

**Uniwersytet Jagielloński**

**Collegium Medicum**

**Wydział Farmaceutyczny**

**Karolina Matyjaszczyk**

**OCENA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHemiczNYCH  
I FARMAKOKINETYczNYCH  
NOWYCH ZWIĄZKÓW, POCHODNYCH ANTYBIOTYKÓW  
ANTRACYKLINOWYCH**

*Praca doktorska*

**Promotor: dr hab. Maria Walczak, prof. UJ**

Praca wykonana w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET)

Kierownik Jednostki: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

**Kraków 2019**



Jagiellonian Centre  
for Experimental Therapeutics



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



JAGIELLONIAN UNIVERSITY  
IN KRAKÓW

Badania współfinansowane przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG.01.01.02-00-069/09-05: „Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym” - grant koordynowany przez JCET UJ); Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu STRATEGMED „Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej” (STRATEGMED 1/233226/11/NCBR/2015) oraz częściowo przez środki otrzymane w ramach dotacji celowej dla młodych naukowców (grant K/DSC/003518 oraz K/DSC/005329)



INNOVATIVE ECONOMY  
NATIONAL COHESION STRATEGY

EUROPEAN UNION  
EUROPEAN REGIONAL  
DEVELOPMENT FUND



*Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Marii Walczak, Prof. UJ za pomoc i opiekę podczas wykonywania badań, a także poświęcony czas i wsparcie merytoryczne przy redagowaniu niniejszej pracy.*

*Pragnę podziękować Panu Prof. dr hab. Stefanowi Chłopickiemu za pomoc, motywację do działania i poświęcony czas.*

*Dziękuję dr Annie Gonciarz-Dytman oraz dr Agnieszce Zakrzewskiej za przekazaną wiedzę i pomoc merytoryczną.*

*Dziękuję ś.p. Prof. dr hab. Irenie Oszczapowicz oraz dr Małgorzacie Łukawskiej z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie za udostępnienie związków do badań.*

*Dziękuję dr Markowi Bednarskiemu za pomoc w badaniach in vivo.*

*Dziękuję wszystkim pracownikom JCET za wspaniałą atmosferę pracy i życzliwość.*

*Dziękuję moim rodzicom i Łukaszowi za motywację, wiarę i miłość.*

**Spis treści**

|         |                                                                                                   |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | Wstęp .....                                                                                       | 10 |
| 1.1     | Właściwości kwasowo-zasadowe .....                                                                | 11 |
| 1.1.1   | Wykładnik stałej dysocjacji .....                                                                 | 11 |
| 1.1.2   | Metody eksperymentalnego wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji .....                           | 12 |
| 1.2     | Właściwości lipofilowe .....                                                                      | 13 |
| 1.2.1   | Współczynnik podziału i współczynnik dystrybucji.....                                             | 13 |
| 1.2.2   | Metody wyznaczania współczynnika podziału i współczynnika dystrybucji .....                       | 13 |
| 1.3     | Przewidywanie <i>in silico</i> właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych związków ..... | 14 |
| 1.4     | Antybiotyki antracyklinowe .....                                                                  | 15 |
| 1.4.1   | Mechanizm działania.....                                                                          | 16 |
| 1.4.2   | Transport przez błony.....                                                                        | 18 |
| 1.4.3   | Lekooporność .....                                                                                | 19 |
| 1.4.4   | Kardiotoksyczność .....                                                                           | 20 |
| 1.4.5   | Nowe antybiotyki antracyklinowe .....                                                             | 21 |
| 2       | Cel pracy .....                                                                                   | 24 |
| 3       | Materiały i metody .....                                                                          | 25 |
| 3.1     | Badane związki.....                                                                               | 25 |
| 3.1.1   | Leki macierzyste .....                                                                            | 25 |
| 3.1.2   | Nowe związki, pochodne antybiotyków antracyklinowych.....                                         | 27 |
| 3.2     | Substancje i odczynniki .....                                                                     | 33 |
| 3.2.1   | Stosowane do wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji.....                                        | 33 |
| 3.2.2   | Stosowane do wyznaczania współczynnika podziału i współczynnika dystrybucji .....                 | 34 |
| 3.2.3   | Stosowane w badaniach farmakokinetycznych.....                                                    | 34 |
| 3.3     | Roztwory .....                                                                                    | 35 |
| 3.3.1   | Roztwory używane do wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji .....                                | 35 |
| 3.3.1.1 | Roztwory buforowe .....                                                                           | 35 |
| 3.3.1.2 | Roztwory podstawowe badanych związków .....                                                       | 36 |
| 3.3.2   | Roztwory używane do wyznaczenia współczynnika dystrybucji i współczynnika podziału .....          | 36 |
| 3.3.2.1 | Przygotowanie mikroemulsji.....                                                                   | 36 |
| 3.3.2.2 | Roztwory badanych związków .....                                                                  | 36 |
| 3.3.3   | Roztwory stosowane w badaniach farmakokinetycznych.....                                           | 37 |
| 3.3.3.1 | Przygotowanie roztworów badanych związków do podania kasetowego .....                             | 37 |

|         |                                                                                                                                                      |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.3.2 | Metodyka przygotowania próbek .....                                                                                                                  | 38 |
| 3.3.3.3 | Roztwory wzorców i próbek kontroli jakości.....                                                                                                      | 39 |
| 3.4     | Aparatura .....                                                                                                                                      | 39 |
| 3.4.1   | System do elektroforezy kapilarnej.....                                                                                                              | 39 |
| 3.4.2   | System ultrasprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas                                                                        | 40 |
| 3.4.3   | Urządzenia pomocnicze .....                                                                                                                          | 40 |
| 3.4.3.1 | pHmetr .....                                                                                                                                         | 40 |
| 3.4.3.2 | System do oczyszczania wody .....                                                                                                                    | 41 |
| 3.4.3.3 | Liofilizator .....                                                                                                                                   | 41 |
| 3.5     | Zwierzęta laboratoryjne i podanie kasetowe związków .....                                                                                            | 41 |
| 3.6     | Metody badań .....                                                                                                                                   | 42 |
| 3.6.1   | Wyznaczanie wykładnika stałej dysocjacji z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej.....                                                     | 42 |
| 3.6.1.1 | Wybór kapilary .....                                                                                                                                 | 43 |
| 3.6.1.2 | Wybór warunków kondycjonowania kapilary.....                                                                                                         | 43 |
| 3.6.1.3 | Wybór objętości dozowanej próbki .....                                                                                                               | 43 |
| 3.6.1.4 | Wybór wielkości przyłożonego napięcia.....                                                                                                           | 44 |
| 3.6.1.5 | Wybór analitycznej długości fali .....                                                                                                               | 45 |
| 3.6.1.6 | Wybór obojętnego znacznika .....                                                                                                                     | 45 |
| 3.6.1.7 | Obliczenia .....                                                                                                                                     | 45 |
| 3.6.1.8 | Integracja danych.....                                                                                                                               | 47 |
| 3.6.2   | Wyznaczanie współczynnika dystrybucji oraz współczynnika podziału z zastosowaniem mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej ..... | 47 |
| 3.6.2.1 | Wybór kapilary .....                                                                                                                                 | 47 |
| 3.6.2.2 | Wybór warunków kondycjonowania kapilary.....                                                                                                         | 48 |
| 3.6.2.3 | Wybór objętości dozowanej próbki .....                                                                                                               | 48 |
| 3.6.2.4 | Wybór przyłożonego napięcia .....                                                                                                                    | 48 |
| 3.6.2.5 | Wybór analitycznej długości fali .....                                                                                                               | 48 |
| 3.6.2.6 | Obliczenia .....                                                                                                                                     | 48 |
| 3.6.3   | Badanie profilu farmakokinetycznego nowych związków .....                                                                                            | 50 |
| 3.6.3.1 | Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego.....                                                                                                 | 50 |
| 3.6.3.2 | Analiza masowa badanych związków .....                                                                                                               | 50 |
| 3.6.3.3 | Obliczenia farmakokinetyczne .....                                                                                                                   | 52 |

---

|         |                                                                                                                                                                       |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.6.3.4 | Walidacja metody oznaczania nowych antybiotyków antracyklinowych z zastosowaniem systemu ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas ..... | 54  |
| 3.6.4   | Modelowanie <i>in silico</i> właściwości fizykochemicznych .....                                                                                                      | 57  |
| 4       | Wyniki.....                                                                                                                                                           | 58  |
| 4.1     | Wyznaczanie wykładnika stałej dysocjacji .....                                                                                                                        | 58  |
| 4.2     | Wyznaczanie współczynnika dystrybucji oraz współczynnika podziału .....                                                                                               | 68  |
| 4.3     | Opracowanie i walidacja metod jednoczesnego oznaczania nowych antybiotyków antracyklinowych z zastosowaniem systemu UPLC/MS/MS .....                                  | 74  |
| 4.4     | Ocena profilu farmakokinetycznego nowych antybiotyków antracyklinowych .....                                                                                          | 79  |
| 4.5     | Ocena właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych badanych substancji w warunkach <i>in silico</i> .....                                                      | 87  |
| 5       | Dyskusja wyników .....                                                                                                                                                | 91  |
| 5.1     | Wyznaczanie wykładnika stałej dysocjacji z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej .....                                                                     | 91  |
| 5.2     | Wyznaczanie współczynnika dystrybucji i współczynnika podziału .....                                                                                                  | 94  |
| 5.3     | Profil farmakokinetyczny nowych antybiotyków antracyklinowych .....                                                                                                   | 96  |
| 5.4     | Porównanie parametrów fizykochemicznych wyznaczonych eksperymentalnie z danymi przewidywanymi <i>in silico</i> .....                                                  | 98  |
| 5.5     | Podsumowanie .....                                                                                                                                                    | 99  |
| 6       | Wnioski .....                                                                                                                                                         | 101 |
| 7       | Streszczenie .....                                                                                                                                                    | 103 |
| 8       | Abstract .....                                                                                                                                                        | 105 |
| 9       | Bibliografia .....                                                                                                                                                    | 107 |
| 10      | Spis rycin .....                                                                                                                                                      | 121 |
| 11      | Spis tabel .....                                                                                                                                                      | 123 |

## Wykaz skrótów

- BFS – kapilara bez modyfikacji powierzchni wewnętrznej (ang. *bare fused silica*)
- BIS-TRIS – 2,2-bis(hydroksymetylo)-2,2',2''-nitrylotrietanol
- BCRP1 – białko oporności wielolekowej raka piersi
- CAPS – kwas 3-(cykloheksylamino)-1-propanosulfonowy
- CC –krzywa kalibracyjna (ang. *calibration curve*)
- CZE – strefowa elektroforeza kapilarna (ang. *capillary zone electrophoresis*)
- DAU – daunorubicyna
- DAU-FHEX –formamidynowa pochodna daunorubicyny z pierścieniem heksametylenoiminy
- DAU-FMOR – formamidynowa pochodna daunorubicyny z pierścieniem morfoliny
- DAU-FPIP – formamidynowa pochodna daunorubicyny z pierścieniem piperydyny
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- DOX – doksorubicyna
- DOX-FHEX –formamidynowa pochodna doksorubicyny z pierścieniem heksametylenoiminy
- DOX-FMOR – formamidynowa pochodna doksorubicyny z pierścieniem morfoliny
- DOX-FPIP – formamidynowa pochodna doksorubicyny z pierścieniem piperydyny
- EDAU – epidaunorubicyna
- EDAU-FHEX –formamidynowa pochodna epidaunorubicyny z pierścieniem heksametylenoiminy
- EDAU-FMOR – formamidynowa pochodna epidaunorubicyny z pierścieniem morfoliny
- EDAU-FPIP – formamidynowa pochodna epidaunorubicyny z pierścieniem piperydyny
- EDOX – epidokсорubicyna
- EDOX-FHEX –formamidynowa pochodna epidokсорubicyny z pierścieniem heksametylenoiminy
- EDOX-FMOR – formamidynowa pochodna epidokсорubicyny z pierścieniem morfoliny
- EDOX-FPIP – formamidynowa pochodna epidokсорubicyny z pierścieniem piperydyny
- EMA –Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*)
- EOF – przepływ elektroendoosmotyczny
- ESI – jonizacja poprzez rozpylanie analitów w polu elektrycznym
- FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
- GALAS – globalny, dostosowany lokalnie według podobieństwa algorytm modelowania *in silico* (ang. *Global, Adjusted Locally According to Similarity*)
- HQC – próbki kontrolne o wysokim stężeniu
- ID<sub>50</sub> – dawka związku powodująca utratę żywotności 50% komórek (ang. *inhibitory dose*)
- IS – wzorzec wewnętrzny
- LD<sub>50</sub> – medialna dawka letalna (ang. *lethal dose*)



- LLOQ - dolna granica oznaczalności
- LOD – granica detekcji
- logD – logarytm współczynnika dystrybucji
- logP – logarytm współczynnika podziału
- LOQ – granica oznaczalności
- LQC – próbki kontrolne o niskim stężeniu
- LRP – białko oporności wielolekowej raka płuc
- $pK_a$ – wykładnik stałej dysocjacji
- MEEKC – mikroemulsyjna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna
- MEKC – micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna
- MQC – próbki kontrolne o średnim stężeniu
- MRM – tryb śledzenia wielokrotnych reakcji fragmentacji
- MRT – średni czas przebywania związku w organizmie
- MRP1 – białko oporności wielolekowej
- NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
- NADP – ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
- NTC – ujemnym współczynnik temperaturowym (ang. *negative temperature coefficient*)
- OATP – (ang. *organic anion-transporting polypeptide*)
- OCT6 – (ang. *organic cation transporter 6*)
- P-gp – P-glikoproteina
- RSD – względne odchylenie standardowe
- QC – kontrola jakości (ang. *quality control*)
- RNA – kwas rybonukleinowy
- ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)
- SDS – laurylosiarczan sodu
- SLC22 – (ang. *Solute Carrier family 22*)
- SPE – ekstrakcja do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*)
- TRIS – Tris(hydroksymetylo)aminometan
- UPLC/MS/MS – ultrasprawa chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
- UV-Vis – zakres światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu (ang. *Ultraviolet-visible*)
- WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*)

## 1 Wstęp

Wprowadzenie nowego leku na rynek to długotrwały i wieloetapowy proces, wymagający znacznych nakładów finansowych. Otrzymanie odpowiedniej struktury chemicznej to niewielka część sukcesu, a odrzucenie dobrze zapowiadającej się cząsteczki, przed wprowadzeniem jej do badań klinicznych, ma miejsce w przypadku około 95% nowych związków. Nowa substancja powinna przede wszystkim spełniać co najmniej dwa z wymienionych kryteriów: jej masa molowa powinna być mniejsza niż 500 daltonów, wartość współczynnika podziału nie powinna przekraczać 5, powinna mieć mniej niż 5 grup donorowych oraz nie więcej niż 10 grup akceptorowych, biorących udział w powstawaniu wiązań wodorowych. Zasada ta nosi nazwę „reguły Lipińskiego” i jest jedną z podstawowych wytycznych, jakimi kierują się naukowcy podczas projektowania nowych cząsteczek<sup>[1,2]</sup>. Spełnienie tych kryteriów to jednak dopiero początek, ponieważ związek musi cechować się ponadto korzystnym profilem farmakokinetycznym, na który wpływ mają, oprócz współczynnika podziału, również współczynnik dystrybucji, powierzchnia polarna, liczba wiązań donorowych wodoru, liczba wiązań akceptorowych wodoru, a także wykładnik stałej dysocjacji oraz udokumentowane bezpieczeństwo. Z tego względu coraz częściej przeprowadza się badania przesiewowe, mające na celu określenie podstawowych parametrów fizykochemicznych i farmakokinetycznych, aby już na początku mieć możliwość wyboru najbardziej obiecujących struktur<sup>[3-6]</sup>.

W dobie rozwoju technik alternatywnych, opartych na modelowaniu komputerowym, nieopłacalna i nieakceptowalna jest synteza związków *de novo*, po czym sprawdzanie ich potencjalnego działania biologicznego. Obecnie, identyfikuje się miejsce efektorowe oraz syntetyzuje takie związki, które są do nich bezpośrednio dopasowane. Coraz popularniejszym podejściem jest synteza tzw. leków „me-too”, czyli analogów strukturalnych leków, które są stosowane w terapii. W ten sposób tworzone są biblioteki związków, które następnie przeszukuje się pod kątem poprawy skuteczności prototypu, zmniejszenia działań niepożądanych oraz przełamывania lekooporności. W przypadku przeszukiwania bibliotek związków wiedza na temat wykładnika stałej dysocjacji ( $pK_a$ ), współczynnika podziału ( $\log P$ ) oraz współczynnika dystrybucji ( $\log D$ ) cząsteczki jest istotna, gdyż pozwala na przewidywanie dystrybucji tych związków

w organizmie, ich dostępności biologicznej, a także umożliwia oszacowanie potencjalnej toksyczności<sup>[7,8]</sup>.

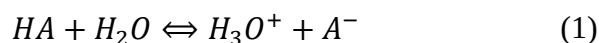
## 1.1 Właściwości kwasowo-zasadowe

### 1.1.1 Wykładnik stałej dysocjacji

Jednym z podstawowych parametrów fizykochemicznych jest wykładnik stałej dysocjacji. Właściwości kwasowo-zasadowe związku, a w szczególności zdolność do jonizacji mają ogromny wpływ na jego aktywność biologiczną, profil farmakokinetyczny, mechanizm transportu, bezpieczeństwo oraz interakcje z innymi lekami<sup>[9]</sup>.

Podstawową wartością mówiącą o właściwościach kwasowo-zasadowych cząsteczki jest stała dysocjacji ( $K_a$ ). Dysocjacja jest to proces rozpadu związku na jony, który zachodzi pod wpływem między innymi takich czynników, jak rozpuszczalnik lub pole elektryczne. Stała dysocjacji jest obliczana jako stosunek iloczynu stężeń molowych, na jakie podczas dysocjacji rozpada się dany elektrolit, do stężenia molowego cząsteczek niezdisocjowanych, w danej temperaturze.

Dysocjację słabego kwasu przedstawiamy jako:



Dla takiego kwasu, stała dysocjacji w rozcieńczonym roztworze, gdzie można przyjąć stężenie wody jako stałe, przyjmuje postać:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (2)$$

Schemat dysocjacji dla słabej zasady przedstawiamy jako:



Stałą dysocjacji słabej zasady w rozcieńczonym roztworze wodnym można przedstawić jako:

$$K_b = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]} \quad (4)$$

Aby ułatwić posługiwanie się wymienionymi stałymi, przedstawia się je w postaci ujemnego logarytmu dziesiętnego, który określa się jako wykładnik stałej dysocjacji.

Wykładnik stałej dysocjacji, odpowiednio  $pK_a$  dla kwasów lub  $pK_b$  dla zasad koreluje z ich mocą. Im mniejsze  $pK_a$ , tym większa moc kwasu oraz im większe  $pK_a$ , tym większa jest moc zasady. Pomiedzy stałymi dla sprzężonej pary kwas-zasada zachodzi zależność:

$$pK_a + pK_b = pK_w \quad (5)$$

Gdzie:

$pK_w$  – jest to wykładnik stałej dysocjacji wody, która w temperaturze pokojowej wynosi  $14^{[10,11]}$ .

### 1.1.2 Metody eksperymentalnego wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji

Miareczkowanie potencjometryczne, ze względu na dużą precyzję i dokładność jaką się cechuje było przez wiele lat określane jako metoda referencyjna w wyznaczaniu stałych dysocjacji. W przypadku substancji o niewielkiej rozpuszczalności w środowisku wodnym, miareczkowanie można przeprowadzić w środowisku wodno-organicznym. Aby przeprowadzić badanie z zastosowaniem tego podejścia, niezbędne jest użycie dużej ilości czystej substancji. Stężenie badanego związku w roztworze roboczym, pozwalające na uzyskanie odpowiedniej krzywej miareczkowania musi być równe co najmniej  $10^{-4} \text{ M}^{[12-14]}$ .

Do wyznaczania  $pK_a$  stosuje się również spektrofotometrię UV-Vis. Techniki te wymagają mniejszego stężenia substancji czynnej ( $>10^{-6} \text{ M}$ ), jednakże badana substancja musi zawierać w swojej strukturze chromofor, który absorbuje promieniowanie w zakresie UV-Vis. Do badania związków z zastosowaniem metod spektrofotometrycznych nadają się jedynie substancje czyste lub takie, co do których mamy pewność, że ich zanieczyszczenia nie pochłaniają światła w zakresie UV-Vis<sup>[15-17]</sup>.

Coraz popularniejszym podejściem stosowanym do wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji jest elektroforeza kapilarna. Technika ta z powodzeniem stosowana jest do wyznaczania wartości  $pK_a$  dla związków o różnej strukturze chemicznej, próbek zanieczyszczonych, a jej ogromną zaletą jest możliwość przeprowadzenia analiz wykorzystując zaledwie niewielką ilość badanego analitu<sup>[18-22]</sup>.

## 1.2 Właściwości lipofilowe

### 1.2.1 Współczynnik podziału i współczynnik dystrybucji

Lipofilowość określa się jako skłonność cząsteczek chemicznych do rozpuszczania się w tłuszczach, olejach oraz rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak heksan lub toluen. Parametr ten cechuje powinowactwo danego związku do fazy lipofilowej (hydrofobowej) i fazy lipofobowej (hydrofilowej).

Podstawowym parametrem opisującym lipofilowość cząsteczki jest współczynnik podziału (P), który definiowany jest jako stosunek stężenia badanej substancji w dwóch różnych, nie mieszających się ze sobą, rozpuszczalnikach. Jest parametrem obliczanym tylko dla formy niezjonizowanej substancji, stąd najczęściej, aby cofnąć dysocjację badanego związku dobiera się wartości pH roztworów, w których wykonuje się pomiar, tak aby związek znajdował się w formie niezdisocjowanej. Współczynnik podziału przedstawia się w postaci logarytmu:

$$\log P = \log \left( \frac{[C]_{\text{niepolarny}}}{[C]_{\text{polarny}}} \right) \quad (6)$$

Gdzie:

$[C]_{\text{niepolarny}}$  – stężenie badanej substancji w rozpuszczalniku niepolarnym

$[C]_{\text{polarny}}$  – stężenie badanej substancji w rozpuszczalniku polarnym

Najczęściej jako rozpuszczalnik niepolarny stosowany jest oktanol, natomiast rozpuszczalnikiem polarnym jest woda. Dla substancji ulegających dysocjacji można obliczyć również współczynnik dystrybucji, który podobnie jak współczynnik podziału, określa się jako stosunek stężenia badanej substancji w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach, z tą różnicą, że współczynnik dystrybucji wyznacza się dla dowolnego pH środowiska, najczęściej dla pH fizjologicznego, równego 7,4. Dla związków niedysocjujących  $\log P$  jest równe  $\log D$ .

### 1.2.2 Metody wyznaczania współczynnika podziału i współczynnika dystrybucji

Metodą referencyjną w badaniach lipofilowości nowych związków jest metoda „shake-flask” (wyrząsanie w kolbie), która jest czasochłonna oraz wymaga dużej ilości substancji o wysokiej czystości<sup>[23]</sup>.

Obecnie dostępnych jest wiele metod służących do wyznaczania logP nowych związków, m. in. zwalidowane i szeroko stosowane metody oparte na wysokosprawnej chromatografii cieczowej<sup>[24]</sup>. Również, elektroforeza kapilarna jest coraz częściej wymieniana jako wszechstronna platforma analityczna. W przypadku elektroforezy kapilarnej stosowane są dwie techniki, tj. micelarna (MEKC) oraz mikroemulsyjna (MEEKC) elektrokinetyczna chromatografia kapilarna<sup>[25,26]</sup>. MEEKC ma kilka zalet w stosunku do MEKC. Z uwagi na fakt, że kropelki mikroemulsji są stabilniejsze niż micle, ze względu na dodatek ko-surfaktanta, który stabilizuje mikroemulsję oraz lepsze naśladowanie właściwości błon fosfolipidowych, MEEKC cieszy się większą popularnością<sup>[27,28]</sup>.

### **1.3 Przewidywanie *in silico* właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych związków**

Obecnie coraz większą popularnością cieszą się metody *in silico* modelowania parametrów fizykochemicznych. Są one ogromnie pomocne na wczesnym etapie badań, jednak nie zawsze otrzymane wyniki są zbieżne z danymi uzyskanymi eksperymentalnie. Jest to efekt koniecznych dla przeprowadzenia analiz uproszczeń oraz przyjmowania pewnych założeń i parametrów o stałych wartościach<sup>[29,30]</sup>.

Modele predykcyjne pozwalają na wyznaczanie stałych dysocjacji w standardowych warunkach, na podstawie różnorodnych podejść prognostycznych. W przypadku oprogramowania ACD Percepta dostępne są dwa algorytmy, tj. klasyczny oraz GALAS.

Algorytm klasyczny, który wykorzystuje równania typu Hammeta i stałe elektryczne grup zdolnych do jonizacji jest akceptowanym przez przemysł farmaceutyczny standardem do przewidywania  $pK_a$ <sup>[31–33]</sup>. W przypadku algorytmu GALAS przewidywanie  $pK_a$  polega na oszacowaniu cząstkowych stałych dysocjacji dla wszystkich prawdopodobnych centrów jonizacji, w hipotetycznym stanie cząsteczki nienaładowanej, a następnie skorygowaniu tych podstawowych wartości, po uwzględnieniu ładunku centrów jonizacji i ich interakcji ze sobą oraz środowiskiem.

Model predykcyjny do przewidywania logP również obejmuje te dwa podstawowe podejścia, tj. klasyczne oraz GALAS, jak również łączy obie strategie. Klasyczny algorytm przy obliczaniu logP stosuje zasadę izolowania atomów węgla<sup>[34]</sup>, natomiast algorytm GALAS opiera się na przewidywaniu tego parametru w oparciu o zbiór treningowy. Model łączony przypisuje

dynamicznie współczynniki adaptacyjne do każdego modelu zgodnie ze wskazaniem jakości prognozowania, co pozwala uzyskać maksymalną dokładność przewidywanego wyniku.

Oprogramowanie Percepta pozwala również na oszacowanie szeregu parametrów określających profil farmakokinetyczny związków za pomocą zestawu równań różniczkowych opisujących model wielokompartimentowy. Profil farmakokinetyczny związku przewidywany jest dla zdrowego człowieka, o standardowej budowie ciała, po podaniu określonej dawki związku oraz sprecyzowaniu drogi podania.

## 1.4 Antybiotyki antracyklinowe

Antybiotyki antracyklinowe są obecne w terapii chorób nowotworowych już blisko pół wieku. W latach 50-tych włoska firma Farmitalia Research Laboratories rozpoczęła badania mające na celu wyizolowanie związków przeciwnowotworowych z drobnoustrojów glebowych. Z próbki gleby, pobranej z okolic Castel del Monte, wyizolowano nowy szczep bakterii *Streptomyces peucetius*, który wytwarzał czerwony barwnik. Stwierdzono, że związek ten wykazywał aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych. Mniej więcej w tym samym czasie, grupa francuskich naukowców z firmy Rhône-Poulenc odkryła ten sam związek, dlatego też nowy lek nazwano łącząc słowo Dauni – określenie przedromańskiego plemienia, które zamieszkiwało obszar Włoch, gdzie związek został wyizolowany, z francuskim słowem *ruby* (*rubis*), oznaczającym kolor czerwony<sup>[35,36]</sup>. Próby kliniczne z zastosowaniem daunorubicyny (DAU) rozpoczęły się w latach 60. XX wieku, a lek okazał się skuteczny w leczeniu ostrej białaczki i chłoniaka. Gdy potwierdzono jego aktywność przeciwnowotworową zaczęto poszukiwać podobnych związków, które mogłyby być zastosowane w lecznictwie. Kilka lat później otrzymano doksorubicynę (DOX), wyprodukowaną przez szczep *Streptomyces peucetius var caesius*, którą wprowadzono na rynek w 1974 roku<sup>[37]</sup>.

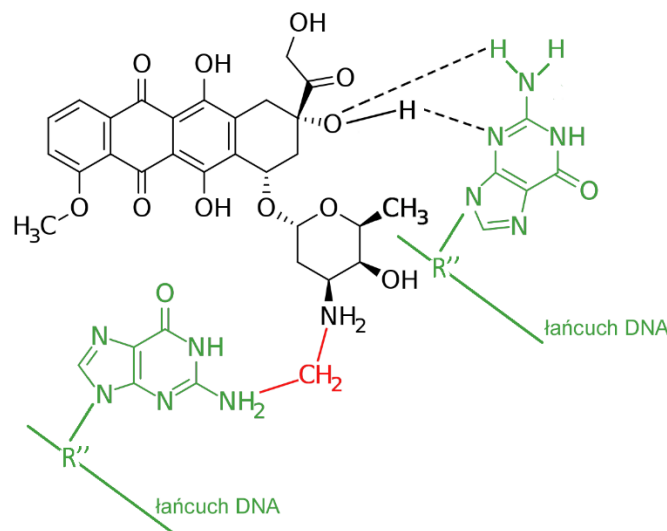
Obecnie zarówno doksorubicyna, jak i daunorubicyna znajdują się na listach leków podstawowych WHO. Wskazaniem do stosowania daunorubicyny są ostre białaczki, natomiast doksorubicyna jest stosowana w wielu jednostkach chorobowych, m.in. w raku piersi, mięsakach, chłoniakach i białaczkach<sup>[38,39]</sup>.

### 1.4.1 Mechanizm działania

Mimo wielu lat badań i ogromnej ilości opublikowanych prac, nie udało się jednoznacznie określić mechanizmu działania antybiotyków antracyklinowych. Dostępne źródła podają przynajmniej kilka możliwych punktów uchwytu dla antracyklin<sup>[40]</sup>. Jedna z hipotez wskazuje jako główny cel dla tych leków topoizomerazę II. Topoizomeraza II jest to enzym występujący w kilku formach i mający za zadanie utrzymanie stabilności genomowej komórki, poprzez wpływ na stopień skręcenia helisy DNA<sup>[41]</sup>. Topoizomeraza II $\alpha$  jest formą, która najczęściej występuje w komórkach nowotworowych, natomiast topoizomeraza II $\beta$  jest specyficzna dla komórek prawidłowych, w tym kardiomiocytów<sup>[42,43]</sup>.

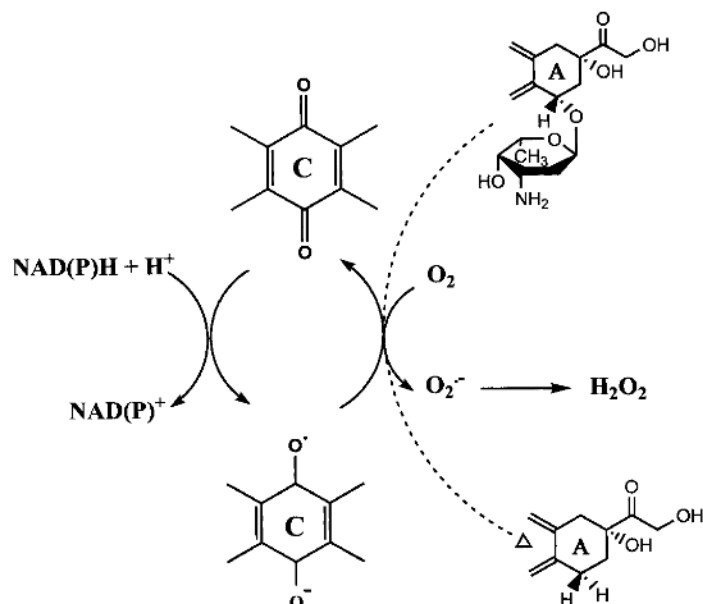
Antracykliny wykazują również zdolność do hamowania replikacji i transkrypcji kwasów nukleinowych, co związane jest z ich zdolnością do interkalacji w łańcuch DNA<sup>[44,45]</sup>. Płaskie ugrupowanie aromatyczne obecne w strukturze związku umożliwia wbudowanie cząsteczki między pary sąsiednich zasad. Kompleksy DNA-antracyklina tworzą się w miejscach, gdzie w sekwencji DNA występują obok siebie guanina i cytozyna (5'-GC-3', 5'-CG-3')<sup>[46]</sup>. Powoduje to zmianę odległości między zasadami oraz zmianę kąta skręcenia sąsiadujących warstw, a w konsekwencji rozluźnienie struktury DNA. Połączenie między lekiem a DNA jest stabilizowane siłami elektrostatycznymi i słabymi wiązaniami wodorowymi<sup>[47,48]</sup>, po czym antracykliny tworzą specyficzne wiązania kowalencyjne z guaniną. Do tworzenia tych wiązań zdolne są jedynie związki posiadające w pozycji C-3' grupę aminową<sup>[49,50]</sup>. Do wytworzenia wiązania kowalencyjnego niezbędna jest obecność w strukturze antracykliny grupy aldehydowej lub obecność formaldehydu, powstającego w warunkach *in vivo*<sup>[51-54]</sup>. Powstawanie tych adduktów aktywuje reakcje uszkodzające DNA i indukujące śmierć komórki, niezależną od topoizomerazy<sup>[55]</sup>. Schemat obrazujący strukturę powstającego kompleksu przedstawiono na rycinie 1.1.





Rycina 1.1. Struktura kompleksu doksorubicyna-DNA. Doksorubicyna tworzy wiązanie kowalencyjne (zaznaczone na czerwono) z guaniną<sup>[56]</sup>.

Nie wszystkie uszkodzenia spowodowane przez antracykliny związane są z ich wiązaniem z cząsteczką DNA. Niektóre z tych uszkodzeń są spowodowane działaniem reaktywnych form tlenu (ROS), które powstają w wyniku redukcji jednoelektronowej antracykliny lub reakcji nieenzymatycznych związanych z obecnością żelaza. Pierwszy z wymienionych procesów polega na przeniesieniu elektronu z NAD (lub NADP) na układ chinonu, w wyniku czego tworzy się semichinon. Podczas jego odtwarzania powstają reaktywne formy tlenu, m. in. takie jak anionorodnik nadadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) lub rodnik hydroksylowy ( $HO\bullet$ )<sup>[57,58]</sup>. Drugi z mechanizmów opiera się na zdolności antracyklin do jednoczesnego hamowania uwalniania żelaza z ferrytyny oraz zapoczątkowania jego uwalniania z innych białek (m. in. akonitazy), jak również tworzenia kompleksów z żelazem. Żelazo jest katalizatorem reakcji prowadzących do powstawania ROS, a koncepcję tę potwierdzają badania, w których podawanie żelaza łącznie z antracyklinami zwiększało śmiertelność zwierząt<sup>[59]</sup>. ROS, cechujące się bardzo dużą reaktywnością, mogą oddziaływać zarówno z białkami, lipidami, jak i kwasami nukleinowymi, powodując na przykład oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych, które wykazują potencjał mutageny<sup>[60]</sup>. Uproszczony schemat powstawania ROS, w reakcji redukcji antracyklin przedstawiono na rycinie 1.2.



Rycina 1.2. Schemat obrazujący powstawanie reaktywnych form tlenu w jednoelektronowej reakcji redukcji antracyklin<sup>[61]</sup>.

Oprócz wymienionych mechanizmów w działaniu cytotoksycznym antracyklin mogą brać udział również inne procesy, m.in. hamowanie aktywności helikazy, indukowanie apoptozy na drodze nadprodukcji ceramidu lub uwalnianie cytochromu c z mitochondriów<sup>[62–64]</sup>. Dokсорubicyna wykazuje powinowactwo do łączenia się z anionowymi składnikami błony, szczególnie z kardioliną, co może prowadzić do bezpośredniego uszkodzenia struktury błony komórkowej oraz mitochondriów<sup>[65,66]</sup>.

Wyniki badań z ostatnich lat wskazują również na możliwość zmiany mechanizmu działania antracyklin, w zależności od stężenia osiąganego w miejscu działania. Uważa się, że w stężeniach nanomolowych, a więc takich, w jakich leki te występują w osoczu chorych, antracykliny indukują uszkodzenie DNA. Z kolei w stężeniach mikromolowych antracykliny działają przede wszystkim poprzez zwiększenie wytwarzania ROS, zmniejszenie zasobów glutationu, zwiększenie przepuszczalności śród błonki oraz reorganizację cytoszkieletu komórki<sup>[67]</sup>.

#### 1.4.2 Transport przez błony

Mimo wielu lat intensywnych badań, mechanizmy transportu antybiotyków antracyklinowych przez błony biologiczne nie zostały do końca poznane<sup>[68]</sup>. We wczesnych

pracach wskazywano na dyfuzję bierną, jako główną drogę transportu tych leków<sup>[69]</sup>. Nowe techniki analityczne, spowodowały istotny postęp w identyfikacji transporterów błonowych. W przypadku antracyklin zwrócono szczególną uwagę na transportery z rodziny SLC22 (solute carrier family 22), szczególnie na SLC22A16, określany również jako OCT6 (organic cation transporter 6), który zidentyfikowano jako importer dla doksorubicyny. Białko to transportuje substancje o charakterze kationowym<sup>[70]</sup>. Udowodniono, że komórki z wysoką ekspresją białka OCT6 są bardziej wrażliwe na doksorubicynę, w porównaniu do komórek z normalną ekspresją tego białka<sup>[71]</sup>. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, że nie stwierdzono ekspresji białka OCT6 w komórkach mięśnia sercowego<sup>[72]</sup>.

Kolejnymi przekaźnikami o udokumentowanej zdolności do przenoszenia antracyklin są białka należące do rodziny OATP (organic anion-transporting polypeptide) – OATP1A oraz OATP1B<sup>[73]</sup>. Typowe substraty OATP, to przede wszystkim substancje polarne i związki o charakterze anionowym. Z uwagi na fakt, że antracykliny w pH fizjologicznym są kationami, dlatego nie rozważano ich, jako potencjalnych substratów dla transporterów OATP. Okazało się jednak, że zarówno białka SLC22A16, jak i OATP1A i OATP1B odgrywają istotną rolę w transporcie tych leków<sup>[74]</sup>. Co więcej, udowodniono, że ekspresja OATP1A2 i OCT6 może służyć jako wskaźnik odpowiedzi na chemioterapię neoadjuwantową u kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi<sup>[75]</sup>.

### **1.4.3 Lekooporność**

Oprócz transporterów, które mają za zadanie przenoszenie antracyklin do wnętrza komórki, wyróżniono również grupę transporterów zaangażowanych w mechanizmy lekooporności, a więc takie białka, które będą transportowały lek poza komórkę. Do najbardziej znanych z nich należy P-glikoproteina (P-gp), która ma zdolność do usuwania ksenobiotyków z komórki oraz ich transportu do lizosomów lub innych organelli. P-gp jest transporterem występującym prawie we wszystkich komórkach, a także w strukturach tworzących barierę krew-mózg, krew-jądro oraz krew-łożysko. Dla komórek prawidłowych, obecność tego białka jest rodzajem mechanizmu obronnego<sup>[76]</sup>.

Usuwanie antracyklin z komórki, z użyciem lizosomów jest zależne od P-gp i właściwości fizykochemicznych antracyklin. Ze względu na fakt, że pH we wnętrzu lizosomów jest kwaśne (ok. 5), antracykliny będą w nim ulegały dysocjacji, stąd nie będą już

w stanie przenikać przez błony biologiczne na drodze dyfuzji biernej, będąc uwięzione we wnętrzu lizosomów<sup>[77,78]</sup>.

Innymi transporterami, które mogą być odpowiedzialne za rozwój lekooporności na leczenie antracyklinami są należące do rodziny ABC białko oporności wielolekowej (MRP1), białko oporności wielolekowej raka piersi (BCRP1) oraz białko oporności wielolekowej raka płuc (LRP)<sup>[79,80]</sup>.

#### **1.4.4 Kardiotoksyczność**

Mechanizm działania kardiotoksycznego antracyklin jest bardzo złożony i nadal nie w pełni poznany. Starsze źródła wskazują, że główną przyczyną może być synteza ROS oraz hamowanie topoizomerazy<sup>[81–85]</sup>. Już po jednorazowym podaniu dokсорubicyny obserwuje się zmiany w strukturze kardiomiocytów, takie jak obrzęk mitochondrialny oraz skurcz chromatyny<sup>[86–88]</sup>. Kardiotoksyczność po podaniu antracyklin, ze względu na rodzaj i czas wystąpienia objawów można podzielić na cztery typy. Pierwszy, czyli kardiotoksyczność ostra, pojawia się już po pierwszym podaniu leku, jest niezależna od dawki i występuje u mniej niż 1 % pacjentów. Kardiotoksyczność podprzewlekła towarzyszy podawaniu wysokich dawek antracyklin i pojawia się w ciągu 1-3 dni od podania leku, w postaci zapalenia mięśnia sercowego. Kardiotoksyczność przewlekłą po podaniu antracyklin dzieli się na wczesną oraz późną. Kardiotoksyczność wczesna pojawia się po kilku tygodniach od zakończenia terapii i jest nią dotkniętych od 1,5 do 2 % pacjentów, z kolei kardiotoksyczność późna rozwija się po co najmniej roku do nawet 30 lat od zakończenia terapii i dotkniętych jest nią nawet 5 % pacjentów<sup>[89–91]</sup>.

Dostępne dla chorych strategie kardioprotekcyjne są dość ograniczone, w tym względzie zwraca się uwagę na formulacje liposomalne oraz zmniejszenie dawki kumulacyjnej. Inne źródła podają, że również stosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny, inhibitorów receptorów angiotensynowych oraz  $\beta$ -blokerów wywiera korzystny wpływ na zmniejszenie działania kardiotoksycznego antracyklin. Jednym z najskuteczniejszych leków działających profilaktycznie jest deksrazoksan zarejestrowany pod nazwą handlową Zinecard, stosowany u kobiet z przerzutującym nowotworem piersi, które otrzymały dawkę kumulacyjną dokсорubicyny przekraczającą 300 mg/m<sup>2</sup> <sup>[92–94]</sup>.

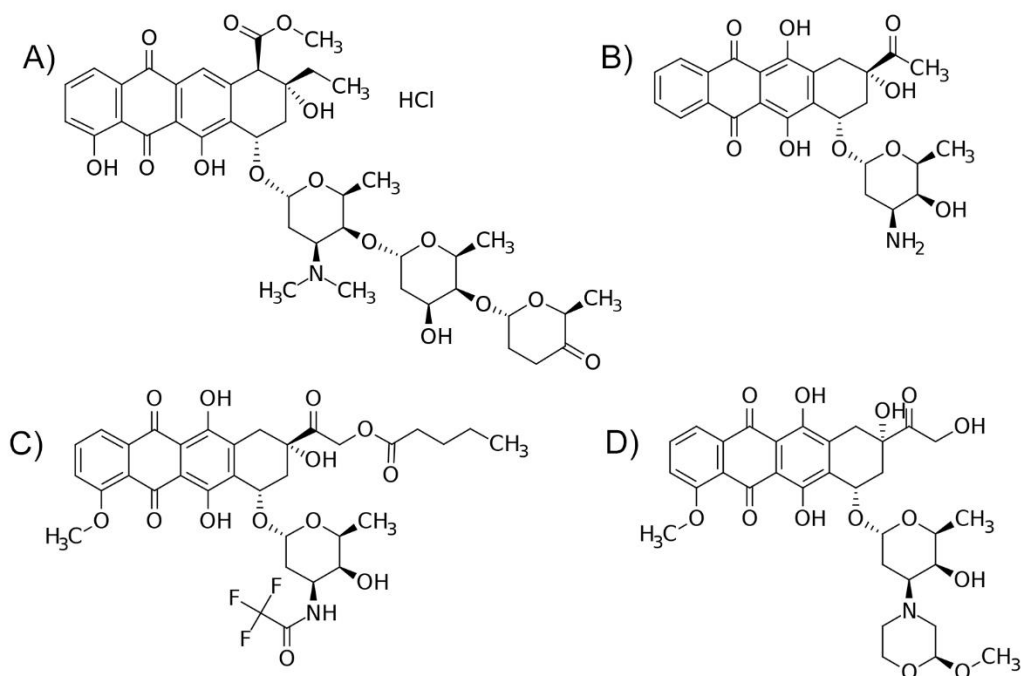
Najnowsze badania podkreślają znaczenie dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, która może wyprzedzać kardiotoxyczność antracyklin, otwierając możliwość projektowania nowych leków, tak aby ograniczyć ich wpływ na śródbłonek <sup>[95,96]</sup>.

#### 1.4.5 Nowe antybiotyki antracyklinowe

Modyfikacje struktury antybiotyków antracyklinowych I generacji, do której zalicza się doksorubicynę oraz daunorubicynę, jest jedną z najpopularniejszych strategii uzyskania nowych antracyklin o lepszych właściwościach biologicznych. Już zmiana konformacji jednego z atomów w strukturze związku macierzystego może wpłynąć na efekt działania leku. Wiodącym przykładem jest w tym względzie epidoksorubicyna, epimer doksorubicyny, charakteryzujący się lepszym profilem bezpieczeństwa w porównaniu do leku macierzystego, obecnie stosowany w leczeniu nowotworów piersi<sup>[97]</sup>.

Kolejnym przykładem może być aklarubicyna, której struktura jest rozbudowana o dwie reszty cukrowe, w stosunku do związku macierzystego. Modyfikacja ta najprawdopodobniej wpłynęła na zmniejszenie powinowactwa leku do P-gp, dlatego też lek ten jest skuteczny w przypadku komórek opornych na antracykliny pierwszej generacji. Aklarubicyna charakteryzuje się również zmniejszoną w stosunku do związków macierzystych kardiotoxycznością, a także odmiennym mechanizmem działania. Pierwszym celem aklarubicyny jest RNA, podczas gdy dla DOX i DAU jest to DNA. Można próbować wytłumaczyć ten mechanizm inną lokalizacją leków w komórce. Aklarubicyna kumuluje się przede wszystkim w cytoplazmie, inaczej niż pozostałe antracykliny, które gromadzone są prawie w całości w jądrze komórkowym<sup>[98]</sup>.

Idarubicyna (4-demetoksydaunorubicynyna) najprawdopodobniej dzięki zwiększonej lipofilowości charakteryzuje się większą cytotoxycznością w porównaniu do DAU oraz większą zdolnością do przełamывania lekooporności. Co istotne, idarubicyna ma wystarczającą biodostępność, stąd może być podawana doustnie<sup>[99]</sup>. Oprócz wymienionych leków, w terapii stosowane są również walrubicyna oraz nemorubicyna. Pierwsza z nich stosowana jest w leczeniu nowotworu pęcherza moczowego, natomiast druga w leczeniu raka wątrobowokomórkowego<sup>[100,101]</sup>. Struktury wymienionych leków przedstawiono na rycinie 1.3.



Rycina 1.3. Struktury nowych antybiotyków antracyklinowych stosowanych w terapii akklarubicyna A), idarubicyna B), walrubicyna C), nemorubicyna D).

Wśród nowo syntetyzowanych związków znaczącą grupę stanowią pochodne formamidynowe, z różnymi cyklicznymi podstawnikami, m. in. piperydyną, morfoliną i heksametylenomiminą. Wprowadzenie do struktury daunozaminy w pozycji C-3' grupy formamidynowej, w miejsce aminowej pozwalało na przełamanie oporności na te cytostatyki komórek nowotworowych, sublinii lekoopornych komórek raka jelita grubego (LoVo/Dx), mięsaka macicy (MES-SA/Dx5) i ostrej białaczki promielocytowej (HL-60/MX2). Badania wykazały, że nowe pochodne doksorubicyny i daunorubicyny charakteryzują się zdolnością do całkowitego lub prawie całkowitego pokonywania lekooporności, rozwijającej się w oparciu o złożone mechanizmy<sup>[102,103]</sup>.

Badania przeprowadzone na linii komórkowej białaczki limfocytowej (L1210) wykazały, że formamidynowe pochodne daunorubicyny wykazują słabszą aktywność cytostatyczną niż daunorubicyna, lecz cechują się wyższą cytotoksycznością w porównaniu do amsakryny, dlatego też mogły być zaliczone do związków o istotnym działaniu przeciwnowotworowym. Miejscem kumulacji badanych nowych związków w komórce jest jądro komórkowe. Zaobserwowano, że mimo, iż wszystkie badane związki indukowały procesy uszkodzenia DNA, mechanizm

uszkodzenia był odmienny. Daunorubicyna działa głównie poprzez mechanizm zahamowania topoizomerazy II, natomiast nowe pochodne, oprócz hamowania topoizomerazy, tworzyły również kowalencyjne addukty z cząsteczką DNA<sup>[104,105]</sup>. Występowanie tych dodatkowych mechanizmów, najprawdopodobniej związanych z tworzeniem wiązań kowalencyjnych między formamidynowymi pochodnymi antracyklin, potwierdzono również przez innych badaczy<sup>[106]</sup>.

Należy zwrócić uwagę, że nowe związki, pochodne formamidynowe charakteryzują się wyższymi wartościami LD<sub>50</sub> w porównaniu do leków macierzystych. W badaniach wykonanych na zwierzętach, po jednorazowym podaniu nowych antracyklin, w dawce odpowiadającej 75% LD<sub>50</sub> stwierdzono, w ocenie histopatologicznej istotnie mniejsze uszkodzenie mięśnia sercowego, w porównaniu do zwierząt, którym podano leki macierzyste<sup>[107]</sup>.

Podsumowując, nowe formamidynowe pochodne antybiotyków antracyklinowych mają potencjał do wprowadzenia do lecznictwa, jako związki o lepszej aktywności antyproliferacyjnej i lepszym profilu bezpieczeństwa, w porównaniu do antracyklin pierwszej generacji<sup>[108,109]</sup>.

## 2 Cel pracy

Wcześniejsze badania wykazały, że nowe związki, pochodne antybiotyków antracyklinowych, charakteryzują się pożądanymi właściwościami biologicznymi, ich potencjał antyproliferacyjny jest zbliżony lub wyższy od leków macierzystych, i co istotne są mniej kardiotoksyczne. Dokładne poznanie właściwości fizykochemicznych, jak i profilu farmakokinetycznego nowych antracyklin jest niezbędne w dalszych badaniach nad rozwojem tych cząstek, jak i w celu opracowania nowych struktur o lepszych właściwościach. Z uwagi na potrzebę opracowania nowych technik analitycznych i wykonanie badań przesiewowych nowych związków, we wczesnej fazie badań przedklinicznych celem pracy było:

1. Opracowanie metody wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy strefowej (CZE).
2. Wyznaczanie  $pK_a$  dla dwunastu nowych związków, formamidynowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych oraz czterech leków macierzystych z zastosowaniem metody CZE.
3. Opracowanie metody wyznaczania współczynnika dystrybucji z zastosowaniem mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MEEKC).
4. Wyznaczanie współczynnika dystrybucji dla dwunastu nowych związków, formamidynowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych oraz czterech leków macierzystych z zastosowaniem opracowanej metody oraz obliczenie współczynnika podziału dla badanych związków.
5. Opracowanie i walidacja metody bioanalitycznej do oznaczania stężenia nowych związków, pochodnych antybiotyków antracyklinowych, w osoczu myszy z zastosowaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC/MS/MS).
6. Określenie profilu farmakokinetycznego nowych antracyklin, po podaniu dożylnym i dootrzewnowym, w dawce kasetowej u myszy.

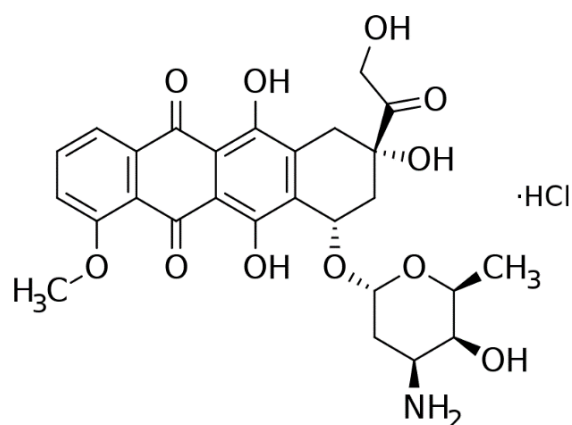


### 3 Materiały i metody

#### 3.1 Badane związki

##### 3.1.1 Leki macierzyste

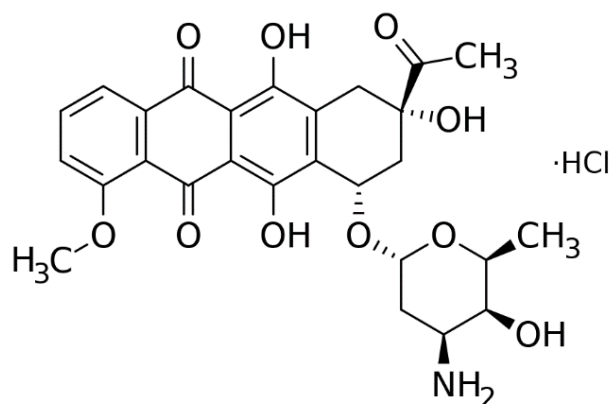
Przedmiotem badań były następujące leki macierzyste:



#### **Chlorowodorek doksorubicyny (DOX)**

$C_{27}H_{29}NO_{11}$ , m.cz.: 543.525 g/mol

Chlorowodorek (7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu (Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie).

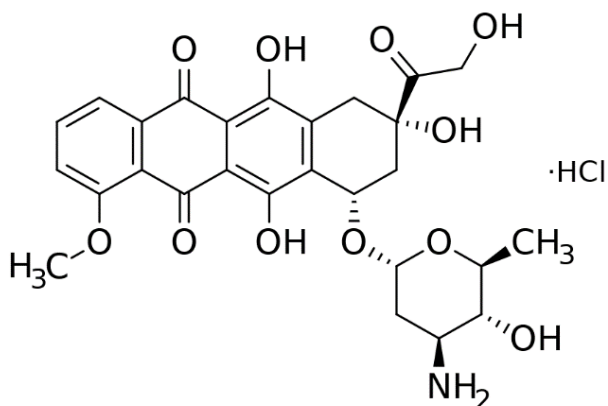


### Chlorowodorek danorubicyny (DAU)

$C_{27}H_{29}NO_{10}$ , m.cz.: 527.526 g/mol

Chlorowodorek (7S,9S)-9-acetylo-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu

(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie).

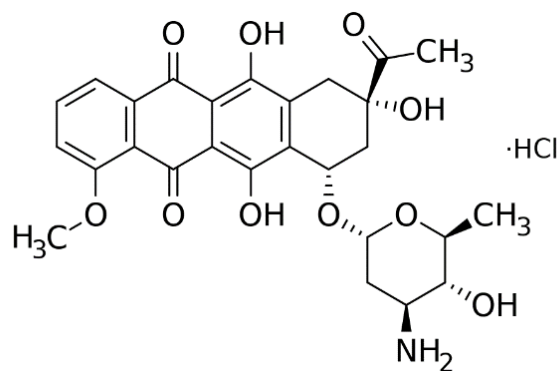


### Chlorowodorek epidoksorubicyny (EDOX)

$C_{27}H_{29}NO_{11}$ , m.cz.: 543.525 g/mol

Chlorowodorek (7S,9S)-7-[(2R,4S,5R,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu

(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie).



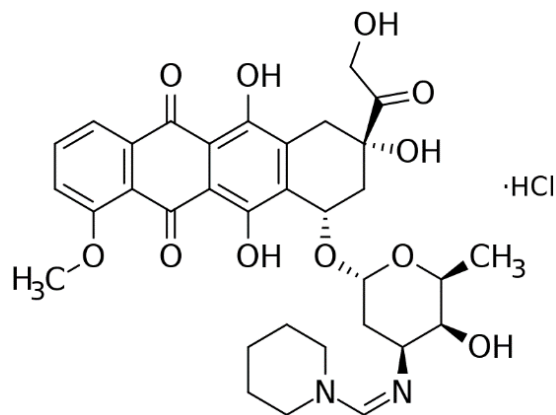
### Chlorowodorek epidanorubicyny (EDAU)

$C_{27}H_{29}NO_{10}$ , m.cz.: 527.526 g/mol

Chlorowodorek (7S,9S)-9-acetylo-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie).

### 3.1.2 Nowe związki, pochodne antybiotyków antracyklinowych

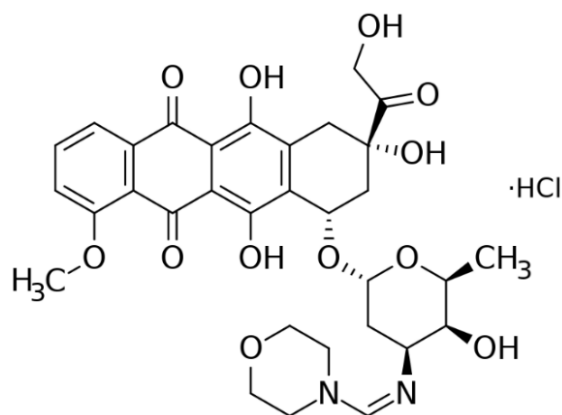
Przedmiotem badań były następujące nowe związki, pochodne antybiotyków antracyklinowych:



### Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DOX-FPIP

$C_{33}H_{38}N_2O_{11}$ , m.cz.: 638.67 g/mol

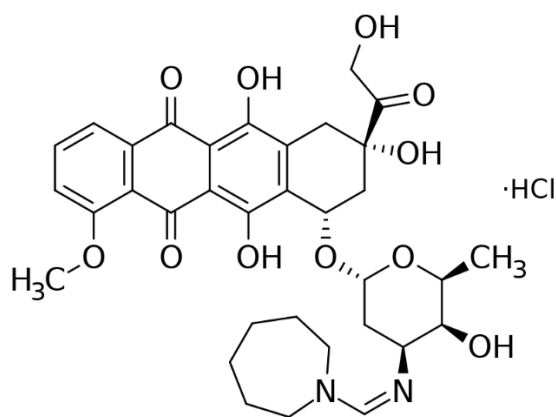
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



## Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DOX-FMOR

$$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{12}, \text{m.cz.: } 640.642 \text{ g/mol}$$

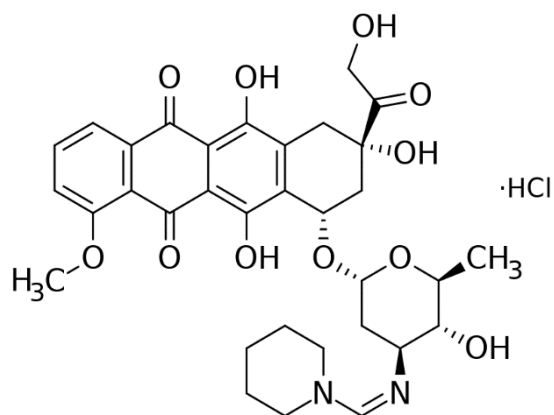
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



## Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DOX-FHEX

$$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{11}, \text{m.cz.: } 652.697 \text{ g/mol}$$

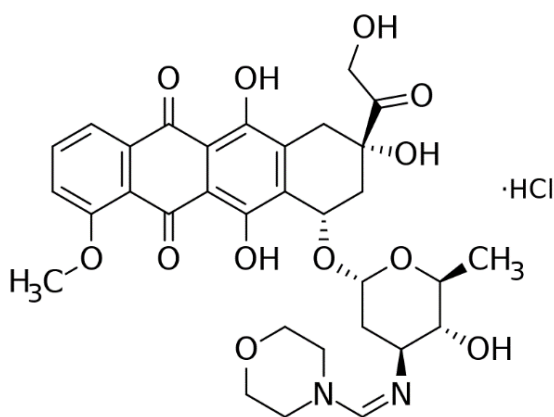
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-yl]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



## Chlorowodorek związku o roboczej nazwie EDOX-FPIP

$$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}, \text{m.cz.: } 638.67 \text{ g/mol}$$

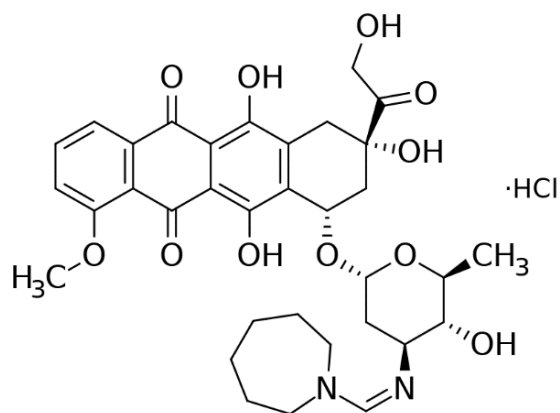
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5R,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



## Chlorowodorek związku o roboczej nazwie EDOX-FMOR

$$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{12}, \text{m.cz.: } 640.642 \text{ g/mol}$$

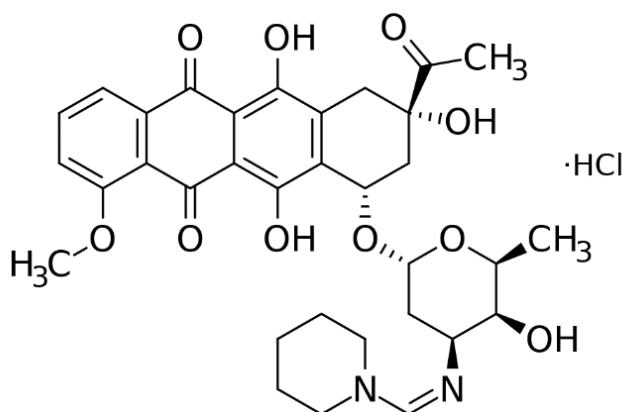
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5R,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



### Chlorowodorek związku o roboczej nazwie EDOX-FHEX

$C_{34}H_{40}N_2O_{11}$ , m.cz.: 652.697 g/mol

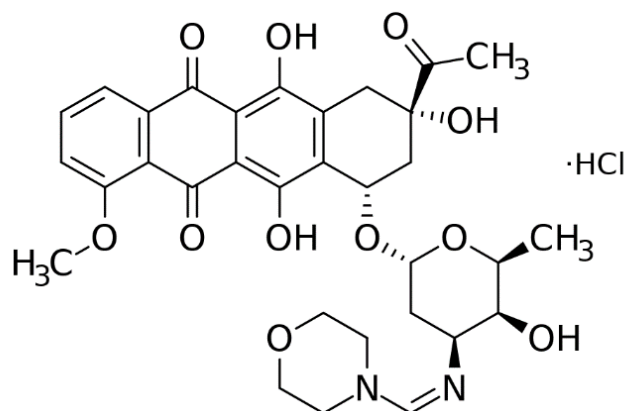
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5R,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



### Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DAU-FPIP

$C_{33}H_{38}N_2O_{10}$  m.cz.: 622.671 g/mol

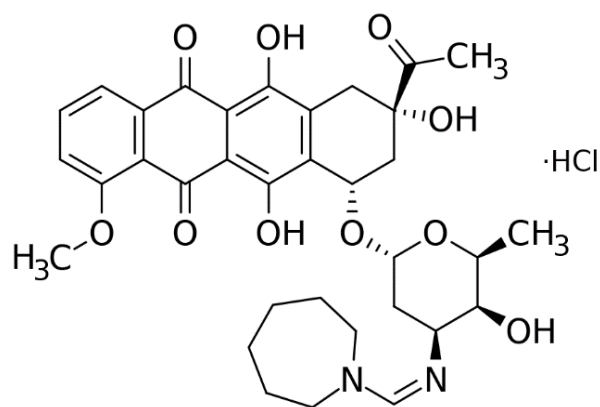
Chlorowodorek 3' - deamino - 3' (N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-(7S,9S)-9-acetylo-7-[(2R,4S,5S,6S) - 4 - amino - 5 - hydroksy - 6 - metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy - 4 - metoksy - 8,10 - dihydro - 7H - tetraceno - 5,12 - dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



### Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DAU-FMOR

$C_{32}H_{36}N_2O_{11}$ , m.cz.: 624.643 g/mol

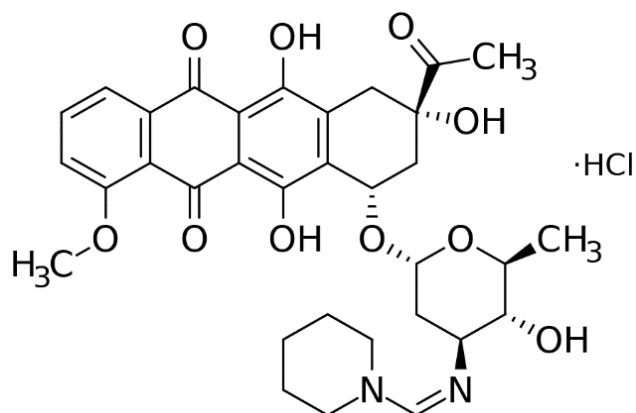
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



### Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DAU-FHEX

$C_{34}H_{40}N_2O_{10}$ , m.cz.: 636.698 g/mol

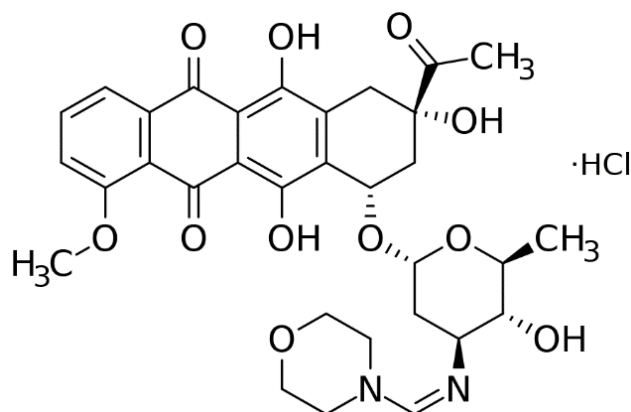
Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).



## Chlorowodorek związku o roboczej nazwie EDAU-FPIP

$$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{10} \text{ m.cz.: } 622.671 \text{ g/mol}$$

Chlorowodorek 3' - deamino - 3' (N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-(7S,9S)-9-acetylo-7-[(2R,4S,5R,6S) - 4 - amino - 5 - hydroksy - 6 - metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy - 4 - metoksy - 8,10 - dihydro - 7H - tetraceno - 5,12 - dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).

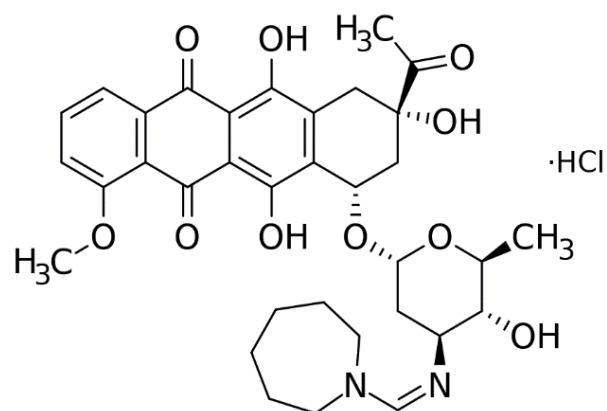


## Chlorowodorek związku o roboczej nazwie EDAU-FMOR

$$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11}, \text{ m.cz.: } 624.643 \text{ g/mol}$$

Chlorowodorek 3'-deamino-3'(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5R,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu  
(Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).





### Chlorowodorek związku o roboczej nazwie DAU-FHEX

$C_{34}H_{40}N_2O_{10}$ , m.cz.: 636.698 g/mol

Chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroksy-6-metyloksan-2-ylo]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetylo)-4-metoksy-8,10-dihydro-7H-tetraceno-5,12-dionu (Związek otrzymano w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie<sup>[110]</sup>).

## 3.2 Substancje i odczynniki

### 3.2.1 Stosowane do wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji

W badaniach zastosowano następujące substancje i odczynniki:

- Kwas octowy ( $\geq 99\%$ ) ( $CH_3COOH$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Aceton ( $\geq 99\%$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- BIS-TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- CAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kwas chlorowodorowy (37%), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Wodorotlenek sodu (1 M), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kwas borowy, (JT Baker, Davenport, Holandia)
- Kwas ortofosforowy (V) (JT Baker, Davenport, Holandia)
- Woda dejonizowana (System do dejonizacji wody, Millipore, Molsheim, Francja)

### 3.2.2 Stosowane do wyznaczania współczynnika podziału i współczynnika dystrybucji

W badaniach zastosowano następujące substancje i odczynniki:

- Wodorofosforan (V) sodu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Diwodorofosforan (V) potasu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Laurylosiarczan sodu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Butan-1-ol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Heptan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-fenylododekan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dimetylosulfotlenek (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Paracetamol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Atorwastatyna (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Benzokaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chloramfenikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Diklofenak (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fenacetyna (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fenytoina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Karbamazepina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kumaryna (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Metoprolol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Nikotynamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Prokainamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rezerpina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 3.2.3 Stosowane w badaniach farmakokinetycznych

W badaniach zastosowano następujące substancje i odczynniki:

- Karwedilol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kwas mrówkowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Acetonitryl (Witko, Poznań, Polska)
- Metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 3.3 Roztwory

#### 3.3.1 Roztwory używane do wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji

##### 3.3.1.1 Roztwory buforowe

Skład roztworów buforowych użytych w badaniu opracowano z zastosowaniem oprogramowania PeakMaster 5.3<sup>[111]</sup>. Przygotowano dwanaście roztworów buforowych o pH w zakresie 5 do 12 i stałej sile jonowej równej 0,05 M. W tabeli 3.1. podano sposób przygotowania użytych roztworów.

Tabela 3.1. Skład roztworów buforowych oraz wartości pH zmierzone tuż po przygotowaniu oraz po 12 h analiz, na wejściu i na wyjściu z kapilary

| pH<br>zadane | Składnik 1                            | Składnik 2 | pH<br>zmierzone | Stabilność buforu po<br>12 h analizy |               |
|--------------|---------------------------------------|------------|-----------------|--------------------------------------|---------------|
|              |                                       |            |                 | Na<br>wejściu                        | Na<br>wyjściu |
| 5            | 74 mM<br>CH <sub>3</sub> COOH         | 50 mM NaOH | 5,00            | 5,02                                 | 5,02          |
| 6            | 66,5 mM bis<br>TRIS                   | 50 mM HCl  | 6,12            | 6,19                                 | 6,17          |
| 7            | 25 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>  | 38 mM NaOH | 7,08            | 7,1                                  | 7,11          |
| 7,5          | 61 mM TRIS                            | 50 mM HCl  | 7,58            | 7,59                                 | 7,61          |
| 8            | 85 mM TRIS                            | 50 mM HCl  | 8,09            | 8,08                                 | 8,08          |
| 8,5          | 162 mM TRIS                           | 50 mM HCl  | 8,59            | 9,57                                 | 8,58          |
| 9            | 120 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 50 mM NaOH | 9,04            | 8,98                                 | 9,02          |
| 9,5          | 72 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  | 50 mM NaOH | 9,58            | 9,47                                 | 9,47          |
| 10           | 200 mM CAPS                           | 50 mM NaOH | 10,05           | 9,93                                 | 9,95          |
| 10,5         | 97,5 mM CAPS                          | 50 mM NaOH | 10,53           | 10,28                                | 10,33         |
| 11           | 63,5 mM CAPS                          | 50 mM NaOH | 11,04           | 10,54                                | 10,59         |
| 11,5         | 50,4 mM CAPS                          | 50 mM NaOH | 11,48           | 10,67                                | 10,71         |

Wszystkie bufony przed użyciem filtrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm (Macherey-Nagel, Duren, Niemcy).

### **3.3.1.2 Roztwory podstawowe badanych związków**

Roztwory podstawowe badanych związków o stężeniu 2 mM przygotowano poprzez rozpuszczenie dokładnie odważonej ilości każdego z nich, w odpowiedniej objętości ultraczystej wody. Roztwory robocze sporządzono poprzez zmieszanie 10  $\mu\text{L}$  roztworu podstawowego z 1  $\mu\text{L}$  acetonu, a następnie rozcieńczono powstały roztwór wodą ultraczystą, tak aby końcowe stężenie badanego związku było równe 100  $\mu\text{M}$ .

### **3.3.2 Roztwory używane do wyznaczenia współczynnika dystrybucji i współczynnika podziału**

#### **3.3.2.1 Przygotowanie mikroemulsji**

Skład zastosowanej w badaniach mikroemulsji opracowano na podstawie danych literaturowych<sup>[27]</sup>. Bufor boranowy będący podstawą mikroemulsji przygotowano w kolbie miarowej o pojemności 100 mL przez rozpuszczenie 0,31 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  w ok. 50 mL wody ultraczystej i dodanie 4,54 mL 1 M NaOH, a następnie dopełnienie wodą ultraczystą do kreski, uzyskując pH=10 tak przygotowanego buforu. Mikroemulsja w buforze boranowym ostatecznie składała się z 3,3 % w/v SDS (surfaktant), 6,6 % w/v butan-1-olu (ko-surfaktant) i 0,8 % heptanu (faza olejowa). Przygotowanie mikroemulsji obejmowało kilka etapów. W pierwszej kolejności rozpuszczano SDS w części buforu, następnie dodawano butan-1-ol oraz heptan i rozcieńczano mikroemulsję pozostałym buforem. Mikroemulsję poddano działaniu ultradźwięków przez 30 min. Po przygotowaniu mikroemulsję przechowywano w temperaturze 4°C i stosowano przez okres 5 dni. Przed użyciem, mikroemulsję filtrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów równej 0,44  $\mu\text{m}$ .

#### **3.3.2.2 Roztwory badanych związków**

Roztwór podstawowy znaczników przygotowano dodając 2  $\mu\text{L}$  1-fenylododekanu oraz 2  $\mu\text{L}$  DMSO do 996  $\mu\text{L}$  mikroemulsji. Substancje te wybrano jako markery, odpowiednio dla przepływu elektroosmotycznego oraz miceli.

Roztwory podstawowe substancji wzorcowych oraz związków badanych o stężeniu 1 mg/mL przygotowano poprzez rozpuszczenie dokładnie odważonej ilości tych substancji, w obliczonej ilości wody lub metanolu.

Roztwory robocze sporządzano poprzez zmieszanie 2  $\mu$ L roztworu podstawowego badanej substancji i 48  $\mu$ L roztworu podstawowego mikroemulsji, do której dodano znaczniki.

### **3.3.3 Roztwory stosowane w badaniach farmakokinetycznych**

#### **3.3.3.1 Przygotowanie roztworów badanych związków do podania kasetowego**

Roztwory podstawowe badanych związków o stężeniu 2 mg/mL sporządzono poprzez rozpuszczenie dokładnie odważonych ilości substancji w wodzie ultraczystej.

W przypadku roztworów do podania dożylnego, do kolby miarowej o pojemności 10 mL, z ok. 5 mL wody do iniekcji dodano po 0,01 mL każdego z roztworów podstawowych. Następnie kolbę dopełniono do kreski wodą do iniekcji.

Z kolei, roztwory związków do podania dootrzewnowego przygotowano poprzez przeniesienie do kolby miarowej o pojemności 10 mL, z ok. 5 mL wody do iniekcji, po 0,2 mL roztworu podstawowego każdej z substancji, a następnie dopełnienie kolby do kreski wodą do iniekcji. Przygotowane roztwory związków do podania kasetowego przechowywano w polipropylenowych butelkach, z ciemnego szkła, w temperaturze 4°C. Przed podaniem zwierzętom, roztwory ogrzewano do temperatury pokojowej.

Przygotowano cztery kasety związków. W kasecie A1 umieszczono cztery związki: DOX-FPIP, DOX-FHEX, DAU-FPIP, DAU-FHEX, o stężeniu całkowitym 0,008 mg/mL (stężenie pojedynczego związku wynosiło 0,002 mg/mL). W kasecie B1 zawarto cztery związki: DOX-FPIP, DOX-FHEX, DAU-FPIP, DAU-FHEX o stężeniu całkowitym 0,32 mg/mL (stężenie pojedynczego związku było równe 0,08 mg/mL).

Kaseta A2 składała się z sześciu związków: EDOX-FPIP, EDOX-FMOR, EDOX-FHEX, EDAU-FPIP, EDAU-FMOR, EDAU-FHEX o stężeniu całkowitym 0,012 mg/mL. Kaseta B2 zawierała sześć związków: EDOX-FPIP, EDOX-FMOR, EDOX-FHEX, EDAU-FPIP, EDAU-FMOR, EDAU-FHEX o stężeniu całkowitym 0,48 mg/mL. Skład przygotowanych roztworów oraz dawki podawane zwierzętom przedstawiono w tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Skład jakościowy i ilościowy kaset oraz droga podania związków u myszy

| Skład kasety                                                         | Droga podania            | Dawka podana                                                      |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| A1: DOX-FPIP; DOX-FHEX; DAU-FPIP; DAU-FHEX                           | Jednorazowo dożylnie     | Całkowita - 0,04 mg/kg<br>(dawka pojedynczego związku 0,01 mg/kg) |
| A2: EDOX-FMOR; EDOX-FPIP; EDOX-FHEX; EDAU-FMOR; EDAU-FPIP; EDAU-FHEX | Jednorazowo dożylnie     | Całkowita - 0,06 mg/kg<br>(dawka pojedynczego związku 0,01 mg/kg) |
| B1: DOX-FPIP; DOX-FHEX; DAU-FPIP; DAU-FHEX                           | Jednorazowo dootrzewnowo | Całkowita - 0,8 mg/kg<br>(dawka pojedynczego związku 0,2 mg/kg)   |
| B2: EDOX-FMOR; EDOX-FPIP; EDOX-FHEX; EDAU-FMOR; EDAU-FPIP; EDAU-FHEX | Jednorazowo dootrzewnowo | Całkowita - 1,2 mg/kg<br>(dawka pojedynczego związku 0,2 mg/kg)   |

### 3.3.3.2 Metodyka przygotowania próbek

Do 100  $\mu\text{L}$  osocza dodawano 5  $\mu\text{L}$  roztworu wzorca wewnętrznego (IS), którym był karwedilol o stężeniu 5  $\mu\text{g/mL}$ . Po zmieszaniu próbek, wytrząsano je przez 5 min na wytrząsarce laboratoryjnej (1500 rpm), po czym rozcieńczano w stosunku 1:1 wodą ultraczystą.

W procesie ekstrakcji analitów do fazy stałej (SPE) zastosowano kolumnienki Strata-X (30mg/mL) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Kolumnienki kondycjonowano stosując kolejno 1 mL metanolu, następnie 1 mL wody ultraczystej, po czym naniesiono próbki na przygotowane złoże. Po przemyciu kolumnienek 5% metanolem, suszono je pod ciśnieniem przez 10 min, tak aby pozbyć się pozostałości wody. Anality wymywano ze złoża pięciokrotnie, porcjami po 200  $\mu\text{L}$ , używając 1% (v/v) kwasu octowego w acetonitrylu. Otrzymane roztwory liofilizowano, po czym

suchą pozostałość rozpuszczano w 30  $\mu\text{L}$  mieszaniny 1% kwasu octowego w acetonitrylu i 1 % kwasu octowego w wodzie ultraczystej, w stosunku (40:60, v/v).

### **3.3.3.3 Roztwory wzorców i próbek kontroli jakości**

Roztwory podstawowe badanych związków, o stężeniu 1 mg/mL przygotowywano poprzez rozpuszczenie w odpowiedniej objętości wody ultraczystej dokładnie odważonych ilości poszczególnych związków. Po przygotowaniu, roztwory przechowywano w polipropylenowych, ciemnych, szczelnie zamkniętych pojemnikach, w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Roztwory robocze przygotowano poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworów podstawowych wodą ultraczystą, tak aby ostatecznie uzyskać stężenie: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 10; 20  $\mu\text{g/mL}$  dla roztworów stosowanych do przygotowania krzywej wzorcowej (CC) oraz stężenie: 0,02; 0,06; 8 i 16  $\mu\text{g/mL}$  dla roztworów używanych do przygotowania próbek kontroli jakości (QC).

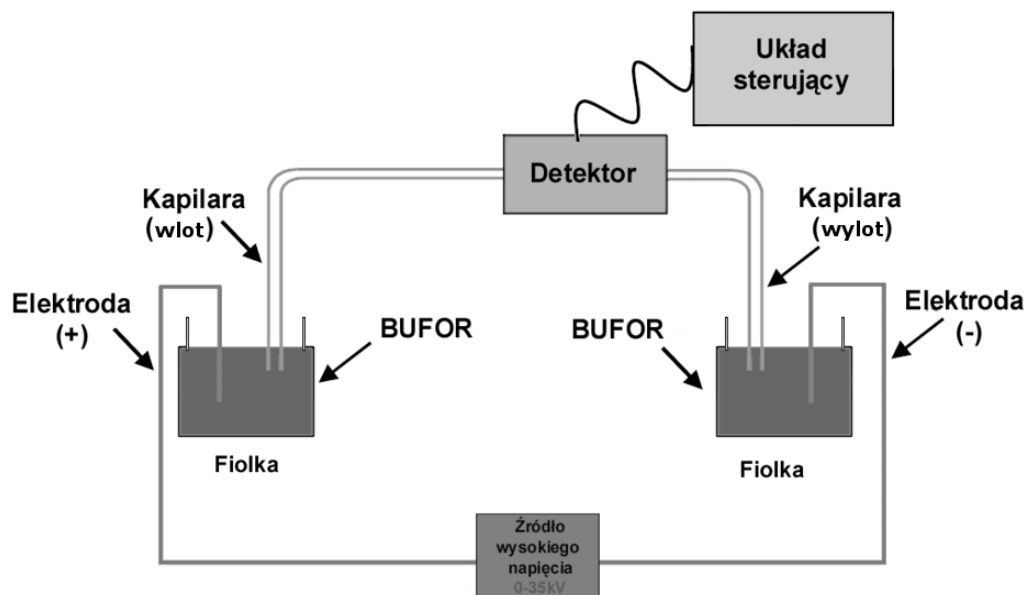
Celem przygotowania krzywej wzorcowej oraz próbek kontroli jakości, do 95  $\mu\text{L}$  osocza myszy, wolnego od związków, dodawano 5  $\mu\text{L}$  roztworu roboczego, uzyskując ostateczne stężenie analitu w próbce równe: 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 500; 1000 ng/mL dla próbek CC oraz 1; 3; 400; 900 ng/mL dla próbek QC oraz 5  $\mu\text{L}$  roztworu karwedilolu, użytego jako IS, o stężeniu 5  $\mu\text{g/mL}$ , otrzymując końcowe stężenie IS w badanej próbce równe 250 ng/mL. Po dokładnym wymieszaniu tak przygotowanych próbek, anality ekstrahowano z zastosowaniem techniki SPE, tak jak opisano w sekcji 3.3.3.2.

## **3.4 Aparatura**

### **3.4.1 System do elektroforezy kapilarnej**

Do wyznaczania właściwości fizykochemicznych związków zastosowano system do elektroforezy kapilarnej P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) z wbudowanym detektorem diodowym (190-600 nm), wyposażony w podajnik próbek składający się z dwóch 36-dolkowych statywów na fiołki oraz dwóch termostatowanych 48-dolkowych statywów na próbki. Aparat wyposażony był w układ sterujący i rejestrujący dane w postaci oprogramowania 32 Karat, wersja 8.0 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). System ten posiadał dwie elektrody platynowe, do których przykładano wysokie napięcie. Do integracji uzyskanych elektroferogramów zastosowano

programowanie PeakFit v.4.12 (SPPS, Chicago, USA). Schemat układu do elektroforezy kapilarnej przedstawiono na rycinie 3.1.



Rycina 3.1. Schemat układu do elektroforezy kapilarnej<sup>[112]</sup>.

### 3.4.2 System ultrasprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas

Do oznaczania stężenia nowych związków w osoczu myszy zastosowano system ultrasprawnej chromatografii cieczowej UPLC 1290 Infinity II (Agilent, Santa Clara, CA, USA) sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas 6470 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Otrzymane dane analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Agilent MassHunter Acquisition (Ver. C.01.00) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) oraz Agilent MassHunter Quantitative Analysis (Ver B.08.00) (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### 3.4.3 Urządzenia pomocnicze

#### 3.4.3.1 pHmetr

Do pomiarów pH przygotowywanych roztworów buforowych zastosowano pHmetr 827 pHLab ze szklaną elektrodą kombinowaną (typ Primatrode), z czujnikiem o ujemnym współczynniku temperaturowym (NTC - negative temperature coefficient) (Metrohm, Herisau, Szwajcaria).



### 3.4.3.2 System do oczyszczania wody

Do oczyszczania wody użyto system do dejonizacji wody Milli-Q pozwalający na otrzymanie wody o wysokiej czystości, o przewodnictwie 0,018  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Millipore, Molsheim, Francja).

### 3.4.3.3 Liofilizator

Do liofilizacji próbek użyto aparat Free Zone 1 (Labconco, Kansas City, KS, USA)

## 3.5 Zwierzęta laboratoryjne i podanie kasetowe związków

Grupę 64 dorosłych samców myszy, szczepu CD-1 (20-26 g) pozyskano ze Zwierzętarni Hodowlano-Eksperymentalnej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kraków, Polska). Myszy utrzymywano w standardowych warunkach: 12 godzinny cykl dobowy (12 godzin jasnych, 12 godzin ciemnych), temp. 22-24°C, wilgotność 50% (+/- 10%), 75 wymian filtrowanego powietrza na godzinę, wolny dostęp do wody i pokarmu. Zwierzętom, 12 h przed badaniem odstawiono pokarm i umieszczono w osobnych klatkach, w grupach po 4 osobniki w klatce, w zależności od czasu uśmiercenia.

Badane związki podano zwierzętom w kasecie (podanie all-in-one, N-in-1). W tym podaniu, jednemu zwierzęciu, zamiast jednej substancji podaje się kilka związków jednocześnie, w odpowiednio małych dawkach, a następnie z użyciem wysoko selektywnych, specyficznych i czułych metod bioanalitycznych oznacza się ich stężenie, w odpowiedniej matrycy.

Wielkości podanych dawek obliczono na podstawie średnich dawek leków macierzystych stosowanych u ludzi (ok. 2 mg/kg). Dawki ustalone dla ludzi są przynajmniej 10 razy mniejsze niż uzyskane z badań na zwierzętach, ze względu na stosowanie współczynnika bezpieczeństwa. W przeprowadzonym badaniu, aby ograniczyć prawdopodobieństwo interakcji związków ze sobą, dawka podana drogą dootrzewnową została zmniejszona jeszcze 10-krotnie, natomiast dawkę podaną drogą dożylną zmniejszono 200-krotnie. Wszystkie użyte związki, zostały przed podaniem przygotowane wg protokołu podanego w sekcji 3.3.3.1. Ostatecznie podawano dożylnie, do żyły ogonowej myszy, kasety w dawce 0,01 mg/kg dla pojedynczego związku, natomiast dawka podawana dootrzewnowo była równa 0,2 mg/kg dla pojedynczego związku. W celu określenia parametrów farmakokinetycznych, w odpowiednich punktach czasowych, po podaniu kaset, tj. 0

(przed podaniem kasety) oraz po 15, 30, 60, 120, 240, 480 i 720 min zwierzęta uśmiercano. Przed uśmierceniem, zwierzęta poddawano głębokiemu znieczuleniu poprzez podanie dootrzewnowe mieszaniny: 1 mL ketaminy (100 mg/mL) oraz 0,1 mL ksylazyny (100 mg/mL), zawieszanej w 8,9 mL wody do iniekcji, w objętości 0,1 mL na 10 g masy ciała zwierzęcia. Próbkę krwi pobierano natychmiast po uśmierceniu zwierząt, do probówek z dodatkiem heparyny. Następnie próbki wirowano (3500 rpm, 10 min, 4 °C), po czym pobierano osocze, które przechowywano w temperaturze – 80 °C do czasu oznaczenia.

Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE, z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Na przeprowadzenie badania zgodę wydała II Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (numer zgody 22/2016).

### **3.6 Metody badań**

Do wyznaczenia wykładnika stałej dysocjacji zastosowano strefową elektroforezę kapilarną. Analizy mające na celu określenie współczynnika dystrybucji przeprowadzono z zastosowaniem mikroemulsyjnej elektrokinezy chromatografii kapilarnej. Do oznaczania stężeń badanych związków w osoczu myszy, po podaniu dożylnym i dootrzewnowym zastosowano ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas.

#### **3.6.1 Wyznaczanie wykładnika stałej dysocjacji z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej**

Opracowanie nowej metody analitycznej pozwalającej na wyznaczenie wykładnika stałej dysocjacji dla badanych związków wymagało doboru odpowiednich warunków analizy. W trakcie optymalizacji metody dobrano odpowiednie parametry rozdzielania elektroforetycznego, takie jak rodzaj kapilary (długość, sposób powlekania wewnętrznej powierzchni kapilary), napięcie na kapilarze oraz warunki jej kondycjonowania, a także wybrano odpowiedni znacznik obojętny, analityczną długość fali oraz objętość dozowanej próbki.

### **3.6.1.1 Wybór kapilary**

Aparat pozwalał na użycie kapilar o różnych długościach. Ostatecznie zdecydowano, że kapilara o długości 40/50,2 cm pozwala na uzyskanie odpowiedniej równowagi między czasem analizy, a odpowiednim rozdzieleniem analitów. Pierwszy człon w zapisie oznacza długość efektywną, tzn. drogę jaką pokonuje analit od początku kapilary do okna detekcji, natomiast drugi człon, to całkowita długość kapilary. W metodzie użyto klasycznych krzemionkowych kapilar, bez modyfikacji powierzchni wewnętrznej (tzw. BFS – bare fused silica), o średnicy wewnętrznej 50  $\mu\text{m}$  i średnicy zewnętrznej 375  $\mu\text{m}$ , a długość kapilary dobrano tak, aby zoptymalizować rozdzielanie elektroforetyczne i czas analizy. Kapilarę termostatowano w temperaturze 25°C.

### **3.6.1.2 Wybór warunków kondycjonowania kapilary**

Przed pierwszym użyciem, kapilarę kondycjonowano według zaleceń producenta, czyli płukano ją przez 10 min 0,1 M roztworem NaOH, następnie przemywano wodą ultraczystą i buforem rozdzielającym przez 5 min, wszystkie kroki przeprowadzano pod ciśnieniem 206,8 kPa (30 psi). Kapilarę używaną kolejny raz, przed rozpoczęciem nowych analiz, kondycjonowano następującą sekwencją odczynników: 0,1 M roztwór NaOH, woda ultraczysta i bufor rozdzielający, każdy przez 3 min, pod ciśnieniem 206,8 kPa (30 psi). Na końcu każdej analizy kapilarę czyszczono 0,1 M NaOH i wodą ultraczystą, przez 5 min, pod ciśnieniem 206,8 kPa (30 psi). Przed każdym nastrzyknięciem kapilarę płukano przez 2 min, 0,1 M roztworem NaOH, następnie przez 2 min wodą ultraczystą oraz buforem, wszystkie kroki prowadzono pod ciśnieniem 206,8 kPa (30 psi). Kapilarę nieużywaną przechowywano w temperaturze pokojowej, po uprzednim napełnieniu wodą ultraczystą i zanurzeniu jej końców w wodzie.

### **3.6.1.3 Wybór objętości dozowanej próbki**

Badane próbki, do wypełnionej buforem kapilary, dozowano hydrodynamicznie pod ciśnieniem 3,447 kPa (0,5 psi) przez 5 s, uzyskując nastrzyk o objętości równej 6 nL. Dozowana objętość pozwoliła na uzyskanie pików o pożądanym kształcie.

### 3.6.1.4 Wybór wielkości przyłożonego napięcia

Wielkość napięcia dla każdego z użytych w analizach buforów ustalono poprzez ocenę zależności pomiędzy przyłożonym napięciem, a natężeniem prądu elektrycznego powstającym w trakcie rozdzielania elektroforetycznego. Liniowa zależność pomiędzy tymi wielkościami wskazywała na odpowiednią kompensację wydzielanego w kapilarze ciepła Joule’a oraz była potwierdzeniem stałości warunków analizy na całej długości kapilary. Wielkości napięcia dla każdego z buforów wraz z odpowiadającymi im wielkościami natężenia prądu zebrano w tabeli 3.3

Tabela 3.3. Napięcie przyłożone do kapilary oraz generowane natężenie prądu dla buforów używanych do wyznaczenia wykładnika stałej dysocjacji

| pH   | Napięcie [kV] | Natężenie [ $\mu$ A] |
|------|---------------|----------------------|
| 5    | +18           | ~27                  |
| 6    | +18           | ~29                  |
| 7    | +18           | ~20                  |
| 7,5  | +18           | ~31                  |
| 8    | +18           | ~30                  |
| 8,5  | +18           | ~29                  |
| 9    | +18           | ~24                  |
| 9,5  | +18           | ~24                  |
| 10   | +20           | ~24                  |
| 10,5 | +20           | ~22                  |
| 11   | +20           | ~23                  |
| 11,5 | +20           | ~26                  |

### 3.6.1.5 Wybór analitycznej długości fali

Oznaczenia wszystkich związków wykonywano stosując detekcję UV-Vis, przy długości fali równej 233 nm, odpowiadającej maksimum absorbancji dla antracyklin. Ponadto monitorowano rozdzielanie elektroforetyczne przy długości fali równej 254 nm, co stanowiło maksimum absorbancji dla znacznika obojętnego.

### 3.6.1.6 Wybór obojętnego znacznika

Znacznik obojętny jest to substancja, która w warunkach analizy nie jonizuje, a jej migracja w kapilarze zależy jedynie od EOF, z tego względu może być stosowana do wyznaczenia EOF. Dodatkową pożądaną właściwością, jaką powinien cechować się znacznik obojętny jest absorbancja, inna niż oznaczanego analitu. W przypadku wyznaczania  $pK_a$  związków, jako znacznik obojętny wybrano 0,5 % aceton. Aceton spełniał wszystkie wymagania stawiane znacznikowi obojętnemu tzn. w całym zakresie analizowanych stężeń nie jonizował oraz w porównaniu do antracyklin miał istotnie wyższe maksimum absorbancji ( $\lambda > 250$  nm).

### 3.6.1.7 Obliczenia

W celu wyznaczenia  $pK_a$ , wyznaczono ruchliwość efektywną cząsteczki, w szerokim zakresie pH. Ruchliwość efektywną obliczono znając czas migracji analizowanej substancji ( $t_R$ ) oraz znacznika obojętnego ( $t_{eof}$ ), korzystając z równania 7 [22]:

$$m_{eff} = m_R - m_{eof} = \frac{L_{tot} \cdot L_{eff}}{V} \cdot \left( \frac{1}{t_R} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \quad (7)$$

Gdzie:

$m_{eff}$  - efektywna ruchliwość elektroforetyczna badanej substancji

$m_R$  - pozorna ruchliwość elektroforetyczna badanej substancji

$m_{eof}$  - ruchliwość elektroforetyczna obojętnego znacznika (ruchliwość EOF)

$L_{tot}$  - całkowita długość kapilary

$L_{eff}$  - długość kapilary od miejsca nastrzyknięcia do okna detekcji

$V$  – wielkość przyłożonego napięcia

$t_R$  - czas migracji analizowanej substancji

$t_{eof}$  - czas migracji obojętnego znacznika

Ruchliwość efektywna związku jest zależna od pH środowiska i może być opisywana jako zależność  $pK_a$  związku od pH środowiska. Dla amfolitów, z jedną grupą kwasową i jedną grupą zasadową, wartość  $m_{eff}$  oblicza się korzystając ze wzoru 8<sup>[113]</sup>:

$$m_{eff} = \frac{m_{A+} \cdot 10^{pK_{a1}-pH} + m_{A-} \cdot 10^{pH-pK_{a2}}}{10^{pK_{a1}-pH} + 10^{pH-pK_{a2}} + 1} \quad (8)$$

Gdzie:

$m_{A+}$  - maksymalna ruchliwość elektroforetyczna dla związku w postaci kationu

$m_{A-}$  - maksymalna ruchliwość elektroforetyczna dla związku w postaci anionu

$K_{a1}, K_{a2}$  – mieszane stałe dysocjacji

Mieszane stałe dysocjacji mogą być zastosowane do obliczenia termodynamicznych stałych dysocjacji. Do przeprowadzenia tego typu obliczeń niezbędne jest wyznaczenie korygującego współczynnika aktywności ( $\gamma_i$ ). W przypadku małych cząsteczek, w roztworach wodnych, o niskiej sile jonowej ( $I < 0,1$ ), w temperaturze 25°C, współczynnik ten może być obliczony na podstawie teorii Debye-Huckel, stosując wzór 9:

$$\gamma_i = \frac{0,5085 \cdot z^2 \sqrt{I}}{1 + 0,3281 \cdot a \sqrt{I}} \quad (9)$$

Gdzie:

$z$  - wartościowość jonu [-]

$I$  - siła jonowa buforu rozdzielającego [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^3$ ]

$a$  - średnica jonu [ $\text{\AA}$ ]

Wiedząc, że współczynnik aktywności dla związku niezjonizowanego jest równy 1<sup>[21]</sup> można, znając wartości mieszanych stałych dysocjacji obliczyć wartości termodynamiczne  $K_a$ , stosując równania 10 i 11:

$$K_{a1}^{th} = K_{a1} \frac{\gamma_{A-}}{\gamma_{HA}} \quad (10)$$

$$K_{a1}^{th} = K_{a1} \frac{\gamma_A}{\gamma_{HA+}} \quad (11)$$

Przedstawione w dalszej części pracy wartości wykładników stałych dysocjacji są to termodynamiczne wykładniki stałych dysocjacji.

### 3.6.1.8 Integracja danych

Uzyskane elektroferogramy oceniano za pomocą oprogramowania PeakFit v.4.12. Na podstawie wyznaczonych czasów migracji pików, odpowiadających substancji badanej i obojętnemu znacznikowi obliczano ruchliwości elektroforetyczne badanych związków, stosując równanie 7, po czym wyznaczano wartości  $pK_a$ , badając zależność ruchliwości elektroforetycznej analitu od pH środowiska, z zastosowaniem regresji nieliniowej, korzystając z oprogramowania GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA).

### 3.6.2 Wyznaczanie współczynnika dystrybucji oraz współczynnika podziału z zastosowaniem mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej

Do przeprowadzenia zaplanowanych badań niezbędne było opracowanie optymalnych warunków analizy, takich jak wybór rodzaju kapilary, sposób nastrzyknięcia próbki, objętość dozowanej próbki oraz napięcie na kapilarze.

#### 3.6.2.1 Wybór kapilary

W badaniach używano niepowlekane kapilary krzemionkowe, o następujących parametrach: 40 cm - długość efektywna, 50,2 cm - długość całkowita, 50  $\mu m$  - średnica wewnętrzna, 375  $\mu m$  - średnica zewnętrzna. Rozdzielenie elektroforetyczne przeprowadzano w temperaturze 30°C. Aby skrócić czas analizy, bez zwiększania natężenia prądu i ilości wydzielanego w kapilarze ciepła Joule'a, zdecydowano o dozowaniu próbki do "krótkiego końca" (*short-end injection*), co polegało na podaniu próbki do końca kapilary, bliższemu oknu detekcji. Procedura ta umożliwiała zmniejszenie długości efektywnej kapilary do 10 cm, co pozwalało

skrócić czas analizy, bez konieczności zmiany przyłożonego napięcia. Jedyną zmienną o jakiej należało pamiętać była konieczność odwrócenia polaryzacji elektrod.

### **3.6.2.2 Wybór warunków kondycjonowania kapilary**

Kapilary kondycjonowano według procedury opisanej w sekcji 3.6.1.2

### **3.6.2.3 Wybór objętości dozowanej próbki**

Próbki dozowano hydrodynamicznie, pod ciśnieniem 0,689 kPa (0,1 psi), przez 3 sek. do końca kapilary bliższemu oknu detekcji.

### **3.6.2.4 Wybór przyłożonego napięcia**

Wielkość napięcia ustalono na podstawie analizy zależności przyłożonego napięcia od uzyskanego natężenia. Ostatecznie wybrano napięcie równe - 8 kV.

### **3.6.2.5 Wybór analitycznej długości fali**

Elektroferogramy rejestrowano przy dwóch długościach fali, tj. 233 nm, która odpowiada maksimum absorbancji dla antracyklin oraz przy 214 nm, która jest uniwersalną długością fali, stąd mogła być użyta dla związków referencyjnych<sup>[114]</sup>.

### **3.6.2.6 Obliczenia**

Wyznaczenie logD z zastosowaniem technik MEEKC jest metodą pośrednią, co oznacza, że w pierwszym etapie należy wyznaczyć krzywą zależności logk od znanych z piśmiennictwa wartości logD, dla serii związków referencyjnych. Kolejnym krokiem jest określenie logD dla badanego związku, w oparciu o równanie krzywej wzorcowej.

Parametr logk można obliczyć korzystając z równania 12<sup>[115]</sup>:

$$\log k = \log \frac{t_R - t_{EOF}}{\left(1 - \frac{t_R}{t_{MIC}}\right)} \cdot t_{EOF} \quad (12)$$

Gdzie:



$t_R$  – czas migracji badanego związku,

$t_{EOF}$  - czas migracji obojętnego znacznika

$t_{MIC}$  - czas migracji znacznika mikroemulsji

Między wartościami  $\log D$  i  $\log P$  związku występuje zależność opisana równaniami 13 i 14<sup>[116]</sup>:

$$\log D_a = \log(P_n + P_i \cdot 10^{pH-pK_a}) - \log(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (13)$$

$$\log D_b = \log(P_n + P_i \cdot 10^{pK_b-pH}) - \log(1 + 10^{pK_b-pH}) \quad (14)$$

Gdzie:

$\log D_a$  – współczynnik dystrybucji związku o charakterze kwasowym

$\log D_b$  – współczynnik dystrybucji związku o charakterze zasadowym

$P_n$  – współczynnik podziału związku w formie niezjonizowanej

$P_i$  – współczynnik podziału związku w formie zjonizowanej

$pK_a$  – wykładnik stałej dysocjacji związku o charakterze kwasowym

$pK_b$  - wykładnik stałej dysocjacji związku o charakterze zasadowym

Korzystając z podanych równań, obliczono współczynniki podziału dla badanych związków. Wykorzystano do tego celu otrzymane we wcześniejszych badaniach wartości wykładnika stałej dysocjacji.

Aby uprościć obliczenia przyjęto, że wartość  $\log P_i$  jest mniejsza od  $\log P$  o 3,15. Podana wartość jest średnią różnicą pomiędzy  $\log P$  i  $\log P_i$ , która zależy od siły jonowej roztworu i struktury związku. Podobne podejście zastosowano z powodzeniem przez innych autorów<sup>[117,118]</sup>.

Antracykliny, jako związki o charakterze amfolitowym występują w formie zjonizowanej w całym zakresie pH, dlatego do określenia  $\log D$  zdecydowano o użyciu buforu o  $pH = 10$ , w którym związki te przyjmowałyby charakter anionowy. Zminimalizowano tym samym interakcję między kationowym surfaktantem, a substancją badaną<sup>[119]</sup>. Obliczenie współczynnika retencji dla związków zdysocjowanych, wymagało danych o ruchliwości elektroforetycznej związku, w buforze użytym do analizy, lecz bez dodatku mikroemulsji. Następnie korzystając z równania 15 obliczono wartość  $\log k$  dla nowych związków, pochodnych antybiotyków antracyklinowych, tak aby w kolejnym etapie obliczyć ich wartości  $\log D_{pH10}$ , w oparciu o równanie krzywej wzorcowej<sup>[120,121]</sup>.

$$\log k = \log \left( \frac{m_R - m_{eph}}{m_{mic} - m_R} \right) \quad (15)$$

Gdzie:

$m_R$  – ruchliwość elektroforetyczna związku badanego w mikroemulsji

$m_{eph}$  – ruchliwość elektroforetyczna związku badanego w buforze, bez obecności fazy pseudostacjonarnej

$m_{mic}$  – ruchliwość elektroforetyczna kropelek mikroemulsji

### **3.6.3 Badanie profilu farmakokinetycznego nowych związków**

#### **3.6.3.1 Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego**

Rozdzielenie chromatograficzne badanych związków przeprowadzano na kolumnie Acquity UPLC BEH C18 (Waters, Milford, USA), wypełnionej żelem krzemionkowym, modyfikowanym chemicznie grupami oktadecylowymi. Średnica ziaren żelu była równa 1,7  $\mu\text{m}$ , średnica kolumny wynosiła 3,0 mm, natomiast jej długość była równa 100 mm. Do rozdzielania chromatograficznego zastosowano fazy ruchome o następującym składzie: (A) woda z dodatkiem kwasu mrówkowego o stężeniu 1 %; (B) acetonitryl z dodatkiem 1 % kwasu mrówkowego. Analizy wykonywano w elucji izokratycznej (65%A:35%B) stosując objętość nastrzyku równą 5  $\mu\text{L}$ . Temperatura kolumny była równa 30  $^{\circ}\text{C}$ , szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,350 mL/min, natomiast czas trwania analizy był równy 10 min.

#### **3.6.3.2 Analiza masowa badanych związków**

Jonizację analitów w detektorze masowym uzyskiwano poprzez zastosowanie łagodnej metody jonizacji, na skutek rozpylania analitów w polu elektrycznym (ESI), z użyciem azotu jako gazu nośnego oraz źródła jonów Agilent JetStream Technology. Parametry detektora masowego były następujące:

- Tryb jonizacji – dodatni
- Temperatura odparowania – 310  $^{\circ}\text{C}$
- Przepływ gazu – 8 mL/min
- Ciśnienie nebulizera – 35 psi (241,3 kPa)
- Napięcie na końcach igły – 4000 V

Przejścia jonowe monitorowano w trybie śledzenia wielokrotnych reakcji fragmentacji (MRM) dla każdego analizowanego związku i wzorca wewnętrznego, a identyfikacji dokonywano na podstawie stosunku masy do ładunku. Przejścia wybrane do analizy wraz z parametrami detekcji dla każdego ze związków zebrano w tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Wybrane do analizy ilościowej przejścia jonowe wraz z parametrami detekcji dla poszczególnych analitów

| Związek    | Jon macierzysty<br>(m/z) | Jon potomny<br>(m/z) | Energia<br>zderzeń [V] | Napięcie<br>fragmentatora [V] |
|------------|--------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| DOX- FPIP  | 639,3                    | 321,1                | 46                     | 170                           |
| DOX-FMOR   | 642,2                    | 346,6                | 30                     | 178                           |
| DOX-FHEX   | 626,2                    | 321,1                | 46                     | 190                           |
| DAU-FPIP   | 623,3                    | 321,1                | 38                     | 166                           |
| DAU-FMOR   | 626,2                    | 321,1                | 38                     | 190                           |
| DAU-FHEX   | 637,3                    | 321,1                | 42                     | 202                           |
| EDOX-FPIP  | 639,3                    | 321,1                | 46                     | 170                           |
| EDOX-FMOR  | 642,2                    | 227,1                | 22                     | 166                           |
| EDOX-FHEX  | 626,2                    | 321,1                | 46                     | 190                           |
| EDAU-FPIP  | 623,3                    | 306,1                | 70                     | 166                           |
| EDAU-FMOR  | 626,2                    | 322,1                | 38                     | 158                           |
| EDAU-FHEX  | 637,3                    | 321,1                | 42                     | 202                           |
| KARWEDILOL | 407,2                    | 224,1                | 22                     | 154                           |

### 3.6.3.3 Obliczenia farmakokinetyczne

Farmakokinetyka jest nauką zajmującą się badaniem zmian stężenia ksenobiotyków w organizmie. Główne procesy, które są przedmiotem jej zainteresowania to wchłanianie, dystrybucja, biotransformacja oraz wydalanie z organizmu oraz wpływ drogi podania i dawki na ich przebieg.

Do określenia podstawowych parametrów farmakokinetycznych stosowane są różne metody analizy danych. Jednym z najpopularniejszych podejść jest analiza kompartmentowa, gdzie organizm traktuje się, jako system połączonych obszarów, jednorodnych pod względem kinetycznym. Przyjmuje się, że w każdym kompartmentcie badana substancja rozmieszczona jest równomiernie. Przy założeniu liniowości procesów farmakokinetycznych można zastosować farmakokinetkę bezmodelową<sup>[122,123]</sup>.

Na podstawie oznaczonych stężeń nowych antybiotyków antracyklinowych, w osoczu myszy, obliczono następujące parametry farmakokinetyczne:

- po podaniu *i.v.* – całkowite pole pod krzywą zmian stężenia związku od czasu ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ), stężenie początkowe osiągnięte w czasie  $t=0$  ( $C_0$ ), okres półtrwania ( $t_{0,5}$ ), średni czas przebywania związku w organizmie (MRT), objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym ( $V_{ss}$ ), klirens całkowity ( $Cl_T$ ).
- po podaniu *i.p.* – całkowite pole pod krzywą zmian stężenia związku od czasu ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ), stężenie maksymalne osiągnięte w czasie  $t_{max}$  ( $C_{max}$ ), czas po którym osiągnięte jest stężenie maksymalne  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), okres półtrwania ( $t_{0,5}$ ), średni czas przebywania związku w organizmie (MRT), dostępność biologiczna (F).

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$  - całkowite pole pod krzywą zmian stężenia związku od czasu, obliczono z zastosowaniem metody najmniejszych kwadratów, stosując wzór:

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \sum_{i=1}^n ((C_i + C_{i+1})/2) \cdot (t_{i+1}) + C_n/\lambda_z \quad (16)$$

Gdzie:

$C_i$  – stężenie związku w czasie  $t_i$

$C_n$  – stężenie związku w ostatnim punkcie czasowym

$\lambda_z$  – stała szybkości eliminacji związku wyznaczona metodą regresji liniowej dla końcowego, prostoliniowego odcinka fazy eliminacji związku

$AUMC_{0 \rightarrow \infty}$  - pole pod pierwszym momentem krzywej obliczono ze wzoru:

$$AUMC_{0 \rightarrow \infty} = \sum_{i=1}^n \left( \frac{(t_i \cdot C_i + t_{i+1} \cdot C_{i+1})}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) + (t_n \cdot C_n) / \lambda_z + C_n / \lambda_z^2 \quad (17)$$

$t_{0,5}$  – biologiczny okres półtrwania obliczono ze wzoru:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad (18)$$

Średni czas przebywania związku w organizmie obliczono ze wzoru:

$$MRT = \frac{AUMC_{0 \rightarrow \infty}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (19)$$

Klirens całkowity obliczono ze wzoru:

$$Cl_T = \frac{D_{iv}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (20)$$

Gdzie:

$D_{iv}$  – dawka związku po podaniu dożylnym

Objętość dystrybucji ( $V_{ss}$ ) obliczono ze wzoru:

$$V_{ss} = \frac{D_{iv} \cdot AUMC_{0 \rightarrow \infty}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (21)$$

Dostępność biologiczną związku po podaniu *i.p.* obliczono ze wzoru:

$$F = \frac{D_{iv} \cdot AUC_{0 \rightarrow \infty i.p.}}{D_{ip} \cdot AUC_{0 \rightarrow \infty i.v.}} \cdot 100\% \quad (22)$$

Gdzie:

$D_{ip}$  – dawka związku po podaniu *i.p.*

$AUC_{0 \rightarrow \infty i.p.}$  - całkowite pole pod krzywą zmian stężenia związku od czasu po podaniu *i.p.*

$AUC_{0 \rightarrow \infty i.v.}$  - całkowite pole pod krzywą zmian stężenia związku od czasu po podaniu *i.v.*

Obliczenia wykonano korzystając z programu WinNonlin (wersja 5.1, Pharsight, CA, USA) przy zastosowaniu metody ważenia  $1/y^2$ .

#### **3.6.3.4 Walidacja metody oznaczania nowych antybiotyków antracyklinowych z zastosowaniem systemu ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas**

W ramach walidacji metody wyznaczono następujące parametry metody: precyzja, dokładność, odzysk, efekt matrycy oraz stabilność. Proces walidacji przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Agencji Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) oraz Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency, EMA)<sup>[124,125]</sup>.

### 3.6.3.4.1 Liniowość

Parametr ten określany jest jako zależność odpowiedzi detektora od stężenia analitu. Oceniono go na podstawie krzywych wzorcowych dla badanych związków, w zakresie stężeń: 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 500; 1000 ng/mL.

Liniowość metody oceniono na podstawie wartości współczynnika determinacji ( $R^2$ ), korzystając z zależności stosunku powierzchni pików dla badanego związku do wzorca wewnętrznego, od stężenia analitu w próbce. Wyznaczone wartości stężeń porównano z wartościami teoretycznymi (*back calculation*). Według wytycznych, otrzymane różnice powinny mieścić się w granicach  $\pm 15\%$ , z wyjątkiem próbek dolnej granicy oznaczalności (LLOQ), gdzie dopuszczono różnicę  $\pm 20\%$ .

### 3.6.3.4.2 Precyzja i dokładność

Precyzja metody, to stopień zgodności wyników uzyskanych w serii niezależnych pomiarów wykonywanych w określonych warunkach. Dokładność natomiast jest miarą zgodności uzyskanych wyników z wartością przyjętą jako prawdziwa. Dokładność opracowanej metody obliczono na podstawie równania 23:

$$\text{Dokładność [\%]} = \frac{C_{\text{oznaczone}}}{C_{\text{teoretyczne}}} \cdot 100\% \quad (23)$$

Pomiary mające na celu określenie precyzji i dokładności wykonano dla czterech różnych stężeń każdego ze związków: wysokiego (HOQ), średniego (MOQ), niskiego (LOQ) i dla LLOQ, co odpowiadało nominalnym stężeniom: 900 ng/mL, 400 ng/mL, 3 ng/mL i 1 ng/mL. Parametry te obliczono po przeprowadzeniu oznaczeń 6 przygotowanych niezależnie próbek dla każdego poziomu stężeń, w ciągu jednego dnia (*intraday*), zgodnie z procedurą opisaną w sekcji 3.3.3.3. Kryteria akceptacji dla parametrów dokładności i precyzji określają, że wartość oznaczonego stężenia powinna mieścić się w zakresie 85-115 % stężenia teoretycznego (RSD% nie powinno przekraczać 15%), jednak dla próbki wyznaczającej LLOQ, stężenie powinno mieścić się w zakresie 80-120% stężenia teoretycznego, a wartość błędu względnego nie powinna być większa od 20%.

$$RSD [\%] = \pm \frac{SD}{C_{\text{sr}}} \cdot 100\% \quad (24)$$

Gdzie:

SD - odchylenie standardowe

C<sub>sr</sub> - stężenie średnie

#### 3.6.3.4.3 Odzysk

Odzysk określa wydajność ekstrakcji i obliczono go poprzez porównanie powierzchni pików otrzymanych po analizie próbek QC o stężeniach 3 i 400 ng/mL, z próbkami do których analit w odpowiedniej ilości został dodany, w ostatnim etapie przygotowania próbki (*post-extraction addition*).

$$RE [\%] = \frac{C}{B} \cdot 100\% \quad (25)$$

Gdzie:

C – sygnał analityczny próbek kontrolnych po ich oznaczeniu

B – sygnał analityczny próbek kontrolnych, gdzie anality dodano w ostatnim etapie przygotowania tych próbek (*post extraction addition*)

Analizę odzysku przeprowadzono na podstawie pięciu niezależnie przygotowanych zestawów próbek.

#### 3.6.3.4.4 Efekt matrycy

Bezwzględny efekt matrycy określono dzieląc stosunek powierzchni pików analitu i wzorca wewnętrznego uzyskanych w analizie próbek przygotowanych zgodnie z metodą *post-extraction addition* przez stosunek powierzchni pików analitu i wzorca wewnętrznego dla próbek, w przypadku których użyto wody jako matrycy, przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w sekcji 3.3.3.3.

$$ME [\%] = \frac{B}{A} \cdot 100\% \quad (26)$$

Gdzie:



A – sygnał analityczny dla roztworów próbek kontrolnych

B – sygnał analityczny próbek kontrolnych, gdzie anality dodano w ostatnim etapie przygotowania próbek (*post extraction addition*)

Gdy względne odchylenie standardowe (RSD%) bezwzględnego efektu matrycy jest większe niż 15%, przyjmuje się, że efekt matrycy jest znaczący i wpływa na parametry walidacji, takie jak precyzja lub dokładność.

#### **3.6.3.4.5 Stabilność**

Stabilność postpreparatywną badanych próbek określono na podstawie analizy dwóch stężeń: 3 ng/mL oraz 400 ng/mL, w trzech niezależnych powtórzeniach. Przygotowane próbki oznaczano po 15 h przechowywania ich w automatycznym podajniku próbek (czas niezbędny do oznaczenia sekwencji próbek), w temperaturze 4°C. Uzyskane stężenia porównano z wartościami teoretycznymi. Średnie obliczone stężenie nie powinno się różnić od stężenia nominalnego o więcej niż 15%.

#### **3.6.4 Modelowanie *in silico* właściwości fizykochemicznych**

Do przewidywania właściwości fizykochemicznych związków: logP, logD<sub>pH10</sub> i pK<sub>a</sub> w warunkach *in silico* zastosowano program ACD Percepta (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Kanada) z modulem przewidywania właściwości fizykochemicznych oraz podstawowych parametrów farmakokinetycznych<sup>[126]</sup>.

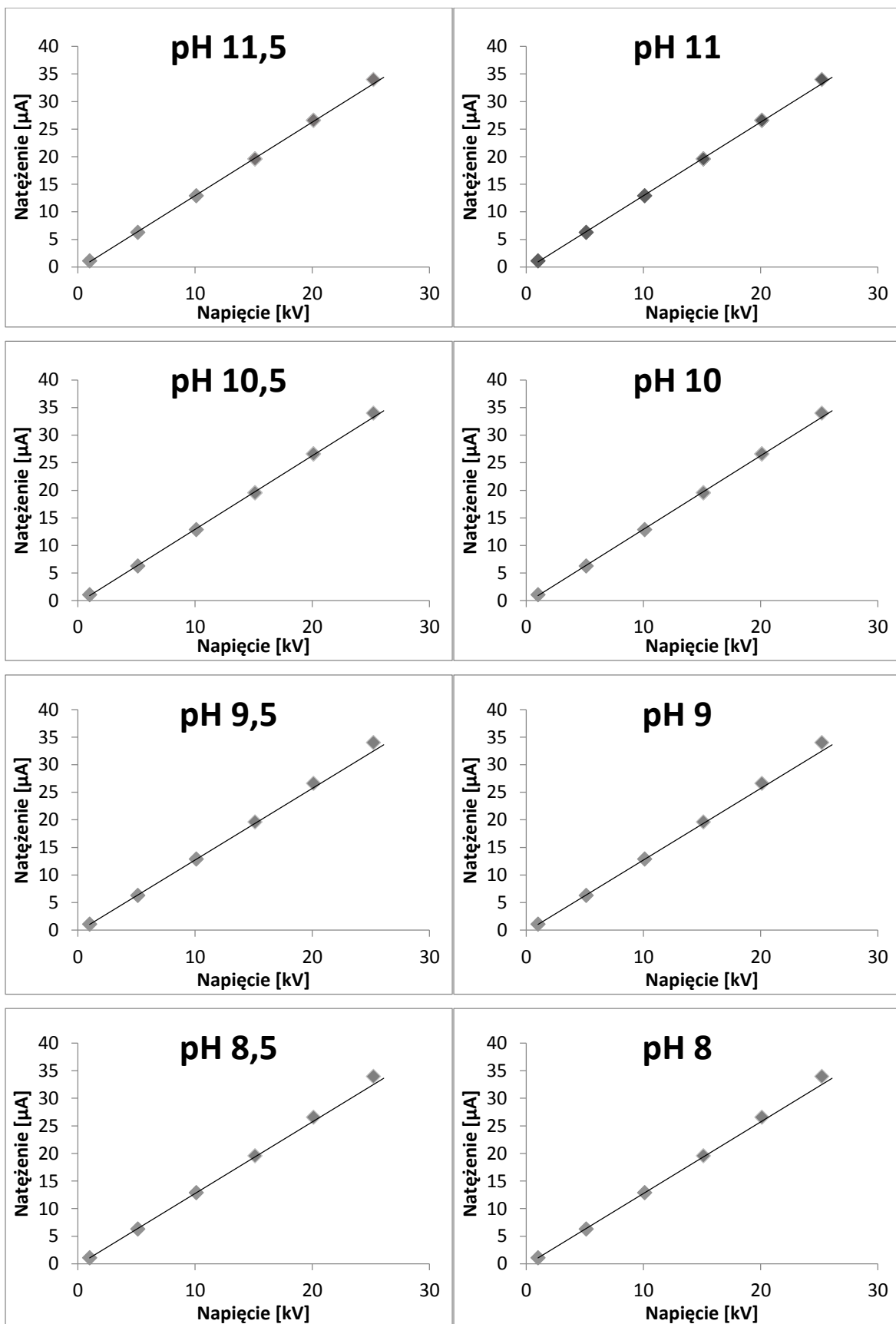
## 4 Wyniki

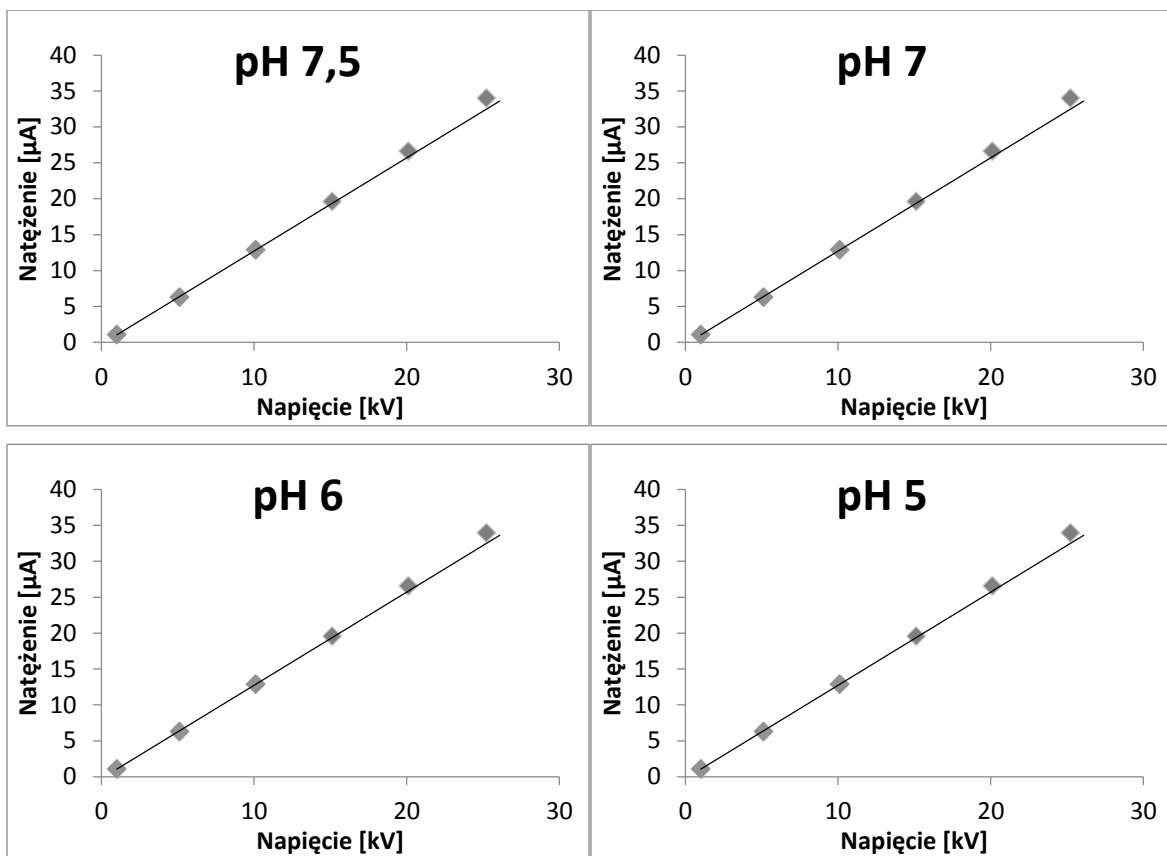
### 4.1 Wyznaczanie wykładnika stałej dysocjacji

W ramach badań opracowano metodę wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji. Optymalizacja metody obejmowała dobór odpowiednich warunków analizy, takich jak rodzaj detekcji, skład i pH buforu rozdzielającego, objętość dozowanej próbki, temperatura pomiaru, wielkość napięcia, stężenie związku, rodzaj kapilary (długość i sposób powlekania wewnętrznej powierzchni kapilary) oraz warunki jej kondycjonowania i przechowywania po zakończeniu analizy. W toku przeprowadzonych doświadczeń wybrano optymalne parametry (opisane w sekcji 3.6.1), pozwalające na uzyskanie odpowiedniego rozdzielenia elektroforetycznego.

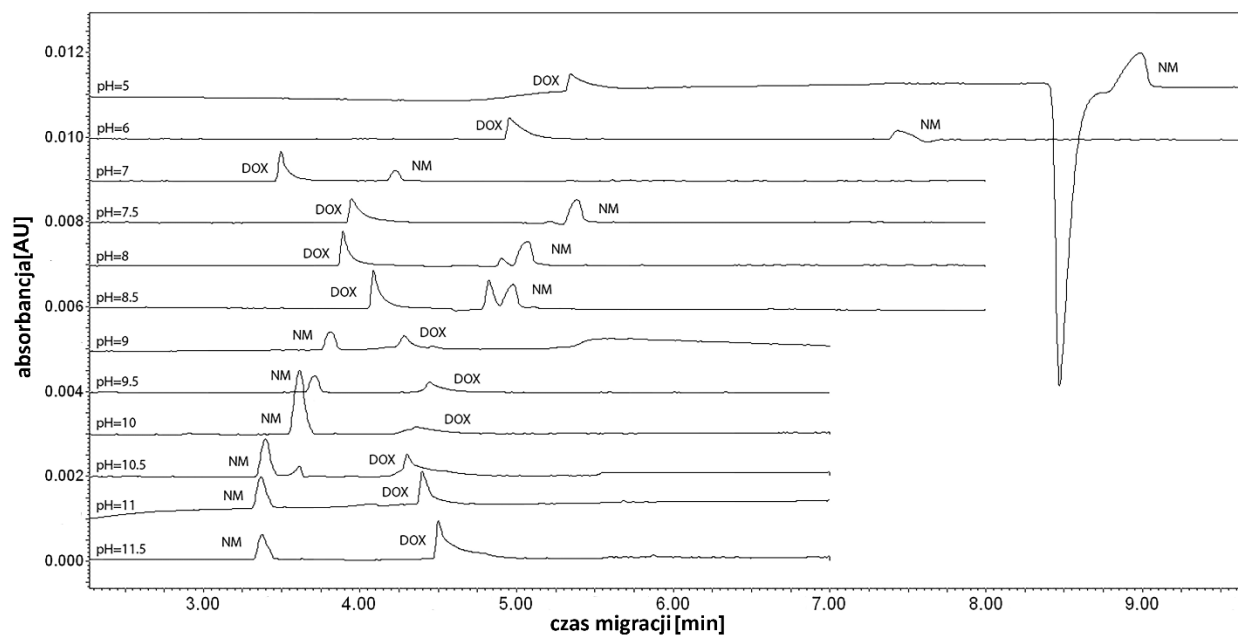
Aby zoptymalizować wartość przyłożonego napięcia oceniano zależność pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego w kapilarze, a wielkością przyłożonego napięcia. Liniowy przebieg tej zależności wskazuje na skuteczną kompensację wydzielanego w kapilarze ciepła Joule'a. Zależności pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego, a napięciem w kapilarze dla wszystkich używanych podczas analiz buforów przedstawiono na rycinie 4.1. Oceniona zależność między natężeniem, a napięciem prądu pozwoliła na wnioskowanie, że w kapilarze o długości 40/50,2 cm ma miejsce efektywna kompensacja ciepła Joule'a. Jedynie w przypadku wysokich wartości przyłożonego napięcia (powyżej 18 kV dla buforów o pH od 5 do 9,5 oraz powyżej 20 kV dla buforów o pH od 10 do 11,5) obserwowano odchylenie od liniowej zależności pomiędzy napięciem, a natężeniem prądu.

W celu wyznaczenia  $pK_a$  dla nowych antracyklin konieczne było przeanalizowanie ruchliwości elektroforetycznej związków w zależności od pH środowiska. Przykładowe elektroferogramy otrzymane w toku rozdzielenia elektroforetycznego próbek zawierających DOX oraz znacznik obojętny, w serii buforów o różnym pH oraz stałej sile jonowej, w zoptymalizowanych warunkach przedstawiono na rycinie 4.2. Z uwagi na fakt, iż maksimum absorbancji dla antracyklin wynosi ok. 233 nm, dla uzyskania wysokiej czułości analiz, wszystkie oznaczenia wykonano przy tej długości fali.



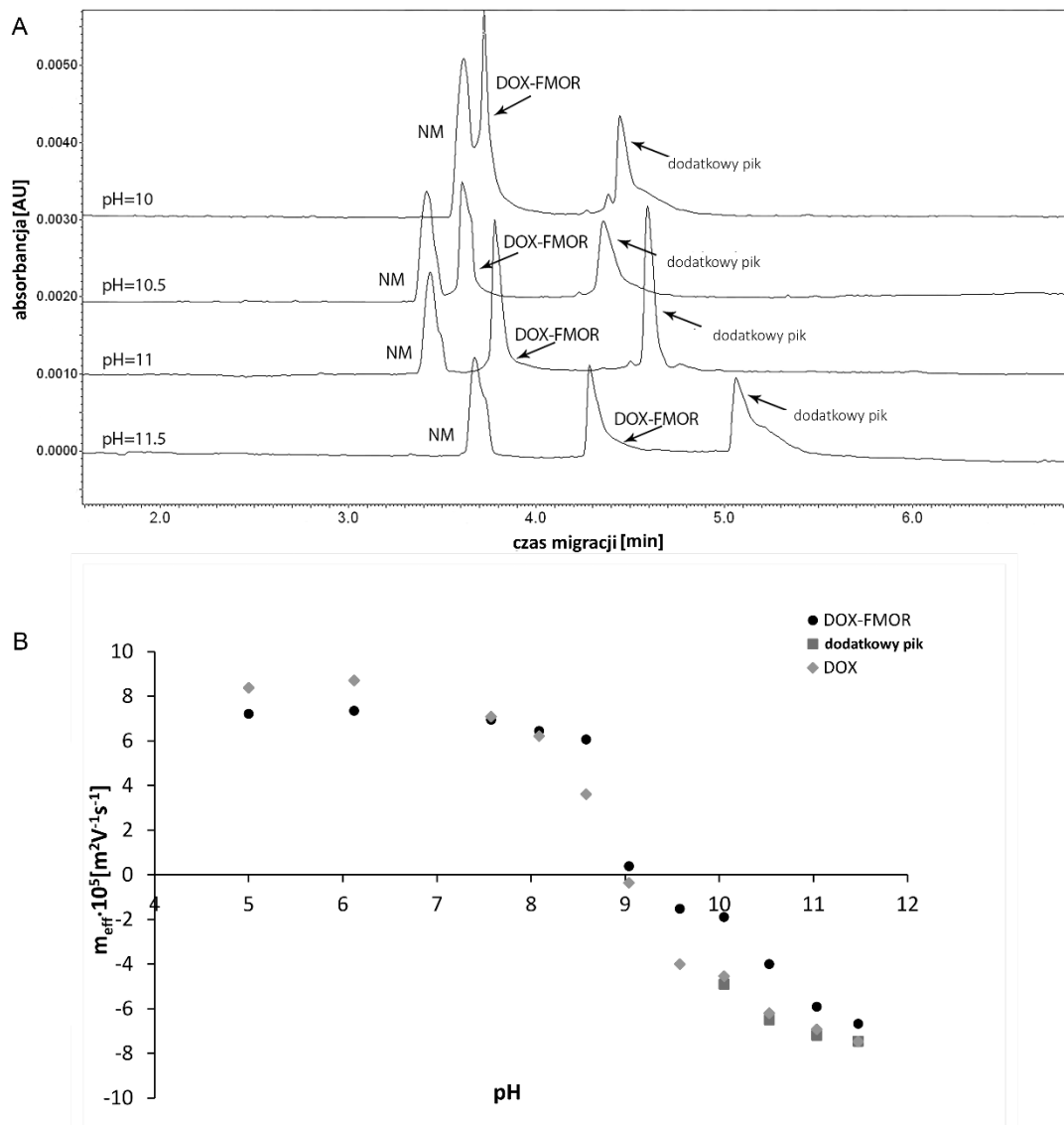


Rycina 4.1. Zależności pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego, a napięciem w kapilarze dla używanych buforów.

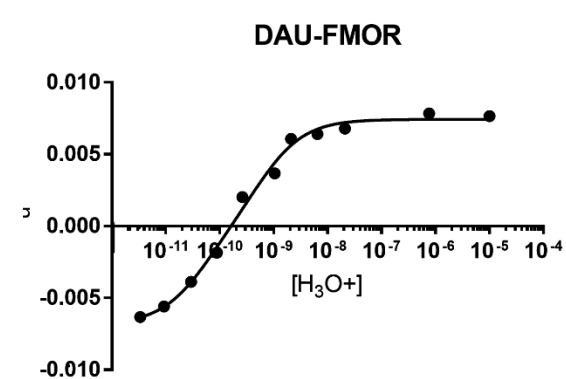
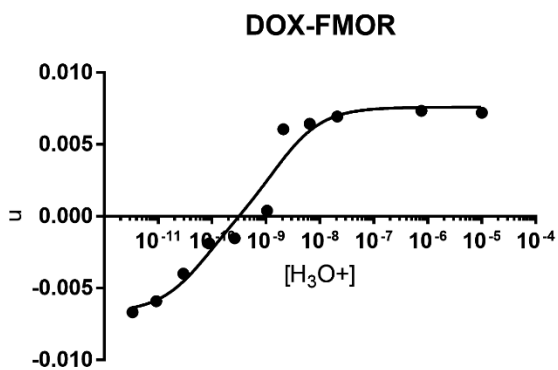
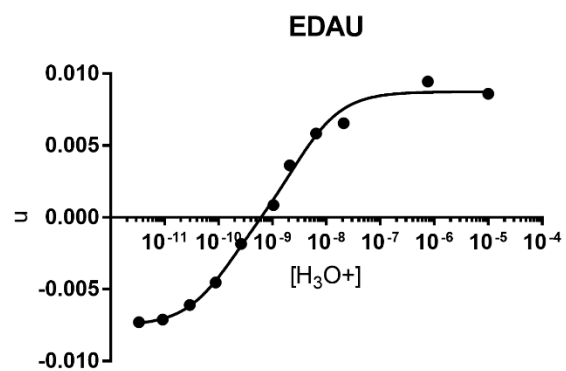
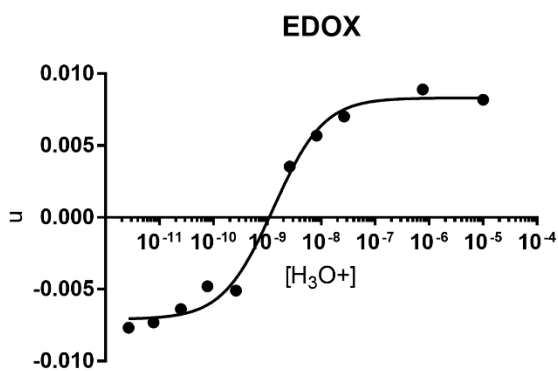
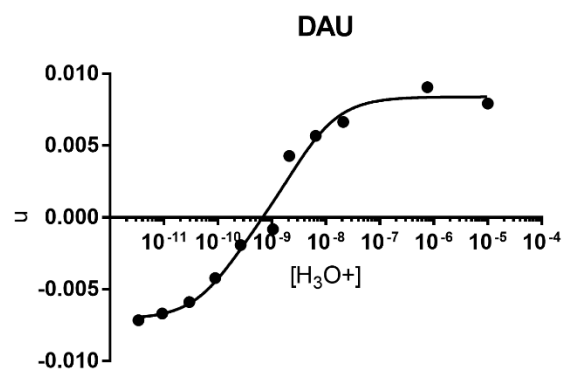
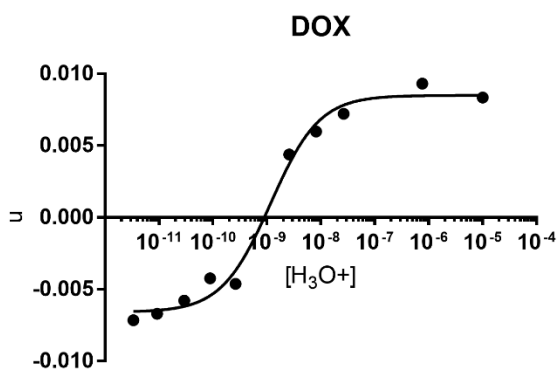


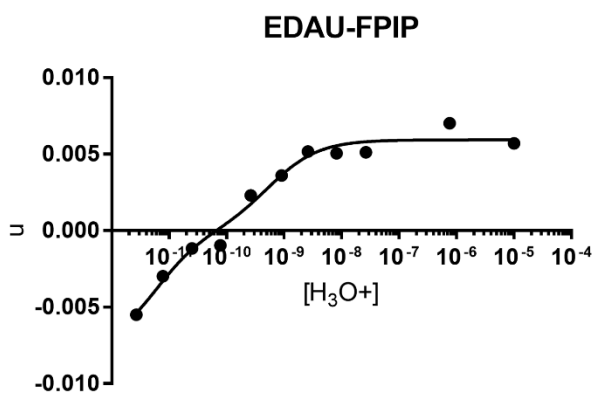
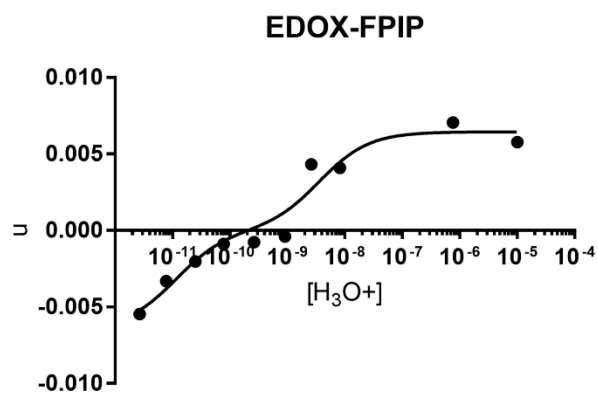
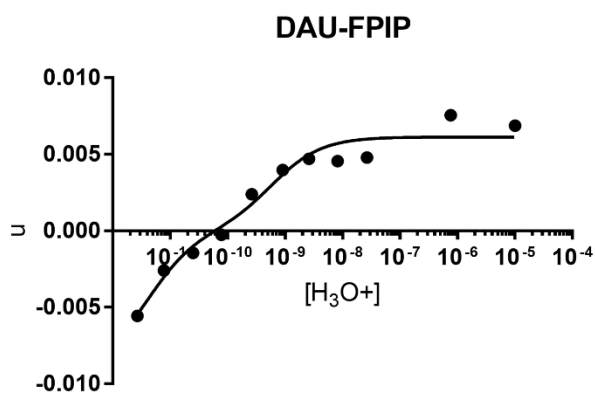
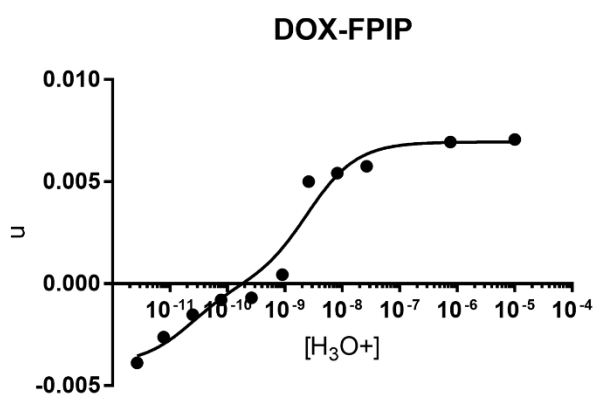
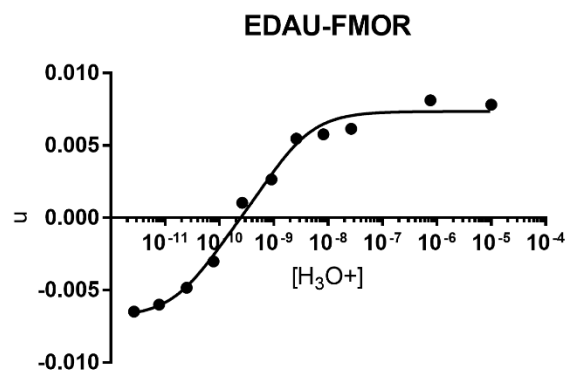
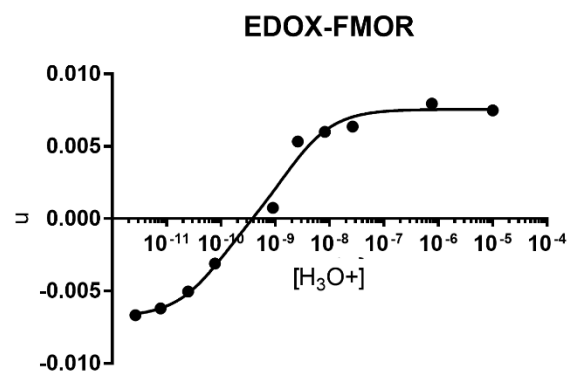
Rycina 4.2. Przykładowe elektroferogramy otrzymane w wyniku rozdzielania DOX w zależności od pH buforu. Piki oznaczone jako NM pochodzą od znacznika obojętnego<sup>[127]</sup>.

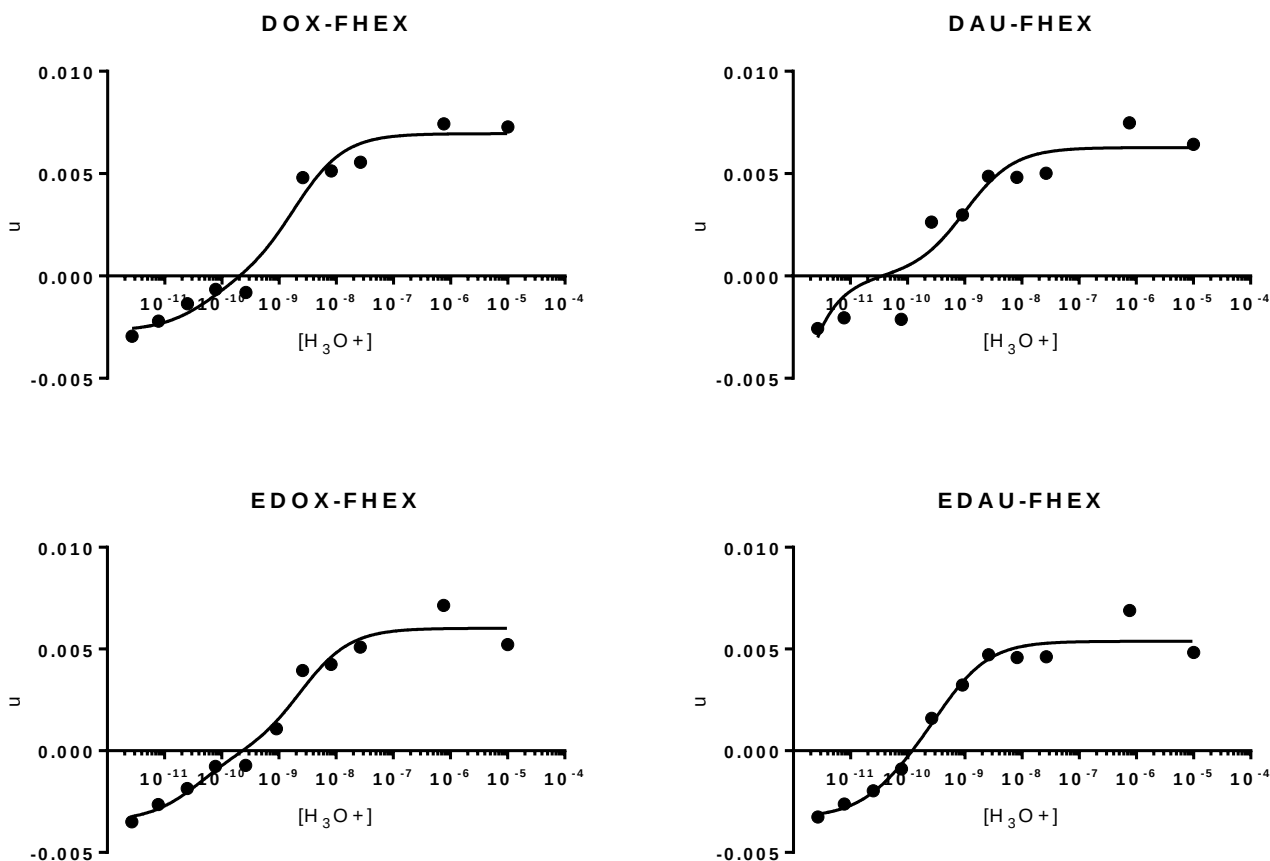
Przykładowe elektroferogramy otrzymane w toku analiz nowych antybiotyków antracyklinowych, w buforach o wysokim pH przedstawiono na rycinie 4.3A. Ze względu na pojawienie się na elektroferogramach dodatkowych pików, zdecydowano się na porównanie ruchliwości elektroforetycznych tych związków oraz leków macierzystych. Porównanie tych wartości przedstawiono również na rycinie 4.3B.



Rycina 4.3. Elektroferogramy otrzymane podczas rozdzielania związku DOX- FMOR w pH- 10- 11,5. Piki oznaczone jako DOX-FMOR pochodzą od badanego związku, piki oznaczone jako NM pochodzą od znacznika obojętnego, natomiast dodatkowe piki mogą prawdopodobnie pochodzić od produktu rozpadu DOX-FMOR, którym może być DOX (A). Porównanie wartości ruchliwości elektroforetycznej DOX, DOX-FMOR i dodatkowego pik (B). W przedstawionych warunkach ruchliwość elektroforetyczna pik nieznanego związku i DOX jest prawie taka sama<sup>[127]</sup>.







Rycina 4.4. Zależność ruchliwości elektroforetycznej badanych antracyklin od pH środowiska wraz z krzywą dopasowania z zastosowaniem regresji nieliniowej. Podczas integracji wyników odrzucono dane uzyskane w pH 7, ze względu na tworzenie się par jonowych badanych związków z fosforanami wchodzącymi w skład buforu.

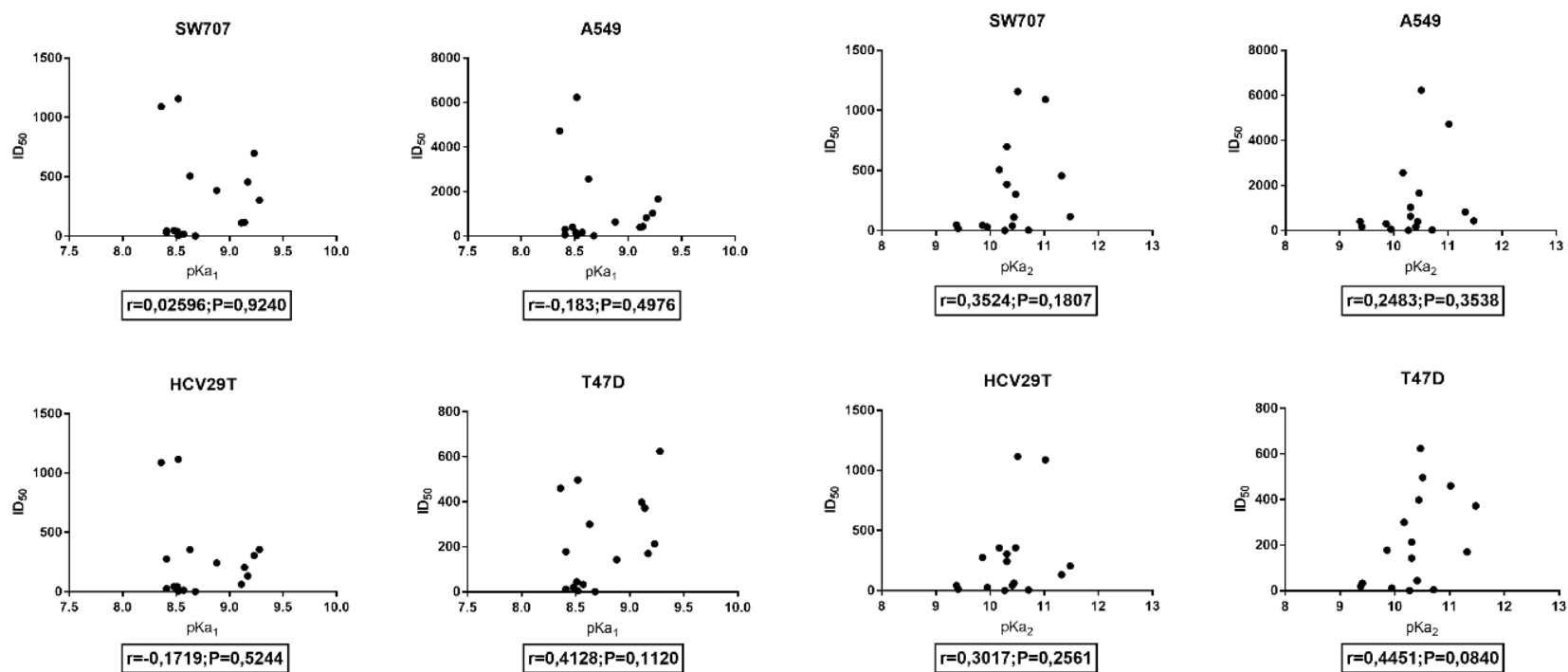
W celu wyznaczenia wartości  $pK_a$  dla nowych związków, przeprowadzono analizy zależności ich ruchliwości elektroforetycznej od pH buforu rozdzielającego, z zastosowaniem regresji nieliniowej. Przykłady otrzymanych dopasowań przedstawiono na rycinie 4.4.

Otrzymane wartości  $pK_{a1}$  oraz  $pK_{a2}$  dla badanych związków oraz obliczoną różnicę pomiędzy tymi wartościami zebrano w tabeli 4.1. Dla każdego ze związków wyznaczono również współczynnik determinacji  $R^2$ , który określa dopasowanie wyników doświadczalnych do wyników uzyskanych z obliczeń teoretycznych, z zastosowaniem oprogramowania GraphPad. Wszystkie badane związki charakteryzowały się właściwościami amfolitowymi. Najniższą wartością  $pK_{a1}$  (8,41) charakteryzowała się DAU, natomiast najwyższą (9,28) pochodna DAU-FHEX. Związek EDOX miał najniższą wartość  $pK_{a2}$  (9,38), natomiast najwyższą (11,48) charakteryzowała się DAU-FPIP.

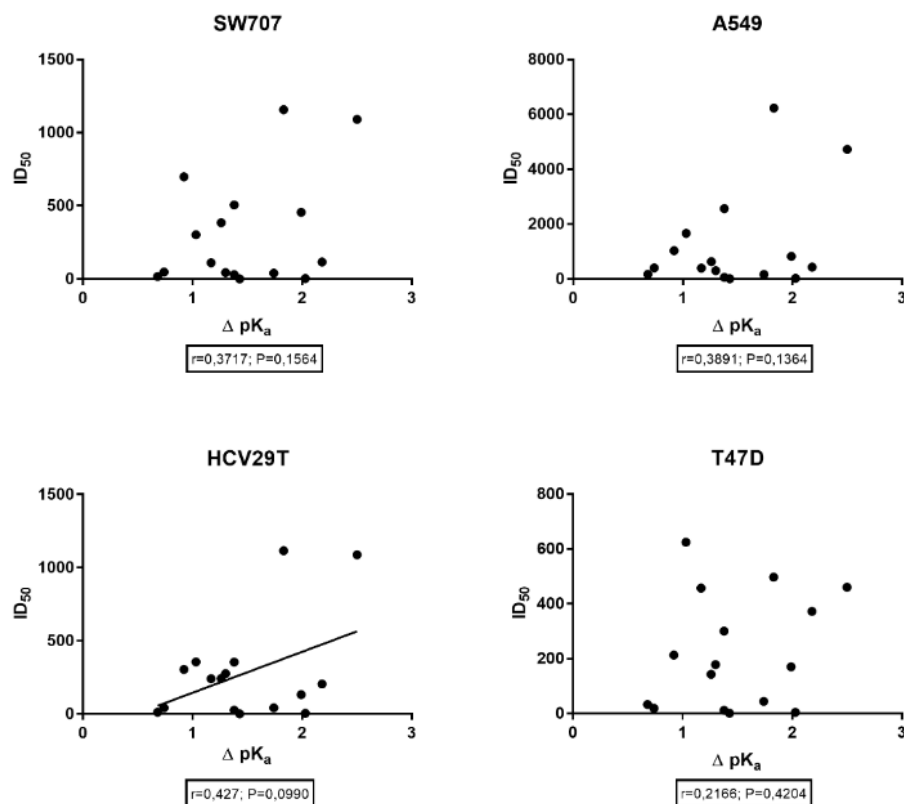


Tabela 4.1. Wyznaczone eksperymentalnie wartości  $pK_a$  dla 16 badanych związków<sup>[127]</sup>

| Związek   | Wykładnik stałej dysocjacji wyznaczony z zastosowaniem CZE |          |           |          |               |        |
|-----------|------------------------------------------------------------|----------|-----------|----------|---------------|--------|
|           | $pK_{a1}$                                                  | $\pm SD$ | $pK_{a2}$ | $\pm SD$ | $\Delta pK_a$ | $R^2$  |
| DOX       | 8,57                                                       | 0,04     | 9,41      | 0,03     | 0,84          | 0,9889 |
| EDOX      | 8,48                                                       | 0,05     | 9,38      | 0,05     | 0,90          | 0,9909 |
| DAU       | 8,41                                                       | 0,02     | 9,86      | 0,06     | 1,46          | 0,9817 |
| EDAU      | 8,41                                                       | 0,02     | 9,95      | 0,07     | 1,54          | 0,9947 |
| DOX-FMOR  | 8,68                                                       | 0,04     | 10,27     | 0,05     | 1,59          | 0,9641 |
| EDOX-FMOR | 8,63                                                       | 0,07     | 10,17     | 0,07     | 1,54          | 0,9898 |
| DAU-FMOR  | 9,11                                                       | 0,09     | 10,44     | 0,01     | 1,33          | 0,9931 |
| EDAU-FMOR | 8,88                                                       | 0,02     | 10,31     | 0,04     | 1,42          | 0,9894 |
| DOX-FPIP  | 8,52                                                       | 0,03     | 10,71     | 0,04     | 2,19          | 0,9666 |
| EDOX-FPIP | 8,36                                                       | 0,03     | 11,02     | 0,07     | 2,66          | 0,9518 |
| DAU-FPIP  | 9,14                                                       | 0,04     | 11,48     | 0,02     | 2,34          | 0,9621 |
| EDAU-FPIP | 9,17                                                       | 0,01     | 11,32     | 0,01     | 2,15          | 0,9776 |
| DOX-FHEX  | 8,51                                                       | 0,04     | 10,41     | 0,08     | 1,90          | 0,9728 |
| EDOX-FHEX | 8,52                                                       | 0,04     | 10,51     | 0,06     | 1,99          | 0,9696 |
| DAU-FHEX  | 9,28                                                       | 0,03     | 10,47     | 0,08     | 1,19          | 0,9741 |
| EDAU-FHEX | 9,23                                                       | 0,04     | 10,31     | 0,07     | 1,08          | 0,9724 |



Rycina 4.5. Korelacja pomiędzy wartościami pK<sub>a1</sub> oraz pK<sub>a2</sub> dla badanych antracyklin oraz ich toksycznością w stosunku do 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wartości ID<sub>50</sub> zaczerpnięto z publikacji<sup>[107]</sup>.



Rycina 4.6. Korelacja pomiędzy wartościami  $\Delta pK_a$  dla badanych antracyklin oraz ich toksycznością dla 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wartości  $ID_{50}$  zaczerpnięto z publikacji<sup>[107]</sup>.

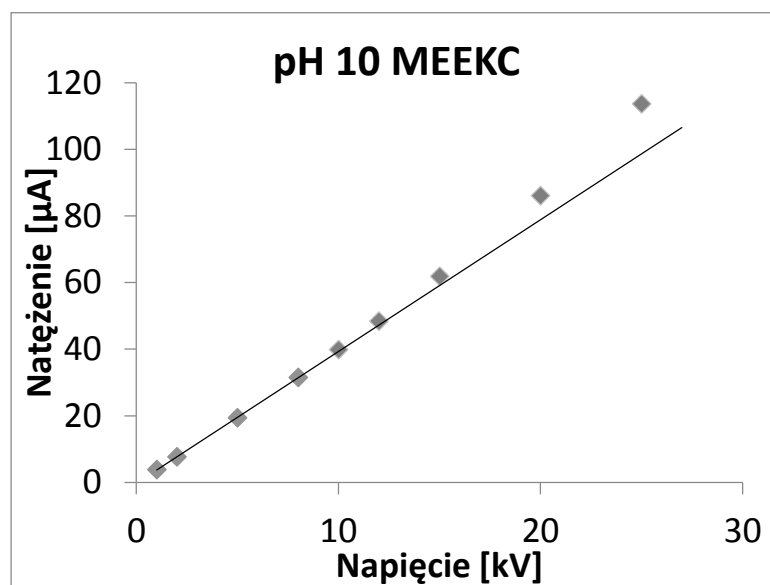
W celu sprawdzenia potencjalnego wpływu cech fizykochemicznych na właściwości biologiczne oceniono zależność pomiędzy wartościami  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  oraz  $\Delta pK_a$ , a aktywnością antyproliferacyjną ( $ID_{50}$ ) nowych antracyklin, przebadaną przez grupę Wąsowska i wsp<sup>[107]</sup>. Na rycinach 4.5. i 4.6. przedstawiono zależności pomiędzy wymienionymi parametrami. Badane związki charakteryzują się zwiększoną aktywnością antyproliferacyjną uzyskaną na podstawie badań z zastosowaniem testu z sulforodaminą. Spośród badanych związków, wobec wybranych linii komórkowych, największą aktywność antyproliferacyjną wykazywały związki DOX-FPIP i DOX-FMOR. Wartość  $ID_{50}$  dla DOX-FPIP w badanych liniach ludzkich komórek nowotworowych była równa od  $3,3 \pm 1,9$  ng/mL do  $23 \pm 1,3$  ng/mL, a dla DOX-FMOR mieściła się w zakresie od  $0,6 \pm 1,3$  ng/mL do  $10,6 \pm 1,5$  ng/mL. Istotną korelację wykazano jedynie

między wartościami  $ID_{50}$ , a  $\Delta pK_a$  dla linii komórkowej HCV29T, nowotworu pęcherza moczowego.

#### 4.2 Wyznaczanie współczynnika dystrybucji oraz współczynnika podziału

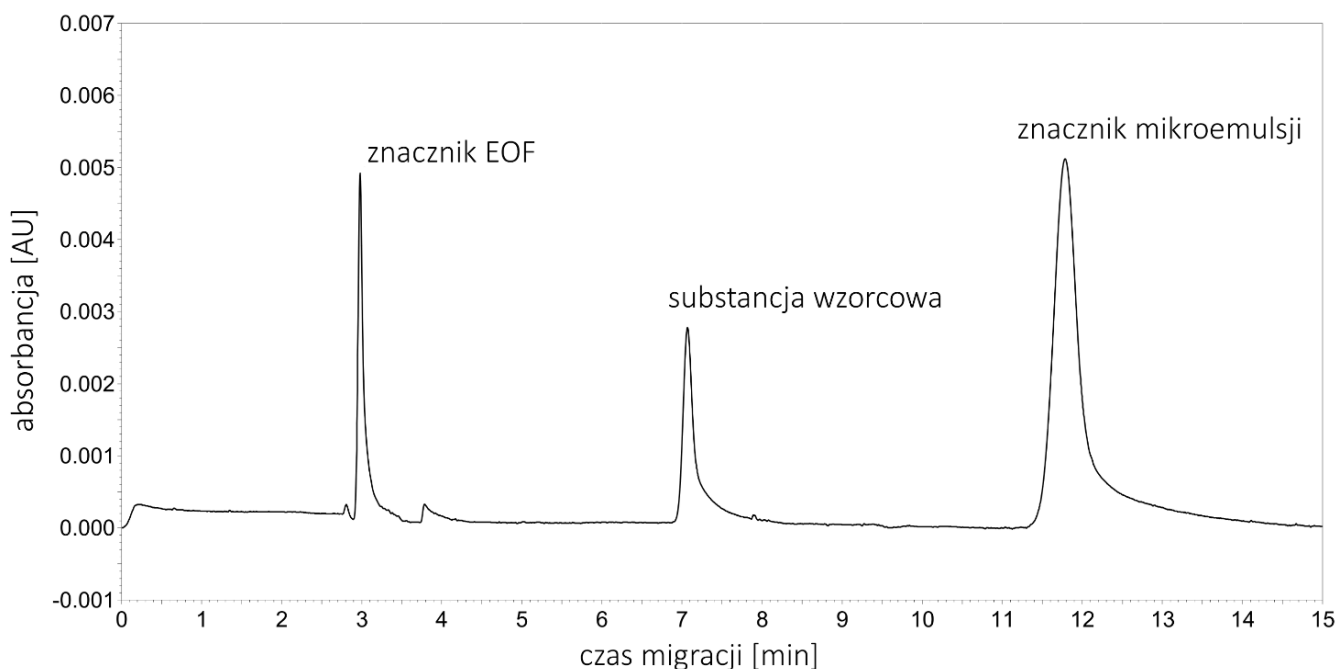
Optymalizacja metody pozwalającej na wyznaczenie współczynnika dystrybucji, a następnie obliczenie współczynnika podziału, wymagała podobnie jak w przypadku wyznaczania  $pK_a$  optymalizacji takich parametrów jak skład i pH buforu rozdzielającego, dobór składu mikroemulsji, objętość dozowanej próbki, temperatura pomiaru, wielkość napięcia, stężenie związku, warunki kondycjonowania kapilary. W toku przeprowadzonych doświadczeń wybrano parametry, opisane w sekcji 3.6.2, pozwalające na uzyskanie najbardziej optymalnego rozdzielania elektroforetycznego.

Podobnie jak w poprzedniej metodzie, po optymalizacji składu mikroemulsji, przeprowadzono analizy zależności pomiędzy natężeniem prądu, a napięciem w kapilarze, celem określenia optymalnej wartości napięcia, która zapewniłaby kompensację ciepła Joule'a. Zależność pomiędzy przyłożonym napięciem, a natężeniem prądu elektrycznego w kapilarze przedstawiono na rycinie 4.7. Po przyłożeniu napięcia przekraczającego 8 kV zaobserwowano zależność nieliniową.



Rycina 4.7. Zależność pomiędzy napięciem, a natężeniem prądu elektrycznego w kapilarze, w temp. 30°C dla użytej mikroemulsji.

W celu wyznaczenia parametru  $\log D_{\text{pH}10}$ , niezbędnym było oznaczenie czasów migracji substancji wzorcowych oraz badanych związków w mikroemulsji i buforze boranowym, będącym jej podstawowym składnikiem. Przykładowy elektroferogram, uzyskany w toku badań z zastosowaniem MEEKC przedstawiono na rycinie 4.8. Na podstawie wyznaczonych czasów migracji, określono ruchliwości elektroforetyczne serii substancji wzorcowych, a następnie na tej podstawie obliczono  $\log k$ .



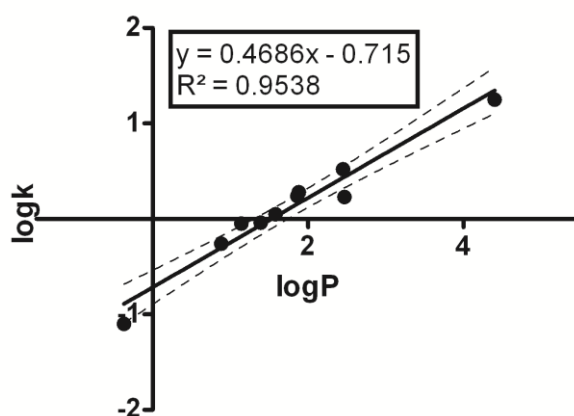
Rycina 4.8. Przykładowy elektroferogram uzyskany w efekcie analizy MEEKC. Zaznaczone piki pochodzą kolejno od DMSO (znacznik EOF), karbamazepiny (substancja wzorcowa) oraz 1-fenylo-dodekanu (znacznik mikroemulsji).

W tabeli 4.2. zebrano wartości  $D_{\text{pH}10}$  oraz  $\text{pK}_a$  dla związków referencyjnych, użytych do wyznaczenia krzywej wzorcowej oraz obliczone z zastosowaniem równań 12 i 15 wartości  $\log k$ . Wartości  $\log P$  oraz  $\text{pK}_a$  dla związków referencyjnych zaczerpnięto z danych literaturowych, biorąc po uwagę jedynie wyniki eksperymentalne, a nie dane uzyskane za pomocą metod *in silico*. Większość substancji wzorcowych w  $\text{pH}=10$ , nie dysocjowała, dlatego ich wartości  $\log P = \log D_{\text{pH}10}$ . Dla chloramfenikolu oraz fenytoiny obliczono wartość  $\log D_{\text{pH}10}$  na podstawie równania 14.

Tabela 4.2. Wyznaczone eksperymentalnie dla substancji wzorcowych wartości logP, pK<sub>a</sub> oraz logk

| Związek        | D <sub>pH10</sub>      | pK <sub>a</sub>      | logk  | ±SD  |
|----------------|------------------------|----------------------|-------|------|
| Benzokaina     | 1,86 <sup>[128]</sup>  | 2,8 <sup>[129]</sup> | 0,24  | 0,01 |
| Chloramfenikol | 1,14 <sup>[128]</sup>  | 5,5 <sup>[130]</sup> | -0,05 | 0,02 |
| Fenacetyna     | 1,58 <sup>[131]</sup>  | 2,2 <sup>[132]</sup> | 0,05  | 0,01 |
| Fenytoina      | 2,47 <sup>[128]</sup>  | 9 <sup>[133]</sup>   | 0,23  | 0,02 |
| Karbamazepina  | 2,45 <sup>[134]</sup>  | -                    | 0,52  | 0,02 |
| Kumaryna       | 1,39 <sup>[135]</sup>  | -                    | -0,04 | 0,01 |
| Metoprolol     | 1,88 <sup>[128]</sup>  | 9,7 <sup>[136]</sup> | 0,28  | 0,04 |
| Nikotynamid    | -0,37 <sup>[128]</sup> | 0,5 <sup>[137]</sup> | -1,10 | 0,01 |
| Prokainamid    | 0,88 <sup>[128]</sup>  | 8,9 <sup>[138]</sup> | -0,26 | 0,01 |
| Rezerpina      | 4,4 <sup>[23]</sup>    | 6,6 <sup>[139]</sup> | 1,25  | 0,04 |

W celu określenia logD<sub>pH10</sub> dla nowych antracyklin, wyznaczono krzywą wzorcową zależności wartości logk i logD<sub>pH10</sub> dla serii związków referencyjnych przedstawioną na rycinie 4.9.



Rycina 4.9. Krzywa wzorcowa zastosowana do wyznaczania logD<sub>pH10</sub> dla nowych antybiotyków antracyklinowych. Krzywa przedstawia zależność eksperymentalnie wyznaczonej wartości logk od logD<sub>pH10</sub> dla serii substancji wzorcowych.

W celu obliczenia parametru  $\log k$  dla badanych związków, które w tych warunkach ulegają dysocjacji, przeprowadzono pomiar ruchliwości elektroforetycznej w buforze o takim samym składzie jak bufor rozdzielający, lecz bez dodatku mikroemulsji. Obliczone ruchliwości przedstawione w tabeli 4.3, użyto do obliczenia  $\log k$  stosując równanie 15.

Tabela 4.3. Wartości ruchliwości efektywnej dla badanych związków w buforze o pH = 10, bez dodatku mikroemulsji

| Związek   | Ruchliwość [ $\text{cm}^2/\text{Vs}$ ] |
|-----------|----------------------------------------|
| DOX       | -0,000097                              |
| DAU       | -0,000097                              |
| EDOX      | -0,00011                               |
| EDAU      | -0,0001                                |
| DOX-FMOR  | -0,000067                              |
| DAU-FMOR  | -0,000065                              |
| EDOX-FMOR | -0,000084                              |
| EDAU-FMOR | -0,00008                               |
| DOX-FPIP  | -0,000025                              |
| DAU-FPIP  | -0,000024                              |
| EDOX-FPIP | -0,000034                              |
| EDAU-FPIP | -0,000019                              |
| DOX-FHEX  | -0,000023                              |
| DAU-FHEX  | -0,000023                              |
| EDOX-FHEX | -0,000031                              |
| EDAU-FHEX | -0,000033                              |

Na podstawie równania regresji i obliczonych wartości  $\log k$  wyznaczono wartości  $\log D_{pH10}$  dla badanych związków, a następnie obliczono ich wartości  $\log P$ , korzystając z równań 13 i 14 oraz otrzymanych wcześniej wartości  $pK_a$  (tabela 4.4).

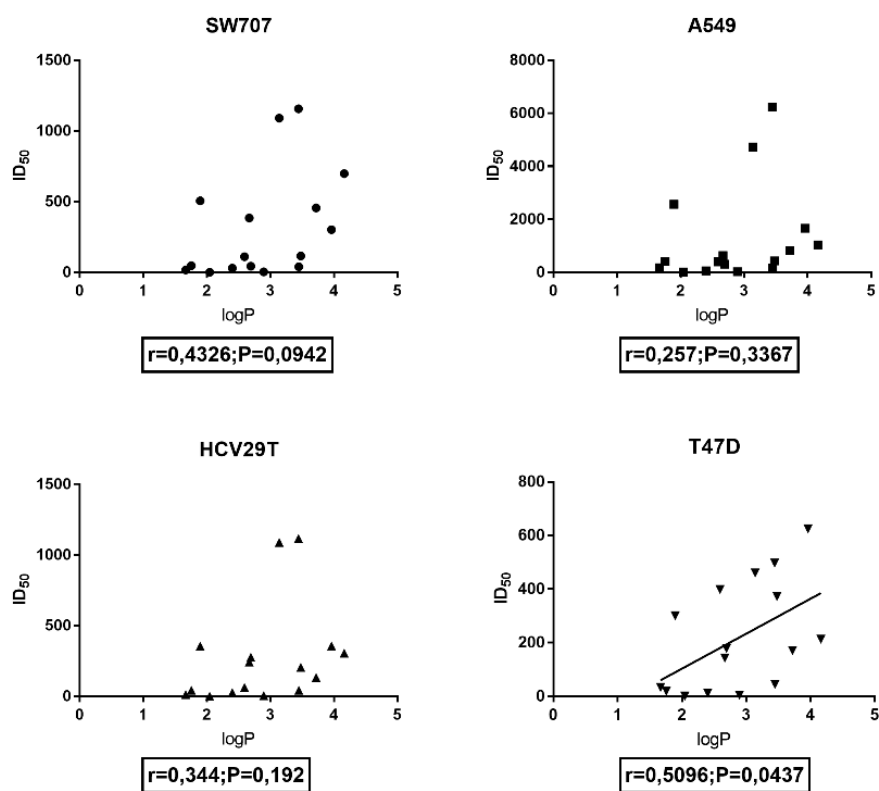
Tabela 4.4. Wartości  $\log D_{pH10}$  oraz  $\log P$  wyznaczone z zastosowaniem techniki MEEKC wraz z wartościami  $\log k$

| Związek   | $\log k$ | $\pm SD$ | $\log D_{pH10}$ | $\log P$ |
|-----------|----------|----------|-----------------|----------|
| DOX       | -0,257   | 0,01     | 0,978           | 1,669    |
| DAU       | 0,212    | 0        | 1,978           | 2,692    |
| EDOX      | -0,227   | 0,01     | 1,040           | 1,757    |
| EDAU      | 0,255    | 0,02     | 2,070           | 2,402    |
| DOX-FMOR  | 0,150    | 0,01     | 1,846           | 2,046    |
| DAU-FMOR  | 0,419    | 0,01     | 2,421           | 2,594    |
| EDOX-FMOR | 0,063    | 0        | 1,661           | 1,895    |
| EDAU-FMOR | 0,444    | 0,02     | 2,473           | 2,668    |
| DOX-FPIP  | 0,599    | 0,01     | 2,805           | 2,894    |
| DAU-FPIP  | 0,883    | 0        | 3,411           | 3,479    |
| EDOX-FPIP | 0,618    | 0,02     | 2,845           | 3,141    |
| EDAU-FPIP | 0,993    | 0,01     | 3,644           | 3,721    |
| DOX-FHEX  | 0,830    | 0,01     | 3,296           | 3,449    |
| DAU-FHEX  | 1,056    | 0,01     | 3,779           | 3,963    |
| EDOX-FHEX | 0,839    | 0,02     | 3,316           | 3,444    |
| EDAU-FHEX | 1,133    | 0,02     | 3,943           | 4,163    |



Badane leki macierzyste oraz pochodne FMOR charakteryzowały się względnie niskimi wartościami logP, co wskazuje na ich umiarkowane właściwości lipofilowe, podczas gdy pochodne FPIP i FHEX charakteryzowały się wysokimi wartościami logP, wskazującymi na ich wysoką lipofilność.

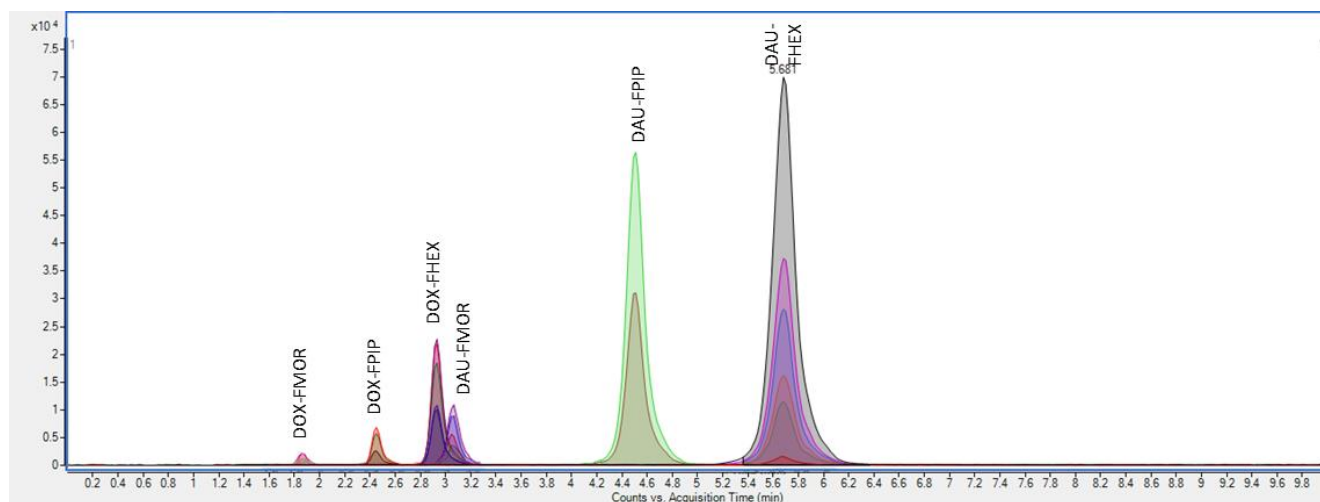
Podobnie jak w przypadku właściwości kwasowo-zasadowych, sprawdzono potencjalny związek pomiędzy wartościami logP oraz ID<sub>50</sub> ocenioną wcześniej przez zespół Wąsowska i wsp.<sup>[107]</sup> (Rycina 4.10). Wykazano istotną korelację jedynie dla linii T47D nowotworu piersi.



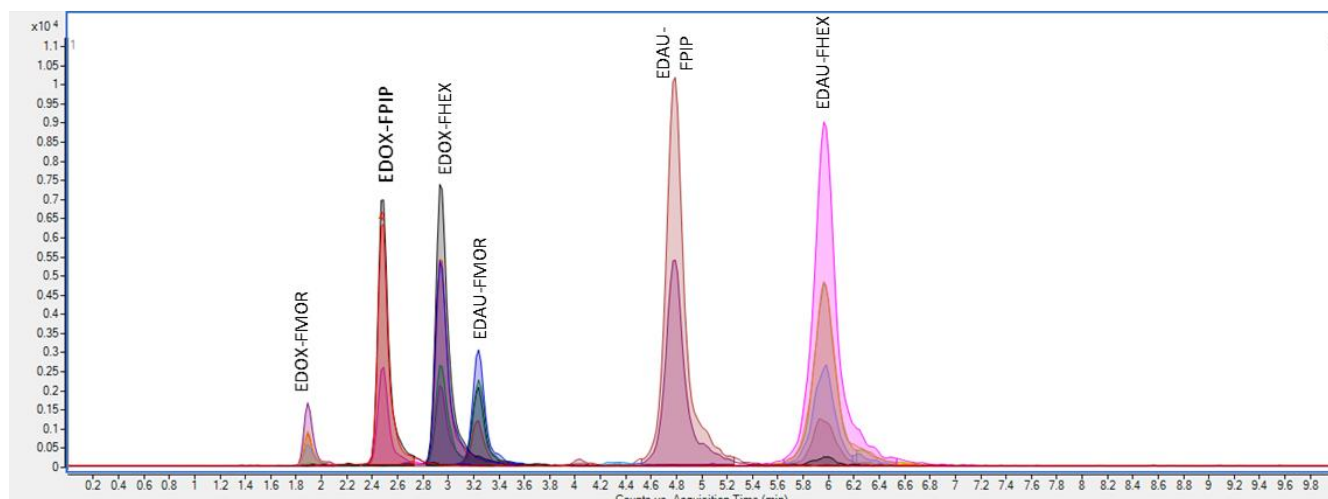
Rycina 4.10. Korelacja pomiędzy wartościami logP dla badanych antracyklin oraz ich toksycznością dla 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wartości ID<sub>50</sub> zaczerpnięto z publikacji<sup>[107]</sup>.

### 4.3 Opracowanie i walidacja metod jednoczesnego oznaczania nowych antybiotyków antracyklinowych z zastosowaniem systemu UPLC/MS/MS

Ze względu na fakt, iż badane związki, które były izomerami, charakteryzowały się taką samą masą, ścieżkami fragmentacji oraz czasem elucji, jednoczesna analiza wszystkich nowych antracyklin z użyciem jednej metody nie była możliwa. Z tego powodu zdecydowano na podział badanych związków na dwie grupy, tj. pochodne DAU i DOX oraz pochodne EDAU i EDOX. Podział ten został również zachowany podczas badania farmakokinetycznego, gdzie badane związki podawano myszom w 2 kasetach, odpowiednio zawierających pochodne DAU i DOX oraz EDAU i EDOX. Opracowane warunki analiz chromatograficznych oraz detekcji masowej pozwoliły na zbudowanie dwóch metod bioanalitycznych, umożliwiających jednoczesne oznaczanie pochodnych DOX i DAU oraz EDOX i EDAU. Przykładowe chromatogramy otrzymane w wyniku rozdzielania chromatograficznego badanych związków przedstawiono na rycinach 4.11 i 4.12.



Rycina 4.11. Rozdzielenie chromatograficzne 6 nowych związków pochodnych DOX i DAU



Rycina 4.12. Rozdzielenie chromatograficzne 6 nowych związków pochodnych EDOX i EDAU.

W tabelach 4.5 oraz 4.6 przedstawiono zakresy liniowości oraz krzywe wzorcowe i współczynniki determinacji dla badanych związków. Otrzymane współczynniki  $R^2$  dla związków pochodnych DOX i DAU były wyższe od 0,984, natomiast dla związków pochodnych EDOX i EDAU były wyższe od 0,990. W przypadku związków DOX-FMOR i DAU-FMOR parametry walidacyjne nie spełniły kryteriów akceptacji dla metod bioanalitycznych, co mogło być wynikiem prawdopodobnie niewielkiej stabilności badanych związków w osoczu myszy. Wymienione związki nie zostały uwzględnione w analizach farmakokinetycznych.

Tabela 4.5. Krzywe wzorcowe oraz współczynniki determinacji dla nowych związków pochodnych DOX i DAU

| Związek  | Zakres stężeń<br>[ng/mL] | Równanie regresji            | Współczynnik<br>determinacji ( $R^2$ ) |
|----------|--------------------------|------------------------------|----------------------------------------|
| DOX-FPIP | 1-1000                   | $y = 4,143x + 0,0000362$     | 0,985                                  |
| DOX-FHEX | 1-1000                   | $y = 16,148 x + 0,0000933$   | 0,984                                  |
| DAU-FPIP | 1-1000                   | $y = 61,612 x - 0,000000006$ | 0,990                                  |
| DAU-FHEX | 1-1000                   | $y = 87,802 x - 0,0000005$   | 0,994                                  |

Tabela 4.6. Krzywe wzorcowe oraz współczynniki korelacji dla nowych związków pochodnych EDOX i EDAU

| Związek   | Zakres stężeń<br>[ng/mL] | Równanie regresji         | Współczynnik<br>determinacji ( $R^2$ ) |
|-----------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| EDOX-FPIP | 1-1000                   | $y = 1,315x - 0,0001655$  | 0,996                                  |
| EDOX-FMOR | 1-1000                   | $y = 0,389x + 0,00006604$ | 0,993                                  |
| EDOX-FHEX | 1-1000                   | $y = 1,396x + 0,00009119$ | 0,994                                  |
| EDAU-FPIP | 1-1000                   | $y = 2,004x + 0,0003360$  | 0,993                                  |
| EDAU-FMOR | 1-1000                   | $y = 0,653x + 0,0001037$  | 0,995                                  |
| EDAU-FHEX | 1-1000                   | $y = 4,269x - 0,0005065$  | 0,990                                  |

Wybrane parametry walidacji dla związków z obu grup zebrano w tabelach 4.7 oraz 4.8. Dla związków z pierwszej grupy, pochodnych DOX i DAU zgodność uzyskanych wyników z wartościami oczekiwanymi była równa od 92,7 % do 112 %, natomiast wartości względnego odchylenia standardowego (RSD %) wynosiły od 2,3 % do 12,9%. Podczas opracowywania metody sprawdzono kilka metod wyodrębnienia analitów z matrycy, w tym strącenie białek, ekstrakcję typu ciecz-ciecz oraz ekstrakcję ciecz-ciało stałe. Zdecydowano o zastosowaniu SPE jako metody ekstrakcji analitów, co pozwoliło na osiągnięcie najwyższego odzysku. W przypadku pochodnych DOX i DAU, odzysk mieścił się w granicach 100-126%. W przypadku wysokich stężeń związków DOX-FPIP, DAU-FPIP oraz DAU-FPIP wartości odzysku były wyższe od 120 %. Badane związki charakteryzowały się dużym efektem matrycy, wynoszącym od 120% do 145 %. Stężenia badanych analitów w próbkach, przechowywanych w automatycznym podajniku próbek przez 15 h nie zmieniły się o więcej niż 20% wartości nominalnej, co wskazuje, że badane próbki były stabilne podczas wykonywania pomiarów.

Dla drugiej grupy związków, pochodnych EDOX i EDAU zgodność uzyskanych wyników z wartościami oczekiwanymi była równa od 91 % do 113 %, wartości RSD % wynosiły od 4 % do 15 %. Odzysk analitów, mieścił się w granicach 87-111%. Bezwzględny efekt matrycy dla badanych związków nie przekraczał 20%. Podobnie jak w przypadku poprzedniej grupy, stabilność po 15 h nie zmieniła się o więcej niż 20 %.

## WYNIKI

Tabela 4.7. Dokładność, precyzja, odzysk, efekt matrycy oraz stabilność dla badanych związków, pochodnych DOX i DAU

| Związek  | Stężenie QC [ng/mL] | Dokładność [%] | RSD [%] | Odzysk [%] | Efekt matrycy [%] | Stabilność [%] |
|----------|---------------------|----------------|---------|------------|-------------------|----------------|
| DOX-FPIP | 1                   | 110,3          | 3,4     | 119        | 130               | 104,3          |
|          | 3                   | 97,5           | 6,4     |            |                   |                |
|          | 400                 | 106,7          | 9,0     | 123        | 144               | 93,9           |
|          | 900                 | 106,3          | 6,0     |            |                   |                |
| DOX-FHEX | 1                   | 97,5           | 12,9    | 100        | 132               | 98,6           |
|          | 3                   | 92,7           | 12,1    |            |                   |                |
|          | 400                 | 101,6          | 9,6     | 114        | 145               | 91,5           |
|          | 900                 | 96,2           | 6,1     |            |                   |                |
| DAU-FPIP | 1                   | 112,0          | 6,0     | 106        | 135               | 104            |
|          | 3                   | 103,4          | 9,4     |            |                   |                |
|          | 400                 | 106,4          | 7,1     | 121        | 129               | 102            |
|          | 900                 | 102,1          | 7,5     |            |                   |                |
| DAU-FHEX | 1                   | 108,8          | 5,0     | 100        | 120               | 107            |
|          | 3                   | 100,4          | 8,0     |            |                   |                |
|          | 400                 | 110,4          | 2,3     | 126        | 128               | 97             |
|          | 900                 | 106,0          | 3,5     |            |                   |                |

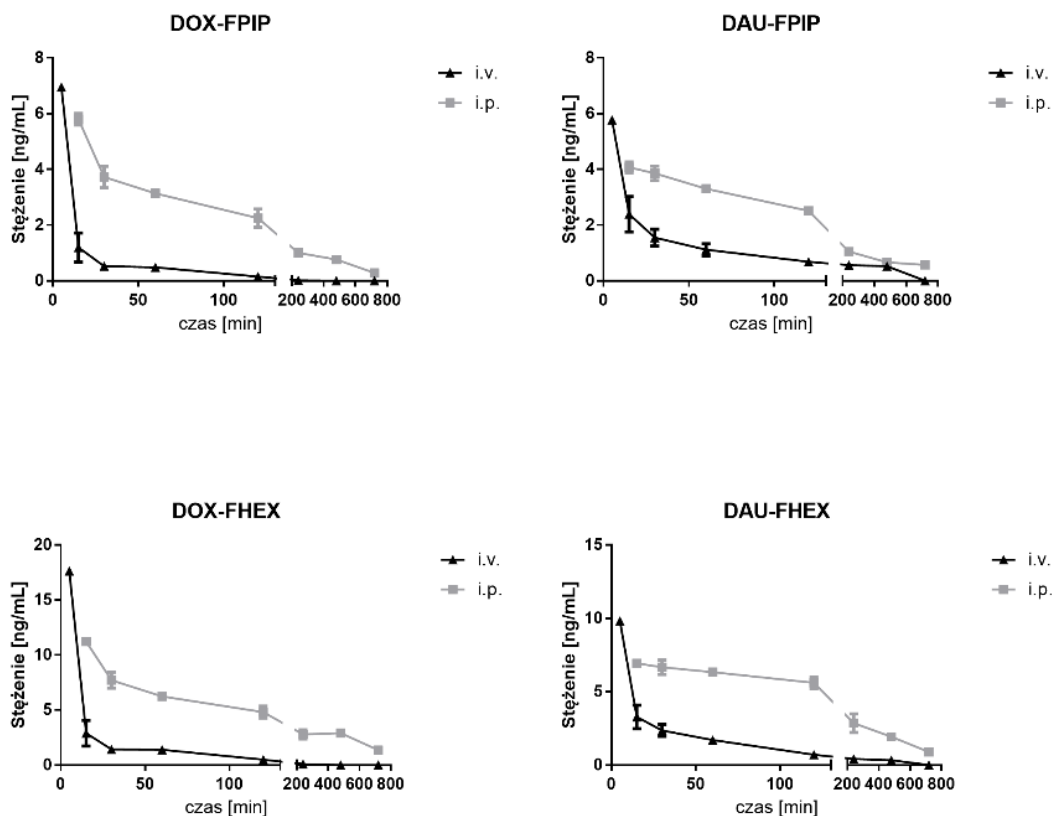
## WYNIKI

Tabela 4.8. Dokładność, precyzja, odzysk, efekt matrycy oraz stabilność dla badanych związków, pochodnych EDOX i EDAU

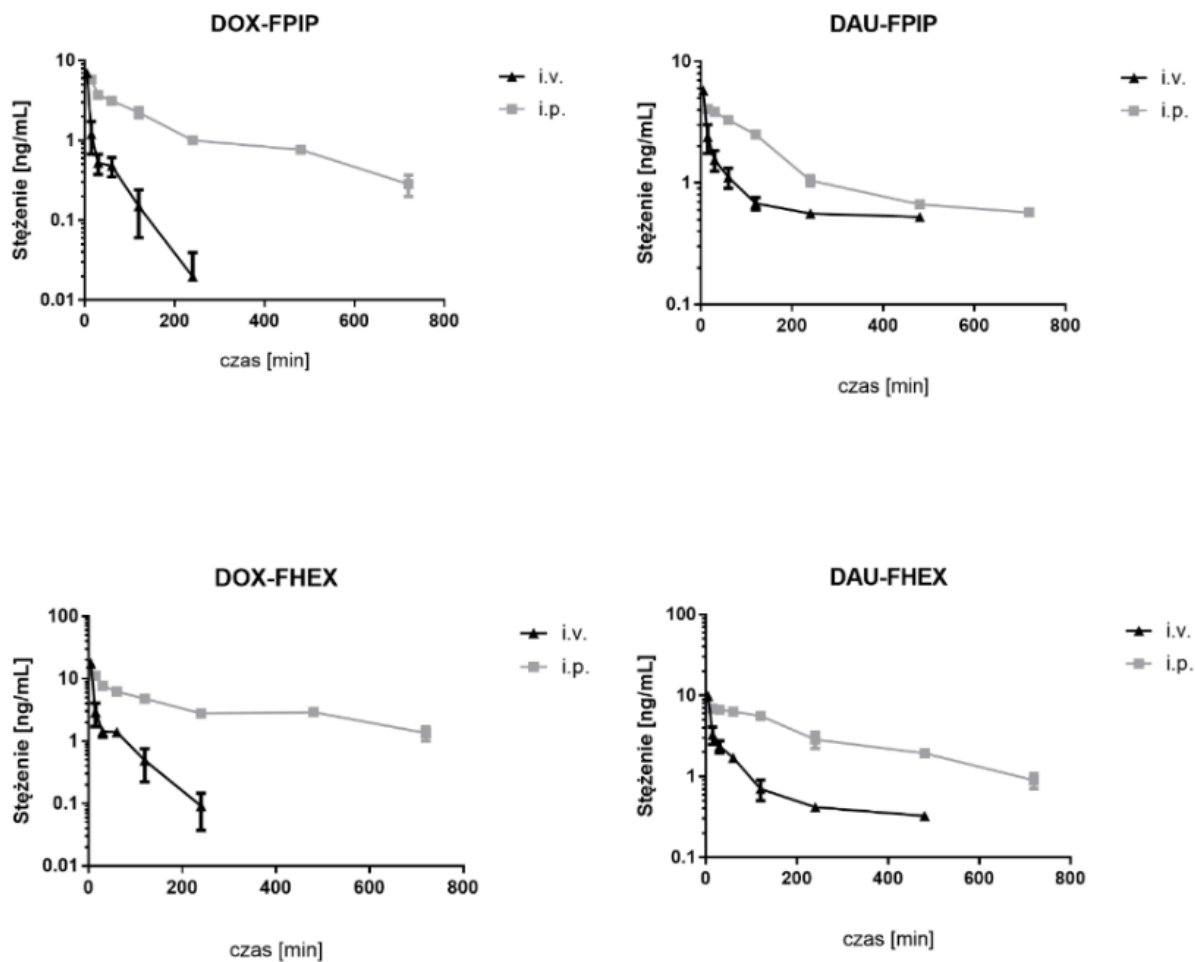
| Związek   | Stężenie QC [ng/mL] | Dokładność [%] | RSD [%] | Odzysk [%] | Efekt matrycy [%] | Stabilność |
|-----------|---------------------|----------------|---------|------------|-------------------|------------|
| EDOX-FMOR | 1                   | 111            | 8       |            |                   |            |
|           | 3                   | 110            | 4       | 100        | 107               | 91,7       |
|           | 400                 | 97             | 15      |            |                   |            |
|           | 900                 | 100            | 14      | 87         | 105               | 98,1       |
| EDOX-FPIP | 1                   | 101            | 14      |            |                   |            |
|           | 3                   | 107            | 5       | 98         | 97                | 94,5       |
|           | 400                 | 100            | 8       |            |                   |            |
|           | 900                 | 106            | 6       | 94         | 100               | 103        |
| EDOX-FHEX | 1                   | 108            | 9       |            |                   |            |
|           | 3                   | 95             | 12      | 111        | 109               | 106        |
|           | 400                 | 100            | 8       |            |                   |            |
|           | 900                 | 109            | 4       | 98         | 107               | 97,7       |
| EDAU-FMOR | 1                   | 112            | 4       |            |                   |            |
|           | 3                   | 103            | 8       | 100        | 107               | 98,6       |
|           | 400                 | 95             | 10      |            |                   |            |
|           | 900                 | 98             | 11      | 97         | 109               | 102        |
| EDAU-FPIP | 1                   | 111            | 5       |            |                   |            |
|           | 3                   | 91             | 5       | 102        | 102               | 111        |
|           | 400                 | 109            | 4       |            |                   |            |
|           | 900                 | 105            | 6       | 100        | 100               | 93,5       |
| EDAU-FHEX | 1                   | 113            | 6       |            |                   |            |
|           | 3                   | 92             | 9       | 106        | 113               | 112        |
|           | 400                 | 102            | 6       |            |                   |            |
|           | 900                 | 107            | 5       | 95         | 108               | 99,8       |

#### 4.4 Ocena profilu farmakokinetycznego nowych antybiotyków antracyklinowych

Na rycinach 4.13 oraz 4.14 przedstawiono zależność stężenia od czasu dla nowych antybiotyków antracyklinowych pochodnych DOX i DAU, w osoczu myszy po jednorazowym podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym, odpowiednio w skali liniowej oraz półlogarytmicznej.



Rycina 4.13. Zależność stężenia od czasu dla czterech nowych związków, pochodnych DOX i DAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala liniowa).



Rycina 4.14. Zależność stężenia od czasu dla czterech nowych związków, pochodnych DOX i DAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala półlogarytmiczna).

Podstawowe parametry farmakokinetyczne dla badanych związków obliczone z zastosowaniem analizy bezmodelowej, odpowiednio po podaniu dożylnym i dootrzewnowym zebrano w tabelach 4.9 i 4.10.



Tabela 4.9. Parametry farmakokinetyczne pochodnych DOX i DAU, po jednorazowym podaniu dożylnym związków, w dawce 0,01mg/kg u myszy (n=4)

| Parametry                                                          | DOX-FPIP | DOX-FHEX | DAU-FPIP | DAU-FHEX |
|--------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| $C_0$ [ng/mL]                                                      | 16,73    | 43,54    | 8,96     | 16,97    |
| $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ ] | 0,16     | 0,43     | 1,2      | 0,51     |
| MRT [h]                                                            | 0,46     | 0,56     | 23,1     | 3,1      |
| $t_{0,5}$ [h]                                                      | 0,66     | 0,77     | 17,63    | 2,44     |
| $V_{ss}$ [L/kg]                                                    | 1,75     | 0,79     | 1,15     | 3,48     |
| Cl [mL/min/kg]                                                     | 63,25    | 23,37    | 8,29     | 18,75    |

$C_0$  – stężenie początkowe związku,  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  – pole pod krzywą zależności stężenia od czasu, MRT – średni czas przebywania związku w organizmie,  $t_{0,5}$  – biologiczny okres półtrwania,  $V_{ss}$  – objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym, Cl – klirens całkowity

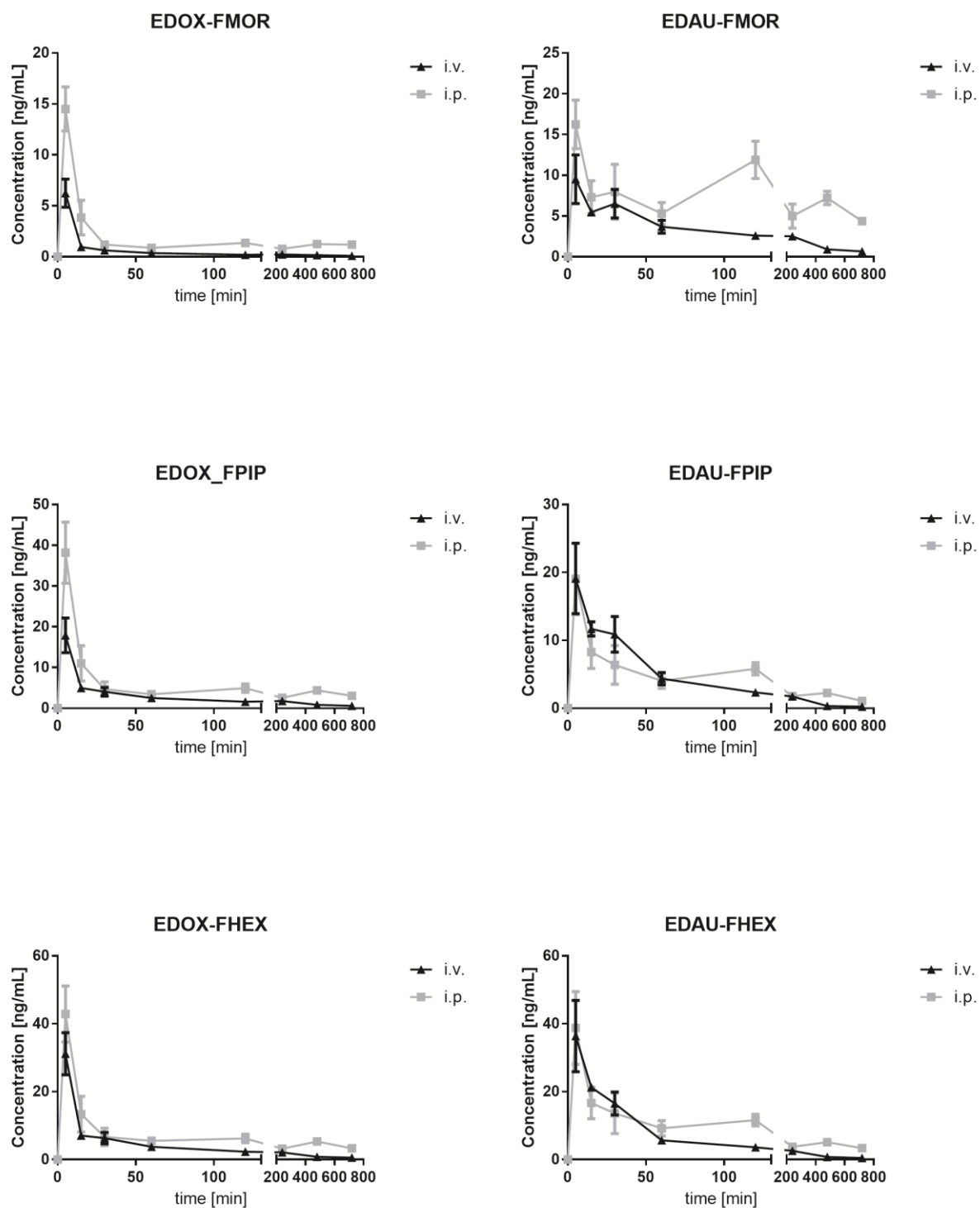
Tabela 4.10. Parametry farmakokinetyczne nowych związków, pochodnych DOX i DAU, po jednorazowym podaniu dootrzewnowym, w dawce 0,2 mg/kg u myszy (n=4)

| Parametr                                                           | DOX-FPIP | DOX-FHEX | DAU-FPIP | DAU-FHEX |
|--------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ ] | 1,2      | 3,2      | 1,2      | 2,5      |
| MRT [h]                                                            | 3,9      | 7,1      | 5,8      | 5,5      |
| $t_{0,5}$ [h]                                                      | 3,3      | 5,2      | 3,9      | 3,97     |
| $C_{\max}$ [ng/mL]                                                 | 25,03    | 25,65    | 7,63     | 13,43    |
| $t_{\max}$ [min]                                                   | 5        | 5        | 5        | 5        |
| F [%]                                                              | 36,9     | 37,4     | 4,9      | 24,6     |

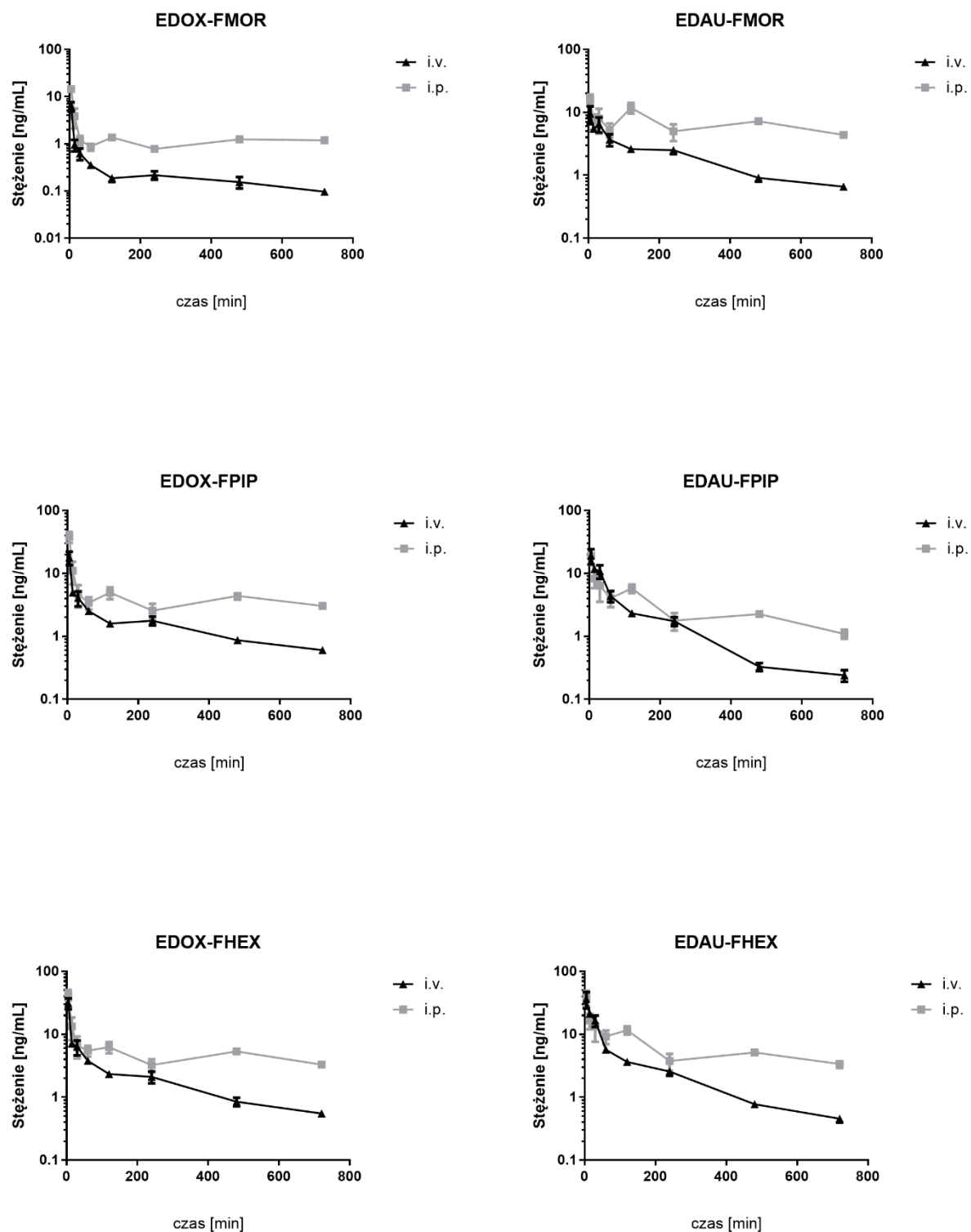
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$  – pole pod krzywą zależności stężenia od czasu, MRT – średni czas przebywania związku w organizmie,  $t_{0,5}$  – biologiczny okres półtrwania,  $C_{\max}$  – stężenie maksymalne,  $t_{\max}$  – czas potrzebny do osiągnięcia stężenia maksymalnego, F - biodostępność

Wyniki wskazują, że nowe antybiotyki antracyklinowe pochodne DOX i DAU charakteryzowały się zróżnicowanym czasem przebywania w organizmie, który wynosił od 0,46 h do 23,1 h po podaniu dożylnym, oraz od 3,9 h do 7,1 h po podaniu dootrzewnowym. Najdłużej w organizmie po podaniu dożylnym przebywała pochodna DAU-FPIP, najkrócej związek DOX-FPIP. W przypadku podania dootrzewnowego najwyższą wartością MRT charakteryzował się związek DOX-FHEX, najkrótszą zaś DOX-FPIP. Badane antracykliny charakteryzowały się dużą objętością dystrybucji wynoszącą od 0,79 L/kg do 3,48 L/kg. Po podaniu dootrzewnowym badane związki szybko wchłaniały się do krążenia ogólnego, osiągając stężenie maksymalne po około 5 min. Biodostępność związków po podaniu dootrzewnowym była zróżnicowana, i wynosiła od 4,9 % dla DAU-FPIP do 37,4% dla DOX-FHEX. Po podaniu dożylnym najniższym stężeniem początkowym w osoczu charakteryzował się związek DAU-FPIP (8,96 ng/mL), natomiast najwyższym DOX-FHEX (43,54 ng/mL). Podobnie po podaniu dootrzewnowym, najniższe stężenie maksymalne osiągał związek DAU-FPIP (7,63 ng/mL), a najwyższe związek DOX-FHEX (25,65 ng/mL).

Na rycinach 4.15 oraz 4.16 przedstawiono zależność stężenia od czasu dla nowych antybiotyków antracyklinowych, pochodnych EDOX i EDAU w osoczu myszy po jednorazowym podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym, odpowiednio w skali liniowej oraz półlogarytmicznej. W tabelach 4.11-4.12. zebrano podstawowe parametry farmakokinetyczne dla badanych związków obliczone z zastosowaniem analizy bezmodelowej, odpowiednio po podaniu dożylnym i dootrzewnowym.



Rycina 4.15. Zależność stężenia od czasu dla sześciu nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala liniowa).



Rycina 4.16. Zależność stężenia od czasu dla sześciu nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala półlogarytmiczna).

Tabela 4.11. Parametry farmakokinetyczne nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU po podaniu dożylnym, w dawce 0,01 mg/kg u myszy (n=4)

| Parametry                                                             | EDOX-FPIP | EDOX-FMOR | EDOX-FHEX | EDAU-FPIP | EDAU-FMOR | EDAU-FHEX |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| $C_0$ [ng/mL]                                                         | 33,87     | 15,98     | 65,40     | 24,42     | 12,54     | 47,54     |
| $AUC_{0 \rightarrow \infty}$<br>[ $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ ] | 1,5       | 2,9       | 1,9       | 1,5       | 1,7       | 2,4       |
| MRT [h]                                                               | 6,35      | 6,52      | 4,26      | 2,61      | 5,69      | 2,93      |
| $t_{0,5}$ [h]                                                         | 5,15      | 6,8       | 4,07      | 2,57      | 4,65      | 3,00      |
| $V_{ss}$ [L/kg]                                                       | 2,5       | 13,5      | 1,4       | 1,1       | 2,0       | 0,7       |
| Cl [mL/min/kg]                                                        | 6,66      | 34,51     | 5,39      | 6,77      | 5,84      | 4,11      |

$C_0$  – stężenie początkowe związku,  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  – całkowite pole pod krzywą zależności stężenia od czasu, MRT – średni czas przebywania związku w organizmie,  $t_{0,5}$  – biologiczny okres półtrwania,  $V_{ss}$  – objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym, Cl – klirens całkowity

Tabela 4.12. Parametry farmakokinetyczne dla nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU po jednorazowym podaniu dootrzewnowym w dawce 0,2 mg/kg u myszy (n=4)

| Parametr                                                           | EDOX-FPIP | EDOX-FMOR | EDOX-FHEX | EDAU-FPIP | EDAU-FMOR | EDAU-FHEX |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ ] | 6,5       | 3,3       | 6,5       | 2,5       | 9,5       | 6,2       |
| MRT [h]                                                            | 19,50     | 34,25     | 14,13     | 6,63      | 16,87     | 8,63      |
| $t_{0,5}$ [h]                                                      | 34,25     | 23,21     | 9,78      | 4,64      | 12,09     | 5,71      |
| $C_{\max}$ [ng/mL]                                                 | 38,17     | 14,51     | 42,89     | 19,06     | 16,24     | 38,78     |
| $t_{\max}$ [min]                                                   | 5         | 5         | 5         | 5         | 5         | 5         |
| F [%]                                                              | 21,93     | 57,21     | 17,57     | 8,57      | 27,83     | 12,84     |

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$  – całkowite pole pod krzywą zależności stężenia od czasu, MRT – średni czas przebywania związku w organizmie,  $t_{0,5}$  – biologiczny okres półtrwania,  $C_{\max}$  – stężenie maksymalne,  $t_{\max}$  – czas potrzebny do osiągnięcia stężenia maksymalnego, F – biodostępność

Wyniki wskazują, że pochodne EDOX i EDAU charakteryzowały się zróżnicowanym, ale dłuższym od pochodnych DOX i DAU czasem przebywania w organizmie, który wynosił od 2,61 h do 6,52 h po podaniu dożylnym, oraz od 6,63 h do 34,25 h po podaniu dootrzewnowym. Najdłużej w organizmie po podaniu dożylnym przebywała pochodna EDOX-FMOR, najkrócej związek EDAU-FPIP. W przypadku podania dootrzewnowego najwyższą wartością MRT charakteryzował się związek EDOX-FMOR, najkrótszą zaś EDAU-FPIP. Badane antracykliny charakteryzowały się dużą objętością dystrybucji wynoszącą od 0,7 L/kg do 13,5 L/kg. Po podaniu dootrzewnowym badane związki szybko wchłaniały się do krążenia ogólnego osiągając stężenie maksymalne po około 5 min. Badane związki miały niską biodostępność wynoszącą od 8,57 % dla EDAU-FPIP do 27,83 % dla EDAU-FMOR, oprócz EDOX-FMOR, która w porównaniu do pozostałych związków, charakteryzowała się najwyższą biodostępnością wynoszącą 57,21%. Po podaniu dożylnym najniższym stężeniem początkowym w osoczu charakteryzował się związek EDAU-FMOR (12,54 ng/mL), natomiast najwyższym EDOX-FHEX (65,4 ng/mL). Po podaniu dootrzewnowym, najniższe stężenie maksymalne osiągał związek EDOX-FMOR (14,51 ng/mL), a najwyższe związek EDOX-FHEX (42,89 ng/mL).

#### **4.5 Ocena właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych badanych substancji w warunkach *in silico***

W celu weryfikacji poprawności wyników uzyskanych w warunkach *in silico* porównano wartości przewidywane za pomocą dostępnego oprogramowania z wartościami otrzymanymi doświadczalnie. W tabeli 4.13 zebrano dane dotyczące lipofilowości oraz właściwości kwasowo-zasadowych badanych związków. Otrzymane wartości logP obliczono na podstawie trzech różnych podejść: klasycznego, GALAS oraz łączonego. Wartości pK<sub>a</sub> obliczono z zastosowaniem podejścia klasycznego oraz GALAS. W tabeli 4.14 przedstawiono podstawowe parametry farmakokinetyczne oszacowane dla zdrowego człowieka o standardowej budowie ciała, po podaniu związku w dawce 50 mg. Wszystkie parametry zostały wygenerowane przez komercyjnie dostępną platformę ACD/Percepta (ACD Labs, Ontario, Kanada).

## WYNIKI

Tabela 4.13. Lipofilowość oraz właściwości kwasowo-zasadowe badanych związków przewidywane w warunkach *in silico*

|           | logP        |       |           | logD <sub>pH10</sub> | pK <sub>a</sub>  |                  |                  | pK <sub>a</sub> GALAS |                      |
|-----------|-------------|-------|-----------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
|           | Klasyczne   | GALAS | Consensus |                      | pK <sub>a1</sub> | pK <sub>a2</sub> | pK <sub>a3</sub> | Ugrupowania kwasowe   | Ugrupowania zasadowe |
| DAU       | 2,92 ± 1,27 | 1,09  | 1,4       | -2,38                | 8,7 ± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,6         | 9,9± 0,4              | 8,1± 0,4             |
| DAU-FHEX  | 4,86 ± 1,27 | 3,64  | 4,19      | 0,66                 | 10,1 ± 0,7       | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,6         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| DAU-FMOR  | 2,75 ± 1,28 | 2,55  | 2,61      | -1,2                 | 7,9 ± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,6         | 10,1± 0,4             | 9,3± 0,5             |
| DAU-FPIP  | 4,29 ± 1,27 | 3,26  | 3,67      | 0,14                 | 10,1 ± 0,7       | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,7         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| DOX       | 2,82 ± 1,30 | 0,67  | 0,92      | -2,89                | 8,7 ± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,3± 0,6         | 9,9± 0,4              | 8,1± 0,4             |
| DOX-FHEX  | 4,76 ± 1,30 | 2,68  | 3,39      | -0,15                | 10,1± 0,7        | 7,4± +- 0,7      | 8,3± 0,7         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| DOX-FMOR  | 2,65 ± 1,31 | 2,06  | 2,27      | -1,56                | 7,9 ± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,3± 0,6         | 10,1± 0,4             | 9,3± 0,5             |
| DOX-FPIP  | 4,20 ± 1,30 | 2,32  | 2,93      | -0,61                | 10,1 ± 0,7       | 7,4± 0,6         | 8,3± 0,6         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| EDAU      | 2,92 ± 1,27 | 1,09  | 1,4       | -2,38                | 8,7± 0,7         | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,6         | 9,9± 0,4              | 8,1± 0,4             |
| EDAU-FHEX | 4,86 ± 1,27 | 3,64  | 4,19      | 0,66                 | 10,1± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,6         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| EDAU-FMOR | 2,75 ± 1,28 | 2,55  | 2,61      | -1,2                 | 7,9 ± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,6         | 10,1± 0,4             | 9,3± 0,5             |
| EDAU-FPIP | 4,29 ± 1,27 | 3,26  | 3,67      | 0,14                 | 10,1 ± 0,7       | 7,4± 0,6         | 8,4± 0,7         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| EDOX      | 2,82 ± 1,30 | 0,67  | 0,92      | -2,89                | 8,7± 0,7         | 7,4± 0,6         | 8,3± 0,6         | 9,9± 0,4              | 8,1± 0,4             |
| EDOX-FHEX | 4,76 ± 1,30 | 2,68  | 3,39      | -0,15                | 10,1± 0,7        | 7,4± 0,7         | 8,3± 0,7         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |
| EDOX-FMOR | 2,65 ± 1,31 | 2,06  | 2,27      | -1,56                | 7,9± 0,7         | 7,4± 0,6         | 8,3± 0,6         | 10,1± 0,4             | 9,3± 0,5             |
| EDOX-FPIP | 4,20 ± 1,30 | 2,32  | 2,93      | -0,61                | 10,1± 0,7        | 7,4± 0,6         | 8,3± 0,6         | 10,2± 0,4             | 9,5± 0,4             |



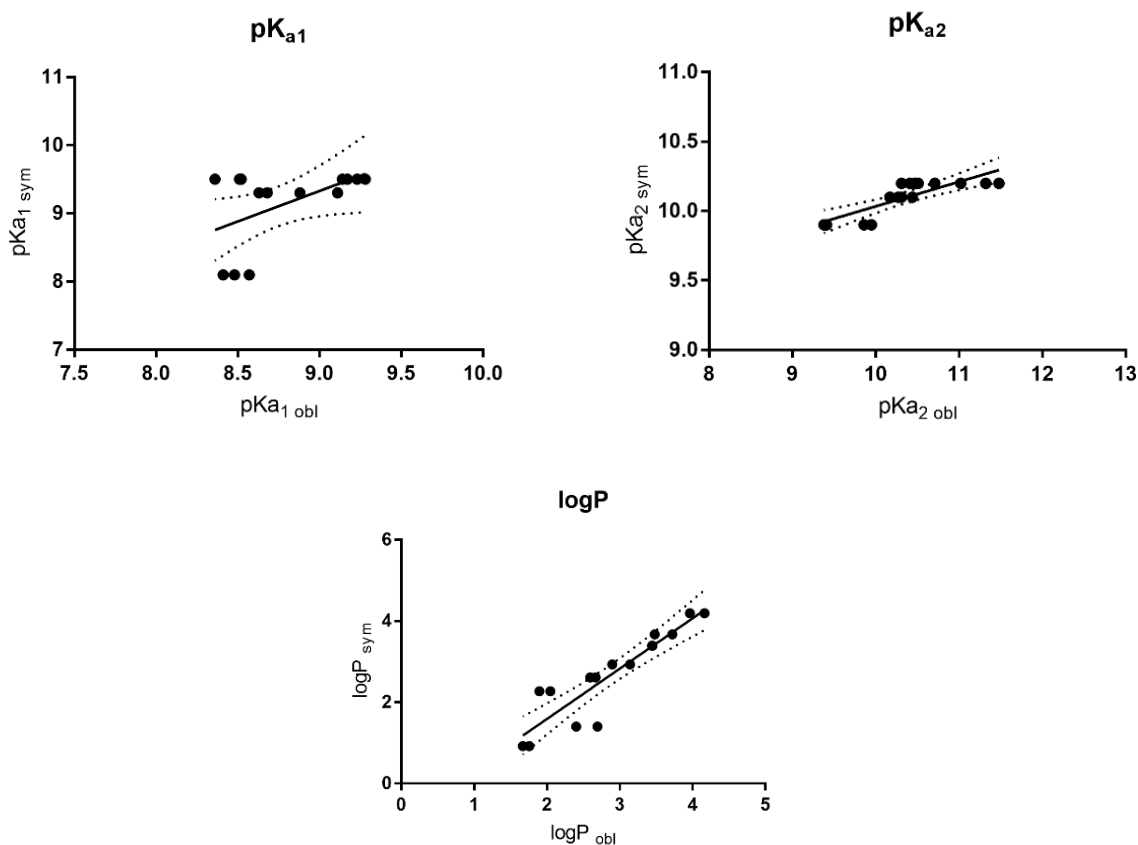
## WYNIKI

Tabela 4.14 . Parametry farmakokinetyczne badanych związków przewidywane w warunkach *in silico*

| Związek   | V <sub>d</sub> [L] | t <sub>max</sub> [min] | C <sub>max</sub> [ug/mL] | AUC <sub>0→∞,p.o.</sub> [ug·h/mL] | AUC <sub>0→∞,i.v.</sub> [ug·h/mL] | F[%] |
|-----------|--------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| DAU       | 34                 | 393                    | 0,1                      | 3,87                              | 52,15                             | 7,4  |
| DAU-FHEX  | 496                | 452                    | 0,04                     | 2,54                              | 6,72                              | 37,8 |
| DAU-FMOR  | 93                 | 271                    | 0,46                     | 25,54                             | 28                                | 91,2 |
| DAU-FPIP  | 274                | 228                    | 0,17                     | 11,3                              | 11,7                              | 96,6 |
| DOX       | 26                 | 392                    | 0,03                     | 1,08                              | 61,64                             | 1,7  |
| DOX-FHEX  | 215                | 449                    | 0,07                     | 4,39                              | 12,92                             | 34   |
| DOX-FMOR  | 65                 | 347                    | 0,44                     | 21,31                             | 33,74                             | 63,1 |
| DOX-FPIP  | 123                | 333                    | 0,27                     | 15,03                             | 20,53                             | 73,2 |
| EDAU      | 34                 | 393                    | 0,1                      | 3,87                              | 52,15                             | 7,4  |
| EDAU-FHEX | 496                | 452                    | 0,04                     | 2,54                              | 6,72                              | 37,8 |
| EDAU-FMOR | 93                 | 271                    | 0,46                     | 25,54                             | 28                                | 91,2 |
| EDAU-FPIP | 274                | 228                    | 0,17                     | 11,3                              | 11,7                              | 96,6 |
| EDOX      | 26                 | 392                    | 0,03                     | 1,08                              | 61,64                             | 1,7  |
| EDOX-FHEX | 215                | 449                    | 0,07                     | 4,39                              | 12,92                             | 34   |
| EDOX-FMOR | 65                 | 347                    | 0,44                     | 21,31                             | 33,74                             | 63,1 |
| EDOX-FPIP | 123                | 333                    | 0,27                     | 15,03                             | 20,53                             | 73,2 |

Na rycinie 4.17 przedstawiono zależności pomiędzy przewidywanymi w warunkach *in silico* wartościami podstawowych parametrów fizykochemicznych, a wyznaczonymi eksperymentalnie, odpowiednio dla  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  oraz  $\log P$ .

W przypadku wartości  $pK_{a1}$  nie wykazano istotnej zależności pomiędzy wielkościami przewidywanymi, a wyznaczonymi doświadczalnie ( $R^2 = 0,2437$ ,  $r=0,4936$ ,  $p>0,05$ ), natomiast w przypadku wartości  $pK_{a2}$  oraz  $\log P$  otrzymano wyniki, które wskazują na wysoką korelację między wartościami przewidywanymi, a obliczonymi doświadczalnie. W przypadku  $pK_{a2}$  obliczone parametry przedstawiały się następująco ( $R^2 = 0,6657$ ,  $r=0,8159$ ,  $p=0,0001$ ), natomiast dla  $\log P$  były równe ( $R^2 = 0,823$ ,  $r=0,9072$ ,  $p<0,0001$ ).



Rycina 4.17. Wykresy zależności pomiędzy przewidywanymi, a wyznaczonymi doświadczalnie wartościami  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  oraz  $\log P$  dla badanych związków.

## 5 Dyskusja wyników

Proces badań nad nową cząsteczką – potencjalnym lekiem jest wieloetapowym postępowaniem, w którym na każdym etapie może okazać się, że związek nie jest optymalnym kandydatem na nowy lek. Wiadomo, że niekorzystny profil farmakokinetyczny i brak odpowiednich właściwości fizykochemicznych nowych związków są najczęstszą przyczyną niepowodzenia we wprowadzeniu nowego leku na rynek<sup>[140]</sup>. Z tego względu, już we wczesnym etapie badań nad lekiem, powinny zostać przeprowadzone przesiewowe badania, mające na celu określenie właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych nowych cząsteczek.

Realizacja badań zaplanowanych w ramach pracy doktorskiej wymagała opracowania metod wyznaczania właściwości fizykochemicznych z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej oraz czułych i selektywnych metod bioanalitycznych, pozwalających na oznaczanie stężenia badanych związków w osoczu myszy, a następnie określenia profilu farmakokinetycznego nowych antybiotyków antracyklinowych, potencjalnych leków, o działaniu przeciwnowotworowym.

### 5.1 Wyznaczanie wykładnika stałej dysocjacji z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej

Podczas opracowywania metodyki wyznaczania  $pK_a$  nowych związków, niezmiernie istotnie było wybranie odpowiedniego składu, pH i siły jonowej roztworów buforowych. Przepływ elektroosmotyczny zależy od przyłożonego napięcia, lepkości roztworu oraz potencjału zeta, czyli potencjału elektrycznego występującego na granicy kapilary i fazy ruchomej<sup>[141]</sup>. Aby zmniejszyć różnice widoczne w ruchliwości elektroforetycznej badanych związków, zależące od innych niż dysocjacja czynników, użyto roztworów buforowych o stałej sile jonowej, równej 0,05 M<sup>[142]</sup>. Jak można zauważyć na Rycinie 3.1, ruchliwość elektroforetyczna DOX w buforze fosforanowym (pH=7) jest wyraźnie niższa niż oczekiwana. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku wszystkich badanych związków. Możliwym wytłumaczeniem takiego zachowania jest prawdopodobne tworzenie się kompleksów (par jonowych) pomiędzy antracyklinami a jonem fosforanowym, który ma inną ruchliwość niż związek macierzysty. Z tego powodu, z końcowych obliczeń wykluczano wartości ruchliwości otrzymane dla buforów o pH = 7.

Podczas opracowywania metody, szczególną uwagę zwrócono na utrzymanie stałego pH roztworów używanych do rozdzielania elektroforetycznego. Zjawiskiem mającym duże znaczenie, szczególnie w przypadku roztworów o wysokim pH jest rozpuszczanie się  $\text{CO}_2$  znajdującego się w powietrzu atmosferycznym<sup>[143]</sup>. W przypadku buforów o pH przekraczających 10, zjawisko to powoduje zmniejszenie wartości wyjściowej pH, mogące wpłynąć na wiarygodność analiz (Tabela 3.1). Z tego względu zdecydowano, aby używane bufony wymieniać co dwie analizy, a każdą analizę rozpoczynać od buforów o wysokim pH, celem zmniejszenia pochłaniania  $\text{CO}_2$ . Aby sprawdzić, czy takie postępowanie pozwala na utrzymanie stałego pH buforów, mierzono ich pH przed i po oznaczeniach. W efekcie uzyskano wartości, które nie różniły się od siebie istotnie.

Na Rycinie 4.2 zamieszczono przykładowe elektroferogramy, które obrazują różnice w czasach migracji pomiędzy badanym związkiem, a znacznikiem obojętnym, w zakresie pH od 5 do 12. Jak można zaobserwować, w pH wyższym od punktu izoelektrycznego (pI) danej substancji, cząsteczki są naładowane ujemnie i migrują wolniej niż znacznik obojętny, natomiast w pH niższym od pI, cząsteczki naładowane są dodatnio i migrują szybciej. Deformacja pików, która jest widoczna w przypadku kilku elektroferogramów może być spowodowana różnicą w przewodności buforu rozdzielającego i wprowadzonej do kapilary dużej objętości próbek<sup>[144]</sup>. To zjawisko może być zmniejszone, np. poprzez zwiększenie siły jonowej buforu albo dodanie do buforu substancji modyfikujących jego właściwości, w tym rozpuszczalników organicznych. W przypadku wyznaczania  $\text{pK}_a$ , gdzie stosowanych jest kilkanaście różnych buforów, takie podejście byłoby jednak bardzo pracochłonne<sup>[145]</sup>. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na ogonowanie pików może być adsorpcja antracyklin do wewnętrznej ściany kapilary. Aby zmniejszyć prawdopodobieństwo wystąpienia błędów, czasy migracji pików obliczano stosując funkcję Haarhoff-Van der Linde (HVL), która dostępna jest w procesie integracji elektroferogramów przy użyciu oprogramowania Peakfit<sup>[146,147]</sup>.

Podczas analizy nowych związków, w buforach o pH wyższym od 10, zaobserwowano pojawianie się na elektroferogramach dodatkowych pików (Rycina. 4.3). Porównano ruchliwość elektroforetyczną tych dodatkowych pików oraz ruchliwości leków macierzystych, tak jak pokazano na Rycinie 4.3. W efekcie wywnioskowano, że dodatkowe piki to produkty rozkładu nowych pochodnych do leków macierzystych, który może zachodzić w środowisku zasadowym. Wyniki te wskazują na istotną zaletę elektroforezy kapilarnej, jako techniki separacyjnej, która umożliwia oznaczanie próbek zanieczyszczonych oraz częściowo rozłożonych.

W wielu dostępnych źródłach, które podają wyznaczone doświadczalnie wartości  $pK_a$  dla antybiotyków antracyklinowych przytaczana jest jedna wartość, wyznaczona dla grupy aminowej, znajdującej się w pierścieniu daunozaminy, z pominięciem  $pK_a$  dla grup fenolowych, obecnych w antrachinonie<sup>[148–150]</sup>. W niniejszej pracy, wyznaczono po dwie wartości  $pK_a$  dla każdego związku, tzn.  $pK_{a1}$  oraz  $pK_{a2}$ , odpowiednio dla grupy aminowej oraz dla grup fenolowych. Wartość  $pK_{a2}$  jest uśrednioną wartością dla obu grup fenolowych, gdyż różnice były zbyt małe aby za pomocą opracowanej metody określić wartości cząstkowe dla każdej z grup.

Wykładniki stałych dysocjacji wyznaczono z wykresu zależności ruchliwości elektroforetycznej od aktywności jonów  $[H_3O^+]$  w danym buforze, za pomocą regresji nieliniowej, stosując równanie 8. Przykładowe dopasowania dla wszystkich badanych związków przedstawiono na rycinie 4.4. Wyznaczone wartości  $pK_a$  dla związków macierzystych oraz nowych pochodnych wskazują, że modyfikacje w pierścieniu daunozaminy wpływają na ich właściwości kwasowo-zasadowe. Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że największe różnice między wartościami  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  są widoczne dla pochodnych z rodziny FPIP. Wśród nich, największe różnice wykazywały związki EDOX- FPIP ( $\Delta pK_a = 2,5$ ) i DAU-FPIP ( $\Delta pK_a = 2,18$ ). Najmniejsze różnice z kolei wykazano dla pochodnych FHEX, wśród nich najmniejsze różnice były widoczne dla związków DAU-FHEX ( $\Delta pK_a = 1,19$ ) oraz EDAU-FHEX ( $\Delta pK_a = 1,08$ ). Różnice między wartościami  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  dla leków macierzystych były niższe niż dla badanych pochodnych i wynosiły odpowiednio 0,68 i 0,76 dla DOX i DAU.

Współczynnik korelacji Pearsona ( $r$ ) wyznaczony z zależności pomiędzy  $pK_{a1}$  oraz  $pK_{a2}$ , a wielkością  $ID_{50}$  nie wykazał istotniej korelacji. Istotną korelację wykazano natomiast pomiędzy  $\Delta pK_a$ , a  $ID_{50}$  dla linii komórkowej HCV29T nowotworu pęcherza moczowego (rycina 4.5 oraz 4.6). Wyniki te potwierdzają, iż w większości przypadków, aktywność antyproliferacyjna nowych związków, w niewielkim stopniu jest zależna od  $pK_a$ , jednakże w przypadku niektórych linii komórkowych może być związana z ich właściwościami kwasowo-zasadowymi, wskazując na inny niż bierny mechanizm transportu, być może transport aktywny lub ułatwiony przy udziale odpowiednich nośników<sup>[151]</sup>.

## 5.2 Wyznaczanie współczynnika dystrybucji i współczynnika podziału

Technika MEEKC, którą zastosowano do określenia lipofilowości nowych antybiotyków antracyklinowych wymagała dodania do próbki znacznika EOF oraz znacznika dla mikroemulsji. Zgodnie z założeniami MEEKC, czas migracji badanej substancji powinien mieścić się w tzw. oknie detekcji, czyli pomiędzy czasami migracji znaczników. Przykładowy elektroferogram otrzymany w toku analizy przedstawiono na rycinie 4.8. Dzięki przepływowi EOF wymuszony jest ruch cząsteczek mikroemulsji w kierunku katody pomimo, iż kropelki mikroemulsji ze względu na użycie anionowego surfaktanta, jakim jest SDS naładowane są ujemnie. Dzięki temu, na jednym elektroferogramie można obserwować piki odpowiadające wszystkim badanym substancjom.

Aby wyznaczyć  $\log D_{pH10}$  dla nowych związków, niezbędne było wykreślenie krzywej wzorcowej. Do przygotowania krzywej użyto 10 związków referencyjnych, o znanych wartościach  $\log P$  oraz  $pK_a$ . Wyznaczone doświadczalnie wartości  $\log k$  dla związków referencyjnych wraz z wartościami  $\log P$  oraz  $pK_a$  przedstawiono w tabeli 4.2. W przypadku ośmiu związków referencyjnych, ze względu na brak ich jonizacji w buforze rozdzielającym wartości  $\log P$  były równe ich wartościom  $\log D_{pH10}$ . Dla dwóch pozostałych, czyli chloramfenikolu oraz fenytoiny, które w warunkach analizy ulegały dysocjacji, podobnie jak badane nowe antracykliny, obliczono wartości  $\log D_{pH10}$  na podstawie równania 15. Przykładową krzywą wzorcową wraz z równaniem regresji oraz współczynnikiem determinacji  $R^2$  przedstawiono na rycinie 4.9.

Dostępne w piśmiennictwie parametry będące miarą lipofilowości antracyklin różnią się istotnie. Jako przykład może służyć DOX, której  $\log D_{pH7,4}$  w różnych publikacjach mieści się w zakresie od -1,98 do 2,82<sup>[128,152,153]</sup>. Tak ogromne rozbieżności mogą być spowodowane różnymi podejściami analitycznymi stosowanymi do wyznaczenia tego parametru. Szczególnych trudności może przysporzyć fakt, iż antracykliny są związkami amfoterycznymi, i stąd w całym zakresie pH występują w formie zjonizowanej. W opublikowanych wcześniej pracach wykorzystujących omawianą metodykę, wyznaczano współczynniki dystrybucji związków o charakterze obojętnym. Związki, które ulegają dysocjacji, oprócz oddziaływań z kropelkami mikroemulsji podlegają również działaniu pola elektrycznego, co wpływa na czas migracji. W metodyce użytej w niniejszej pracy, znormalizowano ruchliwość elektroforetyczną antracyklin, bazując na pracach B.K. Keppler'a i wsp., którzy jako pierwsi zaproponowali sposób obliczania  $\log k$  dla związków ulegających w warunkach analizy jonizacji<sup>[120,121]</sup>. Podejście to polegało na ocenie ruchliwości

elektroforetycznej związków w buforze, bez dodatku mikroemulsji oraz po dodaniu mikroemulsji. Jeżeli ruchliwość elektroforetyczna danego związku w samym buforze jest różna od ruchliwości EOF, wtedy należy ją znormalizować i do obliczeń logk zastosować równanie 15. Ponadto zdecydowano się przeprowadzić analizę w buforze o pH=10, czyli w warunkach, w których antracykliny są naładowane ujemnie, tak aby zmniejszyć możliwość interakcji anionowego surfaktanta oraz badanego związku, z uwagi na fakt, że dane literaturowe wskazują na istotne interakcje pomiędzy substancjami o charakterze kationu oraz anionowymi składnikami liposomów, prowadzące nawet do trzykrotnego zwiększenia współczynnika retencji<sup>[119]</sup>. Otrzymane wartości logk wraz z wyznaczonym  $\log D_{\text{pH}10}$  oraz obliczonym logP zebrano w tabeli 4.4.

Wartości  $\log D_{\text{pH}10}$  dla badanych związków mieszczą się w zakresie od 0,98 dla DOX do 3,94 dla EDAU-FHEX. Dla związków macierzystych, wartości logP mieszczą się w zakresie 1,67-2,69. Najniższą lipofilowością wśród antracyklin pierwszej generacji cechowała się DOX, natomiast najwyższą DAU. Nowe związki charakteryzowały się wyższymi wartościami logP, w stosunku do leków macierzystych, z uwagi na fakt, iż mają one w swojej strukturze dodatkowe pierścienie heterocykliczne, które zwiększają sumaryczną lipofilowość cząsteczki. LogP formamidynowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych wzrastał w następującym szeregu: FMOR<FPIP<FHEX. Najniższą lipofilowość wśród wszystkich badanych nowych związków wykazywała EDOX-FMOR ( $\log P=1,90$ ), natomiast najwyższą charakteryzowała się EDAU-FHEX ( $\log P=4,16$ ).

Aby sprawdzić, czy logP może mieć wpływ na właściwości biologiczne nowych antracyklin, zbadano korelację pomiędzy obliczonymi wartościami logP oraz ich toksycznością, w stosunku do 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wyznaczenie współczynnika korelacji liniowej Pearsona ( $r$ ) pomiędzy wartościami logP oraz wartościami  $ID_{50}$  wykazało, że istotną statystycznie zależność pomiędzy tymi dwoma parametrami uzyskano dla komórek linii T47D nowotworu piersi ( $r=0,5096$ ;  $P=0,0437$ ) (Rycina 4.10). W przypadku pozostałych linii komórkowych, nie uzyskano istotnych statystycznie korelacji. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, które wskazywały na prawdopodobne różnice w możliwym mechanizmie transportu antracyklin, w zależności od typu komórki.

### 5.3 Profil farmakokinetyczny nowych antybiotyków antracyklinowych

Jak wiadomo profil farmakokinetyczny związku ma duży wpływ na jego działanie farmakologiczne, dlatego też postępowaniem wiodącym w przypadku badania cząsteczek, które mają szansę stać się kandydatami na leki powinno być opisanie ich profilu farmakokinetycznego.

Podstawą oceny profilu farmakokinetycznego nowych związków jest opracowanie odpowiedniej metody, spełniającej kryteria walidacji metod bioanalitycznych zgodnie z wytycznymi FDA i EMA. Proces walidacji metody jednoczesnego oznaczania nowych antybiotyków antracyklinowych, w osoczu myszy obejmował ocenę takich parametrów jak liniowość, powtarzalność, precyzja, dokładność oraz stabilność. Opracowane metody, z zastosowaniem systemu UPLC/MS/MS, spełniały kryteria walidacji metod bioanalitycznych dla dziesięciu związków. Dwie z nowych pochodnych, czyli DOX-FMOR i DAU-FMOR prawdopodobnie były zbyt nietrwałe w osoczu myszy i stąd nie udało się opracować w ich przypadku warunków analizy spełniających powyższe kryteria. Nowe, oryginalne metody zostały z sukcesem zastosowane do oznaczania stężenia pozostałych, nowych antybiotyków antracyklinowych w osoczu myszy, w celu określenia ich właściwości farmakokinetycznych oraz biodostępności, po podaniu dootrzewnowym.

W przypadku nowych antybiotyków antracyklinowych, określono ich właściwości farmakokinetyczne po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym, w kasecie, w dawce odpowiednio 0,01 mg/kg dla pojedynczego związku w przypadku podania *i.v.* oraz 0,2 mg/kg dla pojedynczego związku w podaniu *i.p.* Ze względu na tę samą masę molową, takie same ścieżki fragmentacji oraz elucję w bardzo bliskich czasach retencji epimerów antracyklin, zdecydowano o rozdzieleniu związków do dwóch kaset. W pierwszej kasecie podawano nowe związki, pochodne DOX i DAU, w drugiej natomiast nowe związki, pochodne EDOX i EDAU.

Podanie kasetowe związków pozwoliło na znaczne skrócenie czasu niezbędnego do przeprowadzenia zaplanowanych badań oraz istotnie zmniejszyło ilość wymaganych w tego typu badaniach zwierząt laboratoryjnych. Zastosowanie aparatu UPLC/MS/MS o wysokiej czułości pozwoliło na oznaczenie stężenia związków w osoczu myszy, nawet po upływie 12 h od ich podania, mimo podawania związków w niskich dawkach. Zastosowane podejście jest rutynowo stosowane podczas przesiewowych badań farmakokinetycznych<sup>[154–156]</sup>.

Ponieważ leki macierzyste (DOX i DAU) charakteryzują się długimi czasami przebywania leku w organizmie<sup>[157,158]</sup>, niektórzy autorzy wskazują, że skrócenie czasu przebywania leku



w organizmie oraz zmniejszenie AUC nowych pochodnych, może prowadzić, przynajmniej częściowo do zmniejszenia toksyczności nowych antracyklin. Zależność ta jest obserwowana w przypadku epimeru doksorubicyny EDOX<sup>[97]</sup>. Nowe formamidynowe pochodne po podaniu dożylnym wykazywały się zróżnicowanym czasem przebywania w organizmie (od 0,46 h dla DOX-FPIP do 23,1 h dla DAU-FPIP). Po podaniu dootrzewnowym natomiast, ich okres półtrwania ulegał wydłużeniu, co jest w pełni uzasadnione, gdyż po podaniu *i.p.* związek przed dotarciem do krwiobiegu musi przejść przez wątrobę, a dopiero później do krążenia ogólnego<sup>[159]</sup>. Średni czas przebywania w organizmie oraz AUC dla wszystkich nowych związków był niższy w porównaniu do leków macierzystych, co może wskazywać na mniejszą toksyczność tych pochodnych w porównaniu do leków macierzystych.

Antracykliny stosowane w terapii charakteryzują się bardzo szybką dystrybucją, po jednorazowym podaniu, stężenie związków w kompartmentcie centralnym (krew oraz tkanki bogato unaczynione) zmniejsza się szybko, przy jednoczesnym przechodzeniu związku do kompartmentu obwodowego. Eliminacja związków z organizmu jest stosunkowo wolna, z danych literaturowych wiemy, że antybiotyki te eliminowane są na drodze eliminacji przez wątrobę i nerki oraz metabolizm<sup>[160][97,157,158]</sup>. W przypadku nowych antracyklin, po podaniu *i.v.* również obserwowano szybkie zmniejszenie stężenia w osoczu, co wskazuje na szybką dystrybucję oraz wolną eliminację związków. Wszystkie nowe pochodne charakteryzowały się szybkim wchłanianiem po podaniu *i.p.* – maksymalne stężenie pojawiało się po 5 minutach od podania. O szerokiej dystrybucji badanych związków świadczy wysoka wartość objętości dystrybucji wynosząca dla większości struktur około 1 L/kg – co wskazuje na rozmieszczenie tych związków zarówno w przestrzeni zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowej. Dodatkowo niezwykle wysoka wartość objętości dystrybucji (13,5 L/kg) w przypadku pochodnej EDOX-FMOR, świadczy o łączeniu się badanego związku ze strukturami wewnątrzkomórkowymi. Tak duża objętość dystrybucji jest pożądana w aspekcie badania mechanizmu działania antracyklin, wskazując, że nowe antracykliny kumulują się w płynie wewnątrzkomórkowym, a więc mają możliwość interakcji z DNA, który jest głównym celem tych związków.

Po przeanalizowaniu krzywych zależności stężenia od czasu dla badanych związków można przyjąć, że nowe antracykliny, podobnie jak leki macierzyste charakteryzują się co najmniej dwufazowym charakterem eliminacji. Dokładne oszacowanie modelu byłoby prawdopodobnie

możliwe po zwiększeniu ilości próbek pobieranych od myszy oraz wydłużeniu czasu trwania eksperymentu.

Parametry farmakokinetyczne nowych antybiotyków antracyklinowych wydają się odpowiednie, aby zaplanować ich dalsze badania przedkliniczne. W tym względzie, szczególną uwagę należy zwrócić na związek EDOX-FMOR, który cechuje się najwyższą biodostępnością ( $F=57\%$ ) wśród wszystkich nowych antracyklin. Jest to niezwykle istotne, gdyż antracykliny stosowane obecnie w terapii, charakteryzują się bardzo niską biodostępnością i oprócz idarubicyny są podawane jedynie drogą parenteralną<sup>[161]</sup>. Związek EDOX-FMOR charakteryzuje się długim czasem przebywania w organizmie, w porównaniu do pozostałych związków, równym 6,52 h po podaniu *i.v.* oraz 34,25 h po podaniu *i.p.*, niewielkim AUC (2,9  $\mu\text{g min/mL}$  po podaniu *i.v.* oraz 3,3  $\mu\text{g min/mL}$  po podaniu *i.p.*) oraz niskim  $C_{\text{max}}$  (14,51  $\text{ng/mL}$ ). Wszystkie te cechy pozwalają wnioskować, że EDOX-FMOR może okazać się najbardziej obiecującą cząsteczką spośród ocenionej rodziny nowych antybiotyków antracyklinowych.

#### **5.4 Porównanie parametrów fizykochemicznych wyznaczonych eksperymentalnie z danymi przewidywanymi *in silico***

W przemyśle farmaceutycznym opracowywanie modeli obliczeniowych, które umożliwiają przewidywanie właściwości fizykochemicznych, farmakokinetycznych i toksykologicznych nowych związków jest przedmiotem zainteresowania i obiektem licznych badań. Dla przemysłu, programy tego typu są niezwykle użyteczne, pozwalają bowiem na znaczne skrócenie czasu i zmniejszenie kosztów, co jest niezwykle istotne w początkowej fazie badań nad nowym, potencjalnym lekiem<sup>[162,163]</sup>.

Przeprowadzone badania *in silico* dostarczyły informacji o dwóch podstawowych parametrach fizykochemicznych,  $\text{pK}_a$  oraz  $\log P$  oraz profilu farmakokinetycznym badanych antracyklin. Wartości  $\text{pK}_a$  otrzymane *in silico* różniły się od wyznaczonych doświadczalnie oraz dostępnych danych literaturowych, natomiast wartości  $\log P$  były bliskie wartościom otrzymanym doświadczalnie. Nie wykazano zależności między danymi wyznaczonymi eksperymentalnie, a otrzymanymi w efekcie symulacji wartościami  $\text{pK}_{a1}$  ( $R^2 = 0,3501$ ,  $p < 0,05$ ), umiarkowaną, ale istotną statystycznie korelację w przypadku  $\text{pK}_{a2}$  ( $R^2 = 0,6657$ ,  $r = 0,8159$ ,  $p = 0,0001$ ) oraz silną korelację w przypadku wartości  $\log P$  ( $R^2 = 0,823$ ,  $r = 0,9072$ ,  $p < 0,0001$ ). Należy podkreślić, że

w przypadku właściwości kwasowo-zasadowych, program nie uwzględniał różnic w budowie strukturalnej epimerów, a uzyskane wartości były takie same dla związków o zbliżonej strukturze chemicznej, takich jak DOX i DAU, co jest dużym ułatwieniem w aspekcie modelowania, ale niestety powoduje, że wyniki nie można uznać za wiarygodne.

W przypadku modelowania właściwości lipofilowych związków, wyniki otrzymane z zastosowaniem metod *in silico* okazały się bardzo zbliżone do otrzymanych eksperymentalnie.

Oprogramowanie Percepta pozwoliło na oszacowanie podstawowych parametrów farmakokinetycznych nowych antracyklin u człowieka. Otrzymane wartości wskazują, że nowe pochodne mają wyższą biodostępność niż związki macierzyste, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi eksperymentalnie. Niestety, w procesie przewidywania profilu farmakokinetycznego, program nie uwzględnił różnic pomiędzy epimerami.

Dzięki dostępnemu oprogramowaniu komputerowemu możliwe jest zatem wstępne przewidywanie właściwości fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych nowych związków, należy jednak w późniejszych etapach badań zweryfikować prawidłowość otrzymanych danych.

## 5.5 Podsumowanie

Projektowanie i synteza nowych antybiotyków antracyklinowych opiera się na założeniu, że powinny one, w porównaniu do związków obecnie stosowanych, charakteryzować się większą toksycznością w stosunku do komórek nowotworowych, szczególnie szczepów lekoopornych, zmniejszoną kardiotoxycznością, a także korzystniejszym profilem farmakokinetycznym.

Dane literaturowe wskazują, że pierwszym krokiem na drodze uzyskania odpowiedniego kandydata na lek, powinno być zwiększenie lipofilowości związku, które najprawdopodobniej przyczynia się do poprawienia cytotoxyczności antracyklin w stosunku do komórek lekoopornych oraz zmniejszenia ich kardiotoxyczności<sup>[148,161,164]</sup>. Przeprowadzone badania nie wykazały korelacji pomiędzy lipofilowością oraz właściwościami kwasowo-zasadowymi, a cytotoxycznością badanych antracyklin. Można więc wnioskować, że cytotoxyczność antracyklin jest złożonym procesem, który w zależności od typu komórki i obecności specyficznych transporterów może zachodzić w różny sposób, a dokładne ustalenie najbardziej optymalnych wartości parametrów fizykochemicznych, jakimi powinien charakteryzować się nowy związek wymaga dodatkowych badań i dokładniejszego poznania mechanizmu transportu dla tej grupy związków.

Spośród nowych antracyklin na szczególną uwagę zasługuje związek EDOX-FMOR. Mimo niewielkich różnic we właściwościach fizykochemicznych w porównaniu do leków macierzystych, związek ten wykazuje korzystny profil farmakokinetyczny. EDOX-FMOR charakteryzuje się wartościami  $pK_{a1}$  oraz  $pK_{a2}$  zbliżonymi do leków macierzystych, a jego lipofilowość jest najniższa spośród nowych antracyklin. Co istotne, związek ten wykazuje wysoką biodostępność, długi czas przebywania w organizmie oraz bardzo dużą objętość dystrybucji, stąd w stosunku do innych antracyklin jest obiecującym kandydatem do dalszych badań przedklinicznych.

## 6 Wnioski

1. Opracowane z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej oraz mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej oryginalne metody, które zastosowano do oceny właściwości fizykochemicznych nowych związków, pochodnych antybiotyków antracyklinowych mogą być z powodzeniem używane jako metody przesiewowe, do szybkiego wyznaczenia podstawowych parametrów fizykochemicznych, w początkowych etapach badań nad nowymi związkami, potencjalnymi lekami.
2. Badanie właściwości kwasowo-zasadowych związków, wykazało, że antybiotyki antracyklinowe mają właściwości amfolitowe. W pH fizjologicznym związki te są w postaci zjonizowanej.
3. Badanie właściwości lipofilowych związków wykazało, że nowe pochodne charakteryzują się wyższą lipofilowością niż dotychczas stosowane leki z tej grupy. Najwyższą lipofilowością wśród badanych związków charakteryzują się pochodne z podstawnikiem heksametylenoiminy.
4. Opracowane i zwalidowane oryginalne metody jednoczesnego oznaczania nowych antybiotyków antracyklinowych, z zastosowaniem systemu UPLC/MS/MS, umożliwiły oznaczanie stężenia czterech nowych pochodnych DOX i DAU oraz sześciu nowych pochodnych EDOX i EDAU w osoczu myszy.
5. Wykorzystując opracowany warsztat wykazano, że badane związki charakteryzują się długimi czasami przebywania w organizmie, wynoszącymi nawet do 34,3 h, dużymi objętościami dystrybucji, co wskazuje na rozmieszczenie związków zarówno w przestrzeni zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowej, niewielkimi wartościami AUC, co prawdopodobnie może wpływać na zmniejszenie ich kardiotoxyczności, oraz wyższą od związków macierzystych biodostępnością. Biorąc pod uwagę powyższe, za najbardziej obiecującego kandydata na lek uznano pochodną EDOX-FMOR.

6. Podanie kasetowe związków potwierdziło przydatność strategii do szybkiego wyznaczania profilu farmakokinetycznego nowych związków, wpisując się w założenia metod alternatywnych.
7. Modelowanie właściwości fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych metodami *in silico* nie oddaje w pełni właściwości badanych związków i powinno być stosowane jedynie jako narzędzie do wstępnej analizy, a wyniki takiego modelowania muszą być potwierdzone badaniami doświadczalnymi.

## 7 Streszczenie

Antybiotyki antracyklinowe są lekami o udokumentowanej skuteczności, stosowanymi w terapii przeciwnowotworowej. Z uwagi na fakt, że leki te charakteryzują się poważnymi działaniami niepożądanymi, w szczególności kardi toksycznością, w wielu ośrodkach poszukiwane są nowe związki, pochodne antracyklin, które miałyby podobną skuteczność, ale mniejszą toksyczność. Aktywność biologiczna antybiotyków antracyklinowych, ich wychwyt przez komórki nowotworowe oraz transport w organizmie są zależne, m. in. od właściwości fizykochemicznych oraz profilu farmakokinetycznego. Z tego względu, kluczowe dla wyboru potencjalnych kandydatów na leki jest określenie tych parametrów, już w początkowym etapie badań.

Celem podjętych badań była ocena właściwości fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych nowych antybiotyków antracyklinowych. Przedmiotem badań były zaprojektowane i zsyntetyzowane w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie, przez zespół ś.p. Prof. dr hab. Ireny Oszczapowicz nowe antybiotyki antracyklinowe charakteryzujące się bardziej złożoną strukturą, w porównaniu do związków macierzystych. Nowe związki powstały przez zastąpienie grupy aminowej obecnej w pierścieniu daunozaminy antybiotyków antracyklinowych tzw. I generacji tj. w daunorubicynie, doksorubicynie, epidokсорubicynie oraz w epidaunorubicynie przez trójpodstawioną grupę formamidynową –  $N=CR'-NR_1R_2$ , gdzie jako ugrupowania  $-NR_1R_2$  użyto piperidyny, heksametylenoiminy lub morfoliny.

Realizacja badań była możliwa dzięki opracowaniu nowych metod bioanalitycznych z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej do wyznaczenia  $pK_a$ , mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej do wyznaczania  $\log D_{pH10}$  oraz ultrasprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z tandemową spektrometrią mas do oznaczania stężenia nowych antybiotyków antracyklinowych w osoczu myszy.

Wyznaczone wartości  $pK_a$  dla leków macierzystych oraz nowych związków wskazują, że modyfikacje w pierścieniu daunozaminy mają duży wpływ na ich właściwości kwasowo-zasadowe. Antybiotyki antracyklinowe wykazują charakter amfolitowy. Wartości  $pK_{a1}$  badanych związków mieściły się w zakresie 8,36-9,28, natomiast  $pK_{a2}$  wynosiło od 9,38 do 11,48. Największe różnice między wartościami  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$ , w przypadku nowych antracyklin były

widoczne dla EDOX-FPIP ( $\Delta pK_a = 2,5$ ), najmniejsze zaś dla EDAU-FHEX ( $\Delta pK_a = 1,08$ ). Różnice między wartościami  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  dla leków macierzystych były mniejsze niż dla nowych pochodnych i wynosiły 0,68 i 0,76 odpowiednio dla DOX i DAU.

Antracykliny I generacji są lipofilowe i wykazują  $\log P$  w zakresie 1,67-2,69. Najniższą lipofilowością cechowała się DOX, natomiast najwyższą DAU. Nowe związki charakteryzowały się wyższymi wartościami  $\log P$  w stosunku do związków macierzystych. Najniższą lipofilowość wśród wszystkich badanych nowych związków wykazywała EDOX-FMOR ( $\log P = 1,90$ ), natomiast najwyższą ( $\log P = 4,16$ ) charakteryzowała się EDAU-FHEX.

Badanie zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi, a aktywnością antyprolifeacyjną nowych antracyklin, wyznaczoną dla 4 linii ludzkich komórek nowotworowych wykazało korelację pomiędzy wartościami  $\Delta pK_a$  oraz  $ID_{50}$  dla linii komórkowej HCV29T nowotworu pęcherza moczowego oraz zależność pomiędzy  $\log P$ , a  $ID_{50}$  dla linii komórkowej T47D nowotworu piersi.

Ocena profilu farmakokinetycznego wykazała, że nowe antybiotyki antracyklinowe charakteryzują się zróżnicowanym czasem przebywania w organizmie, który wynosił od 0,46 h do 23,1 h po podaniu dożylnym oraz od 3,9 h do 34,3 h po podaniu dootrzewnowym. W przypadku podania dootrzewnowego najwyższą wartością MRT charakteryzował się związek EDOX-FMOR, najkrótszą zaś DOX-FPIP. Badane antracykliny charakteryzowały się dużą objętością dystrybucji wynoszącą od 0,7 L/kg do 13,5 L/kg, co wskazuje na ich rozmieszczenie w całkowitej wodzie organizmu lub kumulację w tkankach i narządach. Biodostępność badanych związków po podaniu dootrzewnowym była zróżnicowana, od 4,9 do 37,4 %. Wyjątkiem był związek EDOX-FMOR, który charakteryzował się najwyższą biodostępnością równą 57,21%. Po podaniu dożylnym, najniższe stężenie początkowe w osoczu osiągał związek DAU-FPIP (8,96 ng/mL), natomiast najwyższe EDOX-FHEX (65,4 ng/mL). Po podaniu dootrzewnowym, najniższe stężenie maksymalne osiągał związek DAU-FPIP (7,63 ng/mL), a najwyższe związek EDOX-FHEX (42,89 ng/mL). Nowe antybiotyki antracyklinowe charakteryzują się korzystnymi właściwościami farmakokinetycznymi i mogą być rozważane jako potencjalne nowe leki. Szczególnie interesującym wydaje się związek EDOX-FMOR, który ze względu na wysoką biodostępność może okazać się bardzo wartościowym kandydatem do dalszych badań przedklinicznych.



## 8 Abstract

Anthracycline antibiotics are a class of drugs used in cancer chemotherapy. Unfortunately, they are characterized by serious side effects, particularly life-threatening cardiotoxicity. For this reason, many scientists are looking for new anthracycline derivatives, which would have similar efficacy but reduced toxicity. The biological activity of anthracycline antibiotics, their uptake by cancer cells and transport in the organism are dependent on physicochemical properties, such as,  $pK_a$  and  $\log P$ . In addition to physicochemical properties, also pharmacokinetic profile is extremely important for the future of the compound, therefore, the key point to selecting potential drug candidates is to determine, at the initial stage of testing, their physicochemical properties and pharmacokinetic profile.

The aim of the study was to assess the physicochemical and pharmacokinetic properties of new derivatives of anthracycline antibiotics. The tested compounds were synthesized at the Institute of Biotechnology and Antibiotics in Warsaw by a team of R.I.P. prof. dr hab. Irena Oszczapowicz. New derivatives of anthracycline antibiotics are characterized by a more complex structure, compared to parent compounds. New derivatives were formed by replacing of the amino group located on the C-3 'carbon of the daununosamine ring of the first generation anthracycline antibiotics by a trisubstituted formamidine group. As substitutions piperidine, hexamethyleneimine and morpholine moiety were used.

During the conducted studies new bioanalytical methods using capillary zone electrophoresis and microemulsion electrokinetic capillary chromatography were developed. First method allowed to determine  $pK_a$  values, whereas second were used to determine  $\log D$  of tested compounds. In the next step new methods using ultra-efficient liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry were created and validated. These methods were used to determine the concentration of new anthracycline antibiotics in the mice plasma in order to assess the pharmacokinetic profiles of new compounds after cassette dosing.

The  $pK_a$  values determined for the parent compounds and new derivatives indicated that the modification of the daununosamine ring had a significant impact on their acid-base properties. The  $pK_{a1}$  values of the tested compounds were in the range of 8.36-9.28, while  $pK_{a2}$  ranged from 9.38 to 11.48. The largest differences between  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values for new anthracyclines were visible for EDOX-FPIP ( $\Delta pK_a=2.5$ ) and the smallest for EDAU-FHEX ( $\Delta pK_a=1.08$ ). The

differences between the  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values for the parent compounds were lower than for the tested derivatives and amounted to 0.68 and 0.76 for DOX and DAU, respectively.

The first generation anthracyclines were lipophilic and were characterized by logP values in the range of 1.67-2.69. The lowest lipophilicity was noted for DOX, while the highest was for DAU. The new compounds were characterized by higher logP values relative to the parent compounds, their lipophilicity increased in the FMOR <FPIP <FHEX series. The lowest lipophilicity among all new compounds was shown by EDOX-FMOR (logP=1.90), while the highest (logP=4.16) was for EDAU-FHEX.

Determination of the relationship between physicochemical properties and antiproliferative activity of new anthracyclines for 4 human tumor cell lines showed a correlation between  $\Delta pK_a$  and  $ID_{50}$  values for the HCV29T cell line (bladder cancer cells) and between logP and  $ID_{50}$  values of T47D cells (breast cancer). These results suggested that depending on the type of anthracycline cells, they may be characterized by toxicity depending on various factors, which may depend, for example, on differences in the transport mechanism.

The results indicated that the new anthracycline antibiotics were characterized by a varied mean residence time in the body, which ranged from 0.46 h to 23.1 h after intravenous administration and from 3.9 h to 34.3 h after intraperitoneal administration. In the case of intraperitoneal administration, the highest MRT was for EDOX-FMOR and the lowest for DOX-FPIP. The new anthracyclines had a distribution volume of 0.7 L/kg to 13.5 L/kg, which suggested that they were distributed in the body's total water or accumulated in tissues and organs. Most of the compounds after intraperitoneal administration were characterized by bioavailability ranges from 4,9 to 37,4 %. The exception was EDOX-FMOR, which had the highest bioavailability of 57.21%. After intravenous administration, the lowest initial concentration in plasma was characterized by DAU-FPIP (8.96 ng/mL) and the highest by EDOX-FHEX (65.4 ng/ L). Following intraperitoneal administration, similarly, the lowest peak concentration was achieved by DAU-FPIP (7.63 ng/mL), and the highest compound EDOX-FHEX (42.89 ng/mL). New anthracycline antibiotics were characterized by favorable pharmacokinetic properties and may be considered as potential new drugs. Especially EDOX-FMOR due to its high bioavailability may prove to be a promising candidate for further research.

## 9 Bibliografia

- [1] M. P. Pollastri. Overview on the rule of five. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **2010**, 49, 9.12.1-9.12.8.
- [2] W. P. Walters, A. Murcko, M. A. Murcko. Recognizing molecules with drug-like properties. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, 384–387.
- [3] E. H. Ohlstein, R. R. Ruffolo Jr, J. D. Elliott. Drug Discovery in the Next Millennium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2000**, 40, 177–191.
- [4] K. Sato, T. Watanabe, K. Nishioka, M. Yabuki, S. Komuro. Key Issues and Perspectives for Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development. *Sumitomo Kagaku*, **2004**, 2004, 26–34.
- [5] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski. The price of innovation: New estimates of drug development costs. *J. Health Econ.*, **2003**, 22, 151–85.
- [6] J. A. DiMasi. The Value of Improving the Productivity of the Drug Development Process: faster times and better decisions. *Pharmacoeconomics*, **2002**, 20, 1–10.
- [7] S. Garattini. Are me-too drugs justified? *J. Nephrol.*, **1997**, 10, 283–294.
- [8] N. J. Nusbaum. Making “me-too” drugs benefit the public. *Am. J. Med. Qual.*, **2002**, 17, 215–217.
- [9] I. D. Kuntz. Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science (80-. )*, **1992**, 257, 1078–1082.
- [10] J. Szymura-Olesiak. Równowagi w roztworach elektrolitów, in *Chem. Fiz.*, (Ed: T. Hermann), **2007**.
- [11] S. Lower. “Acid Strength and the Acid Dissociation Constant (Ka),” Available at: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General\\_Chemistry/Map%3A\\_A\\_Molecular\\_Approach\\_\(Tro\)/16%3A\\_Acids\\_and\\_Bases/16.04%3A\\_Acid\\_Strength\\_and\\_the\\_Acid\\_Dissociation\\_Constant\\_\(Ka\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_A_Molecular_Approach_(Tro)/16%3A_Acids_and_Bases/16.04%3A_Acid_Strength_and_the_Acid_Dissociation_Constant_(Ka)), **2017**.
- [12] V. Martinez, M. I. Maguregui, R. M. Jimenez, R. M. Alonso. Determination of the pKa values of beta-blockers by automated potentiometric titrations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, 23, 459–468.
- [13] J. L. Beltrán, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, J. Barbosa. Spectrophotometric,

- potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile – water media. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 484, 253–264.
- [14] Z. Qiang, C. Adams. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res.*, **2004**, 38, 2874–90.
- [15] S. Babić, A. J. M. Horvat, D. Mutavdžić Pavlović, M. Kaštelan-Macan. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26, 1043–1061.
- [16] E. Jiménez-Lozano, I. Marqués, D. Barrón, J. L. Beltrán, J. Barbosa. Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 464, 37–45.
- [17] V. Evagelou, A. Tsantili-Kakoulidou, M. Koupparis. Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and cefpirome using UV spectrometry and pH potentiometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, 1119–1128.
- [18] V. Solinova, V. Kasicka, D. Koval, M. Cesnek, A. Holy. Determination of acid-base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **2006**, 27, 1006–1019.
- [19] G. A. Caliaro, C. A. Herbots. Determination of pK(a) values of basic new drug substances by CE. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 26, 427–434.
- [20] J. L. Wang, X. J. Xu, D. Y. Chen. Determination of pKa values of a triptolide derivative and its impurities by pressure-assisted capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 88, 22–6.
- [21] J. A. Cleveland, M. H. Benko, S. J. Gluck, Y. M. Walbroehl. Automated pKa determination at low solute concentrations by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **1993**, 652, 301–308.
- [22] P. Nowak, M. Wozniakiewicz, P. Koscielniak. Application of capillary electrophoresis in determination of acid dissociation constant values. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1377, 1–12.
- [23] A. Andres, M. Roses, C. Rafols, E. Bosch, S. Espinosa, V. Segarra, J. M. Huerta. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log D) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2015**, 76, 181–191.
- [24] C. Liang, J. qin Qiao, H. zhen Lian. Determination of reversed-phase high performance liquid chromatography based octanol-water partition coefficients for neutral and ionizable

- compounds: Methodology evaluation. *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1528, 25–34.
- [25] K. D. Altria, A. Marsh, C. Sanger-van de Griend. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis*, **2006**, 27, 2263–2282.
- [26] R. Ryan, K. Altria, E. Mcevoy, S. Donegan, J. Power. A review of developments in the methodology and application of microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, **2013**, 34, 159–177.
- [27] Y. Cao, J. Sheng. Microstructure of microemulsion in MEEKC. *Electrophoresis*, **2010**, 31, 672–678.
- [28] Y. Henchoz, S. Romand, J. Schappler, S. Rudaz, J. L. Veuthey, P. A. Carrupt. High-throughput log P determination by MEEKC coupled with UV and MS detections. *Electrophoresis*, **2010**, 31, 952–964.
- [29] G. T. Balogh, B. Gyarmati, B. Nagy, L. Molnar, G. M. Keseru. Comparative evaluation of in silico pKa prediction tools on the gold standard dataset. *QSAR Comb. Sci.*, **2009**, 28, 1148–1155.
- [30] S. G. Machatha, S. H. Yalkowsky. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP, ACDlogP and KowWin to experimentally determined values. *Int. J. Pharm.*, **2005**, 294, 185–192.
- [31] C. Liao, M. C. Nicklaus. Comparison of nine programs predicting pKa values of pharmaceutical substances. *J. Chem. Inf. Model.*, **2009**, 49, 2801–2812.
- [32] M. Meloun, S. Bordovska. Benchmarking and validating algorithms that estimate pKa values of drugs based on their molecular structures. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 389, 1267–81.
- [33] D. J. Adams, L. R. Morgan. Tumor Physiology and Charge Dynamics of Anticancer Drugs: Implications for Camptothecin-based Drug Development. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, 18, 1367–72.
- [34] A. A. Petrauskas, E. A. Kolovanov. ACD/Log P method description. *Perspect. Drug Discov. Des.*, **2000**, 19, 99–116.
- [35] C. Tan, H. Tasaka, K. -P Yu, M. L. Murphy, D. A. Karnofsky. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*, **1967**, 20, 333–53.
- [36] R. B. Weiss. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.*,

- 1992**, 19, 670–86.
- [37] R. B. Weiss, G. Sarosy, K. Clagett-Carr, M. Russo, B. Leyland-Jones. Anthracycline analogs: the past, present, and future. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1986**, 18, 185–197.
- [38] WHO. *20th Edition WHO Model List of Essential Medicines (March 2017)*, **2017**.
- [39] World Health Organization. WHO Model List of Essential Medicines for Children, 6th List. *Heal. Syst. Transition*, **2015**.
- [40] D. Cappetta, F. Rossi, E. Piegari, F. Quaini, L. Berrino, K. Urbanek, A. De Angelis. Doxorubicin targets multiple players: A new view of an old problem. *Pharmacol. Res.*, **2018**, 127, 4–14.
- [41] A. Szulawska, M. Czyz. Molekularne mechanizmy działania antracyklin. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, **2006**, 60, 78–100.
- [42] G. E. Martorana, D. Tavian, A. Silvestrini, A. Mordente, E. Meucci. Topoisomerases and Anthracyclines: Recent Advances and Perspectives in Anticancer Therapy and Prevention of Cardiotoxicity. *Curr. Med. Chem.*, **2016**, 24, 1607–1626.
- [43] J. Marinello, M. Delcuratolo, G. Capranico. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19, 3480.
- [44] A. Mukherjee, W. D. Sasikala. Drug–DNA Intercalation: From discovery to the molecular mechanism, in *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, Copyright © 2013 Elsevier Inc. All Rights Reserved., **2013**, pp. 1–62.
- [45] K. Mross, U. Massing, F. Kratz. DNA-intercalators — the anthracyclines, in *Drugs Affect. Growth Tumours SE - 2*, (Eds: H.M.. Pinedo, H. Smorenburg), Birkhäuser Basel, Basel, **2006**, pp. 19–81.
- [46] J. B. Chaires, K. R. Fox, J. E. Herrera, M. Britt, M. J. Waring. Site and Sequence Specificity of the Daunomycin-DNA Interaction. *Biochemistry*, **1987**, 26, 8227–8236.
- [47] K. E. Reinert. Anthracycline-binding induced DNA stiffening, bending and elongation; stereochemical implications from viscometric investigations. *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11, 3411–3430.
- [48] D. Suh, Y. K. Oh, M. W. Hur, B. Ahn, J. B. Chaires. Daunomycin binding to deoxypolynucleotides with alternating sequences: Complete thermodynamic profiles of heterogeneous binding sites. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2002**, 21, 637–649.

- [49] F. Leng, R. Savkur, I. Fokt, T. Przewloka, W. Priebe, J. B. Chaires. Base specific and regioselective chemical cross-linking of daunorubicin to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 4731–4739.
- [50] C. Cullinane, S. M. Cutts, A. Van Rosmalen, D. R. Phillips. Formation of adriamycin-DNA adducts in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 2296–2303.
- [51] D. J. Taatjes, G. Gaudiano, K. Resing, T. H. Koch. Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 1276–1286.
- [52] A. van Rosmalen, C. Cullinane, S. M. Cutts, D. R. Phillips. Stability of adriamycin-induced DNA adducts and interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 42–50.
- [53] D. J. Taatjes, G. Gaudiano, T. H. Koch. Production of formaldehyde and DNA-adriamycin or DNA-daunomycin adducts, initiated through redox chemistry of dithiothreitol/iron, xanthine oxidase/NADH/iron, or glutathione/iron. *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, *10*, 953–961.
- [54] D. J. Taatjes, G. Gaudiano, K. Resing, T. H. Koch. Alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4135–4138.
- [55] F. Yang, S. Teves, J. Kemp, S. Henikoff. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochem. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **2014**, *1845*, 84–89.
- [56] S. M. Cutts, A. Nudelman, A. Rephaeli, D. R. Phillips. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life*, **2005**, *57*, 73–81.
- [57] J. Vásquez-Vivar, P. Martasek, N. Hogg, B. S. S. Masters, K. A. Pritchard, B. Kalyanaraman. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 11293–11297.
- [58] S. Licata, A. Saponiero, A. Mordente, G. Minotti. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: Role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, *13*, 414–420.
- [59] M. Gramatyka. Kardiotoksyczność jako niepożądane działanie w terapii raka piersi. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **2014**, *68*, 483–497.
- [60] T. Zaremba. Oksydacyjne uszkodzenia DNA — ich analiza oraz znaczenie kliniczne. *Postepy Biochem.*, **2010**, *56*, 124–138.
- [61] G. Minotti. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **2004**, *56*, 185–229.

- [62] N. Tuteja, T. N. Phan, R. Tuteja, A. Ochem, A. Falaschi. Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 236, 636–640.
- [63] R. Martinez, R. Navarro, M. Lacort, J. I. Ruiz-Sanz, M. B. Ruiz-Larrea. Doxorubicin induces ceramide and diacylglycerol accumulation in rat hepatocytes through independent routes. *Toxicol. Lett.*, **2009**, 190, 86–90.
- [64] G. C. Pereira, S. P. Pereira, L. C. Tavares, F. S. Carvalho, S. Magalhaes-Novais, I. A. Barbosa, M. S. Santos, J. Bjork, A. J. Moreno, K. B. Wallace, P. J. Oliveira. Cardiac cytochrome c and cardiolipin depletion during anthracycline-induced chronic depression of mitochondrial function. *Mitochondrion*, **2016**, 30, 95–104.
- [65] K. Nicolay, R. J. M. Timmers, E. Spoelstra, R. Van Der Neut, J. J. Fok, Y. M. Huigen, A. J. Verkleij, B. De Kruijff. The interaction of adriamycin with cardiolipin in model and rat liver mitochondrial membranes. *BBA - Biomembr.*, **1984**, 778, 359–371.
- [66] E. Goormaghtigh, P. Chatelain, J. Caspers, J. M. Ruyschaert. Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids. *BBA - Biomembr.*, **1980**, 597, 1–14.
- [67] T. Wojcik, E. Buczek, K. Majzner, A. Kolodziejczyk, J. Miszczuk, P. Kaczara, W. Kwiatek, M. Baranska, M. Szymonski, S. Chlopicki. Comparative endothelial profiling of doxorubicin and daunorubicin in cultured endothelial cells. *Toxicol. Vitro.*, **2015**, 29, 512–521.
- [68] H. Karim, A. Bogason, H. Bhuiyan, A. K. Fotoohi, P. Lafolie, S. Vitols. Comparison of uptake mechanisms for anthracyclines in human leukemic cells. *Curr. Drug Deliv.*, **2013**, 10, 404–412.
- [69] J. M. Siegfried, T. G. Burke, T. R. Tritton. Cellular transport of anthracyclines by passive diffusion. Implications for drug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, **1985**, 34, 593–598.
- [70] K. Ota, K. Ito, J.-I. Akahira, N. Sato, T. Onogawa, T. Moriya, M. Unno, T. Abe, H. Niikura, T. Takano, N. Yaegashi. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: A possible role of the adriamycin importer. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **2007**, 26, 334–340.
- [71] M. Okabe, M. Unno, H. Harigae, M. Kaku, Y. Okitsu, T. Sasaki, T. Mizoi, K. Shiiba, H. Takanaga, T. Terasaki, S. Matsuno, I. Sasaki, S. Ito, T. Abe. Characterization of the organic



- cation transporter SLC22A16: A doxorubicin importer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 333, 754–762.
- [72] H. Koepsell, K. Lips, C. Volk. Polyspecific organic cation transporters: Structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.*, **2007**, 24, 1227–1251.
- [73] H. H. Lee, B. F. Leake, R. B. Kim, R. H. Ho. Contribution of Organic Anion-Transporting Polypeptides 1A/1B to Doxorubicin Uptake and Clearance. *Mol. Pharmacol.*, **2016**, 91, 14–24.
- [74] S. Durmus, J. Naik, L. Buil, E. Wagenaar, O. Van Tellingen, A. H. Schinkel. In vivo disposition of doxorubicin is affected by mouse Oatp1a/1b and human OATP1A/1B transporters. *Int. J. Cancer*, **2014**, 135, 1700–1710.
- [75] Y. Hashimoto, S. Tatsumi, R. Takeda, A. Naka, N. Ogane, Y. Kameda, K. Kawachi, S. Shimizu, M. Sakai, S. Kamoshida. Expression of organic anion-transporting polypeptide 1A2 and organic cation transporter 6 as a predictor of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2014**, 145, 101–111.
- [76] R. B. Kim. Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology*, **2002**, 181–182, 291–297.
- [77] T. Yamagishi, S. Sahni, D. M. Sharp, A. Arvind, P. J. Jansson, D. R. Richardson. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 31761–31771.
- [78] M. Walczak. Binding of new aminopropan-2-ol compounds to bovine serum albumin, ai-acid glycoprotein and rat serum using equilibrium dialysis and LC/MS/MS. *Pharmacol. Reports*, **2013**, 65, 1294–1303.
- [79] B. Tan, D. Piwnica-Worms, L. Ratner. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr. Opin. Oncol.*, **2000**, 12, 450–8.
- [80] A. Rajagopal, S. M. Simon. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol. Biol. Cell*, **2003**, 14, 3389–3399.
- [81] L. Gianni, E. H. Herman, S. E. Lipshultz, G. Minotti, N. Sarvazyan, D. B. Sawyer. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. *J Clin Oncol*, **2008**, 26, 3777–3784.
- [82] J. V. McGowan, R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J. M. Walker, D. M. Yellon. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2017**, 31, 63–75.

- 
- [83] D. L. Hershman, T. Shao. Anthracycline cardiotoxicity after breast cancer treatment. *Oncology (Williston Park)*, **2009**, 23, 227–34.
- [84] D. Sawyer. Anthracyclines and heart failure. *N. Engl. J. Med.*, **2013**, 368, 1154–56.
- [85] K. Renu, A. V.G., T. P. Tirupathi, S. Arunachalam. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur. J. Pharmacol.*, **2018**, 818, 241–253.
- [86] O. J. Arola, A. Saraste, K. Pulkki, M. Kallajoki, M. Parvinen, L. M. Voipio-Pulkki. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res.*, **2000**, 60, 1789–1792.
- [87] H. C. Champion, M. W. Skaf, J. M. Hare. Role of nitric oxide in the pathophysiology of heart failure. *Heart Fail. Rev.*, **2003**, 8, 35–46.
- [88] M. A. Grenier, S. E. Lipshultz. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol*, **1998**, 25, 72–85.
- [89] S. M. Castellino, J. A. Tooze, W. M. Leisenring, M. Stovall, L. L. Robison, A. C. Mertens, A. M. Geiger, M. M. Hudson, P. Goodman. Morbidity and mortality in long-term survivors of Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood*, **2010**, 117, 1806–1816.
- [90] T. Šimůnek, M. Štěřba, O. Popelová, M. Adamcová, R. Hrdina, V. Gerši. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Reports*, **2009**, 61, 154–171.
- [91] A. Y. Shaikh, J. A. Shih. Chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Curr. Heart Fail. Rep.*, **2012**, 9, 117–127.
- [92] A. Simmons, J. L. Vacek, D. Meyers. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Postgrad. Med.*, **2008**, 120, 67–72.
- [93] L. R. Wiseman, C. M. Spencer. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs*, **1998**, 56, 385–403.
- [94] P. Vejpongsa, E. T. H. Yeh. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: Challenges and opportunities. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2014**, 64, 938–945.
- [95] T. Wojcik, E. Szczesny, S. Chlopicki. Detrimental effects of chemotherapeutics and other drugs on the endothelium: A call for endothelial toxicity profiling. *Pharmacol. Reports*, **2015**, 67, 811–817.
- [96] A. Soultati, G. Mountzios, C. Avgerinou, G. Papaxoinis, D. Pectasides, M. A. Dimopoulos,

- C. Papadimitriou. Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: Preclinical evidence and clinical implications. *Cancer Treat. Rev.*, **2012**, 38, 473–483.
- [97] G. L. Plosker, D. Faulds, O. Cantoni, C. Gridelli, O. Medica, U. Napoli, T. Habeshaw. Epirubicin. *Drugs*, **1993**, 45, 788–856.
- [98] A. Rogalska, A. Marczak, Z. Józwiak. Aklarubicyna- alternatywa dla komórek opornych na antracykliny I generacji. *Postępy Biol. komórki*, **2008**, 35, 97–111.
- [99] P. Borchmann, K. Hubel, R. Schnell, A. Engert. Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **1997**, 35, 80–83.
- [100] M. Brogini. Nemorubicin. *Top. Curr. Chem.*, **2008**, 283, 191–206.
- [101] S. V Onrust, H. M. Lamb. Valrubicin. *Drugs Aging*, **1999**, 15, 69–75.
- [102] M. Wasowska, J. Wietrzyk, A. Opolski, J. Oszczapowicz, I. Oszczapowicz. Effect of structural modifications of anthracyclines on the ability to overcome drug resistance of cancer cells. *Anticancer Res.*, **2006**, 26, 2009–2012.
- [103] K. Kik, M. Wasowska-Lukawska, I. Oszczapowicz, L. Szmigiero. Cytotoxicity and cellular uptake of doxorubicin and its formamidine derivatives in HL60 sensitive and HL60/MX2 resistant cells. *Anticancer Res.*, **2009**, 29, 1429–1434.
- [104] E. Ciesielska, K. Studzian, M. Wasowska, I. Oszczapowicz, L. Szmigiero. Cytotoxicity, cellular uptake and DNA damage by daunorubicin and its new analogues with modified daunosamine moiety. *Cell Biol. Toxicol.*, **2005**, 21, 139–147.
- [105] S. E. Shadle, B. P. Bammel, B. J. Cusack, R. A. Knighton, S. J. Olson, P. S. Mushlin, R. D. O. Olson. Daunorubicin cardiotoxicity: Evidence for the importance of the quinone moiety in a free-radical-independent mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, 60, 1435–1444.
- [106] M. K. Piestrzeniewicz, D. Wilmańska, J. Szemraj, K. Studzian, M. Gniazdowski. Interactions of novel morpholine and hexamethylene derivatives of anthracycline antibiotics with DNA. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, **2004**, 59, 739–748.
- [107] M. Wasowska, I. Oszczapowicz, J. Wietrzyk, A. Opolski, J. Madej, S. Dzimira, J. Oszczapowicz. Influence of the structure of new anthracycline antibiotics on their biological properties. *Anticancer Res.*, **2005**, 25, 2043–2048.
- [108] A. Opolski, M. Wąsowska, J. Wietrzyk, A. Nasulewicz, J. Oszczapowicz, I. Oszczapowicz. Properties of the new anthracycline derivative containing modified daunosamine moiety. *Eur. J. Cancer*, **2002**, 38, S19–S20.

- [109] D. G. Streeter, D. L. Taylor, E. M. Acton, J. H. Peters. Comparative cytotoxicities of various morpholinyl anthracyclines. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1985**, *14*, 160–164.
- [110] I. Oszczapowicz, M. Wąsowska, J. Oszczapowicz, A. Owoc, E. Dominiczak, J. Wietrzyk, A. Opolski. New derivatives of anthracycline antibiotics, method of their synthesis, pharmaceutical agents containing them, and their use. *Polish Pat.*, **2005**, 210494.
- [111] B. Gaš, M. Jaroš, V. Hruška, I. Zusková, M. Štědrý. PeakMaster-A Freeware Simulator of Capillary Zone Electrophoresis. *LC GC Eur.*, **2005**.
- [112] P. G. Righetti. Electrophoresis: The march of pennies, the march of dimes. *J. Chromatogr. A*, **2005**, *24*, 24–40.
- [113] V. Solinova, V. Kasicka. Determination of acidity constants and ionic mobilities of polyprotic peptide hormones by CZE. *Electrophoresis*, **2013**, *34*, 2655–2665.
- [114] P. Zhao, G. Zhu, W. Zhang, L. Zhang, Z. Liang, Y. Zhang. Study of multiple binding constants of dexamethasone with human serum albumin by capillary electrophoresis-frontal analysis and multivariate regression. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, *393*, 257–261.
- [115] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando. Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries. *Anal. Chem.*, **1984**, *56*, 111–113.
- [116] A. Avdeef. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr. Top. Med. Chem.*, **2001**, *1*, 277–351.
- [117] S. F. Donovan, M. C. Pescatore. Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *952*, 47–61.
- [118] J. M. Cabot, X. Subirats, E. Fuguet, M. Rosés. High throughput determination log Po/w/pKa/log Do/w of drugs by combination of UHPLC and CE methods. *Admet Dmpk*, **2014**, *2*, 98–106.
- [119] S. D. Krämer, A. Braun, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach. Towards the predictability of drug-lipid membrane interactions: The pH- dependent affinity of propranolol to phosphatidylinositol containing liposomes. *Pharm. Res.*, **1998**, *15*, 739–744.
- [120] L. S. Foteeva, D. A. Trofimov, O. V. Kuznetsova, C. R. Kowol, V. B. Arion, B. K. Keppler, A. R. Timerbaev. A quantitative structure-activity approach for lipophilicity estimation of antitumor complexes of different metals using microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2011**, *55*, 409–413.

- [121] A. R. Timerbaev, O. O. Vasylenko, L. S. Foteeva, A. V. Rudnev, O. Semenova, B. K. Keppler. Application of micellar and microemulsion electrokinetic chromatography for characterization of gallium (III) complexes of pharmaceutical significance. *J. Sep. Sci.*, **2007**, *30*, 399–406.
- [122] J. Fan, I. de Lannoy. Pharmacokinetics. *Biochem. Pharmacol.*, **2014**, *87*, 93–120.
- [123] G. R. Jang, R. Z. Harris, D. T. Lau. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. *Med. Res. Rev.*, **2001**, *21*, 382–396.
- [124] European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. *EMA Guidel.*, **2012**, *44*, 1–23.
- [125] Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.*, **2001**.
- [126] ACD/I-Lab 2.0, Advanced Chemistry Development, Inc. **2017**.
- [127] K. Matyjaszczyk, M. Kolonko, A. Gonciarz-Dytman, I. Oszczapowicz, M. Łukawska, W. Jawień, S. Chlopicki, M. Walczak. Effects of structural modification of the daunosamine moiety of anthracycline antibiotics on pKa values determined by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2017**, *1060*, 44–52.
- [128] C. Hansch, A. Leo, D. H. Hoekman. *Exploring QSAR.: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*, American Chemical Society, Washington, **1995**.
- [129] F. Maestrelli, G. Capasso, M. L. González-Rodríguez, A. M. Rabasco, C. Ghelardini, P. Mura. Effect of preparation technique on the properties and *in vivo* efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. *J. Liposome Res.*, **2009**, *19*, 253–260.
- [130] M. A. Schwarz, R. H. H. Neubert, G. Dongowski. Characterization of interactions between bile salts and drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. Part I. *Pharm. Res.*, **1996**, *13*, 1174–80.
- [131] Y. Nakagawa, K. Izumi, N. Oikawa, T. Sotomatsu, M. Shigemura, T. Fujita. Analysis and prediction of hydrophobicity parameters of substituted acetanilides, benzamides and related aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, **1992**, *11*, 901–916.
- [132] F. Qi, W. Chu, B. Xu. Ozonation of phenacetin in associated with a magnetic catalyst CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: The reaction and transformation. *Chem. Eng. J.*, **2015**, 262.
- [133] *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics: An Introduction, Fourth Edition*, Taylor & Francis, **1986**.

- [134] A. D. Pozzo, G. Donzelli, L. Rodriguez, A. Tajana. "In vitro" model for the evaluation of drug distribution and plasma protein-binding relationships. *Int. J. Pharm.*, **1989**, 50, 97–101.
- [135] K. Verschueren. *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*, Van Nostrand Reinhold Co., **1983**.
- [136] R. Heel, G. Avery. *Drug Treatment*, ADIS, Sidney, **1980**.
- [137] D. Perrin. *Dissociation Constants of Bases in Aqueous Solution*, London, **1972**.
- [138] T. Buyuktimkin, D. E. Wurster. Quantitative Structure and Activity Relationship Analysis of the Effect of Metoclopramide and Related Compounds on the Surface Ionization of Fumed Silica. *J. Pharm. Sci.*, **2017**, 104, 2566–2573.
- [139] *Essentials Of Biopharmaceutics And Pharmacokinetics*, Elsevier (A Division of Reed Elsevier India Pvt. Limited), **2010**.
- [140] I. Kola, J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3, 711–5.
- [141] C. L. A. Berli, M. V Piaggio, J. A. Deiber. Modeling the zeta potential of silica capillaries in relation to the background electrolyte composition. *Electrophoresis*, **2003**, 24, 1587–1595.
- [142] E. Fuguet, M. Reta, C. Gibert, M. Rosés, E. Bosch, C. Ràfols. Critical evaluation of buffering solutions for pKa determination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2008**, 29, 2841–2851.
- [143] Z. Mala, P. Gebauer, P. Bocek. Important electromigration effects of carbon dioxide in capillary electrophoresis at high pH. *Electrophoresis*, **2011**, 32, 1500–1507.
- [144] B. Ga, E. Kenndler. Dispersive phenomena in electromigration separation methods. *Electrophoresis*, **2000**, 21, 3888–3897.
- [145] Z. Chen, S. Ghosal. Electromigration Dispersion in Capillary Electrophoresis. *Bull. Math. Biol.*, **2012**, 74, 346–355.
- [146] G. L. Erny, E. T. Bergström, D. M. Goodall, S. Grieb. Predicting peak shape in capillary zone electrophoresis: A generic approach to parametrizing peaks using the Haarhoff-Van der Linde (HVL) function. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4862–4872.
- [147] G. L. Erny, E. T. Bergström, D. M. Goodall. Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis: Experimental validation of use of the Haarhoff-Van der Linde function. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 959, 229–239.

- [148] A. Garnier-Suillerot, C. Marbeuf-Gueye, M. Salerno, C. Loetchutinat, I. Fokt, M. Krawczyk, T. Kowalczyk, W. Priebe. Analysis of drug transport kinetics in multidrug-resistant cells: implications for drug action. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8, 51–64.
- [149] C. Marbeuf-Gueye, D. Etti, W. Priebe, H. Kozłowski, A. Garnier-Suillerot. Correlation between the kinetics of anthracycline uptake and the resistance factor in cancer cells expressing the multidrug resistance protein or the P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1450, 374–384.
- [150] Q. Hu, G. Hu, T. Zhou, Y. Fang. Determination of dissociation constants of anthracycline by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, 679–684.
- [151] J. E. Kim, H. J. Cho, J. S. Kim, C. K. Shim, S. J. Chung, M. H. Oak, I. S. Yoon, D. D. Kim. The limited intestinal absorption via paracellular pathway is responsible for the low oral bioavailability of doxorubicin. *Xenobiotica.*, **2013**, 43, 579–591.
- [152] K. F. Maass, C. Kulkarni, M. A. Quadri, P. T. Hammond, A. M. Betts, K. D. Wittrup. A Flow Cytometric Clonogenic Assay Reveals the Single-Cell Potency of Doxorubicin. *J. Pharm. Sci.*, **2015**, 104, 4409–4416.
- [153] H. Sakagami, C. Shimada, Y. Kanda, O. Amano. Effects of 3-styrylchromones on metabolic profiles and cell death in oral squamous cell carcinoma cells. *Toxicology Reports*, **2015**, 2, 1281–1290.
- [154] “Strona internetowa firmy Compbio,” Available at: <http://www.compbio.com/services/pharmacokinetics/preclinical-pharmacokinetics/>, **n.d.**
- [155] Strona internetowa firmy Pharmidex. **n.d.**
- [156] “Strona internetowa firmy Creative Biolabs,” Available at: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/cassette-dosing-studies.htm>, **n.d.**
- [157] W. J. F. van der Vijgh, P. A. Maessen, H. M. Pinedo. Comparative metabolism and pharmacokinetics of doxorubicin and 4'-epidoxorubicin in plasma, heart and tumor of tumor-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1990**, 26, 9–12.
- [158] K. Mross, P. Maessen, W. J. F. Van Der Vijgh, H. Gall, E. Boven, H. M. Pinedo. Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J. Clin. Oncol.*, **1988**, 6, 517–526.
- [159] L. Lundgren-Eriksson, A. Carlsson, S. Eksborg, W. Ryd, R. Vesanen, R. Hultborn.

- Pharmacokinetics of doxorubicin and epirubicin in mice during chlorpromazine-induced hypothermia. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1997**, *40*, 419–424.
- [160] D. L. Gustafson, J. C. Rastatter, T. Colombo, M. E. Long. Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model. *J. Pharm. Sci.*, **2002**, *91*, 1488–1501.
- [161] D. Crivellari, D. Lombardi, S. Spazzapan, A. Veronesi, G. Toffoli. New oral drugs in older patients: A review of idarubicin in elderly patients. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2004**, *49*, 153–163.
- [162] J. F. Blake. Chemoinformatics - predicting the physicochemical properties of “drug-like” molecules. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, *11*, 104–107.
- [163] G. Lambrinidis, T. Vallianatou, A. Tsantili-Kakoulidou. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2015**, *86*, 27–45.
- [164] E. Salvatorelli, S. Guarnieri, P. Menna, G. Liberi, A. M. Calafiore, M. A. Mariggio, A. Mordente, L. Gianni, G. Minotti. Defective one- or two-electron reduction of the anticancer anthracycline epirubicin in human heart: Relative importance of vesicular sequestration and impaired efficiency of electron addition. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 10990–11001.



## 10 Spis rycin

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Rycina 1.1. Struktura kompleksu doksorubicyna-DNA. Doksorubicyna tworzy wiązanie kowalencyjne (zaznaczone na czerwono) z guaniną.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 17 |
| Rycina 1.2. Schemat obrazujący powstawanie reaktywnych form tlenu w jednoelektronowej reakcji redukcji antracyklin.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 18 |
| Rycina 1.3. Struktury nowych antybiotyków antracyklinowych stosowanych w terapii aklarubicyna A), idarubicyna B), walrubicyna C), nemorubicyna D). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 22 |
| Rycina 3.1. Schemat układu do elektroforezy kapilarnej.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 40 |
| Rycina 4.1. Zależności pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego, a napięciem w kapilarze dla używanych buforów. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60 |
| Rycina 4.2. Przykładowe elektroferogramy otrzymane w wyniku rozdzielania DOX w zależności od pH buforu. Piki oznaczone jako NM pochodzą od znacznika obojętnego.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 60 |
| Rycina 4.3. Elektroferogramy otrzymane podczas rozdzielania związku DOX- FMOR w pH- 10-11,5. Piki oznaczone jako DOX-FMOR pochodzą od badanego związku, piki oznaczone jako NM pochodzą od znacznika obojętnego, natomiast dodatkowe piki mogą prawdopodobnie pochodzić od produktu rozpadu DOX-FMOR, którym może być DOX (A). Porównanie wartości ruchliwości elektroforetycznej DOX, DOX-FMOR i dodatkowego piku (B). W przedstawionych warunkach ruchliwość elektroforetyczna piku nieznanego związku i DOX jest prawie taka sama..... | 61 |
| Rycina 4.4. Zależność ruchliwości elektroforetycznej badanych antracyklin od pH środowiska wraz z krzywą dopasowania z zastosowaniem regresji nieliniowej. Podczas integracji wyników odrzucono dane uzyskane w pH 7, ze względu na tworzenie się par jonowych badanych związków z fosforanami wchodzącymi w skład buforu.....                                                                                                                                                                                                            | 64 |
| Rycina 4.5. Korelacja pomiędzy wartościami $pK_{a1}$ oraz $pK_{a2}$ dla badanych antracyklin oraz ich toksycznością w stosunku do 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wartości $ID_{50}$ zaczerpnięto z publikacji.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 66 |
| Rycina 4.6. Korelacja pomiędzy wartościami $\Delta pK_a$ dla badanych antracyklin oraz ich toksycznością dla 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wartości $ID_{50}$ zaczerpnięto z publikacji.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 67 |
| Rycina 4.7. Zależność pomiędzy napięciem, a natężeniem prądu elektrycznego w kapilarze, w temp. 30°C dla użytej mikroemulsji.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 68 |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Rycina 4.8. Przykładowy elektroferogram uzyskany w efekcie analizy MEEKC. Zaznaczone piki pochodzą kolejno od DMSO (znacznik EOF), karbamazepiny (substancja wzorcowa) oraz 1-fenylododekanu (znacznik mikroemulsji).....                            | 69 |
| Rycina 4.9. Krzywa wzorcowa zastosowana do wyznaczania $\log D_{pH10}$ dla nowych antybiotyków antracyklinowych. Krzywa przedstawia zależność eksperymentalnie wyznaczonej wartości $\log k$ od $\log D_{pH10}$ dla serii substancji wzorcowych..... | 70 |
| Rycina 4.10. Korelacja pomiędzy wartościami $\log P$ dla badanych antracyklin oraz ich toksycznością dla 4 linii ludzkich komórek nowotworowych. Wartości $ID_{50}$ zaczerpnięto z publikacji .....                                                  | 73 |
| Rycina 4.11. Rozdzielenie chromatograficzne 6 nowych związków pochodnych DOX i DAU...                                                                                                                                                                | 74 |
| Rycina 4.12. Rozdzielenie chromatograficzne 6 nowych związków pochodnych EDOX i EDAU. ....                                                                                                                                                           | 75 |
| Rycina 4.13. Zależność stężenia od czasu dla czterech nowych związków, pochodnych DOX i DAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala liniowa). ....                                                                                    | 79 |
| Rycina 4.14. Zależność stężenia od czasu dla czterech nowych związków, pochodnych DOX i DAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala półlogarytmiczna). ....                                                                           | 80 |
| Rycina 4.15. Zależność stężenia od czasu dla sześciu nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala liniowa).....                                                                                    | 83 |
| Rycina 4.16. Zależność stężenia od czasu dla sześciu nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU, po podaniu dożylnym oraz dootrzewnowym u myszy (skala półlogarytmiczna).....                                                                           | 84 |
| Rycina 4.17. Wykresy zależności pomiędzy przewidywanymi, a wyznaczonymi doświadczalnie wartościami $pK_{a1}$ , $pK_{a2}$ oraz $\log P$ dla badanych związków.....                                                                                    | 90 |

## 11 Spis tabel

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3.1. Skład roztworów buforowych oraz wartości pH zmierzone tuż po przygotowaniu oraz po 12 h analiz, na wejściu i na wyjściu z kapilary .....        | 35 |
| Tabela 3.2. Skład jakościowy i ilościowy kaset oraz droga podania związków u myszy .....                                                                    | 38 |
| Tabela 3.3. Napięcie przyłożone do kapilary oraz generowane natężenie prądu dla buforów używanych do wyznaczenia wykładnika stałej dysocjacji.....          | 44 |
| Tabela 3.4. Wybrane do analizy ilościowej przejścia jonowe wraz z parametrami detekcji dla poszczególnych analitów.....                                     | 51 |
| Tabela 4.1. Wyznaczone eksperymentalnie wartości $pK_a$ dla 16 badanych związków .....                                                                      | 65 |
| Tabela 4.2. Wyznaczone eksperymentalnie dla substancji wzorcowych wartości logP, $pK_a$ oraz logk.....                                                      | 70 |
| Tabela 4.3. Wartości ruchliwości efektywnej dla badanych związków w buforze o pH = 10, bez dodatku mikroemulsji.....                                        | 71 |
| Tabela 4.4. Wartości $\log D_{pH10}$ oraz logP wyznaczone z zastosowaniem techniki MEEKC wraz z wartościami logk .....                                      | 72 |
| Tabela 4.5. Krzywe wzorcowe oraz współczynniki determinacji dla nowych związków pochodnych DOX i DAU.....                                                   | 75 |
| Tabela 4.6. Krzywe wzorcowe oraz współczynniki korelacji dla nowych związków pochodnych EDOX i EDAU.....                                                    | 76 |
| Tabela 4.7. Dokładność, precyzja, odzysk, efekt matrycy oraz stabilność dla badanych związków, pochodnych DOX i DAU .....                                   | 77 |
| Tabela 4.8. Dokładność, precyzja, odzysk, efekt matrycy oraz stabilność dla badanych związków, pochodnych EDOX i EDAU .....                                 | 78 |
| Tabela 4.9. Parametry farmakokinetyczne pochodnych DOX i DAU, po jednorazowym podaniu dożylnym związków, w dawce 0,01mg/kg u myszy (n=4) .....              | 81 |
| Tabela 4.10. Parametry farmakokinetyczne nowych związków, pochodnych DOX i DAU, po jednorazowym podaniu dootrzewnowym, w dawce 0,2 mg/kg u myszy (n=4)..... | 81 |
| Tabela 4.11. Parametry farmakokinetyczne nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU po podaniu dożylnym, w dawce 0,01 mg/kg u myszy (n=4) .....                | 85 |

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 4.12. Parametry farmakokinetyczne dla nowych związków, pochodnych EDOX i EDAU po jednorazowym podaniu dootrzewnowym w dawce 0,2 mg/kg u myszy (n=4)..... | 86 |
| Tabela 4.13. Lipofilowość oraz właściwości kwasowo-zasadowe badanych związków przewidywane w warunkach <i>in silico</i> .....                                   | 88 |
| Tabela 4.14 . Parametry farmakokinetyczne badanych związków przewidywane w warunkach <i>in silico</i> .....                                                     | 89 |