

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Syntéza a biologické testování purinových
modulátorů funkcí nervové soustavy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Markéta Dokonalová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Markéta Dokonalová
Název práce:	Syntéza a biologické testování purinových modulátorů funkcí nervové soustavy
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	<p>Puriny mají řadu farmakologických účinků včetně efektů na nervovou tkáň. Cílem experimentální části bylo připravit knihovnu nových derivátů purinu kinetinu a otestovat jejich vliv na aberantní sestřih (vynechání exonu 20) pre-mRNA genu ELP1, který je příčinou dědičného neurodegenerativního onemocnění familiální dysautonomie. Test je založen na přepisu mRNA izolované z pacientských fibroblastů, PCR amplifikaci oblasti zahrnující exon 20 a srovnání množství ampliconů odpovídajících normální a patologické mRNA. Dva z připravených derivátů 16 a 17 efektivně zvyšovaly množství normálního transkriptu genu ELP1. Látky byly také testovány v cytokininových biotestech. Prezentovaná práce ukazuje potenciál purinových derivátů jako léčiv neurodegenerativních chorob. Mechanismus účinku aktivních látek je zatím neznámý a bude předmětem dalších studií.</p>
Klíčová slova:	kinetin, organická syntéza, familiární dysautonomie, sestřih pre-mRNA, sestřihová nemoc
Počet stran:	73
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Markéta Dokonalová
Title of thesis:	Synthesis and biological screening of purines modulating nervous system functions
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
The year of presentation:	2019
Abstract:	<p>Purines have a spectrum of pharmacological activities including effects on neuronal tissue. The aim of this study was the synthesis of a library of new derivatives of purine kinetin and testing of their effect on aberrant splicing (exon 20 skipping) of ELP1 pre-mRNA that is the cause of the hereditary neurodegeneration familial dysautonomia. The assay is based on the transcription of mRNA isolated from patient-derived fibroblasts, PCR amplification of the sequence flanking exon 20 and a comparison of the amounts of the amplicons corresponding to the normal and aberrant transcript. Two of 16 and 17 synthesized derivatives increased levels of the normal ELP1 transcript. The compounds were also tested in cytokinin biotests. The study demonstrates the potential of kinetin derivatives for the treatment of neurodegenerative diseases. The action mechanism is unknown, and its elucidation will be the aim of the follow-up studies.</p>
Keywords:	kinetin, organic synthesis, familial dysautonomia, pre-mRNA splicing, splicing disease
Number of pages:	73
Number of appendices:	1
Language:	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho přátelský přístup, ochotu pomoci, obětavost, cenné rady a za trpělivé a odborné vedení při práci v laboratoři a při sepisování této práce. Poděkování patří i celému kolektivu laboratoře organické syntézy na Oddělení chemické biologie a genetiky CRH za poskytnuté cenné rady a vstřícnost. Dále děkuji Mgr. Jiří Vollerovi Ph.D., Mgr. Barbaře Makové a Kateřině Faksové za asistenci a pomoc při testování na lidských buňkách, Jarmile Balonové a Mgr. Karolíně Wojewodové za provedení standardních cytokininových biotestů, Mgr. Haně Omámikové za změření a zpracování HPLC/MS dat. Tato práce byla vypracována za finanční podpory grantu IGA_PrF_2019_018.

OBSAH

Seznam zkratek.....	8
1 Úvod a cíle práce.....	10
2 Role cirkadiánního rytmu.....	12
2.1 Modelové organismy cirkadiánního rytmu.....	13
2.2 Architektura cirkadiánního rytmu u savců.....	20
3 Patofyziologie spojená s cirkadiánními rytmy.....	21
4 Regulace cirkadiánního rytmu.....	25
4.1 Klíčové proteiny hodinových genů.....	26
4.2 Modulace hodin prostřednictvím nukleárních receptorů.....	27
4.3 Modulace hodin prostřednictvím kinas.....	30
5 Materiál a metody.....	33
5.1 Chemikálie.....	33
5.2 Biologický materiál.....	34
5.3 Metody.....	34
5.4 Syntéza.....	35
5.4.1 Syntéza meziproduktů pomocí Mitsunobu alkylace (I-IX).....	35
5.4.2 Alkylace N9-pozice s použitím K_2CO_3 jako báze.....	36
5.4.3 Nukleofilní substituce v poloze C6 – standardní postup.....	36
5.4.4 Nukleofilní substituce v poloze C6 pomocí mikrovlnného záření.....	37
5.5 Biologické testování.....	37
5.5.1 Testování vlivu na cirkadiánní rytmus.....	37
5.5.2 mRNA sestřihový test.....	38
5.5.3 Standardní cytokininové biotesty.....	40
6 Výsledky a diskuze.....	41
7 Závěr.....	53

8	Seznam literatury.....	54
9	Přílohy	64
9.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených látek	64

Seznam zkratek

BAP	6-benzylaminopurin
5-HT _{2C}	5-hydroxytryptaminový receptor 2C
bHLH	basic helix-loop-helix-PAS
bs	široký singlet
<i>cca1</i>	clock associated 1
CK1	kasein kinasa 1
<i>clk</i>	clock
CRSDs	spánkové poruchy, circadian rhythm sleep disorders
<i>cry</i>	krytochrom
CT	cirkadiánní čas
<i>cyc</i>	cycle
d	dublet
DBT	doubletime
dd	dublet dubletu
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
DSPD	zpožděná fáze spánku, Delayd Sleep-Wake Phase Disorder
dt	dublet tripletu
ekv.	ekvivalent
ESI+-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód
EtOAc	ethyl-acetát
FAD	flavinadenindinukleotid
FASPS	předsunutá fáze spánku, Familial Advanced Sleep Phase Syndrom
<i>frq</i>	frequency
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ipRGC	fotosenzitivní gangliové buňky
ISWRD	nepravidelný rytmus spánku, Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder
<i>J</i>	interakční konstanta
KIN	kinetin, 6-furfurylaminopurin
<i>lhy</i>	late elongated hypocotyl
m	multiplet

MW	mikrovlnná syntéza
N24SWD	volně běžící rytmus, Non-24-Hour Sleep Wake Disorder
NCOR	nuclear receptor corepressor
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>per</i>	period
PPh ₃	trifenylofosfin
PPh ₃ O	trifenylofosfinoxid
ppm	parts per million
PRR	pseudo-response regulátor
RT-PCR	reverzní transkripce s polymerázovou řetězovou reakcí
s	singlet
SCN	suprachiasmatická jádra
SWD	porucha spánku a bdění při směnném provozu, Shift-Work Disorder
T	délka periody
t	triplet
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
<i>tim</i>	timeless
TLC	tenkovrstevná chromatografie
<i>toc1</i>	timing of CAB expression 1
TTF1	transkripční/translační zpětnovazebná smyčka
<i>wc-1</i>	white collar 1
<i>wc-2</i>	white collar 2
WCC	white collar komplex
ZTL	zeitlupe
δ	chemický posun

1 Úvod a cíle práce

Vzhledem ke zvyšujícím se nárokům společnosti dochází ke změnám návyků a chování celé populace, například z důvodů práce na směny, popřípadě stále častějšího cestování za krátkou dobu přes více časových pásem. Tyto změny životního stylu mohou vést k rozvoji řady onemocnění spojených s poruchami v cirkadiánním rytmu. Příčinou může být, buď dlouhodobý nesoulad mezi interními biologickými hodinami a vnějšími časovými signály projevující se únavou, nespavostí ve společensky přijatelnou dobu, nebo mutace v klíčových genech cirkadiánního rytmu vedoucí k poruše základních drah biologických hodin. Cirkadiánní rytmy se podílejí na regulaci řady fyziologických procesů, proto dysfunkce cirkadiánních hodin může vést k onemocněním napříč celým organismem. Důsledkem tohoto zjištění začíná být věnována stále větší pozornost studiu dějů cirkadiánního rytmu.

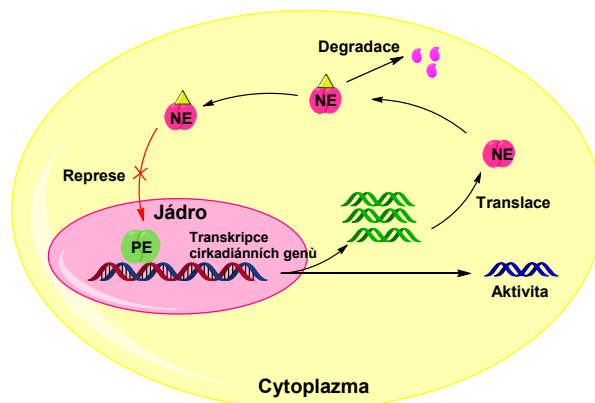
Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na vypracování literární rešerše na téma cirkadiánní rytmus savců/člověka se zaměřením na jeho poruchy a terapeuticky aktivní látky modulující jeho dynamiku. Cílem experimentální části, byla příprava a charakterizace knihovny purinových derivátů a ověření jejich schopnosti modulovat cirkadiánní rytmy v reportérové linii. Vzhledem k zajímavým účinkům purinových derivátů na funkci nervové soustavy byly nasyntetizované deriváty také otestovány jako potenciální léčivo familiární dysautonomie. Jedná se o neurologickou poruchu způsobenou aberantním sestřihem pre-mRNA genu ELP1, a je známo, že některé cytokininy a jejich deriváty vykazují schopnost tuto poruchu korigovat. Dále byla jejich aktivita testována v senescenčním a tabákovém kalusovém biotestu s cílem ověření jejich působení v rostlinách.

Teoretická část

2 Role cirkadiánního rytmu

Biologické hodiny jsou základem každého žijícího organismu. Jedná se o systém specifických molekul (proteinů), který organismům pomáhá přizpůsobit se opakovaným ekologickým a geofyzikálním vlivům jako je sluneční cyklus, příliv a odliv, rotace Měsíce a střídající se roční období (Reddy a Rey, 2014). Rozdělují se na ultradiánní (délka periody $T < 20$ hod), cirkadiánní ($T = 20 - 30$ hod) a infradiánní rytmus ($T > 30$ hod) (Schibler a Naef, 2005).

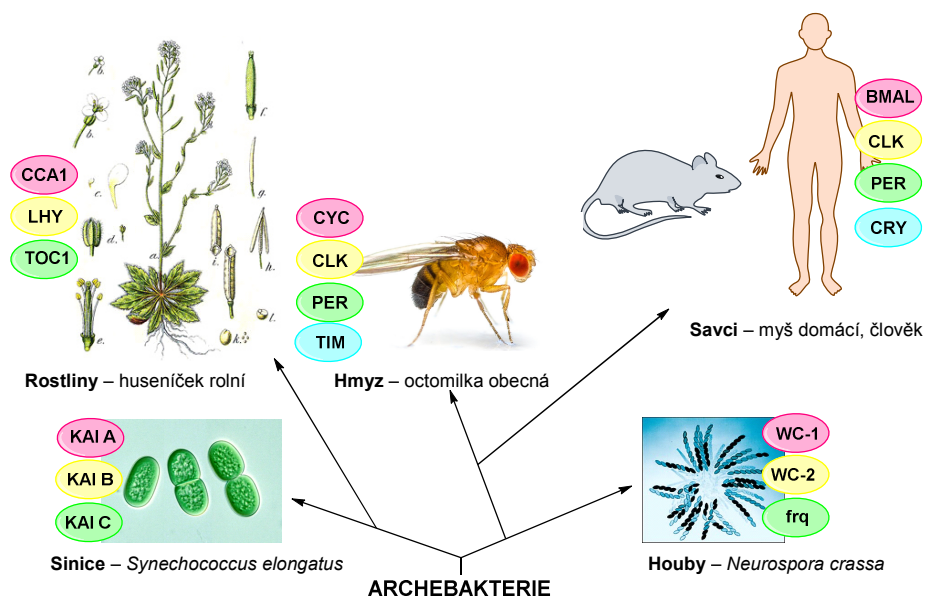
Cirkadiánní rytmus hraje klíčovou roli mezi ostatními biologickými hodinami, protože umožňuje organismům přizpůsobit se střídání dne a noci, respektive období s vyšší a nižší fyziologickou a biologickou aktivitou (Reddy a Rey, 2014). Název cirkadiánní pochází z latinského „*circa diem*“, neboli okolo dne (Partch a kol., 2014). Jedná se o buněčný časovací mechanismus, který koordinuje fyziologii a chování organismů během 24 hod v závislosti na vnějším a vnitřním prostředí s cílem dosáhnout časové homeostaze (Reddy a Rey, 2014). Prakticky všechny organismy citlivé na světlo od cyanobakterií až k člověku mají cirkadiánní hodiny (Levi a Schibler, 2007), které jsou generovány intracelulárními zpětnovazebnými smyčkami (Pett a kol., 2016). Tento mechanismus byl poprvé objeven u mouchy *Drosophila melanogaster* a později byl pojmenován jako transkripční/translační zpětnovazebná smyčka (TTFL) (Hardin a kol., 1990). TTFL (Obr. 1) se stala univerzálním modelem, který byl identifikován ve všech modelových systémech, které byly doposud studovány (Brown a kol., 2012). S tím rozdílem, že každý organismus má vlastní soubor „časových“ genů, které se tohoto mechanismu účastní (Reddy a Rey, 2014). Model transkripční zpětné vazby se skládá ze dvou klíčových komponent: pozitivní a negativní, které se navzájem ovlivňují (Dunlap, 1999). Pozitivní element je složen z genů kodujících transkripční aktivátory, zatímco negativní element je tvořen geny, kódujícími transkripční represory (Schibler a Naef, 2005). Transkripční aktivátor indukuje expresi „časového“ genu za vzniku proteinu, který se akumuluje v buňce a při dosažení prahové hodnoty se stává represorem a dochází k blokaci exprese časového genu (Harmer a kol., 2001). Zásadní úlohu ve zpětnovazebné smyčce také představují postranslační modifikace klíčových proteinů, a to především fosforylace. Mezi další modifikace, které jsou zapojeny do regulace nesčetného množství procesů řídících cirkadiánní rytmus, patří také acetylace, methylylace a glykosylace (Reddy a Rey, 2014).



Obr. 1. Model transkripční/translační zpětnovazebné smyčky u eukaryot (TTFL). Pozitivní element (PE) indukuje expresi cirkadiálních genů za vzniku proteinů, které při dosažení prahové hodnoty aktivují negativní element (NE), který se přesouvá do jádra a blokuje expresi cirkadiálních genů. Upraveno dle Reddy a kol., 2014.

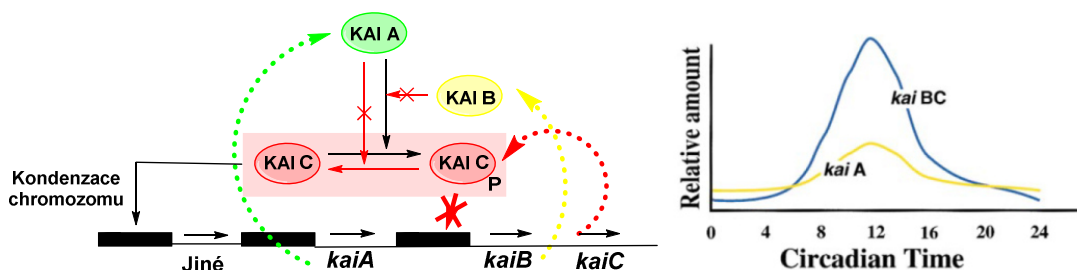
2.1 Modelové organismy cirkadiálního rytmu

Základní rysy cirkadiálního rytmu jsou společné pro všechny fotosensitivní organismy, které se nacházejí na různých místech stromu života (Obr. 2) a jednotlivé molekulární základy byly popsány od nejjednodušších po ty nejkompexnější. Základními modelovými organismy se staly jednobuněčná sinice (*Synechococcus elongatus*), jednobuněčná houba (*Neurospora crassa*), u rostlin huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), u živočichů ovocná muška octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) a u savců myš domácí (*Mus musculus*).



Obr. 2. Fylogenetický strom modelových organismů cirkadiálního rytmu s hlavními „časovými“ geny. Upraveno dle Bhadra a kol., 2017.

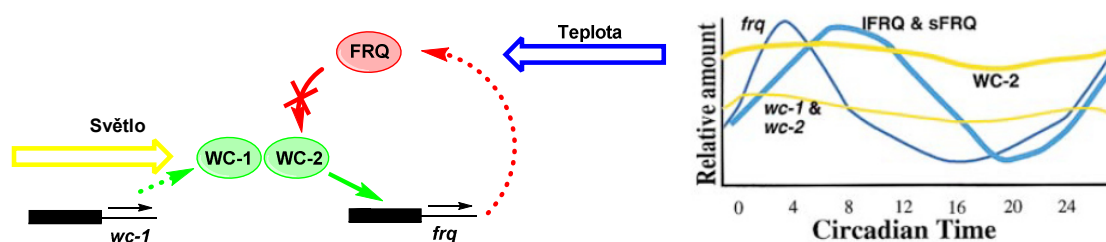
Sinice (kmen Cyanobacteria), fotosyntetická prokaryota, jsou nejjednodušší organismy, o nichž je známo, že obsahují cirkadiální hodiny (Iwasaki a Kondo, 2004). Ty se podílejí na regulaci buněčného dělení, fixaci dusíku, fotosyntéze, syntéze sacharidů a dýchání (Golden a kol., 1997). Základem cyanobakteriálního rytmu jsou 3 geny (*kaiA*, *kaiB* a *kaiC*), které byly identifikovány pomocí genetického screeningu mutantů *S. elongatus* (Kondo a kol., 1994). Klíčovou úlohu v regulaci cirkadiálního rytmu představuje *kaiC*, jeho fosforylační status a rychlost degradace (Obr. 3). Fosforylovaný *kaiC* je pravděpodobně v podobě hexameru schopen se vázat na DNA, a způsobovat tak rytmické a komplexní změny na úrovni chromozomu, které následně ovlivňují transkripční aktivitu všech promotorů na chromosomu. *KaiA* je pozitivním elementem rytmicity, kdy přispívá k fosforylaci *kaiC* a inhibuje jeho defosforylaci, zatímco *kaiB* inhibuje funkci *kaiA* (Xu a kol., 2003).



Obr. 3. Model cirkadiálního rytmu a časová regulace *kai* genů. Model zobrazuje časové geny a jejich odpovídající proteiny zobrazeny v kruhu, kdy zelená barva znázorňuje pozitivní element transkripce, který indukuje expresi genů, zatímco červená znázorňuje negativní element, který inhibuje expresi genů. *KaiA* inhibuje defosforylaci *kaiC*, zatímco *kaiB* inhibuje *kaiA*. V grafu je vykreslen expresní profil *kaiA* (žlutě) a operonu *kaiBC* (modře) v čase. Transkripce těchto genů je rytmická a řídí se cirkadiálním časem (CT), CT 0 odpovídá subjektivnímu svítání, CT 12 subjektivnímu soumraku. Model cirkadiálních hodin upraven dle Harmer a kol., 2001 a Xu a kol., 2003. Graf byl převzat z Dunlap a kol., 1999.

Neurospora crassa je vláknitá houba patřící do oddělení vřeckovýtusných hub (Ascomycota). Stala se důležitým milníkem v objasnění základní cirkadiální fyziologie a molekulární biologie (Catcheside, 2000). Byly zde identifikovány stěžejní „hodinové“ geny, které vedly k pochopení funkce cirkadiální zpětnovazebné smyčky (Dunlap a Loros, 2004). Základem se stal prvotně identifikovaný hodinový gen *frequency* (*frq*), který tvoří centrální komponentu zpětnovazebné smyčky (Feldman a Hoyle, 1973). Jedná se o negativní element, jehož exprese je regulována heterodimerním aktivátorem složeným ze dvou komponent: white collar-1 (WC-1) a white collar-2 (WC-2). Jedná se o transkripční faktory patřící do rodiny GATA, obsahující zinc finger DNA vazebnou doménu, které spolu interagují prostřednictvím PAS domén a vytváří aktivní transkripční faktor – white collar komplex

(WCC). WCC spouští expresi *frq* genu v pozdní části subjektivní noci s vrcholem na počátku subjektivního rána (Obr. 4) (Baker a kol., 2012). WC-1 byl navíc u *N. crassa* identifikován jako fotoreceptor modrého světla díky obsahu flavinadenindinukleotidu (FAD) jako kofaktoru, a stává se tak prostředníkem v regulaci cirkadiálního rytmu mezi externím světelným impulsem a transkripční aktivací cílových genů (Froehlich a kol., 2002). K inaktivaci exprese *frq* dochází fosforylací WCC v době subjektivního pozdního dne s následným poklesem hladin FRQ proteinu (Schafmeier a kol., 2005) prostřednictvím jeho degradace v 26S-proteasomu (He a kol., 2003). Kromě světla má na cirkadiální aktivitu u *N. crassa* vliv i teplota, a to především na FRQ a míru jeho postranlační modifikace (Baker a kol., 2012).



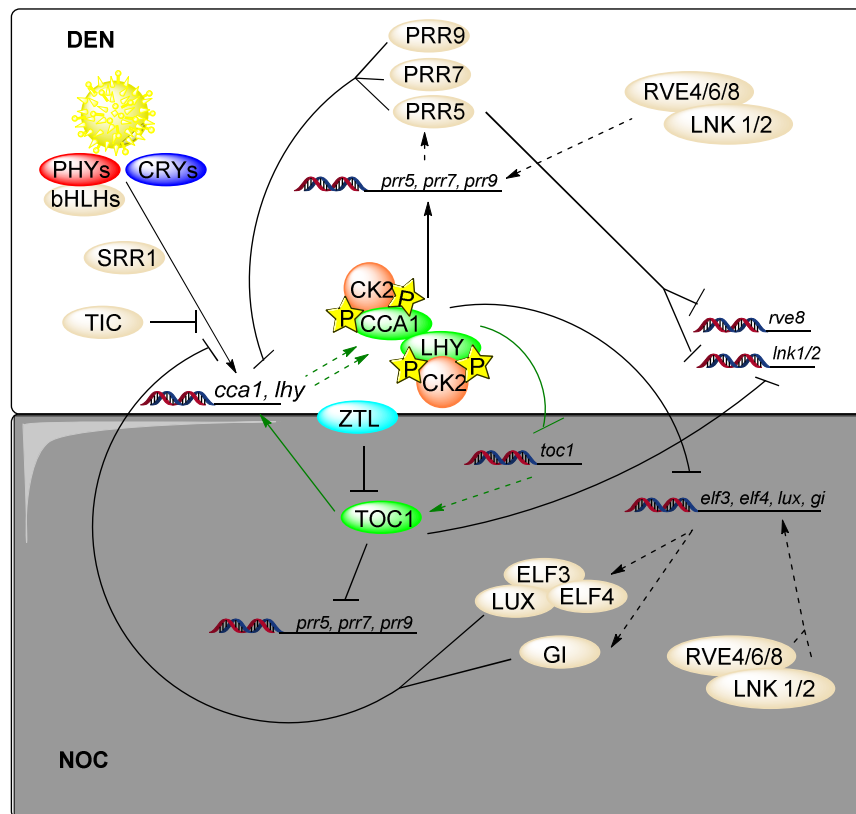
Obr. 4. Model cirkadiálních hodin a časová regulace hlavních genů v *Neurospore*. Pozitivní faktory oscilační smyčky jsou znázorněny zeleně, negativní červeně. Geny jsou vyobrazeny malými písmeny, proteiny velkými. Transkripční faktory WC-1 a WC-2 po světelném impulsu indukují expresi *frq* genu, který zpětně inhibuje expresi *wc* genů. Teplota moduluje množství exprimovaného FRQ proteinu. Graf vykresluje časovou závislost množství cirkadiálních proteinů. Žlutě jsou označeny pozitivní elementy, modře negativní elementy. Model cirkadiálních hodin upraven dle Harmer a kol., 2001. Graf převzat z Dunlap a kol., 1999.

Modelovým organismem rostlin pro cirkadiální rytmus se stal huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Cirkadiální hodiny v *A. thaliana* regulují řadu biologických procesů jako rytmický pohyb listů, otevírání květů, elongaci stonků a kořenů, biosyntézu metabolitů a hormonů, reakci na environmentální stres a obranu proti patogenům (Nakamichi, 2011). V průběhu let bylo v *A. thaliana* identifikováno více jak 25 genů spojených s funkcí cirkadiálního rytmu (Tabulka 1).

Tabulka 1. Přehled genů zapojených do cirkadiánního rytmu u *Arabidopsis thaliana*. Upraveno dle Nakamichi a kol., 2011.

Gen	Fenotyp v rostlině	Molekulární funkce
<i>cca1</i>	krátká perioda	transkripční faktor
<i>lhy</i>	krátká perioda	transkripční faktor
<i>ckb3/4</i>	x	β podjednotka CK2
<i>prr9/7</i>	dlouhá perioda	transkripční faktor
<i>prp5</i>	krátká perioda	transkripční faktor, interakce s <i>toc1</i>
<i>pr3</i>	krátká perioda	interakce s <i>toc1</i>
<i>toc1</i>	krátká perioda	transkripční faktor
<i>prmt5</i>	dlouhá perioda	methyl transferasa
<i>ztl</i>	dlouhá perioda	receptor modrého světla, F-box
<i>fkf1</i>	x	receptor modrého světla, F-box
<i>lkp2</i>	x	receptor modrého světla, F-box
<i>gi</i>	snížení robustnosti	interakce s <i>ztl</i>
<i>lux</i>	arytmický v konstantním světle	transkripční faktor
<i>elf3/4</i>	arytmický v konstantním světle	transkripční faktor
<i>tej</i>	dlouhá perioda	poly-(ADP-ribosa)-glykohydrolasa
<i>jmjd5</i>	krátká perioda	histon demethylasa

V *A. thaliana* jsou cirkadiánní hodiny složeny ze tří vzájemně propojených TTFL (centrální, denní a noční). Centrální smyčku tvoří CCA1, LHY a TOC1, kódované hlavními geny *clock associated 1 (cca1)*, *late elongated hypocotyl (lhy)* a *timing of CAB expression 1 (toc1)* (Romanowski a Yanovsky, 2015). Tyto geny tvoří základ zpětnovazebné smyčky (Obr. 5), kdy *cca1* a *lhy* jsou zodpovědné za potlačení exprese *toc1* (Bhadra a kol., 2017). Během dne komplex transkripčních faktorů CCA1/LHY aktivuje transkripci pseudo-response regulátorů (PRR) a potlačuje expresi nočního proteinu TOC1. PRR jsou represory transkripce s DNA vazebnou aktivitou a mimo jiné negativně ovlivňují expresi *cca1* a *lhy*. Během noci naopak dochází k expresi TOC1, inhibici akumulace CCA1/LHY a tvorbě komplexu ELF3, ELF4 a LUX, který potlačuje expresi *lux*, *elf4*, *gi*, *toc1* a *prp9*. Významnou roli v regulaci hladiny TOC1 pak představuje ZEITLUPE (ZTL), který zajišťuje jeho degradaci v 26S-proteasomu (Romanowski a Yanovsky, 2015).

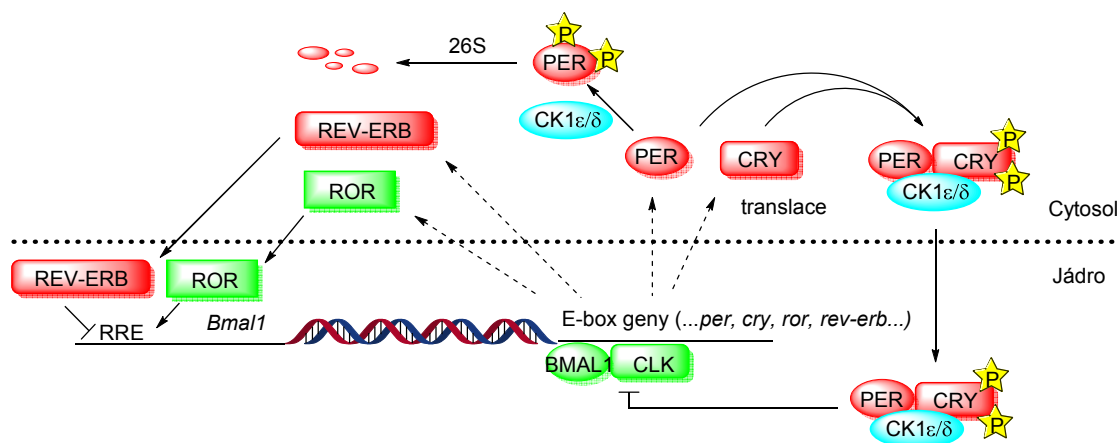


Obr. 5. Molekulární podstata TTFL u *A. thaliana*. Expresе genů (znázorněny malými písmeny, italikou) je naznačena přerušovanou čarou, zatímco aktivita proteinů (znázorněny velkými písmeny) je naznačena plnou čarou. TTFL *Arabidopsis* se skládá z centální smyčky zahrnující TOC1, CCA1 a LHY, denní smyčky, která se skládá z pseudo-response regulátorů (PRR5, 7, 9) a nočního komplexu ELF3,4, LUX a pozitivních elementů REV4, 6, 8 a LNK1, 2. Obrázek upraven dle McClung a kol., 2006.

Drosophila melanogaster je hmyz s proměnou nedokonalou, u něhož cirkadiánní rytmy řídí každodenní chování stejně tak jako pohyb, vykuklení (eklozi), kladení vajec, námluvy nebo citlivost na chuť a čich. V případě *D. melanogaster* byly identifikovány dva hlavní geny *period* (*per*) a *timeless* (*tim*), zodpovědné za správnou funkci cirkadiánního rytmu (Bhadra a kol., 2017). Geny *per* a *tim* představují negativní elementy zpětnovazebné smyčky (Obr. 6), jejichž proteiny PER a TIM inhibují svoji vlastní transkripci. K nárůstu proteinů TIM a PER v cytoplazmě dochází pouze v noci (Dunlap, 1999). Protein TIM je fotosenzitivní a pro stabilizaci vytváří heterodimer s PER, kde takto vytvořený komplex může vstoupit do jádra (Hardin, 2004). Při nedostatku TIM je PER fosforylován kinasou CK1ε, která je regulována proteinem DOUBLETIME (DBT), a degradován v proteasomu. Zatímco TIM je regulován cirkadiánním fotoreceptorem CRY (krytochrom), který v závislosti na světle řídí degradaci TIM, a kinasovou aktivitou proteinu SHAGGY, který zodpovídá za vstup komplexu PER/TIM do jádra. Po translokaci komplexu PER/TIM do jádra dochází k interakci s dimerem CLK/CYC přes podjednotky PER a CLK. Tato interakce vede

rytmu ani při vyřazení genu *mtim* z funkce (Gotter a kol., 2000). Součástí negativní zpětné vazby u savců jsou geny *kryptochrom mcry1, 2*, jejichž proteiny mCRY1, 2 váží chromofory pro modré světlo pterin a flavin, a tím promítají světelnou informaci do cirkadiálních hodin. mCRY ve spolupráci s mPER inhibují komplex mCLK/BMAL1 stejně jako v případě *drosophili* komplex dPER/dTIM inhibuje dCLK/CYC (Harmer a kol., 2001).

Mechanismus intracelulárních hodin u savců se skládá z opakující se pozitivní a negativní transkripční zpětné vazby zahrnující klíčové komponenty (Obr. 7), které se rozdělují na pozitivní CLK/BMAL1 a ROR a negativní PER/CRY a REV-ERB (Reddy a Rey, 2014). Důležitou roli v řízení TTFL hrají kasein kinasy a fosfatasy (kasein kinasy: CKI α , CKI δ a CKI ϵ , fosfatasy: PP1, PP5), které regulují lokalizaci a stabilitu integrálních hodinových proteinů (Partch a kol., 2014).



Obr. 7. Molekulární oscilátor cirkadiálního rytmu u savců. Expresí genů (znázorněny malými písmeny, italikou) je naznačena přerušovaná čarou, zatímco aktivita proteinů (znázorněny velkými písmeny) je naznačena plnou čarou. Zeleně zobrazené proteiny BMAL1/CLK aktivují expresi genů *per/cry* a *rev-erb/ror*. Červeně zobrazené exprimované proteiny PER/CRY a REV-ERB zpětně inhibují expresi genů *bmal1/clk*. Regulační faktory: kasein kinasy CKI α - ϵ , P = fosforylace.

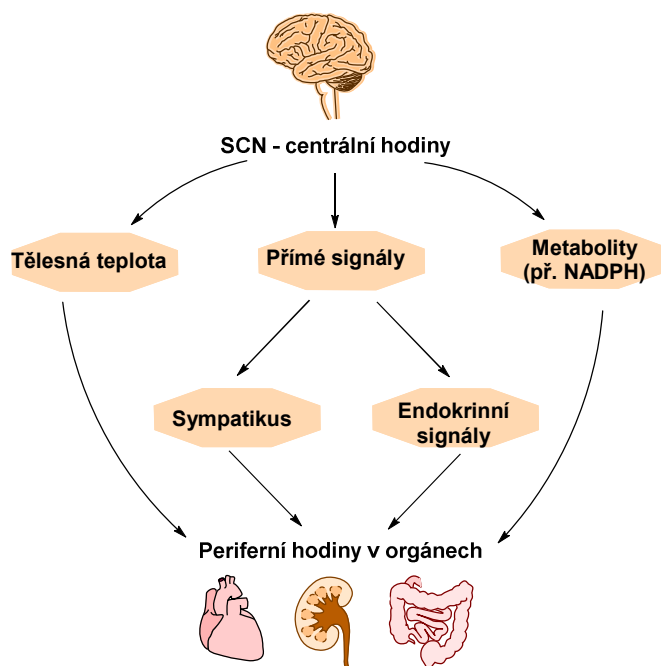
Jádro TTFL je tvořeno dvěma hlavními nezávislými regulačními smyčkami CLK/BMAL1-PER/CRY a CLK/BMAL1-REV-ERB/ROR, které jsou navzájem propojeny. CLK a BMAL1 jsou heterodimerními transkripčními faktory proteinové domény basic helix-loop-helix-PAS (bHLH) a aktivují transkripci represorů *per* a *cry* (Huang a kol., 2012). PER a CRY heterodimerizují v cytoplazmě, odkud se přesouvají do jádra, kde inhibují transkripční aktivitu CLK/BMAL1. Po ukončení inhibice vlivem posttranslačních kroků (fosforylace, ubiquitinace) jsou proteiny PER a CRY degradovány v proteasomu (Partch a kol., 2014). Kasein kinasy CKI δ a CKI ϵ a fosfatasy PP1 a PP5 regulují funkci komplexu PER/CRY a to tak, že rozhodují buď o vstupu komplexu do jádra nebo o jeho degradaci (Lee a kol., 2011). Represe

na CLK/BMAL1 se uvolní a cyklus může začít od začátku s 24 hod. periodicitou (Takahashi, 2017). V případě druhé regulační smyčky heterodimer CLK/BMAL1 aktivuje transkripci nukleárních receptorů REV-ERB a ROR, které kompetují o vazebné místo na promotoru, přičemž ROR spouští expresi *bmal1*, zatímco REV-ERB ji inhibuje (Bhadra a kol., 2017).

2.2 Architektura cirkadiánního rytmu u savců

V případě savců, tedy i člověka, je cirkadiánní systém organizován do tří hlavních fyziologických komponent: *vstupní dráhy*, pomocí nichž jsou získávány informace z vnějšího prostředí (především světlo), které vstupují do *centrálních hodin v mozku* a nakonec *výstupní dráhy*, přes které centrální hodiny regulují cirkadiánní rytmy (Lowrey a Takahashi, 2004).

Molekulární hodiny savců vykazují hierarchické uspořádání (Obr. 8). Jsou organizovány do centrálních hodin uložených v párovém orgánu ve středním hypotalamu, v tzv. suprachiasmatických jádrech (SCN), která se nacházejí v blízkosti optického chiazmatu (Ko a Takahashi, 2006).



Obr. 8. Komplexní architektura cirkadiánního rytmu u savců. Schéma upraveno Dibner a kol., 2010.

SCN se skládá z přibližně 20 000 neuronů, které tvoří vysoce sjednocenou cirkadiánní síť (Mohawk a Takahashi, 2011). Tyto hlavní hodiny jsou jediné molekulární hodiny pro příjem světelných signálů ze sítnice, která synchronizuje vnitřní čas k vnějšímu slunečnému dni (Dibner a kol., 2010). Ve vnitřní vstřevě sítnice se nachází skupina

fotosensitivních gangliových buněk (ipRGC, 1-2 %), které obsahují fotopigment melanopsin a reagují na světelnou stimulaci. Signál z těchto buněk je veden retinohypotalamickým traktem přímo k hlavním hodinám v SCN, kde může ovlivňovat biologické hodiny, ať už jejich zpoždění či urychlení (Lowrey a Takahashi, 2011). SCN poté vysílá rytmické informace do buněk v jiných částech mozku a do periferních orgánů prostřednictvím různých výstupů (Dibner a kol., 2010). Patří mezi ně neuronální spojení, endokrinní signály (především hormon melatonin), metabolity a rytmy tělesné teploty. Dohromady se jedná o složitý systém zajišťující časovou koordinaci s vnějším i vnitřním prostředím (Stratmann a Schibler, 2006).

3 Patofyziologie spojená s cirkadiánními rytmy

Cirkadiánní rytmy člověka ovlivňuje prostředí, ve kterém žije (sociální a fyzické aktivity, střídání světla a tmy). Lidé se řadí mezi denní bytosti, jejichž biologické hodiny jsou přizpůsobeny jejich fyziologickým činnostem. Fyziologické funkce spojené s aktivitou se dějí ve dne, zatímco funkce spojené s odpočinkem v noci. Nesoulad mezi načasovanými cirkadiánními hodinami a vnějším prostředím (jet lag, práce na směny) nebo dysfunkce cirkadiánních hodin vede ke spánkovým poruchám (Tabulka 2) (CRSDs, neboli circadian rhythm sleep disorders).

Tabulka 2. Dělení poruch cirkadiánního rytmu dle Mezinárodní klasifikace poruch spánku.

Poruchy cirkadiánního rytmu

- Zpožděná fáze spánku (Delayed Sleep-Wake Phase Disorder)
 - Předsunutá fáze spánku (Familial Advanced Sleep Phase Syndrome)
 - Nepravidelný rytmus spánku a bdění (Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder)
 - Volně běžící rytmus (Non 24-hour Sleep-Wake Rhythm Disorder)
 - Porucha spánku a bdění při směnném provozu (Shift Work Disorder)
 - Porucha spánku a bdění při posunu časových pásem (Jet Lag Disorder)
 - Poruchy cirkadiánního rytmu jiné příčiny
-

Mezi poruchy cirkadiánního rytmu patří onemocnění „zpožděná fáze spánku“ (Delayed Sleep-Wake Phase Disorder, DSPD). DSPD je charakterizováno chronickou neschopností usnout a probudit se v sociálně přijatelných časech (více jak 2 hodiny zpoždění nástupu spánku oproti konvencím). Pacienti obvykle usínají mezi 1 a 6 ráno a vstávají v brzkém odpoledni. Dochází u nich ke snížení pracovního výkonu v ranních hodinách vlivem pocitu únavy, ospalosti a nesoustředěnosti (Zee a Vitiello, 2009). Prevalence onemocnění se udává mezi 0,2 až 10 % s častějším výskytem u dospívajících a mladých dospělých (Crowley a Carskadon, 2010). Diagnóza DSPD se provádí pomocí pečlivého zaznamenávání historie spánku do spánkových deníků

po dobu nejméně 7 dní, pomocí vyšetření aktigrafie, kdy se sleduje pohyblivost pacienta během spánku a bdění (Zee a Vitiello, 2009). Jako vhodná terapie se osvědčila kombinace fototerapie v ranních hodinách v délce dvou hodin 2 - 3 hod před přirozeným probuzením (Smith a kol., 2009) s podáváním melatoninu (0,5 – 5 mg) v podvečerních hodinách (5 – 6 hod před dobou usnutí) (Paul a kol., 2011).

Opakem DSPD je „předsunutá fáze spánku“ (Familial Advanced Sleep Phase Syndrome, FASPS), která je popisována dřívějším příchodem spánku o více než 2 hodiny oproti konvencím. Zásadní roli u tohoto onemocnění mají genetické faktory, kdy mutace genů *per2* a kasein kinasy 1 δ vede ke zkrácení denní doby (Xu a kol., 2005). Jedinci s FASPS jsou obvykle ospalí mezi 18:00 a 21:00 a probouzí se v časovém rozmezí 2:00 - 5:00. Obvykle se potýkají s denní spavostí především v pozdních odpoledních hodinách, a dále mají problémy s udržením spánku (Zee a kol., 2013). FASPS je méně častá než DSPD s prevalencí okolo 1 %. Onemocnění se spíše objevuje v pozdějším věku (Dodson a Zee, 2010). Diagnostika probíhá stejně jako u DSPD. Primární léčba FASPS zahrnuje časovanou expozici světla nejčastěji od 19:00 do 21:00 s možností podání hypnotik pro zlepšení nespavosti (Zee a kol., 2013).

Nepravidelný rytmus spánku neboli Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder (ISWRD) je charakterizován časovou disorganizací spánku a bdění (Thorpy, 2012). Pacienti s ISWRD mají celkovou dobu spánku zachovanou, ale rozdělenou do 3 a více kratších intervalů, trvajících od 1 do 4 hodin (Zee a kol., 2013). Nejdelší interval spánku se obecně vyskytuje mezi 2:00 a 6:00 hodinou ráno. ISWRD je běžnější pro starší pacienty s demencí nebo pro pacienty, kteří jsou dlouhodobě umístěni v nemocnicích a sociálních zařízeních. Rizikovým faktorem není věk samotný, ale s věkem spojená neurologická a psychiatrická onemocnění, například Alzheimerova choroba (Zee a Vitiello, 2009). Nejúčinnější terapií je expozice světlem každé ráno po dobu 2 hodin. Důležité je vytvořit dostatek sociálních a fyzických aktivit během dne a dodržovat pravidelný rytmus spánku (Zee a kol., 2013).

Volně běžící rytmus neboli Non-24-Hour Sleep-Wake Disorder (N24SWD) je další známou poruchou cirkadiálních hodin, které nejsou synchronizovány s vnějším prostředím, především světlem. Dochází k chronickému opakovanému zpoždování doby usnutí a probuzení. Nejčastěji touto poruchou trpí nevidomí, protože u nich došlo k výraznému snížení nebo úplné ztrátě vnímání světla (Hartley a kol., 2018). Další možnou příčinou poruchy může být mutace kasein kinasy 1 ϵ (CK1 ϵ), případně desynchronizace působení melatoninu (Takano a kol., 2004). Diagnostika onemocnění je velice náročná, díky nespecifickým příznakům jako je únava a nadměrná denní

spavost. Pravidelný denní rytmus (načasování jídel, plánované činnosti, pravidelná fyzická aktivita) je důležitou součástí léčby pacienta spolu s podáváním melatoninu 1 hodinu před spaním (Kanathur a kol., 2010).

Mezi častou přechodnou poruchou cirkadiálního rytmu patří porucha spánku a bdění při posunu přes časová pásma, známější pod názvem jet lag (letová dysrytmie, pásmová nemoc). Jet lagem obvykle trpí cestující, kteří přelétají přes 3 a více časových pásem, kdy dochází k desynchronizaci vnitřních cirkadiálních hodin jedince s časem v místě cílové destinace (Cingi a kol., 2018). Závažnost poruchy souvisí nejen s počtem překročených časových pásem, ale i se směrem cestování. Obecně cesty na východ jsou tolerovány hůře než cesty na západ, protože při cestování na východ dochází k fázovému zpoždění a dny jsou z pohledu cestujícího kratší. Lidé, kteří letí na západ, upravují své rytmy rychleji (1,5 hod za 24 hod) než lidé letící na východ (1 hod za 24 hod). Z tohoto důvodu jsou lety na západ plánovány ve dne, zatímco na východ v noci (Bjorvatn a Pallesen, 2009). Rychlost resynchronizace vnitřních hodin klesá s přibývajícím věkem (Moline a kol., 1992). Příznaky a trvání jet lagu jsou pro každého individuální. K odeznění příznaků může dojít v rámci jednoho dne, typicky několika dní (4 – 6), popřípadě až týdnů. Nejběžnější symptomy jsou různé poruchy spánku, ať už nespavost v noci, únava přes den, fragmentace spánku, brzké vstávání, dále problémy se soustředěním, nechut k jídlu, deprese, nevolnost, bolesti hlavy a další. U žen, které často cestují, může dojít i k poruše menstruačního cyklu (Cingi a kol., 2018). Pro snížení dopadu jet lagu lze provést spousty preventivních opatření přes užívání kombinace hypnotických léků (benzodiazepiny) a melatoninu, fototerapie a speciální diety, až po uzpůsobení spánku novému režimu (Zee a kol., 2013). Zajímavými novými léčivými přípravky se jeví agonisté melatoninových receptorů Ramelteon a Agomelatin, které ve srovnání se samotným melatoninem mají delší biologický poločas a lepší kompatibilitu s melatoninovými receptory. Jejich působením dochází ke zlepšení cyklu spánku a zmírnění nežádoucích účinků jet lagu (Srinivasan a kol., 2008). Agomelatin je zároveň i antagonistou 5-hydroxytryptaminového receptoru 2C (5-HT_{2C}), který váže endogenní neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamin). Jeho dvojitý účinek se proto stává základem nejen léčby poruch cirkadiálního rytmu, ale i léčby depresí (Pandi-Perumal a kol., 2006).

Ve většině průmyslových zemí více než jedna pětina populace pracuje ve směnném režimu mimo denní dobu od 7 ráno do 6 odpoledne. Vlivem posunu pracovní doby do nočních hodin se u některých jedinců může objevit porucha spánku a bdění při směnném provozu, neboli Shift-Work Disorder (SWD) (Monk, 2009).

Z definice této poruchy vyplývá, že obtíže jako nadměrná ospalost během doby požadované bdělosti (noční směna) a nespavost v době, kdy by měl jedinec spát (den), musejí přetrvávat minimálně měsíc (Pretl, 2014). Příčinou poruchy je nesoulad mezi endogenními cirkadiánními rytmy a realitou. V době, ve které je tělo naprogramováno na spánek, je vyžadována bdělost (Wickwire a kol., 2017). Riziko SWD je závislé na věku a pohlaví, kdy muži mají mírně vyšší riziko SWD než ženy. Dále je s touto poruchou spojováno vyšší riziko užívání alkoholu a psychotropních látek, vyšší riziko obezity, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění a některé studie naznačují i zvyšující se riziko rakoviny prsu a dělohy (Culpepper, 2010). Hlavním cílem léčby je zlepšení bdělosti a kvality spánku během požadované doby. Jako terapie je doporučováno vytvořit si vhodné prostředí pro spánek, omezit kofein, fototerapie během noční směny, vyhnout se ostrému světlu v ranních hodinách (Burgess a kol., 2002).

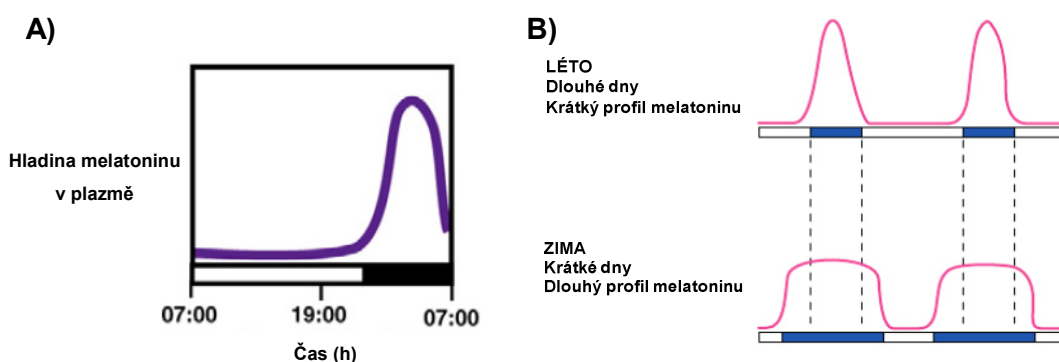
Jak bylo zmíněno výše, cirkadiánní rytmy regulují v lidském těle řadu fyziologických procesů včetně buněčného cyklu, hormonální homeostaze, řízení tělesné teploty, základních buněčných drah (glykolýza, metabolismus mastných kyselin, biosyntéza cholesterolu) a metabolismu léků a xenobiotik. Porucha cirkadiánního rytmu, ať už z genetických, či environmentálních příčin, tak může vést k onemocněním napříč celým organismem od poruch chování až k zhoubným nádorům (Takahashi a kol., 2008).

Mutace v klíčových hodinových genech vede k metabolickým defektům. Například polymorfismus *clock* genu je spojován s obezitou a metabolickým syndromem (Scott a kol., 2008). Dále mutace genu *bmal1* je asociována s predispozicí k hypertenzi a s onemocněním Diabetes mellitus typu 2 (Woon a kol., 2007). Jedna ze studií naznačuje spojitost mezi geny *per3*, *bmal1* a bipolární poruchou (Nievergelt a kol., 2006). Matsuo a kol. (2003) ukázali, že cirkadiánní systém kontroluje buněčný cyklus modulací aktivity cyklin dependentních kinas (Matsuo a kol., 2003). *Per1* gen souvisí s buněčným růstem a kontrolou porušení DNA. Jeho nadměrná exprese vede k indukci apoptózy a redukci proliferace rakovinných buněk (Gery a kol., 2006).

Pochopení mechanismů souvisejících s úzkým propojením cirkadiánních hodin s fyziologií a patofyziologií lidského organismu nám umožní správně diagnostikovat a léčit cirkadiánní poruchy, zlepšit životní styl a lépe přizpůsobit cirkadiánní rytmy fyziologickým procesům našeho těla (Takahashi a kol., 2008).

4 Regulace cirkadiánního rytmu

Cirkadiánní rytmy člověka mohou být synchronizovány i jinými podněty než světlem, například hormony. Mezi hlavní hormony ovlivňující cirkadiánní rytmy patří především melatonin, který je produkován epifýzou. Melatonin neboli *N*-acetyl-5-methoxytryptamin je syntetizován z tryptofanu, kdy dochází k hydroxylaci v 5' poloze za vzniku 5-hydroxytryptofanu. Dekarboxylací 5-hydroxytryptofanu vzniká 5-hydroxytryptamin neboli serotonin, jehož *N*-acetylací vzniká *N*-acetylserotonin a následná *O*-methylace dává vznik melatoninu (Arendt, 1998). Hladiny melatoninu jsou závislé na střídání dne a noci, kdy v noci jsou hladiny melatoninu nejvyšší. Délka sekrece hormonu je dána trváním tmy (Pevet a Challet, 2011). Zajímavým rysem je i rytmus syntetické dráhy, kdy zejména aktivita *N*-acetyltransferasy se v noci zvyšuje až 70krát (Roseboom a kol., 1996). Zajímavé je, že dostatečná délka a intenzita světla dokáže potlačit noční produkci hormonu. Lidé pro úplné potlačení sekrece potřebují intenzitu světla 2500 lux (Arendt, 1998). Vlivem prodlužování a zkracování dne při střídání ročních období se mění i doba sekrece melatoninu. Signál melatoninu nám tak dává informace o cyklu světlo-tma, ale i informace o ročním období (Obr. 9) (Schwartz a kol., 2001).

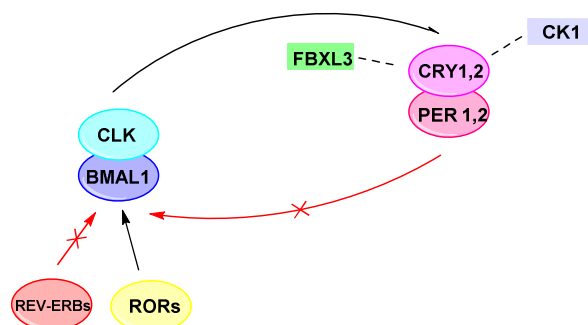


Obr. 9. Časová závislost sekrece melatoninu. A) den/noc, B) léto/zima. Schéma upraveno dle Pevet a Challet, 2011 a Arendt a kol., 1998.

Melatonin je vychytáván adrenergními receptory α a β , které se nachází nejen v SCN, ale i v hipokampu, hypofýze, sítnici, artériích a v dalších orgánech. Díky hojné přítomnosti adrenergních receptorů se agonisté melatoninu (Ramelteon, Agomelatin) stali atraktivní pro farmaceutické společnosti, a zlepšili tak vyhlídky pro léčbu poruch spánku a psychiatrických onemocnění.

S výjimkou melatoninu nebyly k dispozici léky modulující cirkadiánní aktivitu, proto bylo důležité najít molekuly se schopností zkracovat, či prodlužovat periodu hodin. Toto zjištění vedlo k vývoji terapeuticky aktivních malých molekul modulujících dynamiku

cirkadiánních rytmů (Tamai a kol., 2018). Při identifikaci nových aktivních molekul je důležitá znalost jejich molekulárního cíle (hodinové geny, proteinové kinasy, nukleární receptory), charakterizace jejich cirkadiánního účinku a buněčného efektoru (Obr. 10). Tyto mechanické znalosti hrají roli v terapeutické aplikaci pro konkrétní typ onemocnění (Wallach a Kramer, 2015).



CRY ligandy: KL001, KL044, GO sloučeniny, Chun-15

CK1 inhibitory: CK1-7, IC261, D4476, longdaysin, LH846

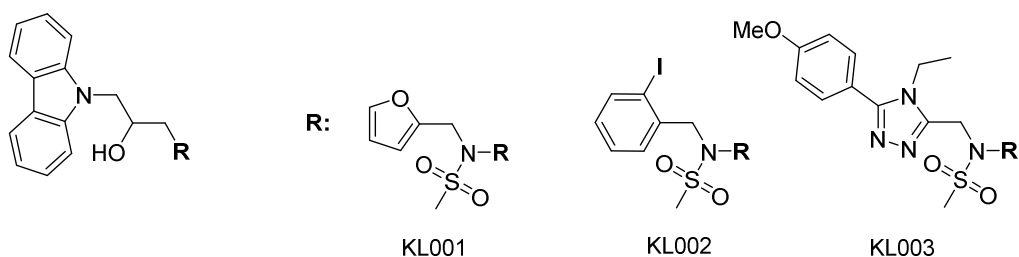
ROR ligandy: SR1078, digoxin, ursolová kyselina, SR3335

REV-ERB ligandy: GSK4112, SR9009, GSK267

Obr. 10. Klíčové molekuly cirkadiánního rytmu a jejich modulátory. TTFL zahrnující klíčové komponenty (BMAL1/CLK a CRY/PER) cirkadiánních hodin, nukleární receptory (ROR, REV-ERB) a proteinové kinasy (CK1) regulující cirkadiánní rytmus. Jednotlivé modulátory byly vyjmenovány dle jejich molekulárního cíle. Schéma upraveno dle Chen a kol., 2018.

4.1 Klíčové proteiny hodinových genů

Plošným testováním více než 60 000 strukturně rozličných látek v *Bmal1-dLuc* reportérovém testu byly objeveny deriváty karbazolu KL001, KL002, KL003 (Obr. 11), které prodlužovaly periodu cirkadiánních hodin (Hirota a kol., 2012).

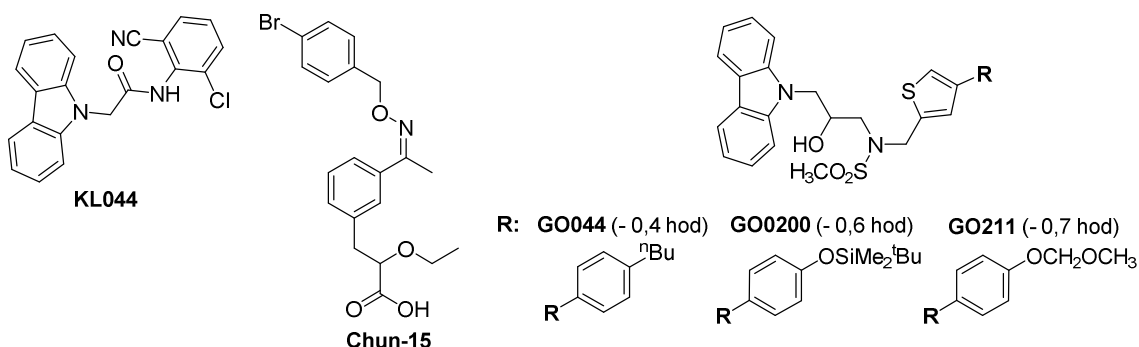


Obr. 11. Struktury derivátů karbazolu. Sloučeniny KL001, KL002, KL003.

S využitím imunoprecipitace a proteomické analýzy byl jako molekulární cíl modulátorů identifikován hodinový protein CRY. Deriváty karbazolu kompetují s FAD o vazebné místo, a stabilizují protein CRY tím, že zabraňují jeho ubiquitinaci

a následné degradaci. Vlivem této stabilizace dochází k prodloužení periody cirkadiánního rytmu a redukci cirkadiánní amplitudy (Lee a kol., 2015). Díky stabilizaci CRY, KL001 inhiboval v hepatocytech glukagonem indukovanou glukoneogenezi, což ukázalo jeho terapeutický potenciál pro léčbu diabetu (Hirota a kol., 2012).

Později byly připraveny další deriváty karbazolu (Obr. 12) s ještě silnějšími účinky - KL044 (Lee a kol., 2015) i látky, které naopak vykazovaly zkrácení periody GO044, GO200 a GO211 (Oshima a kol., 2015). Strukturně zcela odlišnou látku, která je schopna modulovat cirkadiánní hodiny prostřednictvím CRY objevili Chun a kol. (2014). Tento derivát 2-ethoxypropanové kyseliny (Chun - 15), který se váže na C-konec proteinu CRY, inhibuje jeho represivní funkci, a tím aktivuje transkripci *clk/bmal1* genů prostřednictvím E-boxu (Chun a kol., 2014). Následná aplikace látky na buňky lidského karcinomu prsu (MCF-7 a MCF-10A) vedla ke snížení rychlosti růstu buněk a zvýšení citlivosti buněk vůči doxorubicinu a tamoxifenu u linie MCF-7, zatímco u linie MCF-10A nebyl pozorován žádný vliv (Chun a kol., 2015).

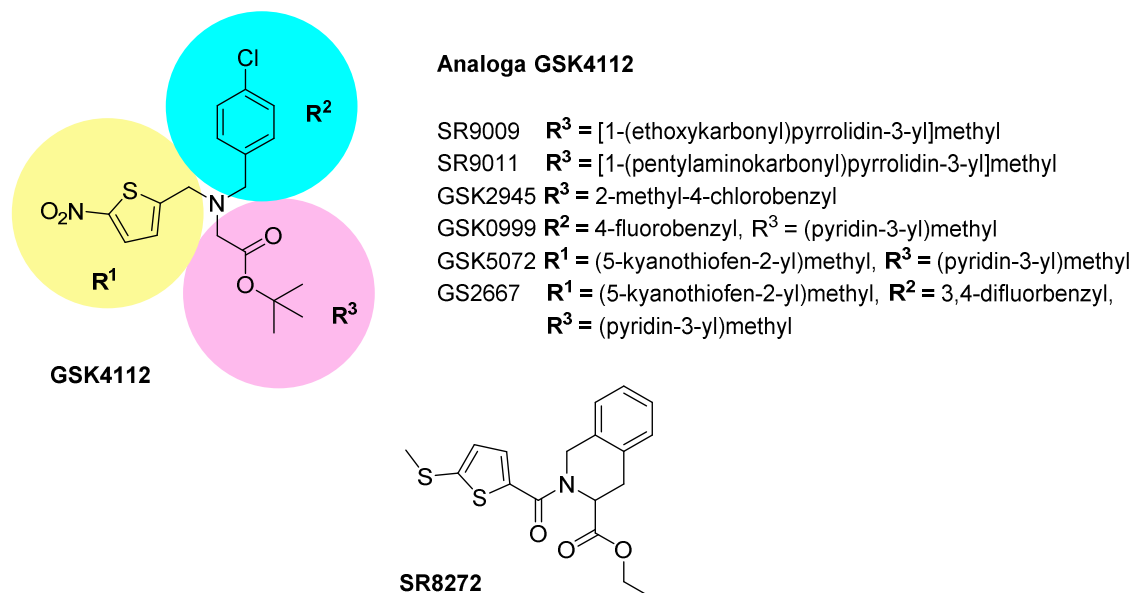


Obr. 12. Struktury molekul ovlivňující CRY. KL004 prodlužuje periodu cirkadiánního rytmu, zatímco deriváty GO044, GO200, GO211 a sloučenina Chun-15 ji zkracují.

4.2 Modulace hodin prostřednictvím nukleárních receptorů

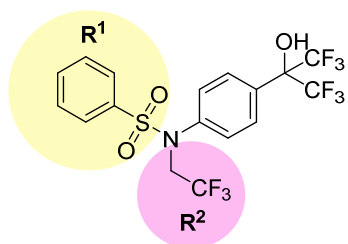
Primární role nukleárních receptorů ROR α / β / γ a REV-ERB α / β v cirkadiálním rytmu je regulace exprese transkripčních aktivátorů *bmal1* a *clk*. Zatímco RORy zvyšují transkripci *bmal1* v kompetici s REV-ERB o vazebné místo na promotoru, REV-ERB naopak transkripci *bmal1* potlačuje (Wallach a Kramer, 2015). Aktivita těchto receptorů je regulována řadou přirozených látek (Obr. 13) (Kojetin a Burris, 2014).

potenciálem. Látky SR9009 a SR9011 jsou 3-4x účinnější než GSK4112 a nevykazují křížovou reaktivitu k jiným nukleárním receptorům (Kojetin a Burris, 2014). Další deriváty GSK4112 (GSK099, GSK5072, GSK2667) vykazují podobné vlastnosti jako látka SR9009 a umožňují perorální podání. V případě GSK2945 byla prokázána 10x vyšší biologická dostupnost a zvýšený biologický poločas (Trump a kol., 2013). Sloučenina SR8278 je naopak doposud jediný identifikovaný antagonist REVERB, který zvyšuje expresi cílových genů (Kojetin a kol., 2011).



Obr. 14. Syntetické ligandy REVERB.

T0901317 byl první validovaný nespecifický ligand schopný regulovat funkci ROR, jehož identifikace vedla k rozvoji dalších ligandů (Obr. 15) (Kumar a kol., 2009). Přímý ROR agonista SR1078 má rozsáhlý terapeutický potenciál pro léčbu obezity, diabetu a rakoviny, protože indukuje expresi podřízených genů glukosa-6-fosfatasy a fibroblastového růstového faktoru 21 (Kojetin a Burris, 2014), které se účastní metabolismu cukrů a tuků (Kharitonov a kol., 2005). Dále stabilizuje p53, a tím indukuje apoptózu v nádorových buňkách (Wang a kol., 2012). Další modifikace předchozích molekul vedly k objevu SR3335, který snižuje hladinu glukosy v plazmě (Kumar a kol., 2011). SR1001, SR2211, SR1555, srdeční glykosid Digoxin a ursolová kyselina potlačují vývoj T_H -17 lymfocytů a inhibují sekreci interleukinu 17, které jsou důvodem vzniku některých autoimunitních onemocnění (Kojetin a Burris, 2014). Tyto poznatky naznačují, že nukleární receptory a jejich ligandy jsou důležitým cílem pro léčbu různých onemocnění.

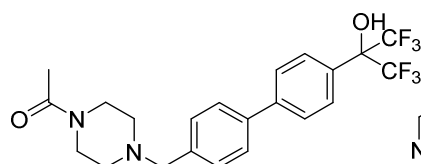


T0901317 a jeho analoga

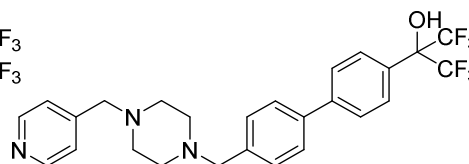
SR1078 R^1 = [4-(trifluormethyl)fenyl]karbonyl, R^2 = H

SR3335 R^1 = thiofen-2-sulfonyl, R^2 = H

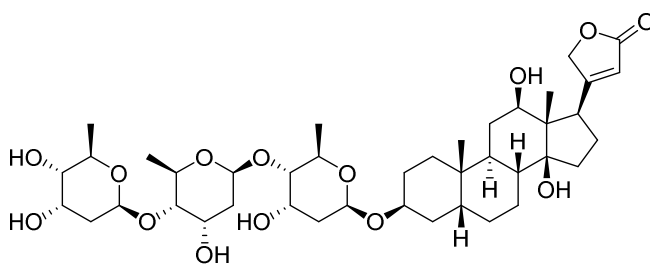
SR1001 R^1 = 2-(acetylamino)-4-methylthiazol-5-ylsulfonyl, R^2 = H



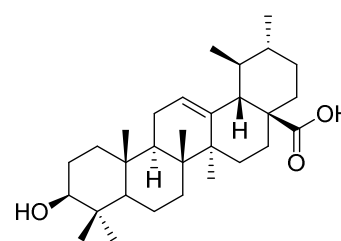
SR1555



SR2211



Digoxin



Ursolová kyselina

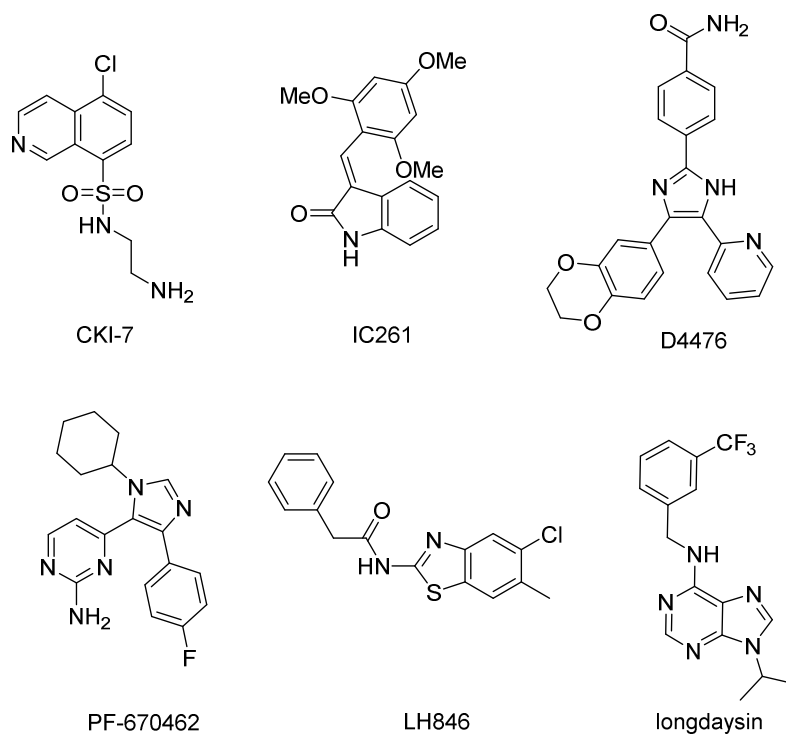
Obr. 15. Syntetické ligandy ROR.

4.3 Modulace hodin prostřednictvím kinas

Hlavním regulačním mechanismem cirkadiánního rytmu je fosforylace klíčových proteinů, kde stěžejní úlohu v tomto procesu hraje kasein kinasa 1 (CK1). Existuje několik isoform CK1 (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ , ϵ), přičemž do regulace hodinových proteinů BMAL1, PER, CRY jsou zapojeny především isoformy α , δ a ϵ (He a Chen, 2016). Fosforylace hodinových proteinů pomocí CK1 je esenciálním elementem kontroly cirkadiánního rytmu (Walton a kol., 2009). Výsledkem mutací v některých bodech kontroly může být řada onemocnění, například syndrom FASPS u lidí, kdy mutace v CK1 δ ovlivňují fosforylační stav PER proteinů vedoucí ke změně periody cirkadiánního rytmu a k jeho fázovému posunu (Wallach a Kramer, 2015).

Proto se inhibitory CK1 (Obr. 16) jeví jako užitečné modulátory pro léčbu poruch cirkadiánního rytmu. Inhibitory CK1 jako CK1-7, IC261, D4476, PF-670462, longdaysin a LH846 způsobují prodloužení cirkadiánní periody (Chen a kol., 2018). Většina inhibitorů není specifická pro určitou CK isoformu a inhibuje fosforylaci PER zprostředkovanou CK1 δ/ϵ , a tím prodloužuje interval negativní zpětné vazby v TTFL (Chen a kol., 2018). Oproti tomu látka PF-670462 vykazuje 6x vyšší specifitu vůči CK1 δ , výrazně prodloužuje cirkadiánní rytmus, protože inhibuje degradaci PER2 (Walton a kol., 2009). IC261 ovlivňuje kromě cirkadiánního rytmu i buněčný cyklus

v mitotické fázi a apoptózu, proto se mimo jiné jeví i jako potenciální léčivo rakoviny (Behrend a kol., 2000).



Obr. 16. Inhibitory kasein kinasy 1.

Zajímavou molekulou výrazně prodlužující cirkadiánní periodu se jeví longdaysin. Po chemické stránce se jedná o *N*9-derivát purinů, jehož molekulárním cílem jsou proteinové kinasy CK1 α/δ a ERK2 (Hirota a kol., 2010). Chemická optimalizace této molekuly může poskytnout výchozí bod pro identifikaci dalších derivátů určených k léčbě cirkadiánních poruch.

Experimentální část

5 Materiál a metody

5.1 Chemikálie

Pro přípravu derivátů byly použity následující chemikálie: benzylamin, trifenylofosfin, diisopropyl azodikarboxylát, deuterovaný dimethylsulfoxid, triethylamin, fetální sérum, L-glutamin, Penicilin/Streptomycin roztok, 10× PCR Buffer, Jump start Taq DNA Polymerasa, ethylendiamintetraoctová kyselina (Sigma-Aldrich), 1,2-dibromethan, 1-brom-2-chlorethan, furfurylamin (Fluka), 2-isopropoxyethanol, oxolan-3-ol, 4-methoxybutan-1-ol, 2-(*terc*-butoxy)ethan-1-ol, 3-methoxy-1-propanol, oxan-4-ol (Enamine), 10× RT Buffer, 10× RT Random Primers, dNTP Mix 100mM, Multi Scribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), DEPC-Treated Water (Ambion), DNA hmotnostní standard 50 bp (BioSystems), Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Invitrogen), 2-merkptoethanol (SERVA), GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium), TurboCapture 384 mRNA kit zahrnující Buffer TCW, TCL, TCE pro mRNA setřihový test (QIAGEN), 6-chlorpurin, 2,6-dichlorpurin (Olchemim). Běžně používané chemikálie jako uhličitán draselný, bezvodný síran sodný, hydrogenuhličitán draselný a rozpouštědla byla zakoupena od firmy Lach:Ner. Prekurzory jako 6-benzylaminopurin, 2-chlor-6-benzylaminopurin, 6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin, 6-chlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin, 6-chlor-9-cyklopentylpurin, 2,6-dichlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin, 2,6-dichlor-9-(tetrahydropyran-4-yl)purin, 2,6-dichlor-9-cyklopentylpurin pro přípravu *N*₉-derivátů BAPu byly nasyntetizovány na Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná panem Mgr. Václavem Mikem, Ph.D.

Suchá rozpouštědla byla připravena dvěma způsoby: *N,N*-dimethylformamid byl vysušen stáním nad aktivovaným 3 Å molekulovým sítem (20% m/v) po dobu nejméně 72 hod pod chlorkalciovým uzávěrem (Bradley a kol., 2010). Suchý tetrahydrofuran byl připraven destilací ze směsi tetrahydrofuran, sodík a benzofenon.

Roztok PBS (1 l) byl připraven rozpuštěním 3,58 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; 8 g NaCl; 0,2 g KCl v 950 ml H₂O s následnou úpravou pH na 7,4, doplněním vody na objem 1 l a přefiltrováním (0,22 μm filtr) připraveného roztoku. TAE pufr 10× (0,5 l) byl připraven smícháním 199,8 ml 1M TRIS pH 8,8; 8 ml koncentrované ledové octové kyseliny; 10 ml 0,5M ethylendiamintetraoctové kyseliny s následnou úpravou pH na hodnotu 8 a doplněním vody na požadovaný objem.

5.2 Biologický materiál

Cirkadiánní test byl prováděn na lidské osteosarkomové buněčné linii U2OS s BMAL1-LUC reporterem (ATCC® HTB-96™). V mRNA sestřihovém testu byla použita linie lidských fibroblastů odvozená od pacientů s familiární dysautomií (Coriell GM04663). Při kultivaci adherentních buněk pro oba biotesty bylo použito DMEM médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 500 ml) s přidavkem NaHCO₃ (1,85 g). Finální médium (10%, 500 ml) pro cirkadiánní test se skládalo z DMEM média bez fenolové červeně s NaHCO₃ (445 ml), fetálního bovinního séra (50 ml) a směsi antibiotik (Penicilin 100 IU/ml/Streptomycin 100 µg/ml, 5 ml). Finální médium pro mRNA sestřihový test (10%, 500 ml) obsahovalo navíc fenolovou červeně a L-glutamin (5 ml).

5.3 Metody

Mikrovlňná syntéza byla prováděna v mikrovlňném reaktoru Discover SP CEM Corporation. Reakce probíhaly v uzavřených ampulích v dynamickém režimu za použití následujících podmínek: doba výhřevu (ramp time) - 2 min, doba reakce (hold time) - 15 min, výkon (power) - 200 W, funkce powermax zapnuta, teplota - 120 °C, tlak - max, míchání (stirring) - vysoké.

Za pomoci tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách se silikagelem 60 F₂₅₄ (Merck) byl kontrolován průběh reakcí. Jako mobilní fáze byly využity směsi chloroform/methanol (9:1) a petrolether/ethyl-acetát (1:1). Vizualizace výsledků byla provedena pomocí UV lampy Camag při 254 nm nebo s využitím vizualizačních činidel manganistanu draselného a vanilinu. Roztok manganistanu draselného byl připraven rozpuštěním 2 g manganistanu draselného, 20 g uhličitanu draselného v 5 ml 5% hydroxidu sodného a 300 ml vody. Roztok vanilinu byl připraven smícháním 3,2 g vanilinu, 200 ml ethanolu, 1 ml koncentrované kyseliny octové a 2 ml koncentrované kyseliny sírové.

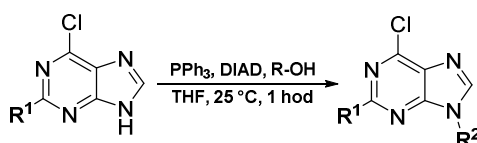
Připravené látky byly přečištěny pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ve skleněných kolonách naplněných silikagelem Davisil LC60A 40-63 Micron (GraceDavison) s mobilní fází chloroform/methanol s gradientem methanolu, popřípadě petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu. Některé z produktů byly přečištěny pomocí preparativní HPLC na přístroji Infinity II 1260/1290 (Agilent Technologies, Inc.) na koloně Prep-C18 (21,2×50 mm, 5 µm) s použitím vody a MeOH jako organického rozpouštědla.

Pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu spojeného s tandemovým hmotnostním spektrometrem (HPLC-DAD-MS, HPLC Alliance 2695 separation module, Waters; PDA 996 detector, Waters; MS Q-Tofmicro, Waters) byla ověřena spektrofotometrická čistota a molekulová hmotnost připravených látek. Vzorky byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 1 mg/ml, a dále naředěny počáteční mobilní fází na finální koncentraci 10 µg/ml. Na kolonu s reverzní fází C18 Symmetry (Waters) s parametry 150 mm × 2,1 mm a pórovitostí 3,5 µm bylo nastříknuto 10 µl vzorku. Separace probíhala gradientovou elucí (0 min - 90 % A; 24 min - 10 % A; 35 min - 10 % A; 36 min - 90 % A; 45 min - 10 % A) o rychlosti průtoku 0,2 ml/min. Mobilní fází A tvořil 15mM HCOONH₄ (pH 4,0) a jako organický modifikátor byl použit methanol. Analyty byly detekovány pomocí DAD detektoru v rozsahu vlnových délek 210-400 nm. Z HPLC byl eluent veden do iontového zdroje s pozitivní ionizací (ESI⁺) s následnou detekcí iontů ve FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-1000. Iontový zdroj byl vyhříván na teplotu 110 °C, zatímco k desolvataci docházelo při teplotě 250 °C s použitím dusíku jako desolvatačního i zamlžovacího plynu. Kapilární napětí bylo nastaveno na 3 kV, na vstupní šěrbině bylo napětí 20 V.

Pro potvrzení struktury připravených sloučenin byla změřena spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) na spektrometru Jeol ECA-500 při frekvencích 500 MHz (¹H) a 125 MHz (¹³C) v prostředí deuterovaného dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆). Chemické posuny (δ) byly kalibrovány na signál rozpouštědla ¹H= 2,49 ppm pro DMSO-*d*₅ a ¹³C= 39,5 ppm pro DMSO-*d*₆.

5.4 Syntéza

5.4.1 Syntéza meziproduktů pomocí Mitsunobu alkylace (I-IX)



- | | |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| I: R ¹ = H-, R ² = 2-(<i>tert</i> -butoxy)ethyl- | V: R ¹ = Cl-, R ² = 2-isopropoxyethyl- |
| II: R ¹ = H-, R ² = 4-methoxybutyl- | VI: R ¹ = Cl-, R ² = 2-(<i>tert</i> -butoxy)ethyl- |
| III: R ¹ = H-, R ² = tetrahydrofuran-3-yl- | VII: R ¹ = Cl-, R ² = 3-methoxypropyl- |
| IV: R ¹ = H-, R ² = tetrahydropyran-4-yl- | VIII: R ¹ = Cl-, R ² = 4-methoxybutyl- |
| | IX: R ¹ = Cl-, R ² = tetrahydrofuran-3-yl- |

Schéma 1. Postup přípravy meziproduktů pomocí Mitsunobu alkylace.

K suspenzi 6-chlorpurinu/2,6-dichlorpurinu (1 ekv.), trifenylofosfinu (1,2 ekv.) a příslušného alkoholu (1,2 ekv.) v suchém THF (koncentrace výchozího purinu 0,15M) pod argonovou atmosférou byl za chlazení ve vodní lázni přikapán DIAD (1,2 ekv.). Po přidání DIADu byla vodní lázeň odstraněna a reakční směs byla míchána 1 hod

za laboratorní teploty a poté zakoncentrována na rotační vakuové odparce. Vedlejší produkt reakce trifenylofosfinoxid (PPh_3O) byl odstraněn krystalizací za horka z toluenu. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu.

5.4.2 Alkylace N9-pozice s použitím K_2CO_3 jako báze

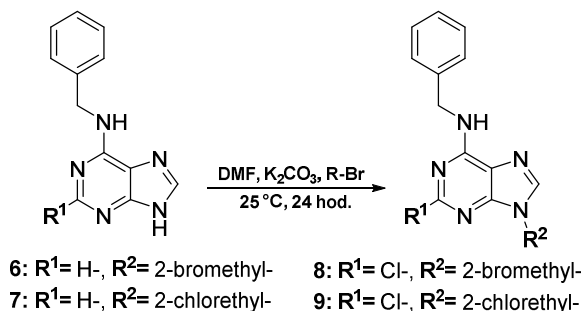


Schéma 2. Obecný postup přípravy N9-derivátů odvozených od benzylaminopurinu.

K suspenzi BAP/2-chlorBAP (1 ekv.), K_2CO_3 (2,5 ekv.) v suchém DMF (koncentrace výchozího purinu 0,15M) míchané 20 minut pod argonovou atmosférou bylo přikapáno alkylační činidlo (1,2 ekv.). Výsledná reakční směs byla míchána 24 hod za laboratorní teploty. Po odreagování výchozí látky byla reakční směs nalita do studené vody (10 ml) a extrahována do ethyl-acetátu (5× 10 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou (2× 10 ml), vysušeny (Na_2SO_4) a zahuštěny na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol s gradientem methanolu.

5.4.3 Nukleofilní substituce v poloze C6 – standardní postup

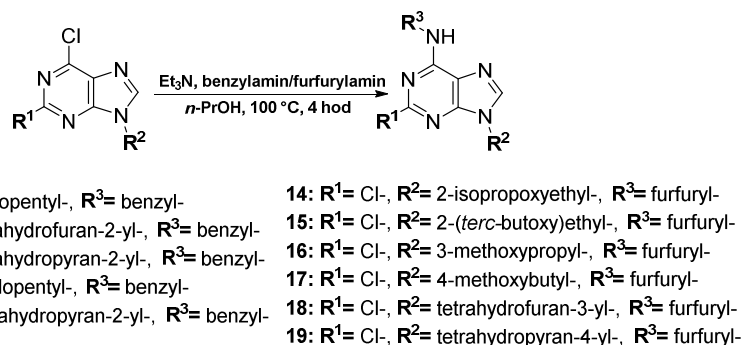
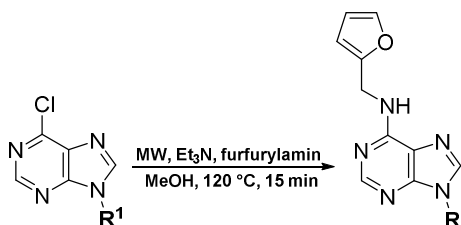


Schéma 3. Syntéza výsledných produktů substitucí v poloze C6.

Směs, výchozího N9-derivátu 6-chlorpurinu/2,6-dichlorpurinu (1 ekv.), benzylaminu/furfurylaminu (1,2 ekv.) a triethylaminu (Et_3N) (2,5 ekv.) v *n*-propanolu (koncentrace výchozího purinu 0,15M), byla míchána v tlakové ampuli 4 hod při teplotě 100 °C. Po ukončení reakce byla reakční směs zahuštěna za sníženého tlaku. Vzniklý odparek byl rozsuspendován ve studené vodě (10 ml) a extrahován do EtOAc

(5× 10 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (2× 10 ml) a vysušeny (Na₂SO₄). Po zahuštění organické fáze na rotační vakuové odparce byl surový produkt purifikován pomocí sloupcové chromatografie s použitím mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH nebo petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu.

5.4.4 Nukleofilní substituce v poloze C6 pomocí mikrovlnného záření



10: R¹= H-, R²= 2-(*tert*-butoxy)ethyl-

11: R¹= H-, R²= 4-methoxybutyl-

12: R¹= H-, R²= tetrahydrofuran-3-yl-

13: R¹= H-, R²= tetrahydropyran-4-yl-

Schéma 4. Postup přípravy derivátů odvozených od 6-chlorpurinu v mikrovlnném reaktoru.

Směs N9-derivátu 6-chlorpurinu (1 ekv.), furfurylaminu (1,5 ekv.) a Et₃N (2,5 ekv.) v MeOH (koncentrace výchozího purinu 0,25M) byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru 15 minut při 120 °C. Po ukončení reakce byla výsledná směs zahuštěna za sníženého tlaku, rozsuspendována ve studené vodě (10 ml) a extrahována do EtOAc (5× 10 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (2× 10 ml), vysušeny bezvodným síranem sodným a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem methanolu.

5.5 Biologické testování

5.5.1 Testování vlivu na cirkadiánní rytmus

Cirkadiánní test byl prováděn v 384-jamkovém systému na lidské osteosarkomové buněčné linii U2OS obsahující BMAL1-LUC reportér. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s 10% fetálním bovinním sérem v stabilní atmosféře (37 °C, 5,5 % CO₂) a subkultivovány každé 2-3 dny. Pro záznam rytmu bylo naočkováno 10 000 buněk/jamka v 20 μl DMEM média s 10% fetálním bovinním sérem. Po dvou dnech byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami ve dvou koncentracích (finální koncentrace pro deriváty KIN: 5,6μM a 50μM, pro deriváty BAP: 10μM a 50μM) v sedmi opakováních nebo DMSO pomocí dávkovače Echo Nanodrop s přidavkem 70 μl DMEM média s 10% fetálním bovinním sérem bez fenolové červeně s vysokým obsahem glukosy obohaceného o HEPES (10mM) a luciferin (0,1mM). Destička byla

překryta PCR fólií. Luminiscence každé jamky byla měřena 11 sekund každou hodinu po dobu 6 nebo 7 dní pomocí přístroje M2 Tecan reader. Analýza experimentu byla provedena pomocí skriptu v R softwaru, který proložil naměřenými body periodickou funkcí. Prvních 20 hodin měření bylo vyřazeno, následných 100 hodin bylo použito pro analýzu.

5.5.2 mRNA sestřihový test

Sestřihový test byl prováděn v 96-jamkových deskách na linii lidských fibroblastů odvozených z pacientů s familiární dysautonomií o koncentraci 8000 buněk/jamka v 80 μ l DMEM média s 10% fetálním bovinním sérem. Buňky byly po napipetování kultivovány v inkubátoru 24 hod, při teplotě 37 °C a CO₂ atmosféře (5,5 kPa). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO (100mM) a naředěny DMEM médiem s 10% fetálním bovinním sérem na koncentraci (100 μ M). Po 24 hodinové inkubaci a zkontrolování buněk pod mikroskopem byly připravené látky v duplikátu přidány do 96-jamkové destičky (20 μ l/jamka, finální koncentrace testované látky 20 μ M). Jako pozitivní kontrola byl použit kinetin. Ošetřená destička byla inkubována 24 hod (37 °C, 5,5 kPa CO₂).

Následující den byla provedena izolace mRNA z buněk pomocí kitu TurboCapture 384 mRNA. Před samotnou izolací byly buňky promyty v PBS. Izolace byla zahájena přidáním TCL pufru (50 μ l/jamka) obsahujícím 1% β -merkptoethanol. Po 5 min inkubaci za laboratorní teploty byly buňky přeneseny do TurboCapture plate 384 (TP9), překryty AlumaSeal II fólií, stočeny na centrifuze (10 000 g/30 s) a inkubovány (90 min, laboratorní teplota) na třepačce (250 rpm) ve tmě. Po uplynutí inkubace byl z jednotlivých jamek odsán lyzát a jednotlivé jamky byly promyty TCW pufrem (2 \times 30 μ l) s následným přidáním TCE pufru (20 μ l/jamka). Po krátké centrifugaci (10 000 g/30 s) byla překrytá destička inkubována na termobloku (5 min, 65 °C). Po uplynutí inkubace a zchladnutí destičky na laboratorní teplotu byla vyizolovaná RNA přenesena do mikrozkumavek (stripů).

V dalším kroku byla provedena reverzní transkripce za použití High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu. Jednotlivé složky směsi premixu v požadovaném objemu (Tabulka 3) byly napipetovány do stripů.

Tabulka 3. Složení RT-PCR premixu pro 1 vzorek.

	Objem pro 1 vzorek (μ l)
10x RT pufr	2
25x dNTP Mix	0,8
10x RT Random primers	2
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1
DEPC-Treated Water	4,2

Stripy byly krátce stočeny v minicentrifuze a vloženy do cycleru. RT-PCR probíhala podle přednastaveného protokolu (Tabulka 4).

Tabulka 4. Teplotní parametry protokolu pro přepis mRNA do cDNA.

	Teplota (°C)	Čas (min)
1. fáze	25	10
2. fáze	37	120
3. fáze	85	5
4. fáze	4	-

Po dokončení reakce byly vzorky použity pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Do sterilních stripů byly rozpipetovány jednotlivé chemikálie PCR premixu (Tabulka 5) a 2 μ l cDNA.

Tabulka 5. Složení PCR Jump premixu.

	Objem pro 1 vzorek (μ l)
sterilní voda	14,72
dNTP 10 mM	0,72
10x PCR pufr	2
forward primer	0,18
reverse primer	0,18
Jump Start Taq DNA Polymerasa	0,2

Po stočení na minicentrifuze byly stripy umístěny do cycleru, kde podle přednastaveného protokolu byla provedena PCR reakce s 34 teplotními cykly (Tabulka 6). Následně byly vzorky ochlazeny na 4 °C a rozděleny pomocí elektroforetické separace v horizontálním uspořádání v 1,5% agarózovém gelu při napětí 120 V po dobu 40 – 60 min.

Tabulka 6. Parametry protokolu klasické PCR.

	Teplota (°C)	Čas (s)
počáteční denaturace	94	300
denaturace	94	40
annealing	63,8	30
extenze	72	90
finální extenze	72	300
ochlazení	4	

Agaróza byla rozpuštěna v 1×TAE pufru (pH 8) a rozvařena v mikrovlnné troubě. K horkému gelu bylo přidáno barvivo GelRed Nucleic Acid Stain (5 μ l na 100 ml). Gel

byl ponechán zchladnout zhruba na 60 °C, a poté byl nalit do elektroforetické vany. Po ztuhnutí gelu (30 min) byla vana naplněna 1×TAE pufrem. Do první jamky gelu byl nanesen marker molekulové hmotnosti (3 µl, 50 bp DNA Ladder). Do dalších jamek byly nanесeny jednotlivé produkty PCR (10 µl) smíchaný s 10× DNA nanášecím pufrem (1 µl). Pro detekci a vizualizaci byly pořízeny snímky gelů pomocí UV-transiluminátoru FLA-4000 (Fujifilm).

5.5.3 Standardní cytokininové biotesty

Biologická aktivita vybraných sloučenin byla otestována pomocí dvou standardních cytokininových biotestů (tabákový kalusový biotest a senescenční biotest), které byly provedeny dle modifikovaného postupu v příložené publikaci (Holub a kol., 1998).

Tabákový kalusový biotest byl proveden na kalusové kultuře cytokinin-dependentního tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38). Kalusová kultura byla kultivována v 6-jamkových deskách (0,1 g kalusu, rozděleného na 3 díly/jamku) na pevném MS médiu s testovanou látkou (3 ml/jamku) po dobu čtyř týdnů (24 °C, ve tmě). Připravené látky byly rozpuštěny v DMSO, naředěny do média a testovány v koncentrační rozsahu 10^{-9} - 10^{-4} M. Jako pozitivní kontrola byl použit BAP. Biologická aktivita testovaných látek byla stanovenána na základě relativního nárůstu hmotnosti kalusu.

Senescenční biotest byl proveden na listových segmentech pšenice (*Triticum aktivum* L. cv. Aranka). Obilky byly promyty pod tekoucí vodou (24 hod), vysety do vermikulitu nasyceného Hoaglandovým živným roztokem a ponechány růst v kultivační komoře (16 hod den/8 hod noc, 7000 lx) při teplotě 22 °C po dobu jednoho týdne. Ze sazenic byly odebrány primární listové segmenty o délce 3,5 cm, které byly zastříhnuty a kombinovány (4 kusy, celková hmotnost 0,1 g/jamka), ponořeny bazální částí do jamky obsahující testované sloučeniny (150 µl/ jamka) a kultivovány v uzavřeném plastovém boxu (24 °C, 96 hod, tma) s navlhčeným filtračním papírem, aby se zabránilo vysychání segmentu. Residuální chlorofyl byl extrahován zahřátím listových segmentů v 5 ml 80% (v/v) ethanolu při teplotě 80 °C po dobu 10 min. Objem získaného extraktu byl doplněn na 5 ml a byla změřena jeho absorbance při 665 nm. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami získanými z výtažků z čerstvých listů (po oddělení skladováno při teplotě – 80 °C) a z listů pěstovaných v deionizované vodě.

6 Výsledky a diskuze

Připravené látky byly testovány jednak na reportérové linii umožňující sledovat vliv na cirkadiánní rytmus, jednak na fibroblastech s mutací vedoucí k aberantnímu sestřihu pre-mRNA genu ELP1. Společným jmenovatelem všech připravených produktů je dusíkatá heterocyklická sloučenina purin, který mimo jiné představuje základní kostru rostlinných hormonů cytokininů. Kinetin a *N*6-benzylaminopurin jsou významnými zástupci aromatických cytokininů. V rámci syntetické části jsme se zabývali především deriváty kinetinu. Původně byl kinetin identifikovaný jako látka s cytokininovou aktivitou (Miller a kol., 1955), protože už při velmi nízkých koncentracích specificky podporoval dělení buněk, neboli cytokinesi (Miller a kol., 1956). Dlouho byl považován za syntetický produkt a jeho přítomnost v rostlinném materiálu byla prokázána až v roce 2005 (Ge a kol., 2005). Kromě dělení rostlinných buněk (Miller, 1961), kinetin v rostlinách ovlivňuje především senescenci (Richmond a Lang, 1957), aktivitu antioxidantních enzymů (Barciszewski a kol., 1997), fotosyntézu (de Moura a kol., 2018) a mnohé další. Kinetin našel využití nejen v rostlinné říši, ale i živočišné. Bylo prokázáno, že kinetin zpomaluje stárnutí a prodlužuje život *Drosophily* (Sharma a kol., 1995), u háďátka chrání buňky před oxidativním a tepelným stresem (Kadlecová a kol., 2018) a díky fotoprotektivní aktivitě chrání lidské fibroblasty před oxidativním stresem (Hönig a kol., 2018). Byly prokázány pozitivní účinky kinetinu na některá neurologická onemocnění jako Huntingtonova choroba (Bowie a kol., 2018) a familiární dysautonomie (Slaugenhaupt a kol., 2004). V současné době se kinetin nachází ve druhé fázi klinického testování vůči familiární dysautonomii (www.clinicaltrials.gov).

Benzylaminopurin je další zajímavou sloučeninou ze skupiny aromatických cytokininů. Stejně jako kinetin se podílí na regulaci proliferace, diferenciace a senescence v rostlinných i lidských buňkách (Doležal a kol., 2006). Výsledky některých studií ukazují potencionální uplatnění benzylaminopurinu a jeho derivátů jako léčiva pro určité typy leukémií (Ishii a kol., 2002) a cirkadiánní poruchy (Lee a kol., 2019). Zajímavou sloučeninou modulující cirkadiánní rytmus je longdaysin (6-[(3-trifluormethyl)benzylamino]purin). Byl identifikován jako inhibitor CK1, který vykazuje cytotoxicitu při koncentraci 71mM a je strukturně blízký inhibitorům cyklin-dependentních kinas (CDK) s protinádorovou aktivitou (Roskovitin, Olomoucín II) (Zatloukal a kol., 2013). Strukturní základ longdaysinu tvoří molekula benzylaminopurinu, proto jsme se rozhodli nalézt vhodnou modifikaci, která by lépe modulovala aktivitu a dynamiku cirkadiánního rytmu.

Pro přípravu derivátů BAPu byly použity dvě syntetické cesty (Schéma 5). V prvním případě byl nejdříve k molekule 6-chlorpurinu/2,6-dichlorpurinu pomocí hydroaminace (v případě THF a THP substituentů) nebo Mitsunobu alkylace (cyklopentyl) připojen *N*9 substituent a v dalším kroku byla provedena nukleofilní substituce v poloze C6. Ta probíhala pro úplné odreagování výchozí látky v nadbytku benzylaminu (1,2 ekv.) a pomocné báze triethylaminu (2,5 ekv.) 4 hodiny při teplotě 100 °C (1-5).

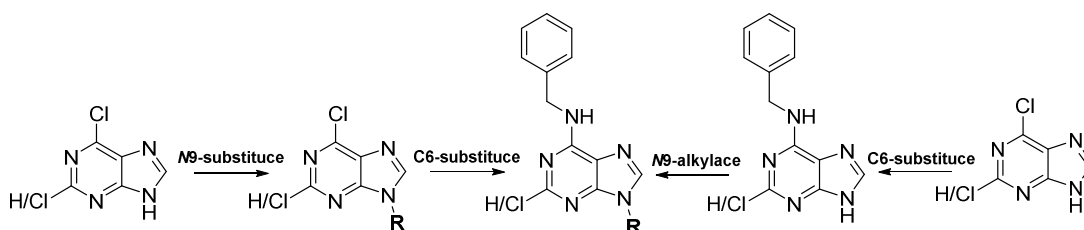


Schéma 5. Syntetické větve přípravy derivátů BAP.

Výtěžky produktů byly obecně nízké, pohybovaly se v rozmezí od 35 do 73 %, což bylo způsobeno převážně ztrátami při čištění látek. Pro purifikaci produktů byla zvolena chromatografická kolona s mobilní fází petroether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu, protože standardně používaná mobilní směs chloroform/MeOH byla pro tyto látky příliš polární.

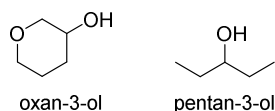
Ve druhém případě (látky **6-9**) byla nejdříve provedena nukleofilní substituce na 6-chlorpurinu/2,6-dichlorpurinu v poloze C6, s následnou přímou alkyací na dusíkovém atomu v pozici 9. Postup alkylační reakce za heterogenních podmínek byl zkombinován dle přiložených publikací s malými úpravami (Itaya a kol., 1980, (Ramzaeva a kol., 1987). Reakce probíhala za laboratorní teploty v suchém DMF pod Ar atmosférou, s nadbytkem alkylačního činidla (1,2 ekv.) a v přítomnosti uhličitanu draselného (2,5 ekv.) jako heterogenní báze po dobu 24 hodin. V případě produktu **8** nedošlo k odreagování výchozí látky, proto byla reakční směs 1 hodinu inkubována při 50 °C. Výtěžky produktů se pohybovaly v rozmezí 29 – 85 %. Důvodem snížení výtěžků byl vznik minoritního podílu *N*7-isomeru, který se bohužel ani v jednom z případů nepodařilo získat. Nízký výtěžek v případě látek **6** a **8** byl způsoben neúplným odreagováním výchozí látky a ztrátou části produktu při jeho purifikaci.

Benefitem přípravy 2-chlor derivátů byla jejich nižší rozpustnost ve vodě, což nám usnadnilo zpracování reakční směsi. Po nalití reakční směsi do studené vody došlo k vykrytalizování pevného produktu v relativně vysoké čistotě, což nám v případě (látky **5**) urychlilo purifikaci. Připravené deriváty BAPu a jejich základní fyzikálně-chemické parametry jsou přehledně shrnuty v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7. Přehled N9-derivátů BAPu a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. THF – tetrahydrofuran-2-yl, THP – tetrahydropyran-2-yl, ^{A)} petrolether/ethyl-acetát (1:1, v/v), ^{B)} chloroform/methanol (9:1, v/v).

Látka	C2	N9	Výtěžek [%]	HPLC [min/%]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺	Retenční faktor
1	-H	cyklopentyl	56	25,60/99,9	294,4	0,15 ^A
2	-H	THF	35	22,63/99,3	296,3	0,75 ^B
3	-H	THP	44	23,92/99,9	310,1	0,64 ^B
4	-Cl	cyklopentyl	73	28,85/99,9	328,4	0,24 ^A
5	-Cl	THP	46	27,38/99,9	344,4	0,67 ^B
6	-H	2-bromethyl	29	26,63/98,7	332,5	0,76 ^B
7	-H	2-chlorethyl	61	23,12/99,5	288,5	0,77 ^B
8	-Cl	2-bromethyl	40	27,02/99,9	366,6	0,66 ^B
9	-Cl	2-chlorethyl	85	26,58/98,7	322,6	0,64 ^B

Deriváty odvozené od kinetinu byly připraveny dvoukrokovou syntézou. Cílem syntézy byla optimalizace N9-substituentu pro cirkadiální assay. V prvním kroku byly do N9-pozice na purinovém skeletu zavedeny substituenty pomocí Mitsunobu alkylace, jelikož výchozími látkami byly příslušné alkoholy. K suspenzi 6-chlorpurinu/2,6-dichlorpurinu, trifenyfosfinu a příslušného alkoholu v suchém THF pod argonovou atmosférou byl za chlazení ve vodní lázni přikapán DIAD. Po přidání DIADu byla vodní lázeň odstraněna a reakční směs byla míchána 1 hod za laboratorní teploty. Po uplynutí reakční doby bylo provedeno kontrolní TLC pro ověření úplného odreagování výchozí látky. V případě látek **III**, **IV**, **VII** a **IX** bylo kvůli neodreagování výchozího purinu zvýšeno množství jednotlivých činidel o 0,8 ekv. a byla prodloužena reakční doba o 1 hodinu. V případě látky **IV**, kdy alkoholem byl oxan-4-ol, nedošlo k odreagování VL, ani po zahřátí, proto bylo k reakční směsi přidáno další množství jednotlivých činidel (0,5 ekv.) a reakční doba byla zvýšena o další hodinu. Ve dvou případech vybraných substituentů (oxan-3-ol, pentan-3-ol) se příslušné prekurzory nepodařilo připravit (Obr. 17), ani úpravou množství reakčních činidel, reakční doby a teploty reakce na 50 °C a posléze 70 °C.



Obr. 17. Struktury substituentů, které nebylo možné zavést na molekulu purinu.

Hlavním důvodem byla pravděpodobně v případě oxan-3-olu nevhodná geometrie molekuly a u pentan-3-olu nedošlo k reakci díky stericke zábraně. V následující tabulce (Tabulka 8) jsou shrnuty připravené meziprodukty a jejich základní fyzikálně-chemické vlastnosti.

Tabulka 8. Přehled meziproduktů připravených Mitsunobu alkylací a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. THF-3-yl = tetrahydrofuran-3-yl, THP-4-yl = tetrahydropyran-4-yl, ^{A)} chloroform/methanol (9:1, v/v), ^{B)} petrolether/ethyl-acetát (1:1, v/v).

Látka	C2	N9	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺	Retenční faktor
I	-H	2-(<i>terc</i> -BuO)ethyl	89	17,52/98,8	255,2	0,38 ^B
II	-H	4-MeObutyl	67	13,61/84,1	241,2	0,37 ^B
III	-H	THF-3-yl	23	9,93/92,5	225,1	0,55 ^A
IV	-H	THP-4-yl	42	11,76/99,9	239,1	0,50 ^A
V	-Cl	2- <i>i</i> PrOethyl	74	23,52/99,9	275,3	0,65 ^A
VI	-Cl	2-(<i>terc</i> -BuO)ethyl	76	25,25/96,2	289,4	0,59 ^A
VII	-Cl	3-MeOpropyl	74	16,81/90,3	262,1	0,41 ^A
VIII	-Cl	4-MeObutyl	44	21,88/56,4	275,4	0,50 ^A
IX	-Cl	THF-3-yl	64	18,85/61,4	259,4	0,37 ^A

Výhodou Mitsunobu alkylace je relativně krátká reakční doba, naopak obrovskou nevýhodou je vznik velkého množství vedlejšího odpadního produktu trifenyfosfinoxidu (PPh₃O), který se z reakční směsi velmi špatně odstraňuje. V rámci naší výzkumné skupiny se hlavním krokem odstranění PPh₃O stala rekrystalizace reakční směsi v toluenu, kdy je odkrystalována převážná část PPh₃O a redukovaného DIADu, s následnou chromatografickou purifikací filtrátu s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu. Bohužel, u většiny případů se nepodařilo zcela oddělit veškerý PPh₃O od produktu. V případě derivátů bez chloru v C2 poloze (látky **I**, **III**, **IV**) byla separace produktu od PPh₃O jednodušší s použitím pouze jedné chromatografické kolony s čistotou pohybující se v rozmezí 93 – 99,9 %. Deriváty obsahující chlor na purinovém kruhu v poloze C2 naopak měly velmi obdobný retenční faktor jako PPh₃O a jejich purifikace byla proto mnohem náročnější a k úplné separaci nedošlo ani po několikerém chromatografickém přečištění (obsah PPh₃O, 1:1 HPLC-UV/VIS detekce). Některé intermediáty (**II**, **VIII**, **IX** a 2,6-dichlor-9-(tetrahydropyran-4-yl)purin) s nižší čistotou, kvůli obsahu PPh₃O, byly použity pro syntézu finálního produktu s cílem zcela přečistit až výsledný produkt. Obrovskou nevýhodou tohoto rozhodnutí byl v případě **19** vznik komplexů s PPh₃O nebo velmi blízký retenční čas finálního produktu s PPh₃O (**11**, **17**, **18**). Z tohoto důvodu byla u intermediátů **II** a **IV** vyzkoušena precipitace PPh₃O pomocí ZnCl₂ (Batesky a kol., 2017). Reakcí PPh₃O s 2 ekv. chloridu zinečnatého v ethyl-acetátu za laboratorní teploty došlo po 24 hod k tvorbě komplexu ZnCl₂ s PPh₃O v podobě bílé sraženiny, která byla odstraněna filtrací. Díky tomuto přečištění došlo k výrazné redukci obsahu PPh₃O na pouhých 10 %. Výtěžky prekurzorů se pohybovaly v rozmezí 23 – 89 %. Nižší výtěžky byly také způsobeny vznikem menších množství *N7* isomerů,

kteře se nám také bohužel ani v jednom případě nepodařilo pomocí sloupcové chromatografie získat.

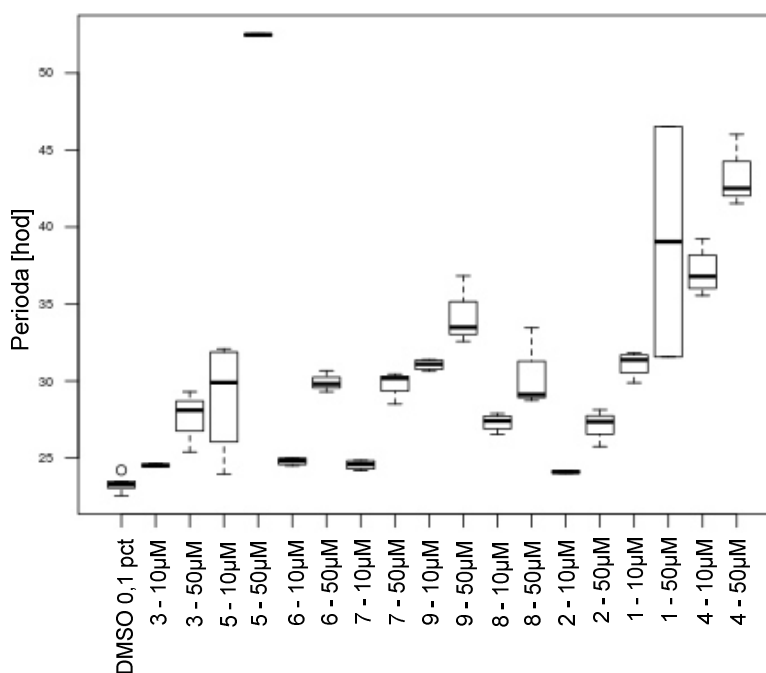
Dalším krokem syntézy byla příprava finálních produktů, která se lišila v závislosti na tom, zda intermediát obsahoval nebo neobsahoval chlor v pozici C2. Meziprodukty s chlorem v pozici C2 (látky **V-IX**) byly připraveny analogicky jako deriváty BAPu (látky **1-5**) – zahříváním s nadbytkem furfurylaminu, Et₃N v *n*-PrOH. Produkty byly chromatograficky přečištěny s použitím mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH. Jak bylo zmíněno výše, u intermediátů s obsahem PPh₃O došlo k odreagování purinu, ale u produktů (**11**, **17**, **18**) byl díky obdobnému retenčnímu faktoru problém s odstraněním PPh₃O, který se podařilo vyřešit až purifikací pomocí preparativní HPLC. V případě látky **19** došlo ke vzniku komplexu purinu s PPh₃O (v HPLC chromatogramu jeden pík). Pomocí NMR bylo určeno, že komplex obsahoval zhruba 4 % PPh₃O.

Benefitem přípravy finálních produktů neobsahujících chlor v pozici C2 byla možnost použití mikrovlnného reaktoru, protože v případě derivátů s chlorem v pozici C2 hrozí 2,6-disubstituce. Pro syntézu byl použit optimalizovaný postup dle přiložené publikace (Huang a kol., 2007). Reakce probíhala v nadbytku reakčních činidel za použití methanolu jako rozpouštědla. Hlavní výhodou mikrovlnné syntézy je obrovské snížení reakční doby ze 4 hodin na 15 minut a usnadnění přečištění finálního produktu, což vedlo ke zvýšení výtěžků finálních produktů. Výtěžky reakcí všech produktů se pohybovaly v rozmezí 23 – 72 %. Nižší výtěžky byly způsobeny především ztrátami při náročné purifikaci. V následující tabulce jsou shrnuty fyzikálně-chemické vlastnosti nasyntetizovaných derivátů kinetinu (Tabulka 9).

Tabulka 9. Přehled připravených finálních produktů N9-derivátů kinetinu a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. THF-3-yl = tetrahydrofuran-3-yl, THP-4-yl = tetrahydropyran-4-yl, ^{A)} chloroform/methanol (9:1, v/v)

Látka	C2	N9	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺	Retenční faktor
10	-H	2-(<i>terc</i> -BuO)ethyl	48	19,89/99,9	316,2	0,50 ^A
11	-H	4-MeObutyl	47	17,53/99,9	302,2	0,47 ^A
12	-H	THF-3-yl	65	14,99/99,9	286,2	0,32 ^A
13	-H	THP-4-yl	72	15,96/93,7	300,2	0,35 ^A
14	-Cl	2- <i>i</i> PrOethyl	23	26,00/99,9	336,6	0,61 ^A
15	-Cl	2-(<i>terc</i> -BuO)ethyl	25	23,13/99,9	350,2	0,69 ^A
16	-Cl	3-MeOpropyl	49	20,31/96,7	322,1	0,43 ^A
17	-Cl	4-MeObutyl	49	21,00/99,3	336,2	0,64 ^A
18	-Cl	THF-3-yl	26	19,56/99,9	320,1	0,65 ^A
19	-Cl	THP-4-yl	37	24,52/99,5	334,6	0,57 ^A

V cirkadiánním testu byla sledována schopnost látek modulovat periodu rytmu, tzn. dobu trvání jednoho opakujícího se cyklu, která u použitých buněk (U2OS s BMAL1-LUC reportérovým systémem) trvá asi 23 hodin. Reportérový systém je založen na expresi luciferasy (LUC) pod kontrolou *bmal1* promotoru, kdy hladiny reportérového enzymu oscilují s měnícími se hladinami BMAL1. Luciferasa katalyzuje rozklad přítomného luciferinu na produkty v excitovaném stavu, které přebytek energie emitují ve formě světla v rozmezí vlnových délek 550 – 570 nm. Signál luminiscence z příslušných jamek byl snímán 11 sekund 1× za hodinu po dobu jednoho týdne. Délka experimentu byla umožněna dostatečným množstvím luciferinu a HEPES pufru. Analýza výsledků byla provedena pomocí skriptu (CellularRhythm) v softwaru R. Kvůli nedostatečné synchronizaci buněk nebyla z celkových 120 hod záznamu brána v potaz data z prvních 20 hod měření. Připravené látky byly testovány ve dvou koncentracích: pro deriváty BAPu 10 μ M a 50 μ M, pro deriváty KIN 5,6 μ M a 50 μ M a jako kontrola byl použit superkinetin-THP (8-amino-6-furfurylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin). V rámci série s benzylaminopurinem (Graf 1) vykazují všechny látky prodloužení periody oproti kontrole. Obecně lze říci, že testované látky vykazovaly markantnější prodloužení periody ve vyšší testované koncentraci.

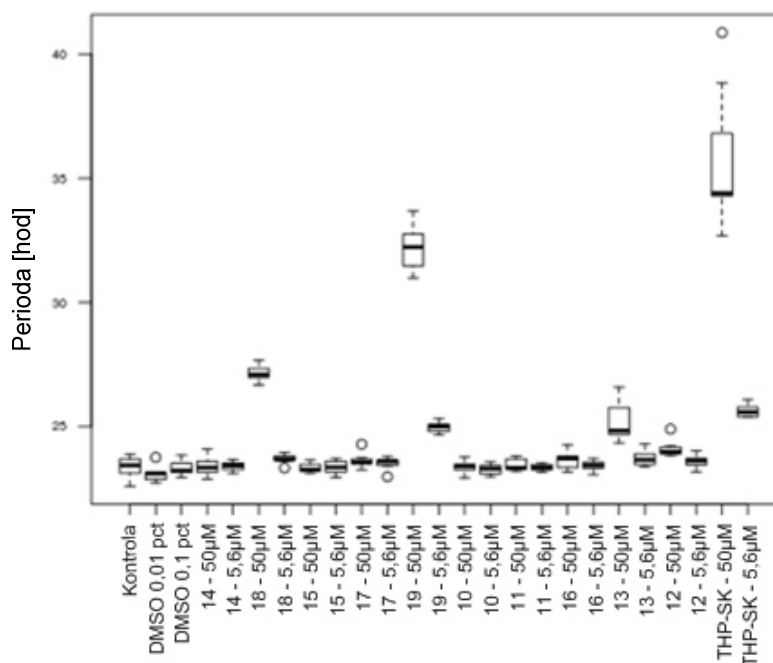


Graf 1. Vliv látek na periodu (hod) cirkadiánního rytmu u derivátů BAP. Výraznější změny v periodě byly pozorovány u látek 1, 4, 5, 9.

Nejnižší aktivitu vykazovaly látky **2** a **3**, u kterých došlo k zanedbatelnému prodloužení periody oproti zbylým derivátům na pouhých 27 hodin. Látky **2** a **3** ve své molekule obsahují heterocyklus (**2**: THF, **3**: THP) a navíc se jedná o chirální

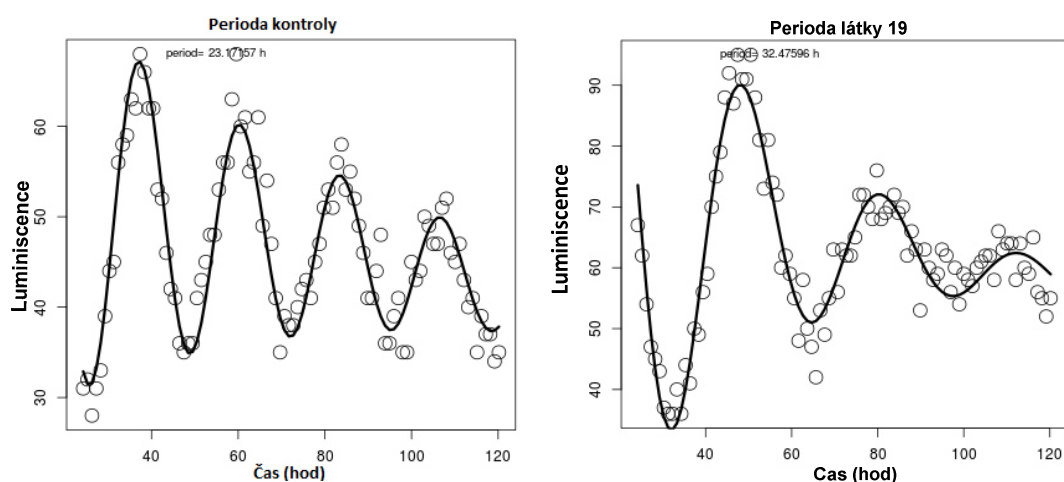
sloučeniny, které vytváří racemickou směs. Následovaly deriváty s jednoduchým alkanovým řetězcem obsahující halogen (látky **6-9**), kdy účinnější byly látky s chlorem v pozici C2, které prodloužily periodu asi na 29 hod – **8** a 35 hod – **9**. Největší prodloužení periody způsobily látky **1** (39 hod), **4** (44 hod) a **5** (52 hod). V případě látek **1** a **4** se jedná o deriváty obsahující cyklopentyl v poloze N9, s tím rozdílem, že větší prodloužení vykazovala látka **4** navíc s chlorem v pozici C2. Látka **5** s nejvýraznějším prodloužením periody obsahuje THP na N9-pozici a chlor na C2-pozici. Bohužel se jedná o chirální sloučeninu, čili biologická aktivita se může lišit v případě R a S enantiomeru. Z výsledků vyplývá, že chlor v pozici C2 hraje významnou roli na jejich aktivitu. Co se týče substituentu na pozici N9, tak nejvyšší aktivitu vykazoval THP a cyklická sloučenina cyklopentyl. Zajímavým poznatkem bylo, jak si můžeme všimnout na grafu, že v žádné testované koncentraci nedošlo k projevům cytotoxicity. Proto se nabízí možnost použití vyšších koncentrací testovaných látek než 50 μ M, kdy by pravděpodobně mohlo dojít k ještě výraznějšímu posunu periody, ale s tím problémem, že může docházet ke krystalizaci látek v médiu.

V rámci série látek odvozených od kinetinu (Graf 2) došlo k nepatrnému prodloužení periody v porovnání s deriváty BAPu. Biologická aktivita byla pozorována pouze u látek **13**, **18** a **19**, kdy došlo k prodloužení periody ve vyšší testované koncentraci přibližně o 2, 4, respektive 9 hodin.



Graf 2. Vliv látek na periodu (hod) cirkadiálního rytmu u derivátů KIN. Jako pozitivní kontrola byl použit SK-THP.

K prodloužení periody došlo u derivátů obsahujících heterocyklický kruh, tetrahydropyran-4-yl (látky **13**, **19**), tetrahydrofuran-3-yl (látky **18**). Stejně jako u aktivních derivátů odvozených od benzylaminopurinu vykazují slibnější aktivitu deriváty s chlorem v poloze C2 (látky **18**, **19**). Nejvýraznější prodloužení v obou testovaných koncentracích vykazovala látka **19**, jejíž prodloužení periody je zobrazeno v grafu 3. Problém představují látky **12** a **18**, které obsahují chirální uhlík na N9-substituentu. Z tohoto důvodu se může jednat o směs R a S enantiomerů s rozdílnou aktivitou, proto by bylo do budoucna vhodné odseparovat jednotlivé enantiomery na chirální koloně.

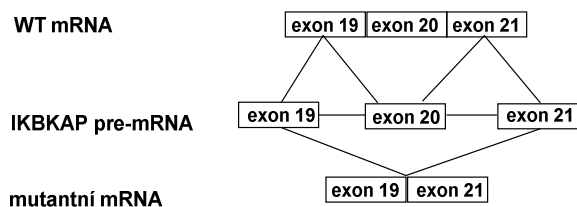


Graf 3. Ukázka záznamu měření luminiscence v jednotlivých jamkách 384-jamkové desky a proložení periodické funkce. Průměrná perioda kontroly je 23 hodin, v případě látky **19** došlo k prodloužení periody na 32 hodin.

V rámci obou serií z výsledků vyplývá, že pro aktivitu je nezbytný atom chloru v pozici C2 a cykloalkyl nebo oxacykloalkyl v pozici N9. Všechny aktivní látky prodlužovaly periodu hodin. Vzhledem ke strukturní podobnosti s longdaysinem bylo usouzeno, že látky pravděpodobně inhibují CK1, čili ovlivňují fosforylaci hodinových proteinů PER/CRY (Hirota a kol., 2010). Do budoucna by bylo vhodné tento předpoklad ověřit přímou interakcí připravených látek s CK1.

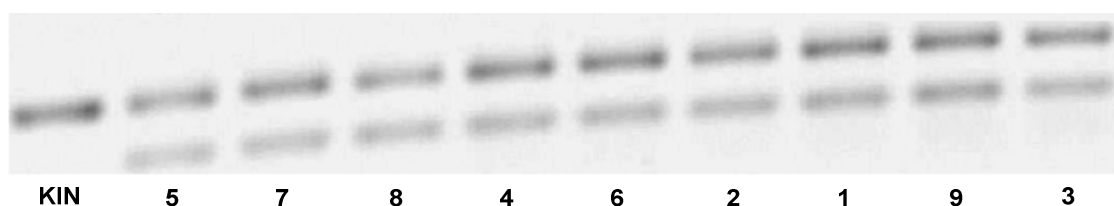
V mRNA sestřihovém biotestu se využívá schopnosti aktivních látek korigovat defektní sestřih pre-mRNA genu ELP1, který je hlavní příčinou familiární dysautonomie neboli Rileyova-Dayova syndromu. Jedná se o dědičnou autonomní vegetativní neuropatii 3. typu způsobenou mutacemi v ELP1 genu s incidencí 1:17 000 narozených dětí. Mutace ELP1 genu vedou k tkáňově specifickému vystřížení exonu 20 (exon skippingu), což vede ke vzniku nižších hladin normálního transkriptu a následně i proteinu (Obr. 18) (Slaugenhaupt a kol., 2004). Produkce mutantních alel vede k degeneraci sensorických a autonomních neuronů, což se projevuje sníženou vnímavostí bolesti a teploty, dysfunkcí zažívacího traktu zahrnující ztrátu papil

na jazyku, potíže s polykáním, gastroesofageálním refluxem, problémy s aspirací, zvýšenou citlivostí k rozvoji restričních onemocnění plic, nebezpečím hypertenzní krize a naopak posturální hypotenzí, emoční nestabilitou, vyšším procentem výskytu skoliózy páteře a aseptické osteonekrózy (Axelrod, 2004).



Obr. 18. Schéma defektního sestřihu u pacientů s familiární dysautomií. WT – alela divokého typu. Schéma upraveno dle Slaugenhaupt a kol., 2004.

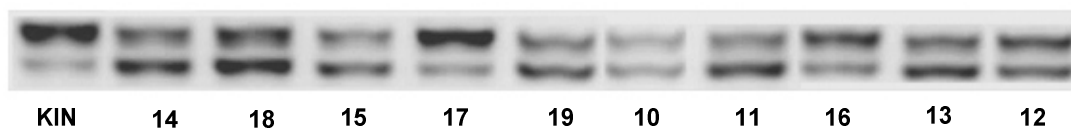
mRNA Sestřihový test spočívá v kultivaci lidských fibroblastů odvozených z pacientů s familiární dysautomií v přítomnosti testovaných látek. Po izolaci mRNA pomocí kitu TurboCapture 384 mRNA byl proveden přepis vyizolované mRNA do cDNA a namnožení produktů polymerázovou řetězovou reakcí. Následně byly získané produkty elektroforeticky rozseparovány na agarózovém gelu a detekovány pomocí UV-transiluminátoru. Cílem je sledování poměru normálního a mutantního transkriptu pomocí PCR po reverzní transkripci. Jako pozitivní kontrola byl použit kinetin. Kinetin výrazně zvyšuje množství funkčního ELP1 proteinu, u kterého nedošlo k vystřížení exonu 20 (Slaugenhaupt a kol., 2004). V případě, kdy dojde ke korekci sestřihového aparátu je na gelu viditelný pouze jeden horní proužek (normální transkript). Pokud jsou na gelu viditelné 2 proužky, buď nedošlo k žádné korekci spliceozomu a látka je neaktivní, nebo došlo pouze k částečné korekci, kdy je horní proužek výraznější a látka je částečně aktivní. V rámci série s 6-benzylaminopurinem nejevila žádná z testovaných látek výraznou biologickou aktivitu (Obr. 19).



Obr. 19. Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Testování aktivity N9-derivátů odvozených od BAPu v mRNA sestřihovém biotestu. Jednotlivá čísla označují testované látky. Jako kontrola byl použit kinetin (100 μ M).

V případě derivátů odvozených od kinetinu (Obr. 20), vykazovaly slibnou biologickou aktivitu látky **16** a **17**. Jedná se o deriváty obsahující ve své molekule chlor v pozici C2 a alifatický řetězec (3-methoxypropyl v případě látky **16**, 4-methoxybutyl

u látky **17**) v pozici *N9*. U látky **12** byl pozorován vznik dvou proužků se srovnatelnou intenzitou. Jedná se o derivát obsahující tetrahydrofuran-3-yl na pozici *N9*, který díky své struktuře může vytvářet racemickou směs. Všechny chirální látky (**2, 3, 5, 12, 18**) připravené jako racemická směs by bylo zajímavé a žádoucí připravit chirálně čisté a ověřit jejich biologické vlastnosti. Z výsledků vyplývá, že zásadní roli na aktivitu bude mít přítomnost chloru v pozici *C2* a stavba postranního řetězce na pozici *N9*.



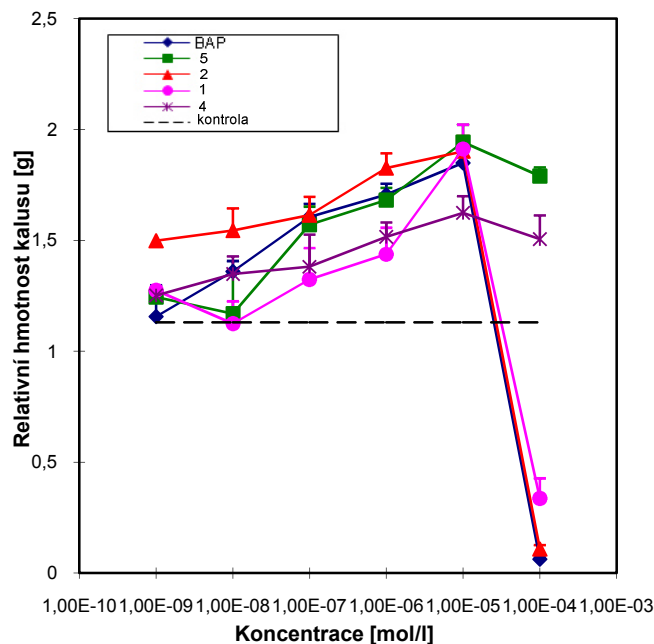
Obr. 20. Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Testování aktivity *N9*-derivátů odvozených od KINu v mRNA sestřihovém biotestu. Jednotlivá čísla označují testované látky. Jako kontrola byl použit kinetin (50 μ M).

Vzhledem k tomu, že se jedná o deriváty rostlinných hormonů cytokininů, zajímal nás také vliv připravených látek na rostlinné buňky. Byly provedeny dva standardní cytokininové biotesty – kalusový a senescenční biotest. V rámci kalusového biotestu byla otestována schopnost produktů stimulovat buněčné dělení cytokinin-dependentního kalusu tabáku, který je schopen růstu pouze v přítomnosti aktivního cytokininu. Biologická aktivita jednotlivých látek byla stanovena na základě relativního nárůstu hmotnosti kalusu v porovnání s BAPem jako pozitivní kontrolou. Obecně lze říci, že deriváty BAPu vykazovaly vyšší aktivitu než deriváty KINu (Tabulka 10).

Tabulka 10. Hodnoty hmotností kalusů po čtyřech týdnech kultivace. V kalusovém biotestu se využívá schopnosti derivátů cytokininů stimulovat buněčné dělení cytokinin dependentního kalusu tabáku, který je schopen proliferace pouze v přítomnosti cytokininu. Zaznamenává se relativní nárůst hmotnosti kalusu po 4 týdnech kultivace. Jako pozitivní kontrola byl použit BAP. Optimální koncentrace testovaných látek byla 10⁻⁵M.

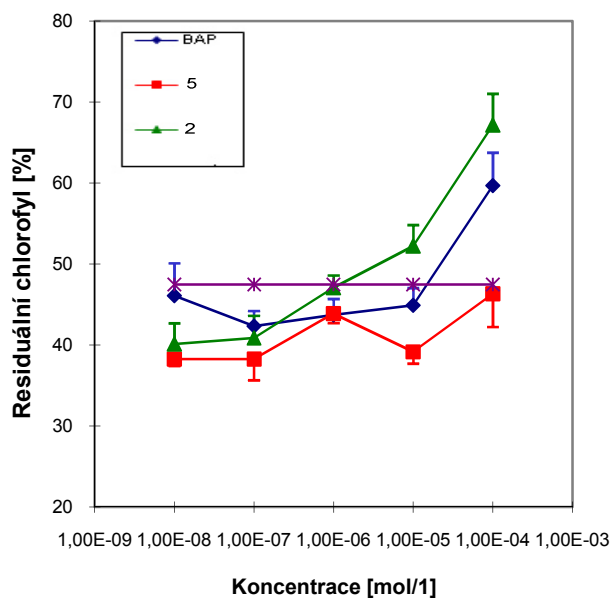
Látka	1	2	4	5	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Relativní nárůst kalusu [%]	109	107	69	113	31	61	15	37	37	31	67	42	36	48

Nejvyšší biologickou aktivitu vykazovaly látky **1, 2, 5**. Jedná se o deriváty BAPu, látka **1** s cyklopentylem v *N9*-poloze, látka **2** s THF jako *N9*-substituentem, zatímco látka **5** s THP v pozici *N9* a navíc chlorem v pozici *C2*. Ostatní deriváty vykazovaly ve srovnání s kontrolním vzorkem zanedbatelnou aktivitu. Zajímavé bylo, že deriváty **4** a **5** při porovnání s kontrolou a ostatními produkty nevykazovaly při koncentraci 10⁻⁵ mol/l tak výrazný cytotoxický efekt (Graf 4).



Graf 4. Tabákový kalusový biotest. Závislost čerstvé hmoty kalusu po 4 týdnech kultivace na koncentraci testovaných látek. BAP byl použit jako pozitivní kontrola. SD reprezentuje chybu v rámci triplikátu.

V senescenčním biotestu se využívá přirozené schopnosti cytokininů a jejich derivátů oddalovat stárnutí rostlinných pletiv a zároveň zabraňovat degradaci chlorofylu. Biotest byl proveden na listových segmentech pšenice ve tmě ponořených v roztoku testovaných látek po dobu 4 dnů. Po uplynutí doby kultivace byl z listových segmentů extrahován a spektrofotometricky stanoven residuální chlorofyl (Graf 5).



Graf 5. Senescenční biotest. Závislost zbytkového chlorofylu na koncentraci testovaných látek. BAP byl použit jako pozitivní kontrola.

Získané hodnoty (Tabulka 11) byly srovnány s hodnotami z výtažků čerstvých listů a z listů pěstovaných v deionizované vodě. Stejně jako u předchozího biotestu vykazují vysokou biologickou aktivitu látky **2** a **12** obsahující v pozici *N9* heterocyklus tetrahydrofuran. V porovnání s literaturou bylo potvrzeno, že derivát BAPu s THF (látko **2**) v pozici *N9* vykazoval dokonce vyšší aktivitu než přirozený BAP (Zhang a Letham, 1989). Další zajímavou aktivitu vykazují látky **11** a **17**, které ve své molekule obsahují 4-methoxybutylový substituent.

Tabulka 11. Hodnoty residuálního chlorofylu v senescenčním biotestu. Využívá se schopnosti derivátů cytokininů zabraňovat degradaci chlorofylu. Residuální chlorofyl se měří spektrofotometricky při 665 nm. Jako pozitivní kontrola byl použit BAP. Optimální koncentrace testovaných látek byla 10^{-4} M.

Látka	1	2	4	5	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Retence chlorofylu [%]	88	107	73	72	92	107	95	76	76	77	83	99	76	79

Zajímavým poznatkem bylo, že vyšší schopnost oddálit senescenci vykazovaly látky neobsahující v pozici C2 chlor. Z dosažených výsledků z obou testů vyplývá, že zásadní roli na aktivitu má typ a kombinace jednotlivých substituentů. U obou serií vykazují lepší výsledky heterocyklické substituenty v pozici *N9*. Výsledky obou uvedených biotestů nemusí být zcela objektivní díky délce trvání obou experimentů, kdy může docházet k rozkladu testované látky, či k různým metabolickým konverzím.

7 Závěr

Práce se zabývá syntézou a biologickou aktivitou purinových derivátů, konkrétně *N9*-derivátů odvozených od 6-benzylaminopurinu a kinetinu. Látky byly syntetizovány jako potencionální léčiva některých onemocnění centrální nervové soustavy. Teoretická část je věnována rešerši na téma cirkadiánní rytmus, konkrétně na jeho poruchy a terapeuticky aktivní látky se schopností měnit periodu rytmu. Cílem experimentální části byla příprava knihovny *N9*-purinových derivátů s nebo bez chloru v pozici C2 na purinovém skeletu s následným otestováním jejich biologické aktivity.

V rámci vytvořené knihovny bylo připraveno 9 derivátů odvozených od 6-benzylaminopurinu a 10 derivátů odvozených od kinetinu. Struktura připravených sloučenin byla ověřena pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod. Látky byly testovány na liniích umožňujících sledovat vliv na cirkadiánní rytmus a aberantní sestřih pre-mRNA genu ELP1. Vzhledem k strukturní podobnosti s rostlinnými hormony cytokininy byly také otestovány v tabákovém kalusovém a senescenčním biotestu. Z výsledků biologických testů vyplývá, že kombinace chloru v pozici C2 a heterocyklu v pozici *N9* má obecně významnou roli na aktivitu sloučenin. V cirkadiánním testu některé látky významně prodlužovaly periodu rytmu, kdy látka **5** prodloužila periodu až na 52 hodin. V případě mRNA sestřihového testu pouze látky **16** a **17** vykazovaly korekci defektního sestřihu. V rámci série s BAPem nebyla žádná z připravených látek aktivní. Výsledky standardních cytokininových biotestů se neliší od doposud publikovaných výsledků. V rámci tabákového kalusového biotestu vykazovaly vyšší aktivitu deriváty odvozené od BAPu, kdy látky **1**, **2** a **5** byly dokonce aktivnější než volná báze BAP. Zatímco v senescenčním biotestu byla aktivita BAP-derivátů i KIN-derivátů srovnatelná, s nejvyšší aktivitou u látek **2** a **11**. Vzhledem k dosaženým výsledkům v cirkadiánním testu by bylo do budoucna zajímavé ověření molekulárního působení na CK1 δ , protože jejich inhibice prodlužuje periodu. U chirálních molekul by bylo vhodné získat jednotlivé R a S enantiomery pro ověření jejich biologické aktivity. Zároveň dosažené výsledky naznačují potenciální uplatnění některých derivátů jako léčivo neurologických poruch.

8 Seznam literatury

- Arendt J. (1998) Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod.* **3**, 13-22.
- Axelrod F. B. (2004) Familial dysautonomia. *Muscle Nerve* **29**, 352-363.
- Baker C. L., Loros J. J., Dunlap J. C. (2012) The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 95-110.
- Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F. C., Rattan S. I. S. (1997) A mechanism for the in vivo formation of N6-furfuryladenine, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA. *FEBS Lett.* **414**, 457-460.
- Behrend L., Milne D. M., Stoter M., Deppert W., Campbell L. E., Meek D. W., Knippschild U. (2000) IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene* **19**, 5303-5313.
- Bhadra U., Thakkar N., Das P., Bhadra M. P. (2017) Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med.* **35**, 49-61.
- Bjorvatn B., Pallesen S. (2009) A practical approach to circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med. Rev.* **13**, 47-60.
- Bowie L. E., Maiuri T., Alpaugh M., Gabriel M., Arbez N., Galleguillos D., Hung C. L. K., Patel S., Xia J. R., Hertz N. T., Ross C. A., Litchfield D. W., Sipione S., Truant R. (2018) N6-Furfuryladenine is protective in Huntington's disease models by signaling huntingtin phosphorylation. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E7081-E7090.
- Bradley D., Williams G., Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.
- Brown S. A., Kowalska E., Dalmann R. (2012) (Re)inventing the circadian feedback loop. *Dev. Cell* **22**, 477-487.
- Burgess H. J., Sharkey K. M., Eastman C. I. (2002) Bright light, dark and melatonin can promote circadian adaptation in night shift workers. *Sleep Med. Rev.* **6**, 407-420.
- Catcheside D. E. A. (2000) *Neurospora* - Contributions of a model organism. *Science* **290**, 1706-1706.
- Cingi C., Emre I. E., Muluk N. B. (2018) Jetlag related sleep problems and their management: A review. *Travel Med. Infect. Dis.* **24**, 59-64.
- Crowley S. J., Carskadon M. A. (2010) Modifications to weekend recovery sleep delay circadian phase in older adolescents. *Chronobiol. Int.* **27**, 1469-1492.
- Culpepper L. (2010) The social and economic burden of shift-work disorder. *J. Fam. Pract.* **59**, S3-S11.

- Darlington T. K., Wager-Smith K., Ceriani M. F., Staknis D., Gekakis N., Steeves T. D. L., Weitz C. J., Takahashi J. S., Kay S. A. (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* **280**, 1599-1603.
- de Moura F. B., Vieira M. R. D., Simoes A. D., Ferreira-Silva S. L., de Souza C. A. V., de Souza E. S., da Rocha A. T., da Silva L. F., Junior M. A. (2018) Physiological effect of kinetin on the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes activities during production of *Anthurium*. *Hortic. Plant J.* **4**, 182-192.
- Dibner C., Schibler U., Albrecht U. (2010) The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 517-549.
- Dodson E. R., Zee P. C. (2010) Therapeutics for circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med. Clin.* **5**, 701-715.
- Doležal K., Popa I., Kryštof V., Spíchal L., Fojtíková M., Holub J., Lenobel R., Schmölling T., Strnad M. (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 875-884.
- Dunlap J. C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Dunlap J. C., Loros J. J. (2004) The *Neurospora* circadian system. *J. Biol. Rhythms* **19**, 414-424.
- Feldman J. F., Hoyle M. N. (1973) Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**, 606-613.
- Froehlich A. C., Liu Y., Loros J. J., Dunlap J. C. (2002) White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**, 815-819.
- Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., Ong E. S. (2005) Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **829**, 26-34.
- Gery S., Komatsu N., Baldjyan L., Yu A., Koo D., Koeffler H. P. (2006) The circadian gene *Per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol. Cell* **22**, 375-382.
- Golden S. S., Ishiura M., Johnson C. H., Kondo T. (1997) Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant Phys.* **48**, 327-354.
- Gotter A. L., Manganaro T., Weaver D. R., Kolakowski L. F., Possidente B., Sriram S., MacLaughlin D. T., Reppert S. M. (2000) A time-less function for mouse *Timeless*. *Nat. Neurosci.* **3**, 755-756.

- Grant D., Yin L., Collins J. L., Parks D. J., Orband-Miller L. A., Wisely G. B., Joshi S., Lazar M. A., Willson T. M., Zuercher W. J. (2010) GSK4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor Rev-erb alpha. *ACS Chem. Biol.* **5**, 925-932.
- Hardin P. E., Hall J. C., Rosbash M. (1990) Feedback of the *Drosophila* period gene-product on circadian cycling of its messenger-RNA level. *Nature* **343**, 536-540.
- Hardin P. E. (2004) Transcription regulation within the circadian clock: The E-box and beyond. *J. Biol. Rhythms* **19**, 348-360.
- Harmer S. L., Panda S., Kay S. A. (2001) Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 215-253.
- Hartley S., Dauvilliers Y., Quera-Salva M. A. (2018) Circadian rhythm disturbances in the blind. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **18**, 65-73.
- He B. K., Chen Z. (2016) Molecular targets for small-molecule modulators of circadian clocks. *Curr. Drug Metab.* **17**, 503-512.
- He Q., Cheng P., Yang Y. H., He Q. Y., Yu H. T., Liu Y. (2003) FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J.* **22**, 4421-4430.
- Helleboid S., Haug C., Lamottke K., Zhou Y. J., Wei J. B., Daix S., Cambula L., Rigou G., Hum D. W., Walczak R. (2014) The identification of naturally occurring neoruscogenin as a bioavailable, potent, and high-affinity agonist of the nuclear receptor ROR alpha (NR1F1). *J. Biomol. Screen.* **19**, 399-406.
- Hirota T., Lee J. W., Lewis W. G., Zhang E. E., Breton G., Liu X. Z., Garcia M., Peters E. C., Etchegaray J. P., Traver D., Schultz P. G., Kay S. A. (2010) High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CKI alpha as a clock regulatory kinase. *PLoS Biol.* **8**, 559-573.
- Hirota T., Lee J. W., St John P. C., Sawa M., Iwaisako K., Noguchi T., Pongsawakul P. Y., Sonntag T., Welsh D. K., Brenner D. A., Doyle F. J., Schultz P. G., Kay S. A. (2012) Identification of small molecule activators of cryptochrome. *Science* **337**, 1094-1097.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998) Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regul.* **26**, 109-115.
- Hönig M., Plíhalová L., Spíchal L., Gruz J., Kadlecová A., Voller J., Svobodová A. R., Vostálová J., Ulrichová J., Doležal K., Strnad M. (2018) New cytokinin derivatives possess UVA and UVB photoprotective effect on human skin cells and prevent oxidative stress. *Eur. J. Med. Chem.* **150**, 946-957.

- Huang L. K., Cheng Y. C., Cheng Y. R., Jang J. P., Chao Y. L., Cheng Y. J. (2007) An efficient synthesis of substituted cytosines and purines under focused microwave irradiation. *Tetrahedron* **63**, 5323-5327.
- Huang N. A., Chelliah Y., Shan Y. L., Taylor C. A., Yoo S. H., Partch C., Green C. B., Zhang H., Takahashi J. S. (2012) Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. *Science* **337**, 189-194.
- Chen Z., Yoo S. H., Takahashi J. S. (2018) Development and therapeutic potential of small-molecule modulators of circadian systems. *Annu. Rev. Pharmacol.* **58**, 231-252.
- Chun S. K., Jang J., Chung S., Yun H., Kim N. J., Jung J. W., Son G. H., Suh Y. G., Kim K. (2014) Identification and validation of cryptochrome inhibitors that modulate the molecular circadian clock. *ACS Chem. Biol.* **9**, 703-710.
- Chun S. K., Chung S., Kim H. D., Lee J. H., Jang J., Kim J., Kim D., Son G. H., Oh Y. J., Suh Y. G., Lee C. S., Kim K. (2015) A synthetic cryptochrome inhibitor induces anti-proliferative effects and increases chemosensitivity in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **467**, 441-446.
- Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y. (2002) Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ.* **13**, 19-26.
- Itaya T., Matsumoto H., Ogawa K. (1980) Syntheses of *N,N*,3- and *N,N*,9-trialkyladenines by alkylation of *N,N*-dialkyladenines. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1920-1924.
- Iwasaki H., Kondo T. (2004) Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. *J. Biol. Rhythms* **19**, 436-444.
- Kadlecová A., Jirsa T., Novák O., Kammenga J., Strnad M., Voller J. (2018) Natural plant hormones cytokinins increase stress resistance and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* **19**, 109-120.
- Kanathur N., Harrington J., Lee-Chiong T. (2010) Circadian rhythm sleep disorders. *Clin. Chest Med.* **31**, 319-+.
- Kharitonov A., Shiyanova T. L., Koester A., Ford A. M., Micanovic R., Galbreath E. J., Sandusky G. E., Hammond L. J., Moyers J. S., Owens R. A., Gromada J., Brozinick J. T., Hawkins E. D., Wroblewski V. J., Li D.-S., Mehrbod F., Jaskunas S. R., Shanafelt A. B. (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* **115**, 1627-1635.
- Ko C. H., Takahashi J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **15**, R271-R277.

- Kojetin D., Wang Y., Kamenecka T. M., Burris T. P. (2011) Identification of SR8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB. *ACS Chem. Biol.* **6**, 131-134.
- Kojetin D. J., Burris T. P. (2014) REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discovery* **13**, 197-216.
- Kondo T., Tsinoremas N. F., Golden S. S., Johnson C. H., Kutsuna S., Ishiura M. (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria *Science* **266**, 1233-1236.
- Kumar N., Solt L. A., Conkright J. J., Wang Y., Istrate M. A., Busby S. A., Garcia-Ordenez R., Burris T. P., Griffin P. R. (2009) The benzenesulfonamide T0901317 is a novel ROR α/γ Inverse Agonist. *Mol. Pharmacol.* **76**, 935-1129.
- Kumar N., Solt L. A., Wang Y., Rogers P. M., Bhattacharyya G., Kamenecka T. M., Stayrook K. R., Crumbley C., Floyd Z. E., Gimble J. M., Griffin P. R., Burris T. P. (2010) Regulation of adipogenesis by natural and synthetic REV-ERB ligands. *Endocrinology* **151**, 3015-3025.
- Kumar N., Kojetin D. J., Solt L. A., Kumar K. G., Nuhant P., Duckett D. R., Cameron M. D., Butler A. A., Roush W. R., Griffin P. R., Burris T. P. (2011) Identification of SR3335 (ML-176): A Synthetic ROR α Selective Inverse Agonist. *ACS Chem. Biol.* **6**, 218-222.
- Lee H. M., Chen R. M., Kim H., Etchegaray J. P., Weaver D. R., Lee C. (2011) The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16451-16456.
- Lee J. W., Hirota T., Kumar A., Kim N. J., Irle S., Kay S. A. (2015) Development of small-molecule cryptochrome stabilizer derivatives as modulators of the circadian clock. *ChemMedChem* **10**, 1489-1497.
- Lee J. W., Hirota T., Ono D., Honma S., Honma K., Park K., Kay S. A. (2019) Chemical control of mammalian circadian behavior through dual inhibition of casein kinase 1 α and δ . *J. Med. Chem.* **62**, 1989-1998.
- Levi F., Schibler U. (2007) Circadian rhythms: Mechanisms and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol.* **47**, 593-628.
- Lowrey P. L., Takahashi J. S. (2004) Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 407-441.
- Lowrey P. L., Takahashi J. S. (2011) Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. In *Advances in Genetics*, Vol. 74, pp. 175-230, Academic Press, San Diego, CA, USA.

- Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F., Okamura H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302**, 255-259.
- Miller C. O., Skoog F., Vonsaltza M. H., Strong F. M. (1955) Kinetin, A cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1392.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Vonsaltza M. H., Strong F. M. (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375-1380.
- Miller C. O. (1961) Growth and development - kinetin and related compounds in plant growth. *Annu. Rev. Plant Phys.* **12**, 395-&.
- Mohawk J. A., Takahashi J. S. (2011) Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends Neurosci.* **34**, 349-358.
- Moline M. L., Pollak C. P., Monk T. H., Lester L. S., Wagner D. R., Zendell S. M., Graeber R. C., Salter C. A., Hirsch E. (1992) Age-related differences in recovery from simulated jet-lag. *Sleep* **15**, 28-40.
- Monk T. H. (2009) Shift work and circadian rhythms. In *Vol. 10*, pp. 777-781, Academic Press, Oxford.
- Nakamichi N. (2011) Molecular Mechanisms Underlying the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1709-1718.
- Nievergelt C. M., Kripke D. F., Barrett T. B., Burg E., Remick R. A., Sadovnick A. D., McElroy S. L., Keck P. E., Schork N. J., Kelsoe J. R. (2006) Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. *Am. J. Med. Genet. B* **141B**, 234-241.
- Oshima T., Yamanaka I., Kumar A., Yamaguchi J., Nishiwaki-Ohkawa T., Muto K., Kawamura R., Hirota T., Yagita K., Irle S., Kay S. A., Yoshimura T., Itami K. (2015) C-H activation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock. *Angew. Chem. Int. Edit.* **54**, 7193-7197.
- Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Cardinali P. D., Monti M. J. (2006) Could agomelatine be the ideal antidepressant? *Expert Rev. Neurother.* **6**, 1595-1608.
- Pardee K. I., Xu X., Reinking J., Schuetz A., Dong A., Liu S., Zhang R., Tiefenbach J., Lajoie G., Plotnikov A. N., Botchkarev A., Krause H. M., Edwards A. (2009) The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERB β . *PLoS Biol.* **7**, e1000043.
- Partch C. L., Green C. B., Takahashi J. S. (2014) Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* **24**, 90-99.

- Paul M. A., Gray G. W., Lieberman H. R., Love R. J., Miller J. C., Trouborst M., Arendt J. (2011) Phase advance with separate and combined melatonin and light treatment. *Psychopharmacology* **214**, 515-523.
- Pett J. P., Korencic A., Wesener F., Kramer A., Herzog H. (2016) Feedback loops of the mammalian circadian clock constitute repressilator. *PLoS Comput. Biol.* **12**, 1-15.
- Pevet P., Challet E. (2011) Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J Physiol-Paris* **105**, 170-182.
- Pretl M. (2014) Poruchy cirkadiánniho rytmu. *Practicus* **13**, 25-28.
- Ramzaeva N. P., Goncharova I. N., Lidak M. Y., Gol'dberg Y. S., Shimanskaya M. V. (1987) Alkylation of some 6-substituted purines under interphase catalysis conditions. *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)* **23**, 93-98.
- Reddy A. B., Rey G. (2014) Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes. In *Annual Review of Biochemistry, Vol. 83*, pp. 165-189, US.
- Richmond A. E., Lang A. (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached xanthium leaves. *Science* **125**, 650-651.
- Rogers P. M., Ying L., Burris T. P. (2008) Relationship between circadian oscillations of Rev-erb alpha expression and intracellular levels of its ligand, heme. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **368**, 955-958.
- Romanowski A., Yanovsky M. J. (2015) Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Front Plant Sci* **6**, 437-448.
- Roseboom P. H., Coon S. L., Baler R., McCune S. K., Weller J. L., Klein D. C. (1996) Melatonin synthesis: Analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* **137**, 3033-3044.
- Scott E. M., Carter A. M., Grant P. J. (2008) Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int. J. Obes.* **32**, 658-662.
- Sharma S. P., Kaur P., Rattan S. I. S. (1995) Plant-growth hormone kinetin delays aging, prolongs the life-span and slows down development of the fruit-fly *Zaprionus paravittiger*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **216**, 1067-1071.
- Shearman L. P., Sriram S., Weaver D. R., Maywood E. S., Chaves I., Zheng B. H., Kume K., Lee C. C., van der Horst G. T. J., Hastings M. H., Reppert S. M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019.
- Schafmeier T., Haase A., Kaldi K., Scholz J., Fuchs M., Brunner M. (2005) Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* **122**, 235-246.

- Schibler U., Naef F. (2005) Cellular oscillators: rhythmic gene expression and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 223-229.
- Schwartz W. J., de la Iglesia H. O., Zlomanczuk P., Illnerova H. (2001) Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: Photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* **16**, 302-311.
- Slaugenhaupt S. A., Mull J., Leyne M., Cuajungco M. P., Gill S. P., Hims M. M., Quintero F., Axelrod F. B., Gusella J. F. (2004) Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 429-436.
- Smith M. R., Revell V. L., Eastman C. I. (2009) Phase advancing the human circadian clock with blue-enriched polychromatic light. *Sleep Med.* **10**, 287-294.
- Srinivasan V., Spence D. W., Pandi-Perumal S. R., Trakht I., Cardinali D. P. (2008) Jet lag: Therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs. *Travel Med. Infect. Dis.* **6**, 17-28.
- Stratmann M., Schibler U. (2006) Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J. Biol. Rhythms* **21**, 494-506.
- Takahashi J. S., Hong H. K., Ko C. H., McDearmon E. L. (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 764-775.
- Takahashi J. S. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 164-179.
- Takano A., Uchiyama M., Kajimura N., Mishima K., Inoue Y., Kamei Y., Kitajima T., Shibui K., Katoh M., Watanabe T., Hashimoto-dani Y., Nakajima T., Ozeki Y., Hori T., Yamada N., Toyoshima R., Ozaki N., Okawa M., Nagai K., Takahashi K., Isojima Y., Yamauchi T., Ebisawa T. (2004) A missense variation in human casein kinase I epsilon gene that induces functional alteration and shows an inverse association with circadian rhythm sleep disorders. *Neuropsychopharmacol.* **29**, 1901-1909.
- Tamai T. K., Nakane Y., Ota W., Kobayashi A., Ishiguro M., Kadofusa N., Ikegami K., Yagita K., Shigeyoshi Y., Sudo M., Nishiwaki-Ohkawa T., Sato A., Yoshimura T. (2018) Identification of circadian clock modulators from existing drugs. *EMBO Mol. Med.* **10**, 1-12.
- Thorpy M. J. (2012) Classification of sleep disorders. *Neurotherapeutics* **9**, 687-701.
- Trump R. P., Bresciani S., Cooper A. W. J., Tellam J. P., Wojno J., Blaikley J., Orband-Miller L. A., Kashatus J. A., Boudjelal M., Dawson H. C., Loudon A., Ray D., Grant D., Farrow S. N., Willson T. M., Tomkinson N. C. O. (2013) Optimized chemical probes for REV-ERB α . *J. Med. Chem.* **56**, 4729-4737.

- Wallach T., Kramer A. (2015) Chemical chronobiology: Toward drugs manipulating time. *FEBS Lett.* **589**, 1530-1538.
- Walton K. M., Fisher K., Rubitski D., Marconi M., Meng Q. J., Sladek M., Adams J., Bass M., Chandrasekaran R., Butler T., Griffor M., Rajamohan F., Serpa M., Chen Y., Claffey M., Hastings M., Loudon A., Maywood E., Ohren J., Doran A., Wager T. T. (2009) Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 430-439.
- Wang Y., Kumar N., Crumbley C., Griffin P. R., Burris T. P. (2010) A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 917-923.
- Wang Y., Solt L. A., Kojetin D. J., Burris T. P. (2012) Regulation of p53 stability and apoptosis by a ROR agonist. *PLoS One* **7**, e34921-e34921.
- Wickwire E. M., Geiger-Brown J., Scharf S. M., Drake C. L. (2017) Shift work and shift work sleep disorder clinical and organizational perspectives. *Chest* **151**, 1156-1172.
- Woon P. Y., Kaisaki P. J., Braganca J., Bihoreau M. T., Levy J. C., Farrall M., Gauguier D. (2007) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14412-14417.
- Xu Y., Mori T., Johnson C. H. (2003) Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the kaiBC promoter in regulating KaiC. *EMBO J.* **22**, 2117-2126.
- Xu Y., Padiath Q. S., Shapiro R. E., Jones C. R., Wu S. C., Saigoh N., Saigoh K., Ptacek L. J., Fu Y. H. (2005) Functional consequences of a CKI delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* **434**, 640-644.
- Zatloukal M., Jorda R., Gucký T., Řezníčková E., Voller J., Pospíšil T., Malínková V., Adamcová H., Kryštof V., Strnad M. (2013) Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **61**, 61-72.
- Zee P. C., Vitiello M. V. (2009) Circadian rhythm sleep disorder: Irregular sleep wake rhythm type. *Sleep Med. Clin.* **4**, 213-218.
- Zee P. C., Attarian H., Videnovic A. (2013) Circadian rhythm abnormalities. *Continuum* **19**, 132-147.
- Zhang R., Letham D. S. (1989) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. 3. The senescence-retarding activity and metabolism of 9-substituted 6-benzylaminopurines in soybean leaves. *J. Plant Growth Regul.* **8**, 181-197.

Internetové zdroje

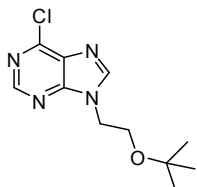
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02274051>

15. 4. 2019

9 Přílohy

9.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených látek

9-(2-(*tert*-butoxy)ethyl)-6-chlor-9*H*-purin (I)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₁H₁₅ClN₄O, výtěžek: 89 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,52; 98,8.

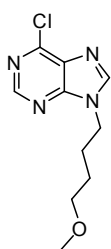
ESI⁺-MS m/z: 255,2 [M+H]⁺.

TLC: PeEt/EtOAc (1:1, v/v), R_f = 0,38.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,96 (s, 9H); 3,68 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H); 4,39 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H); 8,62 (s, 1H); 8,78 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 27,0 (3C, -C(CH₃)₃); 44,6 (CH₂CH₂O*t*Bu); 59,2 (CH₂CH₂O*t*Bu); 72,9 (-C(CH₃)₃); 130,0 (pur C5); 147,5 (pur C8); 148,0 (pur C6); 151,4 (pur C4); 151,9 (pur C2).

6-chlor-9-(4-methoxybutyl)-9*H*-purin (II)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₀H₁₃ClN₄O, výtěžek: 67 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,61; 84,1.

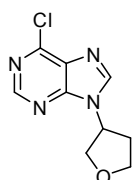
ESI⁺-MS m/z: 241,2 [M+H]⁺.

TLC: PeEt/EtOAc (1:1, v/v), R_f = 0,37.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,43-1,49 (m, 2H); 1,85-1,92 (m, 2H); 3,30 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,41 (s, 3H); 4,29 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H); 8,71 (s, 1H); 8,77 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 26,1 (2C, CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃, CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 43,7 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 57,8 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 71,1 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 130,8 (pur C5); 147,5 (pur C8); 148,9 (pur C6); 151,4 (pur C4); 151,2 (pur C2).

6-chlor-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin (III)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₉H₉ClN₄O, výtěžek: 23 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 9,93; 92,5.

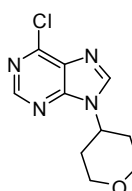
ESI⁺-MS m/z: 225,1 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,55.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,32-2,38 (m, 1H); 2,43-2,46 (m, 1H); 3,86 (td, *J* = 8,7, 5,6 Hz, 1H); 3,97 (dd, *J* = 9,8, 5,8 Hz, 1H); 4,03 (dd, *J* = 9,8, 3,1 Hz, 1H); 4,10-4,16 (m, 1H); 5,30-5,35 (m, 1H); 8,68 (s, 1H); 8,79 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31,6 (THF C5); 55,0 (THF C3); 66,5 (THF C2); 71,6 (THF C4); 131,0 (pur C5); 141,1 (pur C8); 145,7 (pur C6); 149,0 (pur C4); 151,3 (pur C2).

6-chlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-9H-purin (IV)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}$, výtěžek: 42 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 11,76; 99,9.

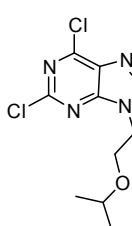
ESI⁺-MS m/z: 239,1 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,50$.

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2,00 (dq, $J = 12,4, 1,8$ Hz, 2H); 2,24 (qd, $J = 12,3, 4,5$ Hz, 2H); 3,52 (td, $J = 12,0, 1,9$ Hz, 2H); 4,01 (dd, $J = 11,6, 4,6$ Hz, 2H); 4,78 (tt, $J = 12,0, 4,2$ Hz, 1H); 8,78 (s, 1H); 8,84 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31,9 (THP C3, THP C5); 52,0 (THP C4); 66,1 (THP C2, THP C6); 131,1 (pur C5); 145,9 (pur C8); 149,0 (pur C6); 151,2 (pur C4); 151,4 (pur C2).

2,6-dichlor-9-(2-isopropoxyethyl)-9H-purin (V)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$, výtěžek: 74 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,52; 99,9.

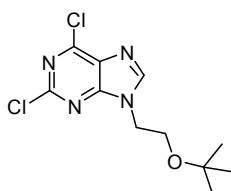
ESI⁺-MS m/z: 275,3 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,65$.

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 0,98 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H); 3,47-3,55 (m, $J = 6,1$ Hz, 1H); 3,73 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H); 4,37 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H); 8,66 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 21,8 (2C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 44,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 64,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 70,9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 130,3 (pur C5); 148,8 (pur C8); 149,5 (pur C6); 150,8 (pur C4); 153,5 (pur C2).

9-(2-(terc-butoxy)ethyl)-2,6-dichlor-9H-purin (VI)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$, výtěžek: 76 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 25,25; 96,2.

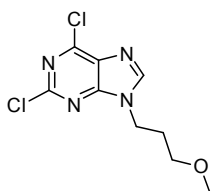
ESI⁺-MS m/z: 289,4 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,59$.

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 0,98 (s, 9H); 3,66 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H); 4,34 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H); 8,65 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 27,0 (3C, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 44,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OtBu}$); 59,1 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OtBu}$); 73,0 ($-\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 130,2 (pur C5); 146,6 (pur C8); 149,5 (pur C6); 150,7 (pur C4); 153,2 (pur C2).

2,6-dichlor-9-(3-methoxypropyl)-9H-purin (VII)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$, výtěžek: 74 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 16,81; 90,3.

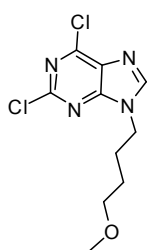
ESI⁺-MS m/z: 262,1 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,41$.

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2,02-2,08 (m, $J = 6,5$ Hz, 2H); 3,18 (s, 3H); 3,32 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H); 4,29 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 8,72 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 28,8 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 41,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 57,9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCH}_3$); 68,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCH}_3$); 130,4 (pur C5); 148,6 (pur C8); 149,4 (pur C6); 150,8 (pur C4); 153,5 (pur C2).

2,6-dichlor-9-(4-methoxybutyl)-9H-purin (VIII)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$, výtěžek: 44 %.

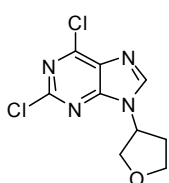
HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,88; 56,4.

ESI⁺-MS m/z: 275,4 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,50$.

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,44-1,52 (m, 2H); 1,82-1,91 (m, 2H); 3,19 (s, 3H); 3,30 (t, $J = 3,1$ Hz, 2H); 4,24 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 8,75 (s, 1H).

2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9H-purin (IX)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}$, výtěžek: 64 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,85; 61,4.

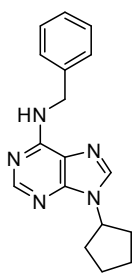
ESI⁺-MS m/z: 259,4 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,37$.

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2,31 (q, 1H); 2,51 (q, 1H); 3,80-3,87 (m, 1H); 3,90-3,95 (m, 1H); 4,01 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 4,12 (d, 1H); 5,24-5,30 (m, 1H); 8,70 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31,6 (THF C4); 55,2 (THF C3); 66,5 (THF C5); 71,6 (THF C2); 130,6 (pur C5); 146,6 (pur C8); 149,5 (pur C6); 150,7 (pur C4); 153,2 (pur C2).

***N*-benzyl-9-cyclopentyl-9*H*-purin-6-amin (1)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₉N₅, výtěžek: 56 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 25,60; 99,9.

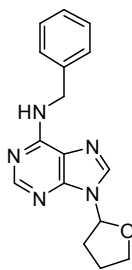
ESI⁺-MS m/z: 294,4 [M+H]⁺.

TLC: PeEt/EtOAc (1:1, v/v), R_f = 0,15.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,65-1,71 (m, 2H); 1,83-1,88 (m, 2H); 1,95-2,02 (m, 2H); 2,09-2,15 (m, 2H); 4,68 (bs, 2H); 4,83 (pent, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,17-7,20 (m, 1H); 7,27 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,32 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 8,18 (s, 1H); 8,21 (s, 1H); 8,30 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2× 23,5; 2×31,9; 42,8; 55,3; 119,5; 126,5; 2×127,1; 2×128,1; 139,3; 140,2; 148,8; 152,0; 154,3.

***N*-benzyl-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (2)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₆H₁₇N₅O, výtěžek: 35 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,63; 99,3.

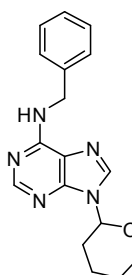
ESI⁺-MS m/z: 296,3 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,75.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,97-2,03 (m, 1H); 2,17-2,23 (m, 1H); 2,37-2,46 (m, 2H); 3,89 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H); 4,12 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H); 4,69 (bs, 2H); 6,25 (dd, *J* = 6,9, 3,8 Hz, 1H); 7,19 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,27 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,32 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 8,19 (s, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,36 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,4; 31,1; 42,8; 68,6; 84,3; 119,5; 126,5; 2× 127,1; 2×128,1; 139,1; 140,1; 148,3; 152,4; 154,3.

***N*-benzyl-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (3)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₉N₅O, výtěžek: 44 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,92; 99,9.

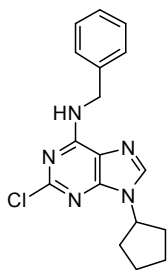
ESI⁺-MS m/z: 310,1 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,64.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H); 1,69-1,73 (m, 1H); 1,90-1,96 (m, 2H); 2,23-2,29 (m, 1H); 3,63-3,68 (m, 1H); 3,97-4,00 (m, 1H); 4,69 (bs, 2H); 5,62 (dd, *J* = 11,2, 2,0 Hz, 1H); 7,19 (tt, *J* = 7,2, 1,6 Hz, 1H); 7,27 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,32 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 8,20 (s, 1H); 8,35 (s, 1H); 8,39 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,5; 24,5; 30,0; 42,8; 67,6; 80,8; 119,0; 126,5; 2× 127,1; 2× 128,2; 138,8; 140,0; 148,4; 152,6; 154,3.

***N*-benzyl-2-chlor-9-cyclopentyl-9*H*-purin-6-amin (4)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅, výtěžek: 73 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 28,85; 99,9.

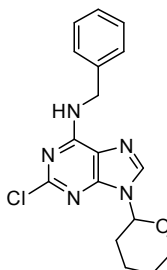
ESI⁺-MS m/z: 328,4 [M+H]⁺.

TLC: PeEt/EtOAc (1:1, v/v), R_f = 0,24.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,65-1,68 (m, 2H); 1,83-1,86 (m, 2H); 1,91-1,94 (m, 2H); 2,10-2,13 (m, 2H); 4,62 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 4,76 (pent, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,21 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H); 7,28-7,33 (m, 4H); 8,25 (s, 1H); 8,81 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2× 23,4; 2×32,0; 43,0; 55,4; 118,4; 126,8; 2×127,3; 2×128,2; 139,3; 139,8; 149,7; 152,7; 154,9.

***N*-benzyl-2-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (5)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅O, výtěžek: 46 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 27,38; 99,9.

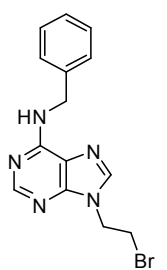
ESI⁺-MS m/z: 344,4 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,67.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,52-1,56 (m, 2H); 1,69-1,73 (m, 1H); 1,91-1,92 (m, 2H); 2,15-2,21 (m, 1H); 3,64-3,69 (m, 1H); 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H); 4,64 (d, *J* = 4,3 Hz, 2H); 5,55 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 7,21 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H); 7,28-7,33 (m, 4H); 8,38 (s, 1H); 8,89 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,3; 24,4; 29,9; 43,1; 67,6; 80,8; 118,0; 126,8; 2× 127,2; 2×128,3; 139,2; 139,4; 149,3; 153,3; 154,9.

***N*-benzyl-9-(2-bromethyl)-9*H*-purin-6-amin (6)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₄BrN₅, výtěžek: 29 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,63; 98,7.

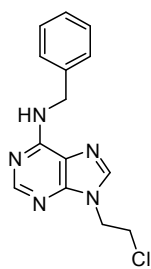
ESI⁺-MS m/z: 332,5 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,76.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,94 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); 4,57 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 4,69 (bs, 2H); 7,19 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,28 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,33 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 8,19-8,20 (m, 2H); 8,38 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,4; 42,7; 44,5; 118,8; 126,4; 2×126,9; 2×128,0; 139,9; 140,7; 148,7; 152,2; 154,1.

***N*-benzyl-9-(2-chlorethyl)-9*H*-purin-6-amin (7)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₄ClN₅, výtěžek: 61 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,12; 99,5.

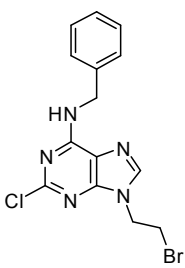
ESI⁺-MS m/z: 288,5 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,77.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,06 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); 4,50 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); 4,69 (bs, 2H); 7,19 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,28 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,33 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 8,19 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,38 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,8; 42,9; 44,7; 119,0; 126,5; 2× 127,1; 2× 128,1; 140,1; 141,0; 148,9; 152,4; 154,3.

***N*-benzyl-9-(2-bromethyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (8)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₃BrClN₅, výtěžek: 40 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 27,02; 99,9.

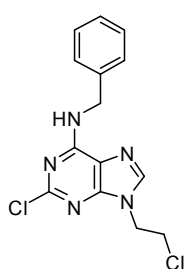
ESI⁺-MS m/z: 366,6 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,66.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,90 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 4,53 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); 4,63 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H); 7,22 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H); 7,29-7,34 (m, 4H); 8,21 (s, 1H); 8,88 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 32,0; 43,6; 45,3; 118,6; 127,3; 2× 127,8; 2× 128,8; 139,7; 142,0; 150,4; 153,6; 155,4.

***N*-benzyl-2-chlor-9-(2-chlorethyl)-9*H*-purin-6-amin (9)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₃Cl₂N₅, výtěžek: 85 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 26,58; 98,7.

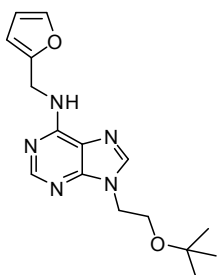
ESI⁺-MS m/z: 322,6 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,64.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,03 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); 4,47 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); 4,63 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H); 7,22 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H); 7,30 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,33 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 8,21 (s, 1H); 8,88 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,9; 43,1; 44,8; 118,0; 126,8; 2× 127,3; 2× 128,3; 139,2; 141,6; 149,9; 153,1; 154,9.

9-(2-(*tert*-butoxy)ethyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (10)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₆H₂₁N₅O₂, výtěžek: 48 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,89; 99,9.

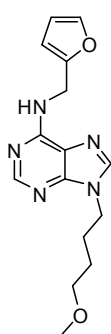
ESI⁺-MS m/z: 316,2 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,50.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,99 (s, 9H); 3,63 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H); 4,22 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H); 4,67 (bs, 2H); 6,21 (dd, *J* = 3,2, 0,8 Hz, 1H); 6,34 (dd, *J* = 3,1, 1,8 Hz, 1H); 7,53 (dd, *J* = 1,8, 0,9 Hz, 1H); 8,07 (s, 1H); 8,14 (bs, 1H); 8,23 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 27,0 (3C, -C(CH₃)₃); 36,4 (CH₂-fur); 43,7 (CH₂CH₂O*t*Bu); 59,5 (CH₂CH₂O*t*Bu); 72,8 (-C(CH₃)₃); 106,6 (fur C3); 110,4 (fur C4); 118,9 (pur C5); 141,4 (pur C8); 141,7 (fur C5); 148,9 (pur C4); 152,1 (fur C2); 153,0 (pur C2); 154,0 (pur C6).

N-(furan-2-ylmethyl)-9-(4-methoxybutyl)-9*H*-purin-6-amin (11)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₉N₅O₂, výtěžek: 47 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,53; 99,9.

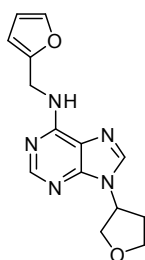
ESI⁺-MS m/z: 302,2 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,47.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,41-1,46 (m, 2H); 1,79-1,85 (m, 2H); 3,17 (s, 3H); 3,29 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 4,15 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 4,67 (s, 2H, pur H8, pur-NH); 6,22 (dd, *J* = 3,2, 0,8 Hz, 1H); 6,34 (dd, *J* = 3,4, 1,8 Hz, 1H); 7,52 (dd, *J* = 1,8, 0,9 Hz, 1H); 8,16 (s, 2H); 8,22 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 26,1 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 26,3 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 36,4 (CH₂-fur); 42,7 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 57,8 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 71,1 (CH₂CH₂CH₂CH₂OCH₃); 106,6 (fur C3); 110,4 (fur C4); 119,1 (pur C5); 140,9 (pur C8); 141,7 (fur C5); 149,0 (pur C4); 152,1 (pur C2); 153,0 (fur C2); 154,0 (pur C6).

N-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-6-amin (12)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₅N₅O₂, výtěžek: 65 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 14,99; 99,9.

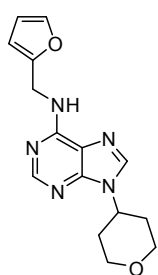
ESI⁺-MS m/z: 286,2 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,32.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2,26-2,31 (m, 1H); 2,43-2,48 (m, 1H); 3,85 (td, $J = 8,6, 5,6$ Hz, 1H); 3,93-3,98 (m, 2H); 4,09 (dd, $J = 15,1, 8,1$ Hz, 1H); 4,67 (s, 2H); 5,15-5,19 (m, 1H); 6,21 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,34 (dd, $J = 3,4, 1,8$ Hz, 1H); 7,52 (dd, $J = 1,8, 0,9$ Hz, 1H); 8,16 (s, 1H); 8,24 (s, 2H, pur NH, H2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31,8 (THF C5); 36,4 ($\text{CH}_2\text{-fur}$); 54,0 (THF C3); 66,5 (THF C2); 71,7 (THF C4); 106,6 (fur C3); 110,4 (fur C4); 119,3 (pur C5); 138,9 (pur C8); 141,7 (fur C5); 148,7 (pur C4); 152,1 (fur C2); 153,0 (pur C2); 154,1 (pur C6).

***N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-9H-purin-6-amin (13)**



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2$, výtěžek: 72 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 15,96; 93,7.

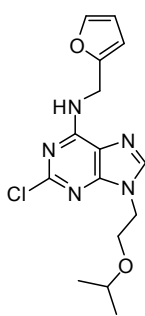
ESI⁺-MS m/z: 300,2 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,35$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.93 (dd, $J = 12,4, 2,3$ Hz, 2H); 2.18 (qd, $J = 12,3, 4,5$ Hz, 2H); 3.49 (td, $J = 11,9, 1,5$ Hz, 2H); 3.98 (dd, $J = 11,3, 4,0$ Hz, 2H); 4.58-4.67 (m, 3H); 6.21 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6.34 (dd, $J = 3,4, 1,8$ Hz, 1H); 7.52 (dd, $J = 1,8, 0,9$ Hz, 1H); 8.22 (s, 2H); 8.27 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 32.2 (THP C3, THP C5); 36.4 ($\text{CH}_2\text{-fur}$); 50.9 (THP C4); 66.2 (THP C2, THP C6); 106.6 (fur C3); 110.4 (fur C4); 119.4 (pur C5); 139.1 (pur C8); 141.7 (fur C5); 148.5 (pur C4); 152.0 (fur C2); 153.0 (pur C2); 154.1 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(2-isopropoxyethyl)-9H-purin-6-amin (14)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_2$, výtěžek: 23 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 26,00; 99,9.

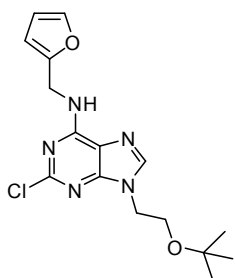
ESI⁺-MS m/z: 336,6 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,61$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 0,99 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H); 3,45-3,55 (m, 1H); 3,68 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H); 4,22 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 4,61 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H); 6,26 (dd, $J = 3,1, 0,9$ Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (dd, $J = 1,7, 0,8$ Hz, 1H); 8,11 (s, 1H); 8,69 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 21,8 (2C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{C}(\text{CH}_3)_2)$); 36,6 ($\text{CH}_2\text{-fur}$); 43,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 65,1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 70,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 107,1 (fur C3); 110,5 (fur C4); 118,0 (pur C5); 141,9 (pur C8); 142,0 (fur C5); 150,0 (pur C4); 152,1 (fur C2); 152,8 (pur C2); 154,6 (pur C6).

9-(2-(*tert*-butoxy)ethyl)-2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (15)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₆H₂₀ClN₅O₂, výtěžek: 25 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,13; 99,9.

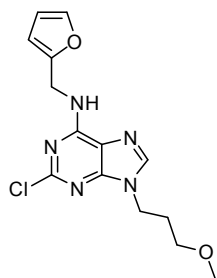
ESI⁺-MS m/z: 350,2 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,69.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,99 (s, 9H); 3,61 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H); 4,18 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H); 4,61 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 6,25 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (s, 1H); 8,09 (s, 1H); 8,66 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 27,1 (3C, -C(CH₃)₃); 36,6 (CH₂-fur); 44,0 (CH₂CH₂O*t*Bu); 59,5 (CH₂CH₂O*t*Bu); 72,9 (-C(CH₃)₃); 107,1 (fur C3); 110,5 (fur C4); 118,0 (pur C5); 142,0 (pur C8); 142,1 (fur C5); 150,0 (pur C4); 152,1 (fur C2); 152,8 (pur C2); 154,6 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(3-methoxypropyl)-9*H*-purin-6-amin (16)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₆ClN₅O₂, výtěžek: 49 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 20,31; 96,7.

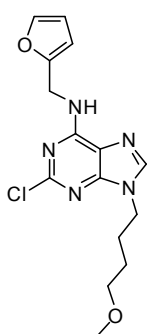
ESI⁺-MS m/z: 322,1 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,43.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,97-2,02 (m, 2H); 3,20 (s, 3H); 3,29 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 4,15 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H); 4,61 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 6,25 (dd, *J* = 3,4, 0,6 Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (dd, *J* = 1,8, 0,9 Hz, 1H); 8,15 (s, 1H); 8,70 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29,2 (CH₂CH₂CH₂OCH₃); 36,6 (CH₂-fur); 40,6 (CH₂CH₂CH₂OCH₃); 57,9 (CH₂CH₂CH₂OCH₃); 68,7 (CH₂CH₂CH₂OCH₃); 107,1 (fur C3); 110,5 (fur C4); 118,2 (pur C5); 141,6 (pur C8); 142,0 (fur C5); 150,0 (pur C4); 152,1 (fur C2); 152,8 (pur C2); 154,6 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(4-methoxybutyl)-9*H*-purin-6-amin (17)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₈ClN₅O₂, výtěžek: 49 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,00; 99,3.

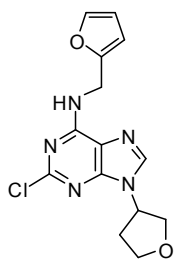
ESI⁺-MS m/z: 336,2 [M+H]⁺.

TLC: CHCl₃/MeOH (9:1, v/v), R_f = 0,64.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,41-1,47 (m, 2H); 1,77-1,83 (m, 2H); 3,18 (s, 3H); 3,30 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 4,10 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H); 4,61 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 6,25 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (dd, *J* = 1,8, 0,9 Hz, 1H); 8,18 (s, 1H); 8,70 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 26,1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 26,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 36,6 ($\text{CH}_2\text{-fur}$); 43,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 57,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 71,1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 107,1 (fur C3); 110,5 (fur C4); 118,2 (pur C5); 141,6 (pur C8); 142,0 (fur C5); 150,0 (pur C4); 152,1 (pur C2); 152,8 (fur C2); 154,6 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-6-amin (18)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2$, výtěžek: 26 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,56; 99,9.

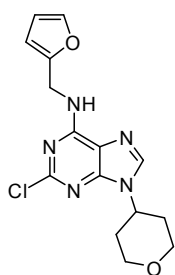
ESI⁺-MS m/z: 320,1 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,65$.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,20-2,26 (m, 1H); 2,43-2,48 (m, 1H); 3,83 (td, $J = 8,7, 5,5$ Hz, 1H); 3,91-3,95 (m, 2H); 4,08 (q, $J = 7,7$ Hz, 1H); 4,61 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H); 5,10-5,14 (m, 1H); 6,25 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (dd, $J = 1,8, 0,9$ Hz, 1H); 8,16 (s, 1H); 8,77 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 31,9 (THF C4); 36,6 ($\text{CH}_2\text{-fur}$); 54,1 (THF C3); 66,4 (THF C5); 71,8 (THF C2); 107,1 (fur C3); 110,5 (fur C4); 118,3 (pur C5); 139,5 (pur C8); 142,0 (fur C5); 149,7 (pur C4); 152,0 (fur C2); 152,8 (pur C2); 154,7 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)-9*H*-purin-6-amin (19)



Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}_2$, výtěžek: 37 %.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 24,52; 99,5.

ESI⁺-MS m/z: 334,6 [M+H]⁺.

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v), $R_f = 0,57$.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,92 (dd, $J = 12,4, 2,3$ Hz, 2H, THP H3, THP H5); 2,07-2,16 (m, 2H, THP H3', THP H5'); 3,50 (td, $J = 11,8, 1,7$ Hz, 2H, THP H2, H6); 3,97 (dd, $J = 11,3, 4,3$ Hz, 2H, THP H2', THP H6'); 4,53-4,61 (m, 3H, THP H3, $\text{CH}_2\text{-fur}$); 6,25 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (dd, $J = 1,8, 0,6$ Hz, 1H); 8,31 (s, 1H); 8,74 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 32,2 (THP C3, THP C5); 36,6 ($\text{CH}_2\text{-fur}$); 51,0 (THP C4); 66,1 (THP C2, THP C6); 107,0 (fur C3); 110,5 (fur C4); 118,4 (pur C5); 139,8 (pur C8); 142,0 (fur C5); 149,5 (pur C4); 152,1 (fur C2); 152,6 (pur C2); 154,7 (pur C6).