C-3a), 146,39 (C-4a), 139,20 (C-2), 129,11 (C-6), 115,49 (C-9a), 101,86 (C-7), 72,11 (NCH₂O), 66,68, 62,69 (CH₂CH₂), 55,27 (OCH₃), 38,03 (C(CH₃)₃), 26,64 (C(CH₃)₃), analiza elementarna obl. dla C₂₂H₂₅N₅O₅ (439,47): C, 60,13; H, 5,73; N, 15,94, dośw.: C, 60,16; H, 5,61; N, 15,83.

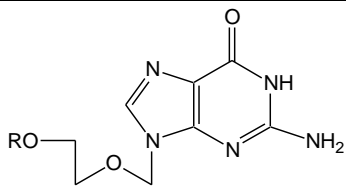
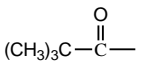
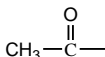
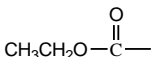
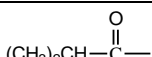
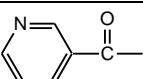
Etc-XXVII – kremowy proszek, tt. 253 – 254°C (z rozkładem), czystość HPLC 98,3%, UV (MeOH): λ_{max}/nm, 262, 308, IR (KBr): ν_{max}/cm⁻¹, 1738, 1678 (C=O), 1288 (C-O, szerokie pasmo), ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 13,00 (1H, s, N5-H), 8,09 (1H, s, 7-H), 8,05 (1H, s, 2-H), 7,84, 7,05 (2 × 2H, 2 × d, fenyl), 3,81 (3H, s, OCH₃), 5,52 (2H, s, NCH₂O), 4,16, 3,74 (2 × 2H, 2 × m, CH₂CH₂), 4,05 (2H, q, (OCH₂)), 1,16 (3H, t, CH₃), ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 154,39 (C=O), 159,65, 126,53, 120,29, 114,47 (fenyl), 151,22 (C-9), 150,25 (C-3a), 146,38 (C-4a), 139,16 (C-2), 129,11 (C-6), 115,47 (C-9a), 101,85 (C-7), 72,12 (NCH₂O), 66,54, 63,52 (CH₂CH₂), 66,07 (OCH₂CH₃), 13,96 (OCH₂CH₃), analiza elementarna obl. dla C₂₀H₂₁N₅O₆ (427,42) × 0,5 H₂O: C, 55,04; H, 5,08; N, 16,05, dośw.: C, 54,83; H, 4,72; N, 15,90.

Nic-XXVII – jasnoróżowy proszek, tt. 245 – 247°C (z rozkładem), czystość HPLC 98,6%, UV (MeOH): λ_{max}/nm, 262, 308, IR (KBr): ν_{max}/cm⁻¹, 1701, 1724 (C=O), ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 12,95 (1H, s, N5-H), 8,08 (1H, s, 7-H), 8,04 (1H, s, 2-H), 7,83, 7,05 (2 × 2H, 2 × d, fenyl), 3,81 (3H, s, OCH₃), 5,56 (2H, s, NCH₂O), 4,41, 3,89 (2 × 2H,

2 × m, CH₂CH₂), 8,95, 8,72, 8,08, 7,43 (4H, d, dd, m, dd, grupa nikotynowa), ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 164,48 (C=O), 159,63, 126,54, 120,32, 114,48 (fenyl), 153,55, 149,82, 136,49, 125,21, 123,62 (grupa nikotynowa), 151,16 (C-9), 150,18 (C-3a), 146,28 (C-4a), 139,23 (C-2), 129,07 (C-6), 115,55 (C-9a), 101,84 (C-7), 72,25 (NCH₂O), 66,42, 63,78 (CH₂CH₂), 55,27 (OCH₃), analiza elementarna obl. dla C₂₃H₂₀N₆O₅ (460,45) × 0,25 H₂O: C, 59,42; H, 4,44; N, 18,08, dośw.: C, 59,41; H, 4,49; N, 17,75.

10. Synteza estrów acyklowiru

Tabela 8. Wzory strukturalne zsyntetyzowanych estrów acyklowiru

			
Związek	R	Związek	R
ACV	H	Piv-I	
Ac-I		Etc-I	
<i>i</i> But-I		Nic-I	

10.1. Ester acetylowy acyklowiru (Ac-I)

Syntezę prowadzono w atmosferze argonu. W kolbie okrągłodennej umieszczono ACV (225 mg; 1,0 mmol) i bezwodny DMSO (4 ml). Do zawiesiny dodano 4-*N,N*-dimetyloaminopirydynę (DMAP, 12 mg; 0,1 mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej do uzyskania roztworu. Następnie dodano bezwodnik kwasu octowego (0,28 ml; 4,5 mmol) i mieszano 15 minut. Mieszaninę reakcyjną przeniesiono wkraplając ją do zlewki z wodą (300 ml), ciągle mieszając. Dalej mieszaninę schłodzono do temperatury 4°C, a po godzinie przesączono, otrzymany osad wysuszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymano ester Ac-I (86 mg; wyd. 32%), biały proszek, tt. 236 – 237°C (z rozkładem), czystość HPLC 100,0%, UV (MeOH): λ_{max}/nm, 258, IR (KBr): ν_{max}/cm⁻¹, 3443 (as), 3312 (sym), 3198 (NH₂); 1755, 1724 (C=O), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)

δ /ppm: 10,61 (1H, s, N1-H), 7,81 (1H, s, 8-H), 6,49 (2H, s, NH₂), 5,34 (2H, s, NCH₂O), 4,06, 3,65 (2 × 2H, 2 × bs, CH₂CH₂), 1,95 (3H, s, CH₃).

10.2. Ester izobutyrylowy acyklowiru (*i*But-I)

Syntezę prowadzono w atmosferze argonu. W kolbie okrągłodennej umieszczono ACV (225 mg; 1,0 mmol) i bezwodny DMSO (4 ml). Do zawiesiny dodano DMAP (12 mg; 0,1 mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej do uzyskania roztworu. Następnie dodano bezwodnik kwasu izomasłowego (0,48 ml; 4,5 mmol) i mieszano 15 minut. Mieszaninę reakcyjną przeniesiono wkraplając ją do zlewki z wodą (300 ml), ciągle mieszając. Dalej mieszaninę schłodzono do temperatury 4°C, a po godzinie przesączono, otrzymany osad wysuszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymano ester *i*But-I (63 mg; wyd. 21%), biały proszek, tt. 225 – 226°C (z rozkładem), czystość HPLC 99,7%, UV (MeOH): λ_{\max} /nm, 254, IR (KBr): ν_{\max} /cm⁻¹, 3453 (as), 3318 (sym), 3192 (NH₂); 1728, 1692 (C=O).¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 10,61 (1H, s, N1-H), 7,81 (1H, s, 8-H), 6,49 (2H, s, NH₂), 5,35 (2H, s, NCH₂O), 4,09 (2H, t, ³J = 4 Hz, CH₂), 3,66 (2H, t, ³J = 4 Hz, CH₂), 2,44 (1H, m, CH), 1,02 (3H, d, ³J = 8 Hz, CH₃).

10.3. Ester piwaloilowy acyklowiru (Piv-I)

Syntezę prowadzono w atmosferze argonu. W kolbie okrągłodennej umieszczono ACV (225 mg; 1,0 mmol) i bezwodny DMSO (4 ml). Do zawiesiny dodano DMAP (12 mg; 0,1 mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej do uzyskania roztworu. Następnie dodano bezwodnik kwasu piwaloowego (0,61 ml; 4,5 mmol). Mieszano w temperaturze pokojowej 25 h. Następnie mieszaninę reakcyjną przeniesiono wkraplając ją do zlewki z wodą (300 ml), ciągle mieszając. Dalej mieszaninę schłodzono do temperatury 4°C, a po godzinie przesączono, otrzymany osad wysuszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymano ester Piv-I (68 mg; wyd. 22%), biały proszek, tt. 220 – 222°C (z rozkładem), czystość HPLC 98,4%, UV (MeOH): λ_{\max} /nm, 254, IR (KBr): ν_{\max} /cm⁻¹, 3474 (as), 3317 (sym), 3188 (NH₂); 1728, 1690 (C=O).¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 10,61 (1H, s, N1-H), 7,81 (1H, s, 8-H), 6,48 (2H, s, NH₂), 5,35 (2H, s, NCH₂O), 4,09 (2H, t, ³J = 4 Hz, CH₂), 3,65 (2H, t, ³J = 4 Hz, CH₂), 1,06 (3H, s, CH₃).

10.4. Ester etoksykarbonylowy acyklowiru (Etc-I)

Syntezę prowadzono w atmosferze argonu. W kolbie okrągłodennej umieszczono ACV (225 mg; 1,0 mmol) i bezwodny DMF (10 ml). Do zawiesiny dodano DMAP (24 mg; 0,2 mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej do uzyskania roztworu. Następnie dodano pirowęglan dietylowy (1,44 ml; 10,0 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej jeszcze 72 h. Dalej dodano bezwodny etanol (1,0 ml) i mieszano 30 minut. Mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha. Pozostałość poddano krystalizacji z etanolu.

Otrzymano ester Etc-I (104 mg; wyd. 35%), biały proszek, tt. 216 – 218°C (z rozkładem), czystość HPLC 99,2%, UV (MeOH): λ_{\max}/nm , 256, IR (KBr): $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, 3447 (as), 3323 (sym), 3161 (NH₂); 1748, 1690 (C=O); 1269 (C-O, szerokie pasmo). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm : 10,64 (1H, s, N1-H), 7,81 (1H, s, 8-H), 6,51 (2H, s, NH₂), 5,35 (2H, s, NCH₂O), 4,15 (2H, t, ³J = 4 Hz, CH₂), 4,08 (2H, q, ³J = 8 Hz, OCH₂), 3,67 (2H, t, ³J = 4 Hz, CH₂), 1,19 (3H, t, ³J = 4 Hz, CH₃), ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 154,41 (C=O), 156,77 (C6), 153,89 (C2), 151,40 (C4), 137,65 (C8), 116,48 (C5), 71,76 (NCH₂O), 66,38, 63,56 (CH₂CH₂), 66,05 (OCH₂), 14,02 (CH₃), analiza elementarna obl. dla C₁₁H₁₅N₅O₅ × CH₃OH (329,13): C, 43,8; H, 5,8; N, 21,3, dośw.: C, 44,4; H, 5,4; N, 20,7.

10.5. Ester nikotynowy acyklowiru (Nic-I)

Syntezę prowadzono w atmosferze argonu. W kolbie okrągłodennej umieszczono ACV (225 mg; 1,0 mmol) i bezwodny DMF (10 ml). Do zawiesiny dodano DMAP (24 mg; 0,2 mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej do uzyskania roztworu. Następnie dodano bezwodnik kwasu nikotynowego (228 mg; 1,0 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej 72 h. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha. Pozostałość rozpuszczono w wodzie (10,0 ml) doprowadzając do pH 9,0 roztworem wodorotlenku sodu 0,1 mol/l. Mieszaninę schłodzono do temperatury 4°C, a po 5 h przesączono. Otrzymany osad wysuszono w temperaturze pokojowej, a następnie poddano krystalizacji z etanolu.

Otrzymano ester Nic-I (99 mg; wyd. 30%), biały proszek, tt. 229 – 233°C (z rozkładem), czystość HPLC 99,3%, UV (MeOH): λ_{\max}/nm , 256, IR (KBr): $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, 3335 (as i sym), 3200 (NH₂); 1701, 1690 (C=O), ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm : 10,59 (1H, s, N1-H), 9,04 (1H, d, J = 1,8 Hz, grupa nikotynowa), 8,82 (1H, dd, J = 4,8,

1,8 Hz, grupa nikotynowa), 8,17 (1H, dt, $J = 8,4$, 1,8 Hz, grupa nikotynowa), 7,55 (1H, dd, $J = 7,8$, 4,8 Hz, grupa nikotynowa), 7,84 (1H, s, 8-H), 6,48 (2H, s, NH₂), 5,41 (2H, s, NCH₂O), 4,40 (2H, t, $J = 4,8$ Hz, CH₂), 3,83 (2H, t, $J = 4,8$ Hz, CH₂), ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 164,54 (C=O), 156,70 (C6), 153,85 (C2), 153,68, 149,93, 136,70, 125,39, 123,83 (grupa nikotynowa), 151,36 (C4), 137,62 (C8), 116,53 (C5), 71,84 (NCH₂O), 66,29, 63,87 (CH₂CH₂), analiza elementarna obl. dla C₁₄H₁₄N₆O₄ × CH₃OH (362,13): C, 49,7; H, 5,0; N, 23,2, dośw.: C, 49,0; H, 4,5; N, 23,7.

11. Wyznaczanie lipofilowości

11.1. Przygotowanie roztworów

- Faza ruchoma dla metody HPLC oznaczania estrów acyklowiru
Przygotowano fazę wodną (bufor fosforanowy 0,02 mol/l o pH 6,7): w 500 ml wody dejonizowanej rozpuszczono 1,4970 g KH₂PO₄ oraz 1,2777 g Na₂HPO₄ i uzupełniono do 1000,0 ml takim samym rozpuszczalnikiem.
Fazę wodną zmieszano z metanolem i acetonitrylem (ACN) (3:1:3), przesączono i odgazowano.
- Fazy ruchome dla metody HPLC oznaczania związku XXVII i jego estrów
Przygotowano 7 faz ruchomych stanowiących mieszaniny wody i acetonitrylu o stężeniu acetonitrylu 30 – 60% (v/v), różniących się stężeniem acetonitrylu o 5%.
Przygotowane fazy ruchome przesączono i odgazowano.
- Roztwory substancji wzorcowych i badanych (50 µg/ml)
Odważono dokładnie 1,00 mg substancji, rozpuszczono w mieszaninie woda – acetonitryl (1:1, v/v) i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml.
Roztwór rozcieńczono takim samym rozpuszczalnikiem (1:1).
- Roztwór KNO₃ (1 mg/ml)
10,00 mg azotan(V) potasu rozpuszczono w 5 ml wody dejonizowanej, uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml.

11.2. Metodyka wyznaczania lipofilowości związku XXVII i jego estrów

Do wyznaczenia lipofilowości związku XXVII oraz jego estrów wykorzystano metodę HPLC opisaną w piśmiennictwie [191, 192]. Zastosowano następujące parametry rozdzielania chromatograficznego:

- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 5 μm
- fazy ruchome: mieszanina acetonitrylu – woda, o stężeniu acetonitrylu 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60% (v/v)
- przepływ fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- objętość nastrzyku: 20 μl
- detekcja UV: 262 nm.

Badanie wykonano przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Zestaw nr 3).

Na kolumnę chromatograficzną nanoszono 3-krotnie roztwory substancji badanych i rejestrowano chromatogramy. Zerowy czas retencji (t_0) wyznaczono rejestrując czas retencji (t_r) roztworu azotan(V) potasu, jako substancji nie zatrzymywanej na kolumnie. Współczynniki retencji ($\log k$) substancji badanych wyznaczono korzystając z równania:

$$\log k = \log \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Wartości $\log k_w$, dla 100% wody jako fazy ruchomej, wyznaczono z następujących równań:

$$\log k = \log k_w - S\varphi \quad (2)$$

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + \log k_w \quad (3)$$

gdzie:

S , A i B – stałe dla danego rozpuszczalnika i układu chromatograficznego

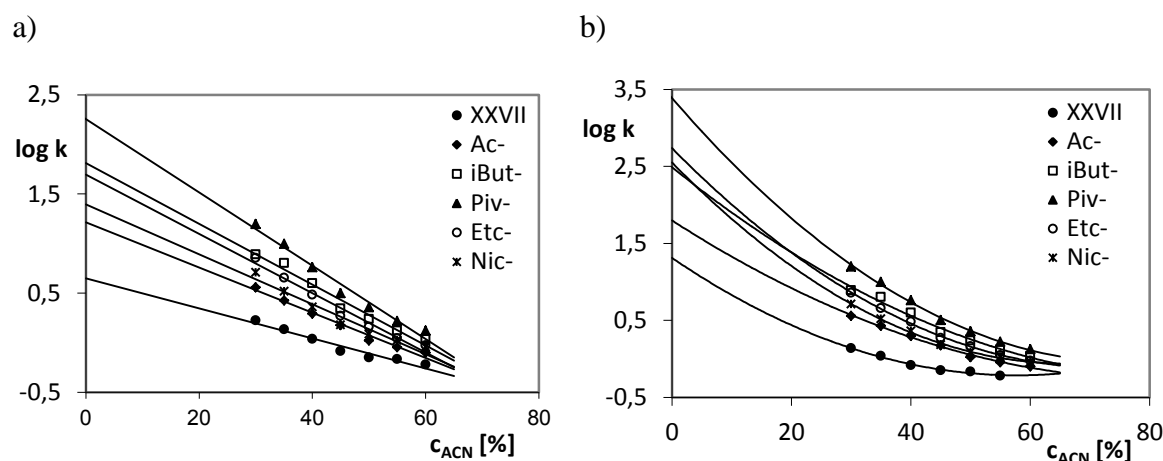
φ – udział objętościowy acetonitrylu w fazie ruchomej

ekstrapolując stężenie acetonitrylu w fazie do zera.

Obliczone wartości współczynników retencji oraz parametry regresji równań (2) i (3) przedstawiono w tabeli 9 oraz na rycinie 14.

Tabela 9. Czasy retencji (t_r), współczynniki retencji ($\log k$) oraz parametry regresji równań (2) i (3)

Związek	ϕ , %	t_r , min	$\log k$	$\log k = f(c_{CH_3CN})$	
				$\log k = \log k_w - S\phi$	$\log k = A\phi^2 + B\phi + \log k_w$
XXVII	30	4,626	0,225	$\log k_w = 0,651 \pm 0,173$ $S = -0,0152 \pm 0,0038$ $s_S = 1,46 \cdot 10^{-3}$ $s_{\log kw} = 6,74 \cdot 10^{-2}$ $r = -0,9774$	$\log k_w = 1,292$ $\log k = 0,0003 \phi^2 - 0,0451 \phi + 1,292$ $r = 0,9950$
	35	4,393	0,135		
	40	3,172	0,038		
	45	2,609	-0,083		
	50	2,471	-0,149		
	55	2,411	-0,165		
	60	2,292	-0,219		
Ac-XXVII	30	7,970	0,558	$\log k_w = 1,217 \pm 0,164$ $S = -0,0228 \pm 0,0036$ $s_S = 1,39 \cdot 10^{-3}$ $s_{\log kw} = 6,39 \cdot 10^{-2}$ $r = -0,9909$	$\log k_w = 1,802$ $\log k = 0,0003 \phi^2 - 0,0502 \phi + 1,802$ $r = 0,9974$
	35	6,815	0,426		
	40	4,504	0,294		
	45	3,570	0,176		
	50	2,964	0,021		
	55	2,722	-0,045		
	60	2,561	-0,101		
Nic-XXVII	30	10,568	0,710	$\log k_w = 1,394 \pm 0,283$ $S = -0,0251 \pm 0,0061$ $s_S = 2,39 \cdot 10^{-3}$ $s_{\log kw} = 0,110$ $r = -0,9782$	$\log k_w = 2,548$ $\log k = 0,0006 \phi^2 - 0,0791 \phi + 2,548$ $r = 0,9988$
	35	7,977	0,518		
	40	4,995	0,360		
	45	3,595	0,181		
	50	3,215	0,088		
	55	2,950	0,025		
	60	2,719	-0,044		
Etc-XXVII	30	14,110	0,856	$\log k_w = 1,696 \pm 0,259$ $S = -0,0299 \pm 0,0056$ $s_S = 1,39 \cdot 10^{-3}$ $s_{\log kw} = 0,101$ $r = -0,9869$	$\log k_w = 2,734$ $\log k = 0,00053 \phi^2 - 0,0785 \phi + 2,734$ $r = 0,9989$
	35	10,257	0,655		
	40	6,134	0,483		
	45	4,093	0,270		
	50	3,540	0,161		
	55	3,023	0,046		
	60	2,774	-0,026		
iBut-XXVII	30	15,138	0,890	$\log k_w = 1,812 \pm 0,267$ $S = -0,0306 \pm 0,0058$ $s_S = 2,26 \cdot 10^{-3}$ $s_{\log kw} = 0,104$ $r = -0,9867$	$\log k_w = 2,490$ $\log k = 0,0004 \phi^2 - 0,0623 \phi + 2,490$ $r = 0,9916$
	35	13,696	0,804		
	40	7,545	0,599		
	45	4,592	0,345		
	50	3,950	0,238		
	55	3,329	0,122		
	60	2,982	0,036		
Piv-XXVII	30	28,826	1,196	$\log k_w = 2,257 \pm 0,298$ $S = -0,0370 \pm 0,0065$ $s_S = 2,51 \cdot 10^{-3}$ $s_{\log kw} = 0,116$ $r = -0,9886$	$\log k_w = 3,393$ $\log k = 0,0006 \phi^2 - 0,0901 \phi + 3,393$ $r = 0,9980$
	35	20,271	0,996		
	40	10,267	0,761		
	45	5,955	0,501		
	50	4,735	0,357		
	55	3,807	0,220		
	60	3,327	0,123		



Ryc. 14. Wykres zależności $\log k_w$ jako funkcji stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej
a) korelacja liniowa; b) korelacja kwadratowa.

11.3. Metodyka wyznaczania lipofilowości estrów acyklowiru

Do wyznaczenia lipofilowości acyklowiru oraz jego estrów wykorzystano metodę HPLC z zastosowaniem techniki krzywej wzorcowej, opisaną w piśmiennictwie [193, 194]. Wykorzystano następujące parametry rozdzielania chromatograficznego:

- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 5 μ m
- faza ruchoma: acetonitryl – metanol – bufor fosforanowy 0,02 mol/l o pH 6,7 (3:1:3, v/v/v)
- przepływ fazy ruchomej: 1,5 ml/min
- objętość nastrzyku: 20 μ l
- detekcja UV: 240 nm.

Badanie wykonano przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Zestaw nr 3).

Na kolumnę chromatograficzną nanoszono roztwory substancji i rejestrowano chromatogramy. Zerowy czas retencji (t_0) wyznaczono rejestrując czas retencji (t_r) roztworu azotanu(V) potasu, jako substancji nie zatrzymywanej na kolumnie. Jego wartość wyniosła $t_0 = 1,045$ min. Współczynniki retencji ($\log k$) substancji wzorcowych i badanych wyznaczono korzystając z równania (1). Dla każdej substancji badanej i wzorcowej $\log k$ wyznaczono jako średnią z sześciu pomiarów.

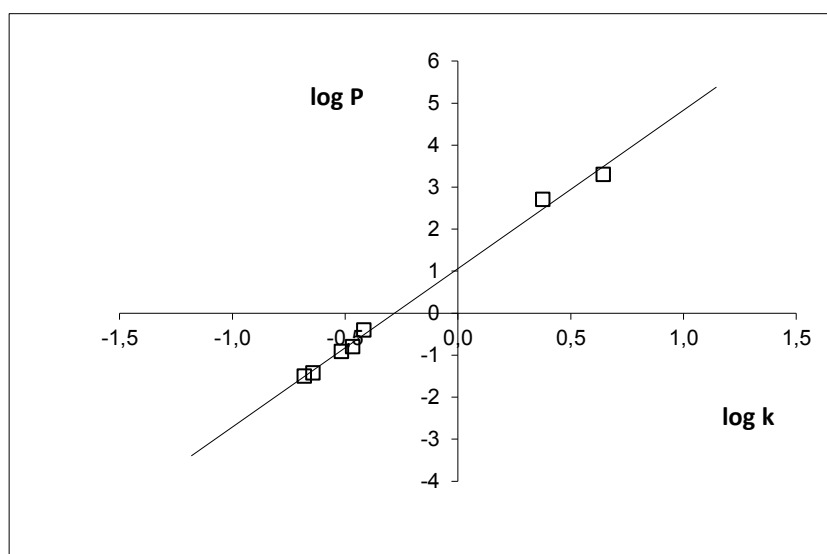
Do sporządzenia krzywej wzorcowej zależności $\log P = f(\log k)$ wybrano siedem substancji o znanych wartościach $\log P$ i lipofilowości zbliżonej do lipofilowości badanych estrów (Tabela 10).

Otrzymaną zależność opisano równaniem (Tabela 10, Ryc. 15):

$$\log P = A + B \log k \quad (4)$$

Tabela 10. Czasy retencji ($t_r \pm \Delta t_r$, S_{tr} , W_z), współczynniki retencji ($\log k$) i współczynniki lipofilowości ($\log P$) substancji wzorcowych ($n = 6$) oraz ocena statystyczna równania (4)

Związek	$t_r \pm \Delta t_r$ [min]	$10^3 S_{tr}$	W_z [%]	$\log k$	$\log P$ [Piśm.]	Parametry równania (4)
Ryboflawina	$1,263 \pm 0,010$	9,82	0,78	-0,681	-1,50 [195]	$A = (3,784 \pm 0,314)$ $B = (1,053 \pm 0,172)$ $S_A = 0,122$ $S_B = 0,067$ $t_B = 15,768$ $t_{0,05}(9) = 2,365$ $r = 0,9974$
ACV	$1,283 \pm 0,003$	3,19	0,25	-0,642	-1,47 [196]	
Guanina	$1,363 \pm 0,005$	5,18	0,38	-0,517	-0,91 [197]	
Pirydoksyna	$1,402 \pm 0,002$	1,60	0,11	-0,466	-0,80 [195]	
Nikotynamid	$1,445 \pm 0,004$	3,83	0,26	-0,417	-0,40 [195]	
1-Naftol	$3,528 \pm 0,003$	2,89	0,08	0,376	2,71 [193] [198]	
Tymol	$5,661 \pm 0,005$	4,84	0,09	0,645	3,30 [193] [198]	



Ryc. 15. Wykres zależności $\log P = f(\log k)$ dla substancji wzorcowych.

Wartości współczynników lipofilowości badanych estrów (Tabela 11) wyznaczono metodą ekstrapolacji z równania (4). Błędy obliczonych wartości przedstawiono jako wartości przedziału ufności dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$.

Tabela 11. Czasy retencji ($t_r \pm \Delta t_r$, S_{tr} , W_z), współczynniki retencji ($\log k$) oraz współczynniki lipofilowości ($\log P \pm \Delta \log P$, $S_{\log P}$, W_z) substancji badanych ($n = 6$)

Związek	Czas retencji			$\log k$	Współczynnik lipofilowości		
	t_r [min]	$10^3 S_{tr}$	W_z [%]		$\log P$	$10^2 S_{\log P}$	W_z [%]
Ac-I	1,363 ± 0,003	2,93	0,22	-0,517	-0,90 ± 0,02	1,50	1,69
Nic-I	1,413 ± 0,003	3,08	0,22	-0,454	-0,66 ± 0,01	1,37	2,09
Etc-I	1,463 ± 0,003	3,27	0,22	-0,398	-0,45 ± 0,01	1,28	2,88
iBut-I	1,527 ± 0,002	2,14	0,14	-0,336	-0,22 ± 0,01	0,76	3,45
Piv-I	1,665 ± 0,003	2,64	0,16	-0,227	0,19 ± 0,01	0,69	3,41

11.4. Wyznaczenie lipofilowości badanych związków z zastosowaniem technik obliczeniowych

Wyznaczone eksperymentalnie wartości $\log k_w$ trójcyklicznego analogu acyklowiru (XXVII), jego estrów oraz wartości $\log P$ estrów acyklowiru porównano z wartościami teoretycznymi ($c \log P$) uzyskanymi przy użyciu dostępnego on-line oprogramowania ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>) (Tabele 12 i 13). Obliczenia w tym programie oparte są na analizie algorytmów topologii całej cząsteczki (AC $\log P$, ALOGPs oraz MLOGP), udziału poszczególnych części struktury cząsteczki (KOWWIN) oraz analizie poszczególnych atomów (ALOGP, XLOGP2 oraz XLOGP3).

Tabela 12. Wartości $\log k_w$ wyznaczone na podstawie równań (2) i (3) oraz $c \log P$ dla związku XXVII i jego estrów

Związek	$\log k_w$		$c \log P$							
	(2)	(3)	AC $\log P$	ALOGPs	MLOGP	KOWWIN	ALOGP	XLOGP2	XLOGP3	Average LogP
XXVII	0,65	1,29	0,59	0,92	1,72	-0,19	0,14	1,27	0,04	0,64
Ac-	1,22	1,80	1,08	1,62	2,20	0,82	0,52	2,01	0,62	1,27
Nic-	1,39	2,55	1,48	1,99	2,41	1,08	1,03	2,47	1,21	1,67
Etc-	1,70	2,73	1,78	1,99	2,11	1,17	1,51	2,60	1,39	1,79
iBut-	1,81	2,49	1,89	2,21	2,65	1,72	1,64	2,55	1,66	2,05
Piv-	2,26	3,39	2,40	2,75	2,87	2,18	2,06	2,76	2,02	2,43

Tabela 13. Wartości logP oraz *c* logP dla acyklowiru (I) i jego estrów

Związek	logP	<i>c</i> logP							
		AC logP	ALOGPs	MLOGP	KOWWIN	ALOGP	XLOGP2	XLOGP ₃	Average logP
I	-1,38	-1,47	-1,45	0,04	-1,70	-1,45	-1,65	-1,92	-1,37
Ac-I	-0,90	-0,98	-0,79	0,65	-0,69	-1,08	-0,91	-1,35	-0,74
Nic-I	-0,66	-0,58	-0,37	1,05	-0,43	-0,56	-0,44	-0,76	-0,30
Etc-I	-0,45	-0,28	-0,39	0,62	-0,32	-0,08	-0,32	-0,58	-0,20
<i>i</i> But-I	-0,22	-0,17	-0,21	1,22	0,22	0,05	-0,36	-0,31	0,06
Piv-I	0,19	0,34	0,19	1,49	0,67	0,43	-0,16	0,05	0,44

12. Ocena trwałości badanych związków w środowisku kwasowym

12.1. Przygotowanie roztworów

- Kwas solny (1 mol/l)
Do kolby miarowej przeniesiono dwie odważki analityczne kwasu solnego (0,1 mol/l) i uzupełniono wodą dejonizowaną do 200,0 ml.
- Roztwór chlorku sodu (2 mol/l)
Odważono dokładnie 11,6879 g chlorku sodu, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i uzupełniono do 100,0 ml takim samym rozpuszczalnikiem.
- Kwas solny (0,05 – 0,5 mol/l) o sile jonowej $\mu = 0,50$ mol/l
Do sześciu kolb miarowych o pojemności 100 ml przeniesiono odpowiednie ilości kwasu solnego (1 mol/l) oraz roztworu NaCl (2 mol/l) i uzupełniono do 100,0 ml wodą dejonizowaną (Tabela 14).

Tabela 14. Przygotowanie roztworów kwasu solnego (0,05 – 0,50 mol/l; $\mu = 0,50$ mol/l)

Stężenie HCl [mol/l]	Objętość HCl 1 mol/l [ml]	Objętość roztworu NaCl [ml]	Uzupełniono wodą do 100,0 ml
0,05	5,0	22,5	
0,10	10,0	20,0	
0,20	20,0	15,0	
0,30	30,0	10,0	
0,40	40,0	5,0	
0,50	50,0	0,0	

- Roztwór wodorotlenku sodu (1 mol/l)

Odważono dokładnie 8,02758 g NaOH, przeniesiono do kolby miarowej, rozpuszczono w 150 ml wody dejonizowanej i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 200,0 ml.

- Roztwory wodorotlenku sodu (0,05 – 0,50 mol/l)

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 100 ml przeniesiono odpowiednie ilości roztworu NaOH (1 mol/l) i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100,0 ml (Tabela 15).

Tabela 15. Przygotowanie roztworów wodorotlenku sodu (0,05 – 0,50 mol/l)

Stężenie roztworu [mol/l]	Objętość roztworu NaOH 1 mol/l [ml]	
0,05	5,0	Uzupełniono wodą do 100,0 ml
0,10	10,0	
0,20	20,0	
0,30	30,0	
0,40	40,0	
0,50	50,0	

- Bufor fosforanowy o pH 6 (0,2 mol/l, 0,02 mol/l)

Odważono 2,3625 g KH_2PO_4 i 0,4599 g K_2HPO_4 , przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 100,0 (0,2 mol/l) lub 1000,0 ml (0,02 mol/l).

- Bufor fosforanowy o pH 6,7 (0,2 mol/l, 0,02 mol/l)

Odważono 1,4970 g KH_2PO_4 i 1,277 g Na_2HPO_4 , przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 100,0 ml (0,2 mol/l) lub 1000,0 ml (0,02 mol/l).

- Roztwór diwodorofosforanu potasu (0,5 mol/l)

Odważono 3,4023 g KH_2PO_4 , przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w 30 ml wody dejonizowanej i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 50,0 ml

- Bufor octanowy o pH 5,57 (0,5 mol/l)

Odważono 6,8045 g octanu sodu, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 100,0 ml (roztwór A). Do kolby miarowej odmierzone 0,72 ml kwasu octowego i uzupełniono wodą dejonizowaną do 25,0 ml (roztwór B). Zmieszano roztwór A i roztwór B (90:10).

12.2. Metoda HPLC oznaczania związku XXVII i jego estrów

Do oceny trwałości w środowisku kwasowym związku XXVII oraz jego estrów opracowano metodę HPLC. Zastosowano następujące warunki rozdzielania chromatograficznego:

- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 5 μm
- faza ruchoma: acetonitryl – 0,02 mol/l bufor fosforanowy pH 6 (35:65, v/v)
- przepływ fazy ruchomej: Tabela 16
- wzorzec wewnętrzny: Tabela 16
- objętość nastrzyku: 20 μl
- detekcja UV: 262 nm.

Badanie wykonano przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Zestaw nr 3).

Tabela 16. Przepływ fazy ruchomej i skład roztworów wzorców wewnętrznych dla oznaczania związku XXVII i jego estrów

Związek	Szybkość przepływu fazy ruchomej	Roztwór wzorca wewnętrznego	
		Skład roztworu	Stężenie [μg/ml]
I Ac-XXVII iBut-XXVII	1,5 ml/min	4,00 mg 4-hydroksybenzoesanu etylu w 50,0 ml mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH 6 (0,02 mol/l) (35:65, v/v)	80
XXVII Piv-XXVII Nic-XXVII	1,0 ml/min	4,00 mg 4-hydroksybenzoesanu etylu w 50,0 ml mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH 6 (0,02 mol/l) (35:65, v/v)	80
Etc-XXVII	1,0 ml/min	3,00 mg 4-hydroksybenzoesanu metylu w 50,0 ml mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH 6 (0,02 mol/l) (35:65, v/v)	60

Selektywność

W celu sprawdzenia selektywności metody, do realizacji zaplanowanych badań, wykorzystano mieszaninę roztworów substancji badanych i acyklowiru, jako potencjalnego produktu rozkładu, o stężeniu każdego związku około 40 μg/ml. Próbkę naniesiono na kolumnę i w przedziale czasu od 0 do 20 minut rejestrowano chromatogram. Następnie na kolumnę nanoszono mieszaniny substancji i wzorców wewnętrznych (Tabela 16) i rejestrowano chromatogramy. Dla wszystkich analizowanych związków w badanym przedziale czasu obserwowano wyraźnie rozdzielone piki. W przypadku estru Nic-XXVII,

potencjalnym produktem hydrolizy jest kwas nikotynowy (KwN), którego czas retencji (t_r = ok. 1,20 min) jest zgodny z czasem retencji acyklowiru w warunkach chromatografowania opisanych dla tego estru (Tabela 17). Potwierdza to wystarczającą do badań trwałości analizowanych związków selektywność oznaczania substancji w obecności ACV i wzorców wewnętrznych z zastosowaniem opracowanych warunków chromatografowania.

Tabela 17. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach

Szybkość przepływu fazy ruchomej	Czas retencji [min]	
	Związek	Wzorzec wewnętrzny
1,0 ml/min	XXVII: 3,27	9,42
	Piv-XXVII: 17,68	9,42
	Etc-XXVII: 8,93	5,81
	KwN: 1,20	9,42
	Nic-XXVII: 6,20	9,42
1,5 ml/min	I: 1,20	6,18
	Ac-XXVII: 3,87	6,18
	<i>i</i> But-XXVII: 8,12	6,18

Liniowość

Odważono dokładnie około 5 lub 10 mg substancji, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w odpowiednim rozpuszczalniku (Tabela 18), uzupełniono do 10,0 ml fazą ruchomą, wymieszano i poddano działaniu ultradźwięków 5 minut (roztwór C). Następnie odmierzone odpowiednią objętość roztworu C, uzupełniono wyżej wymienioną fazą do 10,0 ml i wymieszano, uzyskując odpowiednie stężenie roztworu D (Tabele 19 – 22). Na kolumnę chromatograficzną наносono po 20 μ l mieszaniny roztworu D i roztworu wzorca wewnętrznego (1:1) i rejestrowano chromatogramy w układzie faz opracowanym dla oznaczania danego związku.

Tabela 18. Odważki związków badanych i rozpuszczalniki użyte do rozpuszczenia próbek

Związek	Odważka [mg]	Rozpuszczalnik
ACV	5	faza ruchoma
XXVII	5	faza ruchoma
Ac-XXVII	5	1,0 ml EtOH; 4,0 ml ACN
<i>i</i> But-XXVII	10	2,0 ml EtOH; 4,0 ml ACN
Piv-XXVII	10	7,0 ml ACN
Etc-XXVII	10	4,0 ml EtOH; 3,0 ml ACN
Nic-XXVII	5	2,0 ml ACN

Uzyskane stężenia, względne pola powierzchni pików ($P = P_i/P_w$) oraz ocenę statystyczną parametrów równań liniowych zależności $P = f(c)$ zamieszczono w tabelach 19 – 22 oraz na rycinie 16.

Tabela 19. Stężenia roztworów ACV i związku XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	ACV			XXVII		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	5,2	0,078	$y = ax + b$ $a = (1,50 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$ $b = (0,74 \pm 1,23) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,77 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 5,19 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,427$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9995$	10,1	0,309	$y = ax + b$ $a = (2,96 \pm 0,18) \cdot 10^{-2}$ $b = (-2,10 \pm 5,92) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 7,61 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,50 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 0,839$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9977$
2	10,4	0,166		15,0	0,434	
3	15,6	0,248		20,2	0,545	
4	20,8	0,326		25,2	0,750	
5	26,1	0,397		30,2	0,827	
6	31,3	0,463		35,3	1,008	
7	36,5	0,557	40,3	1,160	$y = ax$ $a = (2,90 \pm 0,16) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 7,12 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9977$	
8	41,7	0,630	45,4	1,348		
9	46,9	0,713	50,4	1,490		

Tabela 20. Stężenia roztworów Ac-XXVII i iBut-XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

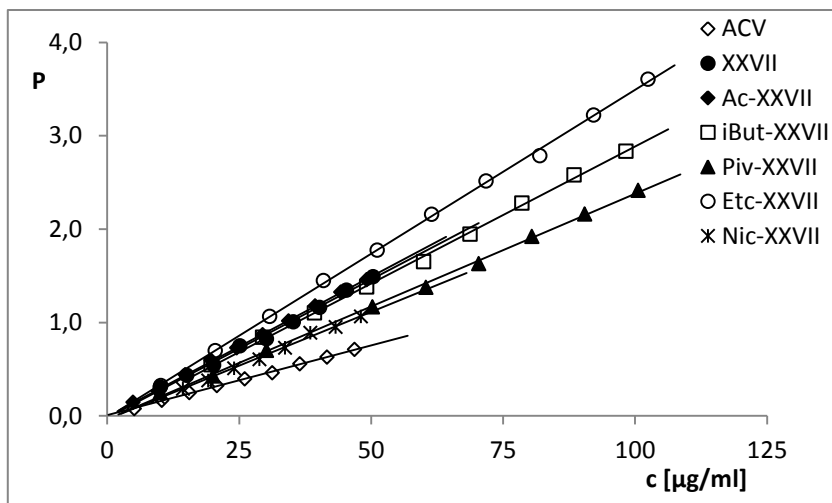
Lp.	Ac-XXVII			iBut-XXVII		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	4,9	0,147	$y = ax + b$ $a = (3,00 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$ $b = (-0,80 \pm 1,61) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 2,28 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 6,97 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,152$ $t_{0,05}(8) = 2,306$ $r = 0,9998$	19,7	0,546	$y = ax + b$ $a = (2,93 \pm 0,10) \cdot 10^{-2}$ $b = (-4,82 \pm 6,12) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 4,02 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,59 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 1,865$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9993$
2	9,8	0,266		29,5	0,841	
3	14,8	0,442		39,3	1,102	
4	19,7	0,594		49,2	1,382	
5	24,6	0,728		60,0	1,653	
6	29,5	0,869		68,8	1,948	
7	34,4	1,019	78,6	2,280	$y = ax$ $a = (2,86 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 3,76 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9993$	
8	39,4	1,179	88,5	2,581		
9	44,3	1,327	98,3	2,836		
10	49,2	1,460				

Tabela 21. Stężenia roztworów Piv-XXVII i Etc-XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Piv-XXVII			Etc-XXVII		
	c [$\mu\text{g/ml}$]	P	Parametry regresji	c [$\mu\text{g/ml}$]	P	Parametry regresji
1	10,1	0,253	$y = ax + b$ $a = (2,41 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$ $b = (-3,56 \pm 5,34) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 3,50 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,26 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 1,576$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9993$	10,2	0,326	$y = ax + b$ $a = (3,51 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$ $b = (-1,80 \pm 4,83) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 3,29 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,10 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 0,861$ $t_{0,05}(8) = 2,306$ $r = 0,9996$
2	20,1	0,428		20,5	0,700	
3	30,2	0,701		30,8	1,067	
4	50,3	1,167		41,0	1,448	
5	60,4	1,376		51,2	1,774	
6	70,4	1,631		61,5	2,159	
7	80,5	1,922		71,8	2,515	
8	90,5	2,164	82,0	2,787	$y = ax$ $a = (3,48 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 3,11 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9996$	
9	100,6	2,418	92,2	3,222		
10			102,5	3,606		

Tabela 22. Stężenia roztworów Nic-XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Nic-XXVII		
	c [$\mu\text{g/ml}$]	P	Parametry regresji
1	9,6	0,205	$y = ax + b$ $a = (2,30 \pm 0,14) \cdot 10^{-2}$ $b = (-4,00 \pm 4,51) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 6,07 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,91 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 2,098$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9976$
2	14,4	0,292	
3	19,2	0,378	
4	24,1	0,511	
5	28,9	0,607	
6	33,7	0,728	
7	38,5	0,891	$y = ax$ $a = (2,19 \pm 0,13) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 5,68 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9976$
8	43,3	0,952	
9	48,1	1,064	



Ryc. 16. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni pików substancji badanej do pola powierzchni pików wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia ACV, związku XXVII i jego estrów.

Granica wykrywalności i oznaczalności, zakres i czułość metody

Granice wykrywalności (LOD), granice oznaczalności (LOQ) oraz zakresy metod HPLC oznaczania analizowanych związków (Tabela 23) wyznaczono korzystając z parametrów liniowych zależności $P = f(c)$ oraz następujących równań:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_b}{a} \quad (5)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_b}{a} \quad (6)$$

Tabela 23. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków

Związek	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	$y = ax$	Zakres [µg/ml]
ACV	1,12	3,41	$y = (1,52 \pm 0,04) \cdot 10^{-2} \cdot x$	5,2 – 46,9
XXVII	2,85	8,63	$y = (2,90 \pm 0,16) \cdot 10^{-2} \cdot x$	10,1 – 50,4
Ac-XXVII	0,77	2,34	$y = (2,97 \pm 0,05) \cdot 10^{-2} \cdot x$	4,9 – 49,2
iBut-XXVII	2,98	9,03	$y = (2,86 \pm 0,09) \cdot 10^{-2} \cdot x$	19,7 – 98,3
Piv-XXVII	3,15	9,55	$y = (2,36 \pm 0,08) \cdot 10^{-2} \cdot x$	10,1 – 100,6
Etc-XXVII	1,98	6,01	$y = (3,48 \pm 0,07) \cdot 10^{-2} \cdot x$	10,2 – 102,5
Nic-XXVII	2,88	8,72	$y = (2,19 \pm 0,13) \cdot 10^{-2} \cdot x$	9,6 – 48,1

Precyzja, dokładność, powtarzalność

Precyzję i dokładność metody oznaczeń każdego badanego związku wyznaczono z ośmiu oznaczeń ich zawartości w roztworach o wybranych stężeniach ($n = 8$). W celu wyznaczenia powtarzalności oznaczeń pomiędzy dniami, kolejnego dnia cały proces wykonano ponownie. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 24. Do obliczenia

stężeń poszczególnych związków wykorzystano parametry zależności $P = f(c)$ (Tabela 23). W ramach oceny statystycznej obliczono: wartości średnie, przedziały ufności (dla $\alpha = 0,05$), odchylenia standardowe (S), odchylenia standardowe wartości średnich (S_x), współczynniki zmienności (W_z) oraz współczynniki zmienności powtarzalności (W_{zr}).

Tabela 24. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń ACV, XXVII oraz jego estrów (n = 8)

Związek	$c_{dekl.}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Dzień analizy	Precyzja		Dokładność		W_{zr} [%]
			$c_{ozn.}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Ocena statystyczna	Odzysk [%]	Ocena statystyczna	
ACV	10,0	1	$10,0 \pm 0,3$	$S = 0,324$ $S_x = 0,115$ $W_z = 3,24\%$	$100,0 \pm 2,7$	$S = 3,242$ $S_x = 1,146$ $W_z = 3,24\%$	0,27
		2	$10,5 \pm 0,2$	$S = 0,248$ $S_x = 0,088$ $W_z = 2,36\%$	$105,1 \pm 2,1$	$S = 2,480$ $S_x = 0,877$ $W_z = 2,36\%$	
	42,0	1	$42,0 \pm 0,3$	$S = 0,315$ $S_x = 0,111$ $W_z = 0,75\%$	$100,1 \pm 0,6$	$S = 0,749$ $S_x = 0,265$ $W_z = 0,75\%$	0,17
		2	$42,8 \pm 0,2$	$S = 0,267$ $S_x = 0,094$ $W_z = 0,62\%$	$101,8 \pm 0,5$	$S = 0,636$ $S_x = 0,225$ $W_z = 0,62\%$	
XXVII	16,0	1	$16,1 \pm 0,1$	$S = 0,137$ $S_x = 0,049$ $W_z = 0,85\%$	$100,4 \pm 0,7$	$S = 0,858$ $S_x = 0,303$ $W_z = 0,85\%$	0,20
		2	$16,1 \pm 0,1$	$S = 0,123$ $S_x = 0,043$ $W_z = 0,76\%$	$100,6 \pm 0,6$	$S = 0,768$ $S_x = 0,271$ $W_z = 0,76\%$	
	48,0	1	$47,8 \pm 0,1$	$S = 0,125$ $S_x = 0,044$ $W_z = 0,26\%$	$99,5 \pm 0,2$	$S = 0,260$ $S_x = 0,092$ $W_z = 0,26\%$	0,11
		2	$48,1 \pm 0,1$	$S = 0,151$ $S_x = 0,053$ $W_z = 0,31\%$	$100,1 \pm 0,3$	$S = 0,315$ $S_x = 0,111$ $W_z = 0,31\%$	
Ac- XXVII	9,0	1	$8,5 \pm 0,2$	$S = 0,188$ $S_x = 0,067$ $W_z = 2,23\%$	$94,0 \pm 1,8$	$S = 2,095$ $S_x = 0,741$ $W_z = 2,23\%$	0,11
		2	$9,0 \pm 0,1$	$S = 0,093$ $S_x = 0,033$ $W_z = 1,03\%$	$100,5 \pm 0,9$	$S = 1,038$ $S_x = 0,367$ $W_z = 1,03\%$	
	39,0	1	$39,6 \pm 0,1$	$S = 0,124$ $S_x = 0,044$ $W_z = 0,31\%$	$101,4 \pm 0,3$	$S = 0,319$ $S_x = 0,113$ $W_z = 0,31\%$	0,08
		2	$38,6 \pm 0,1$	$S = 0,130$ $S_x = 0,046$ $W_z = 0,34\%$	$99,1 \pm 0,3$	$S = 0,333$ $S_x = 0,118$ $W_z = 0,34\%$	

cd. Tabela 24.

iBut- XXVII	18,5	1	18,4 ± 0,3	S = 0,318 S _x = 0,112 W _z = 1,72%	99,7 ± 1,4	S = 1,717 S _x = 0,607 W _z = 1,72%	0,08
		2	18,3 ± 0,1	S = 0,146 S _x = 0,052 W _z = 0,80%	98,9 ± 0,6	S = 0,789 S _x = 0,279 W _z = 0,80%	
	78,0	1	77,1 ± 0,1	S = 0,159 S _x = 0,056 W _z = 0,21%	98,9 ± 0,2	S = 0,203 S _x = 0,072 W _z = 0,21%	0,07
		2	77,0 ± 0,2	S = 0,239 S _x = 0,085 W _z = 0,31%	98,7 ± 0,3	S = 0,307 S _x = 0,108 W _z = 0,31%	
Piv- XXVII	30,5	1	30,9 ± 0,1	S = 0,175 S _x = 0,062 W _z = 0,57%	101,2 ± 0,5	S = 0,575 S _x = 0,203 W _z = 0,57%	0,13
		2	30,9 ± 0,1	S = 0,136 S _x = 0,048 W _z = 0,44%	101,2 ± 0,4	S = 0,445 S _x = 0,157 W _z = 0,44%	
	91,5	1	91,1 ± 0,2	S = 0,209 S _x = 0,074 W _z = 0,23%	99,6 ± 0,2	S = 0,228 S _x = 0,081 W _z = 0,23%	0,12
		2	93,3 ± 0,3	S = 0,381 S _x = 0,135 W _z = 0,41%	102,0 ± 0,3	S = 0,416 S _x = 0,147 W _z = 0,41%	
Etc- XXVII	30,0	1	30,4 ± 0,1	S = 0,176 S _x = 0,062 W _z = 0,58%	101,2 ± 0,5	S = 0,587 S _x = 0,207 W _z = 0,58%	0,13
		2	29,5 ± 0,1	S = 0,122 S _x = 0,043 W _z = 0,41%	98,3 ± 0,3	S = 0,406 S _x = 0,144 W _z = 0,41%	
	90,0	1	91,5 ± 0,2	S = 0,229 S _x = 0,081 W _z = 0,25%	101,7 ± 0,2	S = 0,255 S _x = 0,090 W _z = 0,25%	0,12
		2	89,9 ± 0,3	S = 0,359 S _x = 0,127 W _z = 0,40%	99,9 ± 0,3	S = 0,399 S _x = 0,141 W _z = 0,40%	

cd. Tabela 24.

Nic-XXVII	14,5	1	14,6 ± 0,1	S = 0,149 S _x = 0,053 W _z = 1,02%	100,8 ± 0,9	S = 1,030 S _x = 0,364 W _z = 1,02%	0,30
		2	14,6 ± 0,2	S = 0,196 S _x = 0,069 W _z = 1,34%	100,7 ± 1,1	S = 1,351 S _x = 0,478 W _z = 1,34%	
	43,5	1	43,5 ± 0,3	S = 0,323 S _x = 0,114 W _z = 0,74%	100,0 ± 0,6	S = 0,742 S _x = 0,262 W _z = 0,74%	0,21
		2	45,6 ± 0,3	S = 0,319 S _x = 0,113 W _z = 0,70%	104,8 ± 0,6	S = 0,734 S _x = 0,259 W _z = 0,70%	

c_{dekl} – deklarowane stężenie substancji w roztworze

c_{ozn} – stężenie substancji w roztworze oznaczone metodą HPLC

Odzysk = 100% c_{ozn}/c_{dekl}

12.3. Ocena trwałości XXVII i jego estrów w środowisku kwasowym

12.3.1. Wpływ glikolu propylenowego i dimetylosulfotlenku na hydrolizę kwasową

Wpływ dimetylosulfotlenku na rozkład estru Ac-XXVII (c = 120 µg/ml) w temperaturze 37°C, w środowisku kwasu solnego o stężeniu 0,50 mol/l (µ = 0,50 mol/l), zbadano w zakresie stężeń 2,5 – 7,5%, w obecności glikolu propylenowego o stężeniu 45%. Do trzech zakręczanych probówek odmierzano po 2,50 ml roztworu HCl o stężeniu 2,0 mol/l, 4,50 ml glikolu propylenowego oraz odpowiednie objętości wody (Tabela 25). Probówki zakręcano i doprowadzano do temperatury 37°C. Następnie dodawano odpowiednią ilość Ac-XXVII rozpuszczonego w DMSO (Tabela 25) i ogrzewano w łaźni wodnej.

Tabela 25. Objętości roztworów substancji w DMSO dodawane do kwasu solnego, objętości wody użyte do przygotowania roztworów kwasu solnego oraz obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy Ac-XXVII w kwasie solnym o stężeniu 0,50 mol/l (µ = 0,50 mol/l, 37°C)

c _{DMSO} [%]	DMSO [ml]	H ₂ O [ml]	k _{obs.} ± Δk _{obs.} [s ⁻¹]	-r	n
2,50	0,25	2,75	(1,07 ± 0,05) · 10 ⁻⁴	0,9978	11
5,00	0,50	2,50	(1,02 ± 0,06) · 10 ⁻⁴	0,9963	12
7,50	0,75	2,25	(9,86 ± 0,68) · 10 ⁻⁵	0,9954	12

Wpływ glikolu propylenowego na rozkład estru Ac-XXVII (c = 120 µg/ml) w temperaturze 37°C, w środowisku kwasu solnego o stężeniu 0,50 mol/l (µ = 0,50 mol/l),

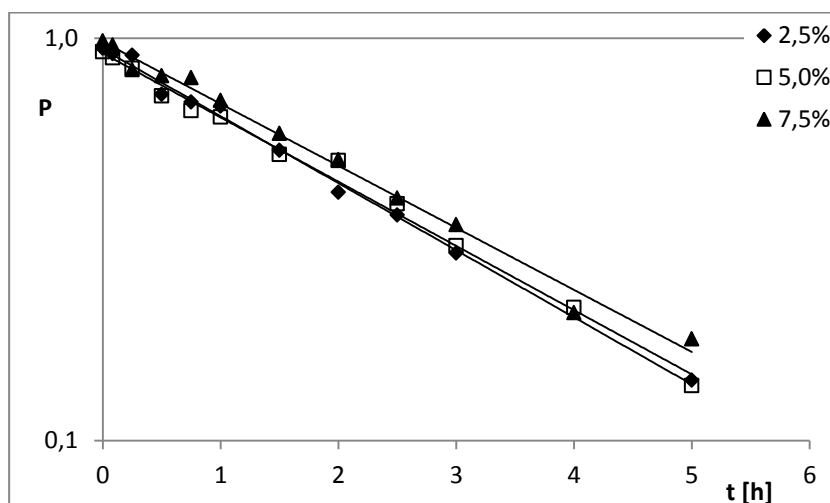
zbadano w zakresie stężeń 35 – 55%, w obecności DMSO o stałym stężeniu 5,0%. Do trzech zakręczanych probówek odmierzano 2,50 ml roztworu HCl o stężeniu 2,0 mol/l oraz odpowiednie objętości glikolu propylenowego i wody (Tabela 26). Probówki zakręcano i doprowadzano do temperatury 37°C. Następnie dodawano 0,5 ml roztworu Ac-XXVII w DMSO i ogrzewano w łaźni wodnej.

Tabela 26. Objętości glikolu propylenowego i wody użyte do przygotowania roztworów kwasu solnego oraz obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy Ac-XXVII w kwasie solnym o stężeniu 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C)

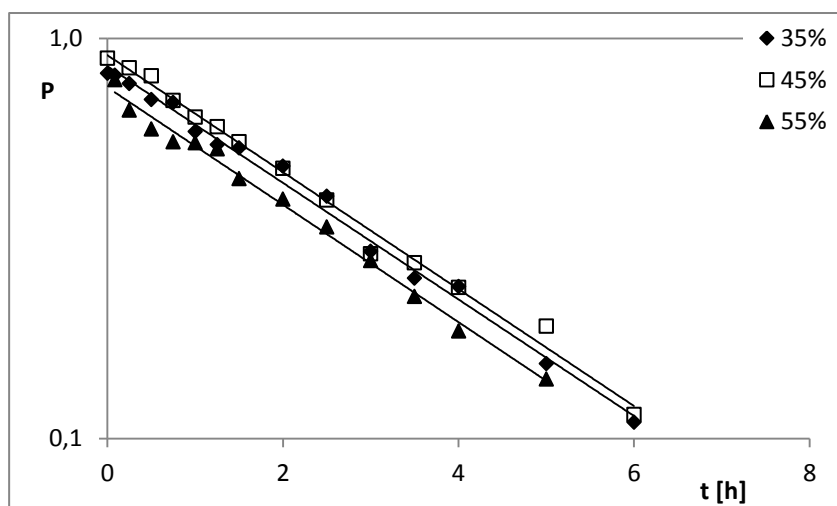
$C_{\text{glikolu propylenowego}} [\%]$	Glikol propylenowy [ml]	H ₂ O [ml]	$k_{\text{obs.}} \pm \Delta k_{\text{obs.}} [s^{-1}]$	-r	n
35	3,50	3,50	$(9,31 \pm 0,47) \cdot 10^{-5}$	0,9964	15
45	4,50	2,50	$(9,34 \pm 0,52) \cdot 10^{-5}$	0,9961	14
55	5,50	1,50	$(9,38 \pm 0,57) \cdot 10^{-5}$	0,9959	13

W określonych punktach czasowych pobierano po 0,2 ml próby badanej, zobojętniano dodając 0,2 ml buforu octanowego o pH 5,57 (0,5 mol/l) i schładzano w mieszaninie wody z lodem dla zatrzymania reakcji rozkładu. Następnie dodawano po 0,2 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4-hydroksybenzoesan etylu), wymieszano, nanoszono na kolumnę chromatograficzną i rejestrowano chromatogramy (Rozdział 12.2, Tabela 16).

Wykresy zależności P jako funkcji czasu rozkładu Ac-XXVII w kwasie solnym ($c = 0,50$ mol/l) w roztworach wodno-organicznych (35 – 55% glikolu propylenowego, 2,5 – 7,5% DMSO) przedstawiono na rycinach 17 i 18.



Ryc. 17. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu 0,50 mol/l dla różnych stężeń DMSO.



Ryc. 18. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_1 = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu $0,50 \text{ mol/l}$ dla różnych stężeń glikolu propylenowego.

12.3.2. Badanie trwałości XXVII i jego estrów w kwasie solnym

Do sześciu zakręczanych probówek odmierzano odpowiednie objętości roztworów: HCl $2,0 \text{ mol/l}$, NaCl $2,0 \text{ mol/l}$, wody oraz glikolu propylenowego, tak by uzyskać roztwory o zamierzonym stężeniu HCl ($0,05 - 0,50 \text{ mol/l}$) i stałej wartości siły jonowej ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$) (Tabela 27). Probówki zakręcano i doprowadzano do temperatury 37°C . Odważano $8,40 \text{ mg}$ (XXVII, Ac-XXVII, Nic-XXVII) lub $16,80 \text{ mg}$ (*i*But-XXVII, Piv-XXVII, Et-XXVII) substancji badanej i rozpuszczano w $3,5 \text{ ml}$ DMSO. Do inkubowanych roztworów kwasu solnego dodawano po $0,5 \text{ ml}$ substancji rozpuszczonej w DMSO i ogrzewano w łaźni wodnej.

Tabela 27. Objętości HCl, NaCl, wody i glikolu propylenowego użyte do przygotowania roztworów kwasu solnego o odpowiednim stężeniu i stałej sile jonowej

c_{HCl} [mol/l]	HCl $2,0 \text{ mol/l}$ [ml]	NaCl $2,0 \text{ mol/l}$ [ml]	H ₂ O [ml]	Glikol propylenowy [ml]
0,05	0,25	2,25	2,50	4,50
0,10	0,50	2,00	2,50	4,50
0,20	1,00	1,50	2,50	4,50
0,30	1,50	1,00	2,50	4,50
0,40	2,00	0,50	2,50	4,50
0,50	2,50	0,00	2,50	4,50

W określonych punktach czasowych pobierano po $0,2 \text{ ml}$ próby badanej, zobojętniano dodając $0,2 \text{ ml}$ buforu octanowego o pH $5,57$ ($0,5 \text{ mol/l}$) i schładzano w mieszaninie wody z lodem dla zatrzymania reakcji rozkładu. Następnie do każdej probówki dodawano $0,2 \text{ ml}$

roztworu wzorca wewnętrznego (Tabela 16, Rozdział 12.2), wymieszano i nanoszono na kolumnę chromatograficzną przy przepływie fazy wybranym dla danego związku (Tabela 16, Rozdział 12.2).

Wartości pH analizowanych roztworów obliczono z następującego wzoru:

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+} = -\log f_{\text{HCl}} [\text{HCl}] \quad (7)$$

gdzie współczynnik aktywności (f_{HCl}) dla temperatury 37°C zaczerpnięto z piśmiennictwa [199] lub odczytano poprzez ekstrapolację danych.

12.3.3. Obserwowane stałe szybkości hydrolizy związku XXVII i jego estrów

Zmiany stężenia poszczególnych związków w czasie opisane są równaniem kinetycznym:

$$\ln P_t = \ln P_0 - k_{\text{obs.}} \cdot t \quad (8)$$

gdzie:

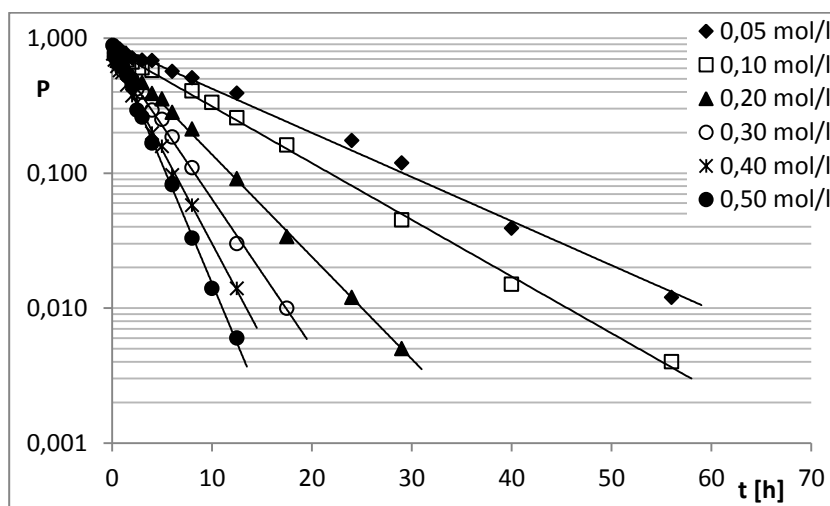
P_t, P_0 – wartości P_i/P_w wyznaczone odpowiednio w czasie t i t_0

$k_{\text{obs.}}$ – obserwowana stała szybkości reakcji hydrolizy

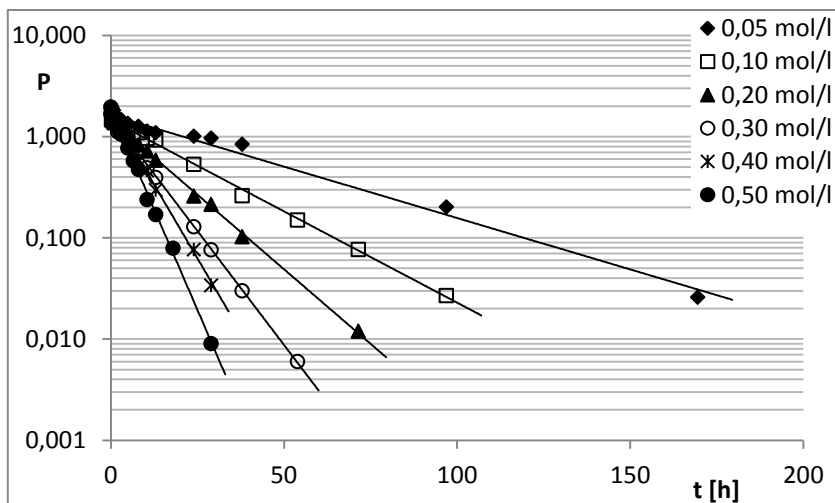
t – czas.

Dla wszystkich badanych substancji półlogarytmiczne wykresy zależności P_t jako funkcji czasu są prostoliniowe (Ryc. 19 – 24) o nachyleniu ujemnym, równym obserwowanej stałej szybkości ze znakiem ujemnym.

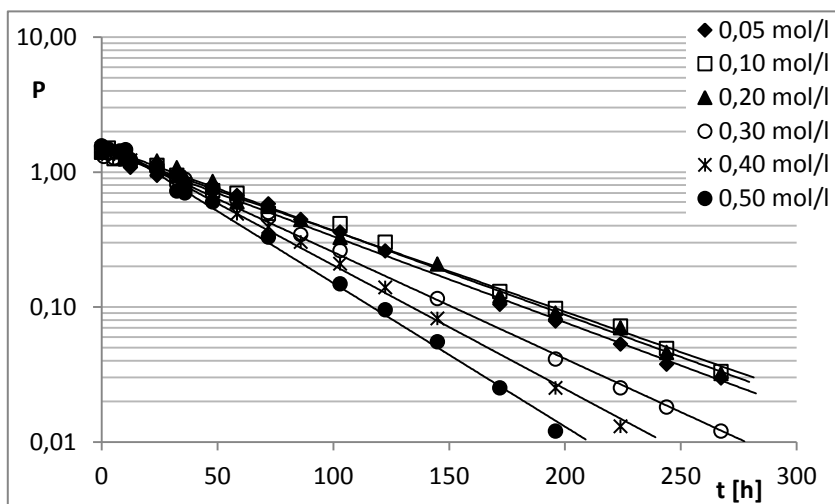
Wartości $k_{\text{obs.}}$ obliczono metodą najmniejszych kwadratów i zamieszczono w tabeli 28.



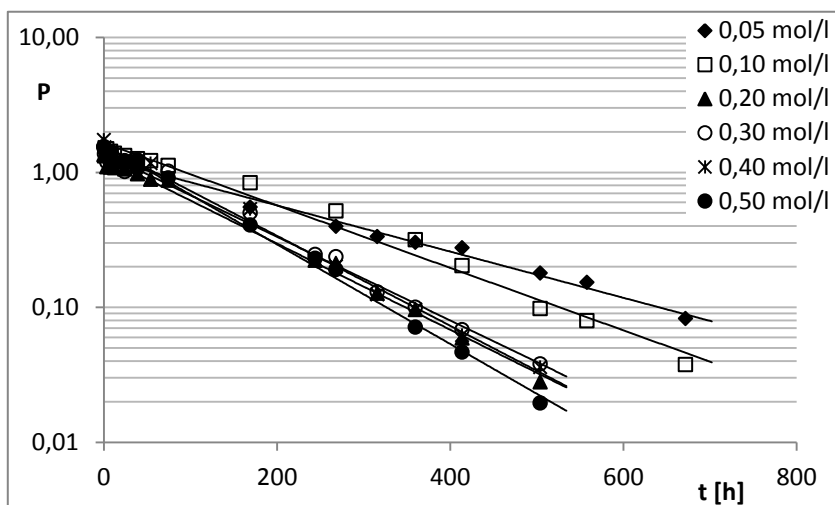
Ryc. 19. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w roztworach wodno-organicznych.



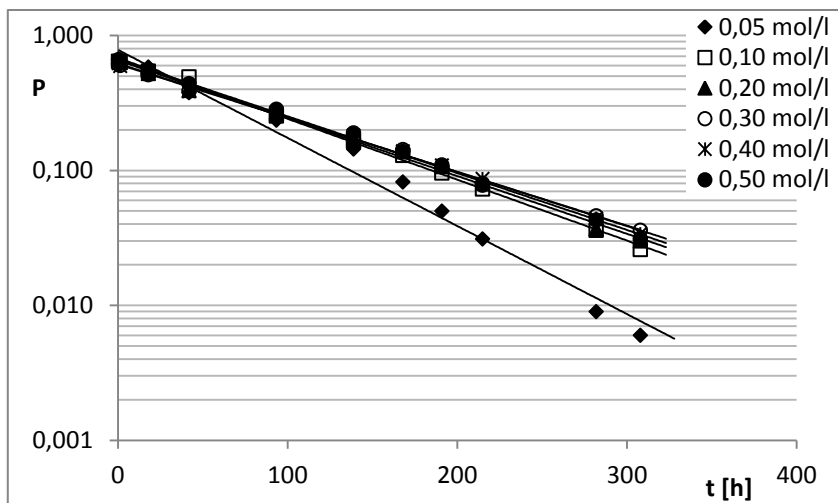
Ryc. 20. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru *i*But-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50 \text{ mol/l}$, w roztworach wodno-organicznych.



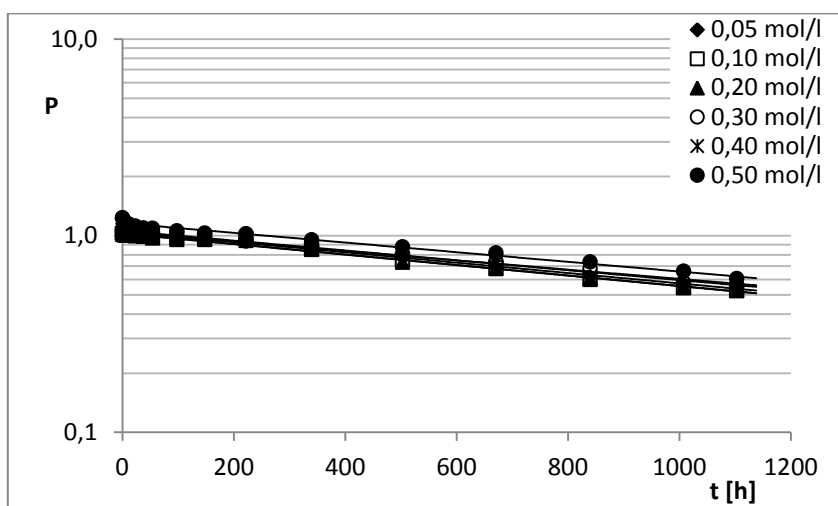
Ryc. 21. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50 \text{ mol/l}$, w roztworach wodno-organicznych.



Ryc. 22. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50 \text{ mol/l}$, w roztworach wodno-organicznych.



Ryc. 23. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50 \text{ mol/l}$, w roztworach wodno-organicznych.



Ryc. 24. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy związku XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50 \text{ mol/l}$, w roztworach wodno-organicznych.

Tabela 28. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy związku XXVII oraz jego estrów w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C)

Związek	c_{HCl} [mol/l]	pH	$k_{\text{obs.}} \pm \Delta k_{\text{obs.}}$ [s^{-1}]	-r	n
Ac-XXVII	0,05	1,38	$(2,09 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$	0,9975	14
	0,10	1,10	$(2,69 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	0,9991	14
	0,20	0,81	$(4,85 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$	0,9996	15
	0,30	0,65	$(6,99 \pm 0,21) \cdot 10^{-5}$	0,9989	14
	0,40	0,52	$(8,90 \pm 0,22) \cdot 10^{-5}$	0,9992	14
	0,50	0,42	$(1,13 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$	0,9991	14
iBut-XXVII	0,05	1,38	$(6,50 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}$	0,9943	13
	0,10	1,10	$(1,15 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	0,9990	13
	0,20	0,81	$(1,88 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	0,9995	12
	0,30	0,65	$(2,88 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	0,9995	15
	0,40	0,52	$(3,73 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$	0,9987	14
	0,50	0,42	$(5,09 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}$	0,9989	14
Piv-XXVII	0,05	1,38	$(4,08 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	0,9981	17
	0,10	1,10	$(3,83 \pm 0,22) \cdot 10^{-6}$	0,9982	18
	0,20	0,81	$(3,99 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}$	0,9984	17
	0,30	0,65	$(5,05 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$	0,9982	18
	0,40	0,52	$(5,87 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$	0,9982	16
	0,50	0,42	$(6,81 \pm 0,23) \cdot 10^{-6}$	0,9984	15
Etc-XXVII	0,05	1,38	$(1,12 \pm 0,11) \cdot 10^{-6}$	0,9900	13
	0,10	1,10	$(1,48 \pm 0,11) \cdot 10^{-6}$	0,9925	14
	0,20	0,81	$(2,07 \pm 0,05) \cdot 10^{-6}$	0,9991	14
	0,30	0,65	$(2,02 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$	0,9981	14
	0,40	0,52	$(2,13 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}$	0,9972	14
	0,50	0,42	$(2,36 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$	0,9983	13
Nic-XXVII	0,05	1,38	$(4,17 \pm 0,42) \cdot 10^{-6}$	0,9912	11
	0,10	1,10	$(2,89 \pm 0,11) \cdot 10^{-6}$	0,9988	11
	0,20	0,81	$(2,74 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$	0,9983	11
	0,30	0,65	$(2,55 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$	0,9991	11
	0,40	0,52	$(2,57 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$	0,9990	11
	0,50	0,42	$(2,69 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$	0,9984	11
XXVII	0,05	1,38	$(1,69 \pm 0,09) \cdot 10^{-7}$	0,9951	17
	0,10	1,10	$(1,71 \pm 0,11) \cdot 10^{-7}$	0,9950	17
	0,20	0,81	$(1,71 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$	0,9967	17
	0,30	0,65	$(1,51 \pm 0,09) \cdot 10^{-7}$	0,9951	17
	0,40	0,52	$(1,61 \pm 0,11) \cdot 10^{-7}$	0,9935	17
	0,50	0,42	$(1,57 \pm 0,13) \cdot 10^{-7}$	0,9902	17

12.3.4. Obserwowane stałe szybkości tworzenia i rozkładu związku XXVII jako produktu hydrolizy badanych estrów

Na analizowanych chromatogramach obserwowano zmiany wielkości pików związku XXVII – produktu rozkładu badanych estrów. Półlogarytmiczne wykresy zależności $P_t = f(t)$ dla zmian stężenia związku XXVII obserwowanych podczas hydrolizy jego estrów przedstawiono na rycinie 25. Obserwowane stałe szybkości reakcji tworzenia (k_T) i/lub rozkładu (k_R) związku XXVII jako produktu hydrolizy jego estrów obliczono z następujących równań:

$$\ln P_t = \ln P_0 - k_R \cdot t \quad (9)$$

$t > t_{maks.}$

oraz

$$\ln (P' - P)_t = \ln (P' - P)_0 - k_T \cdot t \quad (10)$$

$t < t_{maks.}$

gdzie:

P_t, P_0 – wartości ilorazu P_{XXVII}/P_w odpowiednio w czasie t i t_0

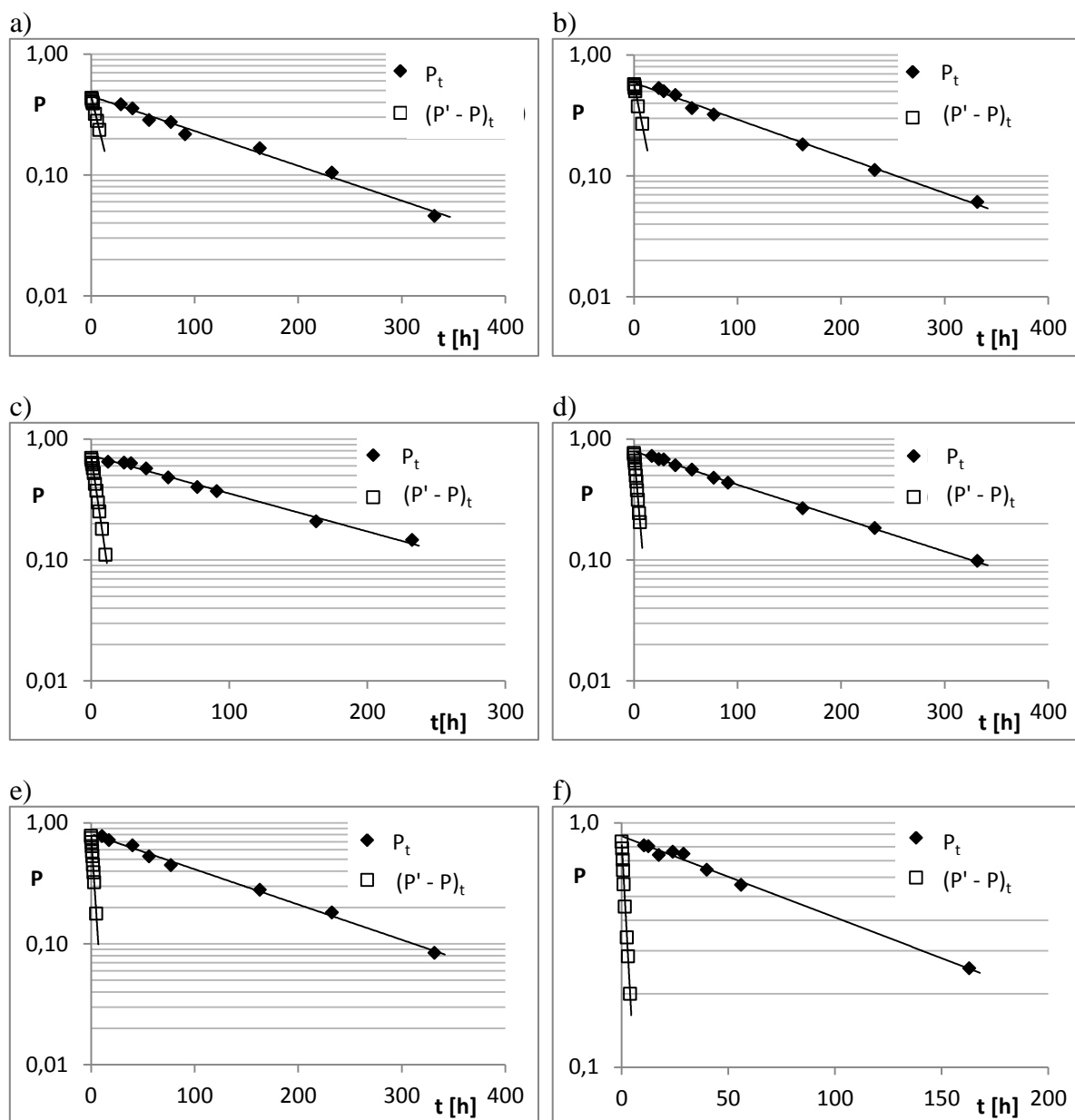
k_R – obserwowana stała szybkości rozkładu XXVII

k_T – obserwowana stała szybkości tworzenia XXVII

P' – teoretyczna wartość P obliczona z równania (9).

Tabela 29. Obliczone wartości obserwowanych stałych szybkości tworzenia związku XXVII (k_T) i jego hydrolizy (k_R)

Substrat	c_{HCl} [mol/l]	Tworzenie związku XXVII			Rozkład związku XXVII		
		$k_T \pm \Delta k_T$ [s ⁻¹]	-r	n_1	$k_R \pm \Delta k_R$ [s ⁻¹]	-r	n_2
Ac- XXVII	0,05	$(2,25 \pm 1,21) \cdot 10^{-5}$	0,9985	8	$(1,85 \pm 0,21) \cdot 10^{-6}$	0,9936	8
	0,10	$(2,74 \pm 0,21) \cdot 10^{-5}$	0,9976	7	$(1,95 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$	0,9968	8
	0,20	$(4,98 \pm 0,10) \cdot 10^{-5}$	0,9996	12	$(2,01 \pm 0,19) \cdot 10^{-6}$	0,9952	9
	0,30	$(6,35 \pm 0,20) \cdot 10^{-5}$	0,9990	12	$(1,77 \pm 0,06) \cdot 10^{-6}$	0,9993	10
	0,40	$(8,33 \pm 0,28) \cdot 10^{-5}$	0,9992	10	$(1,87 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$	0,9978	8
	0,50	$(1,01 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$	0,9978	9	$(2,13 \pm 0,18) \cdot 10^{-6}$	0,9965	8
iBut- XXVII	0,05	$(6,77 \pm 0,33) \cdot 10^{-6}$	0,9988	8	$(2,00 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	0,9993	5
	0,10	$(1,29 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	0,9995	9	$(1,82 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$	0,9993	7
	0,20	$(1,87 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$	0,9984	9	$(1,84 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	0,9984	6
	0,30	$(2,90 \pm 0,08) \cdot 10^{-5}$	0,9992	12	$(1,88 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$	0,9972	7
	0,40	$(3,63 \pm 0,20) \cdot 10^{-5}$	0,9969	12	$(1,82 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	0,9984	6
	0,50	$(5,03 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	0,9992	12	$(1,99 \pm 0,11) \cdot 10^{-6}$	0,9988	7



Ryc. 25. Półlogarytmiczne wykresy zależności P_t oraz $(P_\infty - P_t)$ jako funkcji czasu reakcji tworzenia i rozkładu XXVII z estru Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C):

- a) HCl 0,05 mol/l; pH 1,38
- b) HCl 0,10 mol/l; pH 1,10
- c) HCl 0,20 mol/l; pH 0,81
- d) HCl 0,30 mol/l; pH 0,65
- e) HCl 0,40 mol/l; pH 0,52
- f) HCl 0,50 mol/l; pH 0,42.

12.4. Metoda HPLC oznaczania estrów acyklowiru

Do oceny trwałości estrów acyklowiru w środowisku kwasowym opracowano metodę HPLC, w której zastosowano następujące warunki rozdzielania chromatograficznego:

- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 5 μm
- faza ruchoma: Tabela 30
- przepływ fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- wzorzec wewnętrzny: Tabela 30
- objętość nastrzyku: 20 μl
- detekcja UV: 254 nm.

Badanie wykonano przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Zestaw nr 3).

Tabela 30. Skład fazy ruchomej i roztworów wzorców wewnętrznych dla oznaczania poszczególnych estrów acyklowiru

Związek	Skład fazy ruchomej	Roztwór wzorca wewnętrznego	
		Skład roztworu	Stężenie [μg/ml]
Ac-I	Acetonitryl – bufor fosforanowy pH 6 (0,02 mol/l) (25:75, v/v)	6,00 mg sulfatiazolu w 50,0 ml mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH 6 (0,2 mol/l) (1:1)	120
<i>i</i> But-I Piv-I	Acetonitryl – bufor fosforanowy o pH 6,7 (0,02 mol/l) (30:70, v/v)	9,00 mg 4-hydroksybenzoesanu metylu w 100,0 ml mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH 6,7 (0,2 mol/l) (1:1)	90
Etc-I Nic-I	roztwór KH ₂ PO ₄ (0,50 mol/l) – acetonitryl – kwas octowy (99,9%) – woda dejonizowana (40:200:5:755, v/v/v/v)	12,00 mg sulfamerazyny w 50,0 ml mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH 6 (0,2 mol/l) (1:1)	240

Selektywność

W celu sprawdzenia selektywności metody do realizacji zaplanowanych badań wykorzystano roztwory estrów acyklowiru w kwasie solnym (0,05 – 0,50 mol/l) ogrzewane w temperaturze 37°C. Próbkę nanoszono na kolumnę i w przedziałach czasu od 0 do 6 (Ac-I), 8 (Etc-I i Nic-I) lub 10 (*i*But-I i Piv-I) minut rejestrowano chromatogramy. Dla wszystkich analizowanych estrów, we wszystkich stężeniach kwasu, w badanym przedziale czasu obserwowano wyraźnie rozdzielone piki: estru, ACV jako produktu rozkładu oraz wzorca wewnętrznego (Tabela 31). W przypadku estru Nic-I, potencjalnym

produktem hydrolizy jest kwas nikotynowy (KwN), którego czas retencji (t_r = ok. 2 min) jest zgodny z czasem retencji acyklowiru w warunkach chromatografowania opisanych dla tego estru (Tabela 31). Potwierdza to wystarczającą do badań trwałości analizowanych związków selektywność oznaczania estrów w obecności ACV i wzorców wewnętrznych z zastosowaniem opracowanych warunków chromatografowania.

Tabela 31. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach

Metoda HPLC dla związku	Czas retencji [min]		
	ACV	Związek	Wzorzec wewnętrzny
Ac-I	1,99	Ac-I: 2,48	3,70
<i>i</i> But-I Piv-I	1,95	<i>i</i> But-I: 3,28 Piv-I: 4,05	7,15
Etc-I Nic-I	2,09	Etc-I: 4,55 Nic-I: 3,50 KwN: 2,00	6,20

Liniowość

Odważono 12,50 lub 25,00 mg substancji, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej, rozpuszczono w odpowiedniej objętości HCl, uzupełniono do 25,0 ml fazą ruchomą przygotowaną do oznaczania danego związku (Tabele 30 i 32) i wymieszano (roztwór E). Następnie odmierzoną odpowiednią objętość roztworu E, uzupełniono wyżej wymienioną fazą do 10,0 ml i wymieszano, uzyskując odpowiednie stężenie roztworu F (Tabele 33 – 35). Na kolumnę chromatograficzną nanoszono po 20 μ l mieszaniny roztworu F i odpowiedniego wzorca wewnętrznego (1:1) i rejestrowano chromatogramy w układzie faz opracowanym dla oznaczania danego związku.

Tabela 32. Odważki związków badanych i objętości HCl użyte do rozpuszczenia próbek

Związek	Odważka [mg]	HCl do rozpuszczenia
ACV	25,00	1,0 ml 0,1 mol/l
Ac-I	25,00	2,0 ml 0,1 mol/l
<i>i</i> But-I	12,50	2,0 ml 0,3 mol/l
Piv-I	12,50	3,0 ml 0,3 mol/l
Etc-I	12,50	1,0 ml 0,3 mol/l
Nic-I	12,50	1,5 ml 0,3 mol/l

Uzyskane stężenia, względne pola powierzchni pików ($P = P_i/P_w$) oraz ocenę statystyczną parametrów równań liniowych zależności $P = f(c)$ zamieszczono w tabelach 33 – 35 oraz na rycinie 26.

Tabela 33. Stężenia roztworów ACV i Ac-I, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

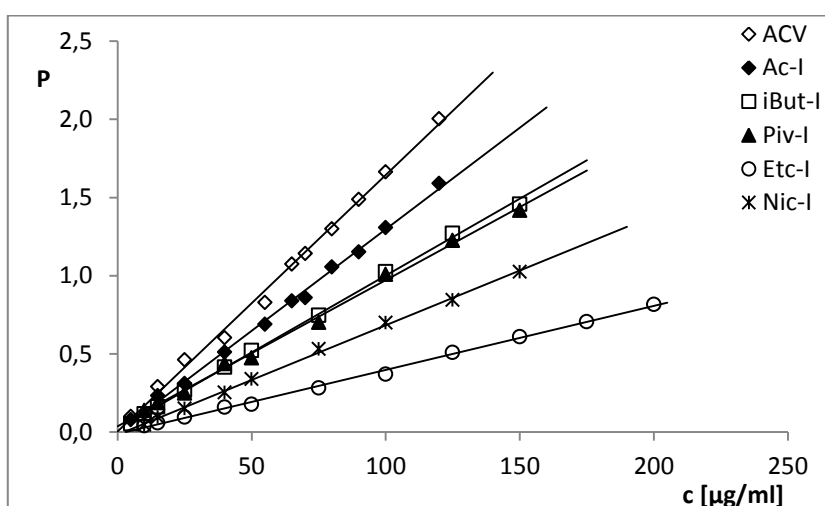
Lp.	ACV			Ac-I		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	15,0	0,205	$y = ax + b$ $a = (1,67 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$ $b = (-4,10 \pm 5,09) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 3,08 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,25 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -1,823$ $t_{0,05}(8) = 2,306$ $r = 0,9986$	15,0	0,212	$y = ax + b$ $a = (1,30 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$ $b = (-6,30 \pm 35,69) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 2,16 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,58 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -0,399$ $t_{0,05}(8) = 2,306$ $r = 0,9989$
2	25,0	0,402		25,0	0,311	
3	40,0	0,604		40,0	0,512	
4	55,0	0,829		55,0	0,689	
5	65,0	1,074		65,0	0,838	
6	70,0	1,141		70,0	0,859	
7	80,0	1,299		80,0	1,056	
8	90,0	1,488	$y = ax$ $a = (1,62 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 2,90 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9986$	90,0	1,152	$y = ax$ $a = (1,29 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 2,03 \cdot 10^{-3}$ $r = 0,9989$
9	100,0	1,663		100,0	1,307	
10	120,0	1,929		120,0	1,551	

Tabela 34. Stężenia roztworów iBut-I i Piv, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	iBut-I			Piv-I		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	5,0	0,053	$y = ax + b$ $a = (1,01 \pm 0,01) \cdot 10^{-2}$ $b = (9,16 \pm 11,12) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,29 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 4,82 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,898$ $t_{0,05}(8) = 2,306$ $r = 0,9998$	10,0	0,138	$y = ax + b$ $a = (9,70 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ $b = (1,53 \pm 2,08) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,09 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 8,79 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,740$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9996$
2	10,0	0,117		15,0	0,188	
3	15,0	0,162		25,0	0,250	
4	25,0	0,268		40,0	0,438	
5	40,0	0,416		50,0	0,475	
6	50,0	0,522		75,0	0,701	
7	75,0	0,747		100,0	1,017	
8	100,0	1,025	$y = ax$ $a = (1,02 \pm 0,01) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 5,93 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9998$	125,0	1,225	$y = ax$ $a = (9,86 \pm 0,24) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,02 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9996$
9	125,0	1,271		150,0	1,419	
10	150,0	1,537				

Tabela 35. Stężenia roztworów Etc-I i Nic-I, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Etc-I			Nic-I		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	10,0	0,041	$y = ax + b$ $a = (4,06 \pm 0,01) \cdot 10^{-3}$ $b = (-5,85 \pm 8,74) \cdot 10^{-4}$ $S_a = 3,56 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 3,86 \cdot 10^{-3}$ $t_b = -1,514$ $t_{0,05}(9) = 2,262$ $r = 0,9997$	10,0	0,057	$y = ax + b$ $a = (7,00 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$ $b = (-1,34 \pm 1,58) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 8,49 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 6,86 \cdot 10^{-3}$ $t_b = -1,959$ $t_{0,05}(7) = 2,365$ $r = 0,9995$
2	15,0	0,058		15,0	0,095	
3	25,0	0,095		25,0	0,151	
4	40,0	0,160		40,0	0,253	
5	50,0	0,197		50,0	0,339	
6	75,0	0,282		75,0	0,531	
7	100,0	0,391		100,0	0,700	
8	125,0	0,509	125,0	0,856	$y = ax$ $a = (6,86 \pm 0,18) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 7,94 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9995$	
9	150,0	0,609	150,0	1,026		
10	175,0	0,706				
11	200,0	0,806				



Ryc. 26. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni piku substancji badanej do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia ACV i jego estrów.

Granica wykrywalności i oznaczalności, zakres i czułość metody

Granice wykrywalności (LOD), granice oznaczalności (LOQ) oraz zakres metody HPLC oznaczania analizowanych związków wyznaczono zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 12.2.

Wyniki przedstawiono w tabeli 36.

Tabela 36. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków

Związek	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]	$y = ax$	Zakres [$\mu\text{g/ml}$]
ACV	4,44	13,45	$y = (1,62 \pm 0,06) \cdot 10^{-2} \cdot x$	15,0 – 120,0
Ac-I	4,02	12,18	$y = (1,29 \pm 0,05) \cdot 10^{-2} \cdot x$	15,0 – 120,0
<i>t</i> But-I	1,57	4,76	$y = (1,02 \pm 0,01) \cdot 10^{-2} \cdot x$	5,0 – 150,0
Piv-I	2,99	9,06	$y = (9,86 \pm 0,24) \cdot 10^{-3} \cdot x$	10,0 – 150,0
Etc-I	3,14	9,51	$y = (4,02 \pm 0,01) \cdot 10^{-3} \cdot x$	10,0 – 200,0
Nic-I	3,23	9,80	$y = (6,86 \pm 0,18) \cdot 10^{-3} \cdot x$	10,0 – 150,0

Precyzja, dokładność, powtarzalność

Precyzję i dokładność metody oznaczania każdego z estrów oceniono wykonując po sześć oznaczeń ich zawartości w roztworach o wybranych stężeniach ($n = 6$). W celu wyznaczenia powtarzalności oznaczeń pomiędzy dniami, kolejnego dnia cały proces wykonano ponownie. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 37. Do obliczenia stężeń poszczególnych związków wykorzystano parametry zależności $P = f(c)$ (Tabela 36).

Tabela 37. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń ACV oraz jego estrów ($n = 6$)

Związek	$c_{\text{dekl.}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Dzień analizy	Precyzja		Dokładność		W_{zr} [%]
			$c_{\text{ozn.}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Ocena statystyczna	Odzysk [%]	Ocena statystyczna	
ACV	25	1	$21,4 \pm 0,3$	$S = 0,352$ $S_x = 0,144$ $W_z = 1,65\%$	$85,4 \pm 1,4$	$S = 1,41$ $S_x = 0,574$ $W_z = 1,65\%$	0,34
		2	$22,0 \pm 0,2$	$S = 0,230$ $S_x = 9,37 \cdot 10^{-2}$ $W_z = 1,04\%$	$88,1 \pm 0,9$	$S = 0,918$ $S_x = 0,375$ $W_z = 1,04\%$	
	90	1	$91,1 \pm 1,1$	$S = 1,10$ $S_x = 0,451$ $W_z = 1,21\%$	$101,3 \pm 1,2$	$S = 1,23$ $S_x = 0,501$ $W_z = 1,21\%$	0,28
		2	$90,1 \pm 0,8$	$S = 0,800$ $S_x = 0,326$ $W_z = 0,89\%$	$100,1 \pm 0,8$	$S = 0,889$ $S_x = 0,363$ $W_z = 0,89\%$	
Ac-I	25	1	$23,2 \pm 0,2$	$S = 0,191$ $S_x = 0,078$ $W_z = 0,82\%$	$92,8 \pm 0,8$	$S = 0,766$ $S_x = 0,312$ $W_z = 0,82\%$	0,37
		2	$24,0 \pm 0,3$	$S = 0,270$ $S_x = 0,110$ $W_z = 1,12\%$	$96,1 \pm 1,1$	$S = 1,08$ $S_x = 0,441$ $W_z = 1,12\%$	
	90	1	$88,6 \pm 1,1$	$S = 1,15$ $S_x = 0,470$ $W_z = 1,30\%$	$98,5 \pm 1,3$	$S = 1,28$ $S_x = 0,522$ $W_z = 1,30\%$	0,24
		2	$85,8 \pm 0,4$	$S = 0,365$ $S_x = 0,149$ $W_z = 0,42\%$	$95,3 \pm 0,4$	$S = 0,405$ $S_x = 0,165$ $W_z = 0,42\%$	

cd. Tabela 37.

iBut-I	25	1	23,8 ± 0,4	S = 0,433 S _x = 0,177 W _z = 1,81%	95,4 ± 1,7	S = 1,73 S _x = 0,707 W _z = 1,81%	0,37
		2	25,2 ± 0,3	S = 0,271 S _x = 0,111 W _z = 1,07%	101,0 ± 1,1	S = 1,08 S _x = 0,442 W _z = 1,07%	
	125	1	131,6 ± 1,6	S = 1,66 S _x = 0,676 W _z = 1,26%	105,3 ± 1,3	S = 1,32 S _x = 0,540 W _z = 1,26%	0,28
		2	129,4 ± 1,1	S = 1,14 S _x = 0,468 W _z = 0,89%	103,5 ± 0,9	S = 0,917 S _x = 0,374 W _z = 0,89%	
Piv-I	25	1	23,3 ± 0,4	S = 0,388 S _x = 0,158 W _z = 1,66%	93,1 ± 1,5	S = 1,55 S _x = 0,633 W _z = 1,66%	0,36
		2	23,0 ± 0,3	S = 0,264 S _x = 0,108 W _z = 1,14%	92,2 ± 1,0	S = 1,06 S _x = 0,431 W _z = 1,14%	
	125	1	117,3 ± 0,7	S = 0,675 S _x = 0,276 W _z = 0,57%	93,8 ± 0,5	S = 0,540 S _x = 0,220 W _z = 0,57%	0,31
		2	117,6 ± 1,2	S = 1,16 S _x = 0,474 W _z = 0,99%	94,0 ± 0,9	S = 0,928 S _x = 0,379 W _z = 0,99%	
Etc-I	25	1	24,2 ± 0,3	S = 0,291 S _x = 0,119 W _z = 1,21%	96,6 ± 1,2	S = 1,17 S _x = 0,476 W _z = 1,21%	0,35
		2	23,8 ± 0,4	S = 0,378 S _x = 0,154 W _z = 1,59%	95,3 ± 1,5	S = 1,51 S _x = 0,618 W _z = 1,59%	
	175	1	176,2 ± 0,6	S = 0,626 S _x = 0,256 W _z = 0,35%	100,7 ± 0,4	S = 0,358 S _x = 0,146 W _z = 0,35%	0,18
		2	177,6 ± 1,0	S = 0,965 S _x = 0,394 W _z = 0,54%	101,5 ± 0,6	S = 0,551 S _x = 0,225 W _z = 0,54%	

cd. Tabela 37.

Nic-I	40	1	39,7 ± 0,7	S = 0,732 S _x = 0,299 W _z = 1,84%	99,2 ± 1,8	S = 1,83 S _x = 0,748 W _z = 1,84%	0,37
		2	42,0 ± 0,5	S = 0,462 S _x = 0,189 W _z = 1,10%	104,9 ± 1,1	S = 1,16 S _x = 0,472 W _z = 1,10%	
	125	1	124,6 ± 0,6	S = 0,658 S _x = 0,269 W _z = 0,53%	99,7 ± 0,5	S = 0,526 S _x = 0,215 W _z = 0,53%	0,31
		2	137,3 ± 1,4	S = 1,38 S _x = 0,562 W _z = 1,00%	109,8 ± 1,1	S = 1,10 S _x = 0,450 W _z = 1,00%	

c_{dekl} – deklarowane stężenie substancji w roztworze

c_{ozn} – stężenie substancji w roztworze oznaczone metodą HPLC

Odzysk = 100% c_{ozn}/c_{dekl}

12.5. Badanie trwałości estrów acyklowiru w środowisku kwasowym

Odmierzano 9,5 ml roztworów kwasu solnego (0,05 – 0,50 mol/l) o stałej wartości siły jonowej ($\mu = 0,50$ mol/l) do sześciu zakręczanych probówek i doprowadzano do temperatury 37°C. Odważano 2,70 mg substancji badanej i rozpuszczano w 0,75 ml kwasu solnego o odpowiednim stężeniu. 0,50 ml roztworów estrów przenoszono do odpowiednich inkubowanych roztworów kwasu solnego i ogrzewano w łaźni wodnej. W określonych punktach czasowych pobierano po 0,2 ml próby badanej, zobojętniano dodając 0,2 ml roztworu NaOH o stężeniu odpowiadającym stężeniu użytego kwasu i schładzano w mieszaninie wody z lodem dla zatrzymania reakcji rozkładu. Następnie do każdej probówki dodawano 0,2 ml roztworu wzorca wewnętrznego (Tabela 30, Rozdział 12.4), wymieszano, nanoszono na kolumnę chromatograficzną i rejestrowano chromatogramy w układzie faz opracowanym dla odpowiedniego estru (Tabela 30, Rozdział 12.4).

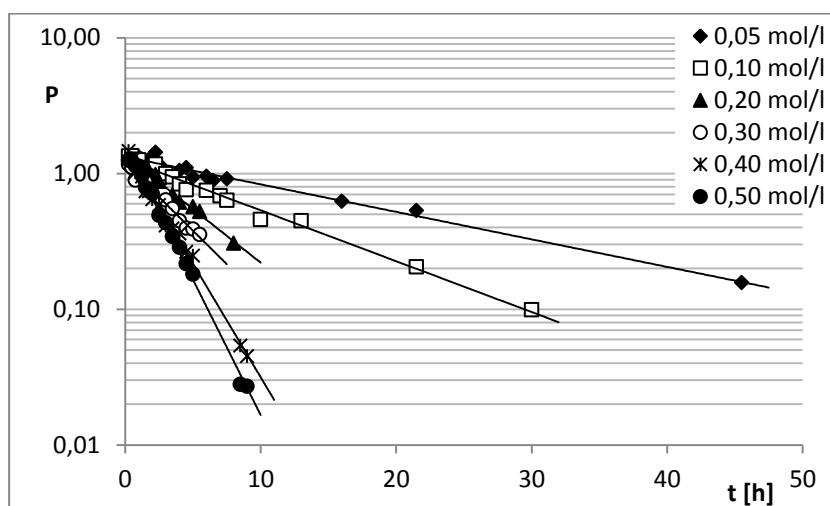
Wartości pH analizowanych roztworów obliczono z wzoru (7).

12.5.1. Obserwowane stałe szybkości hydrolizy estrów acyklowiru

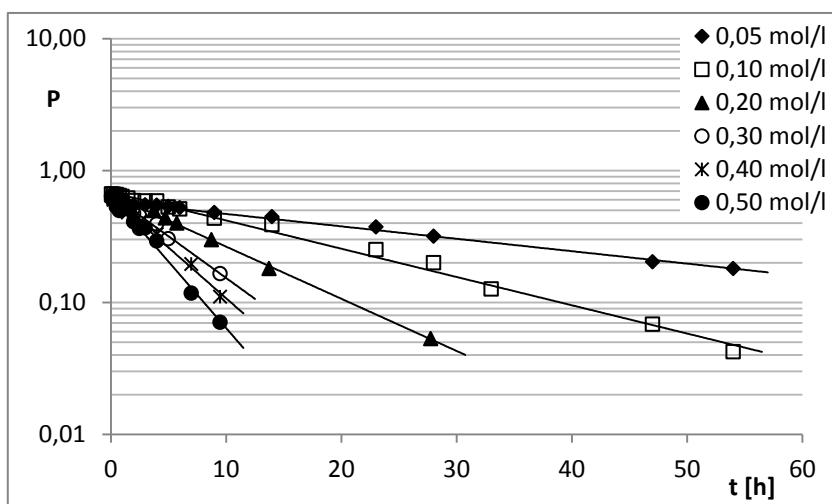
Zmiany stężenia poszczególnych estrów w czasie opisane są równaniem (8).

Dla wszystkich badanych substancji półlogarytmiczne wykresy zależności P_t jako funkcji czasu są prostoliniowe (Ryc. 27 – 31) o nachyleniu ujemnym, równym obserwowanej stałej szybkości ze znakiem ujemnym.

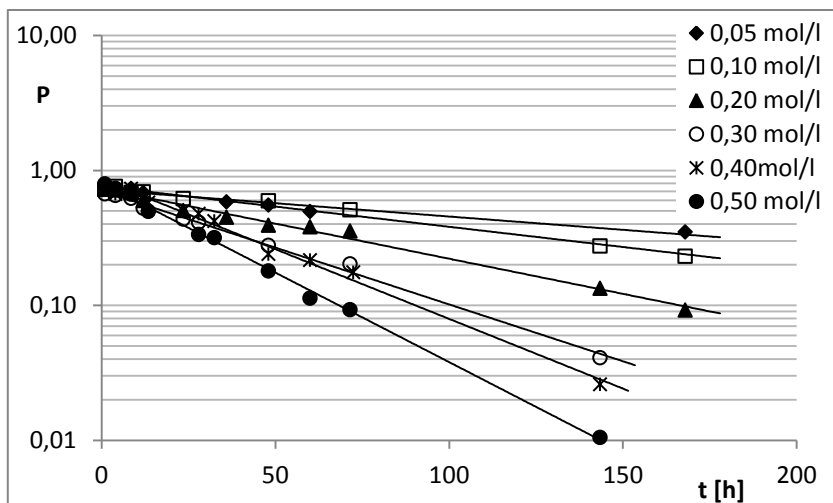
Wartości k_{obs} obliczono metodą najmniejszych kwadratów i zamieszczono w tabeli 38.



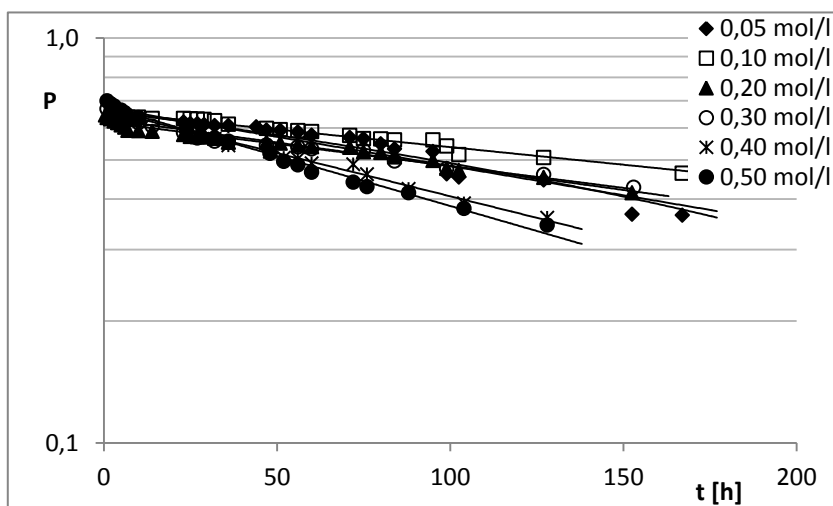
Ryc. 27. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-I w kwasie solnym o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).



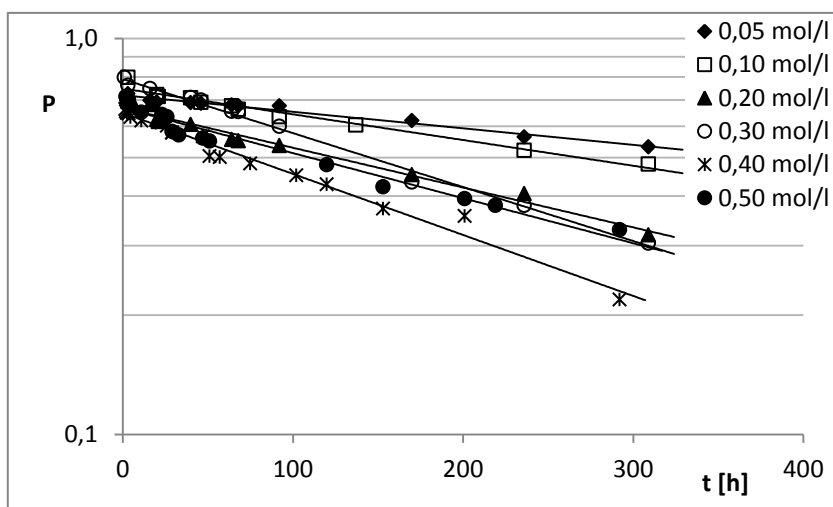
Ryc. 28. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru iBut-I w kwasie solnym o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).



Ryc. 29. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-I w kwasie solnym o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).



Ryc. 30. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-I w kwasie solnym o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).



Ryc. 31. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-I w kwasie solnym o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

Tabela 38. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy estrów acyklowiru w kwasie solnym ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C)

Związek	c_{HCl} [mol/l]	pH	$k_{\text{obs.}} \pm \Delta k_{\text{obs.}}$ [s^{-1}]	-r	n
Ac-I	0,05	1,38	$(1,30 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$	0,9908	13
	0,10	1,10	$(2,40 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}$	0,9928	18
	0,20	0,81	$(5,06 \pm 0,38) \cdot 10^{-5}$	0,9924	15
	0,30	0,65	$(6,32 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$	0,9904	11
	0,40	0,52	$(1,07 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	0,9968	16
	0,50	0,42	$(1,28 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	0,9977	15
<i>i</i> But-I	0,05	1,38	$(6,02 \pm 0,22) \cdot 10^{-6}$	0,9979	17
	0,10	1,10	$(1,37 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	0,9966	18
	0,20	0,81	$(2,53 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	0,9989	13
	0,30	0,65	$(4,04 \pm 0,28) \cdot 10^{-5}$	0,9964	10
	0,40	0,52	$(4,91 \pm 0,28) \cdot 10^{-5}$	0,9976	10
	0,50	0,42	$(6,45 \pm 0,55) \cdot 10^{-5}$	0,9937	11
Piv-I	0,05	1,38	$(1,07 \pm 0,29) \cdot 10^{-6}$	0,9728	7
	0,10	1,10	$(1,92 \pm 0,22) \cdot 10^{-6}$	0,9919	9
	0,20	0,81	$(3,33 \pm 0,26) \cdot 10^{-6}$	0,9945	11
	0,30	0,65	$(5,39 \pm 0,34) \cdot 10^{-6}$	0,9975	9
	0,40	0,52	$(6,60 \pm 0,54) \cdot 10^{-6}$	0,9950	10
	0,50	0,42	$(8,57 \pm 0,31) \cdot 10^{-6}$	0,9990	10
Etc-I	0,05	1,38	$(2,48 \pm 0,33) \cdot 10^{-7}$	0,9614	22
	0,10	1,10	$(4,06 \pm 0,44) \cdot 10^{-7}$	0,9779	19
	0,20	0,81	$(5,47 \pm 0,64) \cdot 10^{-7}$	0,9703	22
	0,30	0,65	$(7,26 \pm 0,62) \cdot 10^{-7}$	0,9836	22
	0,40	0,52	$(9,53 \pm 0,93) \cdot 10^{-7}$	0,9833	18
	0,50	0,42	$(1,15 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}$	0,9877	16
Nic-I	0,05	1,38	$(2,67 \pm 0,30) \cdot 10^{-7}$	0,9888	11
	0,10	1,10	$(4,15 \pm 0,57) \cdot 10^{-7}$	0,9839	11
	0,20	0,81	$(6,43 \pm 0,71) \cdot 10^{-7}$	0,9894	11
	0,30	0,65	$(8,72 \pm 0,54) \cdot 10^{-7}$	0,9961	12
	0,40	0,52	$(9,86 \pm 0,71) \cdot 10^{-7}$	0,9902	19

12.5.2. Obserwowane stałe szybkości tworzenia acyklowiru w reakcji hydrolizy jego estrów

Na analizowanych chromatogramach obserwowano zmiany wielkości piku ACV (I) – produktu rozkładu badanych estrów.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $P = f(t)$ dla zmian stężenia ACV jako produktu hydrolizy estrów Ac-I, *i*But-I i Piv-I w wybranych warunkach reakcji przedstawiono na rycinie 32.

Obserwowane stałe szybkości tworzenia ACV obliczono z następującego wzoru:

$$\ln(P_{\infty} - P_t) = \ln(P_{\infty} - P_0) - k_{ACV} \cdot t \quad (11)$$

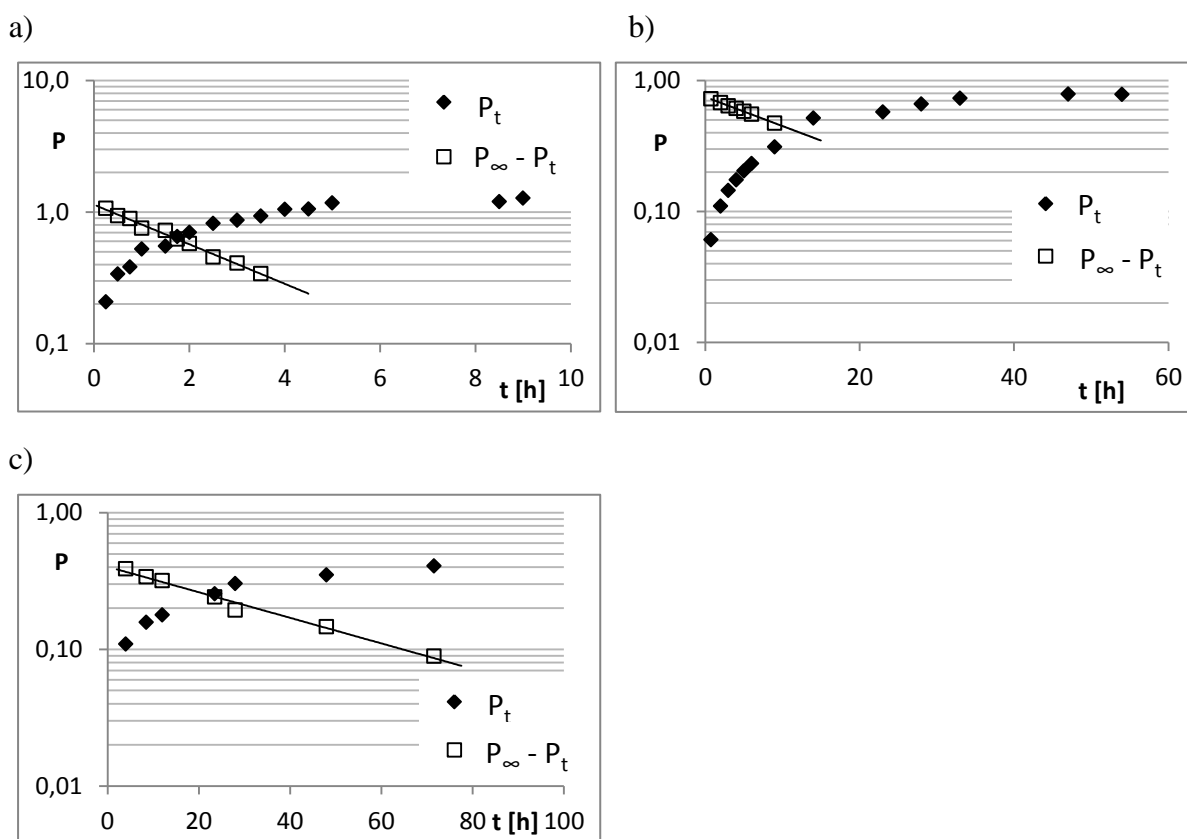
gdzie:

P_t, P_0 – wartości ilorazu P_{ACV}/P_w odpowiednio w czasie t i t_0

P_{∞} – wartość P_t po czasie $t \rightarrow \infty$

k_{ACV} – obserwowana stała szybkości tworzenia ACV.

Wartości stałych szybkości reakcji tworzenia ACV obliczono techniką odejmowania oraz porównano statystycznie, testem równoległości z odpowiednimi wartościami k_{obs} hydrolizy estrów Ac-I, *i*But-I oraz Piv-I. Wartość obliczoną testem t-Studenta porównano z wartością krytyczną $t_{0,05}(n_1+n_2-4)$ (Tabela 39).



Ryc. 32. Półlogarytmiczne wykresy zależności P_t oraz $(P_{\infty} - P_t)$ jako funkcji czasu obserwowanej reakcji tworzenia i rozkładu acyklowiru w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C):

- z estru Ac-I (HCl 0,4 mol/l; pH 0,52)
- z estru *i*But-I (HCl 0,1 mol/l; pH 1,10)
- z estru Piv-I (HCl 0,3 mol/l; pH 0,65).

Tabela 39. Obliczone wartości obserwowanych stałych szybkości tworzenia ACV (k_{ACV}) i hydrolizy estrów Ac-I, *i*But-I i Piv-I ($k_{obs.}$) oraz parametry statystyczne testu równoległości

Substrat	Tworzenie ACV			Rozkład estru		Test równoległości	
	$k_{ACV} \pm \Delta k_{ACV} [s^{-1}]$	-r	n_1	$k_{obs.} \pm \Delta k_{obs.} [s^{-1}]$	n_2	t	$t_{0,05} (n_1+n_2-4)$
Ac-I	$(9,60 \pm 0,80) \cdot 10^{-5}$	0,9948	10	$(1,07 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	16	1,739	2,074
<i>i</i> But-I	$(1,42 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	0,9998	7	$(1,37 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	18	0,181	2,080
Piv-I	$(5,98 \pm 0,77) \cdot 10^{-6}$	0,9938	7	$(5,39 \pm 0,34) \cdot 10^{-6}$	9	1,764	2,179

13. Test stresowy, przyspieszony i pośredni oceny trwałości związku XXVII

13.1. Parametry analizy zmian stężenia związku XXVII – trójcyklicznego analogu ACV

Do oceny trwałości związku XXVII wykorzystano opracowaną i zwalidowaną metodę HPLC (Tabela 16, Rozdział 12.2). Chromatogramy rozwijano przy użyciu Zestawu nr 2, podczas analizy jednorodności piku korzystano z detektora DAD w trybie skanowania 200 – 400 nm.

W analizie jakościowej obecności ACV w mieszaninach reakcyjnych zastosowano metodę HPLC-MS/MS wykonując badania we współpracy z prof. dr. hab. Zenonem Kokotem, dr. Pawłem Derezińskim oraz mgr Agnieszką Klupczyńską (Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UMP). Separację chromatograficzną przeprowadzono w następujących warunkach:

- aparatura: zestaw LC-MS/MS składający się z wysokosprawnego chromatografu cieczowego 1260 Infinity (Agilent Technologies) sprzężonego ze spektrometrem mas z potrójnym kwadrupolem 4000 QTRAP (AB Sciex)
- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 5 μm
- temperatura kolumny: 24°C
- faza ruchoma: mieszanina acetonitryl – woda (35:65) z modyfikatorami (mrówczan amonu 0,005 mol/l i kwas mrówkowy 0,1%)
- przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min
- objętość nasyty: 10 μl
- detekcja: tandemowy spektrometr mas 4000 QTRAP (AB Sciex) z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI) i detekcją z użyciem potrójnego kwadrupola, pozytywny tryb

jonizacji, napięcie elektrody: 5500 V, temperatura: 550°C, gaz rozpylający 1: 50,0 psig, gaz rozpylający 2: 60,0 psig, gaz kurtynowy: 40,0 psig, potencjał wejścia: 10,0 V

- tryb monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM) – przejścia MRM i zoptymalizowane powiązane parametry (DP – potencjał rozpadu klastrów, ang. *Declustering Potential*, CE – energia kolizji, ang. *Collision Energy*, CXP – potencjał wyjścia z komory kolizyjnej, ang. *Collision Cell Exit Potential*, DT – czas oczekiwania, ang. *Dwell time*) przedstawiono w tabeli 40.

Tabela 40. Zoptymalizowane parametry analizy MS/MS

Substancja	Masa atomowa [Da]	Jon prekursorowy [m/z]	Jony potomne [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	DT [ms]
XXVII	355,3	356,3	294,1 282,1 267,1 239,1	50	24 29 48 59	16 15 15 13	78
ACV	225,2	226,2	152,1 135,1 110,1	51	20 12 43	13 12 10	78

13.2. Test stresowy

13.2.1. Środowisko kwasowe, zasadowe i obojętne

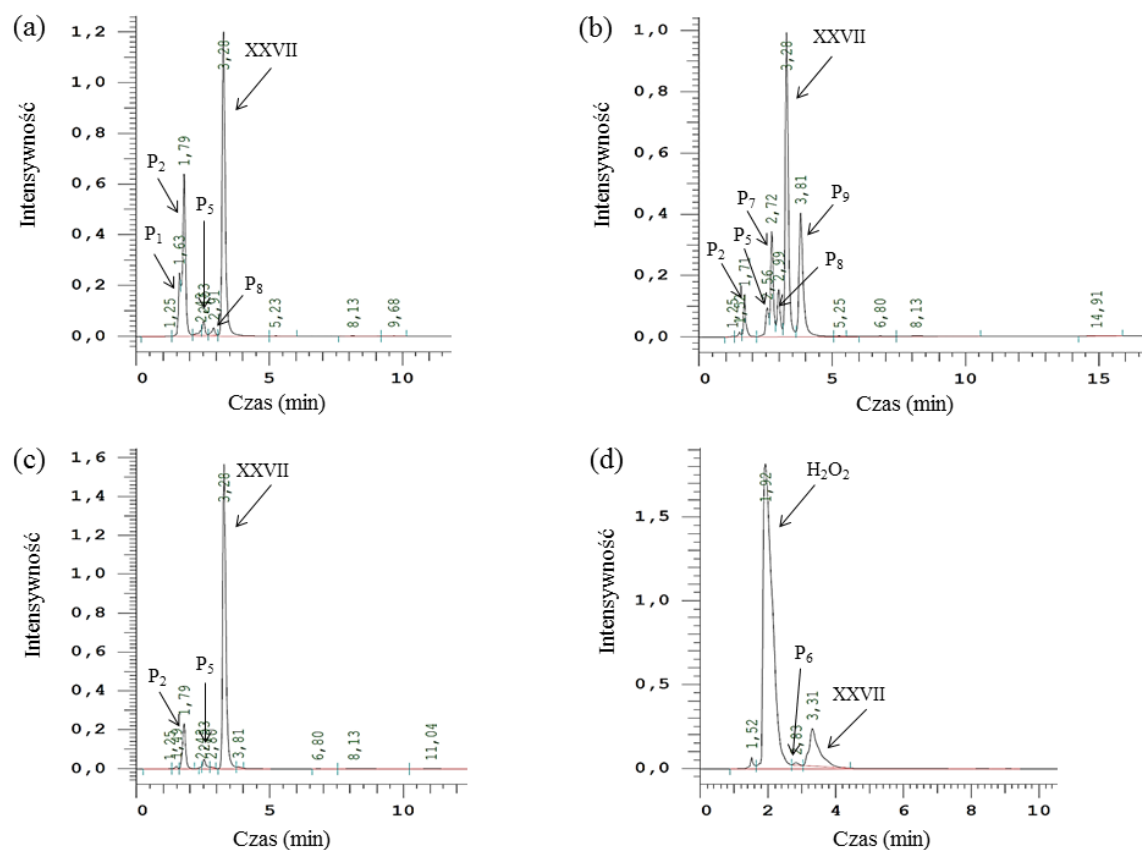
Odważano około 1,00 mg substancji do zakręcanych próbek o pojemności 10 ml. Dodano 10,0 ml wody dejonizowanej, kwasu solnego 0,1 mol/l lub roztworu wodorotlenku sodu 0,1 mol/l i umieszczono w płuczce ultradźwiękowej na 5 minut. Probówki przechowywano w warunkach podanych w tabeli 41. Po odpowiednim czasie (36 h i 72 h dla środowiska obojętnego, 24 h, 72 h i 7 dni dla środowiska kwasowego i zasadowego) roztwory schłodzono do temperatury pokojowej (25°C). Następnie mieszaniny reakcyjne rozcieńczano wodą dejonizowaną lub zobojętniano odpowiednio roztworem NaOH 0,1 mol/l lub HCl 0,1 mol/l (1:1) w celu uzyskania takiego samego stężenia związku XXVII (0,05 mg/ml, roztwory G). Na kolumnę chromatograficzną nanoszono roztwory G i rejestrowano sygnały wszystkich produktów rozkładu badanego związku (Ryc. 33). W celu ilościowej analizy zmian stężenia związku XXVII na kolumnę nanoszono mieszaniny roztworów G i wzorca wewnętrznego (1:1) – roztwory H. Równocześnie sporządzono chromatogramy mieszanin roztworów porównawczych substancji badanej (związek XXVII, 0,05 mg/ml) i roztworów

wzorca wewnętrznego (1:1) - roztwory I. Badanie powtórzono 3-krotnie. Zawartość substancji badanej w roztworach poddanych rozkładowi została obliczona jako procent zawartości w stosunku do roztworów odniesienia (Tabela 41).

Tabela 41. Zawartość związku XXVII w roztworach poddanych hydrolizie lub działaniu czynnika utleniającego, klasyfikacja wg ICH oraz czasy retencji produktów degradacji

Warunki stresowe	Czas	Zawartość [%]	Bilans masy ^a	Klasyfikacja ICH	Produkty	t _r [min]
H ₂ O 90°C	36 h	96,42 ± 1,45	99,6	nietrwały	P ₁	1,63
	72 h	73,30 ± 1,42	98,7		P ₂ P ₅ P ₈	1,79 (główny) 2,53 2,91
HCl 0,1 mol/l 90°C	24 h	79,86 ± 1,76	99,9	nietrwały	P ₂ P ₅ P ₇ P ₈ P ₉	1,71 2,56 2,72 2,99 3,81 (główny)
	72 h	76,30 ± 2,30	98,0			
	7 dni	0	97,7		P ₂ P ₄ P ₇ P ₁₀	1,79 2,40 2,75 (główny) 3,94
NaOH 0,1 mol/l 90°C	24 h	89,93 ± 0,97	100,0	nietrwały	P ₂ P ₅	1,79 (główny) 2,53
	72 h	79,36 ± 2,47	97,3			
	7 dni	17,13 ± 0,23	97,6		P ₂ P ₃ P ₅	1,79 1,87 (główny) 2,59
3% H ₂ O ₂ temp. pok.	6 h	79,82 ± 1,42	99,7	nietrwały	P ₆	2,83

^a (% zawartość + % zanieczyszczenia +% produkty degradacji)



Ryc. 33. Chromatogramy HPLC związku XXVII poddanego
a) hydrolizie w środowisku obojętnym (H₂O, 90°C, 72 h)
b) hydrolizie w środowisku kwasowym (HCl, 0,1 mol/l, 90°C, 24 h)
c) hydrolizie w środowisku zasadowym (NaOH, 0,1 mol/l, 90°C, 24 h)
d) działaniu środka utleniającego (H₂O₂, 3%, temp. pok., 6 h).

13.2.2. Rozkład pod wpływem środka utleniającego

Odważano około 1,00 mg substancji do zakręczanych probówek o pojemności 10 ml, rozpuszczono w 9,0 ml wody dejonizowanej, dodano 1,0 ml 30% H₂O₂ i umieszczono na 5 min w płuczce ultradźwiękowej. Probówki były chronione od światła przy użyciu folii aluminiowej i przechowywane w temperaturze pokojowej. Po 6 godzinach roztwory rozcieńczono wodą dejonizowaną (1:1), a następnie analizowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 13.2.1 (Ryc. 33, Tabela 41).

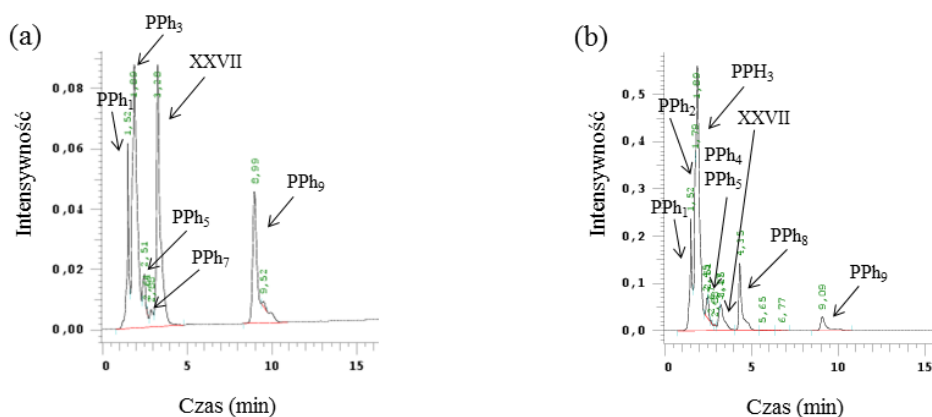
13.2.3. Wpływ temperatury

Odważano dokładnie 1,00 mg substancji badanej do fiolek ze szkła bursztynowego i przechowywano w atmosferze suchego powietrza w temperaturze 100°C. Po 1 dniu, 7 dniach i 30 dniach, próbki schłodzono do temperatury pokojowej, przeniesiono ilościowo do kolb miarowych, rozpuszczono w fazie ruchomej i uzupełniono takim samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml. Następnie próbki były analizowane zgodnie z procedurą

opisaną w rozdziale 13.2.1. Wyniki badania dla lepszej jego interpretacji przedstawiono w rozdziale 13.3 (Tabela 43).

13.2.4. Badanie fototrwałości związku XXVII w roztworze

Odważono około 1,00 mg substancji, rozpuszczono w 20,0 ml wody dejonizowanej i przeniesiono do kuwet kwarcowych ($l = 1$ cm). Kuwety z roztworem umieszczono na 22 lub 109 h w aparacie Atlas Suntest CPS+ (250 W/m^2 , dawka odpowiednio $1,2 \cdot 10^6$ lub $6,0 \cdot 10^6 \text{ lux}\cdot\text{h}$). Dla każdej serii przygotowano dwie próbki – chronione od światła przy użyciu folii aluminiowej i niechronione. W czasie t_0 oraz po ekspozycji na światło, chronione i niechronione próbki nanoszono na kolumnę chromatograficzną bezpośrednio oraz w mieszaninie z roztworem wzorca wewnętrznego (1:1) (Tabela 42, Ryc. 34).



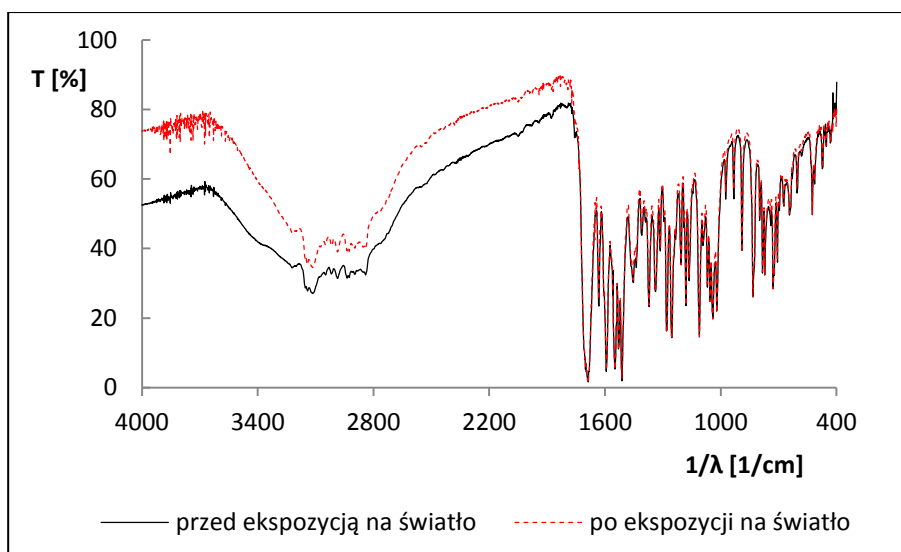
Ryc. 34. Chromatogramy HPLC roztworu związku XXVII poddanego działaniu światła
a) dawka $1,2 \cdot 10^6 \text{ lux}\cdot\text{h}$
b) dawka $6,0 \cdot 10^6 \text{ lux}\cdot\text{h}$.

13.2.5. Badanie fototrwałości związku XXVII w fazie stałej

Odważano 1,00 mg substancji badanej, dodano 300 mg bromku potasu i przygotowano tabletki przy użyciu prasy hydraulicznej. Tabletki zostały umieszczone na 22 lub 109 h w aparacie Atlas Suntest CPS+ (250 W/m^2 , dawka odpowiednio $1,2 \cdot 10^6$ lub $6,0 \cdot 10^6 \text{ lux}\cdot\text{h}$). Badaniu zostały równocześnie poddane tabletki chronione od światła przy użyciu folii aluminiowej i niechronione. W czasie t_0 oraz po ekspozycji na światło, wykonano widma FTIR (Ryc. 35). Następnie z każdej tabletki sporządzono 10,0 ml ekstraktu metanolowego. Ekstrakty zostały zmieszane z roztworem wzorca wewnętrznego (1:1) i były analizowane metodą HPLC, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 13.2.1. (Tabela 42).

Tabela 42. Wpływ światła na zawartość związku XXVII w roztworach i w fazie stałej oraz czasy retencji produktów degradacji powstałych w próbkach chronionych i niechronionych

Warunki	Chronione			Niechronione		
	Zawartość [%]	Produkty	t_r [min]	Zawartość [%]	Produkty	t_r [min]
H ₂ O; 1,2·10 ⁶ lux·h	47,79 ± 2,99	PPh ₁ PPh ₃ PPh ₄ PPh ₆ PPh ₇	1,52 (główny) 1,89 2,43 2,56 2,85	31,49 ± 2,74	PPh ₁ PPh ₃ PPh ₅ PPh ₇ PPh ₉	1,52 1,89 (główny) 2,51 2,88 8,99
H ₂ O; 6,0·10 ⁶ lux·h	28,18 ± 1,82	PPh ₁ PPh ₃ PPh ₄ PPh ₅ PPh ₇	1,52 1,87 (główny) 2,43 2,53 2,88	4,97 ± 1,19	PPh ₁ PPh ₂ PPh ₃ PPh ₄ PPh ₅ PPh ₈ PPh ₉	1,52 1,79 1,89 (główny) 2,45 2,51 4,35 9,09
faza stała 6,0·10 ⁶ lux·h	99,18 ± 3,20	Brak produktów degradacji		92,17 ± 2,73	Brak produktów degradacji	

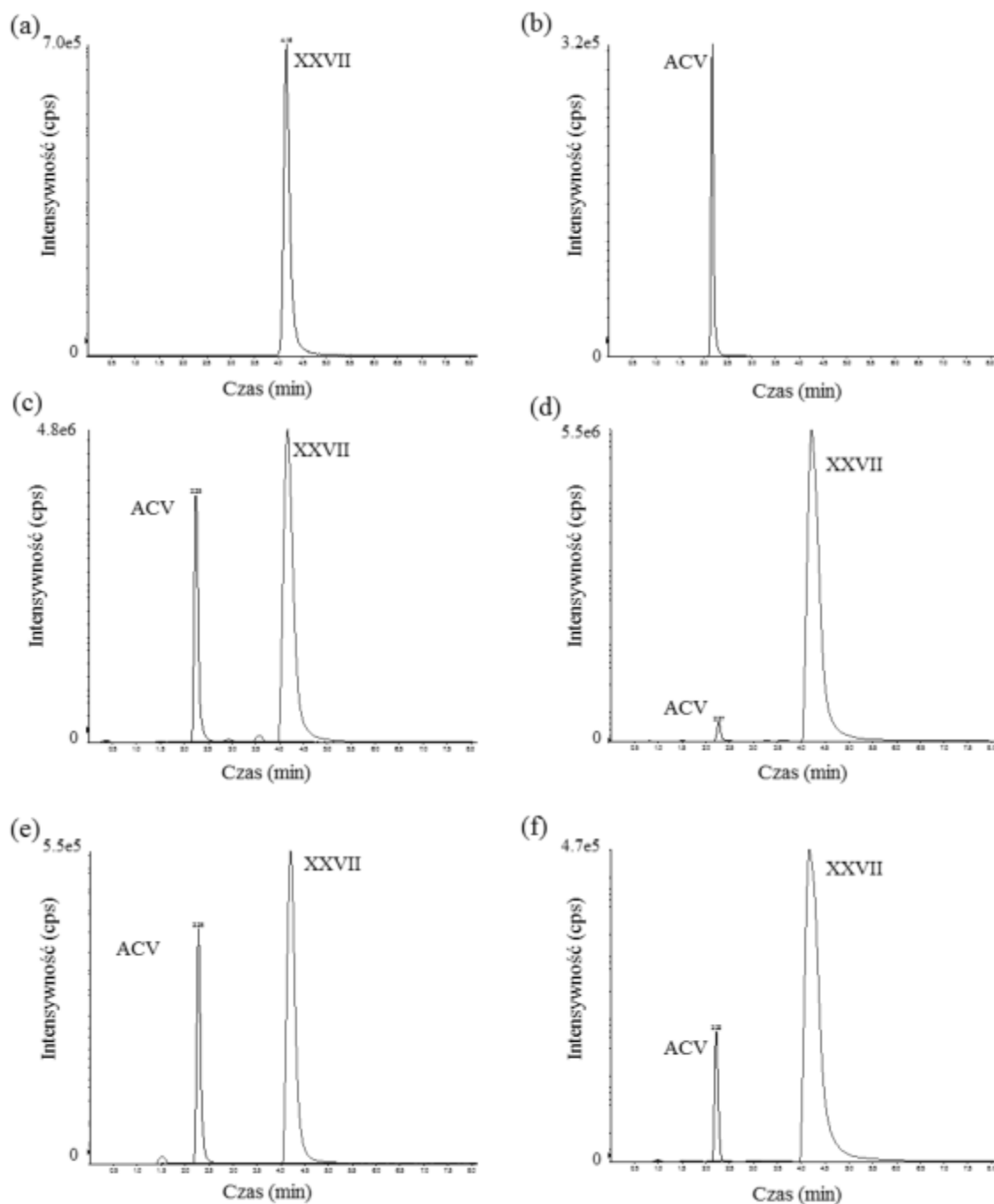


Ryc. 35. Widma FTIR związku XXVII w fazie stałej przed i po ekspozycji na światło (6,0 · 10⁶ lux·h).

13.2.6. Analiza HPLC-MS/MS

Wykonano analizę metodą HPLC-MS/MS roztworów związku XXVII poddanych testom stresowym w odniesieniu do roztworów wzorcowych związku XXVII oraz ACV. Najbardziej charakterystyczne i intensywne sygnały jonów potomnych przedstawiono w tabeli 40. Na chromatogramach HPLC-MS/MS wszystkich próbek poddanych rozkładowi

obserwowano sygnały charakterystyczne zarówno dla związku XXVII, jak i ACV (Ryc. 36).



Ryc. 36. Chromatogramy HPLC-MS/MS związku XXVII (przejście masy 356,3/282,1 m/z) oraz ACV (przejście masy 226,2/152,1 m/z):

- roztwór wzorcowy XXVII
- roztwór wzorcowy ACV
- roztwór XXVII po ekspozycji na światło $1,2 \cdot 10^6$ lux·h (próbka niechroniona)
- roztwór XXVII po ekspozycji na światło $1,2 \cdot 10^6$ lux·h (próbka chroniona)
- roztwór XXVII poddany hydrolizie w środowisku kwasowym (HCl, 0,1 mol/l, 90°C, 24 h)
- roztwór XXVII poddany działaniu środka utleniającego (H₂O₂, 3%, temp. pok., 6 h).

13.3. Test przyspieszony i pośredni

Odważano 1,00 mg substancji badanej do fiolek ze szkła bursztynowego i przechowywano w eksykatorach zawierających nasycone roztwory soli nieorganicznych: azotanu(III) sodu ($30 \pm 2^\circ\text{C}/65\% \pm 5\% \text{RH}$ (wilgotność względna powietrza)) – test pośredni, lub chlorku sodu ($40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \pm 5\% \text{RH}$) – test przyspieszony. Eksykatory przechowywano w komorach utrzymujących stałą temperaturę. Po 1, 3, 6 miesiącach (dla obu testów) oraz 12 miesiącach (dla testu pośredniego) próbki schłodzono do temperatury pokojowej, przenoszono ilościowo do kolb miarowych, rozpuszczano w fazie ruchomej i uzupełniano takim samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml. Następnie próbki analizowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 13.2.1 (Tabela 43).

Tabela 43. Wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza na trwałość substancji badanej

Warunki	Czas	Zawartość [%]	Uwagi
100°C/0% RH	1 dzień	100,02 ± 4,48	Brak produktów degradacji
	7 dni	100,45 ± 6,70	
	30 dni	98,87 ± 1,41	
40°C/75% RH	1 miesiąc	97,03 ± 3,34	Brak produktów degradacji
	3miesiące	100,14 ± 1,68	
	6 miesięcy	100,33 ± 1,59	
30°C/65% RH	1 miesiąc	101,60 ± 2,29	Brak produktów degradacji
	3 miesiące	96,06 ± 2,13	
	6 miesięcy	102,50 ± 2,20	
	9 miesięcy	101,27 ± 2,24	
	12 miesięcy	99,03 ± 2,15	

14. Ocena trwałości badanych estrów w osoczu ludzkim i w obecności esterazy z wątroby wieprzowej

14.1. Przygotowanie roztworów

- Titrant do przygotowania buforu PBS

Odważono 0,7738 g chlorku sodu oraz 0,0193 g chlorku potasu, rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej, dodano 25,0 ml wodorotlenku sodu (0,1 mol/l) i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100,0 ml.

- Bufor PBS

Odważono 0,7738 g chlorku sodu, 0,0193 g chlorku potasu, 0,0250 g diwodorofosforanu potasu, 0,1096 g wodorofosforanu sodu i rozpuszczono w 95 ml

wody dejonizowanej. Roztwór termostatowano w temperaturze 37°C 24 h i doprowadzono do pH 7,4 przy użyciu 1,5 ml roztworu titranta. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej zawartość przeniesiono ilościowo do kolby miarowej i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100,0 ml.

- Faza ruchoma – mieszanina kwasu octowego (0,02 mol/l) i chlorku potasu (0,001 mol/l) z acetonitrylem

Odważono 75,0 mg chlorku potasu, rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej, dodano 1,15 ml kwasu octowego (99,5%) i uzupełniono wodą dejonizowaną do 1000,0 ml. Następnie zmieszano przygotowany roztwór z acetonitrylem w proporcjach zgodnych z warunkami dla oznaczania poszczególnych estrów (Rozdział 14.2, Rozdział 14.3, Tabela 54). Otrzymaną mieszaninę przesączono i odgazowano przy użyciu płuczki ultradźwiękowej (5 minut).

- Roztwory wzorców wewnętrznych:

Przygotowano roztwory wzorców wewnętrznych w mieszaninie acetonitryl – metanol (1:1, v/v) o stężeniach podanych w tabelach 44 i 54.

14.2. Metoda HPLC oznaczania związku XXVII i jego estrów w osoczu

Do oceny trwałości związku XXVII i jego estrów w osoczu zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz przeprowadzono jej walidację. Zastosowano następujące warunki rozdzielania chromatograficznego:

- faza stacjonarna: przedkolumna Phenomenex C18, 4 × 3 mm
kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 10 μm
- temperatura kolumny: 25°C
- faza ruchoma: acetonitryl – mieszanina CH₃COOH (0,02 mol/l) i KCl (0,001 mol/l) (35:65, v/v)
- przepływ fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- wzorzec wewnętrzny: Tabela 44
- objętość nastrzyku: 20 μl
- detekcja UV: 262 nm.

Badanie wykonano przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Zestaw nr 1).

Tabela 44. Roztwory wzorców wewnętrznych dla oznaczania badanych związków

Związek	Wzorec wewnętrzny
Ac-XXVII Piv-XXVII	nitrazepam (192 µg/ml)
XXVII iBut-XXVII Etc-XXVII Nic-XXVII	sulfadimetoksyna (192 µg/ml)

Selektywność

W celu sprawdzenia selektywności metody do realizacji zaplanowanych badań wykorzystano roztwory badanych związków w osoczu z dodatkiem buforu PBS, termostатовane 2 h w temperaturze 37°C, następnie zmieszane z odpowiednimi wzorcami wewnętrznymi (1:2). Próbkę nanoszono na kolumnę i w przedziałach czasowych od 0 do 30 minut rejestrowano chromatogramy. Dla wszystkich analizowanych związków obserwowano wyraźnie rozdzielone piki: estru, związku XXVII jako produktu rozkładu, pozostałości osocza oraz wzorca wewnętrznego (Tabela 45). Potwierdza to odpowiednią do badań trwałości analizowanych związków selektywność oznaczania związków w obecności związku XXVII i wzorców wewnętrznych z zastosowaniem opracowanych warunków chromatografowania.

Tabela 45. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach

Związek	Czas retencji [min]		
	Substancja badana	Wzorec wewnętrzny	Pozostałość osocza
XXVII	4,29	6,65	2,01
Ac-XXVII Piv-XXVII	6,95 20,55	11,35	2,01
iBut-XXVII Etc-XXVII Nic-XXVII	13,49 10,83 8,16	6,65	2,01

Liniowość

Odważono około 3,0 mg związku i rozpuszczono w 0,50 ml DMSO (roztwór J). Do próbek odmierzone po 2,0 ml świeżo rozmrożonego osocza, 0,4 ml buforu PBS i wymieszano. Następnie dodawano odpowiednie objętości DMSO oraz roztworu J (10 – 100 µl) uzyskując 2,5 ml mieszanin o odpowiednich stężeniach substancji (Tabele

46 – 51). Z każdego roztworu pobrano po 0,2 ml roztworu, dodano 0,4 ml odpowiedniego roztworu wzorca wewnętrznego (Tabela 44) i wymieszano. Mieszaninę wirowano 15 minut (5 minut, 13 tys. obrotów), a następnie pobrano nadsącz.

Na kolumnę chromatograficzną nanoszono po 20 µl nadsączu i rejestrowano chromatogramy zgodnie z warunkami opracowanymi dla oznaczania danego związku. Uzyskane stężenia, względne pola powierzchni pików ($P = P_i/P_w$) oraz ocenę statystyczną parametrów równań prostych zamieszczono w tabelach 46 – 51 oraz na rycinie 37. Badanie wykonano dla dwóch serii osocza.

Tabela 46. Stężenia roztworów związku XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	48	0,1405	$y = ax + b$ $a = (3,99 \pm 0,36) \cdot 10^{-3}$ $b = (-3,53 \pm 5,30) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,29 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,91 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -1,848$ $t_{0,05}(4) = 2,776$ $r = 0,9979$	48	0,1683	$y = ax + b$ $a = (3,84 \pm 0,19) \cdot 10^{-3}$ $b = (-2,23 \pm 2,70) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 7,25 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 1,05 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -2,131$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9991$
2	72	0,2464		72	0,2550	
3	96	0,3558		96	0,3295	
4	144	0,5578		120	0,4312	
5	192	0,7515		144	0,5482	
6	240	0,8959		192	0,7184	
7				240	0,8942	
					$y = ax$ $a = (3,78 \pm 0,30) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,15 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9979$	
					$y = ax$ $a = (3,70 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,62 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9991$	

Tabela 47. Stężenia roztworów Ac-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	48	0,2138	$y = ax + b$ $a = (4,47 \pm 0,24) \cdot 10^{-3}$ $b = (-0,56 \pm 3,47) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 9,33 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 1,35 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -0,414$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9989$	24	0,0887	$y = ax + b$ $a = (4,57 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$ $b = (-1,63 \pm 1,79) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 5,42 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 7,35 \cdot 10^{-3}$ $t_b = -2,215$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9996$
2	72	0,3065		48	0,1999	
3	96	0,4175		72	0,3326	
4	120	0,5362		96	0,4093	
5	144	0,6358		120	0,5342	
6	192	0,8793	144	0,6461	$y = ax$ $a = (4,47 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 5,02 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9996$	
7	240	1,0500	192	0,8556		
8			240	1,0834		

Tabela 48. Stężenia roztworów iBut-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	48	0,1763	$y = ax + b$ $a = (3,78 \pm 0,27) \cdot 10^{-3}$ $b = (-3,18 \pm 3,88) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,10 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,59 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -2,004$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9979$	48	0,1996	$y = ax + b$ $a = (3,48 \pm 0,30) \cdot 10^{-3}$ $b = (0,41 \pm 4,32) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,16 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,68 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 0,244$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9972$
2	72	0,2260		72	0,2586	
3	96	0,3055		96	0,3520	
4	120	0,4180		120	0,4086	
5	144	0,4939		144	0,4861	
6	196	0,7111	192	0,6519	$y = ax$ $a = (3,50 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,06 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9972$	
7	240	0,8755	240	0,8643		

Tabela 49. Stężenia roztworów Piv-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

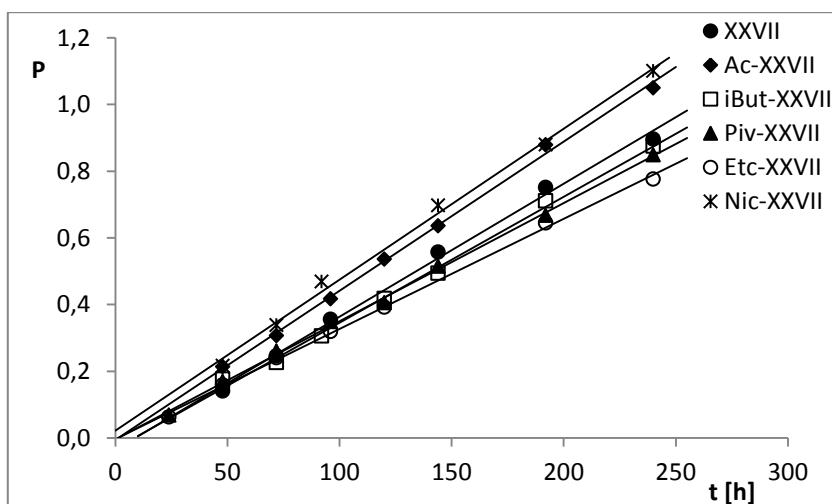
Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	24	0,0692	$y = ax + b$ $a = (3,54 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$ $b = (-3,82 \pm 20,17) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,08 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 8,24 \cdot 10^{-3}$ $t_b = -0,464$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9991$	48	0,1780	$y = ax + b$ $a = (4,10 \pm 0,33) \cdot 10^{-3}$ $b = (-1,71 \pm 4,81) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,36 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,97 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -0,868$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9973$
2	48	0,1696		72	0,2994	
3	72	0,2611		96	0,3935	
4	96	0,3487		120	0,4526	
5	120	0,4053		144	0,5421	
6	144	0,5153	$y = ax$ $a = (3,52 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 5,63 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9991$	192	0,7680	$y = ax$ $a = (3,99 \pm 0,32) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,24 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9973$
7	192	0,6674		240	0,9849	
8	240	0,8489				

Tabela 50. Stężenia roztworów Etc-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	24	0,0632	$a = (3,30 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$ $b = (-2,86 \pm 20,07) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 5,81 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 7,81 \cdot 10^{-3}$ $t_b = -0,366$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9992$	48	0,1645	$y = ax + b$ $a = (3,21 \pm 0,25) \cdot 10^{-3}$ $b = (3,01 \pm 3,66) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 9,84 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 1,42 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 2,117$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9977$
2	48	0,1593		72	0,2562	
3	72	0,2402		96	0,3443	
4	96	0,3194		120	0,4355	
5	120	0,3921	$y = ax$ $a = (3,28 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 5,31 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9992$	144	0,5086	$y = ax$ $a = (3,40 \pm 0,22) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 8,98 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9977$
6	192	0,6450		192	0,6372	
7	240	0,7762		240	0,7893	

Tabela 51. Stężenia roztworów Nic-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	48	0,2166	$y = ax + b$ $a = (4,69 \pm 0,32) \cdot 10^{-3}$ $b = (0,94 \pm 4,70) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,14 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,69 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 0,557$ $t_{0,05}(4) = 2,776$ $r = 0,9988$	48	0,2583	$y = ax + b$ $a = (5,12 \pm 0,35) \cdot 10^{-3}$ $b = (-0,88 \pm 5,07) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,43 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,07 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -0,425$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9980$
2	72	0,3385		72	0,3332	
3	96	0,4688		96	0,4934	
4	144	0,6973		120	0,5759	
5	192	0,8999		144	0,7541	
6	240	1,1306	$y = ax$ $a = (4,75 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,02 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9988$	192	0,9727	$y = ax$ $a = (5,07 \pm 0,31) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,31 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9980$
7				240	1,2200	



Ryc. 37. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni piku substancji badanej do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia związku XXVII i jego estrów w osoczu (seria I).

Granica wykrywalności i oznaczalności, zakres i czułość metody

Granice wykrywalności (LOD), granice oznaczalności (LOQ) oraz zakres metody HPLC oznaczania badanych związków (Tabela 52) wyznaczono zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 12.2.

Tabela 52. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków

Związek	Seria	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	$y = ax$	Zakres [µg/ml]	Zakres [mmol/ml]
XXVII	I	16	48	$y = (3,99 \pm 0,36) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,33 - 6,67) \cdot 10^{-4}$
	II	9	27	$y = (3,70 \pm 0,16) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,33 - 6,67) \cdot 10^{-4}$
Ac-XXVII	I	10	30	$y = (4,44 \pm 0,21) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,22 - 6,04) \cdot 10^{-4}$
	II	5	16	$y = (4,47 \pm 0,12) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,61 - 6,04) \cdot 10^{-4}$
iBut-XXVII	I	14	42	$y = (3,78 \pm 0,27) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,13 - 5,64) \cdot 10^{-4}$
	II	16	48	$y = (3,50 \pm 0,26) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,13 - 5,64) \cdot 10^{-4}$
Piv-XXVII	I	8	23	$y = (3,54 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,55 - 5,46) \cdot 10^{-4}$
	II	16	48	$y = (3,99 \pm 0,32) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,09 - 5,46) \cdot 10^{-4}$
Etc-XXVII	I	8	24	$y = (3,30 \pm 0,15) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,56 - 5,62) \cdot 10^{-4}$
	II	15	44	$y = (3,40 \pm 0,22) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,12 - 5,62) \cdot 10^{-4}$
Nic-XXVII	I	12	36	$y = (4,75 \pm 0,26) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,04 - 5,21) \cdot 10^{-4}$
	II	13	40	$y = (5,07 \pm 0,31) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,04 - 5,21) \cdot 10^{-4}$

Precyzja, dokładność, powtarzalność

Precyzję i dokładność metody oznaczania każdej z badanych substancji w osoczu oceniono wykonując po sześć oznaczeń próbek o wybranych stężeniach ($n = 6$). W celu wyznaczenia powtarzalności oznaczeń pomiędzy dniami, kolejnego dnia cały proces wykonano ponownie. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 53. Do obliczenia stężeń poszczególnych związków wykorzystano zależności $P = f(c)$ (Tabela 52).

Tabela 53. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń związku XXVII oraz jego estrów w osoczu

Związek	$c_{\text{dekl.}}$ [µg/ml]	Dzień analizy	Precyzja		Dokładność		W_{zr} [%]
			$c_{\text{ozn.}}$ [µg/ml]	Ocena statystyczna	Odzysk [%]	Ocena statystyczna	
XXVII	96,0	1	$96,6 \pm 2,8$	$S = 2,712$ $S_x = 1,107$ $W_z = 2,81\%$	$100,6 \pm 3,0$	$S = 2,825$ $S_x = 1,153$ $W_z = 2,81\%$	0,99
		2	$95,9 \pm 3,7$	$S = 3,733$ $S_x = 1,524$ $W_z = 3,89\%$	$99,9 \pm 3,9$	$S = 3,889$ $S_x = 1,588$ $W_z = 3,89\%$	
	192,0	1	$190,5 \pm 2,3$	$S = 2,234$ $S_x = 0,912$ $W_z = 1,17\%$	$99,2 \pm 1,2$	$S = 1,163$ $S_x = 0,475$ $W_z = 1,17\%$	0,60
		2	$193,8 \pm 4,4$	$S = 4,427$ $S_x = 1,807$ $W_z = 2,28\%$	$100,9 \pm 2,3$	$S = 2,306$ $S_x = 0,941$ $W_z = 2,28\%$	

cd. Tabela 53.

Ac- XXVII	72,0	1	72,8 ± 1,4	S = 1,355 S _x = 0,553 W _z = 1,86%	101,2 ± 2,0	S = 1,882 S _x = 0,768 W _z = 1,86%	0,46
		2	72,2 ± 0,9	S = 0,911 S _x = 0,372 W _z = 1,26%	100,3 ± 1,3	S = 1,266 S _x = 0,517 W _z = 1,26%	
	192,0	1	190,0 ± 5,2	S = 4,990 S _x = 2,037 W _z = 2,63%	99,0 ± 2,7	S = 2,599 S _x = 1,061 W _z = 2,63%	0,39
		2	193,8 ± 2,5	S = 2,529 S _x = 1,032 W _z = 1,31%	100,9 ± 1,3	S = 1,317 S _x = 0,538 W _z = 1,31%	
iBut- XXVII	96,0	1	101,2 ± 2,5	S = 2,386 S _x = 0,974 W _z = 2,36%	105,5 ± 2,6	S = 2,486 S _x = 1,015 W _z = 2,36%	0,73
		2	101,2 ± 3,3	S = 3,403 S _x = 1,389 W _z = 3,36%	105,5 ± 3,4	S = 3,545 S _x = 1,447 W _z = 3,36%	
	192,0	1	194,7 ± 3,1	S = 2,925 S _x = 1,194 W _z = 1,50%	101,4 ± 1,6	S = 1,523 S _x = 0,622 W _z = 1,50%	0,65
		2	194,0 ± 4,8	S = 4,853 S _x = 1,981 W _z = 2,50%	101,0 ± 2,5	S = 2,528 S _x = 1,032 W _z = 2,50%	
Piv- XXVII	96,0	1	96,0 ± 2,3	S = 2,230 S _x = 0,910 W _z = 2,32%	100,0 ± 2,4	S = 2,438 S _x = 0,948 W _z = 2,32%	0,77
		2	97,1 ± 2,9	S = 2,904 S _x = 1,185 W _z = 2,99%	101,2 ± 3,0	S = 3,025 S _x = 1,235 W _z = 2,99%	
	120,0	1	107,8 ± 3,4	S = 3,214 S _x = 1,312 W _z = 2,98%	89,8 ± 2,8	S = 2,678 S _x = 1,093 W _z = 2,98%	0,74
		2	118,7 ± 3,9	S = 3,891 S _x = 1,589 W _z = 3,28%	98,9 ± 3,2	S = 3,242 S _x = 1,324 W _z = 3,28%	

cd. Tabela 53.

Etc- XXVII	72,0	1	73,6 ± 1,1	S = 1,093 S _x = 0,446 W _z = 1,48%	102,3 ± 1,6	S = 1,518 S _x = 0,620 W _z = 1,48%	0,92
		2	74,6 ± 2,9	S = 2,876 S _x = 1,174 W _z = 3,86%	103,6 ± 4,0	S = 3,994 S _x = 1,631 W _z = 3,86%	
	120,0	1	115,4 ± 3,6	S = 3,443 S _x = 1,406 W _z = 2,98%	96,2 ± 3,0	S = 2,869 S _x = 1,171 W _z = 2,98%	0,38
		2	121,1 ± 1,3	S = 1,268 S _x = 0,518 W _z = 1,05%	100,9 ± 1,1	S = 1,056 S _x = 0,431 W _z = 1,05%	
Nic- XXVII	72,0	1	73,9 ± 1,9	S = 1,847 S _x = 0,754 W _z = 2,50%	102,7 ± 2,7	S = 2,566 S _x = 1,047 W _z = 2,50%	0,56
		2	73,6 ± 1,8	S = 1,762 S _x = 0,719 W _z = 2,39%	102,3 ± 2,4	S = 2,447 S _x = 0,999 W _z = 2,39%	
	120,0	1	116,6 ± 3,5	S = 3,321 S _x = 1,356 W _z = 2,85%	97,1 ± 2,9	S = 2,767 S _x = 1,130 W _z = 2,85%	0,89
		2	124,2 ± 4,0	S = 4,049 S _x = 1,653 W _z = 3,26%	103,5 ± 3,4	S = 3,374 S _x = 1,378 W _z = 3,26%	

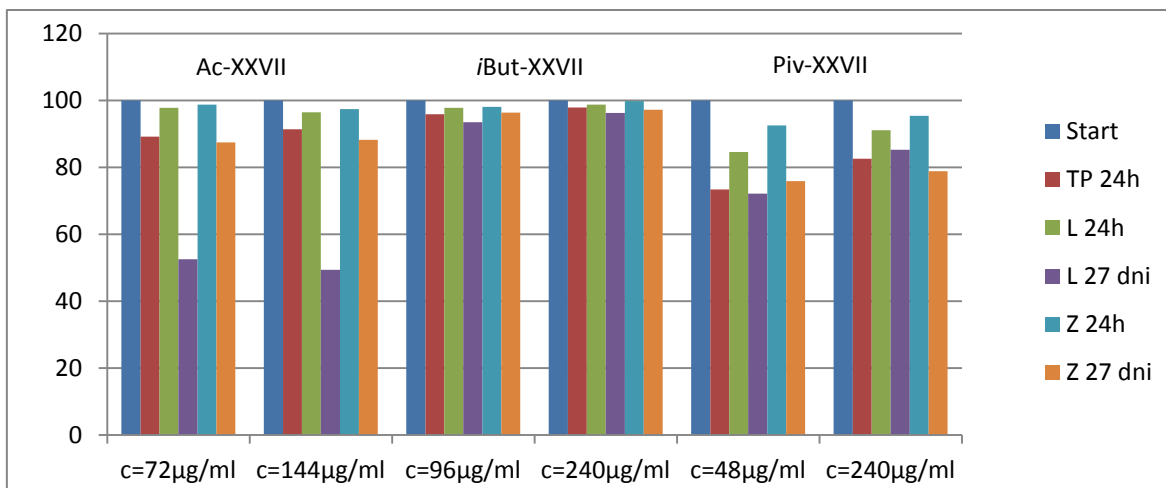
c_{dekl} – deklarowane stężenie substancji w roztworze

c_{ozn} – stężenie substancji w roztworze oznaczone metodą HPLC

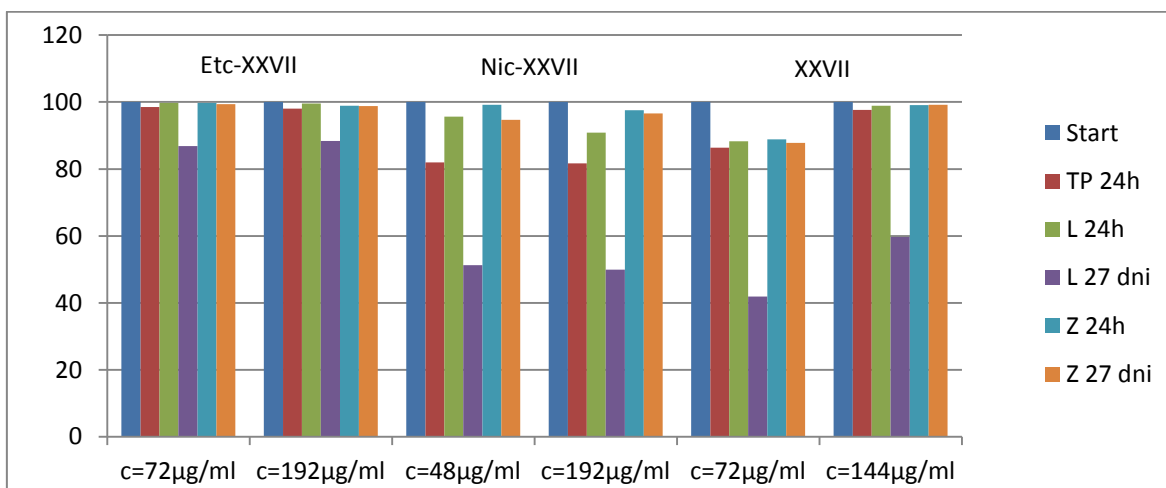
Odzysk = 100% c_{ozn}/c_{dekl}

Stabilność analitu

Sprawdzono możliwość przechowywania nadsączów badanych związków i analizowania ich w kolejnych dniach, w zależności od warunków przechowywania oraz czasu. Dla każdej substancji przygotowano próbki o dwóch stężeniach z zakresu liniowości metody. Nadsącze obu roztworów poddano analizie metodą HPLC natychmiast po przygotowaniu (Start) oraz po przechowywaniu w temperaturze pokojowej (TP, 25°C), w lodówce (L, 4°C) i zamrażalniku (Z, -20°C) przez określony czas. Obliczono wartości $P = P_i/P_w$ i wyznaczono stopień rozkładu badanych związków w odniesieniu do wartości początkowej. Uzyskane wyniki zamieszczono na rycinach 38 – 39.



Ryc. 38. Zmiany stężenia związków Ac-XXVII, iBut-XXVII i Piv-XXVII w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).



Ryc. 39. Zmiany stężenia związków Etc-XXVII, Nic-XXVII i XXVII w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).

14.3. Metoda HPLC oznaczania estrów acyklowiru w osoczu

Do oceny trwałości estrów acyklowiru w osoczu opracowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz przeprowadzono jej walidację. Zastosowano następujące warunki rozdzielania chromatograficznego:

- faza stacjonarna: przedkolumna Phenomenex C18, 4 × 3 mm
kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 10 µm
- temperatura kolumny: 25°C
- faza ruchoma: Tabela 54
- przepływ fazy ruchomej: Tabela 54
- wzorzec wewnętrzny: Tabela 54

- objętość nastrzyku: 20 μ l
- detekcja UV: 254 nm.

Badanie wykonano przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Zestaw nr 1).

Tabela 54. Skład i przepływ fazy ruchomej oraz roztwory wzorców wewnętrznych dla oznaczania poszczególnych estrów acyklowiru

Związek	Skład fazy ruchomej	Szybkość przepływu fazy ruchomej	Wzorec wewnętrzny
Ac-I	Acetonitryl – mieszanina CH ₃ COOH (0,02 mol/l) i KCl (0,001 mol/l) (15:85, v/v)	0,7 ml/min	sulfatiazol (96 μ g/ml)
<i>i</i> But-I Piv-I	Acetonitryl – mieszanina CH ₃ COOH (0,02 mol/l) i KCl (0,001 mol/l) (23:77, v/v)	1,0 ml/min	sulfafurazol (112 μ g/ml)
Etc-I	Acetonitryl – mieszanina CH ₃ COOH (0,02 mol/l) i KCl (0,001 mol/l) (20:80, v/v)	1,0 ml/min	sulfafurazol (56 μ g/ml)
Nic-I	Acetonitryl – mieszanina CH ₃ COOH (0,02 mol/l) i KCl (0,001 mol/l) (20:80, v/v)	1,0 ml/min	sulfafurazol (112 μ g/ml)

Selektywność

W celu sprawdzenia selektywności metody do realizacji zaplanowanych badań wykorzystano roztwory estrów acyklowiru w osoczu z dodatkiem buforu PBS oraz odpowiedniego wzorca wewnętrznego. Próbkę nanoszono na kolumnę i w przedziałach czasu od 0 do 20 minut rejestrowano chromatogramy. Dla wszystkich analizowanych estrów obserwowano wyraźnie rozdzielone piki: estru, ACV jako produktu rozkładu, pozostałości osocza oraz wzorca wewnętrznego (Tabela 55). Potwierdza to odpowiednią do badań trwałości analizowanych związków selektywność oznaczania estrów w obecności ACV i wzorców wewnętrznych z zastosowaniem opracowanych warunków chromatografowania.

Tabela 55. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach

Metoda HPLC dla związku	Czas retencji [min]			
	ACV	Ester	Wzorzec wewnętrzny	Pozostałość osocza
Ac-I	3,50	Ac-I: 5,51	9,72	3,50
<i>i</i> But-I Piv-I	2,47	<i>i</i> But-I: 5,02 Piv-I: 7,89	11,42	1,59
Etc-I Nic-I	3,33	Etc-I: 4,84 Nic-I: 4,16	14,00	2,41

Liniowość

Badanie wykonano zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 14.2. Wyniki wraz z oceną statystyczną przedstawiono w tabelach 56 – 60 oraz na rycinie 40.

Tabela 56. Stężenia roztworów Ac-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	24	0,0945	$y = ax + b$ $a = (4,11 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$ $b = (-0,34 \pm 2,35) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 7,08 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 9,60 \cdot 10^{-3}$ $t_b = -0,358$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9991$	24	0,1002	$y = ax + b$ $a = (4,10 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$ $b = (0,88 \pm 23,97) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 7,03 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 9,52 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 0,092$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9991$
2	48	0,1772		48	0,1798	
3	72	0,3018		72	0,3040	
4	96	0,4153		96	0,4178	
5	120	0,4771		120	0,4802	
6	144	0,5849	$y = ax$ $a = (4,09 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,56 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9991$	144	0,5883	$y = ax$ $a = (4,10 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,51 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9991$
7	192	0,7859		192	0,7892	
8	240	0,9810		240	0,9816	

Tabela 57. Stężenia roztworów *i*But-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	24	0,0637	$y = ax + b$ $a = (3,78 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$ $b = (-1,47 \pm 2,28) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 7,29 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 8,23 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,788$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9991$	24	0,0911	$y = ax + b$ $a = (3,68 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$ $b = (0,72 \pm 1,64) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 4,71 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 6,38 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,132$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9995$
2	48	0,1675		48	0,1875	
3	72	0,2665		72	0,2819	
4	96	0,3620		96	0,3516	
5	120	0,4303		120	0,4516	
6	144	0,5311	$y = ax$ $a = (3,66 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,65 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9991$	144	0,5247	$y = ax$ $a = (3,72 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 4,36 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9995$
7	192	0,7054		192	0,7244	
8				240	0,8863	

Tabela 58. Stężenia roztworów Piv-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

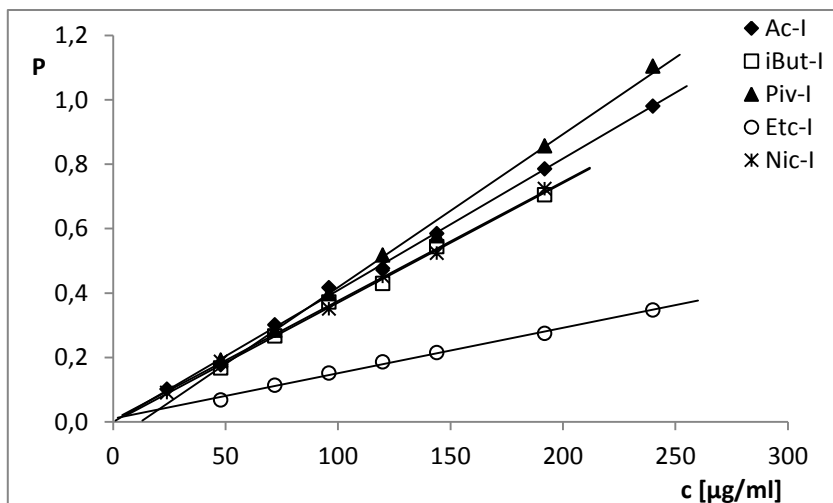
Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	48	0,1926	$y = ax + b$ $a = (4,50 \pm 0,28) \cdot 10^{-3}$ $b = (-3,20 \pm 3,99) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,13 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 1,63 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -1,958$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9984$	48	0,2195	$y = ax + b$ $a = (4,84 \pm 0,35) \cdot 10^{-3}$ $b = (0,03 \pm 5,07) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 1,43 \cdot 10^{-4}$ $S_b = 2,07 \cdot 10^{-2}$ $t_b = -0,016$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9978$
2	72	0,2843		72	0,3336	
3	96	0,3976		96	0,4954	
4	120	0,5184		120	0,5929	
5	144	0,5879		144	0,7026	
6	192	0,8572	$y = ax$ $a = (4,30 \pm 0,24) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,03 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9984$	192	0,8951	$y = ax$ $a = (4,84 \pm 0,31) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 1,31 \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9978$
7	240	1,0390		240	1,1736	

Tabela 59. Stężenia roztworów Etc-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	48	0,0679	$y = ax + b$ $a = (1,41 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$ $b = (1,01 \pm 1,50) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 4,04 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 5,84 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 1,731$ $t_{0,05}(5) = 2,571$ $r = 0,9980$	24	0,0380	$y = ax + b$ $a = (1,43 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$ $b = (7,72 \pm 8,66) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 2,49 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 3,37 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 2,290$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9991$
2	72	0,1135		48	0,0730	
3	96	0,1512		72	0,1131	
4	120	0,1858		96	0,1510	
5	144	0,2153		120	0,1849	
6	192	0,2743	$y = ax$ $a = (1,47 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 3,69 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9980$	144	0,2153	$y = ax$ $a = (1,48 \pm 0,06) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 2,30 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9991$
7	240	0,3476		192	0,2763	
8				240	0,3522	

Tabela 60. Stężenia roztworów Nic-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną

Lp.	Seria I			Seria II		
	c [µg/ml]	P	Parametry regresji	c [µg/ml]	P	Parametry regresji
1	24	0,1213	$y = ax + b$ $a = (5,02 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$ $b = (0,68 \pm 2,06) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 6,20 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 8,40 \cdot 10^{-3}$ $t_b = 0,812$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9995$	24	0,1253	$y = ax + b$ $a = (4,51 \pm 0,18) \cdot 10^{-3}$ $b = (2,21 \pm 2,45) \cdot 10^{-2}$ $S_a = 7,40 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 1,00 \cdot 10^{-2}$ $t_b = 2,208$ $t_{0,05}(6) = 2,447$ $r = 0,9992$
2	48	0,2525		48	0,2406	
3	72	0,3827		72	0,3607	
4	96	0,4672		96	0,4313	
5	120	0,6116		120	0,5824	
6	144	0,7350	$y = ax$ $a = (5,06 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 5,74 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9995$	144	0,6714	$y = ax$ $a = (4,65 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$ $S_a = 6,85 \cdot 10^{-5}$ $r = 0,9992$
7	192	0,9786		192	0,8798	
8	240	1,2057		240	1,1076	



Ryc. 40. Wykres zależności ilarazu pola powierzchni pików substancji badanej do pola powierzchni pików wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia estrów acyklowiru w osoczu (seria I).

Granica wykrywalności i oznaczalności, zakres i czułość metody

Granice wykrywalności (LOD), granice oznaczalności (LOQ) oraz zakres metody HPLC oznaczania badanych związków (Tabela 61) wyznaczono zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 12.2.

Tabela 61. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków

Związek	Seria	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	$y = ax$	Zakres [µg/ml]	Zakres [mmol/ml]
Ac-I	I	8	23	$y = (4,09 \pm 0,16) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,89 - 8,92) \cdot 10^{-4}$
	II	8	23	$y = (4,10 \pm 0,15) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,89 - 8,92) \cdot 10^{-4}$
iBut-I	I	7	22	$y = (3,66 \pm 0,17) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 192	$(0,81 - 6,46) \cdot 10^{-4}$
	II	6	17	$y = (3,72 \pm 0,11) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,81 - 8,08) \cdot 10^{-4}$
Piv-I	I	12	36	$y = (4,30 \pm 0,24) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,54 - 7,71) \cdot 10^{-4}$
	II	14	43	$y = (4,84 \pm 0,31) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,54 - 7,71) \cdot 10^{-4}$
Etc-I	I	14	41	$y = (1,47 \pm 0,09) \cdot 10^{-3} \cdot x$	48 – 240	$(1,60 - 8,02) \cdot 10^{-4}$
	II	8	24	$y = (1,48 \pm 0,06) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,80 - 8,02) \cdot 10^{-4}$
Nic-I	I	6	17	$y = (5,06 \pm 0,14) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,72 - 7,23) \cdot 10^{-4}$
	II	7	22	$y = (4,65 \pm 0,16) \cdot 10^{-3} \cdot x$	24 – 240	$(0,72 - 7,23) \cdot 10^{-4}$

Precyzja, dokładność, powtarzalność

Precyzję i dokładność metody oznaczania każdego z estrów w osoczu oceniono wykonując po sześć oznaczeń próbek o wybranych stężeniach ($n = 6$). W celu wyznaczenia powtarzalności oznaczeń pomiędzy dniami, kolejnego dnia cały proces wykonano

ponownie. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 62. Do obliczenia stężeń poszczególnych związków wykorzystano parametry zależności $P = f(c)$ (Tabela 61).

Tabela 62. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń estrów acyklowiru (n = 6)

Związek	c _{dekl.} [µg/ml]	Dzień analizy	Precyzja		Dokładność		W _{zr} [%]
			c _{ozn.} [µg/ml]	Ocena statystyczna	Odzysk [%]	Ocena statystyczna	
Ac-I	48,0	1	46,4 ± 1,9	S = 1,845 S _x = 0,753 W _z = 3,97%	96,8 ± 4,0	S = 3,845 S _x = 1,570 W _z = 3,97%	0,63
		2	49,5 ± 1,6	S = 1,605 S _x = 0,655 W _z = 3,24%	103,0 ± 3,3	S = 3,344 S _x = 1,365 W _z = 3,24%	
	192,0	1	184,7 ± 4,3	S = 4,071 S _x = 1,662 W _z = 2,20%	96,2 ± 2,2	S = 2,120 S _x = 0,866 W _z = 2,20%	0,58
		2	186,9 ± 4,1	S = 4,135 S _x = 1,688 W _z = 2,21%	97,3 ± 2,2	S = 2,153 S _x = 0,879 W _z = 2,21%	
iBut-I	72,0	1	66,6 ± 1,3	S = 1,280 S _x = 0,523 W _z = 1,92%	92,5 ± 1,9	S = 1,778 S _x = 0,726 W _z = 1,92%	0,57
		2	70,7 ± 1,7	S = 1,723 S _x = 0,703 W _z = 2,43%	98,1 ± 2,4	S = 2,393 S _x = 0,977 W _z = 2,43%	
	144,0	1	142,1 ± 4,0	S = 3,792 S _x = 1,548 W _z = 2,67%	98,7 ± 2,8	S = 2,634 S _x = 1,075 W _z = 2,67%	0,44
		2	143,2 ± 2,2	S = 2,185 S _x = 0,892 W _z = 1,53%	99,5 ± 1,5	S = 1,517 S _x = 0,620 W _z = 1,53%	
Piv-I	48,0	1	46,6 ± 2,2	S = 2,085 S _x = 0,851 W _z = 4,48%	97,0 ± 4,6	S = 4,343 S _x = 1,773 W _z = 4,48%	0,68
		2	47,7 ± 1,8	S = 1,821 S _x = 0,743 W _z = 3,82%	99,4 ± 3,8	S = 3,794 S _x = 1,549 W _z = 3,82%	
	120,0	1	115,3 ± 2,5	S = 2,402 S _x = 0,981 W _z = 2,08%	96,1 ± 2,1	S = 2,001 S _x = 0,817 W _z = 2,08%	0,44
		2	118,1 ± 1,7	S = 1,727 S _x = 0,705 W _z = 1,46%	98,4 ± 1,4	S = 1,439 S _x = 0,587 W _z = 1,46%	

cd. Tabela 62.

Etc-I	48,0	1	49,8 ± 2,8	S = 2,625 S _x = 1,072 W _z = 5,27%	103,8 ± 5,7	S = 5,470 S _x = 2,233 W _z = 5,27%	0,84
		2	48,7 ± 2,7	S = 2,682 S _x = 1,095 W _z = 5,51%	101,5 ± 5,6	S = 5,588 S _x = 2,281 W _z = 5,51%	
	144,0	1	152,9 ± 1,5	S = 1,394 S _x = 0,569 W _z = 0,91%	106,2 ± 1,0	S = 0,968 S _x = 0,395 W _z = 0,91%	0,62
		2	146,9 ± 3,7	S = 3,676 S _x = 1,501 W _z = 2,50%	102,0 ± 2,5	S = 2,553 S _x = 1,042 W _z = 2,50%	
Nic-I	72,0	1	68,7 ± 1,9	S = 1,778 S _x = 0,726 W _z = 2,59%	95,5 ± 2,6	S = 2,470 S _x = 1,008 W _z = 2,59%	0,59
		2	72,4 ± 1,9	S = 1,915 S _x = 0,782 W _z = 2,64%	100,6 ± 2,7	S = 2,660 S _x = 1,086 W _z = 2,64%	
	144,0	1	144,8 ± 2,4	S = 2,326 S _x = 0,950 W _z = 1,61%	100,6 ± 1,7	S = 1,615 S _x = 0,659 W _z = 1,61%	0,43
		2	145,6 ± 2,1	S = 2,120 S _x = 0,866 W _z = 1,46%	101,1 ± 1,5	S = 1,473 S _x = 0,601 W _z = 1,46%	

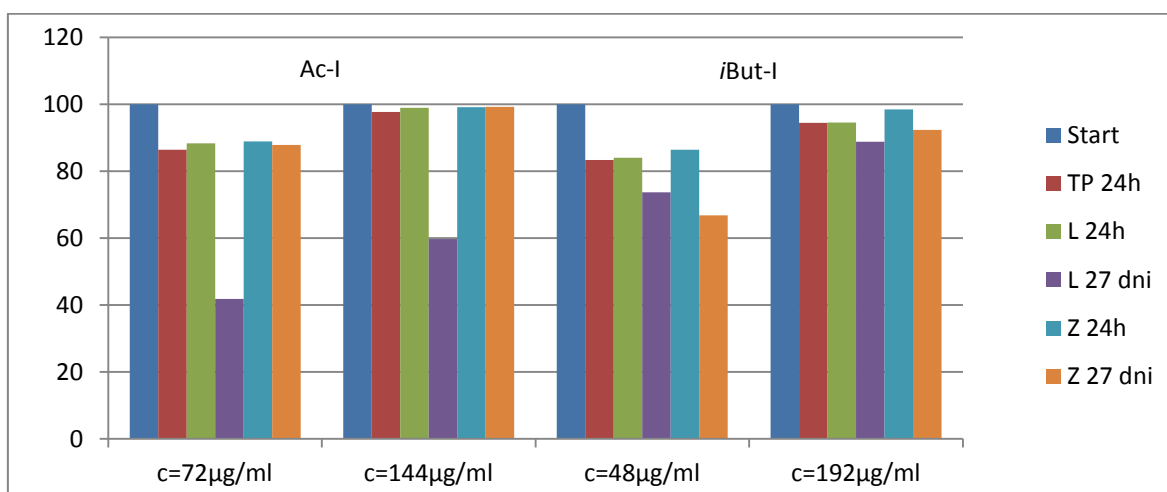
c_{dekl} – deklarowane stężenie substancji w roztworze

c_{ozn} – stężenie substancji w roztworze oznaczone metodą HPLC

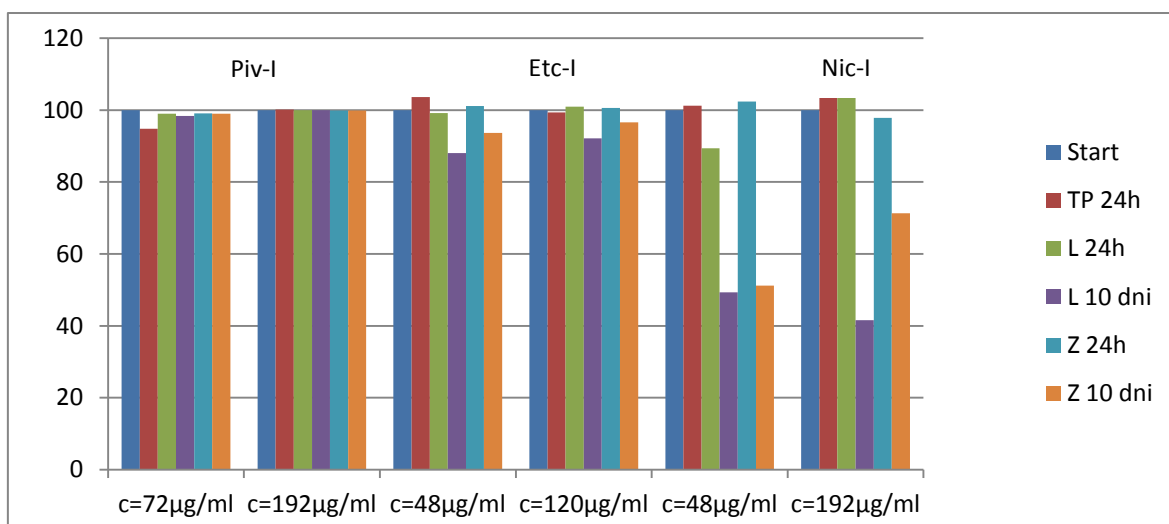
Odzysk = 100% c_{ozn}/c_{dekl}

Stabilność analitu

Badanie wykonano zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 14.2. Uzyskane wyniki zamieszczono na rycinach 41 – 42.



Ryc. 41. Zmiany stężenia estrów Ac-I i iBut-I w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).



Ryc. 42. Zmiany stężenia estrów Piv-I, Etc-I i Nic-I w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).

14.4. Trwałość substancji badanych w roztworach biologicznych

Osocze

Badania trwałości wykonane zostały w osoczu ludzkim (80%, seria I) termostатовanym w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Odważano 2,50 mg każdego z analizowanych związków i rozpuszczano w 0,5 ml DMSO. Do plastikowych, zakręconych probówek zawierających 4,0 ml osocza dodawano 0,8 ml buforu PBS, mieszano i termostатовano w łaźni wodnej. Do inkubowanego osocza dodawano 0,2 ml roztworu badanego związku w DMSO (5,0 mg/ml). Próbkę utrzymywano w temperaturze 37°C i w określonych odstępach czasu, po uprzednim wymieszaniu, pobierano po 0,2 ml próby badanej i przenoszono do 0,4 ml roztworu odpowiedniego wzorca wewnętrznego (Tabele 44 i 54). Po wymieszaniu, próbki wirowano 15 minut (5 min, 13 tys. obr/min). Nadsącz przenoszono do probówek i nanoszono na kolumnę chromatograficzną rozwijając chromatogramy w odpowiednim dla danego związku układzie faz (Rozdział 14.2 i 14.3). Stężenie początkowe badanych związków w osoczu wynosiło 200 µg/ml, natomiast w roztworze analitu (nadsączu) 66,7 µg/ml.

Osocze wzbogacone esterazą wieprzową

Przygotowano wodny roztwór esterazy wieprzowej o stężeniu 1 U/µl poprzez rozcieńczenie zawiesiny wodą o objętości 200 µl. Jako masę cząsteczkową esterazy

przyjęto 168 000 Da i obliczono stężenie molowe enzymu w ustalonej objętości próby badanej wynoszącej 5,0 ml – 1 μ l roztworu enzymu odpowiada stężeniu $5,50 \cdot 10^{-9}$ mol/l.

Do plastikowych, zakręcanych probówek zawierających 4,0 ml osocza (seria II) dodawano 0,8 ml buforu PBS, mieszano i termostatowano w łaźni wodnej (37°C). Do inkubowanego osocza dodawano ustaloną objętość enzymu (0,5 – 11,0 μ l), mieszano i termostatowano 15 minut. Następnie dodawano 0,2 ml roztworu badanego związku w DMSO (5,00 mg/ml), dokładnie wymieszano i postępowano zgodnie z opisem zamieszczonym powyżej.

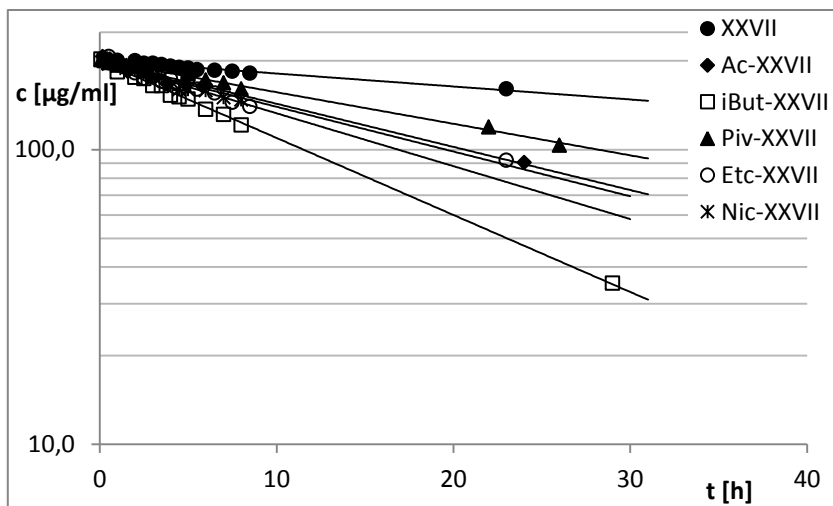
14.4.1. Obserwowane stałe szybkości rozkładu

Analizując zmiany stężenia substancji w osoczu oraz osoczu wzbogaconym esterazą wieprzową wykonano wykresy półlogarytmicznej zależności P jako funkcji czasu (Ryc. 43 – 55) oraz dokonano oceny statystycznej parametrów obserwowanych prostych (Tabele 63 – 64). Rozkład substancji w analizowanych warunkach zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu. Zmiany stężenia poszczególnych substancji w czasie opisane są równaniem kinetycznym (8) (Rozdział 12.3.3).

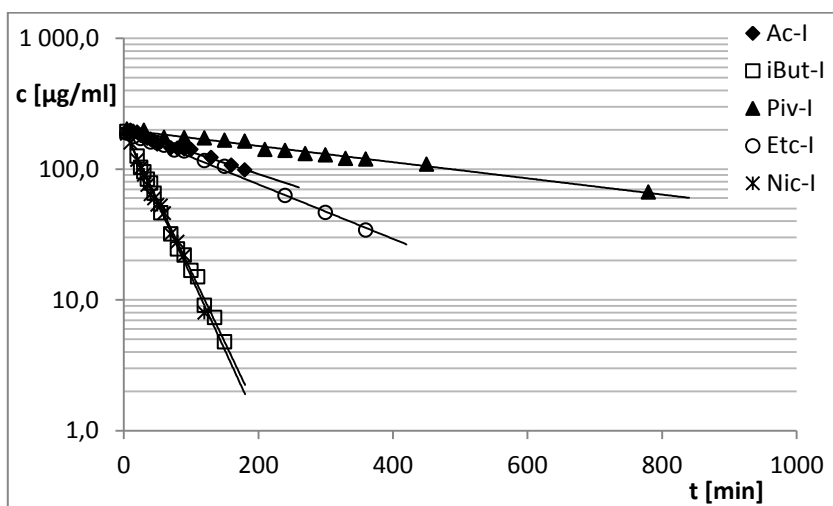
Obliczono czasy połowicznego rozkładu związków ($t_{0,5}$) w badanych warunkach:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs.}} \quad (12)$$

Dla wszystkich badanych substancji półlogarytmiczne wykresy zależności P_t jako funkcji czasu są prostoliniowe (Ryc. 43 – 55) o nachyleniu ujemnym, równym obserwowanej stałej szybkości ze znakiem ujemnym. Parametry statystyczne prostych $y = ax + b$ oraz błędy parametrów regresji obliczono metodą najmniejszych kwadratów dla $f = n - 2$ stopni swobody i poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Obliczone wartości $k_{obs.}$ zamieszczono w tabelach 63 i 64.



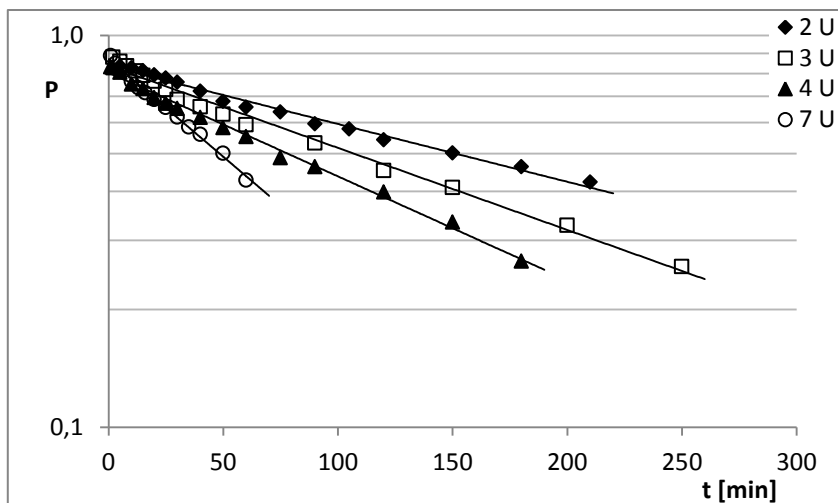
Ryc. 43. Półlogarytmiczny wykres zależności $c_t = f(t)$ reakcji hydrolizy związku XXVII i jego estrów w osoczu (80%, 37°C).



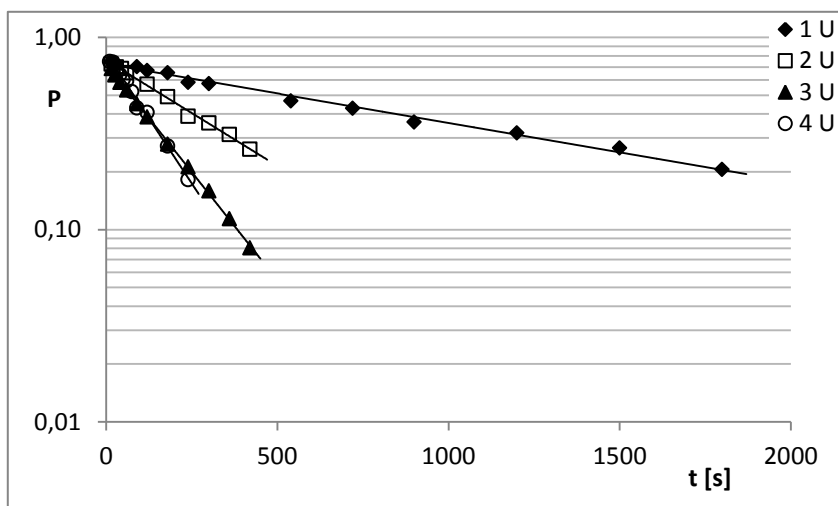
Ryc. 44. Półlogarytmiczny wykres zależności $c_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estrów acyklowiru w osoczu (80%, 37°C).

Tabela 63. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy badanych związków w osoczu (80%, 37°C)

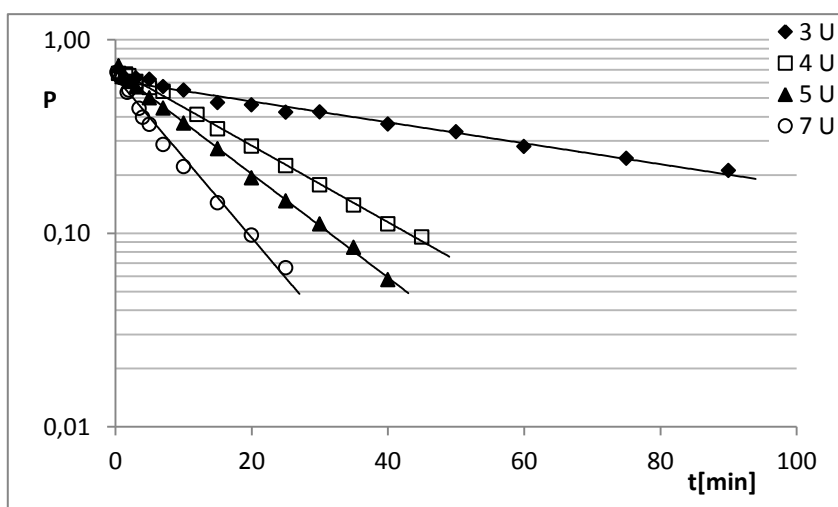
Związek	$k_{obs.} \pm \Delta k_{obs.} [s^{-1}]$	$t_{0,5} [h]$	-r	n
Ac-XXVII	$(9,36 \pm 0,72) \cdot 10^{-6}$	20,57	0,9933	13
iBut-XXVII	$(1,67 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	11,52	0,9992	15
Piv-XXVII	$(6,84 \pm 0,33) \cdot 10^{-6}$	28,13	0,9977	12
Etc-XXVII	$(9,74 \pm 1,16) \cdot 10^{-6}$	19,77	0,9824	14
Nic-XXVII	$(1,15 \pm 0,13) \cdot 10^{-5}$	16,78	0,9837	14
XXVII	$(2,81 \pm 0,36) \cdot 10^{-6}$	68,40	0,9822	13
Ac-I	$(6,47 \pm 0,49) \cdot 10^{-5}$	2,98	0,9912	16
iBut-I	$(4,16 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$	0,46	0,9978	16
Piv-I	$(2,38 \pm 0,17) \cdot 10^{-5}$	8,09	0,9932	15
Etc-I	$(7,99 \pm 0,37) \cdot 10^{-5}$	2,41	0,9976	13
Nic-I	$(4,31 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$	0,45	0,9959	15



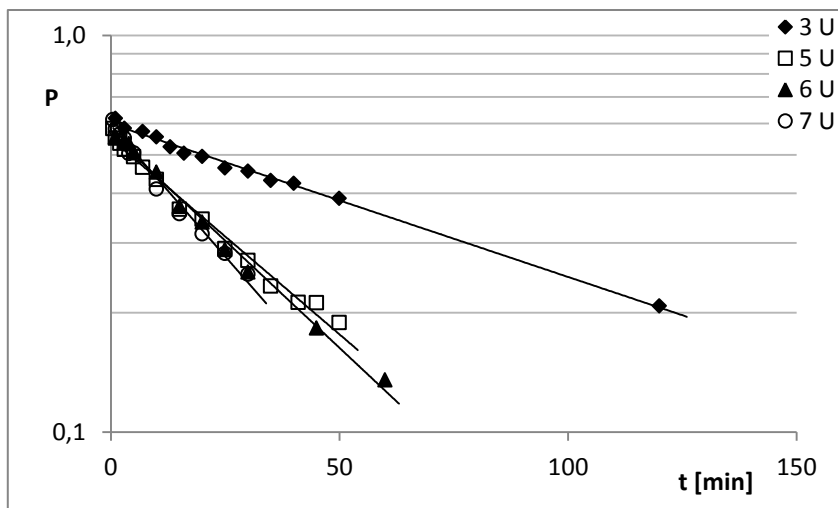
Ryc. 45. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



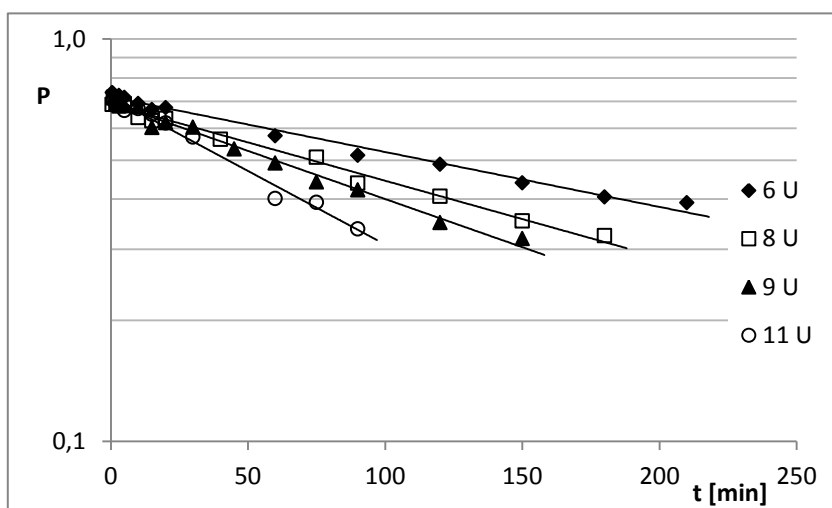
Ryc. 46. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru *i*But-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



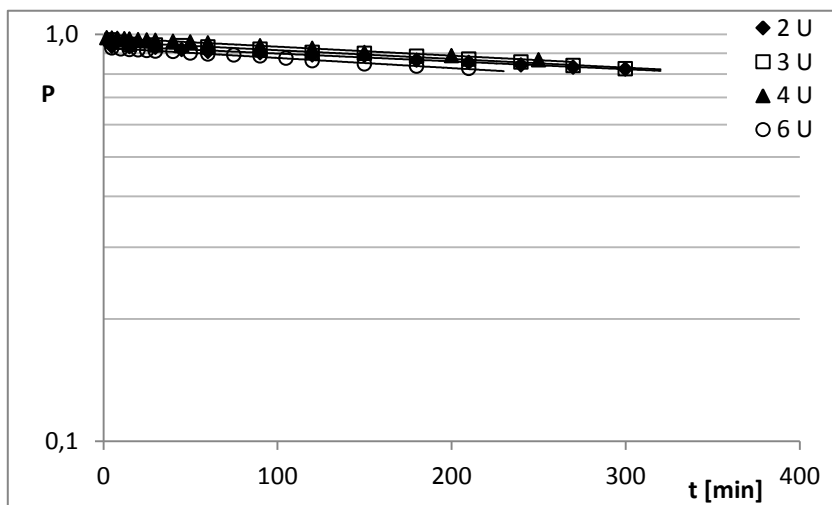
Ryc. 47. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



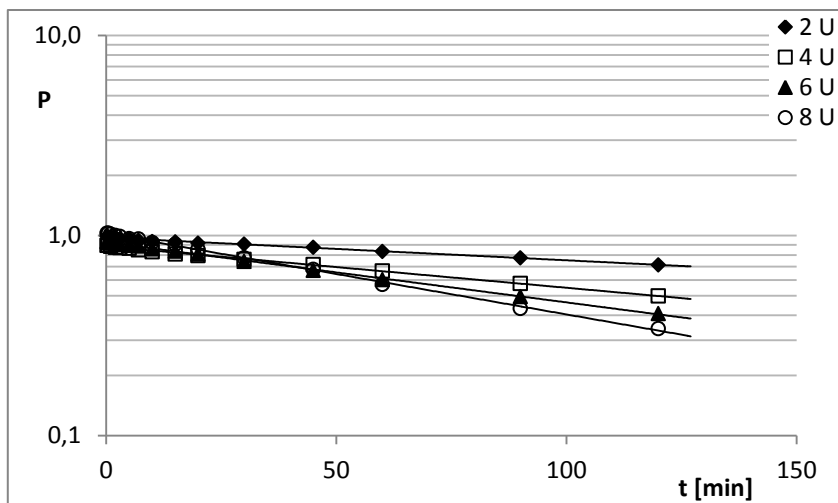
Ryc. 48. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



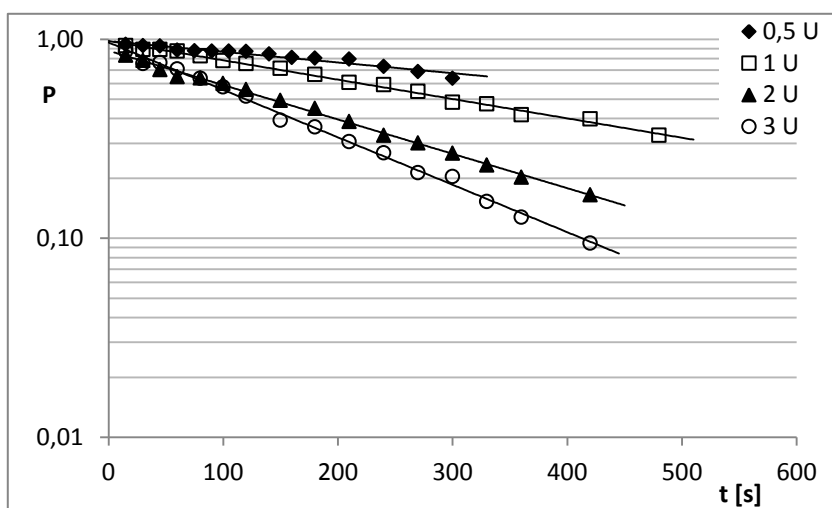
Ryc. 49. Półlogarytmiczny wykres zależności $\log P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



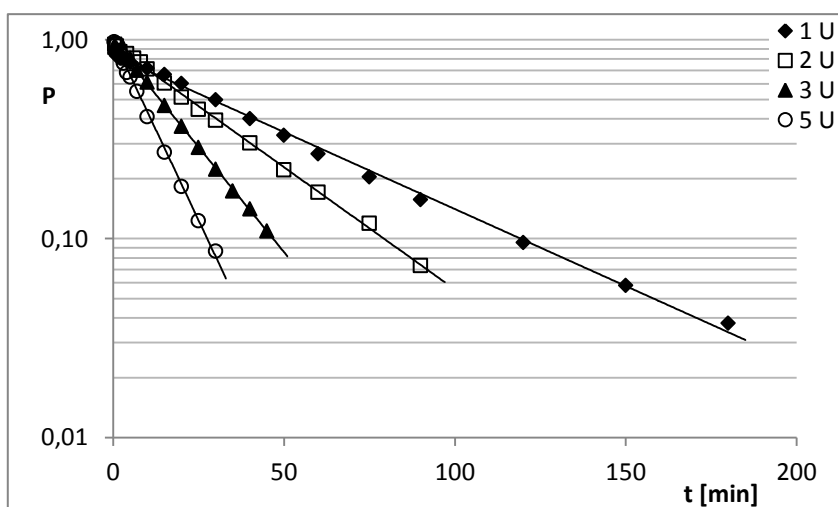
Ryc. 50. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy związku XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



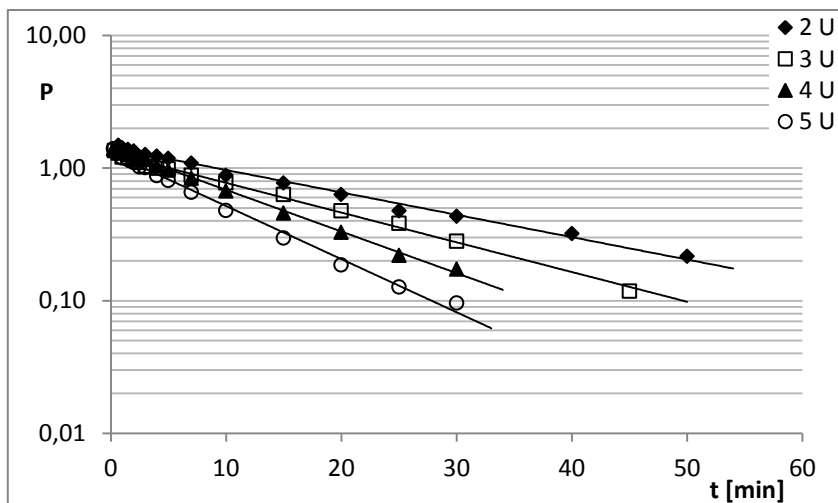
Ryc. 51. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



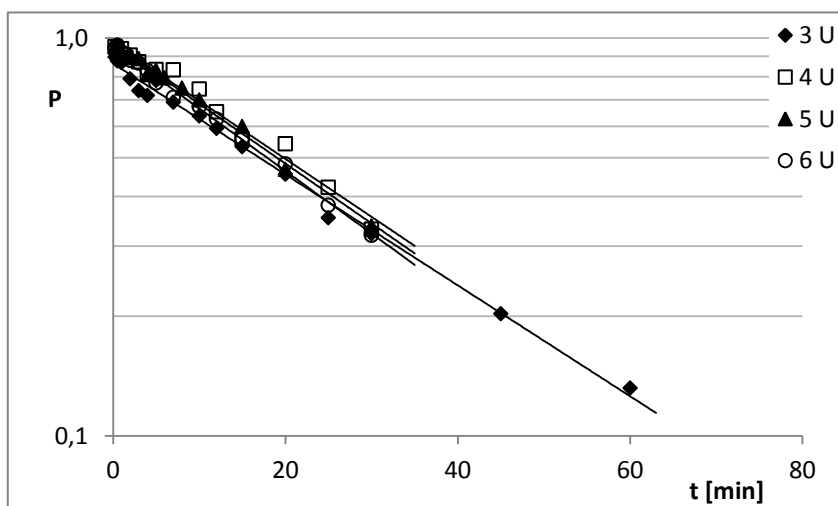
Ryc. 52. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru *i*But-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



Ryc. 53. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



Ryc. 54. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.



Ryc. 55. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.

Tabela 64. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy badanych związków w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej

Związek	C_{enzymu} [U]	C_{enzymu} [mol/l]	$k_{\text{obs.}} \pm \Delta k_{\text{obs.}}$ [s^{-1}]	$t_{0,5}$ [min]	-r	n
Ac-XXVII	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(5,66 \pm 0,36) \cdot 10^{-5}$	204,0	0,9940	16
	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(8,04 \pm 0,50) \cdot 10^{-5}$	143,7	0,9943	16
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(1,02 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	113,7	0,9966	16
	7,0	$3,85 \cdot 10^{-8}$	$(1,91 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	60,4	0,9968	13
iBut-XXVII	1,0	$5,50 \cdot 10^{-9}$	$(7,05 \pm 0,39) \cdot 10^{-4}$	16,4	0,9962	14
	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(2,53 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$	4,6	0,9978	10
	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(5,17 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$	2,2	0,9997	11
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(6,22 \pm 0,45) \cdot 10^{-3}$	1,9	0,9962	10

cd. Tabela 64.

Piv-XXVII	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(2,08 \pm 0,19) \cdot 10^{-4}$	55,5	0,9908	13
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(7,59 \pm 0,18) \cdot 10^{-4}$	15,2	0,9993	14
	5,0	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$(1,03 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	11,2	0,9992	13
	7,0	$3,85 \cdot 10^{-8}$	$(1,59 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$	7,3	0,9936	14
Etc-XXVII	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(1,48 \pm 0,07) \cdot 10^{-4}$	78,0	0,9972	13
	5,0	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$(3,79 \pm 0,27) \cdot 10^{-4}$	30,5	0,9930	15
	6,0	$3,30 \cdot 10^{-8}$	$(4,15 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$	27,8	0,9964	11
	7,0	$3,85 \cdot 10^{-8}$	$(5,07 \pm 0,43) \cdot 10^{-4}$	22,8	0,9927	12
Nic-XXVII	6,0	$3,30 \cdot 10^{-8}$	$(5,24 \pm 0,38) \cdot 10^{-5}$	220,6	0,9933	14
	8,0	$4,40 \cdot 10^{-8}$	$(7,31 \pm 0,49) \cdot 10^{-5}$	158,1	0,9943	14
	9,0	$4,95 \cdot 10^{-8}$	$(9,18 \pm 0,65) \cdot 10^{-5}$	125,8	0,9937	14
	11,0	$6,05 \cdot 10^{-8}$	$(1,10 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}$	104,9	0,9764	12
XXVII	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(7,39 \pm 0,49) \cdot 10^{-6}$	1563,5	0,9950	13
	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(8,21 \pm 0,58) \cdot 10^{-6}$	1408,0	0,9938	14
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(8,37 \pm 0,24) \cdot 10^{-6}$	1364,4	0,9988	16
	6,0	$3,30 \cdot 10^{-8}$	$(9,58 \pm 0,39) \cdot 10^{-6}$	1206,1	0,9975	16
Ac-I	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(4,37 \pm 0,27) \cdot 10^{-5}$	264,6	0,9946	15
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(7,94 \pm 0,23) \cdot 10^{-5}$	145,6	0,9988	15
	6,0	$3,30 \cdot 10^{-8}$	$(1,15 \pm 0,02) \cdot 10^{-4}$	100,4	0,9995	15
	8,0	$4,40 \cdot 10^{-8}$	$(1,55 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	74,4	0,9992	15
iBut-I	0,5	$2,75 \cdot 10^{-9}$	$(1,24 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$	9,3	0,9869	15
	1,0	$5,50 \cdot 10^{-9}$	$(2,24 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	5,2	0,9971	17
	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(3,98 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$	2,9	0,9985	16
	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(5,49 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$	2,1	0,9979	16
Piv-I	1,0	$5,50 \cdot 10^{-9}$	$(2,97 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	38,9	0,9988	16
	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(4,71 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	24,5	0,9995	16
	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(8,11 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$	14,3	0,9995	15
	5,0	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$(1,40 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$	8,3	0,9989	15
Etc-I	2,0	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$(6,48 \pm 0,35) \cdot 10^{-4}$	17,8	0,9960	15
	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(8,60 \pm 0,34) \cdot 10^{-4}$	13,4	0,9977	16
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(1,20 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	9,6	0,9991	15
	5,0	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$(1,54 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	7,5	0,9971	15
Nic-I	3,0	$1,65 \cdot 10^{-8}$	$(5,35 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$	21,6	0,9971	16
	4,0	$2,20 \cdot 10^{-8}$	$(5,59 \pm 0,50) \cdot 10^{-4}$	20,7	0,9892	15
	5,0	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$(5,77 \pm 0,32) \cdot 10^{-4}$	20,0	0,9966	13
	6,0	$3,30 \cdot 10^{-8}$	$(6,03 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}$	19,2	0,9981	15

14.4.2. Analiza HPLC-MS/MS roztworów XXVII i jego estrów poddanych hydrolizie w środowisku osocza i w obecności esterazy wieprzowej

W analizie jakościowej obecności ACV i związku XXVII w mieszaninach reakcyjnych pochodnych trójcyklicznych poddanych hydrolizie w osoczu oraz w obecności esterazy wieprzowej, zastosowano metodę HPLC-MS/MS wykonując badania we współpracy z prof. dr. hab. Zenonem Kokotem, mgr Agnieszką Klupczyńską oraz mgr. Szymonem Plewą (Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UMP).

Analizę wykonano przy wykorzystaniu wysokosprawnego chromatografu cieczowego 1260 Infinity (Agilent Technologies) sprzężonego ze spektrometrem mas z potrójnym kwadrupolem 4000 QTRAP (Sciex). Warunki rozdziału chromatograficznego i parametry pracy spektrometru mas były następujące:

- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher 100 RP-18, 250 × 4 mm, 5 μm
- temperatura kolumny: 24°C
- faza ruchoma: woda z dodatkiem mrówczanu amonu 0,005 mol/l i kwasu mrówkowego 0,1% (A); acetonitryl z kwasem mrówkowym 0,1% (B) w elucji gradientowej (Tabela 65)
- przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min
- objętość nastrojki: 5 μl
- detekcja: tandemowy spektrometr mas 4000 QTRAP (AB Sciex) z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI) i detekcją z użyciem potrójnego kwadrupola, pozytywny tryb jonizacji, napięcie elektrody: 5500 V, temperatura: 550°C, gaz rozpylający 1: 50,0 psig, gaz rozpylający 2: 60,0 psig
- tryb monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM) – przejścia MRM i warunki oznaczania badanych substancji przedstawiono w tabeli 66. Optymalizację przeprowadzono w oparciu o bezpośredni nastrojki roztworów wzorcowych do źródła jonów z użyciem pompy strzykawkowej.

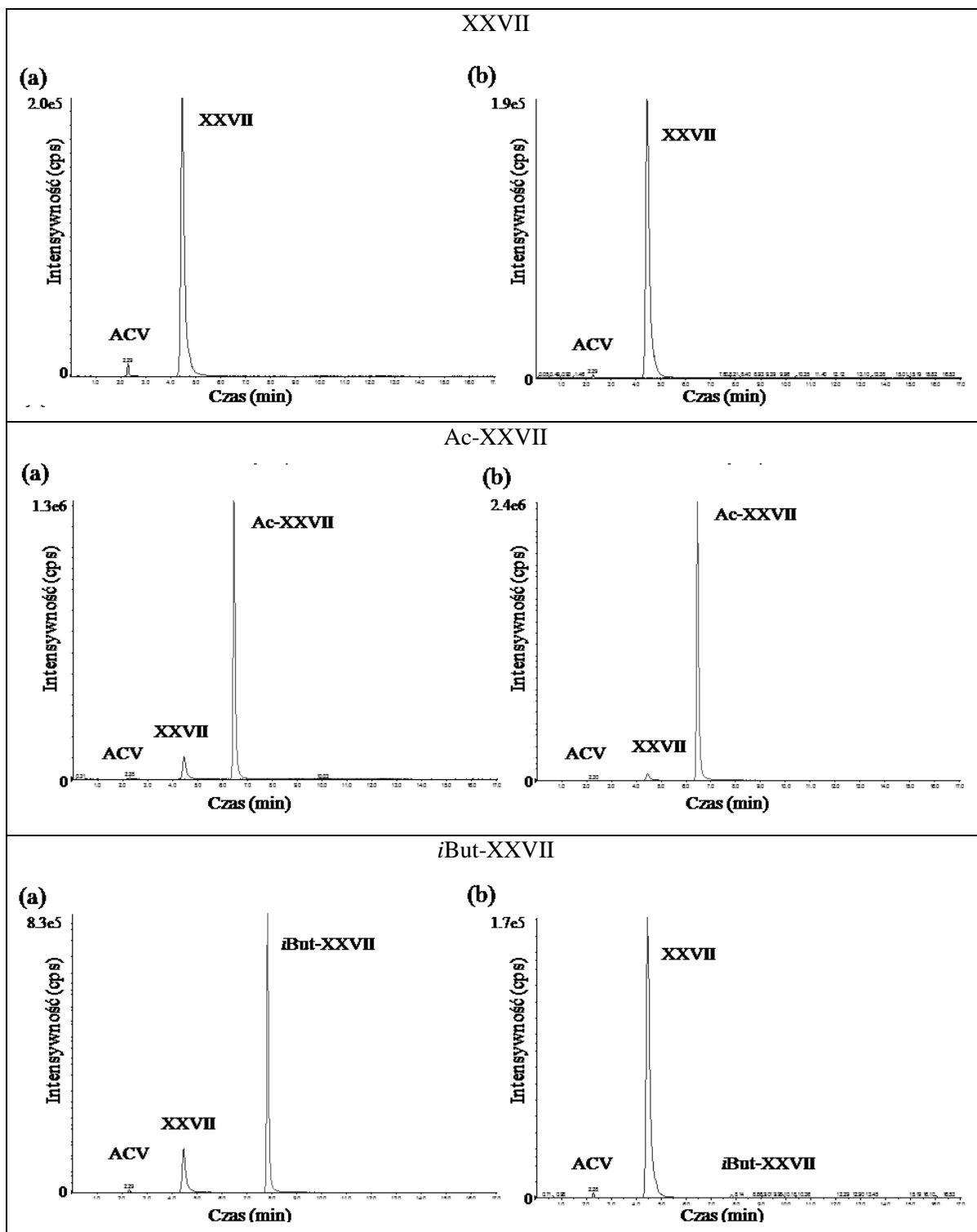
Tabela 65. Skład fazy ruchomej w przedziałach czasu zastosowanej elucji gradientowej

Krok	Czas [min]	Faza A [%]	Faza B [%]
0	0,0	65,0	35,0
1	1,0	65,0	35,0
2	8,0	15,0	85,0
3	10,0	15,0	85,0
4	11,0	65,0	35,0
5	17,0	65,0	35,0

Tabela 66. Zoptymalizowane parametry analizy MS/MS

Substancja	Masa atomowa [Da]	Czas retencji [min]	Jon prekursorowy [m/z]	Jony potomne [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	DT [ms]
ACV	225,2	2,29	226,2	152,1 110,1	51	20 43	13 10	57
XXVII	355,35	4,46	356,3	294,2 282,1	50	24 29	16 15	
Ac-XXVII	397,39	6,46	398,2	294,3 87,1	85	27 46	17 15	
<i>i</i> But-XXVII	425,45	7,82	426,2	294,3 115,2	100	28 42	17 20	
Piv-XXVII	439,47	8,45	440,5	294,3 129,3	112	27 45	24 22	
Etc-XXVII	427,42	7,36	428,2	194,3 117,3	110	27 31	17 21	
Nic-XXVII	460,45	6,68	461,2	294,3 150,2	100	30 41	17 27	

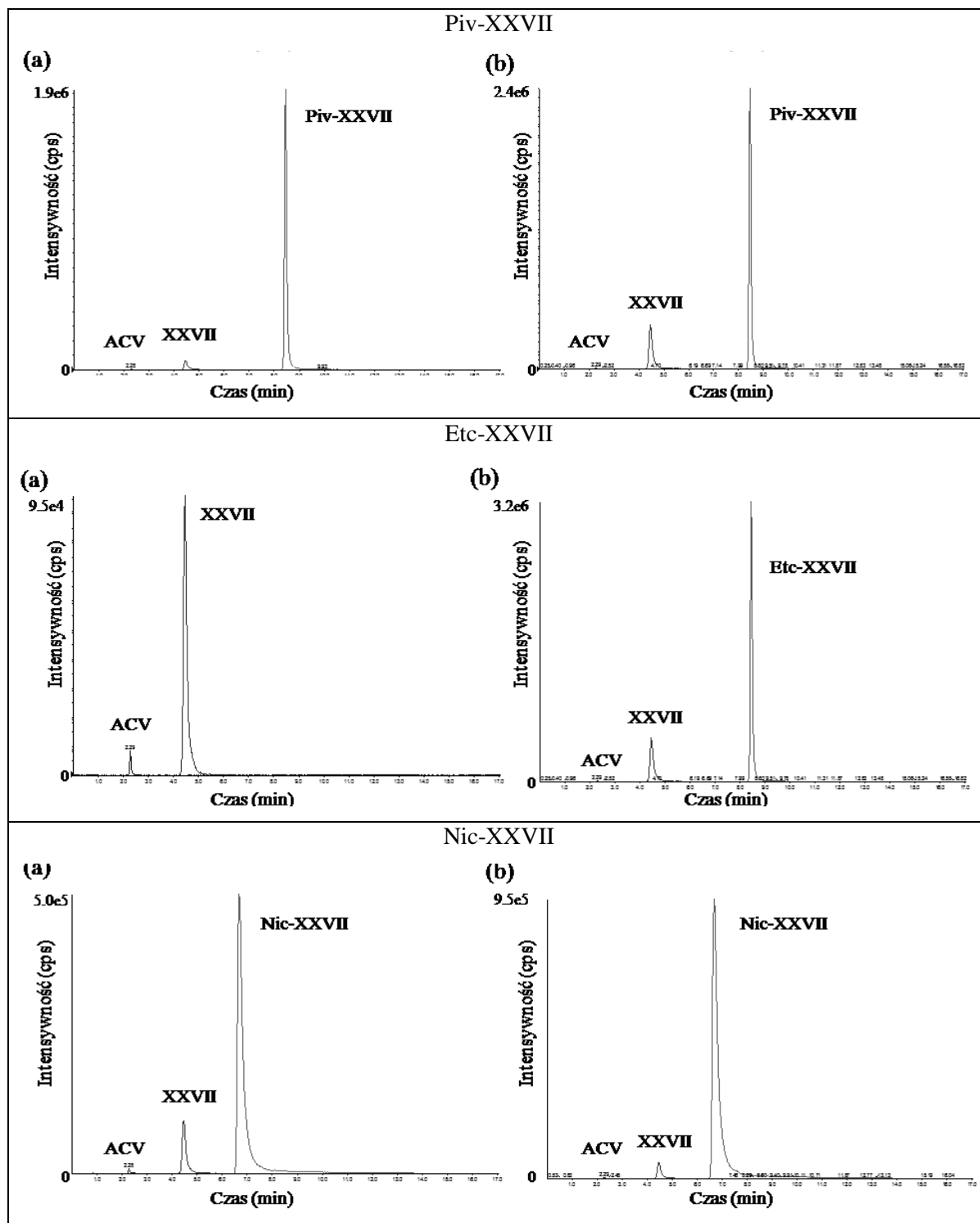
Do analizy HPLC-MS/MS wykorzystano roztwory związków poddane hydrolizie w osoczu (80%) ogrzewane w temperaturze 37°C 24 h oraz roztwory poddane hydrolizie w osoczu (80%) wzbogaconym esterazą wieprzową o stężeniu $5,50 \cdot 10^{-9}$ mol/l (1 U/5 ml) ogrzewane w temperaturze 37°C 2 h. Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 14.4, a następnie rozcieńczono wodą w proporcji 1:100 (v/v). Na chromatogramach HPLC-MS/MS wszystkich próbek poddanych rozkładowi obserwowano wyraźne sygnały charakterystyczne dla badanych estrów oraz związku XXVII. Sygnały ACV były bardzo słabo widoczne i wielokrotnie mniejsze od pozostałych (Ryc. 56).



Ryc. 56. Chromatogramy HPLC-MS/MS badanych związków poddanych hydrolizie w temperaturze 37°C

a) w osoczu (80%) przez 24 h

b) w osoczu (80%) w obecności esterazy wieprzowej ($5,50 \cdot 10^{-9}$ mol/l) przez 2 h.



cd. Ryc. 56. Chromatogramy HPLC-MS/MS badanych związków poddanych hydrolizie w temperaturze 37°C

a) w osoczu (80%) przez 24 h

b) w osoczu (80%) w obecności esterazy wieprzowej ($5,50 \cdot 10^{-9}$ mol/l) przez 2 h.

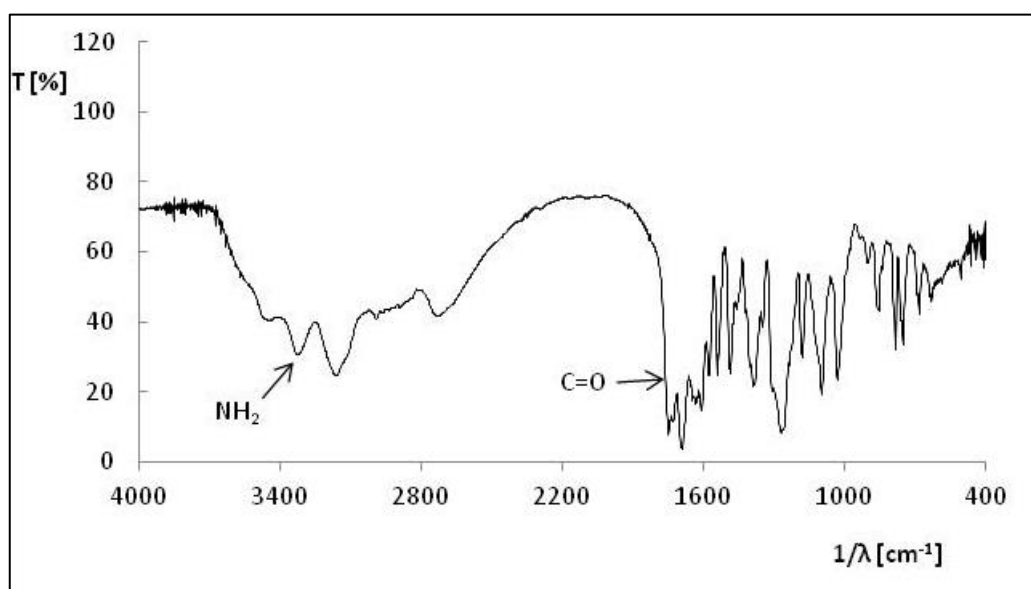
V. Omówienie i dyskusja wyników

Przedstawione w rozprawie badania w zakresie oceny właściwości fizykochemicznych oraz trwałości wybranych estrów acyklowiru, a przede wszystkim estrów jego trójcyklicznego analogu, oparto na wykorzystaniu techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC), zapewniającej możliwość opracowania warunków selektywnej analizy poszczególnych związków w ich mieszaninach, m.in. z produktami ich degradacji. Zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP) oraz wymaganiami prowadzonej analizy, opracowane metody poddano szczegółowemu procesowi walidacji dowodząc ich przydatności w określonym zakresie prowadzonych badań. Ponieważ etap walidacji metody stanowił pewnego rodzaju etap przygotowania odpowiedniego narzędzia dla zapewnienia właściwej interpretacji wyników, poświęcono mu szczególną uwagę w Części Doświadczalnej dysertacji, przedstawiając i dokumentując wszystkie jego etapy (Rozdziały 12.2, 12.4, 14.2 i 14.3).

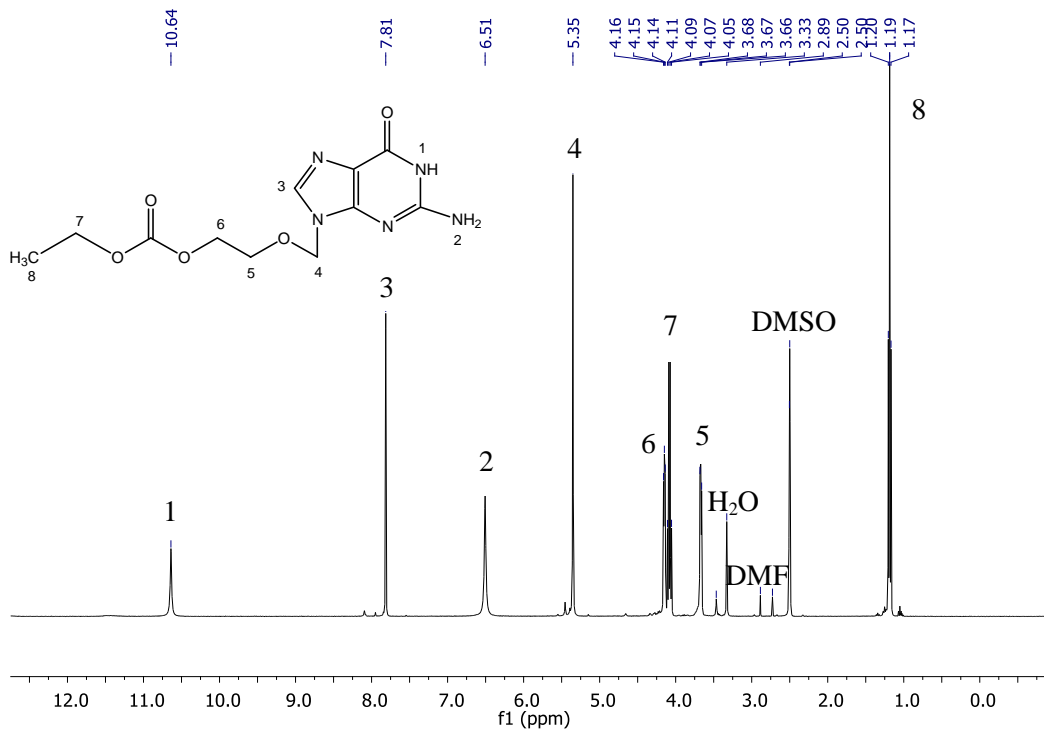
15. Synteza estrów i wyznaczenie ich lipofilowości

W celu zwiększenia lipofilowości cząsteczki związku XXVII oraz cząsteczki acyklowiru, estryfikacji poddano grupę hydroksylową wymienionych substancji tworząc proste estry: acetylowe (Ac-), izobutyrylowe (*i*But-), piwaloilowe (Piv-) oraz etoksykarbonylowe (Etc-) i nikotynowe (Nic-). Estry Ac-I, *i*But-I oraz Piv-I są opisane w piśmiennictwie (Ac-I [200 – 203]; *i*But-I [200, 201], Piv-I [52, 200, 201]). Do ich syntezy postanowiono zaadaptować metodę polegającą na estryfikacji ACV odpowiednim bezwodnikiem kwasowym w środowisku bezwodnego DMSO w atmosferze argonu [202]. Po odpowiednim czasie mieszaninę reakcyjną przenoszono kroplami do odpowiedniej objętości wody w celu strącenia otrzymanego estru. Tak otrzymane związki, pomimo niskiej wydajności syntezy (21,2% – 32,0%) charakteryzowały się wysoką czystością potwierdzoną metodą HPLC (98,4% – 100,0%). Tożsamość otrzymanych estrów potwierdzono technikami spektroskopowymi (UV, IR i ¹H-NMR) i porównano z danymi piśmiennictwa [52, 200 – 202]. Reakcje syntezy estru Etc-I i Nic-I prowadzono w środowisku DMF w atmosferze argonu. Po odpowiednim czasie rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość przekrystalizowano z etanolu (Etc-I) lub strącono w roztworze wodnym (Nic-I). Oba estry oczyszczono na kolumnie

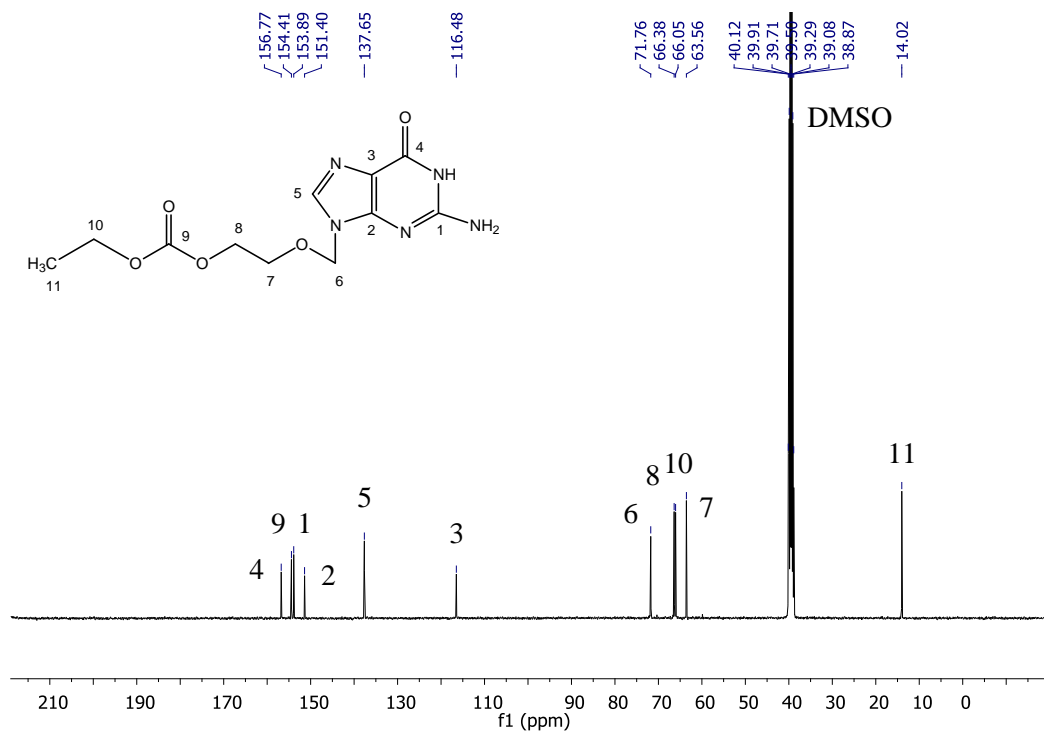
chromatograficznej wykorzystując jako eluent: mieszaninę dichlorometan – metanol (8:1) (Etc-I) lub (4:1) (Nic-I). W obu przypadkach jako katalizator reakcji zastosowano DMAP. Czystość obu estrów potwierdzono chromatograficznie (HPLC: Etc-I – 99,2%, Nic-I – 99,3%), analizą elementarną i mierząc temperaturę topnienia. Otrzymane estry scharakteryzowano spektrofotometrycznie (UV, IR, ^1H - i ^{13}C -NMR) potwierdzając obecność grupy estrowej (IR ok. $1701\text{--}1755\text{ cm}^{-1}$, C=O) oraz odpowiednich dla grupy etylowej i pirydyny, sygnałów widm ^1H - i ^{13}C -NMR. W widmie IR wszystkich pięciu estrów obserwowano dodatkowo zanik pasm drgań rozciągających wiązania O-H i uwidocznienie pasm charakterystycznych dla I-rzędowej grupy aminowej: $\nu\text{ NH}$ ok. 3450 cm^{-1} (as) i ok. 3320 cm^{-1} (sym) oraz nadton ok. 3185 cm^{-1} ($2 \times \delta\text{ NH}$). Przykładowe widma IR, ^1H - i ^{13}C -NMR dla estru Etc-I zamieszczono na rycinach 57 – 61.



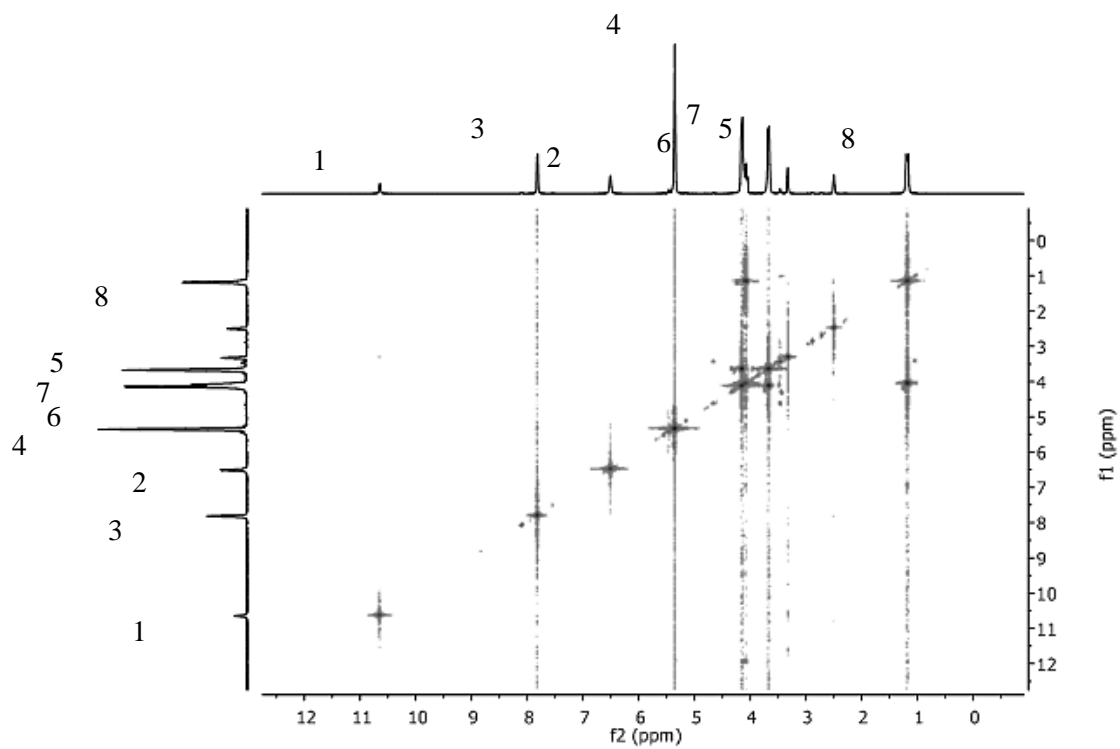
Ryc. 57. Widmo IR estru Etc-I.



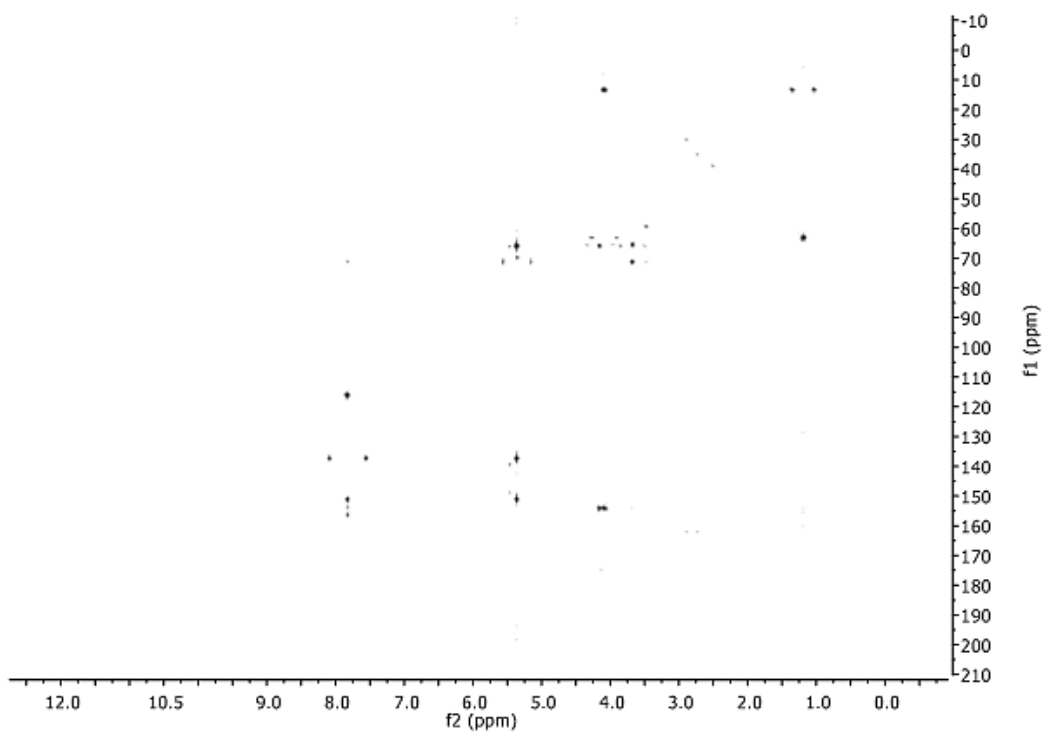
Ryc. 58. Widmo $^1\text{H-NMR}$ estru Etc-I.



Ryc. 59. Widmo $^{13}\text{C-NMR}$ estru Etc-I.



Ryc. 60. Widmo COSY estru Etc-I.



Ryc. 61. Widmo HMBC estru Etc-I.

Analogicznie zostały zsyntetyzowane i oczyszczone estry związku XXVII, a ich tożsamość potwierdzono metodami ^1H - i ^{13}C -NMR (dr hab. Tomasz Ostrowski, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu) [204]. Powyższe estry poddane zostały również analizie widm UV oraz IR. Wszystkie pochodne charakteryzowały się maksimum absorpcji w roztworach metanолоwych w zakresie UV 262 nm oraz 308 nm. W widmach IR estrów charakterystyczne jest pojawienie się dodatkowego pasma grupy C=O ugrupowania estrowego (ok. 1724 do 1738 cm^{-1}) świadczące o pozytywnej estryfikacji grupy OH łańcucha alkilowego cząsteczki związku XXVII. Dodatkowo w przypadku estru Etc-XXVII zaobserwowano poszerzenie pasma C-O asymetrycznego przy 1285 cm^{-1} . Widma ^1H -NMR potwierdziły strukturę otrzymanych estrów pozwalając na identyfikację poszczególnych grup atomów wodoru zarówno ugrupowań alifatycznych (metylowa, izopropylowa, *tert*-butylowa, etylowa), jak i aromatycznych (pierścieni pirydyny) jako dodatkowych sygnałów w odniesieniu do widma związku XXVII. Tożsamość produktów syntezy potwierdzają również wyniki analizy elementarnej zgodne z wartościami przewidywanymi dla tych struktur [204]. Czystość wszystkich substancji oceniono również poprzez pomiar temperatury topnienia i analizę HPLC. Zakresy temperatury topnienia nie przekraczały 2°C, co świadczy o wysokiej czystości, czego potwierdzeniem była również analiza HPLC. Na chromatogramach rozwijanych w czasie stanowiącym 7-krotność czasu retencji pików głównego, nie obserwowano żadnych dodatkowych pików, a poziom czystości oceniono na 96,5% – 99,1%, co uznano za satysfakcjonujące.

Chcąc wyznaczyć lipofilowość otrzymanych estrów zastosowano metodę HPLC, która może mieć zastosowanie dla związków o przewidywalnej wartości logP w granicach od 0 do 6, a nawet od -1 do 8, jak podają niektórzy autorzy [191]. Zaletą tej metody jest prostota wykonania i oszczędność, zarówno substancji badanych (niewielka ilość analitu), jak i odczynników.

Wyznaczenie lipofilowości związku XXVII i jego estrów wykonano zgodnie z powszechnie przyjętym założeniem, że analiza współczynników wymywania kolejnych substancji na kolumnie z wypełnieniem RP-18 w stałych warunkach temperatury i przy zmiennej zawartości składnika organicznego fazy (ACN lub MeOH) pozwala wyznaczyć wartości log k_w będące wyznacznikiem lipofilowości związku. Dla większości związków istnieje liniowa korelacja pomiędzy wartościami log k_w a logP_{oct} (wyznaczone metodą ekstrakcyjną) [191, 192]. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność badanych substancji w metanolu i w konsekwencji niezadowolające ich wymywanie z kolumny,

badanie wykonano z wykorzystaniem faz ruchomych stanowiących mieszaninę ACN i wody (30% – 60%). Ponieważ w przypadku zastosowania ACN jako składnika wymywającego fazy obserwowana zależność $\log k$ jako funkcja zawartości ACN nie zawsze ma charakter prostoliniowy, ustalono parametry w/w zależności korzystając z równania liniowego (2) oraz kwadratowego (3) [192]. Zarówno rycina 14, jak i współczynniki korelacji (Tabela 9) wskazują, że lepszą korelację otrzymano po zastosowaniu równania kwadratowego. Wartości bezwzględne r dla równania (2) mieszczą się w zakresie 0,9774 – 0,9909, natomiast dla równania (3) wynoszą 0,9916 – 0,9989. Ekstrapolowane wartości $\log k_w$ różnią się jednak dość znacznie między sobą, w zależności od zastosowanego równania (wartości w zakresie 0,651 – 2,257 dla równania (2) i 1,292 – 3,393 dla równania (3)). Wartości $\log k_w$ obliczone z równania kwadratowego dla wszystkich związków były większe niż obliczone z równania liniowego.

W przypadku estrów acyklowiru oparto się na danych piśmiennictwa dowodzących istnienia korelacji pomiędzy wartościami $\log P$ wyznaczonymi eksperymentalnie (metoda *shake flask*) oraz logarytmem współczynnika wymywania ($\log k$) związków chromatografowanych na kolumnie z wypełnieniem RP-18 [193, 194, 198]. Fakt ten w piśmiennictwie potwierdzono analizując powyższą zależność dla 68 związków o różnej budowie chemicznej [193]. Autorzy wykazali, że możliwe jest zastosowanie techniki krzywej wzorcowej w wyznaczaniu wartości $\log P$ metodą HPLC, lecz istotny jest prawidłowy dobór substancji standardowych o znanych wartościach $\log P$. Dla wyznaczania lipofilowości nowych związków, jako wzorce poleca się zastosowanie conajmniej 4 substancji np. alkoholu benzyłowego, acetofenonu, toluenu i naftalenu, lub w przypadku związków zawierających ugrupowanie fenolowe lub karboksylowe: 4-metoksyfenolu, p-krezolu, 1-naftolu i tymolu [193]. Istotne w doborze wzorców jest podobieństwo strukturalne oraz wartości $\log P$ odpowiadające spodziewanemu zakresowi dla związków badanych. Dlatego do wyznaczenia $\log P$ otrzymanych estrów zaproponowano jako substancje wzorcowe: ACV i guaninę ($\log P$ -1,42, -0,91; podobieństwo strukturalne), 1-naftol i tymol ($\log P$ 2,71, 3,30; rekomendowane dla związków z grupą fenolową [193]) oraz ryboflawinę, pirydoksynę i nikotynamid ($\log P$ -1,50, -0,80, -0,40). Wartości $\log k$ wyznaczono z zastosowaniem kolumny chromatograficznej LiChrospher RP-18 (250 × 4 mm, 5 μ m; Merck, Germany), a fazę ruchomą stanowiła mieszanina ACN – MeOH – 0,02 mol/l bufor fosforanowy o pH 6,7 (3:1:3). Zastosowana długość fali 240 nm pozwoliła na rejestrację sygnałów wszystkich

analizowanych substancji (badanych estrów i substancji wzorcowych). Dla każdego badanego związku $\log k$ wyznaczono jako średnią z sześciu pomiarów czasu retencji substancji badanych i azotanu sodu jako substancji nie ulegającej adsorpcji na kolumnie chromatograficznej. W zastosowanych warunkach czasy retencji nanoszonych związków mieściły się w zakresie od 1,263 do 5,661 min (Tabela 10 i 11). Natomiast współczynniki zmienności odczytanych czasów retencji mieściły się w zakresie 0,08% – 0,78% (Tabele 10 i 11). Obliczono parametry równania (4):

$$\log P = (1,053 \pm 0,172) + (3,784 \pm 0,314) \log k$$

dla którego współczynnik korelacji r wyniósł 0,9974. Wartości $\log P$ obliczono z wyznaczonego równania krzywej wzorcowej, a ich błędy przedstawiono jako wartości przedziału ufności dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ (Tabela 11). Współczynniki zmienności obliczonych wartości $\log P$ mieściły się w zakresie 1,69% – 3,45%.

Równocześnie obliczono przewidywane wartości $c \log P$ dla wszystkich związków, korzystając z dostępnego oprogramowania (ALOGPS 2.1 program), dającego możliwość zastosowania 7 algorytmów i wyznaczenia wartości średniej (Tabele 12 i 13). AC $\log P$, ALOGPs i MLOGP to wartości $c \log P$ obliczone na podstawie topologii całej cząsteczki, podczas gdy KOWWIN uwzględnia różne części struktury, a ALOGP, XLOGP2 oraz XLOGP3 analizę poszczególnych atomów wchodzących w skład cząsteczki.

Analiza zależności $\log k_w$ (z równań (2) i (3) dla związku XXVII i jego estrów) lub $\log P$ (dla estrów ACV) jako funkcji $c \log P$ (Tabele 12 i 13) pozwoliła na jej opisanie odpowiednim równaniem (Tabele 67 i 68):

$$\log k_w (\log P) = k_1 + k_2 \times c \log P \quad (13)$$

Obliczono wartości współczynników k_1 i k_2 , współczynników korelacji r oraz dokonano ich oceny statystycznej szacując standardowe błędy jako przedział ufności przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Weryfikacji poddano również hipotezę o istnieniu korelacji między analizowanymi zmiennymi porównując wartości r z wartościami krytycznymi dla $f = n - 2$ stopni swobody i poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$ (dla estrów acyklowiru).

Tabela 67. Analiza korelacji pomiędzy wartościami $\log k_w$ wyznaczonymi na podstawie równań (2) i (3) oraz $c \log P$ dla związku XXVII i jego estrów

Równanie	$\log k_w = k_1 + k_2 \cdot c \log P$			
	AC logP	ALOGPs	MLOGP	KOWWIN
(2)	$k_2 = 0,964 \pm 0,108$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9941$	$k_2 = 0,794 \pm 0,194$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9824$	$k_2 = 0,661 \pm 0,693$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,8947$	$k_2 = 0,669 \pm 0,175$ $k_1 = 0,749 \pm 0,237$ $r = 0,9826$
(3)	$k_2 = 1,462 \pm 0,311$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9720$	$k_2 = 1,235 \pm 0,368$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9638$	$k_2 = 1,033 \pm 1,138$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,8348$	$k_2 = 0,835 \pm 0,491$ $k_1 = 1,432 \pm 0,664$ $r = 0,9207$
	ALOGP	XLOGP2	XLOGP3	Average logP
(2)	$k_2 = 0,747 \pm 0,210$ $k_1 = 0,646 \pm 0,278$ $r = 0,9801$	$k_2 = 0,674 \pm 0,417$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9315$	$k_2 = 0,754 \pm 0,203$ $k_1 = 0,633 \pm 0,270$ $r = 0,9817$	$k_2 = 0,912 \pm 0,149$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9892$
(3)	$k_2 = 0,967 \pm 0,423$ $k_1 = 1,262 \pm 0,562$ $r = 0,9538$	$k_2 = 1,053 \pm 0,521$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9399$	$k_2 = 0,983 \pm 0,390$ $k_1 = 1,238 \pm 0,520$ $r = 0,9614$	$k_2 = 1,412 \pm 0,383$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9591$

$r_{\alpha}(n-2): r_{0,05}(4) = 0,8114$

Tabela 68. Analiza korelacji pomiędzy wartościami $\log P$ oraz $c \log P$ dla acyklowiru i jego estrów

$\log P = k_1 + k_2 \times c \log P$			
AC logP	ALOGPs	MLOGP	KOWWIN
$k_2 = 0,850 \pm 0,122$ $k_1 = -0,122 \pm 0,125$ $r = 0,9946$ $t = 19,270$	$k_2 = 0,947 \pm 0,300$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9749$ $t = 8,757$	$k_2 = 0,968 \pm 0,584$ $k_1 = -1,388 \pm 0,566$ $r = 0,9170$ $t = 4,597$	$k_2 = 0,663 \pm 0,144$ $k_1 = -0,322 \pm 0,120$ $r = 0,9879$ $t = 12,754$
ALOGP	XLOGP2	XLOGP3	Average logP
$k_2 = 0,745 \pm 0,211$ $k_1 = -0,236 \pm 0,167$ $r = 0,9798$ $t = 9,813$	$k_2 = 0,900 \pm 0,542$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9174$ $t = 4,609$	$k_2 = 0,751 \pm 0,171$ $k_1 = \text{NS}$ $r = 0,9868$ $t = 12,192$	$k_2 = 0,852 \pm 0,166$ $k_1 = -0,270 \pm 0,112$ $r = 0,9903$ $t = 14,265$

$r_{\alpha}(n-2): r_{0,05}(4) = 0,8114; r_{0,01}(4) = 0,9172$

$t_{\alpha}(n-2): t_{0,05}(4) = 2,776; t_{0,01}(4) = 4,604$

Dla związku XXVII i jego estrów we wszystkich przypadkach korelacja była statystycznie istotna dla $\alpha = 0,05$ ($r > r_{0,05}(4)$; Tabela 67), a wartości współczynnika korelacji wskazują na lepszą korelację w przypadku $\log k_w$ wyznaczonego z równania liniowego (r w zakresie 0,8947 – 0,9941) niż z równania kwadratowego (r w zakresie 0,8348 – 0,9720). Najniższą korelację obserwowano dla wartości obliczonych przy użyciu algorytmu MLOGP (współczynnik korelacji wyniósł 0,8947 i 0,8348, odpowiednio dla równania (2) i (3)). Na uwagę zasługuje również najwyższa korelacja i zbieżność wartości $\log k_w$ (równanie liniowe) z $c \log P$ obliczonymi algorytmem AC logP (Tabela 12). Wartość nachylenia analizowanej prostej k_2 (Tabela 67) mieści się w przedziale ufności

0,856 – 1,072 co sugeruje możliwość wykorzystania tego algorytmu i parametrów równania (13) dla przewidywania wartości $\log k_w$ w tej grupie związków (Tabela 67).

W przypadku estrów acyklowiru analiza istotności współczynników równania (13) wykazała, że współczynnik k_I nie jest statystycznie istotny ($k_I = 0$) w przypadku zależności opisanej dla algorytmu ALOGPs, XLOGP2 oraz XLOGP3 (Tabela 68). Test istotności korelacji badanych zmiennych (r , t) wykazał, że dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$, korelacja zmiennych $\log P$ i $c \log P$ wszystkich algorytmów obliczeniowych jest istotna (Tabela 68: $r > r_{0,05}(f-2)$; $t \geq t_{0,05}(f-2)$). Natomiast dla poziomu istotności $\alpha = 0,01$, korelacja zmiennych $\log P$ i MLOGP nie jest istotna (Tabela 68: $r \leq r_{0,01}(f-2)$; $t \leq t_{0,01}(f-2)$). Biorąc pod uwagę różnice wartości wyznaczonych eksperymentalnie i obliczonych z wykorzystaniem algorytmów (Tabela 13) oraz niską korelację, za najmniej przydatne w przewidywaniu $\log P$ i określaniu lipofilowości badanego szeregu estrów ACV uznano algorytmy: MLOGP i XLOGP2 (Tabela 68). Natomiast za najbardziej przydatne uznano algorytm AC $\log P$ (oparty na topologii całej cząsteczki) oraz analizę wartości średnich proponowanych algorytmów (Average $\log P$). Dla tych zależności obserwowano najwyższą korelację porównywanych wartości $\log P$ (Tabela 68).

Następnie obliczono wartości $\log P$ (estry acyklowiru) lub $\log k_w$ (związek XXVII i jego estry) wszystkich badanych związków korzystając z równania (13) uwzględniając wartości AC $\log P$ i Average $\log P$ (dla estrów ACV) lub AC $\log P$ (dla związku XXVII i jego estrów) oraz porównano z wartościami eksperymentalnymi wyznaczonymi metodą HPLC (Tabele 69 i 70). Różnice eksperymentalnej i obliczonej wartości $\log P$ wynoszą średnio 0,05 i 0,03, natomiast różnice eksperymentalnej i obliczonej wartości $\log k_w$ wynoszą średnio 0,06, co potwierdza możliwość wykorzystania tych algorytmów w przewidywaniu analizowanych wartości. Ma to istotne znaczenie w badaniach ilościowej zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną związków (QSAR), gdzie z powodzeniem można wykorzystać metodę obliczeniową określenia lipofilowości estrów ACV i jego analogu trójcyklicznego (algorytm AC $\log P$ z uwzględnieniem parametrów równania (13)) zamiast badań eksperymentalnych.

Tabela 69. Analiza wartości k_w wyznaczonych eksperymentalnie przy użyciu równania liniowego oraz obliczonych na podstawie równania (13) dla związku XXVII i jego estrów

Substancja	log k_w		dośw. – obl.
	dośw. log $k_w = \log k - S\varphi$	obl. log $k_w = k_1 + k_2$ (AC logP)	
XXVII	0,65	0,57	0,08
Ac-XXVII	1,21	1,04	0,17
Nic-XXVII	1,39	1,43	-0,04
Etc-XXVII	1,70	1,72	-0,02
<i>i</i> But-XXVII	1,81	1,82	-0,01
Piv-XXVII	2,26	2,31	-0,05

Tabela 70. Analiza wartości logP wyznaczonych eksperymentalnie oraz obliczonych na podstawie równania (13) dla ACV i jego estrów

Substancja	logP	logP obliczony z równania logP = $k_1 + k_2 \cdot AC \log P$		logP obliczony z równania logP = $k_1 + k_2 \cdot Average \log P$	
	dośw.	obl.	dośw. – obl.	obl.	dośw. – obl.
ACV	-1,38	-1,37	-0,01	-1,43	0,05
Ac-I	-0,90	-0,95	0,05	-0,90	0,00
Nic-I	-0,66	-0,61	-0,05	-0,52	-0,14
Etc-I	-0,45	-0,36	-0,09	-0,44	-0,01
<i>i</i> But-I	-0,22	-0,27	0,05	-0,22	0,00
Piv-I	0,19	0,17	0,02	0,10	0,09

Chcąc ocenić prawidłowość zastosowanej metody należy porównać wartości uzyskane opracowaną metodą z danymi piśmiennictwa. Dla estrów acyklowiru dostępne dane dotyczyły wartości logP wyznaczonych metodą ekstrakcyjną ($\log P_{oct}$) i obejmowały estry Ac-I (-1,24, temp. 37°C [203]) oraz Piv-I (0,30, temp. 37°C [52]). Różnica wartości logP i $\log P_{oct}$ wynosi odpowiednio 0,34 i -0,11 dla estrów Ac-I i Piv-I. Zgodnie z zaleceniami OECD (ang. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju), powtarzalność oznaczeń powinna mieścić się w zakresie $\pm 0,1$, a różnica między logP wyznaczonymi metodą HPLC i *shake flask* nie powinna być większa niż $\pm 0,5$ [198]. Zatem pomimo różnic w warunkach temperaturowych porównywanych badań, we wszystkich tych przypadkach, powyższe kryterium zostało spełnione. Można zatem uznać, że proponowane warunki chromatografowania oraz użyte wzorce są odpowiednie dla wyznaczania wartości logP estrów ACV, a opracowana metoda jest szybka, tania i precyzyjna.

W przypadku XXVII dane piśmiennictwa podają, że wartość $\log P_{oct}$ dla tego związku wynosi 0,39 ($P_{oc/w} = 2,43$; temp. 25°C; metoda ekstrakcyjna) [80]. Wyznaczona metodą chromatograficzną wartość $\log k_w$ (0,65) oraz obliczona (0,57) mieszczą się w granicy dopuszczalnej różnicy między wartościami $\log P_{oct}$ i $\log k_w$ ($\pm 0,5$) [205, 206]. Powyżej przedstawiona analiza statystyczna wskazuje ponadto, że błędem jest uwzględnianie równania kwadratowego w chromatograficznej metodzie określania lipofilowości badanego szeregu związków pomimo wykonania analizy z zastosowaniem acetonitrylu jako czynnika wymywającego i uzyskania lepszej korelacji zmiennych dla tego równania. Dodatkowo należy zwrócić uwagę, że korzystając z równania kwadratowego, ekstrapolowane wartości $\log k_w$ sugerują inną niż obserwowana kolejność wymywania poszczególnych związków a zatem i błędną interpretację szeregu lipofilowości w tej grupie strukturalnej.

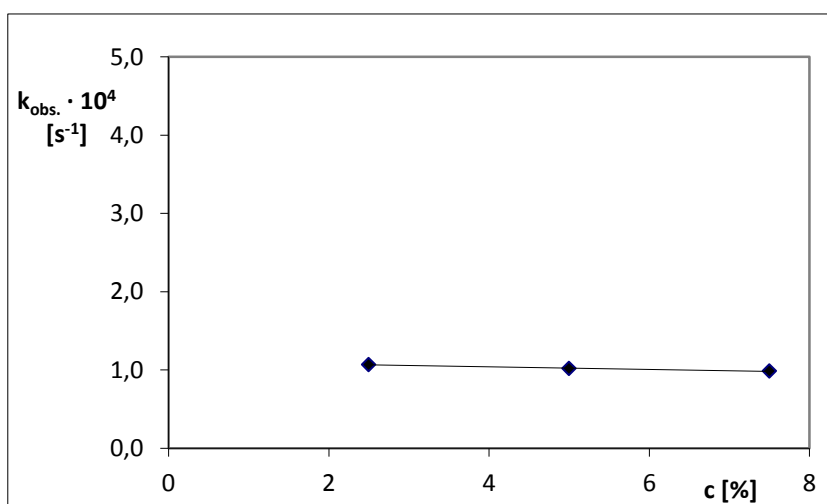
Uwzględniając wartości $\log P$ ($\log k_w$) wyznaczone metodą HPLC oraz zgodnie z algorytmem AC $\log P$ i kolejnością wymywania związków na kolumnie chromatograficznej szereg lipofilowości badanych pochodnych wygląda następująco: ACV < Ac-I < Nic-I < Etc-I < *i*But-I < Piv-I < XXVII < Ac-XXVII < Nic-XXVII < Etc-XXVII < *i*But-XXVII < Piv-XXVII.

16. Ocena trwałości badanych związków w środowisku kwasowym

Kolejny etap badań stanowiła ocena trwałości badanych związków trójcyklicznych oraz estrów acyklowiru w środowisku kwasowym, z wykorzystaniem opracowanych i zwalidowanych warunków analizy metodą HPLC. Badania kinetyczne wykonano w środowisku kwasu solnego (0,05 – 0,50 mol/l) o pH 0,42 – 1,38, w temperaturze 37°C przyjętej za odpowiednią do badań, ze względu na wartość zbliżoną do temperatury ciała ludzkiego. Wszystkie roztwory były doprowadzane do stałej wartości siły jonowej (μ) równej 0,50 mol/l poprzez dodanie odpowiedniej objętości roztworu chlorku sodu (2,0 mol/l) (Tabele 14 i 27). W ten sposób wyeliminowano ewentualny efekt solny, który może mieć wpływ na szybkość obserwowanej reakcji hydrolizy. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność związku XXVII oraz jego estrów w kwasie solnym, dla oceny trwałości tej grupy związków użyto jako rozpuszczalnika dimetylosulfotlenku, a badania wykonano w środowisku wodno-organicznym (z użyciem glikolu propylenowego). Na przykładzie estru Ac-XXVII, zbadano wpływ zmian stężenia zarówno

dimetylosulfotlenku, jak i glikolu propylenowego, na hydrolizę kwasową analizowanych związków w zakresie $5\% \pm 2,5\%$ DMSO oraz $45\% \pm 5\%$ glikolu propylenowego.

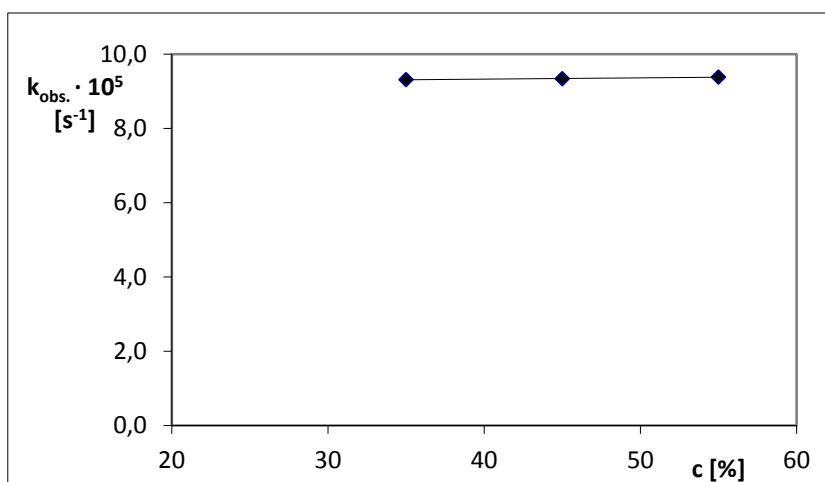
Techniką najmniejszych kwadratów wyznaczono z równania (8) wartości obserwowanych stałych szybkości rozkładu Ac-XXVII w temperaturze 37°C , w środowisku kwasu solnego o stężeniu $0,50 \text{ mol/l}$ ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$) w zakresie stężeń $2,5\% - 7,5\%$ DMSO w obecności glikolu propylenowego o stężeniu 45% (Tabela 25). Następnie sporządzono wykres liniowej zależności $k_{\text{obs.}}$ jako funkcji stężenia DMSO (Ryc. 62) oraz obliczono parametry regresji (Tabela 71). Analogicznie wyznaczono obserwowane stałe szybkości rozkładu związku w zakresie stężeń $35\% - 55\%$ glikolu propylenowego w obecności DMSO o stężeniu $5,0\%$ (Tabela 26) oraz obliczono parametry regresji obserwowanej liniowej zależności $k_{\text{obs.}}$ jako funkcji stężenia glikolu propylenowego (Ryc. 63, Tabela 71).



Rycina 62. Wykres zależności obserwowanej stałej szybkości rozkładu estru Ac-XXVII jako funkcja stężenia DMSO.

Tabela 71. Analiza statystyczna wpływu stężenia DMSO i glikolu propylenowego na szybkość rozkładu estru Ac-XXVII

Wpływ DMSO			Wpływ glikolu propylenowego		
c [%]	$k_{\text{obs.}} \pm \Delta k_{\text{obs.}} [\text{s}^{-1}]$	Parametry regresji	c [%]	$k_{\text{obs.}} \pm \Delta k_{\text{obs.}} [\text{s}^{-1}]$	Parametry regresji
2,50	$(1,07 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	$a = (1,68 \pm 2,35) \cdot 10^{-6}$ $b = (1,11 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$ $t_a = -9,093$ $t_{0,05}(1) = 12,706$ $-r = 0,9940$	35	$(9,31 \pm 0,47) \cdot 10^{-5}$	$a = (3,50 \pm 3,67) \cdot 10^{-8}$ $b = (9,19 \pm 0,17) \cdot 10^{-5}$ $t_a = 12,124$ $t_{0,05}(1) = 12,706$ $-r = 0,9966$
5,00	$(1,02 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$		45	$(9,34 \pm 0,52) \cdot 10^{-5}$	
7,50	$(9,86 \pm 0,68) \cdot 10^{-5}$		55	$(9,38 \pm 0,57) \cdot 10^{-5}$	



Rycina 63. Wykres zależności obserwowanej stałej szybkości rozkładu estru Ac-XXVII jako funkcja stężenia glikolu propylenowego.

Dla obu analizowanych zależności $k_{obs.} = f(c)$ oceniono istotność współczynnika a regresji na podstawie testu t-Studenta. Na tej podstawie uznano, że stężenie dimetylosulfotlenku oraz glikolu propylenowego nie mają wpływu na szybkość rozkładu związku w przyjętym zakresie. Zatem dalsze badania trwałości trójcyklicznego analogu ACV i jego estrów wykonano w środowisku wodno-organicznym zawierającym 5% DMSO oraz 45% glikolu propylenowego, co zapewniło ich rozpuszczalność. Zastosowane rozpuszczalniki nie biorą udziału w reakcji hydrolizy badanych związków.

Znając wartości pK_a związku XXVII oraz acyklowiru (XXVII: $pK_{a_1} = 1,75$; $pK_{a_2} = 8,20$; ACV: $pK_{a_1} = 2,27$; $pK_{a_2} = 9,25$ [82, 207]) uznano, że w badanym zakresie pH zarówno estry związku XXVII, jak i estry acyklowiru występują w formie monoprotowanej (BH^+) i obojętnej (B). W badanych warunkach forma obojętna stanowi w przypadku estrów trójcyklicznych od 0,000002% (pH 0,42) do 29,9% (pH 1,38), natomiast dla estrów ACV od 1,4 % (pH 0,42) do 11,4% (pH 1,38). Forma BH^+ związków trójcyklicznych powstaje w wyniku protonowania atomu azotu w pozycji N1 (Ryc. 8) [208]. Natomiast forma BH^+ estrów acyklowiru powstaje w wyniku protonowania grupy aminowej w pozycji C2 (Ryc. 1). Wyznaczono obserwowane stałe szybkości reakcji hydrolizy, w roztworach o odpowiednich wartościach pH, z liniowej zależności opisanej równaniem (8):

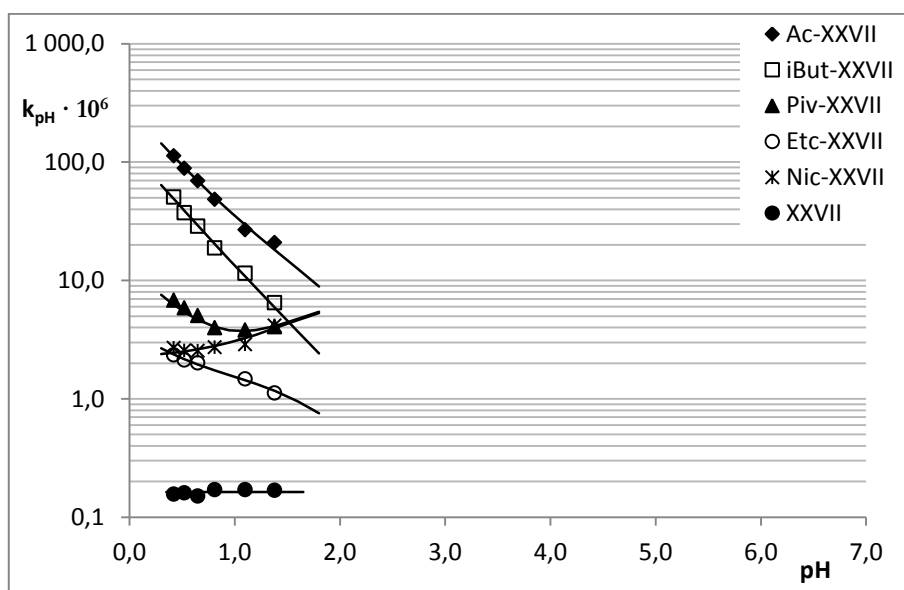
$$\ln P_t = \ln P_0 - k_{obs.} \cdot t$$

i dowiedziono, że obserwowana reakcja hydrolizy jest reakcją pseudopierwszego rzędu (Ryc. 19 – 24 i 27 – 31).

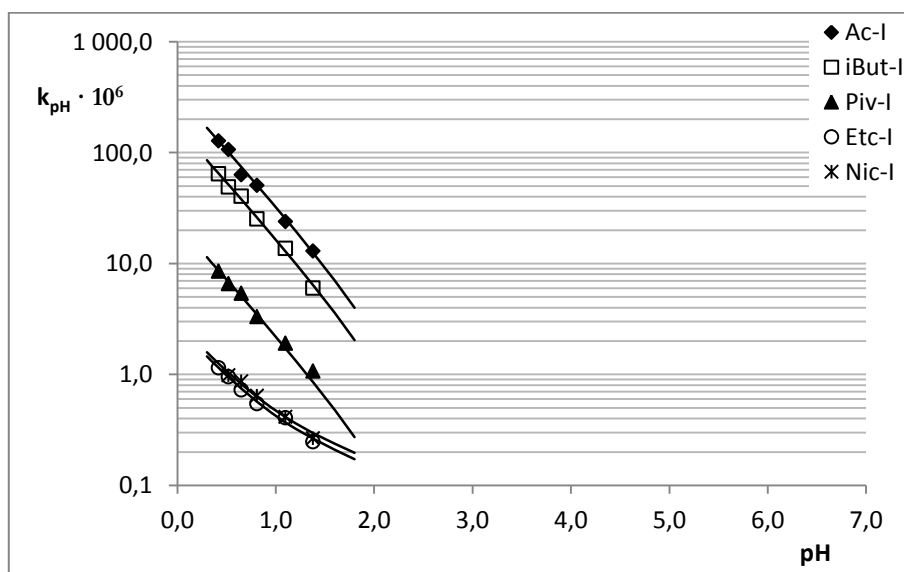
Półlogarytmiczne zależności $k_{pH} = f(pH)$ (Ryc. 64) pozwalają stwierdzić, że na hydrolizę badanych estrów w temperaturze 37°C, w środowisku kwasu solnego o pH 0,42 – 1,38 składa się:

- hydroliza form protonowanych pod wpływem jonów wodorowych
- hydroliza spontaniczna form protonowanych pod wpływem wody i/lub
- hydroliza spontaniczna form obojętnych pod wpływem wody.

a)

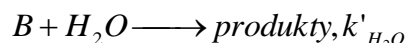
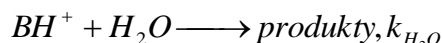
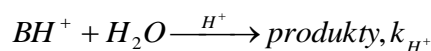


b)



Ryc. 64. Półlogarytmiczna zależność $k_{pH} = f(pH)$ reakcji hydrolizy badanych związków: a) związku XXVII i jego estrów; b) estrów ACV, w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$) w temperaturze 37°C.

Ogólny schemat obserwowanych reakcji można przedstawić następująco:



Dla poszczególnych związków zaproponowano następujące równania opisujące zależność $k_{pH} = f(pH)$ w badanym zakresie pH:

- estry Ac-I, *i*But-I, Piv-I: $k_{pH} = k_{H^+} \cdot a_{H^+} \cdot f_1$ (14)

- estry Ac-XXVII, *i*But-XXVII, Etc-XXVII, Etc-I, Nic-I:

$$k_{pH} = k_{H^+} \cdot a_{H^+} \cdot f_1 + k_{H_2O} \cdot f_1$$
 (15)

- ester Piv-XXVII: $k_{pH} = k_{H^+} \cdot a_{H^+} \cdot f_1 + k_{H_2O} \cdot f_1 + k'_{H_2O} \cdot f_2$ (16)

- ester Nic-XXVII: $k_{pH} = k_{H_2O} \cdot f_1 + k'_{H_2O} \cdot f_2$ (17)

- XXVII: $k_{pH} = k_{H_2O}$ (18)

gdzie:

k_{H^+} – katalityczna stała szybkości opisująca efekt katalityczny jonów wodorowych

a_{H^+} – aktywność jonów wodorowych na podstawie [199]

f_1 – ułamek formy jonowej BH^+

$$f_1 = \frac{(a_{H^+})^2}{(a_{H^+})^2 + K_{a1} \cdot a_{H^+} + K_{a1} \cdot K_{a2}}$$
 (20)

f_2 – ułamek formy jonowej B

$$f_2 = \frac{K_{a1} \cdot a_{H^+}}{(a_{H^+})^2 + K_{a1} \cdot a_{H^+} + K_{a1} \cdot K_{a2}}$$
 (21)

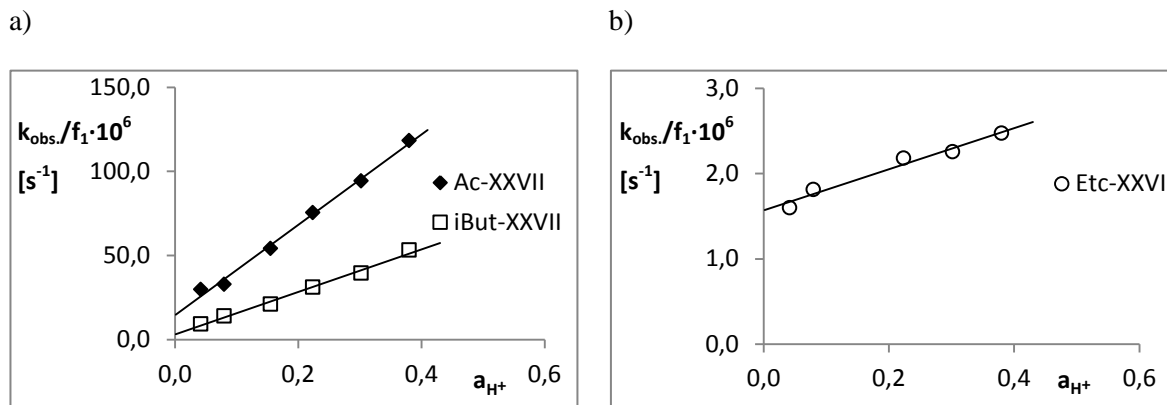
k_{H_2O} – katalityczna stała szybkości opisująca spontaniczną hydrolizę pod wpływem wody formy BH^+

k'_{H_2O} – katalityczna stała szybkości opisująca spontaniczną hydrolizę pod wpływem wody formy obojętnej związku (B).

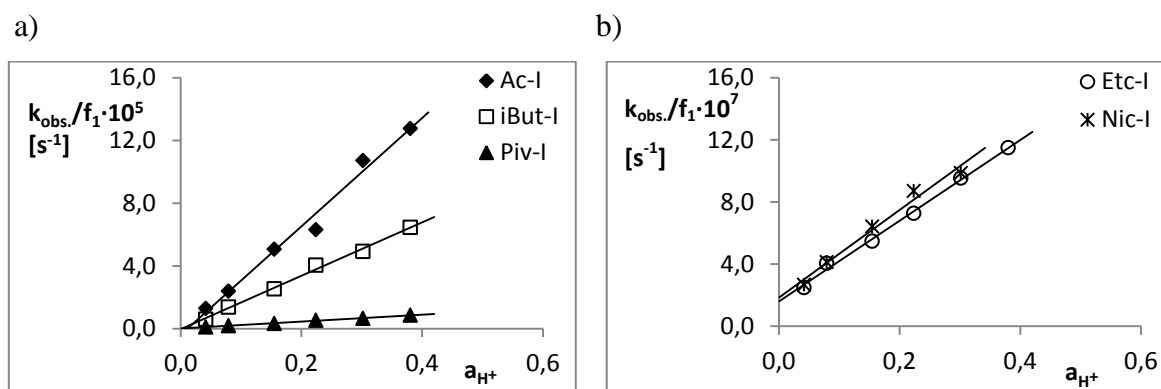
Wyznaczone wartości obserwowanych stałych szybkości $k_{obs.}$ (Tabele 28 i 38) odpowiadające wartościom k_{pH} (właściwa kataliza kwasowo-zasadowa) posłużyły do wyznaczenia katalitycznych stałych szybkości opisujących efekt katalityczny jonów wodorowych (k_{H^+}) oraz spontaniczną hydrolizę pod wpływem wody (k_{H_2O} i k'_{H_2O}) na hydrolizę badanych estrów (forma BH^+ i B) (Tabela 72, Ryc. 65 i 66). Poszczególne katalityczne stałe szybkości k_{H^+} i k_{H_2O} wyznaczono korzystając z następującego równania prostej:

$$k_{pH}/f_1 = k_{H^+} \cdot a_{H^+} + k_{H_2O}$$
 (22)

Wykresy zależności $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$ są prostoliniowe, a ich nachylenie odpowiada wartości k_{H^+} (Ryc. 65 i 66).



Ryc. 65. Wykresy zależności $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$ reakcji hydrolizy badanych estrów: a) estry Ac-XXVII, iBut-XXVII; b) ester Etc-XXVII, w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

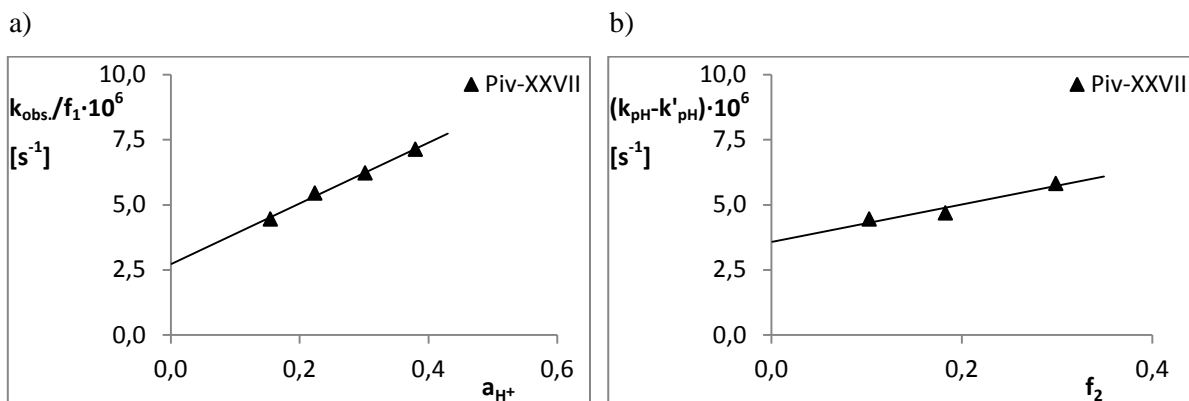


Ryc. 66. Wykresy zależności $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$ reakcji hydrolizy badanych estrów: a) estry Ac-I, iBut-I, Piv-I; b) estry Etc-I i Nic-I, w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

Katalityczną stałą k_{H^+} dla związku Piv-XXVII wyznaczono z równania (22) (Ryc. 67a). Następnie obliczono wartości teoretyczne k'_{pH} , które posłużyły do wyznaczenia wartości k_{H_2O} i k'_{H_2O} z następującego przekształcenia równania (16):

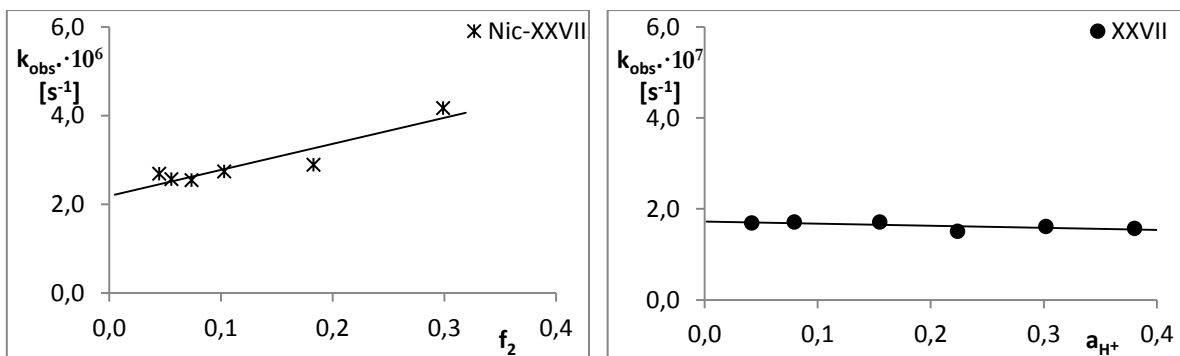
$$k_{pH} - k'_{pH} = k_{pH} - (k_{H^+} \cdot a_{H^+} \cdot f_1) = k_{H_2O} \cdot f_1 + k'_{H_2O} \cdot f_2 \quad (23)$$

Sporządzono wykres zależności $k_{pH} - k'_{pH} = f(f_2)$ (Ryc. 67b), dla którego wartość rzędnej dla $f_2 = 0$ odpowiada katalitycznej stałej szybkości k_{H_2O} , a dla $f_2 = 1$ odpowiada katalitycznej stałej szybkości k'_{H_2O} (Tabela 72).



Ryc. 67. Wykresy zależności: a) $k_{\text{obs.}}/f_1 = f(a_{\text{H}^+})$; b) $k_{\text{pH}} - k'_{\text{pH}} = f(f_2)$, reakcji hydrolizy estru Piv-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

Podobnie, katalityczne stałe szybkości $k_{\text{H}_2\text{O}}$ i $k'_{\text{H}_2\text{O}}$ opisujące spontaniczną hydrolizę pod wpływem wody poszczególnych form jonowych estru Nic-XXVII wyznaczono z równania (17) na podstawie analizy parametrów regresji liniowej zależności $k_{\text{pH}} = f(f_2)$ (Ryc. 68, Tabela 72). Natomiast katalityczną stałą $k_{\text{H}_2\text{O}}$ opisującą spontaniczną hydrolizę pod wpływem wody formy BH^+ związku XXVII wyznaczono z równania (18) (Ryc. 69, Tabela 72) jako wartość średnią $k_{\text{obs.}}$.



Ryc. 68. Wykres zależności $k_{\text{pH}} = f(f_2)$ reakcji hydrolizy estru Nic-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

Ryc. 69. Wykres zależności $k_{\text{obs.}} = f(a_{\text{H}^+})$ reakcji hydrolizy związku XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

Tabela 72. Katalityczne stałe szybkości reakcji hydrolizy kwasowej dla związku XXVII i jego estrów oraz estrów ACV w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C)

Związek	k_{H^+} [$\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	$k_{\text{H}_2\text{O}}$ [s^{-1}]	$k'_{\text{H}_2\text{O}}$ [s^{-1}]
Ac-XXVII	$(2,68 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$	$(1,46 \pm 0,65) \cdot 10^{-5}$	
<i>i</i> But-XXVII	$(1,26 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}$	$(3,14 \pm 3,81) \cdot 10^{-6}$	
Piv-XXVII	$(1,16 \pm 0,27) \cdot 10^{-5}$	$1,72 \cdot 10^{-6}$	$8,60 \cdot 10^{-6}$
Etc-XXVII	$(2,41 \pm 0,76) \cdot 10^{-6}$	$(1,57 \pm 0,18) \cdot 10^{-6}$	
Nic-XXVII		$8,06 \cdot 10^{-6}$	$2,19 \cdot 10^{-6}$
XXVII		$(1,63 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$	
Ac-I	$(3,38 \pm 0,51) \cdot 10^{-4}$		
<i>i</i> But-I	$(1,72 \pm 0,14) \cdot 10^{-4}$		
Piv-I	$(2,30 \pm 0,18) \cdot 10^{-5}$		
Etc-I	$(2,55 \pm 0,25) \cdot 10^{-6}$	$(1,90 \pm 0,57) \cdot 10^{-7}$	
Nic-I	$(2,76 \pm 0,63) \cdot 10^{-6}$	$(2,19 \pm 1,18) \cdot 10^{-7}$	

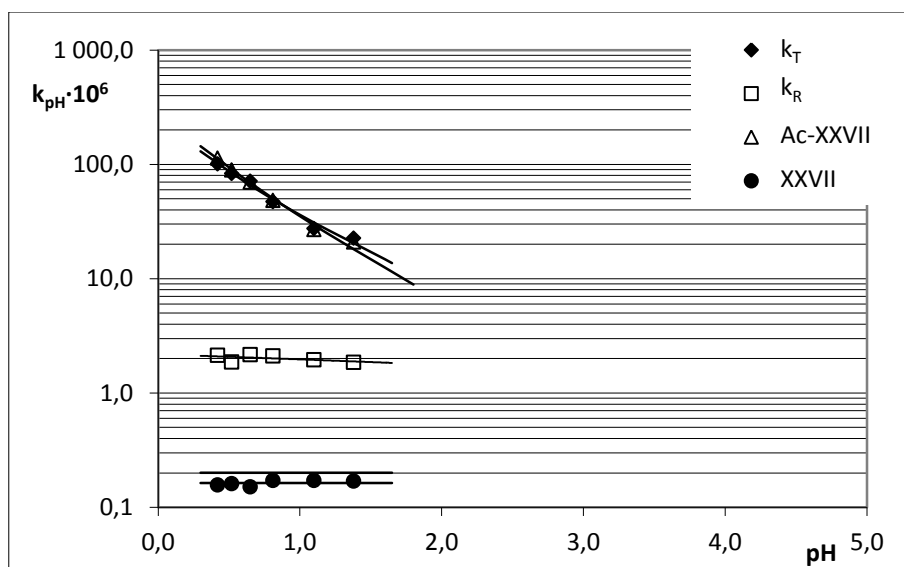
W badanym zakresie pH, wpływ jonów wodorowych na hydrolizę estrów Ac-I, *i*But-I oraz Piv-I był na tyle znaczący, że efekt katalityczny wody okazał się statystycznie nieistotny, co wykazano testem t-Studenta dla współczynników b analizowanych zależności $k_{\text{obs.}}/f_1 = f(a_{\text{H}^+})$ (Tabela 72). Na podstawie równań (14 – 18) obliczono wartości teoretyczne k_{pH} i sporządzono wykresy zależności $k_{\text{pH}} = f(\text{pH})$, na których punktowo zaznaczono wartości $k_{\text{pH}} = k_{\text{obs.}}$ oraz linią ciągłą wartości teoretyczne k_{pH} (Ryc. 64). Zgodność wyznaczonych eksperymentalnie wartości k_{pH} z wartościami obliczonymi dowodzi poprawności zaproponowanego mechanizmu reakcji hydrolizy poszczególnych estrów w badanych warunkach (37°C , pH 0,42 – 1,38, $\mu = 0,50$ mol/l) (Ryc. 64).

Podczas badań hydrolizy estrów trójcyklicznych, obserwowano w przypadku wszystkich związków pojawianie się i zmiany wielkości piku o czasie retencji zgodnym z t_{r} związku XXVII. Ponieważ separacja związków była zadowalająca, postanowiono wykonać analizę ilościową tworzenia i rozkładu tego związku. Badania wykonano dla estrów Ac-XXVII i *i*But-XXVII w środowisku wodno-organicznym kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) (Tabela 29, Ryc. 25). Na wykresach półlogarymicznych zależności $P_t = f(t)$ jednocześnie z ubytkiem substratu obserwowano przyrost (tworzenie), a następnie, w skutek reakcji następczej, rozkład związku XXVII. Korzystając z równań (9) i (10) obliczono obserwowane stałe szybkości reakcji tworzenia (k_{T}) i rozkładu (k_{R}) XXVII (Tabela 29). Wyznaczone stałe szybkości rozkładu związku XXVII powstałego w wyniku hydrolizy Ac-XXVII i *i*But-XXVII w określonym środowisku, porównano statystycznie testem równoległości.

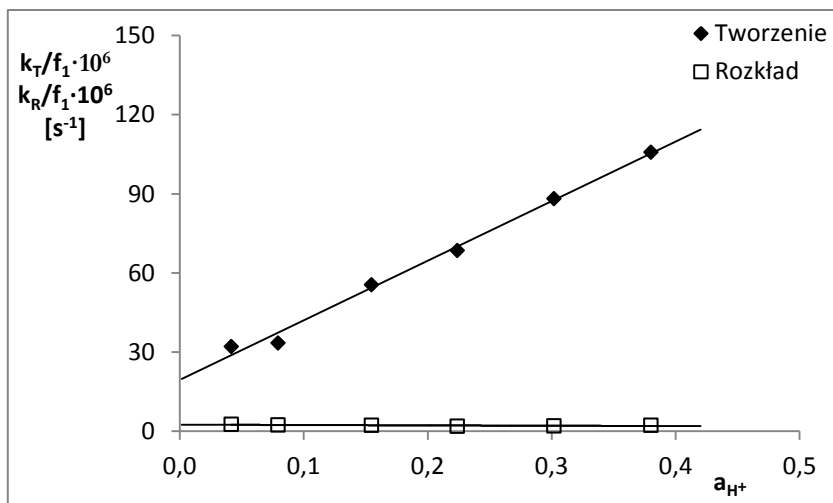
Analiza porównawcza dla wszystkich analizowanych par prostych potwierdziła hipotezę o braku istotnej statystycznie różnicy ($t_{0,05}(n_1+n_2-4) > t$) w wartościach stałych szybkości rozkładu związku XXVII powstałego w wyniku hydrolizy estru Ac-XXVII i *i*But-XXVII (Tabela 29). W związku z powyższym analizie poddano profile zależności $k_{pH} = k_T = k_R = f(pH)$ (Ryc. 70) i uznano, że w badanym zakresie pH szybkość tworzenia związku XXVII podczas hydrolizy estru Ac-XXVII jest uwarunkowana katalitycznym wpływem jonów wodorowych oraz wody. Natomiast na rozkład związku XXVII nie wywierają wpływu jony wodorowe. Zatem równania opisujące zależność $k_{pH} = f(pH)$ w badanym zakresie pH przyjmują następujący zapis:

$$k_{pH} = k_T = k_{H^+} \cdot a_{H^+} \cdot f_1 + k_{H_2O} \cdot f_1 \text{ (tworzenie związku XXVII)} \quad (24)$$

$$k_{pH} = k_R = k_{H_2O} \text{ (rozkład związku XXVII)} \quad (25)$$



Ryc. 70. Półlogarytmiczna zależność $k_{pH} = f(pH)$ reakcji rozkładu Ac-XXVII (Δ), tworzenia (\blacklozenge) i rozkładu (\square) związku XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII oraz reakcji bezpośredniej jego degradacji (\bullet) w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$) w temperaturze 37°C .



Ryc. 71. Wykres zależności $k_T/f_1 = f(a_{H^+})$ i $k_R/f_1 = f(a_{H^+})$ reakcji tworzenia i rozkładu XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).

Tabela 73. Parametry opisujące zależność $k_{obs}/f_1 = f(a_{H^+})$ oraz katalityczne stałe szybkości reakcji tworzenia i rozkładu związku XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C)

Reakcja	k_T [s ⁻¹]	a_{H^+}	k_{H^+} [mol ⁻¹ ·l·s ⁻¹] k_{H_2O} [s ⁻¹]
Tworzenie	$2,25 \cdot 10^{-5}$	$4,17 \cdot 10^{-2}$	k_{H^+} $(2,26 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$
	$2,74 \cdot 10^{-5}$	$7,94 \cdot 10^{-2}$	
	$4,98 \cdot 10^{-5}$	0,155	k_{H_2O} $(1,94 \pm 0,60) \cdot 10^{-5}$
	$6,35 \cdot 10^{-5}$	0,224	
	$8,33 \cdot 10^{-4}$	0,302	
	$1,01 \cdot 10^{-4}$	0,380	
Reakcja	k_R [s ⁻¹]	a_{H^+}	k_{H^+} [mol ⁻¹ ·l·s ⁻¹] k_{H_2O} [s ⁻¹]
Rozkład	$1,85 \cdot 10^{-6}$	$4,17 \cdot 10^{-2}$	k_{H_2O} $(1,93 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}$
	$1,95 \cdot 10^{-6}$	$7,94 \cdot 10^{-2}$	
	$2,01 \cdot 10^{-6}$	0,155	
	$1,77 \cdot 10^{-6}$	0,224	
	$1,87 \cdot 10^{-6}$	0,302	
	$2,13 \cdot 10^{-6}$	0,380	

Na podstawie powyższych równań wyznaczono wartości k_{H^+} i k_{H_2O} (Ryc. 71, Tabela 73), obliczono wartości teoretyczne k_{pH} i sporządzono wykresy zależności $k_{pH} = f(pH)$, na których punktowo zaznaczono wartości k_{pH} oraz linią ciągłą wartości teoretyczne k_{pH} (Ryc. 70). Zgodność wyznaczonych eksperymentalnie wartości k_{pH} z wartościami obliczonymi dowodzi poprawności zaproponowanego mechanizmu reakcji tworzenia i rozkładu związku XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII w badanych warunkach (37°C, pH 0,42 – 1,38, $\mu = 0,50$ mol/l) (Ryc. 70).

Uzyskując podczas badań kinetycznych rozkładu estrów ACV zadowalającą separację badanych związków i acyklowiru postanowiono, w przypadku obserwacji całkowitego rozkładu estru, wykonać analizę ilościową tworzenia produktu hydrolizy o czasie retencji zgodnym z czasem retencji ACV. Powyższy warunek został spełniony dla estrów acetylowego, izobutyrylowego i piwaloilowego w środowisku kwasu solnego 0,4 mol/l (Ac-I, Piv-I) oraz 0,1 mol/l (*i*But-I). Na wykresach półlogarytmicznych zależności $P_t = f(t)$ jednocześnie z ubytkiem substratu obserwowano przyrost sygnału ACV aż do osiągnięcia wartości P_∞ (Ryc. 32). Ponadto w analizowanym przedziale czasowym nie obserwowano reakcji następczej rozkładu ACV (Ryc. 32). Wyznaczono techniką odejmowania wartości obserwowanych stałych szybkości tworzenia ACV, a następnie porównano statystycznie, testem równoległości, z wartościami obserwowanych stałych szybkości hydrolizy odpowiedniego estru wyznaczonymi w tych samych warunkach reakcji (Tabela 39). Przeprowadzona analiza porównawcza potwierdziła hipotezę o braku istotnej statystycznie różnicy ($t_{0,05}(n_1+n_2-4) > t$) w wartościach stałych szybkości tworzenia ACV i hydrolizy estrów badanych stanowiących współczynniki kierunkowe prostych ze znakiem ujemnym ($-a$) (Tabela 39). W związku z powyższym produkt hydrolizy, identyfikowany jako ACV, pozostaje w równowadze hydrolitycznej z badanym estrem, a jednocześnie jest w tych warunkach znacznie od niego trwalszy.

17. Test stresowy, przyspieszony i pośredni oceny trwałości związku XXVII

Badania trwałości związku XXVII testem stresowym pozwoliły na sklasyfikowanie go jako substancji nietrwałej we wszystkich analizowanych warunkach. W środowisku obojętnym w temperaturze 90°C obserwowano rozkład związku i tworzenie produktów degradacji już po 36 h inkubacji. Rozkład ten był nieznaczny (3,6%), wystarczający jednak by sklasyfikować substancję (zgodnie z zaleceniami ICH) jako nietrwałą w tym środowisku (Tabela 41). Ubytek substancji badanej zwiększał się wraz z czasem ogrzewania roztworu (26,7% po 72 h). Na chromatogramach obserwowano cztery produkty rozkładu, spośród których za główny produkt degradacji uznano substancję P_2 o czasie retencji 1,79 min (Ryc. 33, Tabela 41).

W środowisku kwasowym (HCl 0,1 mol/l, 90°C, 24 h) stopień degradacji badanego związku wyniósł 20,1%, co pozwoliło sklasyfikować go również jako nietrwałą w tych

warunkach (Tabela 41). Dalsze ogrzewanie wykazało, że po 7 dniach inkubacji związek uległ całkowitemu rozkładowi. Na chromatogramie po 24 h inkubacji obserwowano pięć produktów rozkładu, a jako główny uznano produkt P₉ o czasie retencji 3,81 min (Ryc. 33). Trzy spośród produktów rozkładu (P₂, P₅, P₈) były zgodne (t_r) z obserwowanymi w środowisku obojętnym. Jednak w wyniku dalszego ogrzewania liczba produktów rozkładu zmniejsza się do czterech, w tym jednego obserwowanego również dla rozkładu w warunkach obojętnych (P₂), a głównym produktem degradacji stał się P₇ o czasie retencji 2,75 (Ryc. 33, Tabela 41).

W przypadku rozkładu hydrolytycznego w środowisku NaOH (0,1 mol/l, 90°C) związek XXVII również został sklasyfikowany jako nietrwały, ze względu na jego 10,1% ubytek w czasie 24 h inkubacji (Tabela 41). Po takim czasie ogrzewania na chromatogramie obserwowano dwa produkty rozkładu (P₂ i P₅), oba obserwowane również w środowisku obojętnym i kwasowym. Jako główny produkt rozkładu uznano P₂ o czasie retencji 1,79 min (Ryc. 33, Tabela 41). Ogrzewanie przez 7 dni wykazało rozkład związku na poziomie 82,9% oraz pojawienie się nowego produktu degradacji, P₃ o czasie retencji 1,87 min, który został uznany za główny (Tabela 41).

W ramach badań stresowych dokonano również oceny stopnia degradacji badanego związku w obecności czynnika utleniającego – nadtlenu wodoru. W środowisku 3% H₂O₂ w temperaturze pokojowej, po 6 h inkubacji związek XXVII uległ rozkładowi w 20,2%, co pozwoliło na zaklasyfikowanie go jako nietrwałego w obecności środków utleniających (Tabela 41). W tym czasie na chromatogramie obserwowano tylko jeden produkt degradacji P₆ o czasie retencji 2,83 min, odmiennym od czasów retencji produktów degradacji powstających w pozostałych warunkach testu stresowego (Ryc. 33, Tabela 41).

Kolejny etap badań stanowiła ocena wpływu światła na trwałość związku XXVII. Badanie wykonano w dwóch wariantach: naświetlając wodne roztwory badanej substancji oraz naświetlając tabletki z KBr zawierające 1 mg substancji badanej (badania w fazie stałej). Próby naświetlano promieniowaniem elektromagnetycznym w zakresie widma 300 – 800 nm (UV-Vis) o natężeniu 250 W/m² dawką 1,2·10⁶ oraz 6,0·10⁶ lux·h umieszczając w aparacie Suntest CPS+ wyposażonym w klimatyzator chłodzący komorę (35°C). Równocześnie naświetlano próby badane oraz próby zabezpieczone przed dostępem światła folią aluminiową. Analiza metodą HPLC wykazała, że badana substancja, zarówno w roztworze, jak i w fazie stałej jest wrażliwa na działanie światła i należy ją sklasyfikować jako fotolabilną (Tabela 42). W roztworze po naświetleniu dawką 1,2·10⁶

lux·h (najniższa dawka zalecana przez ICH w badaniach stresowych), obserwowano rozkład substancji na poziomie 86,5%. Dalsze naświetlanie roztworu doprowadziło do rozkładu na poziomie 95% po dawce $6,0 \cdot 10^6$ lux·h (Tabela 42). Jednocześnie rozkładowi uległa także substancja w roztworze zabezpieczonym przed dostępem światła. Stopień rozkładu dla prób chronionych był mniejszy niż dla naświetlanych i wynosił 52,2% i 71,8% odpowiednio dla dawki $1,2 \cdot 10^6$ lux·h i $6,0 \cdot 10^6$ lux·h (Tabela 42). Po ekspozycji roztworów na światło na chromatogramach obserwowano wiele sygnałów produktów rozkładu (Ryc. 34). Ich liczba rosła wraz z dawką promieniowania. Produkty rozkładu obserwowano również na chromatogramach prób chronionych przed światłem. W tych warunkach było ich jednak mniej. Jako główny produkt rozkładu, zarówno w próbach naświetlanych, jak i chronionych, uznano PPh₃ o czasie retencji około 1,9 min. Wyjątek stanowiła próba chroniona przed dawką $1,2 \cdot 10^6$ lux·h, gdzie głównym produktem rozkładu był PPh₁ o czasie retencji 1,52 min (Ryc. 34).

Analiza wrażliwości na fotodegradację substancji w fazie stałej wykazała, że związek ten jest fotolabilny, lecz obserwowany rozkład był na zdecydowanie niższym poziomie niż w przypadku analizy tego procesu w roztworach. Analiza IR wykazała brak pojawienia się dodatkowych pasm po naświetleniu, zarówno w próbach poddanych ekspozycji, jak i chronionych (Ryc. 35). Pomimo tego, na podstawie obserwowanych zmian zabarwienia naświetlanych tabletek oraz analizy ilościowej zawartości związku XXVII w metanолоwych ekstraktach tabletek, związek uznano za fotolabilny. Po naświetleniu tabletek dawką $6,0 \cdot 10^6$ lux·h obserwowano 7,8% ubytek związku (Tabela 42). Natomiast próby substancji w fazie stałej zabezpieczone przed działaniem światła okazały się trwałe w powyższych warunkach.

Wykonano również analizę HPLC-MS/MS roztworów związku XXVII poddanych testom stresowym w celu identyfikacji acyklowiru jako potencjalnego produktu rozkładu jego trójcyklicznego analogu – XXVII. Próbkę analizowano w wysoce selektywnym trybie monitorowania reakcji wielokrotnych. Na podstawie analizy roztworów wzorcowych związku XXVII oraz ACV określono najbardziej charakterystyczne i intensywne sygnały jonów potomnych obu substancji. Następnie oceniono występowanie tych sygnałów w próbkach poddanych rozkładowi w zakresie testów stresowych. Uzyskane wyniki wykazały, że we wszystkich analizowanych warunkach podczas rozkładu związku XXVII tworzył się acyklowir (Ryc. 36). Jego ilość była różna, w zależności od zastosowanego czynnika degradującego. W próbkach pobranych w czasie $t=0$, przechowywanych w

temperaturze 4°C przez 24 h, ACV obecny był jedynie w bardzo małej ilości. W roztworach poddanych działaniu światła ilość ACV zwiększała się wraz z przyjętą dawką promieniowania (30-krotnie po dawce $1,2 \cdot 10^6$ lux·h i 40-krotnie po dawce $6,0 \cdot 10^6$ lux·h). Jednocześnie zmniejszał się poziom związku XXVII. Analogiczna sytuacja miała miejsce dla próbek chronionych przed działaniem światła – zmiany w poziomie ACV i związku XXVII były tam jednak mniejsze (3-krotny wzrost poziomu ACV po dawce $1,2 \cdot 10^6$ lux·h i 10-krotny po dawce $6,0 \cdot 10^6$ lux·h). Około 2-krotny wzrost poziomu ACV obserwowany był także w próbkach poddanych hydrolizie w środowisku kwasowym, zasadowym oraz obojętnym (HCl 0,1 mol/l, 90°C, 24 h; NaOH 0,1 mol/l, 90°C, 72 h; H₂O, 90°C, 72 h). Duży poziom ACV (2-krotny wzrost poziomu w odniesieniu do próby pobranej w czasie t=0) został zaobserwowany także w próbkach poddanych działaniu czynnika utleniającego.

Uzyskane wyniki dowodzą, że jednym z produktów rozkładu związku XXVII w warunkach testu stresowego jest acyklowir. Rozkład tego typu zachodzi niezależnie od środowiska reakcji, jednak ilość powstającego acyklowiru jest uzależniona od warunków, w jakich reakcja zachodzi.

Ostatni etap badań stanowiła analiza wpływu temperatury i wilgotności względnej powietrza w warunkach przechowywania, na trwałość badanego związku. Substancję w fazie stałej (bez opakowania) przechowywano w temp. 100°C oraz zgodnie z testem przyspieszonym i pośrednim odpowiednio w 40°C/75% wilgotności względnej oraz 30°C/65% wilgotności względnej. Po 1 miesiącu przechowywania próbek w temperaturze 100°C, nie zaobserwowano rozkładu związku (Tabela 43). W przypadku testu przyspieszonego w ciągu 6 miesięcy, również nie zaobserwowano rozkładu związku ani tworzenia się produktów degradacji. Takie same obserwacje poczyniono dla testu pośredniego w ciągu 12 miesięcy (Tabela 43). Jednak w trakcie przechowywania próbek w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza obserwowano zmianę zabarwienia próbek z prawie białej odpowiednio na jasnożółtą w przypadku testu przyspieszonego lub pomarańczową dla testu pośredniego. Wspomniane zmiany zabarwienia, obserwowane również w wykonanych tabletkach, mogą być związane z zachodzącym w analizowanych warunkach powstawaniem defektów w sieci krystalicznej substancji, zanikiem solwatów bądź hydratów lub tworzeniem się niestabilnych dimerów.

Powyższe badania pozwalają stwierdzić, że zarówno temperatura, jak i wilgotność względna nie mają istotnego wpływu na trwałość badanej substancji w fazie stałej. W związku z tym związek XXVII nie wymaga specjalnych opakowań i warunków przechowywania, które chroniłyby go np. przed wilgocią. Związek ten, a szczególnie jego roztwory, powinny jednak być przechowywane w warunkach chroniących przed dostępem światła.

18. Ocena trwałości estrów w osoczu ludzkim i w obecności esterazy z wątroby wieprzowej

Wyznaczono wartości $k_{obs.}$ reakcji hydrolizy badanych związków w osoczu ludzkim (80%, 37°C) z liniowej zależności $P_t = f(t)$ (8):

$$\ln P_t = \ln P_0 - k_{obs.} \cdot t$$

dowodząc, że reakcja zachodzi zgodnie w kinetykę reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu (Ryc. 43 – 55).

Badania podatności związków na hydrolizę w osoczu wykazały, że pochodne trójcykliczne charakteryzują się dużą trwałością w powyższych warunkach. Najszybciej rozkładowi ulegał ester *i*But-XXVII, dla którego $t_{0,5}$ wynosi 11,52 h (Ryc. 43, Tabela 63). Testem równoległości wykazano, że różnica trwałości estrów Ac-XXVII i Etc-XXVII w osoczu jest statystycznie nieistotna. Podatność na hydrolizę w osoczu związków trójcyklicznych można zatem uszeregować następująco:



Wartości $k_{obs.}$ dla tej grupy związków mieszczą się w zakresie $2,81 \cdot 10^{-6} - 1,67 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, natomiast wartości $t_{0,5}$ w zakresie 11,52 – 68,40 h (Tabela 63).

Trwałość w osoczu estrów acyklowiru jest zdecydowanie mniejsza niż estrów związku XXVII. Wartości $k_{obs.}$ dla tej grupy związków mieszczą się w zakresie $2,38 \cdot 10^{-5} - 4,31 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, natomiast wartości $t_{0,5}$ w zakresie 0,45 – 8,09 h (Tabela 63). Wartości $k_{obs.}$ estrów ACV są 3,5 – 37-krotnie większe w porównaniu z wartościami $k_{obs.}$ analogicznych estrów związku XXVII. Dowiedziono testem równoległości, że obserwowana różnica podatności estrów *i*But-I i Nic-I na hydrolizę pod wpływem enzymów osoczowych jest statystycznie nieistotna. Podatność na rozkład w osoczu estrów ACV można zatem uszeregować następująco:



Dla prawidłowej interpretacji rozkładu badanych związków pod wpływem esterazy konieczne jest poznanie specyfiki reakcji enzymatycznych. Schemat reakcji enzymatycznej przedstawiono na rycinie 72.



Ryc. 72. Schemat reakcji enzymatycznej (ES – kompleks substratu z enzymem; k_1 , k_{-1} , k_2 – stałe szybkości reakcji cząstkowych).

Zachodzącą podczas hydrolizy enzymatycznej biotransformację można traktować jako proces o ograniczonej pojemności i opisać za pomocą równania Michaelisa-Menten:

$$-\frac{dc}{dt} = \frac{V_m \cdot c}{K_M + c} \quad (26)$$

gdzie:

c – stężenie substancji

$-\frac{dc}{dt}$ – szybkość zmian stężenia substancji

V_m – maksymalna teoretyczna szybkość procesu

K_M – stała Michaelisa (liczbowo równa stężeniu substancji, przy którym jej eliminacja zachodzi z szybkością równą połowie V_m).

W przypadku, gdy wartość stałej Michaelisa jest znacznie większa od stężenia substancji ($K_M \gg c$), równanie (26) można uprościć do postaci:

$$-\frac{dc}{dt} = \frac{k_2}{K_M} \cdot c_E \cdot c = \frac{V_m}{K_M} \cdot c = k_{obs.} \cdot c \quad (27)$$

gdzie:

c_E – stężenie enzymu.

Po przekształceniu:

$$k_{obs.} = \frac{k_2}{K_M} \cdot c_E = \frac{V_m}{K_M} \quad (28)$$

Powyższa sytuacja ma miejsce dla procesów zachodzących zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Szybkość zmian stężenia substancji jest wprost proporcjonalna do teoretycznej maksymalnej szybkości procesu i stężenia substancji. Natomiast w sytuacji odwrotnej, gdy stężenie substancji jest znacznie większe od wartości stałej Michaelisa ($c \gg K_M$), równanie (26) przyjmuje postać:

$$-\frac{dc}{dt} = V_m \quad (29)$$

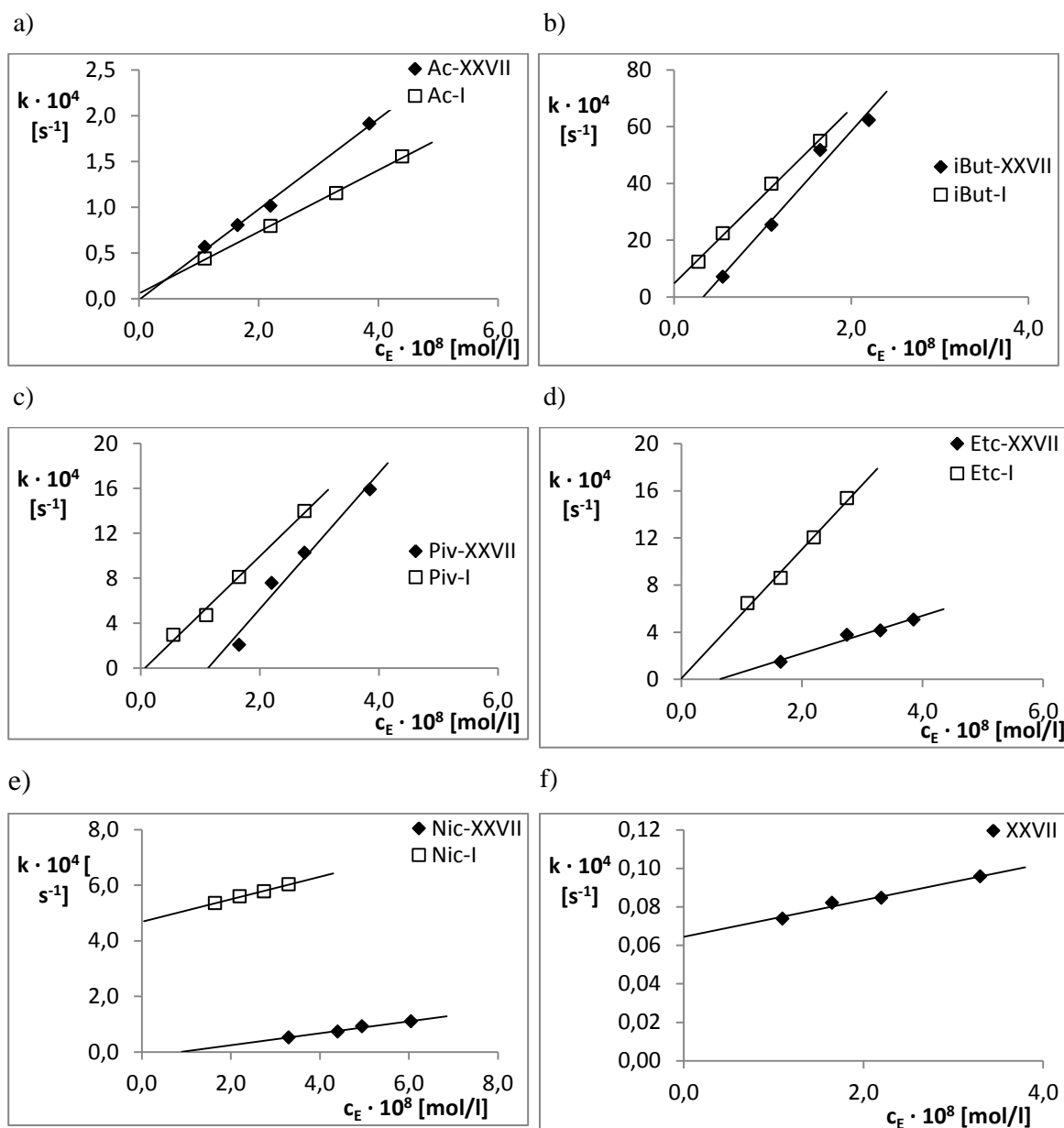
Równanie to ma zastosowanie dla procesów zachodzących zgodnie w kinetyką zerowego rzędu. Dla tej sytuacji szybkość zmian stężenia substancji jest stała, równa szybkości maksymalnej i nie zależy od stężenia substancji. Warto jednak zauważyć,

że zanim reakcja osiągnie szybkość maksymalną V_m , jej wzrost zachodzi liniowo proporcjonalnie do wzrostu stężenia, zgodnie z zasadami kinetyki pierwszego rzędu [209, 210].

W przedstawionych w rozprawie badaniach dowiedziono, że w ustalonych warunkach reakcji, rozkład wszystkich badanych związków (c dla związków trójcyklicznych $4,3 \cdot 10^{-4} - 5,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l; dla estrów ACV $6,0 \cdot 10^{-4} - 7,4 \cdot 10^{-4}$ mol/l) w osoczu ludzkim w obecności esterazy (c_E w zakresie $2,75 \cdot 10^{-9} - 6,05 \cdot 10^{-8}$ mol/l) zachodzi z kinetyką reakcji pierwszego rzędu (Ryc. 45 – 55). W związku z tym szybkość reakcji enzymatycznej może być opisana równaniem (27). Wyznaczone wartości $k_{obs.}$ związków poddanych działaniu esterazy (Tabela 64) są większe w porównaniu z wartościami $k_{obs.}$ związków poddanych hydrolizie tylko w osoczu (Tabela 63). Jednocześnie wraz ze wzrostem stężenia enzymu obserwowano wzrost szybkości reakcji rozkładu badanych związków (Tabela 64, Ryc. 73). Zaobserwowano ponadto, że poszczególne związki różnią się podatnością na hydrolizę pod wpływem esterazy (Ryc. 73), na co wskazują wartości nachylenia analizowanych prostych $k_{obs.} = f(c_E)$, które odpowiadają ilorazowi stałej szybkości tworzenia produktu k_2 i stałej szybkości Michaelisa K_M ($a = k_2/K_M$). (Ryc. 73, Tabela 74).

Tabela 74. Parametry opisujące zależność $k_{obs.} = f(c_E)$ reakcji hydrolizy związku XXVII i jego estrów w środowisku osocza ludzkiego w obecności esterazy wieprzowej (37°C)

Związek	k_2/K_M [mol ⁻¹ ·l·s ⁻¹]	Związek	k_2/K_M [mol ⁻¹ ·l·s ⁻¹]
Ac-XXVII	$(4,89 \pm 0,64) \cdot 10^3$	Ac-I	$(3,54 \pm 0,18) \cdot 10^3$
<i>i</i> But-XXVII	$(2,80 \pm 1,00) \cdot 10^5$	<i>i</i> But-I	$(3,48 \pm 0,30) \cdot 10^5$
Piv-XXVII	$(3,66 \pm 1,93) \cdot 10^4$	Piv-I	$(4,97 \pm 0,89) \cdot 10^4$
Etc-XXVII	$(1,28 \pm 0,51) \cdot 10^4$	Etc-I	$(5,52 \pm 1,02) \cdot 10^4$
Nic-XXVII	$(1,77 \pm 0,47) \cdot 10^3$	Nic-I	$(4,04 \pm 0,79) \cdot 10^3$
XXVII	$(9,52 \pm 4,26) \cdot 10$		



Ryc. 73. Wykresy zależności $k_{obs.} = f(c_E)$ reakcji hydrolizy a) estrów Ac-XXVII i Ac-I; b) estrów *i*But-XXVII i *i*But-I; c) estrów Piv-XXVII i Piv-I; d) estrów Etc-XXVII i Etc-I; e) estrów Nic-XXVII i Nic-I; f) związku XXVII, w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej w temperaturze 37°C.

Na podstawie analizy zależności $k_{obs.} = f(c_E)$ stwierdzono, że estry acyklowiru są tylko nieco bardziej podatne na hydrolizę pod wpływem esterazy niż analogiczne estry związku XXVII. Większy wpływ na podatność na hydrolizę niż obecność dodatkowego pierścienia w analogach trójcyklicznych, wywiera jednak rodzaj ugrupowania estrowego. Jako najbardziej podatne na hydrolizę uznano estry izobutyrylowe *i*But-XXVII i *i*But-I, dla których k_2/K_M wynosi $(2,80 - 3,48) \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tabela 74). Związki te prawdopodobnie w organizmie ulegałyby szybkiej przemianie do związku macierzystego

na skutek metabolizmu zachodzącego w wątrobie. Około ośmiokrotnie mniej wrażliwe na wpływ esterazy są estry piwaloilowe i etoksykarbonylowe. Natomiast estry acetylowe i nikotynowe wykazują około 90-krotnie mniejszą podatność na rozkład pod wpływem esterazy (Tabela 74).

Najmniej wrażliwy na hydrolizę pod wpływem esterazy okazał się związek XXVII, którego wartość k_2/K_M ($95,2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$) była ponad 3000 razy mniejsza niż dla estrów izobutyrylowych (Tabela 73). Ponieważ związek XXVII posiada aktywność przeciwwirusową, jego szybki rozkład w organizmie byłby zjawiskiem niekorzystnym. Wysoka odporność trójcyklicznego analogu acyklowiru na hydrolizę enzymatyczną sugeruje jego powolny metabolizm, a więc możliwość uzyskiwania odpowiednio wysokich stężeń substancji w krwi przez wymagany okres czasu.

Stwierdzono ponadto, że różnica szybkości rozkładu odpowiednich estrów ACV i estrów związku XXVII w obecności esterazy jest dużo mniejsza niż w przypadku porównania szybkości hydrolizy analogicznych par estrów w osoczu. Estry acyklowiru w osoczu ulegają rozkładowi około 10-krotnie szybciej niż estry związku XXVII, natomiast w obecności esterazy szybkość rozkładu estrów ACV jest tylko około 1,5-krotnie większa niż pochodnych trójcyklicznych (Tabele 63 i 74).

W celu identyfikacji związku XXVII oraz ACV jako produktów rozkładu estrów trójcyklicznych w płynach ustrojowych, wykonano analizę HPLC-MS/MS roztworów badanych estrów trójcyklicznego analogu ACV (XXVII) poddanych hydrolizie w osoczu ludzkim oraz w osoczu z dodatkiem esterazy (Rozdział 14.4.2). Uzyskane wyniki wykazały, że dla wszystkich analizowanych estrów podczas ich rozkładu tworzył się związek XXVII (Ryc. 56). Jego ilość była różna w zależności od szybkości rozkładu estrów w danych warunkach i zwiększała się proporcjonalnie do zmniejszania się sygnału estru. Stopień rozkładu poszczególnych estrów i tworzenia XXVII, obserwowany na chromatogramach HPLC-MS/MS roztworów poddanych hydrolizie w osoczu i w obecności esterazy, jest zbliżony do wartości oczekiwanych obliczonych na podstawie wyznaczonych wartości k_{obs} . Z uwagi na stosunkowo małą podatność estrów Ac-XXVII i Nic-XXVII na rozkład pod wpływem esterazy, roztwory tych estrów, poddane działaniu enzymu o stężeniu $5,50 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$ w czasie 2 h, uległy rozkładowi w około 2-krotnie mniejszym stopniu niż analogiczne roztwory inkubowane w osoczu przez 24 h. Ester Piv-XXVII, ze względu na większą wrażliwość na wpływ enzymu, uległ w większym stopniu rozkładowi pod wpływem esterazy niż w samym osoczu. Natomiast najbardziej wrażliwy ester izobutyrylowy uległ całkowitemu rozkładowi w obecności esterazy,

a także istotnej hydrolizie w osoczu. Hydroliza związku XXVII w obu analizowanych warunkach była zbliżona i zaszła w niewielkim stopniu, co tłumaczyć można jego wysoką trwałością w osoczu, a jednocześnie bardzo małą wrażliwością na działanie esterazy (Ryc. 56, Tabele 63 i 74). W analizowanych próbkach obserwowano ponadto występowanie niewielkich, słabo widocznych sygnałów acyklowiru nawet przy całkowitym rozkładzie analizowanego związku (*i*But-XXVII, Ryc. 56). Ich niewielka intensywność nie pozwoliła na przybliżone oszacowanie ilości powstałego ACV. Uzyskane wyniki dowodzą, że głównym produktem rozkładu estrów trójcyklicznych analogów ACV w osoczu i w obecności esterazy, jest związek XXVII. Natomiast obserwowany na chromatogramach w niewielkich ilościach ACV nie może być uznany za produkt hydrolizy analizowanych związków (Ryc. 56).

19. Podsumowanie

Acyklowir jest lekiem przeciwwirusowym powszechnie stosowanym w zakażeniach herpeswirusami. Mimo dużej skuteczności i bezpieczeństwa stosowania, z jego podawaniem wiążą się pewne ograniczenia. Podstawowym jest niska biodostępność ACV po podaniu doustnym i związana z tym konieczność stosowania wysokich dawek leku kilkakrotnie w ciągu dnia. W związku z tym poszukuje się pochodnych i analogów ACV o skuteczności i bezpieczeństwie leku macierzystego, a jednocześnie posiadających korzystniejsze parametry farmakokinetyczne. Cel ten można osiągnąć poprzez syntezę proleków.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu modyfikacji strukturalnych w obrębie części zasadowej i pseudocukrowej acyklowiru na trwałość chemiczną, enzymatyczną oraz lipofilowość wybranych nowych pochodnych ACV. Synteza pochodnych estrowych ACV oraz związku XXVII miała na celu zwiększenie lipofilowości, co może pozytywnie wpływać na zwiększenie ilości leku wchłoniętego do ustroju. Lipofilowość otrzymanych związków wyznaczono doświadczalnie przy użyciu metody HPLC oraz obliczono przewidywane wartości $c \log P$, korzystając z dostępnego oprogramowania (ALOGPS 2.1 program). Porównanie wartości uzyskanych eksperymentalnie z danymi piśmiennictwa potwierdziło poprawność zastosowanej metody doświadczalnej dla badanych substancji. Stwierdzono ponadto istnienie korelacji między wartościami wyznaczonymi doświadczalnie i obliczonymi. Wybrano algorytm AC $\log P$, dla którego obserwowana

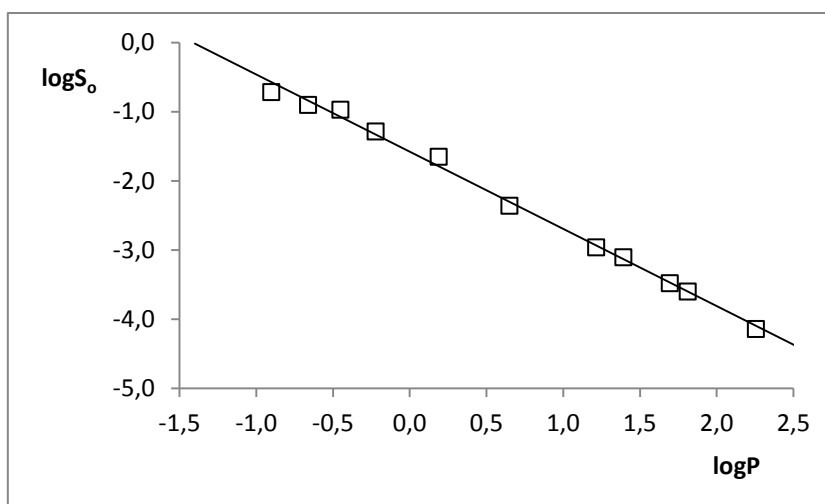
korelacja była najwyższa i opisano zależność odpowiednim równaniem. Dowiedziono, że różnice wartości $\log P(\log k_w)$ dla badanej grupy związków wyznaczone eksperymentalnie i obliczone przy użyciu opracowanego równania są na tyle niewielkie, że wybrany algorytm może być z powodzeniem wykorzystywany do przewidywania lipofilowości analogów ACV i związku XXVII zamiast badań eksperymentalnych. Lipofilowość badanych związków została uszeregowana następująco: ACV < Ac-I < Nic-I < Etc-I < *i*But-I < Piv-I < XXVII < Ac-XXVII < Nic-XXVII < Etc-XXVII < *i*But-XXVII < Piv-XXVII, co wskazuje, że pochodne trójcykliczne charakteryzują się większą lipofilowością w porównaniu z estrami ACV. Wyraźnie zaznacza się również wpływ podstawników na lipofilowość. Najbardziej lipofilowe są estry piwaloilowe, dalej izobutyrylowe i etoksykarbonylowe. Estry nikotynowe i acetylowe są zdecydowanie mniej lipofilowe w porównaniu z poprzednimi, bardziej jednak niż niezestryfikowane ACV czy związek XXVII. Wyznaczone wartości $\log P(\log k_w)$ można wykorzystać do obliczenia rzeczywistej rozpuszczalności substancji należących do tej grupy (Tabela 75), na podstawie równania:

$$\log S_o = 0,5 - \log P - 0,01 \cdot (tt. - 25) \quad (30)$$

opisującego zależność $\log S_o = f(\log P)$ (Ryc. 74).

Tabela 75. Obliczone wartości $\log S_o$ badanych związków

Związek	$\log S_o$	Związek	$\log S_o$
Ac-XXVII	-2,962	Ac-I	-0,715
<i>i</i> But-XXVII	-3,597	<i>i</i> But-I	-1,285
Piv-XXVII	-4,142	Piv-I	-1,650
Etc-XXVII	-3,481	Etc-I	-0,970
Nic-XXVII	-3,104	Nic-I	-0,900
XXVII	-2,361		



Ryc. 74. Wykres zależności $\log S_0 = f(\log P)$ analizowanych związków.

Związek XXVII poddano następnie testom trwałości zgodnie z wytycznymi ICH. W ramach testu stresowego oceniono rozkład związku w roztworze pod wpływem podwyższonej temperatury w środowisku obojętnym, kwasowym i zasadowym, rozkład w obecności czynnika utleniającego oraz pod wpływem światła. Uzyskane wyniki pozwoliły na sklasyfikowanie związku XXVII jako nietrwałego/fotolabilnego we wszystkich analizowanych warunkach. Roztwory poddane testom stresowym analizowano następnie metodą HPLC-MS/MS i ustalono, że niezależnie od środowiska reakcji rozkładowi związku XXVII, poza powstawaniem innych produktów degradacji, towarzyszy tworzenie się ACV. Warto jednak zauważyć, że zachowanie substancji w warunkach testu stresowego nie musi odpowiadać jej zachowaniu w ustroju, gdzie nie jest narażona na tak wysoką temperaturę, czy czynniki katalityczne (H^+ , OH^- , H_2O_2). W ustroju występują za to liczne enzymy czy układy buforowe decydując o metabolizmie związku. W ramach testu przyspieszonego i pośredniego dowiedziono ponadto, że zarówno temperatura, jak i wilgotność względna powietrza nie mają istotnego wpływu na trwałość badanej substancji w fazie stałej. Podczas przechowywania nie jest więc niezbędna specjalna ochrona związku XXVII przed wilgocią. Jednak biorąc pod uwagę jego fotolabilność, konieczne wydaje się przechowywanie substancji w warunkach chroniących przed dostępem światła.

Badane związki stanowią estry acyklowiru i estry związku XXVII, mogą być więc traktowane jako proleki. Substancje o charakterze proleków powinny wykazywać odpowiednią szybkość hydrolizy do związku macierzystego. Istotna jest ich odpowiednia trwałość, która zapobiega przedwczesnej hydrolizie już w przewodzie pokarmowym,

co ograniczałoby biodostępność leku. Natomiast po osiągnięciu przez prolek krwiobiegu lub miejsca działania, powinien on szybko uwalniać substancję aktywną, tak by możliwe było uzyskanie stężenia terapeutycznego. Acyklowir i jego pochodne ulegają wchłanianiu głównie w żołądku i dwunastnicy, w związku z tym muszą wykazywać się odpowiednio wysoką odpornością na hydrolizę pod wpływem kwasowego środowiska żołądka i zasadowej treści dwunastniczej.

Podczas dotychczasowych badań trwałości pochodnych acyklowiru ustalono, że trwałość estrów alifatycznych ACV maleje wraz z wydłużaniem łańcucha, rośnie natomiast wraz z jego rozgałęzieniem [52]. Piśmiennictwo nie dostarcza jednak informacji na temat kinetyki reakcji hydrolizy estrów ACV w środowisku kwasowym. Brak również informacji o trwałości pochodnych trójcyklicznych w powyższych warunkach. W związku z powyższym oraz wiedząc, że modyfikacje strukturalne mogą wpływać nie tylko na właściwości fizykochemiczne, ale również biologiczne oraz stabilność substancji, zbadano wpływ modyfikacji w obrębie części pseudocukrowej i zasadowej ACV na trwałość pochodnych w środowisku kwasowym. Badania trwałości pochodnych trójcyklicznych poprzedzono określeniem wpływu DMSO i glikolu propylenowego na szybkość rozkładu. Ustalono, że stężenie wspomnianych rozpuszczalników w analizowanym zakresie nie wywiera wpływu na rozkład badanych estrów. Badania rozkładu analizowanych związków w środowisku kwasowym pozwoliły ustalić parametry kinetyczne obserwowanych reakcji (Rozdział 16). Zaobserwowano, że stałe szybkości hydrolizy analogicznych estrów ACV i związku XXVII (poza estrami nikotynowymi) są zbliżone i stwierdzono, że obecność dodatkowego pierścienia w strukturze analogów trójcyklicznych nie wywiera wpływu na podatność estrów na hydrolizę pod wpływem jonów wodorowych, jako czynników katalitycznych. Istotny wpływ na szybkość hydrolizy badanych związków w środowisku kwasowym wywiera natomiast budowa przestrzenna podstawników w części estrowej. W badanej grupie związków obserwuje się więc wyraźny efekt steryczny podstawników, opisany parametrem Tafta (E_s) [211]. Zgodnie z analizą Tafta na szybkość reakcji hydrolizy w środowisku kwasowym oraz reakcji estryfikacji wpływają jedynie czynniki steryczne, natomiast w przypadku hydrolizy zasadowej rolę odgrywają również czynniki polarne [211]. W analizowanych warunkach równanie Tafta przyjmuje więc postać:

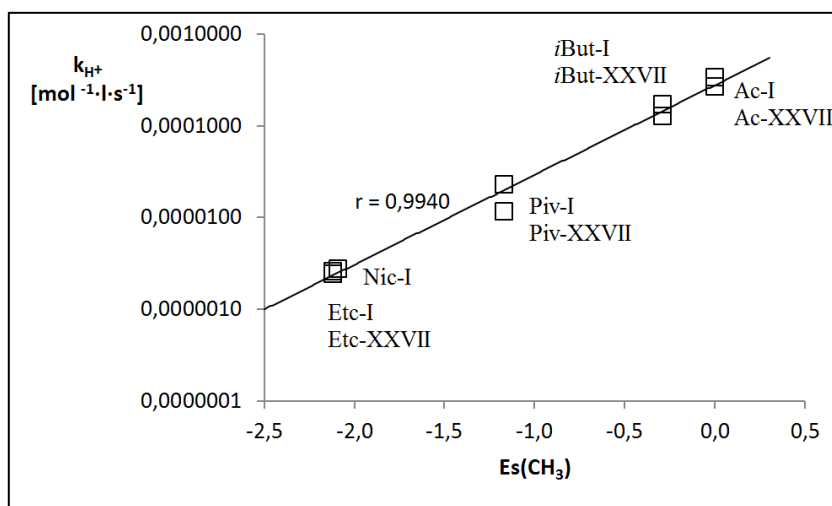
$$\log \frac{k_s}{k_{CH_3}} = \delta E_s \quad (31)$$

gdzie:

k_s/k_{CH_3} – iloraz stałej szybkości reakcji związku z analizowanym podstawnikiem do stałej szybkości związku referencyjnego (z grupą metylową jako podstawnikiem)

δ – czynnik wrażliwości reakcji na efekty steryczne (w hydrolizie kwasowej $\delta = 1$) [212].

Czynniki steryczne dla badanych podstawników obliczono biorąc pod uwagę wartości k_{H^+} wyznaczone dla estrów ACV. Ich wartości przedstawiały się następująco: -0,29 (izopropylowy), -1,17 (*tert*-butylowy), -2,12 (etoksy), -2,09 (3-pirydynowy). Ujemne wartości wskazują, że powyższe podstawniki zmniejszają szybkość hydrolizy estrów. Analiza parametrów sterycznych wykazała, że ugrupowanie etoksykarbonylowe oraz nikotynowe najbardziej stabilizują strukturę estru (mają najniższą wartość $Es(CH_3)$) (Ryc. 75). Wniosek ten znalazł potwierdzenie na profilach $\log k_{pH} = f(pH)$ reakcji hydrolizy obu badanych grup związków (Ryc. 64).



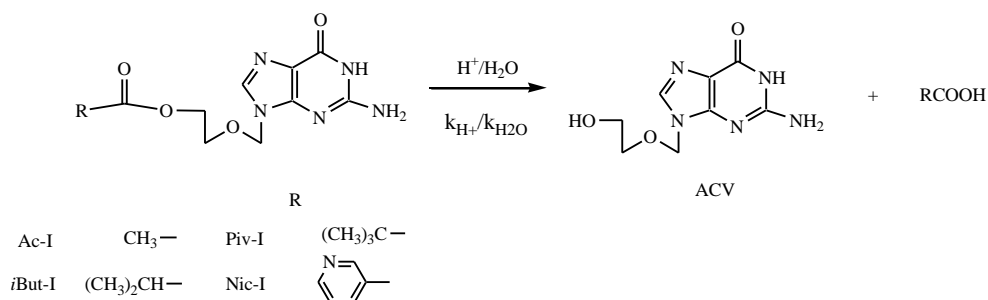
Ryc. 75. Półlogarytmiczna zależność $k_{H^+} = f(Es(CH_3))$ analizowanych związków.

Stwierdzono ponadto, że wartości katalitycznych stałych szybkości reakcji hydrolizy estrów izobutyrylowych są około 2-, estrów piwaliolowych 10-, a estrów etoksykarbonylowych i nikotynowych 100-krotnie mniejsze w porównaniu z estrami acetylowymi (Tabele 28 i 38). Wskazuje to na różnice w energii aktywacji hydrolizy kwasowej poszczególnych rodzajów estrów. Zgodnie z danymi piśmiennictwa [213, 214] różnice stabilności badanych związków są wynikiem różnic w energii aktywacji obserwowanych reakcji. Może to stanowić dodatkowe wyjaśnienie dużej stabilności estrów etoksykarbonylowych i nikotynowych w analizowanych warunkach.

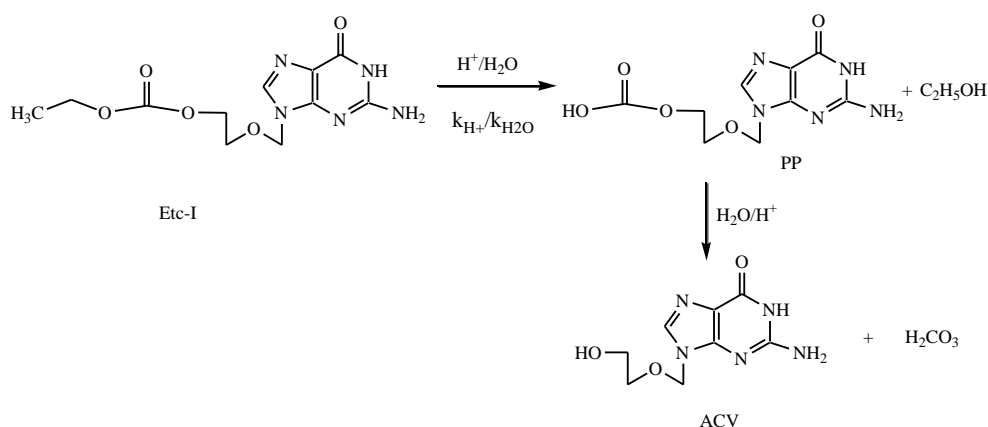
Zaproponowano mechanizm reakcji hydrolizy poszczególnych związków do związku macierzystego (Ryc. 76 i 77). Hydroliza estrów związku XXVII i większości estrów ACV

(poza Etc-I) zachodzi w środowisku kwasowym pod wpływem jonów wodorowych i/lub wody jednoetapowo według prostego schematu, i prowadzi do powstania związku macierzystego oraz odpowiedniego kwasu (Ryc. 76a i 77a). W przypadku estru Etc-I zaproponowano dwuetapową reakcję rozkładu z tworzeniem nietrwałego produktu pośredniego (PP, Ryc. 76b). Produkt pośredni nie był obserwowany na chromatogramach podczas analizy, w związku z tym parametry kinetyczne reakcji jego tworzenia i rozkładu nie zostały wyznaczone. Szybkość powyższej reakcji hydrolizy estru Etc-I uwarunkowana jest pierwszym etapem, który przebiega wolniej niż drugi. Następuje szybkie protonowanie, a następnie powolna dwucząsteczkowa reakcja ataku cząsteczki wody i rozszczepienia wiązania C=O z uwolnieniem etanolu. W drugim etapie zachodzi szybka jednocząsteczkowa reakcja rozszczepienia wiązania pomiędzy węglem a tlenem, w wyniku której powstaje ACV oraz kwas węglowy. Powyższy mechanizm reakcji jest zgodny z proponowanym w piśmiennictwie [215] i wyjaśnia niską reaktywność tego typu estrów. Podobny mechanizm reakcji hydrolizy można zaproponować dla estru Etc-XXVII.

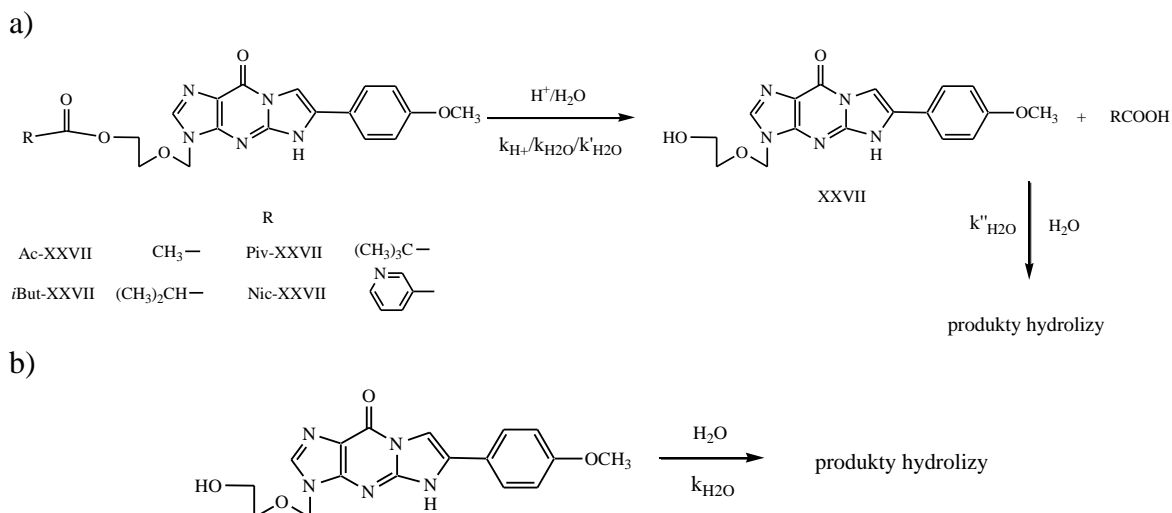
a)



b)



Ryc. 76. Mechanizm hydrolizy estrów acyklowiru w środowisku kwasowym: a) estry Ac-, *i*But-, Piv-, Nic-I; b) ester Etc-I.

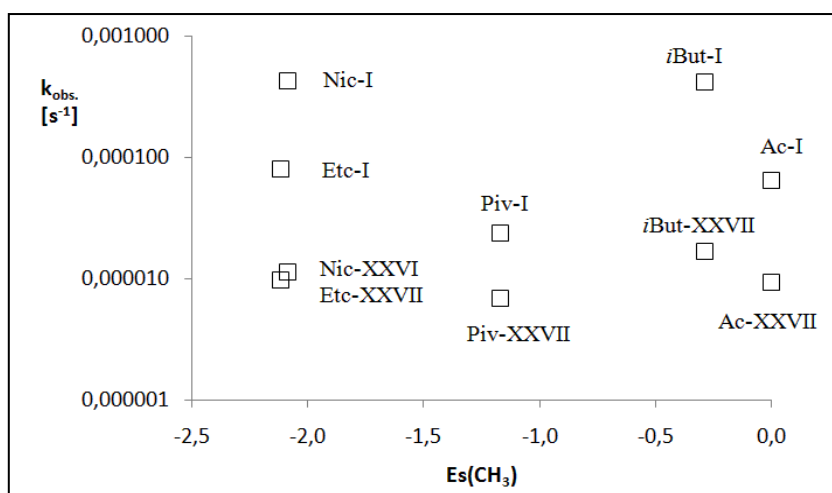


Ryc. 77. Mechanizm hydrolizy trójcyklicznych analogów ACV w środowisku kwasowym: a) estry związku XXVII i dalsza hydroliza powstałego w jej wyniku związku XXVII; b) hydroliza związku XXVII.

Acyklowir powstały w wyniku hydrolizy estrów acyklowiru jest trwały w analizowanych warunkach i nie ulega dalszemu rozkładowi (Rozdział 12.5.2). Natomiast związek XXVII powstały jako produkt hydrolizy estrów trójcyklicznych, w badanych warunkach ulega dalszemu rozkładowi w reakcji następczej. Porównano szybkość rozkładu związku XXVII poddanego hydrolizie w środowisku kwasowym i związku XXVII obserwowanego jako produkt hydrolizy estru Ac-XXVII. Stwierdzono, że związek XXVII poddany hydrolizie ulega rozkładowi około 10-krotnie wolniej w porównaniu z XXVII powstałym w wyniku rozkładu Ac-XXVII ($k_{H_2O} < k''_{H_2O}$, Ryc. 70). Na tej podstawie przypuszcza się, że powstający podczas hydrolizy estru kwas (np. octowy), chociaż nie ma wpływu na zmianę pH roztworu, mimo to katalizuje rozkład związku XXVII (Ryc. 77).

Ponieważ badane związki wykazały dość dużą stabilność w środowisku kwasowym ($t_{0,5}$ dla estrów ACV w zakresie 1,50 h – 776,21 h, dla estrów związku XXVII 1,70 h – 171,88 h, dla związku XXVII średnio 1180,98 h), wydają się one obiecujące pod względem stawianych prolekom wymagań trwałości w przewodzie pokarmowym. Istotne jest jednak, aby po osiągnięciu krążenia ogólnego, zachodził rozkład substancji o charakterze proleków z uwolnieniem substancji aktywnej. W związku z powyższym sprawdzono stabilność roztworów badanych związków w osoczu ludzkim oraz w środowisku osocza w obecności esterazy z wątroby wieprzowej, w temperaturze 37°C. Ustalono, że rozkład estrów acyklowiru w osoczu zachodzi znacznie szybciej niż estrów

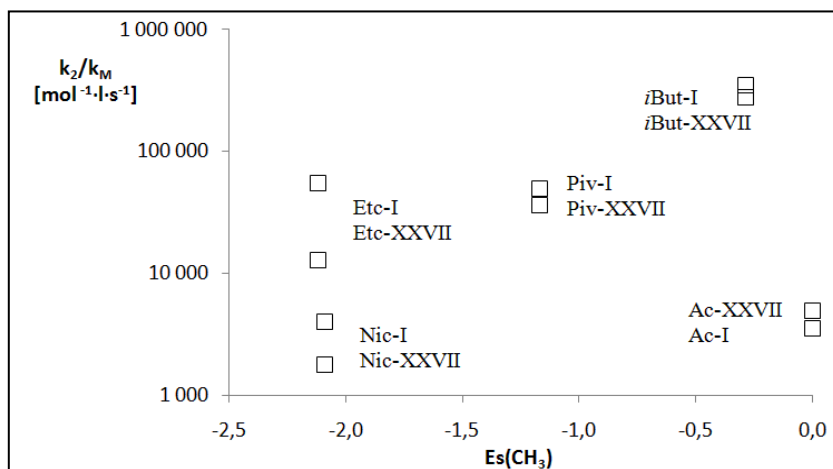
trójcyklicznych (Ryc. 78). Jednocześnie stwierdzono, że typ podstawnika w części estrowej obu grup związków wywiera wpływ na podatność na hydrolizę. W analizowanych warunkach najszybciej ulegały rozkładowi estry izobutyrylowe i nikotynowe. Bardziej stabilne były estry nikotynowe i etoksykarbonylowe, najbardziej natomiast estry piwaloilowe. Zgodnie z przewidywaniami, największą trwałością spośród wszystkich związków charakteryzował się związek XXVII, pozbawiony podatnego na rozkład wiązania estrowego. Wpływ podstawników na szybkość hydrolizy w osoczu nie daje się jednak wytłumaczyć jedynie efektem sterycznym zgodnie z analizą Tafta (Ryc. 78). Jednocześnie warto zauważyć, że wartości $t_{0,5}$ badanych związków w osoczu (0,45 h – 68,40 h) są znacznie mniejsze niż wartość $t_{0,5}$ stosowanego w leczeniu walacyklowiru (226 h) [44]. Prawdopodobnie więc mogą one ulegać w organizmie przekształceniu do substancji aktywnej z szybkością umożliwiającą uzyskanie stężenia terapeutycznego.



Ryc. 78. Półlogarytmiczna zależność $k_{\text{obs.}} = f(E_s(\text{CH}_3))$ analizowanych związków dla hydrolizy w osoczu (80%, 37°C).

Podobnie, nie udało się zaobserwować prostej zależności wpływu efektu sterycznego Tafta na szybkość rozkładu dla hydrolizy badanych związków w obecności esterazy (Ryc. 79). Wpływ podstawników jest analogiczny w obu grupach estrów, różni się on jednak od wpływu podstawników na hydrolizę w osoczu. Ponadto podczas hydrolizy w obecności esterazy zaobserwowano mniejszą różnicę w szybkości rozkładu pomiędzy odpowiednimi estrami ACV i związku XXVII (Ryc. 79) niż podczas analizy ich rozkładu w osoczu. Obie grupy związków w obecności esterazy ulegają rozkładowi szybciej

niż w osoczu, zwiększenie szybkości reakcji jest jednak znacznie bardziej widoczne w przypadku estrów trójcyklicznych (Tabele 63 i 64).



Ryc. 79. Półlogarytmiczna zależność $k_{obs.} = f(Es(CH_3))$ analizowanych związków dla hydrolizy w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy.

Uzyskane wyniki prowadzą do wniosku, że estry związku XXVII są bardziej podatne na metabolizm wątrobowy w porównaniu z estrami ACV. Jednocześnie, powstały w wyniku ich hydrolizy związek XXVII, którego tożsamość jako produktu hydrolizy potwierdzono metodą HPLC-MS/MS, jest związkiem wystarczająco trwałym w powyższych warunkach, by móc osiągnąć satysfakcjonujące stężenie w płynach ustrojowych i nie ulec zbyt szybkiemu metabolizmowi.

VI. Wnioski

1. Metoda HPLC wyznaczania lipofilowości może być stosowana do określania wartości $\log k_w/\log P$ acyklowiru i jego analogów zamiast referencyjnej metody *shake flask* nie przekraczając dopuszczalnego błędu ($\pm 0,5$), przy czym jest to metoda szybka i tania.
2. Wyznaczone równania $\log k_w(\log P) = k_1 + k_2 \times AC \log P$ pozwalają z powodzeniem wykorzystać w badaniach QSAR, metodę obliczeniową określenia lipofilowości estrów ACV i jego analogu trójcyklicznego, zamiast badań eksperymentalnych.
3. Według wytycznych ICH związek XXVII został sklasyfikowany jako nietrwały w roztworze we wszystkich warunkach testu stresowego, odporny na działanie podwyższonej temperatury i względnej wilgotności powietrza w fazie stałej oraz fotolabilny w roztworze i w fazie stałej.
4. Badane związki są podatne na rozkład we wszystkich analizowanych warunkach: najtrwalsze są w środowisku kwasowym, mniej trwałe w osoczu ludzkim, a najmniej trwałe w obecności esterazy z wątroby wieprzowej, przy czym szybkość ich rozkładu jest zależna od stężenia enzymu.
5. W środowisku kwasowym rozkład badanych związków zachodzi z kinetyką pseudopierwszego rzędu i składa się na niego hydroliza form protonowanych pod wpływem jonów wodorowych, hydroliza spontaniczna pod wpływem wody form protonowanych i/lub form obojętnych.
6. Podatność związków na rozkład zależy głównie od rodzaju podstawnika w części estrowej. Dla hydrolizy w środowisku kwasowym obserwuje się wyraźny wpływ budowy przestrzennej (efekt steryczny) podstawników, opisany parametrem Tafta. Obecność dodatkowego pierścienia w części zasadowej wydaje się wpływać (stabilizująco) jedynie na szybkość rozkładu analizowanych związków w osoczu.
7. W środowisku kwasowym hydroliza większości estrów przebiega jednoetapowo, podczas gdy estry etoksykarbonylowe ulegają rozkładowi w reakcji dwuetapowej z utworzeniem nietrwałego produktu pośredniego.
8. Powstający podczas hydrolizy estrów trójcyklicznych związek XXVII ulega reakcji następczej, na której szybkość katalityczny wpływ wywiera równocześnie powstający kwas organiczny.
9. W warunkach testu stresowego związek XXVII ulega rozkładowi do ACV. Natomiast

w osoczu ludzkim i w obecności esterazy, analogi trójcykliczne hydrolizują głównie do związku XXVII, a jego dalszy rozkład do ACV nie został dowiedziony. Zatem mechanizm działania analogów trójcyklicznych nie wynika z ich rozkładu do ACV.

10. Biorąc pod uwagę mechanizm działania ACV (na komórki zainfekowane wirusem) oraz stabilność hydrolityczną, enzymatyczną oraz lipofilowość ($\log k_w = 1,39$), ciekawym z punktu widzenia podania dostnego, jako potencjalnego proleku, wydaje się być ester nikotynowy trójcyklicznego analogu ACV (Nic-XXVII).

VII. Streszczenie

Niedogodności związane ze stosowaniem acyklowiru skłaniają do ciągłego poszukiwania jego nowych analogów o skuteczności i bezpieczeństwie leku macierzystego, a jednocześnie posiadających korzystniejsze parametry farmakokinetyczne. Celem badań niniejszej pracy była ocena wpływu modyfikacji strukturalnych w obrębie części zasadowej i pseudocukrowej acyklowiru na trwałość chemiczną, enzymatyczną oraz lipofilowość wybranych nowych pochodnych ACV.

W celu zwiększenia lipofilowości cząsteczki acyklowiru oraz jego trójcyklicznego analogu – związku XXVII (3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5*H*-imidazo-[1,2-*a*]puryna), estryfikacji poddano grupę hydroksylową wymienionych substancji tworząc proste estry. Do badań wybrano pięć estrów obu związków: acetylowe (Ac-), izobutyrylowe (*i*But-), piwaloilowe (Piv-) oraz etoksykarbonylowe (Etc-) i nikotynowe (Nic-).

Dokonano syntezy pięciu estrów acyklowiru oraz potwierdzono ich tożsamość (estry Ac-I, *i*But-I, Piv-I) metodami spektroskopowymi. Dla nowosyntetyzowanych estrów Etc-I i Nic-I wykonano charakterystykę przy użyciu metod spektroskopowych, analizy elementarnej i pomiaru temperatury topnienia. Wszystkie otrzymane estry charakteryzowały się wysoką czystością potwierdzoną metodą HPLC (98,4% – 100,0%). Analogicznym badaniom poddane zostały estry związku XXVII zsyntetyzowane przez dr hab. Tomasza Ostrowskiego (Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu).

Lipofilowość badanych związków wyznaczono doświadczalnie przy użyciu metody HPLC, a następnie porównano otrzymane wyniki z wartościami uzyskanymi za pomocą technik obliczeniowych (ALOGPS 2.1 program) w celu sprawdzenia możliwości zamiennego stosowania obu metod do określania lipofilowości związków należących do tej grupy. Porównano wartości uzyskane eksperymentalnie z danymi piśmiennictwa i stwierdzono, że zastosowana metoda doświadczalna jest poprawna i użyteczna dla wyznaczania lipofilowości badanych substancji, a jednocześnie jest też szybka i tania. Obserwując istnienie korelacji między wartościami wyznaczonymi doświadczalnie i obliczonymi, wybrano algorytm AC logP o najlepszych parametrach korelacji. Obserwowaną zależność opisano równaniem: $\log k_w = k_1 + k_2 \times \text{AC logP}$ ($\log P = k_1 + k_2 \times \text{AC logP}$), które pozwala wyznaczyć lipofilowość metodą obliczeniową z niewielkim

błędem względem wartości uzyskanych eksperymentalnie. W związku z tym może ona być z powodzeniem wykorzystywana do przewidywania lipofilowości analogów ACV i XXVII zamiast badań doświadczalnych. Badane związki zostały uszeregowane według wzrastającej lipofilowości: ACV < Ac-I < Nic-I < Etc-I < *i*But-I < Piv-I < XXVII < AcXXVII < Nic-XXVII < Etc-XXVII < *i*But-XXVII < Piv-XXVII.

Dla każdego z analizowanych związków opracowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detekcją UV, do rejestrowania zmian stężenia w obecności produktów jego rozkładu i wzorca wewnętrznego w warunkach rozkładu w środowisku kwasowym, w osoczu ludzkim oraz w osoczu w obecności esterazy. Opracowane metody poddano walidacji poprzez ocenę takich parametrów jak: selektywność, liniowość, precyzja, dokładność, powtarzalność, zakres i czułość metody, granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), a dla metod opracowanych dla badań trwałości w materiale biologicznym także stabilność analitu. Wszystkie metody spełniały stawiane im wymagania i mogły być stosowane w określonym zakresie prowadzonych badań.

Dokonano oceny trwałości związku XXVII za pomocą testu stresowego, przyspieszonego i pośredniego z pomiarem zmian stężenia substancji metodą HPLC-UV i analizą produktów degradacji przy użyciu metody HPLC-MS/MS. Badany związek został sklasyfikowany jako nietrwały/fotolabilny we wszystkich analizowanych warunkach testu stresowego. Dowiedziono, przy użyciu metody HPLC-MS/MS, że niezależnie od środowiska reakcji rozkładowi związku XXVII, towarzyszy tworzenie się acyklowiru. Podczas testu przyspieszonego i pośredniego ustalono natomiast, że ani temperatura, ani wilgotność względna powietrza, nie mają istotnego wpływu na trwałość badanej substancji w fazie stałej.

Badania kinetyczne reakcji hydrolizy kwasowej wykonano w roztworach wodno-organicznym (związek XXVII i jego estry) lub wodnym (estry ACV), w środowisku kwasu solnego w zakresie stężeń 0,05 mol/l – 0,50 mol/l (pH 0,42 – 1,38) przy stałej wartości siły jonowej ($\mu = 0,50$ mol/l). Wyznaczono obserwowane stałe szybkości reakcji hydrolizy, a następnie opisano odpowiednimi równaniami kinetycznymi zależności $\log k_{pH} = f(pH)$, wyznaczając katalityczne stałe szybkości reakcji. Ustalono, że w środowisku kwasowym rozkład badanych związków zachodzi z kinetyką pseudopierwszego rzędu i składa się na niego hydroliza form protonowanych pod wpływem jonów wodorowych, hydroliza spontaniczna pod wpływem wody form protonowanych i/lub form obojętnych. Stwierdzono ponadto, że stałe szybkości hydrolizy

analogicznych estrów ACV i XXVII (poza estrami nikotynowymi) są zbliżone, w związku z czym obecność dodatkowego pierścienia w strukturze analogów trójcyklicznych nie wywiera wpływu na podatność estrów na hydrolizę w powyższych warunkach. Istotny wpływ na szybkość hydrolizy badanych związków wywiera natomiast budowa przestrzenna podstawników w części estrowej. Zaobserwowano wyraźny efekt steryczny podstawników, opisany parametrem Tafta. Dla wybranych estrów wyznaczono również obserwowane stałe szybkości tworzenia (dla związku XXVII i ACV) i rozkładu (dla związku XXVII) obserwowanego produktu hydrolizy. Zaproponowano mechanizm hydrolizy badanych estrów do związków macierzystych w środowisku kwasowym, jako reakcję dwuetapową (dla Etc-I i Etc-XXVII) lub jednoetapową (dla pozostałych estrów). Stwierdzono również, że różnica w szybkości hydrolizy bezpośredniej związku XXVII oraz tworzącego się podczas rozkładu jego estru może wynikać z katalitycznego wpływu kwasu organicznego powstającego podczas hydrolizy estru.

Wykonano również badania kinetyczne hydrolizy analizowanych związków w temperaturze 37°C w 80% osoczu ludzkim oraz w osoczu w obecności esterazy z wątroby wieprzowej w zakresie czterech stężeń enzymu. W ramach powyższych badań wyznaczono parametry kinetyczne reakcji: obserwowane stałe szybkości ($k_{obs.}$) i biologiczne okresy półtrwania ($t_{0,5}$). Ustalono, że w osoczu rozkład estrów acyklowiru zachodzi znacznie szybciej niż estrów trójcyklicznych, natomiast w obecności esterazy różnice w szybkości hydrolizy są niewielkie. Dla wszystkich związków rozkład w obecności enzymu zachodzi szybciej niż w osoczu, a wzrost szybkości reakcji jest proporcjonalny do wzrostu stężenia enzymu. Stwierdzono ponadto, że typ podstawnika w części estrowej obu grup związków wywiera wpływ na podatność na hydrolizę w analizowanych warunkach, nie daje się on jednak wytłumaczyć jedynie efektem sterycznym zgodnie z analizą Tafta.

Summary

Comparative analysis of lipophilicity and stability of an antivirally active derivative of 9-oxo-5*H*-imidazo [1,2-*a*] purine, its esters and acyclovir esters

Even though acyclovir (ACV) is widely used antiviral drug new analogues with the efficacy and safety of the parent drug and more favorable pharmacokinetic parameters are still desired. The aim of this research was to evaluate the impact of structural modifications within the basic and pseudosugar moiety of acyclovir on lipophilicity, chemical and enzymatic stability of selected, new derivatives of ACV. Modification of basic part of ACV lead to its tricyclic analog: 3,9-dihydro-3-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(4-methoxyphenyl)-9-oxo-5*H*-imidazo[1,2-*a*]purine (compound XXVII).

In order to increase the lipophilicity hydroxyl groups of acyclovir and its tricyclic analog were esterified to form simple esters. Five esters of the both compounds were selected for the study: methyl (Ac-), isobutyryl (iBut-), pivaloyl (Piv-), ethoxycarbonyl (Etc-) and nicotinoyl (Nic-).

The esters of acyclovir were synthesized and identified by spectroscopic techniques (Ac-I, iBut-I, Piv-I). Characteristics of newly synthesized esters Etc-I and Nic-I were performed using spectroscopic techniques, elemental analysis and melting point. All the synthesized esters were of high purity, which was confirmed by HPLC method (98,4% – 100,0%). Esters of XXVII compound were synthesized by dr hab. Tomasz Ostrowski (Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Science) and they have been subjected to the same identity and purity tests.

Lipophilicity of the tested compounds was determined experimentally by HPLC method. The results were compared with values obtained using computational method (2.1 ALOGPS program) to check the interchangeability of both methods. Comparison of the values obtained experimentally with the data from the literature showed that the experimental method is correct and useful to determine the lipophilicity of the tested substances. The HPLC method is also fast and cheap. The AC logP algorithm was selected as the most useful since the values calculated with the this algorithm showed the highest correlation coefficient with the values observed experimentally. The equation $\log k_w = k_1 + k_2 \times \text{AclogP}$ (or $\log P = k_1 + k_2 \times \text{AClogP}$) allows to determine the lipophilicity using the computational method with small errors compare to the values obtained experimentally.

Therefore, it can be successfully used to predict lipophilicity of ACV and XXVII analogs instead of experiments. The tested compounds were ordered according to increasing lipophilicity: ACV < Ac-I < Nic-I < Etc-I < *i*But-I < Piv-I < XXVII < Ac-XXVII < Nic-XXVII < Etc-XXVII < *i*But-XXVII < Piv-XXVII.

A method of high performance liquid chromatography in reversed phase with UV detection was developed for each of the analyzed compounds to record changes of concentration in the presence of degradation products and the internal standard. Methods were developed for conditions of degradation in an acidic environment, in human plasma and in plasma in the presence of esterase. The developed methods were validated with respect to parameters such as selectivity, linearity, precision, accuracy, repeatability, range and sensitivity of the method, the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ). Furthermore the stability of the analyte was examined for the methods developed for stability tests in the biological material. All methods met the requirements and can be used in a proposed range of research.

The evaluation of stability of compound XXVII was determined using stress, accelerated or intermediate degradation tests with measurement of the changes in substance concentration by HPLC-UV. The analysis of the degradation products was performed by HPLC-MS/MS method. Compound XXVII was classified as unstable/photolabile in all analyzed conditions of stress test. It was proved by HPLC-MS/MS, that acyclovir is formed during degradation of XXVII independently from the reaction environment. During the accelerated and intermediate tests neither the temperature nor the relative air humidity does not have a significant effect on the stability of the substance in the solid state.

Kinetic studies of the reaction of acid hydrolysis were investigated in aqueous-organic (XXVII esters) and aqueous (ACV esters) solutions in hydrochloric acid environment at a concentration range of 0.05 mol/l – 0.50 mol/l (pH 0.42 – 1.38) and at constant ionic strength ($\mu = 0.50$ mol/l). The observed rate constants of the hydrolysis reaction were determined. Next, dependence of $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ for each compound was described by suitable kinetic equation and the catalytic reaction rate constants were determined. It was found, that in an acidic environment the observed hydrolysis reactions were the pseudo-first order reactions. Degradation of compounds consists of the hydrolysis of the protonated form under the influence of hydrogen ions, spontaneous hydrolysis of protonated forms by water and/or spontaneous hydrolysis of neutral forms by water. It was further found that the hydrolysis rate constants of the corresponding esters of ACV and

XXVII (except nicotinic esters) are similar and therefore the presence of the additional ring in the tricyclic structure analogs does not influence on susceptibility to hydrolysis of esters under these conditions. On the other hand, a spatial construction of the substituents on the ester part of the compounds has significant impact on the rate of hydrolysis. A significant steric effect of substituents, described by Taft's parameter, has been observed. The observed rate constants of formation (for XXVII and ACV) and degradation (for XXVII) of main hydrolysis product of selected esters were also determined. The proposed mechanism of hydrolysis of the tested esters under acidic conditions is a two-step reaction (Etc-I and Etc-XXVII), or a one-step (for other esters). It was also found that the difference in the rate of hydrolysis of compound XXVII and compound XXVII formed in the decomposition of its ester, may result from the catalytic influence of an organic acid which is formed during the hydrolysis of the ester.

Kinetics studies of the hydrolysis of the tested compounds were also performed at a temperature of 37°C in 80% human plasma and in the plasma in the presence of porcine liver esterase, in the range of four concentrations of the enzyme. The kinetic parameters of reaction: the observed rate constants ($k_{obs.}$) and the biological half-lives ($t_{0,5}$) were determined during these studies. It was found, that in the plasma the acyclovir esters degradation proceeded much faster than the tricyclic esters, but in the presence of esterase differences in the hydrolysis rates were low. Degradation of all compounds in the presence of an enzyme occurred faster than in the plasma and increase of the reaction rate was proportional to the increase of enzyme concentration. It was further found that the type of the substituent in the ester part of the compounds has an effect on susceptibility to hydrolysis under the analyzed conditions, but it cannot be explained only according to the steric effect of Taft's analysis.

VIII. Spis rycin i tabel

Spis rycin

Ryc. 1. Wzór strukturalny: a) acyklowiru; b) guanozyny.....	12
Ryc. 2. Mechanizm działania acyklowiru (wg [15]).....	14
Ryc. 3. Metabolizm acyklowiru w wątrobie (wg [28]).....	15
Ryc. 4. Wzór strukturalny walacyklowiru (III).....	20
Ryc. 5. Struktura: a) PEG-ACV ₂ ; b) PEG-VACV ₂	24
Ryc. 6. Możliwe przekształcenia 6-deoksyacyklowiru w ustroju (wg [54]).....	26
Ryc. 7. Pochodne acyklowiru otrzymane przez zablokowanie atomów azotu.....	27
Ryc. 8. Struktura: a) pierwszej aktywnej przeciwwirusowo trójcyklicznej pochodnej acyklowiru; b)TACV.....	28
Ryc. 9. Najbardziej cytotoksyczna pochodna TACV – XLV.....	35
Ryc. 10. Struktura A-5021 (XLVI).....	39
Ryc. 11. Budowa i schemat aktywacji a) proleków związanych z cząsteczką nośnika; b) bioprekursorów (wg [106]).....	45
Ryc. 12. Zależności między stałą biotransformacji a stałymi eliminacji (wg [6]).....	46
Ryc. 13. Usunięcie wiązania estrowego przy udziale esteraz lub enzymów cytochromu P450 (wg [111]).....	48
Ryc. 14. Wykres zależności $\log k_w$ jako funkcji stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej a) korelacja liniowa; b) korelacja kwadratowa.....	70
Ryc. 15. Wykres zależności $\log P = f(\log k)$ dla substancji wzorcowych.....	71
Ryc. 16. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni pików substancji badanej do pola powierzchni pików wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia ACV, związku XXVII i jego estrów.....	79
Ryc. 17. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu 0,50 mol/l dla różnych stężeń DMSO.....	83
Ryc. 18. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu 0,50 mol/l dla różnych stężeń glikolu propylenowego.....	84
Ryc. 19. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w roztworach wodno-organicznych.....	85
Ryc. 20. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru <i>i</i> But-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w roztworach wodno-organicznych.....	86
Ryc. 21. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w roztworach wodno-organicznych.....	86

Ryc. 22. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l, w roztworach wodno-organicznych.....	86
Ryc. 23. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l, w roztworach wodno-organicznych.....	87
Ryc. 24. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy XXVII w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C) o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l, w roztworach wodno-organicznych.....	87
Ryc. 25. Półlogarytmiczne wykresy zależności P_t oraz $(P_\infty - P_t)$ jako funkcji czasu obserwowanej reakcji tworzenia i rozkładu XXVII z estru Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C): a) HCl $0,05$ mol/l; pH $1,38$; b) HCl $0,10$ mol/l; pH $1,10$; c) HCl $0,20$ mol/l; pH $0,81$; d) HCl $0,30$ mol/l; pH $0,65$; e) HCl $0,40$ mol/l; pH $0,52$; f) HCl $0,50$ mol/l; pH $0,42$	90
Ryc. 26. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni piku substancji badanej do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia ACV i jego estrów...	94
Ryc. 27. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-I w kwasie solnym o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	98
Ryc. 28. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru <i>i</i> But-I w kwasie solnym o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	98
Ryc. 29. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-I w kwasie solnym o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	99
Ryc. 30. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-I w kwasie solnym o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	99
Ryc. 31. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-I w kwasie solnym o stężeniu $0,05 - 0,50$ mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	99
Ryc. 32. Półlogarytmiczne wykresy zależności P_t oraz $(P_\infty - P_t)$ jako funkcji czasu obserwowanej reakcji tworzenia i rozkładu acyklowiru w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C): a) z estru Ac-I (HCl $0,4$ mol/l; pH $0,52$); b) z estru <i>i</i> But-I (HCl $0,1$ mol/l; pH $1,10$); c) z estru Piv-I (HCl $0,3$ mol/l; pH $0,65$).....	101
Ryc. 33. Chromatogramy HPLC związku XXVII poddanego: a) hydrolizie w środowisku obojętnym (H_2O , 90°C , 72 h); b) hydrolizie w środowisku kwasowym (HCl, $0,1$ mol/l, 90°C , 24 h); c) hydrolizie w środowisku zasadowym (NaOH, $0,1$ mol/l, 90°C , 24 h); d) działaniu środka utleniającego (H_2O_2 , 3% , temp. pok., 6 h).....	105
Ryc. 34. Chromatogramy HPLC roztworu związku XXVII poddanego działaniu światła a) dawka $1,2 \cdot 10^6$ lux·h; b) dawka $6,0 \cdot 10^6$ lux·h.....	106
Ryc. 35. Widma FTIR związku XXVII w fazie stałej przed i po ekspozycji na światło ($6,0 \cdot 10^6$ lux·h).....	107
Ryc. 36. Chromatogramy HPLC-MS/MS związku XXVII (przejście masy $356,3/282,1$ m/z) oraz ACV (przejście masy $226,2/152,1$ m/z): a) roztwór wzorcowy XXVII; b) roztwór wzorcowy ACV; c) roztwór XXVII po ekspozycji na światło $1,2 \cdot 10^6$ lux·h (próbka niechroniona); d) roztwór XXVII po ekspozycji na światło $1,2 \cdot 10^6$ lux·h (próbka chroniona); e) roztwór XXVII poddany hydrolizie w środowisku kwasowym (HCl, $0,1$ mol/l, 90°C , 24 h); f) roztwór XXVII poddany działaniu środka utleniającego (H_2O_2 , 3% , temp. pok., 6 h).....	108
Ryc. 37. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni piku substancji badanej do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia związku XXVII i jego estrów w osoczu (seria I).....	115

Ryc. 38. Zmiany stężenia związków Ac-XXVII, <i>i</i> But-XXVII i Piv-XXVII w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).....	119
Ryc. 39. Zmiany stężenia związków Etc-XXVII, Nic-XXVII i XXVII w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).....	119
Ryc. 40. Wykres zależności ilorazu pola powierzchni piku substancji badanej do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego (P) jako funkcja stężenia estrów acyklowiru w osoczu (seria I).....	124
Ryc. 41. Zmiany stężenia estrów Ac-I i <i>i</i> But-I w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).....	126
Ryc. 42. Zmiany stężenia estrów Piv-I, Etc-I i Nic-I w nadsączach osocza w zależności od warunków przechowywania (TP, L, Z).....	127
Ryc. 43. Półlogarytmiczny wykres zależności $c_t = f(t)$ reakcji hydrolizy związku XXVII i jego estrów w osoczu (80%, 37°C).....	129
Ryc. 44. Półlogarytmiczny wykres zależności $c_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estrów acyklowiru w osoczu (80%, 37°C).....	129
Ryc. 45. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	130
Ryc. 46. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru <i>i</i> But-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	130
Ryc. 47. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	130
Ryc. 48. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	131
Ryc. 49. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	131
Ryc. 50. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy związku XXVII w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	131
Ryc. 51. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Ac-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	132
Ryc. 52. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru <i>i</i> But-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	132
Ryc. 53. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Piv-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	132
Ryc. 54. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Etc-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	133
Ryc. 55. Półlogarytmiczny wykres zależności $P_t = f(t)$ reakcji hydrolizy estru Nic-I w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	133
Ryc. 56. Chromatogramy HPLC-MS/MS badanych związków poddanych hydrolizie w temperaturze 37°C: a) w osoczu (80%) przez 24 h; b) w osoczu (80%) w obecności esterazy wieprzowej ($5,50 \cdot 10^{-9}$ mol/l) przez 2h.....	137
Ryc. 57. Widmo IR estru Etc-I.....	140
Ryc. 58. Widmo $^1\text{H-NMR}$ estru Etc-I.....	141
Ryc. 59. Widmo $^{13}\text{C-NMR}$ estru Etc-I.....	141
Ryc. 60. Widmo COSY estru Etc-I.....	142

Ryc. 61. Widmo HMBC estru Etc-I.....	142
Ryc. 62. Wykres zależności obserwowanej stałej szybkości rozkładu estru Ac-XXVII jako funkcja stężenia DMSO.....	150
Ryc. 63. Wykres zależności obserwowanej stałej szybkości rozkładu estru Ac-XXVII jako funkcja stężenia glikolu propylenowego.....	151
Ryc. 64. Półlogarytmiczna zależność $k_{pH} = f(pH)$ reakcji hydrolizy badanych związków: a) związku XXVII i jego estrów; b) estrów ACV, w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$) w temperaturze 37°C	152
Ryc. 65. Wykresy zależności $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$ reakcji hydrolizy badanych estrów: a) estry Ac-XXVII, <i>i</i> But-XXVII; b) ester Etc-XXVII, w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	154
Ryc. 66. Wykresy zależności $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$ reakcji hydrolizy badanych estrów: a) estry Ac-I, <i>i</i> But-I, Piv-I; b) estry Etc-I i Nic-I, w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	154
Ryc. 67. Wykresy zależności: a) $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$; b) $k_{pH} - k'_{pH} = f(f_2)$, reakcji hydrolizy estru Piv-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	155
Ryc. 68. Wykres zależności $k_{pH} = f(f_2)$ reakcji hydrolizy estru Nic-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	155
Ryc. 69. Wykres zależności $k_{obs.} = f(a_{H^+})$ reakcji hydrolizy związku XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	155
Ryc. 70. Półlogarytmiczna zależność $k_{pH} = f(pH)$ reakcji tworzenia i rozkładu związku XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$) w temperaturze 37°C	157
Ryc. 71. Wykres zależności $k_T/f_1 = f(a_{H^+})$ i $k_R/f_1 = f(a_{H^+})$ reakcji tworzenia i rozkładu XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	158
Ryc. 72. Schemat reakcji enzymatycznej (ES – kompleks substratu z enzymem; k_1 , k_{-1} , k_2 – stałe szybkości reakcji cząstkowych).....	164
Ryc. 73. Wykresy zależności $k_{obs.} = f(c_E)$ reakcji hydrolizy a) estrów Ac-XXVII i Ac-I; b) estrów <i>i</i> But-XXVII i <i>i</i> But-I; c) estrów Piv-XXVII i Piv-I; d) estrów Etc-XXVII i Etc-I; e) estrów Nic-XXVII i Nic-I; f) związku XXVII, w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej w temperaturze 37°C	166
Ryc. 74. Zależność $\log S_o = f(\log P)$ analizowanych związków.....	170
Ryc. 75. Półlogarytmiczna zależność $k_H^+ = f(Es(\text{CH}_3))$ analizowanych związków.....	172
Ryc. 76. Mechanizm hydrolizy estrów acyklowiru w środowisku kwasowym: a) estry Ac-, <i>i</i> But-, Piv-, Nic-ACV; b) ester Etc-ACV.....	173
Ryc. 77. Mechanizm hydrolizy trójcyklicznych analogów ACV w środowisku kwasowym: a) estry związku XXVII i dalsza hydroliza powstałego w jej wyniku związku XXVII; b) hydroliza związku XXVII.....	174
Ryc. 78. Półlogarytmiczna zależność $k_{obs.} = f(Es(\text{CH}_3))$ analizowanych związków dla hydrolizy w osoczu (80%, 37°C).....	175
Ryc. 79. Półlogarytmiczna zależność $k_{obs.} = f(Es(\text{CH}_3))$ analizowanych związków dla hydrolizy w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy.....	176

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka acyklowiru.....	13
Tabela 2. Wybrane dipeptydowe pochodne acyklowiru [50].....	22
Tabela 3. Wybrane trójcykliczne pochodne ACV i GCV [64][65].....	29
Tabela 4. Trójcykliczne pochodne A-5021.....	40
Tabela 5. Trójcykliczne analogi ACV i RA-5021.....	41
Tabela 6. Struktura najbardziej aktywnych przeciwwirusowo trójcyklicznych analogów CBV, DXG, AZG oraz MG.....	42
Tabela 7. Wzory strukturalne badanych związków trójcyklicznych.....	62
Tabela 8. Wzory strukturalne zsyntetyzowanych estrów acyklowiru.....	64
Tabela 9. Czasy retencji (t_r), współczynniki retencji ($\log k$) oraz parametry regresji równań (2) i (3).....	69
Tabela 10. Czasy retencji ($t_r \pm \Delta t_r$, S_{tr} , W_z), współczynniki retencji ($\log k$) i współczynniki lipofilowości ($\log P$) substancji wzorcowych ($n = 6$) oraz ocena statystyczna równania (4).....	71
Tabela 11. Czasy retencji ($t_r \pm \Delta t_r$, S_{tr} , W_z), współczynniki retencji ($\log k$) oraz współczynniki lipofilowości ($\log P \pm \Delta \log P$, $S_{\log P}$, W_z) substancji badanych ($n = 6$).....	72
Tabela 12. Wartości $\log k_w$ wyznaczone na podstawie równań (2) i (3) oraz $c \log P$ dla związku XXVII i jego estrów.....	72
Tabela 13. Wartości $\log P$ oraz $c \log P$ dla acyklowiru (I) i jego estrów.....	73
Tabela 14. Przygotowanie roztworów kwasu solnego (0,05 – 0,50 mol/l; $\mu = 0,50$ mol/l).....	73
Tabela 15. Przygotowanie roztworów wodorotlenku sodu (0,05 – 0,50 mol/l).....	74
Tabela 16. Przepływ fazy ruchomej i skład roztworów wzorców wewnętrznych dla oznaczania związku XXVII i jego estrów.....	75
Tabela 17. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach.....	76
Tabela 18. Odważki związków badanych i rozpuszczalniki użyte do rozpuszczenia próbek.....	76
Tabela 19. Stężenia roztworów ACV i związku XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	77
Tabela 20. Stężenia roztworów Ac-XXVII i <i>i</i> But-XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	77
Tabela 21. Stężenia roztworów Piv-XXVII i Etc-XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	78
Tabela 22. Stężenia roztworów Nic-XXVII, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	78
Tabela 23. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków.....	79
Tabela 24. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń ACV, XXVII oraz jego estrów ($n = 8$).....	80
Tabela 25. Objętości roztworów substancji w DMSO dodawane do kwasu solnego, objętości wody użyte do przygotowania roztworów kwasu solnego oraz obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy Ac-XXVII w kwasie solnym o stężeniu 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	82

Tabela 26. Objętości glikolu propylenowego i wody użyte do przygotowania roztworów kwasu solnego oraz obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy Ac-XXVII w kwasie solnym o stężeniu 0,50 mol/l ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	83
Tabela 27. Objętości HCl, NaCl, wody i glikolu propylenowego użyte do przygotowania roztworów kwasu solnego o odpowiednim stężeniu i stałej sile jonowej.....	84
Tabela 28. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy związku XXVII oraz jego estrów w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	88
Tabela 29. Obliczone wartości obserwowanych stałych szybkości tworzenia związku XXVII (k_T) i jego hydrolizy (k_R).....	89
Tabela 30. Skład fazy ruchomej i roztworów wzorców wewnętrznych dla oznaczania poszczególnych estrów acyklowiru.....	91
Tabela 31. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach.....	92
Tabela 32. Odważki związków badanych i objętości HCl użyte do rozpuszczenia próbek.....	92
Tabela 33. Stężenia roztworów ACV i Ac-I, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	93
Tabela 34. Stężenia roztworów <i>i</i> But-I i Piv, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	93
Tabela 35. Stężenia roztworów Etc-I i Nic-I, parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	94
Tabela 36. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków.....	95
Tabela 37. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń ACV oraz jego estrów ($n = 6$).....	95
Tabela 38. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy estrów acyklowiru w kwasie solnym ($\mu = 0,50$ mol/l, 37°C).....	100
Tabela 39. Obliczone wartości obserwowanych stałych szybkości tworzenia ACV (k_{ACV}) i hydrolizy estrów Ac-I, <i>i</i> But-I i Piv-I ($k_{obs.}$) oraz parametry statystyczne testu równoległości.....	102
Tabela 40. Zoptymalizowane parametry analizy MS/MS.....	103
Tabela 41. Zawartość związku XXVII w roztworach poddanych hydrolizie lub działaniu czynnika utleniającego, klasyfikacja wg ICH oraz czasy retencji produktów degradacji.....	104
Tabela 42. Wpływ światła na zawartość związku XXVII w roztworach i w fazie stałej oraz czasy retencji produktów degradacji powstałych w próbkach chronionych i niechronionych.....	107
Tabela 43. Wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza na trwałość substancji badanej.....	109
Tabela 44. Roztwory wzorców wewnętrznych dla oznaczania badanych związków.....	111
Tabela 45. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach.....	111
Tabela 46. Stężenia roztworów związku XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	112
Tabela 47. Stężenia roztworów Ac-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	113
Tabela 48. Stężenia roztworów <i>i</i> But-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	113

Tabela 49. Stężenia roztworów Piv-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	114
Tabela 50. Stężenia roztworów Etc-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	114
Tabela 51. Stężenia roztworów Nic-XXVII, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	115
Tabela 52. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków.....	116
Tabela 53. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń związku XXVII oraz jego estrów w osoczu.....	116
Tabela 54. Skład i przepływ fazy ruchomej oraz roztwory wzorców wewnętrznych dla oznaczania poszczególnych estrów acyklowiru.....	120
Tabela 55. Czasy retencji substancji obserwowanych na chromatogramach.....	121
Tabela 56. Stężenia roztworów Ac-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	121
Tabela 57. Stężenia roztworów <i>i</i> But-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	122
Tabela 58. Stężenia roztworów Piv-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	122
Tabela 59. Stężenia roztworów Etc-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	123
Tabela 60. Stężenia roztworów Nic-I, odpowiadające im wartości P oraz parametry zależności $P = f(c)$ wraz z oceną statystyczną.....	123
Tabela 61. Wartości LOD, LOQ oraz zakresy metod oznaczania badanych związków.....	124
Tabela 62. Precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń estrów acyklowiru ($n = 6$).....	125
Tabela 63. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy badanych związków w osoczu (80%, 37°C).....	129
Tabela 64. Obserwowane stałe szybkości pseudopierwszego rzędu reakcji hydrolizy badanych związków w osoczu (80%, 37°C) w obecności esterazy wieprzowej.....	133
Tabela 65. Skład fazy ruchomej w przedziałach czasu zastosowanej elucji gradientowej.....	136
Tabela 66. Zoptymalizowane parametry analizy MS/MS.....	136
Tabela 67. Analiza korelacji pomiędzy wartościami $\log k_w$ wyznaczonymi na podstawie równań (2) i (3) oraz clogP dla związku XXVII i jego estrów.....	146
Tabela 68. Analiza korelacji pomiędzy wartościami $\log P$ oraz clogP dla acyklowiru i jego estrów.....	146
Tabela 69. Analiza wartości k_w wyznaczonych eksperymentalnie przy użyciu równania liniowego oraz obliczonych na podstawie równania (13) dla związku XXVII i jego estrów.....	148
Tabela 70. Analiza wartości $\log P$ wyznaczonych eksperymentalnie oraz obliczonych na podstawie równania (13) dla ACV i jego estrów.....	148
Tabela 71. Analiza statystyczna wpływu stężenia DMSO i glikolu propylenowego na szybkość rozkładu estru Ac-XXVII.....	150
Tabela 72. Katalityczne stałe szybkości reakcji hydrolizy kwasowej dla związku XXVII i jego estrów oraz estrów ACV w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$, 37°C).....	156

Tabela 73. Parametry opisujące zależność $k_{obs.}/f_1 = f(a_{H^+})$ oraz katalityczne stałe szybkości reakcji tworzenia i rozkładu związku XXVII podczas hydrolizy Ac-XXVII w środowisku kwasu solnego ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}, 37^\circ\text{C}$).....	158
Tabela 74. Parametry opisujące zależność $k_{obs.} = f(c_E)$ reakcji hydrolizy związku XXVII i jego estrów w środowisku osocza ludzkiego w obecności esterazy wieprzowej (37°C).....	165
Tabela 75. Obliczone wartości $\log S_o$ badanych związków.....	169

IX. Piśmiennictwo

- [1] J. Wojnowski: *Wielka Encyklopedia PWN*, tom 16, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003, 239.
- [2] A. Piekarowicz: *Podstawy wirusologii molekularnej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004, 3 – 29.
- [3] G. Sumbali, R. S. Methrora: *The Viruses: Introduction, characteristics and taxonomy*, w *Principles of Microbiology*, Tata McGraw-Hill Education, New Delhi 2009, 153 – 154.
- [4] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, C. A. Vilee: *Wirusy i krolestwo Prokaryotae*, w *Biologia*, Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2000, 508 – 528.
- [5] W. H. Prusoff: *Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine*, *Biochim. Biophys. Acta* 1959, 32, 295 – 296.
- [6] M. Zając, E. Pawełczyk, A. Jelińska: *Pro-leki*, w *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań 2006, 25 – 32.
- [7] W. S. Gumułka: *Farmakodynamika leków stosowanych z zakażeniami i chorobami inwazyjnymi*, w *Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji*, tom 2, red. W. Janiec, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, 1189 – 1215.
- [8] W. Janiec, B. Nowińska, L. Śliwiński: *Leki stosowane w zakażeniach i chorobach inwazyjnych*, w *Kompendium farmakologii*, red. W. Janiec, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, 456 – 464.
- [9] E. De Clercq, H. J. Field: *Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy*, *Br. J. Pharmacol.* 2006, 1, 1 – 11.
- [10] E. De Clercq: *The discovery of antiviral agents: Ten different compounds, ten different stories*, *Med. Res. Rev.* 2008, 28, 929 – 953.
- [11] E. De Clercq: *Another ten stories in antiviral drug discovery (Part C): “Old” and “New” antivirals, strategies, and perspectives*, *Med. Res. Rev.* 2009, 29, 611 – 645.
- [12] H. J. Field, E. De Clercq: *Antiviral drugs – a short history of their discovery and development*, *Microbiology Today* 2004, 31, 58 – 61.
- [13] European Pharmacopoeia 8th Edition, Council of Europe, Strasburg 2014
- [14] International Agency for Research on Cancer: *Aciclovir*, [Online] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol76/mono76-6.pdf>. [Data uzyskania dostępu: 05.12.2015].
- [15] T. Dzieciatkowski, A. Rola, A. Majewska, M. Solarska, M. Łuczak: *Drugs used in antiherpesviral therapy in humans*, *Adv. Microbiol. (Postępy Mikrobiologii)* 2007, 46, 211 – 221.
- [16] H. J. Schaeffer, L. Beauchamp, P. Miranda, G. B. Elion, D. J. Bauer, P. Collins: *9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group*, *Nature* 1978, 272, 583 – 585.
- [17] W. B. Mahony, B. A. Domin, R. T. McConnell, T. P. Zimmerman: *Acyclovir transport into human erythrocytes*, *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 9285 – 9291.
- [18] G. B. Elion: *Mechanism of action and selectivity of acyclovir*, *Am. J. Med* 1982, 73, 7 – 13.
- [19] G. B. Elion, P. A. Furman, J. A. Fyfe: *Selectivity of action of an anti herpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 5716 – 5720.

- [20] B. Golankiewicz: *Synthetic and biological applications of tricyclic analogues of guanosine*, Acta Biochimia Polonica 1996, 43, 53 – 64.
- [21] P. A. Furman, M. H. St Clair, J. A. Fyfe, J. L. Rideout, P. M. Keller, G. B. Elion: *Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine and its triphosphate*, J. Virol. 1979, 32, 72 – 77.
- [22] C. Fletcher, B. Bean: *Evaluation of oral acyclovir therapy*, Drug Intell. Clin. Pharm. 1985, 19, 518 – 524.
- [23] M. Sampson, B. Bloom, R. Lenfestey, B. Harper, A. D. Kashuba, R. Anand: *Pharmacokinetics of intravenous acyclovir in preterm and term infants*, Pediatr. Infect. Dis. J. 2014, 33, 42 – 49.
- [24] C. M. Hay, R. C. Reichman: *Antiviral Drugs*, w Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, wyd. VII, McGraw-Hill, Nowy Jork 2008, 2203 – 2211.
- [25] G. K. McEvoy, red: *American hospital formulary service-drug information 2004*, Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists Inc 2004, 774.
- [26] J. H. Zhang, J. B. Zhu, X. J. Chen, R. Zhao, Y. Y. Gang, Z. H. Wu, K. Cheng, X. Y. Xu: *Pharmacokinetics and bioavailability of sustained release and conventional formulation of acyclovir*, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 2001, 26, 145 – 148.
- [27] J. Soul-Lawton, E. Seaber, N. On, R. Wootton, P. Rolan, J. Posner: *Absolute bioavailability and metabolic disposition of valacyclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans*, Antimicrob. Agents Chemother. 1995, 39, 2759 – 2764.
- [28] A. Hellden, J. Lycke, T. Vander, J. O. Svensson, I. Odar-Cederlof, L. Stahle: *The aciclovir metabolite CMMG is detectable in the CSF of subjects with neuropsychiatric symptoms during aciclovir and valaciclovir treatment*, J. Antimicrob. Chemother. 2006, 57, 945 – 949.
- [29] J. P. Smith, S. Weller, B. Johnson, J. Nicotera, J. M. Luther, D. W. Haas: *Pharmacokinetics of acyclovir and its metabolites in cerebrospinal fluid and systemic circulation after administration of high-dose valacyclovir subjects with normal and impaired renal function*, Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54, 1146 – 1151.
- [30] R. E. Keeney, L. E. Kirk, D. Brigden: *Acyclovir tolerance in humans*, Am. J. Med. 1982, 73 (Supl 1A), 176 – 181.
- [31] D. Pavan-Langston: *Herpes Zoster: Antivirals and pain management*, Ophtalamology 2008, 115, 13 – 20.
- [32] R. Fleischer, M. Johnson: *Acyclovir nephrotoxicity: A case report highlighting the importance of prevention, detection and treatment of acyclovir-induced nephropathy*, Case Reports in Medicine 2010.
- [33] B. N. Becker, P. Fall, C. Hall, D. Milam, J. Leonard, A. Glick i G. Schulman: *Rapidly progressive acute renal failure due to acyclovir: case report and review of literature*, Am. J. Kidney Diseases 1996, 22, 611 – 615.
- [34] P. K. Sodhi, S. K. Ratan: *A Case of chronic renal dysfunction following treatment with oral acyclovir*, Scand. J. Infect. Dis. 2003, 35, 770 – 772.
- [35] P. Gunness, K. Aleksa, J. Bend, G. Koren: *Acyclovir-induced nephrotoxicity: the role of the acyclovir aldehyde metabolite*, Translation Research: J. Lab. Clin. Med. 2001, 158, 290 – 301.
- [36] J. C. Wade, J. D. Meyers: *Neurologic symptoms associated with parenteral acyclovir treatment after marrow transplantation*, Ann. Intern. Med. 1983, 98, 921 – 925.
- [37] A. Helldén, I. Odar-Cederlof, P. Diener, L. Barkholt, C. Medin, J. O. Svensson, J. Sawe, L. Stahle: *High serum concentrations of the acyclovir main metabolite 9-*

- carboxymethoxymethylguanine in renal failure patients with acyclovir-related neuropsychiatric side effects: an observational study*, Nephrol. Dial. Transplant. 2003, 18, 1135 – 1141.
- [38] M. Tod, M. Lokiec, R. Bidault, F. De Bony, O. Petitjean, Y. Aujard: *Pharmacokinetics of oral acyclovir in neonates and in infants: a population analysis*, Antimicrob. Agents Chemother. 2001, 45, 150 – 157.
- [39] M. J. Keller, A. M. Malone, C. A. Carpenter, Y. Lo, M. Huang, L. Corey, R. Willis, C. Nguyen, S. Kennedy, M. Gunawardana, D. Guerrero, J. A. Moss, M. M. Baum, T. J. Smith i B. C. Herold: *Safety and pharmacokinetics of aciclovir in women following release*, J. Antimicrob. Chemother. 2012, 67, 2005 – 2012.
- [40] L. K. Ursell, M. Guanawardana, S. Chang, M. Mullen, J. A. Moss, B. C. Herold, M. J. Keller, D. McDonald, A. Gonzalez, R. Kinght, M. M. Baum: *Comparison of the vaginal microbial communities in women with recurrent genital HSV receiving acyclovir intravaginal rings*, Antiviral Res. 2014, 102, 87 – 94.
- [41] L. Zeng, C. E. Nath, E. Y. Blair, P. J. Shaw, K. Stephen, J. W. Earl, J. C. Coakley, A. J. McLachlan: *Population pharmacokinetics of acyclovir in children and young people with malignancy after administration of intravenous acyclovir or oral valacyclovir*, Antimicrob. Agents Chemother. 2009, 53, 2918 – 2927.
- [42] S. Ganguly: *A randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy of oral acyclovir in the treatment of Pityriasis Rosea*, J. Clin. Diagn. Res. 2014, 8, YC01 – YC04.
- [43] K. R. Beutner: *Valacyclovir: a revive of its antiviral activity, pharmacokinetics properties, and clinical efficacy*, Antiviral Res. 1995, 28, 281 – 290.
- [44] S. Katragadda, R. Jain, D. Kwatra, S. Hariharan, A. K. Mitra: *Pharmacokinetics of amino acid ester prodrugs of acyclovir after oral administration: interaction with the transporters on Caco-2 cells*, Int. J. Pharm. 2008, 362, 93 – 101.
- [45] R. Karaman, K. Dajani, A. Qtait, M. Khamis: *Prodrugs of acyclovir – a computational approach*, Chem. Biol. Drug Des. 2012, 79, 219 – 234.
- [46] G. E. Granero, G. L. Amidon: *Stability of valacyclovir: implications for its oral bioavailability* Int. J. Pharm. 2006, 317, 14 – 18.
- [47] J. Salomon, J. Szepietowski: *Walacyklowir w leczeniu infekcji wirusowych skóry i błon śluzowych spowodowanych wirusami opryszczki i ospy wietrznej*, Przegl. Dermatol. 2012, 99, 707 – 715.
- [48] C. McDougall, J. Guglielmo: *Pharmacokinetics of valacyclovir*, J. Antimicrob. Chemother. 2004, 53, 899 – 901.
- [49] R. S. Talluri, S. K. Samanta, R. Gaudana, A. K. Mitra: *Synthesis, metabolism and cellular permeability of enzymatically stable dipeptide prodrugs of acyclovir*, Int. J. Pharm. 2008, 361, 118 – 124.
- [50] C. R. Santos, R. Capela, C. S. Pereira, E. Valente, L. Gouveia, C. Pannecouque, E. De Clercq: *Structure-activity relationships for dipeptide prodrugs of acyclovir: implications for prodrug design*, Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 2339 – 2346.
- [51] R. S. Talluri, R. Gaudana, S. Hariharan, R. Jain, A. K. Mitra: *Disposition kinetics of a dipeptide ester prodrug of acyclovir and its metabolites following intravenous and oral administrations in rat*, Clin. Res. Regul. Aff. 2009, 26, 65 – 72.
- [52] Z. Shao, G. B. Park, R. Krishnamoorthy, A. K. Mitra: *The physicochemical properties, plasma enzymatic hydrolysis and nasal absorption of acyclovir and it's 2'-ester prodrugs*, Pharm. Res. 1994, 11, 237 – 242.

- [53] M. Zacchigna, G. Di Luca, V. Maurich, E. Boccu: *Synthesis, chemical and enzymatic stability of New poly(ethylene glycol)-acyclovir prodrugs*, *Il Farmaco* 2002, 57, 207 – 214.
- [54] T. A. Krenitsky, W. W. Hall, P. Miranda, L. M. Beauchamp, H. J. Schaeffer, P. D. Whiteman: *6-Deoxyacyclovir: a xanthine oxidase-activated prodrug of acyclovir*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 3209 – 3213.
- [55] E. De Clercq: *Trends in the development of new antiviral agents for the chemotherapy of infections caused by herpesviruses and retroviruses*, *Rev. Med. Vir.* 1995, 5, 149 – 165.
- [56] L. M. Beauchamp, G. F. Orr, P. Miranda, T. Burnette, T. A. Krenitsky: *Amino acid ester prodrugs of acyclovir*, *Antivir. Chem. Chemother.* 1992, 3, 157 – 164.
- [57] S. S. Good, H. C. Krasny, G. B. Elion, P. Miranda: *Disposition of the dog and the rat of 2,6-diamino-9-(2-hydroxyethoxymethyl)purine (A134U), a potential prodrug of acyclovir*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983, 227, 644 – 651.
- [58] M. J. Robins, P. W. Hatfield, J. Balzarini, E. Ce Clercq: *Nucleic acid related compounds. Synthesis and biological activities of pyrimidine and purine “acyclic” nucleoside analogues*, *J. Med. Chem.* 1984, 27, 1486 – 1492.
- [59] L. M. Beauchamp, B. L. Dolmatch, H. J. Schaeffer, P. Collins, D. J. Bauer, P. M. Keller, J. A. Fyfe: *Modifications on the heterocyclic base of acyclovir: synthesis and antiviral properties*, *J. Med. Chem.* 1985, 28, 982 – 987.
- [60] B. T. Golding, P. K. Slaich, W. P. Watson: *The structures of adducts from the reaction between guanosine and glycidaldehyde (oxiranecarbaldehyde): a ¹⁵N labelling study*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1986, 515 – 517.
- [61] J. Boryski, B. Golankiewicz, E. De Clercq: *Synthesis and antiviral activity of novel N-substituted derivatives of acyclovir*, *J. Med. Chem.* 1988, 31, 1351 – 1355.
- [62] B. Golankiewicz, T. Ostrowski, J. Boryski, E. De Clercq: *Synthesis of acycloxyosine and acyclo-3-methylguanosine, as probes for some chemical and biological properties resulting from the N-3 substitution of guanosine and its analogues*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1991, 1, 589 – 593.
- [63] J. Boryski, B. Golankiewicz, E. De Clercq: *Synthesis and antiviral activity of 3-substituted derivatives of 3,9-dihydro-9-oxo-5H-imidazo[1,2-a]purines, tricyclic analogues of acyclovir and gancyclovir*, *J. Med. Chem.* 1991, 34, 2380 – 2383.
- [64] B. Golankiewicz, T. Ostrowski, T. Gośliński, P. Januszczyk, J. Zeidler, D. Baranowski, E. De Clercq: *Fluorescent tricyclic analogues of acyclovir and gancyclovir. A structure-antiviral activity study*, *J. Med. Chem.* 2001, 44, 4284 – 4287.
- [65] B. Golankiewicz, T. Ostrowski: *Tricyclic nucleoside analogues as antiherpes agents*, *Antiviral Res.* 2006, 71, 134 – 140.
- [66] B. Golankiewicz, T. Ostrowski, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq: *Tricyclic analogues of acyclovir and gancyclovir. Influence of substituents in the heterocyclic moiety on the antiviral activity*, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 3187 – 3190.
- [67] T. Ostrowski, J. Zeidler, T. Gośliński, B. Golankiewicz: *Substituent – directed aralkylation and alkylation reactions of the tricyclic analogues of acyclovir and guanosine*, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 2000, 19, 1911 – 1929.
- [68] W. Zielenkiewicz, G. I. Perlovich, B. Golankiewicz: *Thermodynamic properties of aqueous solution of 1,N2-(prop-1-ene-1,2-diyl)acyclovir*, *J. Thermal. Anal.* 1998, 54, 237 – 241.
- [69] W. Zielenkiewicz, B. Golankiewicz, G. I. Perlovich, M. Kozbial: *Aqueous solubilities, infinite dilution activity coefficients and octanol-water partition coefficients of tricyclic analog of acyclovir*, *J. Solution Chem.* 1999, 28, 731 – 745.

- [70] A. K. Field, K. K. Biron: *'The end of innocence' revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs*, Clin. Microbiol. Rev. 1994, 7, 1 – 13.
- [71] T. Ostrowski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini: *Fluorosubstitution and 7-alkylation as prospective modifications of biologically active 6-aryl derivatives of tricyclic acyclovir and ganciclovir analogues*, Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 2089 – 2096.
- [72] T. Gośliński, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini: *Synthesis and biological activity of strongly fluorescence tricyclic analogues of acyclovir and ganciclovir*, J. Med. Chem. 2002, 45, 5052 – 5057.
- [73] T. Gośliński, G. Wenska, B. Golankiewicz, J. Balzarini, E. De Clercq: *Synthesis and fluorescent properties of 6-(4-biphenyl)-3,9-dihydro-9-oxo-5H-imidazo[1,2-a]purine analogues of acyclovir and ganciclovir*, Nucleos. Nucleot. Nucl. 2003, 22, 911 – 914.
- [74] T. Gośliński, P. Januszczyk, G. Wenska, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini: *Synthesis and fluorescent properties of the tricyclic analogues of acyclovir linked with nitrogen heterocyclic units*, Nucleos. Nucleot. Nucl. 2005, 24, 571 – 575.
- [75] J. Balzarini, T. Ostrowski, T. Goslinski, E. De Clercq, B. Golankiewicz: *Pronounced cytostatic activity and bystander effect of a novel series of fluorescent tricyclic acyclovir and ganciclovir derivatives in herpes simplex virus thymidine kinase gene-transduced tumor cell lines*, Gene Ther. 2002, 9, 1173 – 1182.
- [76] D. G. Brown, R. Visse, G. Sandhu, A. Davies, P. J. Rizkallah, C. Melitz, W. C. Summers, M. R. Sanderson: *Crystal structures of the thymidine kinase from Herpes simplex virus type 1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir*, Nature Struct. Biol. 1995, 2, 876 – 881.
- [77] J. Czaplicki, T. Bohner, A. K. Habermann, G. M. Folkers, A. Milon: *A transferred NOE study of a tricyclic analog of acyclovir bound to thymidine kinase*, J. Biomol. NMR 1996, 8, 261 – 272.
- [78] B. Hładoń, T. Gośliński, H. Laskowska, D. Baranowski, T. Ostrowski, J. Zeidler, P. Ruszkowski, B. Golankiewicz: *In vitro cytostatic activity of 8-substituted and tricyclic analogues of acyclovir*, Pol. J. Pharmacol. 2002, 54, 45 – 53.
- [79] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney: *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*, Adv. Dug Deliv. Rev. 2001, 46, 3 – 26.
- [80] M. Koźbiał, P. Gierycz: *Comparison of aqueous and 1-octanol solubility as well as liquid–liquid distribution of acyclovir derivatives and their complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, J. Solution Chem. 2013, 42, 866 – 881.
- [81] W. Zielenkiewicz, M. Koźbiał, B. Golankiewicz, J. Poznański: *Enhancement of aqueous solubility of tricyclic acyclovir derivatives by their complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, J. Therm. Anal. Calorim. 2010, 101, 555 – 560.
- [82] M. Koźbiał, P. Gierycz: *Partitioning and complexation study of bioactive tricyclic acyclovir derivative with cyclodextrins*, J. Chem. Thermodyn. 2014, 72, 23 – 30.
- [83] T. Sekiyama, S. Hatsuya, Y. Tanaka, M. Uchiyama, N. Ono: *Synthesis and Antiviral Activity of Novel Acyclic Nucleosides: Discovery of a cyclopropyl nucleoside with potent inhibitory activity against herpesviruses*, J. Med. Chem. 1998, 41, 1284 – 1298.
- [84] S. Iwayama, N. Ono, Y. Ohmura, K. Suzuki, M. Aoki, H. Nakazawa: *Antiherpesvirus activities of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine (A-5021) in cell culture*, Antimicrob. Agents Chemother. 1998, 42, 1666 – 1670.
- [85] J. Neyts, L. Naesens, C. Ying, L. De Bolle, E. De Clercq: *Anti-herpesvirus activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)-cycloprop-1'-yl]methyl] x guanine (A-5021) in vitro and in vivo*, Antiviral Res. 2001, 49, 115 – 120.

- [86] T. Ostrowski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini: *Synthesis and biological activity of tricyclic analogues of 9-[[cis-1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine*, Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 3535 – 3542.
- [87] P. Wigerinck, C. Pannecouque, R. Snoeck, P. Claes, E. De Clercq, P. Herdewijn: *5-(5-Bromothien-2-yl)-2'-deoxyuridine and 5-(5-chlorothien-2-yl)-2'-deoxyuridine are equipotent to (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in the inhibition of herpes simplex virus type I replication*, J. Med. Chem. 1991, 34, 2383 – 2389.
- [88] P. Wigerinck, L. Kerremans, P. Cleas, R. Snoeck, P. Maudgal, E. de Clercq, P. Herdewijn: *Synthesis and antiviral activity of 5-thien-2-yl-2'-deoxyuridine analogs*, J. Med. Chem. 1993, 36, 538 – 543.
- [89] U. Koch, B. Attenni, S. Malancona, S. Colarusso, I. Conte, M. Di Filippo, S. Harper, B. Pacini, C. Giomini, S. Thomas, I. Incitti, L. Tomei, R. De Francesco, S. Altamura, V. G. Matassa, F. Narjes: *2-(2-Thienyl)-5,6-dihydroxy-4-carboxypyrimidines as inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: discovery, SAR, modeling, and mutagenesis*, J. Med. Chem. 2006, 49, 1693 – 1705.
- [90] M. Hocek, P. Naus, R. Pohl, I. Votruba, P. A. Furman, P. M. Tharnish, M. J. Otto: *Cytostatic 6-arylpurine nucleosides. 6. SAR in anti-HCV and cytostatic activity of extended series of 6-hetarylpurine ribonucleosides*, J. Med. Chem. 2005, 48, 5869 – 5873.
- [91] C. L. Verlinde, M. Callens, S. Van Calenbergh, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, V. Hannaert, P. A. Michels, F. R. Opperdoes, W. G. Hol: *Selective Inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: Toward new drugs for the treatment of sleeping sickness*, J. Med. Chem. 1994, 37, 3605 – 3613.
- [92] M. Brændvang, L. Gundersen: *Selective anti-tubercular purines: Synthesis and chemotherapeutic properties of 6-aryl- and 6-heteroaryl-9-benzylpurines*, Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 6360 – 6373.
- [93] T. Ostrowski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, G. Andrei, R. Snoeck: *Synthesis and anti-VZV activity of 6-heteroaryl derivatives of tricyclic acyclovir and 9-[[cis-1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine analogues*, Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 3313 – 3317.
- [94] F. Amblard, E. Fromentin, M. Detorio, A. Obikhod, K. L. Rapp, T. R. McBrayer, T. Whitaker, S. J. Coats, R. F. Schinazi: *Synthesis, antiviral activity, and stability of nucleoside analogs containing tricyclic bases*, Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 3845 – 3851.
- [95] K. M. Huttunen, H. Raunio, J. Raunio: *Prodrugs-from serendipity to rational design*, Pharmacol. Rev. 2011, 63, 750 – 771.
- [96] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimach, R. Oliyai, D. Oh, T. Jarvinen, J. Savolainen: *Prodrugs: design and clinical applications*, Nature Rev. Drug Discov. 2008, 7, 255 – 270.
- [97] A. Albert: *Chemical aspects of selective toxicity*, Nature 1958, 182, 421 – 423.
- [98] B. Testa: *Prodrug research: futile or fertile?*, Biochem. Pharmacol. 2004, 68, 2097 – 2106.
- [99] V. J. Stella, R. T. Borchardt RT, M. J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. W. Tilley: *Prodrugs: Challenges and Rewards Part 1 & 2*, Springer Science + Business Media, Nowy Jork 2007.
- [100] J. B. Zawilska, J. Wojcieszak, A. B. Olejniczak: *Prodrugs: A challenge for the drug development*, Pharmacol. Rep. 2013, 65, 1 – 14.
- [101] V. J. Stella: *Prodrugs: Some thoughts and current issues*, J. Pharm. Sci. 2010, 99, 4755 – 4765.
- [102] B. Testa: *Prodrugs: Bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2009, 13, 338 – 344.

- [103] R. Karaman: *Prodrugs design based on inter- and intramolecular chemical processes*, Chem. Biol. Drug Des. 2013, 82, 643 – 668.
- [104] N. R. Srinivas: *The rationality for using prodrug approach in drug discovery programs for new xenobiotics: opportunities and challenges*, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 2011, 36, 49 – 59.
- [105] R. Silverman: *The organic chemistry of drug design and drug action*, wyd. II, Elsevier Academic Press, Burlington 2004.
- [106] P. Nuhn, R. Neubert: *The biochemical basis of pharmaceutical chemistry. 9. The effect of structure on biopharmaceutic/pharmacokinetic behavior*, Pharmazie 1991, 46, 61 – 72.
- [107] N. Das, M. Dhanawat, B. Dash, R. C. Nagarwal, S. K. Shrivastava: *Codrug: An efficient approach for drug optimization*, Eur. J. Pharm. Sci. 2010, 41, 571 – 588.
- [108] A. Stańczak, A. Ferra: *Prodrugs and soft drugs*, Pharmacol. Rep. 2006, 58, 599 – 613.
- [109] G. R. Kokil, P. V. Rewatkar: *Bioprecursor prodrugs: molecular modification of the active principle*, Mini Rev. Med. Chem. 2010, 10, 1316 – 1330.
- [110] C. G. Wermuth: *Designing prodrugs and bioprecursors*, w Drug Design: Fact or Fantasy, red. G. Jolles, K. R. Woolridge, Academic Press, Londyn 1984, 47 – 72.
- [111] B. M. Liederer, R. T. Borchardt: *Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs*, J. Pharm. Sci. 2006, 95, 1177 – 1195.
- [112] S. D. Clas, R. I. Sanchez, R. Nofsinger: *Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges*, Drug Discov. Today 2014, 19, 79 – 87.
- [113] C. E. Wheelock, T. F. Severson i B. D. Hammock: *Synthesis of new carboxylesterase inhibitors and evaluation of potency and water solubility*, Chem. Res. Toxicol. 2001, 14, 1563 – 1572.
- [114] S. Benchairt, C. L. Morton, J. L. Hyatt, P. Kuhn, M. K. Danks, P. M. Potter, M. R. Redinbo: *Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer's drug tacrine: From binding promiscuity to selective inhibition*, Chem. Biol. 2003, 10, 341 – 349.
- [115] T. Satoh, M. Hosokawa: *Structure, function and regulation of carboxylesterases*, Chem. Biol. Interact. 2006, 162, 195 – 211.
- [116] T. Satoh, P. Taylor, W. F. Bosron, S. P. Sanghani, M. Hosokawa, B. N. La Du: *Current progress on esterases: from molecular structure to function*, Drug Metab. Dispos. 2002, 30, 488 – 493.
- [117] M. Miwa, M. Ura, M. Nishida, N. Sawada, T. Ishikawa, K. Mori, N. Shimma, I. Umeda, H. Ishitsuka: *Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue*, Eur. J. Cancer 1998, 34, 1274 – 1281.
- [118] P. D. Senter, H. Marquardt, B. A. Thomas, B. D. Hammock, I. S. Frank, H. P. Svensson: *The role of rat serum carboxylesterase in the activation of paclitaxel and camptothecin prodrugs*, Cancer Res. 1996, 7, 1471 – 1474.
- [119] Y. Yoshigae, T. Imai, M. Taketani, M. Otagiri: *Characterization of esterases involved in the stereoselective hydrolysis of ester-type prodrugs of propranolol in rat liver and plasma*, Chirality 1999, 11, 10 – 13.
- [120] D. M. Quinn: *Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states*, Chem. Rev. 1987, 87, 955 – 979.

- [121] R. V. Tak, D. Pal, H. Gao, S. Dey, A. K. Mitra: *Transport of acyclovir ester prodrugs through rabbit cornea and SIRC-rabbit corneal epithelial cell line*, J. Pharm. Sci. 2001, 90, 1505 – 1515.
- [122] M. Nakamura, E. Shirasawa, M. Hikida: *Characterization of esterases involved in the hydrolysis of dipivefrin hydrochloride*, Ophthalmic Res. 1993, 25, 46 – 51.
- [123] E. H. Sklan, A. Lowenthal, M. Korner, Y. Ritov, D. M. Landers, T. Rankinen, C. Bouchard, A. S. Leon, T. Rice, D. C. Rao, J. H. Wilmore, J. S. Skinner, H. Soreq: *Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in health, risk factors, exercise training, and genetics study*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 5512 – 5517.
- [124] B. Fuhrman, A. Partoush, M. Aviram: *Acetylcholine esterase protects LDL against oxidation*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 322, 974 – 978.
- [125] H. Sun, Y. P. Pang, O. Lockridge, S. Brimijoin: *Re-engineering butyrylcholinesterase as a cocaine hydrolase*, Mol. Pharmacol. 2002, 62, 220 – 224.
- [126] O. Lockridge: *Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine*, Pharmacol. Ther. 1990, 47, 35 – 60.
- [127] E. Masson, M. T. Froment, P. L. Fortier, J. E. Visicchio, C. F. Bartels, O. Lockridge: *Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin related neutral esters*, Biochim. Biophys. Acta 1998, 1387, 41 – 52.
- [128] O. Lockridge, N. Mottershow-Jackson, H. W. Eckerson: B. N. La Du: *Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase*, J. Pharmac. Exp. Ther. 1980, 215, 1 – 8.
- [129] A. Tunek, E. Levin, L. A. Svensson: *Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro*, Biochem. Pharmacol. 1988, 37, 3867 – 3876.
- [130] C. Meyers, O. Lockridge, B. N. La Du: *Hydrolysis of methylprednisolone acetate by human serum cholinesterase*, Drug Metab. Dispos. 1982, 10, 279 – 280.
- [131] J. F. Gilmer, L. M. Moriarty, M. N. Lally, J. M. Clancy: *Isosorbide-based aspirin prodrugs: II. Hydrolysis kinetics of isosorbide diaspirinate*, Eur. J. Pharm. Sci. 2002, 16, 297 – 304.
- [132] P. Gajewski, M. Tomaniak, K. J. Filipiak: *Paraoksonaza 1 - co o niej obecnie wiadomo? Paraoksonaza 1 - what do we know today?*, Folia Cardiologica 2015, 10, 183 – 189.
- [133] D. Litvinov, H. Mahini, M. Garelnabi: *Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases*, N. Am. J. Med. Sci. 2012, 4, 523 – 532.
- [134] D. I. Draganov, B. N. La Du: *Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2004, 369, 78 – 88.
- [135] K. Tougou, A. Nakamura, S. Watanabe, Y. Okuyama, A. Morino: *Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent*, Drug Metab. Dispos. 1998, 26, 355 – 359.
- [136] A. Salvi, P. A. Carrupt, J. M. Mayer, B. Testa: *Esterase-like activity of human serum albumin toward prodrug esters of nicotinic acid*, Drug Metab. Dispos. 1997, 25, 395 – 398.
- [137] R. M. Laethem, T. A. Blumenkopf, M. Cory, L. Elwell, C. P. Moxham, P. H. Ray, L. M. Walton, G. K. Smith: *Expression and characterization of human pancreatic preprocarboxypeptidase A1 and preprocarboxypeptidase A2*, Arch. Biochem. Biophys. 1996, 332, 8 – 18.

- [138] R. S. Sidhu, A. H. Blair: *Human liver aldehyde dehydrogenase. Esterase activity*, J. Biol. Chem. 1975, 250, 7894 – 7898.
- [139] J. A. Verpoorte, S. Mehta, J. T. Edsall: *Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C*, J. Biol. Chem. 1967, 242, 4221 – 4229.
- [140] H. Tsunematsu, S. Yoshida, K. Horie, M. Yamamoto: *Synthesis and the stereoselective enzymatic hydrolysis of flurbiprofen-basic amino acid ethyl esters*, J. Drug Target. 1995, 2, 517 – 525.
- [141] T. Tsujita, K. Shirai, Y. Saito, H. Okuda: *Relationship between lipase and esterase*, Prog. Clin. Biol. Res. 1990, 344, 915 – 933.
- [142] F. J. Gonzalez, R. H. Tukey: *Drug metabolism*, w Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, The McGraw-Hill Companies Inc., Nowy Jork 2006, 71 – 91.
- [143] B. Testa, S. D. Kramer: *The biochemistry of drug metabolism—an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes*, Chem. Biodivers. 2007, 4, 257 – 405.
- [144] S. D. Kramer, B. Testa: *The biochemistry of drug metabolism—an introduction: Part 6. Inter-individual factors affecting drug metabolism*, Chem. Biodivers. 2008, 5, 2465 – 2578.
- [145] D. A. Sica, T. W. Gehr, S. Ghosh: *Clinical pharmacokinetics of losartan*, Clin. Pharmacokinet. 2005, 44, 797 – 814.
- [146] P. J. Neuvonen: *Drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): the importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics*, Curr. Opin. Investing. Drugs 2010, 11, 323 – 332.
- [147] L. Wallentin: *P2Y₁₂ inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use*, Eur. Heart J. 2009, 30, 1964 – 1977.
- [148] H. S. Smith: *Opioid metabolism*, Mayo Clin. Proc. 2009, 84, 613 – 624.
- [149] K. M. Huttunen, N. Mahonen, H. Raunio, J. Raunio: *Cytochrome P450 activated prodrugs: targeted drug delivery*, Curr. Med. Chem. 2008, 15, 2346 – 2365.
- [150] V. C. Jordan: *New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer*, Steroids 2007, 72, 829 – 842.
- [151] T. Imai: *Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design*, Drug Metab. Pharmacokinet. 2006, 21, 173 – 185.
- [152] T. Satoh, M. Hosokawa: *The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1998, 38, 257 – 288.
- [153] B. Bukowska, D. Pieniążek, K. Hutniki, W. Duda: *Acetylo- i butyrylocholinoesteraza - budowa, funkcje i ich inhibitory*, Curr. Top. Biophys. 2007, 30, 11 – 23.
- [154] V. N. Talesa: *Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease*, Mech. Ageing Dev. 2001, 122, 1961 – 1969.
- [155] K. Biggadike, R. M. Angell, C. M. Burgess, R. M. Farrell, A. P. Hancock, A. J. Harker, W. R. Irving, C. Ioannou, P. A. Procopiou, R. E. Shaw, Y. E. Solanke, O. M. Singh, M. A. Snowden, R. J. Stubbs, S. Walton, H. E. Weston: *Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism*, J. Med. Chem. 2000, 43, 19 – 21.
- [156] T. Imai, M. Imoto, H. Sakamoto, M. Hashimoto: *Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predicting human intestinal absorption*, Drug Metab. Dispos. 2005, 33, 1185 – 1190.

- [157] K. Beaumont, R. Webster, I. Gardner, K. Dack: *Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist*, *Curr. Drug Metab.* 2003, 4, 461 – 485.
- [158] A. Stańczak, M. Szumilak: *Proleki w terapii nowotworów. Część II. Strategie ADEPT i V/GDEPT*, *Farm. Przegl. Nauk.* 2010, 5, 11 – 16.
- [159] F. Kraftz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke: *Prodrug strategies in anticancer chemotherapy*, *Chem. Med. Chem.* 2008, 3, 20 – 53.
- [160] K. Hida, J. Hanes, M. Ostermeier: *Directed evolution for drug and nucleic acid delivery*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 1562 – 1578.
- [161] I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer: *Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997, 26, 151 – 172.
- [162] P. D. Senter, J. C. Springer: *Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 53, 247 – 264.
- [163] P. Wentworth, A. Datta, D. Blakley, T. Boyle, L. J. Partridge, G. M. Blackburn: *Toward antibody-directed “abzyme” prodrug therapy, ADAPT: carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its in vitro application to human tumor cell killing*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 799 – 803.
- [164] A. Mayer, R. J. Francis, S. K. Sharma, B. Tolner, C. J. Springer, J. Martin, G. M. Boxer, J. Bell, A. J. Green, J. A. Hartley, C. Cruickshank, J. Wren, K. A. Chester, R. H. Begent: *A phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFECP1 and a bis-iodo phenol mustard prodrug*, *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 6509 – 6516.
- [165] A. Mayer, R. Francis, S. K. Sharma, C. Sully, S. Parker, B. Tolner, N. Griffin, N. Germain, P. Beckett, G. Boxer, A. Green, K. A. Chester, R. H. Begent: *A phase I/II trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) with MFECP1 and ZD2767P*, *Br. J. Cancer* 2004, 91 (Supl 1), 8 – 23.
- [166] P. D. Senter: *Activation of prodrugs by antibody-enzyme conjugates: a new approach to cancer therapy*, *FASEB J.* 1990, 4, 188 – 193.
- [167] V. M. Vrudhula, P. D. Senter, K. J. Fischer, P. M. Wallace: *Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin-G amidase conjugate*, *J. Med. Chem.* 1993, 36, 919 – 923.
- [168] K. Bosslet, J. Czech, D. Hoffmann: *Tumor-selective prodrug activation by fusion protein-mediated catalysis*, *Cancer Res.* 1994, 54, 2151 – 2159.
- [169] V. M. Vrudhala, H. P. Svensson, P. D. Senter: *Cephalosporin derivatives of doxorubicin and melphalan and their activation by monoclonal antibody- lactamase conjugates*, *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1380 – 1385.
- [170] R. P. Alexander, N. R. Beeley, M. O'Driscoll, F. P. O'Neill, T. A. Millican, A. J. Pratt, F. W. Willenbrock: *Cephalosporin nitrogen mustard carbamate prodrugs for „ADEPT”*, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 3269 – 3272.
- [171] G. R. Melton, R. F. Sherwood: *Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy*, *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88, 153 – 156.
- [172] P. M. Wallace, J. F. Macmaster, V. F. Smith, D. E. Kerr, P. D. Senter, W. L. Cosand: *Intratumor generation of 5-fluorouracil mediated by an antibody-cytosine deaminase conjugate in combination with 5-fluorocytosine*, *Cancer Res.* 1994, 54, 2719 – 2723.
- [173] P. D. Senter, M. G. Saulnier, G. J. Schreiber, D. L. Hirschberg, J. P. Brown, K. E. Hellström: *Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 4842 – 4846.

- [174] C. J. Springer, I. Niculescu-Duvaz: *Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT): choice of prodrugs*, Adv. Drug Deliv. Rev. 1996, 22, 351 – 364.
- [175] D. J. Kerr, L. S. Young, P. F. Searle, I. A. McNeish: *Gene directed enzyme prodrug therapy for cancer*, Adv. Drug Deliv. Rev. 1997, 26, 173 – 184.
- [176] M. Rooseboom, J. N. Commandeur, N. P. E. Vermeulen: *Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs*, Pharmacol. Rev. 2004, 56, 53 – 102.
- [177] A. D. William: *Suicide gene therapy*, J. Biomed. Biotechnol. 2003, 1, 48 – 70.
- [178] C. Avendano, C. J. Menendez: *Medicinal chemistry of anticancer drugs*, Elsevier B.V., Oxford 2008.
- [179] S. H. Chen, H. D. Shine, J. C. Goodman, R. G. Grossman, S. L. Woo: *Gene therapy for brain tumors: Regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 3054 – 3057.
- [180] C. A. Mullen, M. Kilstrup, R. M. Blaese: *Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers ethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 33 – 37.
- [181] X. Guo, T. R. Evans, S. Somanath, A. L. Armesilla, J. L. Darling, A. Schatzlein, J. Cassidy, W. Wang: *In vitro evaluation of cancer-specific NF- κ B-CEA enhancer-promoter system for 5-fluorouracil prodrug gene therapy in colon cancer cell lines*, Br. J. Cancer 2007, 97, 745 – 754.
- [182] C. R. Miller, C. R. Williams, D. J. Buchsbaum, G. Y. Gillespie: *Intratumoral 5-fluorouracil produced by cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human glioblastomas*, Cancer Res. 2002, 62, 773 – 780.
- [183] A. V. Patterson, M. P. Saunders, O. Greco: *Prodrugs in genetic chemoradiotherapy*, Curr. Pharm. Des. 2003, 9, 2131 – 2154.
- [184] L. Chen i D. J. Waxman: *Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer*, Curr. Pharm. Des. 2002, 8, 1405 – 1416.
- [185] P. Garnier, X. T. Wang, M. A. Robinson, S. van Kasteren, A. C. Perkins, M. Frier, A. J. Fairbanks, B. G. Davis: *Lectin-directed enzyme activated prodrug therapy (LEAPT): Synthesis and evaluation of rhamnose-capped prodrugs*, J. Drug Target. 2010, 18, 794 – 802.
- [186] M. A. Robinson, S. T. Charlton, P. Garnier, X. T. Wang, S. S. Davis, A. C. Perkins, M. Frier, R. Duncan, T. J. Savage, D. A. Wyatt, S. A. Watson, B. G. Davis: *LEAPT: Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 14527 – 14532.
- [187] G. D. Brown, S. Gordon: *Immune recognition: A new receptor for β -glucans*, Nature 2001, 413, 36 – 37.
- [188] S. J. Lee, S. Evers, D. Roeder, A. F. Parlow, J. Risteli, L. Risteli, Y. C. Lee, T. Feizi, H. Langen, M. C. Nussenzweig: *Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis*, Science 2002, 295, 1898 – 1901.
- [189] E. Beutler: *Gaucher disease*, Blood Rev. 1988, 2, 59 – 70.
- [190] S. Aquaro, P. Bagnarelli, T. Guenci, A. De Luca, M. Clementi, E. Balestra, R. Calio, C. F. Perno: *Long-term survival and virus production in human primary macrophages infected by human immunodeficiency virus*, J. Med. Virol. 2002, 68, 479 – 488.
- [191] Y. Henchoz, B. Bard, D. Guillarme, P. A. Carrupt, J. L. Veuthey, S. Martel: *Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution*, Anal. Bioanal. Chem. 2009, 394, 707 – 729.

- [192] T. Bączek, M. Markuszewki, R. Kaliszan: *Linear and quadratic relationships between retention and organic modifier content in eluent in reversed phase high-performance liquid chromatography: A systematic comparative statistical study*, J. High. Resol. Chromatogr. 2000, 23, 667 – 676.
- [193] J. E. Haky, A. M. Young: *Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds*, J. Liq. Chromatogr. 1984, 7, 675 – 689.
- [194] X. Fei, Q. H. Zheng: *Lipophilicity coefficients of [11C]MeHalo-CGS 27023A analogs determined by HPLC*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2005, 28, 939 – 945.
- [195] A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, J. Watts: *Clarke's analysis of drugs and poisons. 4th ed.*, 2011 [Online]: <http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current/d1e579315.html>. [Data uzyskania dostępu: 22.09.2015].
- [196] H. Bundgaard, E. Jensen, E. Falch: *Water-soluble, solution-stable, and biolabile N-substituted (aminomethyl)benzoate ester prodrugs of acyclovir*, Pharmaceut. Res. 1991, 8, 1087 – 1093.
- [197] C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman: *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic, and steric constants*, American Chemical Society, Waszyngton 1995.
- [198] OECD Guideline for Testing of Chemicals – Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. Draft Guideline 117, 2004. [Online]: <http://www.oecdlibrary.org/content/book/9789264069824-en>. [Data uzyskania dostępu: 22.09.2015].
- [199] E. Pawełczyk, T. Hermann: *Podstawy trwałości leków*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1982, 68 – 69.
- [200] H. Gao, A. K. Mitra: *NMR spectral data for acyclovir prodrugs*, Magn. Reson. Chem. 1999, 37, 687 – 689.
- [201] H. Gao, A. K. Mitra: *Synthesis of acyclovir, ganciclovir and their prodrugs: a review*, Synthesis 2000, 3, 329 – 351.
- [202] R. De Regil-Hernandez, F. Martinez-Lagos, A. Rodrigez-Bayon, J. V. Sinisterra: *New green synthesis and formulations of acyclovir prodrugs*, Chem. Pharm. Bull. 2011, 59, 1089 – 1093.
- [203] H. Bando, T. Takagi, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida: *Theoretical design of prodrug-enhancer combination based on a skin diffusion model: prediction of permeation of acyclovir prodrugs treated with 1-geranylazacycloheptan-2-one*, Pharm. Res. 1996, 13, 427 – 432.
- [204] M. A. Lesniewska, T. Ostrowski, J. Zeidler, I. Muszalska: *Ester groups as carriers of antivirally active tricyclic analogue of acyclovir in prodrugs designing: Synthesis, lipophilicity – comparative statistical study of the chromatographic and theoretical methods, validation of the HPLC method*, Comb. Chem. High Throughput Screen. 2014, 17, 639 – 650.
- [205] R. Mannhold, K. Dross: *Calculation procedures for molecular lipophilicity: A comparative study*, Quant. Struct.-Act. Relat. 1996, 15, 403 – 409.
- [206] U. Franke, A. Munk, M. Wiese: *Ionization constants and distribution coefficients of phenothiazines and calcium channel antagonists determined by a pH-metric method and correlation with calculated partition coefficients*, J. Pharm. Sci. 1999, 88, 89 – 95.
- [207] Q. A. Xu, T. L. Madden: *Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology*, Wiley, Hoboken 2011, 17 – 18.

- [208] G. Wenska, J. Koput, M. Insinska-Rak, B. Golankiewicz, T. Goslinski, T. Ostrowski: *Spectral and photophysical properties of some imidazo[1,2-a]purine derivatives related to acyclovir*, J. Photochem. Photobiol. A 2004, 163, 171 – 180.
- [209] M. Bełtowska-Brzezinska: *Podstawy kinetyki chemicznej - skrypt do wykładów*, Wydział Chemii UAM, Poznań 2009, 61 – 66.
- [210] A. Molski, *Wprowadzenie do kinetyki chemicznej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2001, pp. 128-134.
- [211] R. W. Taft: *Polar and steric substituent constants for aliphatic and o-benzoate groups from rates of esterification and hydrolysis of esters*, J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 3120 – 3128.
- [212] K. Schwetlick: *Kinetyczne metody badania mechanizmów reakcji*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1975, 285 – 291.
- [213] K. Hori, Y. Ikenaga, K. Arata, T. Takahashi, K. Kasai, Y. Noguchi, M. Sumimoto, H. Yamamoto: *Theoretical study on the reaction mechanism for the hydrolysis of esters and amides under acidic conditions*, Tetrahedron 2007, 63, 1264 – 1269.
- [214] S. Yamabe, T. Fukuda, M. Ishii: *Role of hydrogen bonds in acid-catalyzed hydrolyses of esters*, Theor. Chem. Acc. 2011, 130, 429 – 438.
- [215] J. Ostergaard, C. Larsen: *Bioreversible derivatives of phenol. 1. The role of human serum albumin as related to the stability and binding properties of carbonate esters with fatty acid-like structures in aqueous solution and biological media*, Molecules 2007, 12, 2380 – 2395.

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy.....**doktorskiej**..... p.t.:

„Analiza porównawcza lipofilowości oraz trwałości aktywnej przeciwwirusowo pochodnej 9-okso-5*H*-imidazo-[1,2-*a*]puryny, jej estrów oraz estrów acyklowiru”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia ...**naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**..., a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis