

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Příprava nových derivátů kinetinu s vlivem
na cirkadiánní rytmus**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Markéta Dokonalová
Studijní program:	R220755 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Experimentální biologie
Konzultant:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Markéta Dokonalová
Název práce:	Příprava nových derivátů kinetinu s vlivem na cirkadiánní rytmus
Typ práce:	Rigorózní
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů, UPOL
Konzultant:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Abstrakt:	<p>Kinetin (N^6-furfuryladenin) je cytokininový rostlinný hormon, který reguluje růst a vývoj rostlin a zároveň je schopen ovlivňovat různé procesy i v živočišných buňkách a tkáních. Součástí této práce je přehled protektivních účinků kinetinu u savců, včetně člověka, a jeho využití jako potencionální léčivo v případě nemocí souvisejících s věkem, včetně neurodegenerací a dysfunkčního cirkadiánního rytmu. Cílem této práce byla vícekroková syntéza nových aktivnějších derivátů odvozených od kinetinu a ověření jejich vlivu na cirkadiánní rytmus v jednoduchém buněčném modelu; schopnost látek modulovat délku periody byla měřena prostřednictvím luminiscenčního reportéru <i>BMAL1:LUC</i> transdukovaného v buněčné linii U2OS. Připravené deriváty prodlužují délku periody v závislosti na použitém substituentu a koncentraci testované látky a jsou aktivnější než samotný kinetin. Zjištění, že testované látky prodlužují periodu rytmu, může vést k celé řadě terapeutických aplikací u různých onemocnění.</p>
Klíčová slova:	kinetin, syntéza, deriváty kinetinu, cirkadiánní rytmus, cirkadiánní test, kaseinkinasa 1
Počet stran:	74
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Mgr. Markéta Dokonalová

Title of thesis: Synthesis of novel derivatives of kinetin influencing circadian rhythms

Type of thesis: Rigorous

Department: Laboratory of Growth Regulators, UPOL

Supervisor: Mgr. Jiří Voller, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract: Kinetin (N^6 -furfuryladenine) is a cytokinin plant hormone that regulates the growth and development of plants and is also able to influence various processes in animal cells and tissues. The part of this theses is an overview of the protective effects of kinetin in mammals, including humans, and its use as a potential drug in age-related diseases, including neurodegeneration and dysfunctional circadian rhythm. The aim of this theses was the multi-steps synthesis of new, more active derivatives derived from kinetin and testing their effect on the circadian rhythm in a simple cell model; the ability of substances to modulate period length was measured using the *BMAL1:LUC* luminescent reporter transduced in the U2OS cell line. The prepared derivatives lengthen the period depending on the used substituent and the concentration of the tested substance and are more active than kinetin itself. The finding that test substances lengthen the period of the rhythm may lead to a number of therapeutic applications in various diseases.

Keywords: kinetin, synthesis, kinetin derivatives, circadian rhythm, circadian assay, kaseinkinase 1

Number of pages: 74

Number of appendices: 1

Language: Czech

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

V Olomouci dne

Na prvním místě bych ráda poděkovala panu Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho přátelský přístup, ochotu pomoci, obětavost, cenné rady a spolupráci při práci v laboratoři a při sepisování této práce. Poděkování patří i celému kolektivu laboratoře organické syntézy za poskytnuté cenné rady a vstřícnost. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. a Kateřině Fakové za pomoc při testování na lidských buňkách, Mgr. Haně Omámikové za změření a zpracování HPLC/MS a HRMS dat.

OBSAH

1	Úvod a cíle práce.....	10
2	Kinetin	12
2.1	Historie a výskyt kinetinu	13
3	Biologický účinek kinetinu u savců.....	15
3.1	Kinetin a oxidativní stres.....	15
3.2	Kinetin a stárnutí.....	17
3.3	Neuroprotektivní aktivita kinetinu	18
3.3.1	Familiární dysautonomie.....	18
3.3.2	Neurodegenerativní onemocnění.....	20
3.4	Kinetin a cirkadiánní rytmus.....	21
4	Materiál a metody	27
4.1	Chemikálie.....	27
4.2	Biologický materiál.....	27
4.3	Metody.....	28
4.4	Syntéza	29
4.4.1	Funkcionalizace purinového heterocyklu v pozici N9.....	29
4.4.2	Funkcionalizace purinového heterocyklu v pozici C6	31
4.4.3	Funkcionalizace purinového heterocyklu v pozici C2	32
4.5	Biologické testování.....	33
4.5.1	Cirkadiánní test.....	33
4.5.2	Inhibice kaseinkinasy 1 δ (CSNK1 δ).....	34
5	Výsledky a diskuze	35
5.1	Syntéza	36
5.2	Biologická aktivita	41
6	Závěr	46

7	Seznam literatury	47
8	Přílohy	55
8.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených látek.....	55

Seznam zkratk

ATP	adenosin-5'-trifosfát
bs	široký singlet
cP	cyklopentyl
CSNK1	kaseinkinasa 1
d	dublet
dd	dublet dubletu
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
dt	dublet tripletu
ekv.	ekvivalent
ESI+MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód
EtOAc	ethyl-acetát
FASPS	syndrom familiární pokročilé spánkové fáze
fur	furan
HN	Huntingtonova nemoc
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>J</i>	interakční konstanta
KTHP	<i>N</i> -(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-amin
KTP	Kinetin-9-ribosid-5'-trifosfát
m	multiplet
MeOH	methanol
MU	mutantní
MW	mikrovlnné záření
NIH3T3	myší embryonální fibroblasty
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -propanol
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDA	detektor fotodiodového pole
PE	petrolether
PINK1	PTEN-indukovaná kinasa 1
PPh ₃	trifenylfosfin
pur	purin
ppm	parts per million
PV	přihláška vynálezu
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
s	singlet
SCN	suprachiasmatická jádra hypotalamu
SH-SY5Y	neuroblastomová buněčná linie ATCC CRL-2266
t	triplet
TFA	trifluoroctová kyselina

THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TOF	hmotnostní analyzátor doby letu „time-of-flight“
U2OS	buňky lidského osteosarkomu ATCC HTB-96
WT	wild-type
Δ	chemický posun

1 Úvod a cíle práce

Kinetin je významný rostlinný hormon, který patří do rodiny cytokininů. Objev, že kinetin hraje důležitou roli v regulaci růstu a vývoji rostlin, podnítil mnoho studií k jeho potencionálnímu využití pro léčbu lidských onemocnění. V průběhu let došlo k enormnímu rozšíření znalostí a mechanismů působení kinetinu napříč různými organismy včetně člověka. Mezi jeho hlavní prokázané účinky patří cytoprotektivní aktivita vůči oxidativnímu stresu, který může být spouštěčem patologií. Další zajímavostí je schopnost kinetinu oddalovat stárnutí, které mimo jiné souvisí i s rozvojem neurodegenerativních onemocnění. Kinetin ukazuje slibné výsledky a uplatnění i v kosmetickém průmyslu a jako potencionální lék na různá onemocnění v rámci celého lidského organismu.

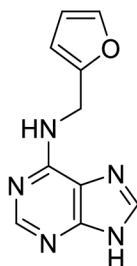
Teoretická část práce byla věnována shrnutí poznatků a vlastností kinetinu se zaměřením na jeho biologický účinek u savců i člověka. Poslední kapitola teoretické části byla zaměřena na cirkadiánní rytmus, jeho propojení s fyziologickými a patofyziologickými procesy v našem těle. Cílem experimentální části bylo rozšíření stávající knihovny o aktivnější deriváty odvozené od kinetinu a jejich fyzikálně-chemická charakterizace. V rámci biologického testování byla ověřena schopnost připravených derivátů modulovat periodu cirkadiánních hodin.

Vzhledem k různorodým účinkům kinetinu jako potencionálního léčiva řady onemocnění mohou aktivnější deriváty přinést novou naději na vyléčení řady chorob.

Teoretická část

2 Kinetin

Kinetin (N^6 -furfuryladenin) je jeden z nejznámějších rostlinných hormonů patřící do skupiny cytokininů. Po chemické stránce se jedná o derivát adeninu, který na pozici N^6 obsahuje furanový heterocyklus (Obr. 1) (Strong a kol., 1965).

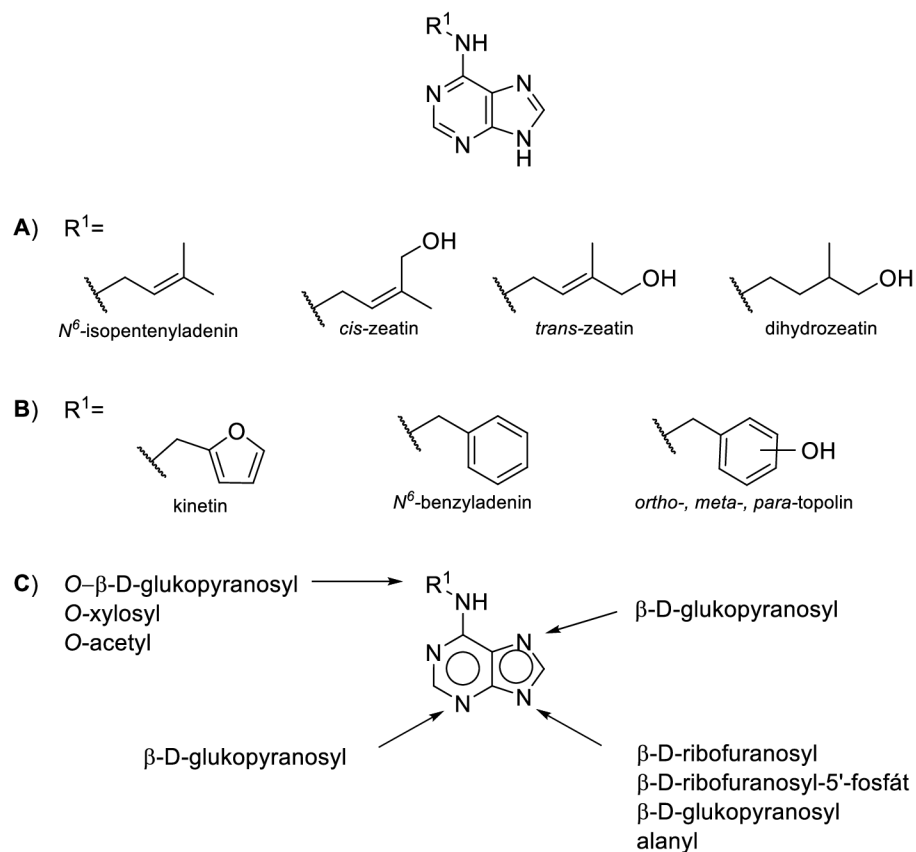


Obr. 1: Molekula kinetinu.

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které byly objeveny v 50. letech 20. století jako látky (Miller a kol., 1955), které v přítomnosti auxinů podporují dělení rostlinných buněk (Strong a kol., 1965). Kromě schopnosti stimulovat dělení rostlinných buněk, podporují cytokininy také buněčný růst, vývoj chloroplastů a morfogenezi nediferenciovaných buněk a hrají tak klíčovou roli v mnoha důležitých fázích růstu a vývoje rostliny. Podílejí se na regulaci růstu jak kořenů, tak i zejména nadzemní části rostlin, potlačují apikální dominanci, dále stimulují kvetení, klíčení semen, ovlivňují transport živin a vody a zpomalují senescenci (Werner a Schmülling, 2009). Existují také důkazy, že cytokininy regulují metabolismus a morfologii rostlin během působení enviromentálních stresových faktorů (Hirose a kol., 2008).

Z chemického pohledu se jedná o deriváty odvozené od purinové báze adeninu s postranním řetězcem v pozici N^6 . Podle jeho povahy se cytokininy rozdělují na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Mezi isoprenoidní cytokininy se řadí N^6 -isopentenyladenin, *cis/trans*-zeatin a dihydrozeatin s nasyceným postranním řetězcem (Obr. 2A). Mezi aromatické naopak patří kinetin, N^6 -benzyladenin a topoliny s hydroxyskupinou na benzylu v pozicích *ortho*, *meta* nebo *para* (Obr. 2B) (Strnad, 1997).

V rostlinách se cytokininy nachází v různých formách (Obr. 2C), jako volné báze (aktivní forma), nukleosidy, nukleotidy nebo *N*- či *O*-cukerné konjugáty s glukózou nebo xylózou (transportní a zásobní forma) (Spíchal, 2012).



Obr. 2: Struktury cytokininů adeninového typu a jejich metabolitů. A) isoprenoidní cytokininy; **B)** aromatické cytokininy; **C)** metabolity cytokininů.

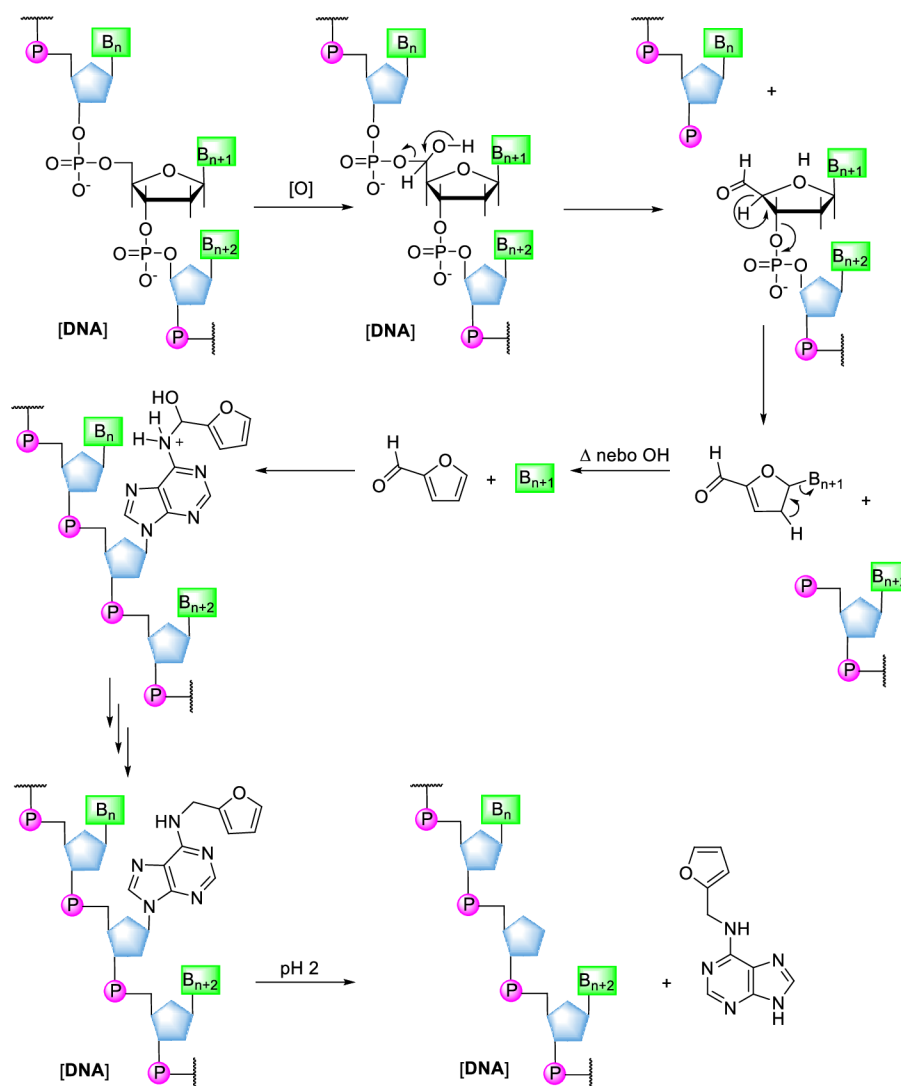
2.1 Historie a výskyt kinetinu

Kinetin byl jako první cytokinin poprvé vyizolován a charakterizován v roce 1955 z autoklávané DNA sledího spermatu jako aktivní látka se schopností stimulovat cytokinezi rostlinných buněk (Miller a kol., 1955). Dlouhou dobu se věřilo, že kinetin vzniká pouze jako syntetický produkt při degradaci DNA (Hall a Ropp, 1955). V roce 1996 byl ale potvrzen jeho výskyt v extraktu z kořenových hlíz rostliny *Casuariana equisetifolia*, které vznikají v důsledku symbiózy s bakterií rodu *Frankia* fixující dusík (Raman a Elumalai, 1996). Přítomnost kinetinu byla detekována také v kořenech rostliny *Cymbopogon martinii*, kdy se množství kinetinu výrazně zvýšilo po inokulaci arbulaskulárními mykorrhizními houbami rodu *Glomus* (Ratti a Jonardhanan, 1996). Později byl kinetin a jeho nukleosid identifikován i v čerstvém kokosovém mléce z mladých kokosů (Ge a kol., 2005).

Přítomnost kinetinu byla mimo jiné potvrzena i v jiných organismech než v rostlinách. Kinetin byl například detekován v lidské moči pocházející od pacientů s karcinomem

plic (Barciszewski a kol., 2000) nebo v mozkové a jaterní tkáni transgenických laboratorních myší trpících familiární dysautonomií (Shetty a kol., 2011).

Díky předešlým i vlastním výsledkům Barciszewski a kol. (1997) přišel s myšlenkou, že přítomnost endogenního kinetinu je pravděpodobně výsledkem oxidativního stresu a ukázal možný mechanismus jeho vzniku (Obr. 3). Vlivem kyslíkových radikálů může docházet k poškození DNA, konkrétně hydroxylaci deoxyribosy na uhlíku 5'. Rozštěpení 5' a následně 3' cukr-fosfátové vazby vede ke vzniku nenasyceného cukerného aldehydu, který po eliminaci připojené báze poskytuje klíčový intermediát furfural. Ten je schopen atakovat exocyklickou aminoskupinu adeninu v DNA a vytvářet tak Schiffovu bázi, která po dehydrataci a redukcí umožňuje vznik kinetinu. Ten je z DNA pravděpodobně uvolňován vlivem opravných mechanismů DNA (Barciszewski a kol., 1997a).



Obr. 3. Navržený mechanismus biosyntézy kinetinu.

3 Biologický účinek kinetinu u savců

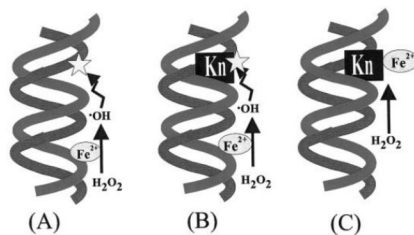
Získané znalosti o působení kinetinu v rostlinách vedly ke zkoumání jeho protektivních účinků i na jiné organismy, včetně člověka. Bylo provedeno mnoho studií zkoumajících farmakologické účinky kinetinu a dalších cytokininů, kde byly prokázány jejich protektivní účinky u neurodegenerativních, kardiovaskulárních a metabolických onemocnění (Fathy a kol., 2022).

3.1 Kinetin a oxidativní stres

Oxidativní stres je definován jako nerovnováha mezi antioxidantními mechanismy buňky a množstvím volných radikálů. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou vysoce reaktivní atomy nebo molekuly obsahující nejméně jeden atom kyslíku a jeden nebo více nepárových elektronů a jsou produkovány v různých endogenních i exogenních procesech (Valko a kol., 2007). Do této skupiny látek se řadí zejména singletový kyslík, superoxidový radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxid vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$). Jejich působením dochází k oxidačnímu poškození buněčných makromolekul (proteinů, lipidů a DNA), což může mít za následek poškození, či ztrátu jejich funkce a rozvoj onemocnění (Liguori a kol., 2018).

Antioxidační aktivita kinetinu byla nejprve zpozorována u rostlin, kdy kinetin v řadě experimentů zvyšoval aktivitu antioxidačních enzymů jako je peroxidasa (Gaspar a Xhaufflaire, 1996), katalasa nebo superoxiddismutasa a byl tak schopen potlačit projevy oxidativního stresu (Kar a Feierabend, 1984). Kinetin vykazuje podobné účinky i na živočišných buňkách, chrání DNA keratinocytů vůči UVB záření a zároveň snižuje peroxidaci buněčných lipidů (McDaniel a kol., 2005).

Olsen a kol. (1999) publikovali, že kinetin významně chrání DNA proti oxidativnímu poškození zprostředkované Fentonovou reakcí *in vitro*, při které vzniká vysoce aktivní a toxický hydroxylový radikál (Obr. 4). Přítomnost kinetinu ve Fentonově reakci inhibuje vznik 8-oxo-2'-deoxyguanosinu v DNA v závislosti na správné koncentraci (100 $\mu\text{mol/l}$). Mimo jiné bylo prokázáno, že kinetin je mnohem účinnější v protekci DNA proti oxidativnímu poškození než adenin. Důvod, proč je kinetin elektrochemicky aktivnější než adenin, může být furfurylový substituent na pozici N^6 (Olsen a kol. 1999).



Obr. 4.: Předpokládaný mechanismus ochrany DNA pomocí kinetinu. A) Poškození DNA ve Fentonově reakci. B) Kinetin vychytává hydroxylový radikál a chrání DNA. C) Kinetin váže železnatý iont Fe^{2+} a zabraňuje tvorbě hydroxylového radikálu. (Převzato z: Olsen a kol. 1999)

Další data ukazují, že kinetin chrání i proteiny proti oxidačnímu poškození a zároveň zabraňuje tvorbě produktů pokročilé glykace (Verbeke a kol., 2000). Ty vznikají při neenzymatické glykaci bílkovin a jsou schopny modifikovat fyzikální a chemické vlastnosti biologických struktur, což může hrát roli v patogenezi různých onemocnění (Baynes, 2000). Lipidy také podléhají oxidačnímu poškození. Liu a kol. (2011) prokázali, že kinetin při koncentraci $100 \mu\text{mol/l}$ snižuje peroxidaci lipidů u gliálních buněk astrocytů *in vitro* a chrání myší mozky *in vivo* proti působení D-galaktózy.

Antioxidační aktivita kinetinu byla mimo jiné prokázána i u kryokonzervace spermií (Hashem a Eslami, 2016). Oxidativní stres je jedna z hlavních příčin snížené kvality spermií v průběhu procesu zmrazování a následného rozmrazování. Během experimentu bylo prokázáno, že kinetin jako antioxidant zlepšuje motilitu a viabilitu spermií, integritu plazmatické membrány spermií a inhibuje peroxidaci lipidů u chlazených beraních spermií (Hashem a Eslami, 2016). Další studie potvrdila schopnost kinetinu zachovat správnou strukturu a funkci psiho spermatu po kryokonzervaci. Výsledky ukázaly, že při optimální koncentraci kinetinu ($50 \mu\text{mol/l}$) dochází ke snížení oxidačního poškození psiho spermatu, ke zvýšení exprese anti-apoptotických genů (*BCL2*) a protamin asociovaných genů (*PRM2*) a naopak ke snížení exprese pro-apoptotických genů (*BAX*) a mitochondriálních ROS genů (*ROMO1*) (Qamar a kol., 2020).

Mechanismy účinků, které stojí za antioxidační aktivitou kinetinu, jsou jednak stimulace aktivity řady antioxidačních enzymů (katalas, peroxidas, superoxiddismutas, glutathionperoxidas, glutathionreduktas apod.), ale pravděpodobně i samotná struktura a vlastnosti kinetinu. Jednou z možností je furanový kruh, který je bohatý na elektrony se schopností vázat ROS (Okada a kol., 1996). Další způsob je tvorba komplexu kinetinu s ionty některých kovů, například s Cu^{2+} , kdy vzniklý komplex má superoxiddismutasovou aktivitu (Parvez a kol., 1990).

3.2 Kinetin a stárnutí

Stárnutí (angl. aging) je proces, který probíhá v rámci celého života jakéhokoliv žijícího organismu. Dochází při něm k postupným progresivním změnám vlivem vnitřních i vnějších faktorů, které vedou ke ztrátě biologických a fyziologických funkcí tkání a orgánů (Baynes, 2000). Jedna z teorií stárnutí říká, že volné radikály jsou hlavním faktorem v tomto procesu, který je způsoben akumulací poškození biologických molekul vlivem oxidativního stresu (Lin a Beal, 2003).

Schopnost zpomalovat stárnutí je jedna z vlastností, která byla prokázána i u kinetinu. Rattan a Clark v roce 1994 pozorovali pozitivní účinek kinetinu při kultivaci lidských kožních fibroblastů. Kinetin byl schopen oddálit nástup stárnutí a snížit množství jeho projevů, které se objevovaly při pasážování buněk. Aplikace kinetinu ovlivnila rychlost růstu, morfologické změny a velikost buněk, uspořádání cytoskeletu, a také syntézu makromolekul (Rattan a Clark, 1994). Kinetin také zpomaluje stárnutí endotelových buněk, zvyšuje jejich proliferaci a metabolickou kapacitu. Stárnutí endotelových buněk snižuje integritu a elasticitu krevních cév, což může vést k rozvoji kardiovaskulárních chorob jako ateroskleróza, hypertenze, mozková mrtvice a srdeční selhání (Lee a kol., 2006). Kromě fibroblastů a endotelových buněk byla schopnost zpomalovat stárnutí prokázána i u lidských keratinocytů v *in vitro* podmínkách (Berge a kol., 2008). Kinetin podporuje diferenciaci keratinocytů indukovanou vápenatými ionty, jež v průběhu kultivace díky buněčnému stárnutí v *in vitro* podmínkách postupně klesá.

Příznivé účinky kinetinu na kožní buňky vedly k myšlence jeho využití v kosmetických přípravcích při péči o pleť a v dermatologii. Četné studie lokální aplikace kinetinu pro účely péče o pleť byly zkoumány na zvířecích modelech, ale i v klinickém testování na dobrovolnících (Fathy a kol., 2022, McCullough a Weinstein, 2002, Wanitphakdeedecha a kol., 2015). Jeden ze známých produktů obsahující kinetin 0,1% je krém Kinerase. Jeho bezpečnost a účinek byly prokázány v několika klinických studiích. Krém Kinerase je dobře tolerován, hydratuje a zlepšuje texturu pokožky, redukuje hyperpigmentaci (četnost pih a hnědých skvrn) a zarudnutí pleti (McCullough a Weinstein, 2002), dále vyhlazuje vrásky způsobené stárnutím a působením slunce (Wanitphakdeedecha a kol., 2015). Za krátkou zmínku stojí i kosmetický produkt Pyratine, jehož účinnou látkou je derivát odvozený od kinetinu 6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin (KTHP), a na jehož vývoji se podílela Laboratoř růstových regulátorů v Olomouci. Je znám jako krém proti stárnutí pleti, který redukuje jemné i hluboké vrásky, zjemňuje a minimalizuje

hyperpigmentaci pokožky a zlepšuje i příznaky erytému a akné (McCullough a kol., 2008).

Účinky kinetinu, které souvisí se stárnutím nejsou omezeny pouze na buňky či tkáň, ale jsou schopny se projevit i na úrovni celého organismu. Bylo prokázáno, že kinetin prodlužuje životnost ovocných mušek *Zaprionus parvittiger* (Sharma a kol., 1995) i hlístic *Caenorhabditis elegans* (Kadlecová a kol., 2018).

3.3 Neuroprotektivní aktivita kinetinu

Mezi další projevy stárnutí a poškození organismu se řadí rozvoj neurodegenerativních onemocnění, která jsou charakterizována postupnou degenerací a odumíráním neuronů. Možnosti léčby neurodegenerativních onemocnění jsou poměrně omezené, ale některé probíhající studie dávají naději na objevení nových možností, jak tyto nemoci vyléčit (Richardson a kol., 2024). Kinetin vykazuje slibné výsledky v několika studiích zaměřujících se na léčbu familiární dysautonomie a neurofibromatózy typu I., dokonce i Parkinsonovy a Huntingtonovy choroby.

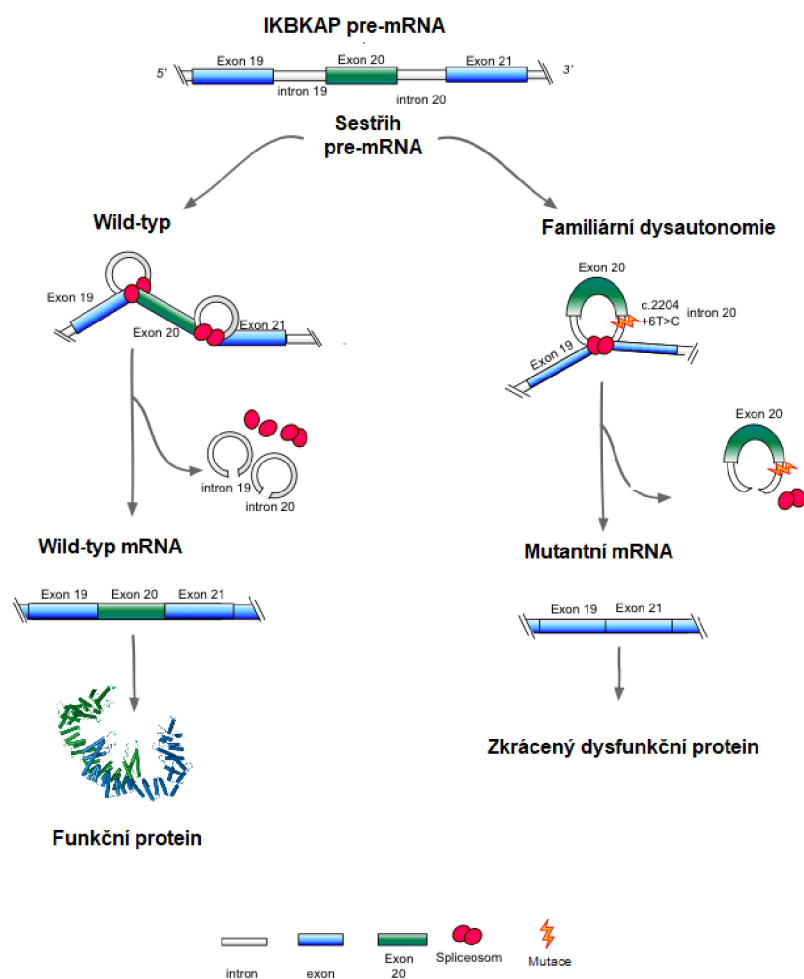
3.3.1 Familiární dysautonomie

Familiární dysautonomie, někdy nazývána i Rileyův-Dayův syndrom, je dědičná autonomní vegetativní neuropatie III. typu s největší prevalencí u aškenázských Židů. Příčinou onemocnění je bodová mutace (záměna thyminu za cytosin) v místě sestřihu pre-mRNA v genu *IKBKAP*, která vede ke snížení účinnosti sestřihu a v transkriptu *IKBKAP* pre-mRNA k přeskočení intronu 20 a vystřížení exonu 20. Výsledkem translace této mRNA je dysfunkční zkrácený protein IKAP (Obr. 5). Vlivem mutace dochází ke špatnému vývoji sensorických a autonomních neuronů odpovědných za vegetativní funkce. Klinické projevy onemocnění jsou poruchy termoregulace a vnímání bolesti, nestabilní krevní tlak, potíže s polykáním, dysfunkce zažívacího traktu a další (Norcliffe-Kaufmann, 2017).

V roce 2004 Slaugenhaupt a kol. objevili, že kinetin je schopen korigovat defektní sestřih pre-mRNA genu *IKBKAP* a výrazně tak zvyšovat množství funkčního nezkráceného (wild-type WT) IKAP proteinu. Následná studie ukázala, že pro opravnou aktivitu kinetinu je důležitá CAA sekvence na 5' konci exonu 20, a že kinetin je do jisté míry schopen korigovat chybný sestřih pre-mRNA i dalších genů obsahující tuto sekvenci, například i genu *NF1* způsobujícího neurofibromatózu 1. typu (Ars a kol., 2000). Charakteristickým znakem tohoto onemocnění je výskyt tzv. „café au lait spots“

(světle hnědé skvrny na kůži) a nezhoubných nádorů neurofibromů (Friedman, 2022). Hims a kol. (2007) publikovali, že kinetin úspěšně moduloval sestřih pre-mRNA, kdy došlo k inkluzi exonu 36.

Účinky kinetinu korigovat defektní sestřih pre-mRNA *IKBKAP* genu byly v průběhu let ověřeny v řadě studií, například na pluripotentních (iPSC) (Lee a kol. 2009) a mesenchymálních kmenových buňkách (OE-MSC) (Boone a kol., 2012), *in vivo* u transgenních myší s vloženou sestřihovou mutací *IKBKAP* genu (Shetty a kol., 2011). Na základě těchto zjištění kinetin postoupil do klinických studií a stal se nadějí pro léčbu tohoto neurodegenerativního onemocnění (www.clinicaltrials.gov).

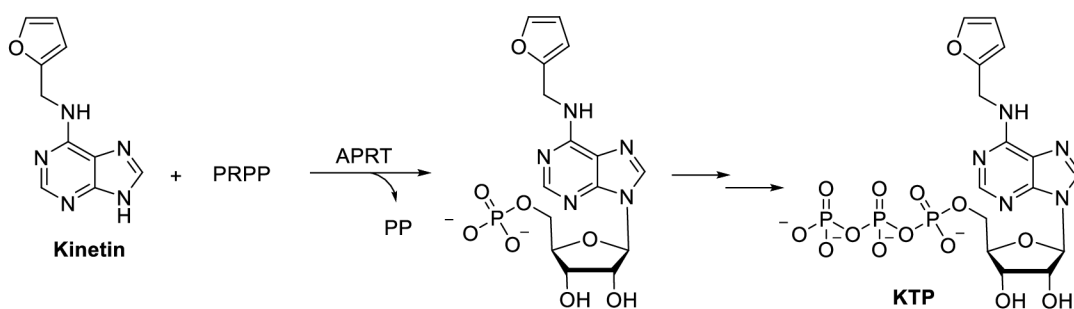


Obr. 5: Schématický diagram sestřihu pre-mRNA u genu *IKBKAP*. (Převzato z: Norcliffe-Kaufmann, 2017)

3.3.2 Neurodegenerativní onemocnění

Poškození nebo ztráta specifických neuronů souvisí s rozvojem neurodegenerativních poruch jako jsou Parkinsonova, Huntingtonova a Alzheimerova choroba (Liang a kol., 2023). Oxidativní stres a dysfunkce mitochondrií patří mezi hlavní faktory ovlivňující patofyziologické procesy vedoucí k neurodegeneraci (Olufunmilayo a kol., 2023).

Parkinsonova choroba je druhé nejčastější progresivní neurodegenerativní onemocnění, které souvisí s úbytkem dopaminergních neuronů v části mozku nazvané Substantia nigra. Úbytek neuronů produkující dopamin vede k postupné ztrátě regulace hybnosti pacienta. Jedním z charakteristických znaků patogeneze tohoto onemocnění je porucha funkce mitochondrií. Hlavní faktor, který vede k narušení funkce mitochondrií, je mutace u enzymů PINK1 (PTEN-indukovaná kinasa 1) a Parkin (ubiquitinligasa), které hrají důležitou roli při reparačním mechanismu mitochondrií a rozhodují o jejich degradaci (Blagov a kol., 2022). Kinetin ukázal slibné výsledky jako aktivátor PINK1, protože jeho metabolit kinetinribosid-5'-trifosfát (KTP) (Obr. 6), který je analogem ATP, je schopen zvýšit aktivitu PINK1 (Hertz a kol., 2013). Při testování neuroblastomových buněk SH-SY5Y ošetřených kinetinem (50 $\mu\text{mol/l}$) došlo ke zvýšení aktivity PINK1 i ligasy Parkin a zároveň ke snížení apoptózy buněk. Neuroprotektivní aktivita byla prokázána i u derivátu odvozeného od kinetinu. Gonzalez a kol. (2021) publikoval protektivní účinek kinetinu-3-glukosidu u SH-SY5Y buněk. Kinetin se tedy jeví jako naděje v boji proti Parkinsonově chorobě u pacientů s mutacemi v enzimech PINK1 a Parkin.



Obr. 6: Biotransformace kinetinu na kinetin-9-ribosid-5'-trifosfát (KTP). Kinetin je nejprve účinkem adeninfosforibosyltransferasy (APRT) převeden na kinetin-9-ribosid-5'-monofosfát, kde jako donor fosforibosy slouží 5'-fosforibosylpyrofosfát (PRPP) a dále činností endogenních enzymů na KTP.

V další studii byl prokázán protektivní účinek kinetinu v modelových systémech Huntingtonovy choroby (HN) (Bowie a kol., 2018). Jedná se o autosomálně dominantně dědičné onemocnění charakterizované poruchou motoriky, ztrátou kognitivních funkcí a rozvojem demence. Za vznik onemocnění je zodpovědná mutace v *HTT* genu, který

kóduje protein huntingtin. Příčinou mutace je abnormální zmnožení tripletu CAG (cytosin-adenin-guanin, kodon pro glutamin), neboli polyglutaminová porucha. K projevu onemocnění dochází, pokud má pacient více než 40 CAG repetice. Existuje určitá pravděpodobnost, že čím víc repetice CAG jedinec má, tím dříve onemocnění propukne. Léčba v současné době neexistuje, proto se zkoumají látky, které by mohly mít neuroprotektivní účinek i v rámci tohoto onemocnění (Nittari a kol., 2023). Vědci zjistili, že kinetin ovlivňuje fosforylaci N17 mutantní huntington domény, která hraje roli v progresi tohoto onemocnění. Kinetin v modelovém systému HN na myších buňkách ze striata zvyšuje fosforylaci domény N17. Mechanismus fosforylace je závislý na množství ATP, jehož hladiny jsou u pacientů s HN výrazně sníženy. Kinetin slouží jako prekurzor pro vznik KTP, který je donorem fosfátů pro kaseinkinasu 2, která fosforyluje doménu N17, a tím chrání buňky před poškozením (Bowie a kol., 2018).

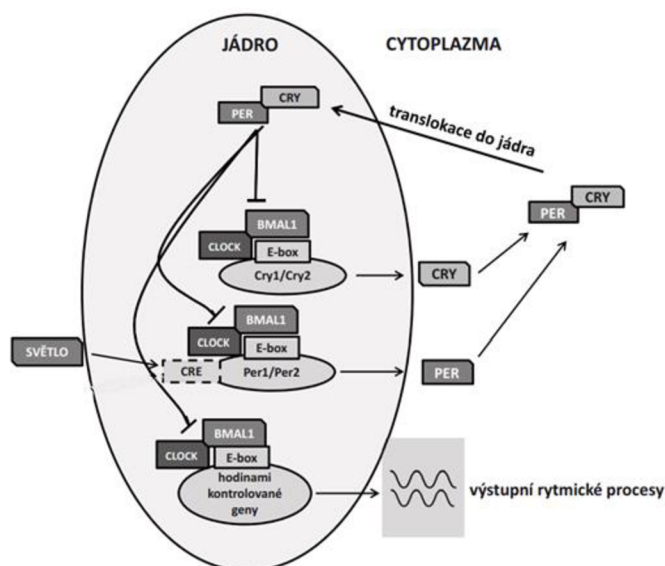
Za zmínku stojí i neuroprotektivní účinek kinetinu jako kandidáta na léčbu Alzheimerovi choroby. Výsledky studie ukázaly, že kinetin je schopen chránit myší hippokampální neurony HT22 proti oxidačnímu stresu vyvolanému působením glutamátu, kdy došlo ke snížení hladin ROS a Ca^{2+} uvnitř buněk, zachování normální funkce mitochondrií a ke snížení počtu apoptotických buněk (Wei a kol., 2018).

3.4 Kinetin a cirkadiánní rytmus

Cirkadiánní rytmus je důležitý mechanismus, který reguluje chování a obrovské množství fyziologických a metabolických procesů v našem těle s 24hodinovou rytmicitou. Narušení tohoto mechanismu je spojeno s rozvojem různých onemocnění jako jsou neurodegenerativní choroby, metabolické, kardiovaskulární nebo i nádorová onemocnění (Gaikwad, 2018).

U savců včetně člověka jsou cirkadiánní rytmy řízeny centrálním oscilátorem, který je uložen v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu (Maywood a kol., 2020). SCN jsou primárně synchronizována světelnými podněty z retinohypotalamického traktu, který je propojuje s fotosenzitivními gangliovými buňkami sítnice. Následně SCN pomocí neuronálních a humorálních signálů reguluje rytmy v jednotlivých periferních tkáních a umožňuje jejich adaptaci na časové změny okolního prostředí (Chen a kol., 2018). Molekulární podstatou cirkadiánního rytmu jsou transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky mezi hodinovými geny a jejich proteiny (Takahashi, 2017). Molekulární smyčky jsou tvořeny transkripčními aktivátory (BMAL1, CLOCK a ROR) a represory (CRY1, 2, PER 1, 2 a REV-ERB α). Transkripční aktivátory

indukují transkripci represorů vazbou k E-boxu v jejich promotorových sekvencích. Represory PERs/CRYs po vstupu do jádra inhibují aktivátory CLOCK/BMAL1 a zároveň jsou substrátem pro posttranslační modifikace (fosforylace pomocí kaseinkinas CSNK1δ/ε) a řízenou proteinovou degradaci v proteasomu. Když jejich hladina klesne dostatečně, aktivátory CLOCK/BMAL1 se uvolní a cyklus začíná znovu s 24hodinovou periodicitou (Obr. 7).



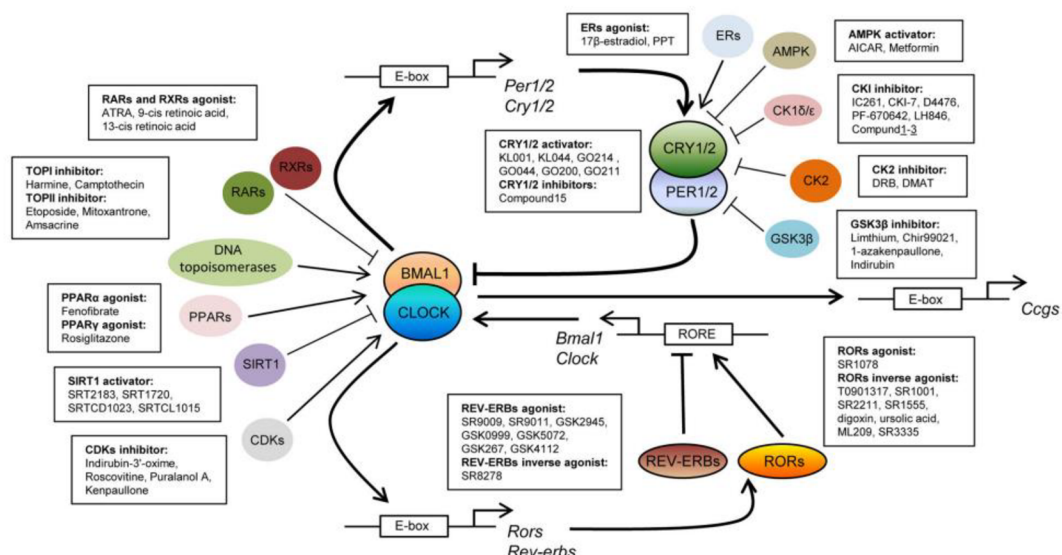
Obr. 7: Transkripčně-translační zpětnovazební smyčka cirkadiánního rytmu. (Převzato z: Pačesová a kol., 2019)

Nesoulad mezi vnitřními cirkadiánními hodinami a přirozeným cyklem světlo-tma v důsledku moderního uspěchaného životního stylu (nepravidelný příjem potravy a nepravidelný spánek, práce na směny, pásmová nemoc a sociální jet-lag) může vést k narušení vnitřní homeostáze a rozvoji různých patologií (Abott a kol., 2020), což bylo demonstrováno i na zvířecích modelech. Laboratorní myši s deficitem *BMAL1* mají sníženou délku života vlivem předčasného stárnutí a zároveň u nich byly v některých tkáních stanoveny vyšší hladiny ROS (Kondratov a kol., 2006). U laboratorních myši s mutací v transkripčním faktoru *CLOCK* dochází k rozvoji obezity a metabolického syndromu z důvodu narušené energetické bilance (Turek a kol., 2005) a při deficitu genu *PER2* se myši stávají náchylnější k rakovině (Fu a kol., 2002).

U lidí je známé onemocnění, které přímo souvisí s bodovou mutací genu *PER2* a *CSNK1δ*. Jedná se o syndrom familiární pokročilé spánkové fáze (FASPS), kdy vlivem mutace dochází ke zkrácení cirkadiánní periody zhruba o 2 hodiny. Mezi další poruchy cirkadiánního rytmu, které přímo souvisí s dysfunkcí a nesouladem cirkadiánních hodin, patří syndrom zpožděné fáze spánku, syndrom nepravidelné

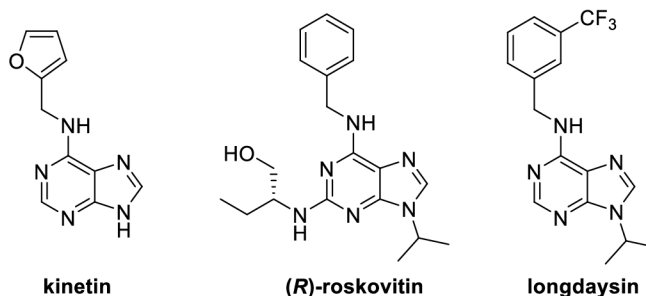
spánkové fáze, dále syndrom volně běžící spánkové fáze, pásmová nemoc neboli jet-lag a porucha spánku a bdění při směnném provozu (Jones a kol., 2013). Narušení cirkadiálních hodin zvyšuje rozvoj různých onemocnění. Studie ukazují, že u pacientů s neurodegenerativním onemocněním jako Alzheimerova choroba, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba, dochází ke zhoršené expresi hodinových genů, ke změnám fáze a snížení amplitudy, dále ke snížení hladiny melatoninu a ke zvýšení oxidačního stresu v mozkové tkáni (Musiek a kol., 2015). Zajímavé je, že tyto příznaky se objevují dříve, než dojde k rozvoji onemocnění, proto by jejich časná diagnóza mohla pomoci včasnému zahájení léčby (Fishbein a kol., 2021). Bylo publikováno i propojení mezi dysfunkcí cirkadiálních hodin s psychiatrickými onemocněními, včetně schizofrenie, depresivní poruchy, bipolární a sezónní afektivní poruchy (Walker a kol., 2020). Cirkadiální dysregulace může mimo jiné přispívat i k rozvoji metabolického syndromu a diabetu 2. typu (Maury, 2020), přibývají i důkazy o úzkém propojení dysfunkčních cirkadiálních rytmů a rakoviny (Liu a kol., 2022). Například hodinové geny *PER2* hrají důležitou roli při kontrole proliferace buněk a jejich zvýšená exprese může vést k indukci apoptózy a inhibici maligní transformace buněk. Bohužel v případě nádorových buněk je exprese *PER2* snížena (Liu a kol., 2022).

Mezi současnými možnostmi léčby, zejména spánkových poruch, dominuje terapie jasným světlem o vysoké intenzitě (od 2500 luxů) v přesných časových intervalech (Zhu a Zee, 2012). Další možností je použití melatoninu, který by měl pomoci s usínáním a udržením spánku, ale je účinný jen u některých pacientů (Zee a kol., 2013). V průběhu let byly identifikovány malé intracelulární molekuly jako NAD, hem nebo cAMP, které jsou schopny různými mechanismy modulovat cirkadiální rytmy. Prohledávání rozsáhlých knihoven malých syntetických látek následně vedly k identifikaci nových modulátorů cirkadiálních rytmů (Cha a kol., 2019) a v současnosti je známá celá paleta látek, které jsou schopny cílit přímo na klíčové komponenty hodinového jádra, regulační kinasy, jaderné receptory nebo DNA topoisomerasy, které se podílejí na rytmické genové expresi (Obr. 8) (shrnuto v He a Chen, 2016).



Obr. 8: Možné molekulární cíle s výčetem doposud známých modulátorů cirkadiálního rytmu a transkripčně-translační zpětnovazební smyčky cirkadiálních hodin. (Převzato z He a Chen, 2016)

Na dvou modelových buněčných liniích U2OS (buňky lidského osteosarkomu) a NIH3T3 (myší embryonální fibroblasty) obsahujících *BMAL1:LUC*, respektive *PER2:LUC* reportérový systém bylo demonstrováno, že kinetin je schopen v závislosti na koncentraci prodlužovat periodu cirkadiálního rytmu (Voller a kol., PV 2019-757). Strukturně je kinetin příbuzný se dvěma dalšími, již dříve identifikovanými modulátory cirkadiálního rytmu a to roskovitinem (Isojima a kol., 2009) a longdaysinem (Hirota a kol., 2010) (Obr. 9). Obě tyto látky výrazně prodlužují periodu cirkadiálního rytmu, interagují se stejným molekulárním cílem, kterým je kaseinkinasa 1δ (CSNK 1δ), a inhibují její aktivitu.



Obr. 9: Chemická struktura (*R*)-roskovitinu a longdaysinu v porovnání s kinetinem.

Posttranslační modifikace klíčových komponent cirkadiálních hodin jsou důležité stejně jako jejich transkripční regulace, neboť pomáhají v jemném ladění cirkadiálních rytmů prostřednictvím regulace jejich subcelulární lokalizace, aktivity nebo degradace

(Gallego a Virshup, 2007). Významnou roli v tomto procesu hraje právě kaseinkinasa 1 δ , která je schopna prostřednictvím protein-proteinové interakce vytvářet s PER stabilní komplex a katalyzovat jeho fosforylaci. PER proteiny jsou součástí negativní zpětnovazebné smyčky cirkadiálních hodin a jejich rytmická exprese a fosforylace definuje v cirkadiálním cyklu denní dobu. PER funguje v buňce jako adaptorový protein, díky němuž je CSNK1 δ po asociaci CSNK1 δ /PER s CRY a translokaci celého komplexu do jádra schopna regulovat transkripční aktivitu CLOCK/BMAL1 (hyper)fosforylací CLOCK (An a kol., 2022).

Jak bylo demonstrováno v teoretické části této práce, kinetin jako multiaktivní molekula vykazuje řadu pozitivních účinků jak na rostlinné, tak živočišné buňky nebo celé organismy. Některé další studie naznačují, že strukturní modifikace kinetinu případně vhodná substituce může tyto benefiční účinky ještě podpořit. Příkladem může být u těchto látek antisenescenční aktivita (Mik a kol., 2011), antioxidační aktivita a neuroprotektce (Maková a kol., 2021) nebo vliv na cirkadiální rytmus (Dokonalová, 2019).

Experimentální část

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Použitý výchozí materiál byl pořízen z komerčních zdrojů (VWR, Acros Organics, Sigma Aldrich, Fluka, Enamine, Invitrogen, SERVA, Olchemim atd.). Při syntéze derivátů byly použity následující chemikálie a rozpouštědla: diisopropyl azodikarboxylát (DIAD), trifenyfosfin (Ph_3P), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$), diethylether (Et_2O), cyklopentanol, oxolan-3-ol, 2-propoxyethanol, 3-chloropentán, 3-chlorocyklopentán, chloromethyl-methyl ether, chloroethyl-methyl ether, 2-chloroethyl-ethylether, oxetan-3-ylmethyl chlorid, 33% methylamin v absolutním ethanolu, 5,6M dimethylamin v absolutním ethanolu, *N,N*-dimethylformamid (DMF), 2-aminoethyl(methyl)amin, (2-dimethylamino)ethylamin, ethan-1,2-diamin, 2-aminoethanol, tetrahydrofuran (THF), triethylamin (Et_3N), trifluoroctová kyselina (TFA), furfurylamin, morfolin, propylamin, dipropylamin, benzylamin, pyrrolidin, hexan-1,6-diamin, 3-methoxypropylamin, 6-chlorpurin, 2,6-dichlorpurin, 2-fluor-6-chlorpurin. Běžně používané chemikálie jako chlorid sodný, bezvodný síran sodný, uhličitan draselný, hydrogenuhličitan draselný a rozpouštědla ethyl-acetát (EtOAc), diethylether, petrolether 40-65 °C (PE), methanol (MeOH), chloroform, *n*-propanol (*n*-PrOH) a toluen byla zakoupena od firmy Lach:Ner. Kinetin, 2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (2-chlorkinetin), 2,6-dichlor-9-(furan-3-ylmethyl)-9*H*-purin (VII) a *N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin byly připraveny Mgr. Václavem Mikem, Ph.D. DMF a EtOAc byl vysušen stáním nad aktivovaným molekulovým sítem 3 Å (20% m/v) po dobu minimálně 72 hodin pod chlorkalciovým uzávěrem (Bradley a kol., 2010). Suchý THF byl připraven destilací ze směsi THF, sodík a benzofenon. V cirkadiálním testu bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Invitrogen), fetální sérum, Penicilin/Streptomycin roztok, GlutaMAX, HEPES a Luciferin-EF. V testu inhibice CSNK1δ bylo použito: [γ - ^{33}P]ATP-MP, enzym CSNK1δ, substrát casein (1mg/ml), DTT, 85% kyselina fosforečná, 96% ethanol, MOPS (Sigma Aldrich).

4.2 Biologický materiál

V experimentu byla použita buněčná linie U2OS (buňky lidského osteosarkomu, ATCC® HTB-96™) s *BMAL1:LUC* reportérovým systémem, který byl transdukován pomocí lentivirových částic (poskytnuta Dr. Martinem Sládkem, Fyziologický ústav

AV ČR). Na kultivaci buněk bylo použito růstové médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) obsahující glukózu 5 g/l, 2mM *L*-glutamin, 10% fetální telecí sérum, antibiotika (penicilin 100 U/ml a streptomycin 100 µg/ml) a buňky byly kultivovány za standardních kultivačních podmínek (5,5 % CO₂, 37 °C) se subkultivací každé 2-3 dny.

4.3 Metody

Níže je popsáno, jaké analytické metody byly použity. Pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byl sledován průběh reakcí. TLC byla prováděná na hliníkových destičkách se silikagelem 60 Å s fluorescenčním indikátorem F₂₅₄ (VWR) s použitím mobilních směsí CHCl₃/MeOH (9:1, v/v) nebo PE/EtOAc (1:1, v/v). Skvrny na destičkách byly detekovány UV světlem pomocí UV lampy Camag (254 nm a 365 nm) nebo byly použity vizualizační činidla 6% vanilin (3,2 g vanilinu, 200 ml 96% ethanol, 1 ml koncentrované CH₃COOH, 2 ml koncentrované H₂SO₄) a manganistan draselný (2 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃, 5 ml 5% KOH, 300 ml H₂O).

Sloupcová chromatografie a preparativní HPLC byly použity na přečištění připravených látek. Sloupcová chromatografie byla prováděna ve skleněných kolonách na silikagelu Davisil LC60A 40-63 µm nepravidelného tvaru (VWR) s mobilní směsí CHCl₃/MeOH nebo PE/EtOAc s gradientovou elucí, popřípadě izokraticky s využitím Et₂O. Preparativní HPLC byla provedena na přístroji 1260/1290 Infinity II LC/MSD (Agilent Technologies) na koloně Agilent 5 Prep-C18 (50 × 21,2 mm nebo 100 × 21,2 mm, velikost částic 5 µm) s použitím H₂O nebo 0,1% CH₃COOH jako rozpouštědla A a MeOH nebo CH₃CN jako rozpouštědla B s průtokem 20 ml/min.

Spektrofotometrická čistota a molekulová hmotnost připravených látek byla ověřena pomocí systému ACQUITY UPLC® H-Class (Waters) s detektorem s diodovým polem ACQUITY UPLC PDA (Waters) a stolním hmotnostním spektrometrem s jednoduchým kvadrupólem QDa (Waters). Vzorky byly rozpuštěny v DMSO (1 mg/100 µl) a dále 1000× naředěny do MeOH. Vzorky o objemu 10 µl byly nastříknuty na kolonu s reverzní fází Symmetry C18 (150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm, velikost částic 5 µm, Waters) a separovány při průtoku 0,2 ml/min gradientovou elucí (0 min - 90 % A; 24 min - 10 % A; 35 min - 10 % A; 36 min - 90 % A; 45 min - 10 % A). Na konci gradientu byla kolona reekvilibrována na výchozí podmínky. Jako rozpouštědlo A byla použita 15mM kyselina mravenčí (pH 4,0) a rozpouštědlem B byl MeOH. Analyty byly detekovány v PDA detektoru v rozsahu skenování 190-500 nm s rozlišením 1,2 nm a následně v hmotnostním spektrometru s iontovým zdrojem

v podobě elektrospreje s ionizací v pozitivní módu (ESI⁺, teplota zdroje 110 °C, napětí na kapiláře +3.0 kV, napětí na vstupním kuželu +20 V, desolvatační teplota 250 °C). Dusík byl použit jako sušící (50 l/h) i zmlžující (500 l/h) plyn. Jednotlivé ionty byly detekovány ve FULLSCAN módu v rozsahu 50-1000 m/z a analyzovány pomocí softwaru MassHunter.

Struktura připravených látek byla potvrzena změřením spekter pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) na spektrometru ECA-500 (Jeol, frekvence 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C) nebo na NMR spektrometru ECZ/R 400 (Jeol, frekvence 400 MHz pro ¹H, 100 MHz pro ¹³C a 375 MHz pro ¹⁹F). Jednotlivé vzorky byly rozpuštěny v DMSO-*d*₆ a chemické posuny byly kalibrovány na signál rozpouštědla (DMSO-*d*₆; 2,49 ppm pro ¹H; DMSO-*d*₆ 39,5 ppm pro ¹³C) a chemické posuny ve ¹⁹F spektrech byly kalibrovány na CCl₃F (0 ppm).

4.4 Syntéza

4.4.1 Funkcionalizace purinového heterocyklu v pozici N9

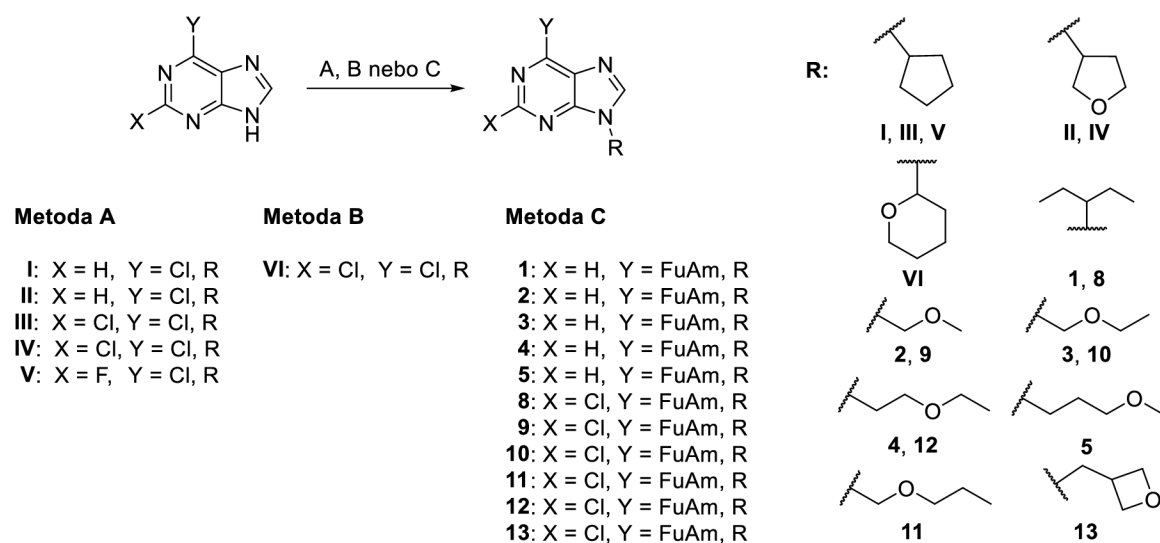


Schéma 1: Obecný postup syntézy N9-derivátů kinetinu. Metoda A - Mitsunobuova alkylace: R-OH, PPh₃, DIAD, THF, lab. tepl., 1 h. Metoda B – hydroamice: 3,4-dihydro-2H-pyran, TFA, EtOAc, 0 °C – lab. tepl, 2 h; Metoda C - alkylace alkylhalogenidem: R-Cl/Br, DMF, K₂CO₃, lab. tepl., 24 h. FuAm – furan-2-ylmethylamino.

Metoda A – Mitsunobuova alkylace (meziprodukty I-V)

DIAD (2 ekv.) byl přikapán za laboratorní teploty pod inertní argonovou atmosférou do suspenze 6-chlorpurinu/2,6-dichlorpurinu v suchém THF (0,15M) s příslušným alkoholem R-OH (2 ekv.) a trifenyfosfinem (2 ekv.). Reakční směs byla míchána 1 h za laboratorní teploty a následně zakoncentrována za sníženého tlaku. Většina trifenyfosfinoxidu (Ph_3PO) byla odstraněna krystalizací z toluenu. Filtráty byly zakoncentrovány za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s využitím mobilních fází $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0, v/v), PE/EtOAc (5:1, v/v) s gradientem polární složky, isokraticky pomocí Et_2O , případně získán po rekrystalizaci z MeOH. V některých případech bylo k odstranění trifenyfosfinoxidu z reakce použito vysrážení pomocí ZnCl_2 (Batesky et al., 2017). K odparku reakční směsi rozpuštěné v EtOAc byl přidán ZnCl_2 (2 ekv.) a vzniklá suspenze byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Zinečnatý komplex trifenyfosfinoxidu v podobě bílé sraženiny byl odfiltrován a filtrát byl po zakoncentrování použit k purifikaci pomocí sloupcové chromatografie.

Metoda B – Hydroaminace 3,4-dihydro-2H-pyranem (meziprodukt VI)

TFA (1,2 ml, 15,87 mmol) byla přikapána k suspenzi 2,6-dichlorpurinu (2 g, 10,58 mmol) a 3,4-dihydro-2H-pyranu (1,3 ml, 13,76 mmol) v suchém EtOAc (16 ml) vychlazené v ledové lázni. Po přidání TFA byla reakční směs pozvolna vytemperována na laboratorní teplotu a míchána další 2 h. Reakční směs byla poté znovu vychlazená v ledové lázni a její pH bylo upraveno roztokem amoniaku (28% vodný amoniak/ H_2O – 3:2, v/v) na pH 7-8, přičemž došlo k vypadnutí pevné látky. Ta byla zfiltrována, promyta vychlazeným EtOAc a vodou a vysušena při 50 °C. Druhý podíl produktu byl získán extrakcí filtrátu EtOAc. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny nad Na_2SO_4 , zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odparek byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie s použitím mobilní směsi PE/EtOAc (5:1, v/v) s gradientem EtOAc.

Metoda C – Alkylace alkylhalogenidy s použitím K_2CO_3 jako báze (produkty 1-5, 8-13)

Suspenze kinetinu/2-chlorkinetinu v suchém DMF (0,15M) s K_2CO_3 (2,5 ekv.) byla 20 minut míchána pod argonovou atmosférou za laboratorní teploty. Následně bylo do reakční směsi přikapáno příslušné alkylační činidlo (1,2 ekv.) a reakce probíhala 24 h při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byla reakční směs nalita do studené vody a extrahována do EtOAc. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny nad Na_2SO_4 , zfiltrovány a zakoncentrovány pomocí vakuové odparky. Získaný

surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s použitím mobilní fáze chloroform/methanol (100:0, v/v) s gradientem polární složky.

4.4.2 Funkcionalizace purinového heterocyklu v pozici C6

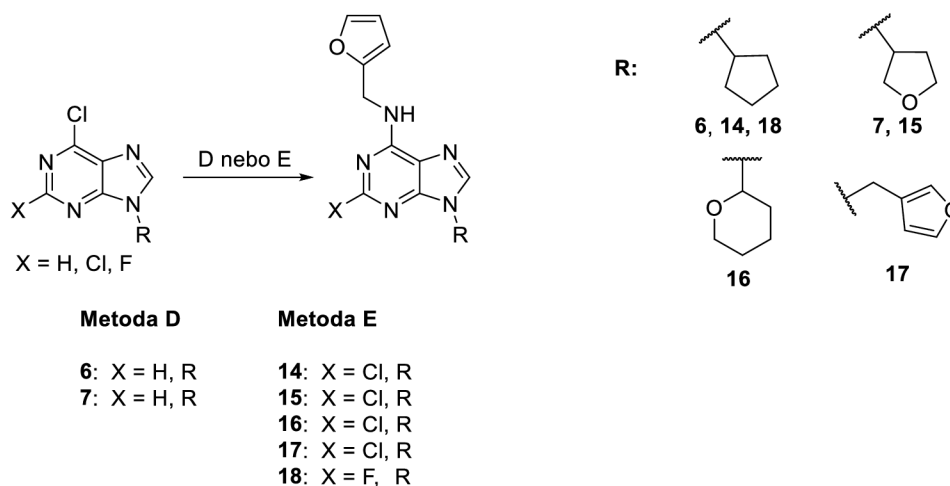


Schéma 2: Reakční schéma nukleofilní substituce purinových derivátů v poloze C6. Metoda D s mikrovlnným zahříváním: furfurylamin, Et₃N, MeOH, MW, 120 °C, 15-30 min. Metoda E s konvenčním zahříváním: furfurylamin, Et₃N, *n*-PrOH, 100 °C, 4 h.

Metoda D – Substituce nukleofilní (S_N) s mikrovlnným zahříváním (produkty 6, 7)

Směs příslušného purinu I/II v MeOH (0,25M) s furfurylaminem (1,5 ekv.) a Et₃N (2,5 ekv.) byla zahřívána 15–30 min při 120 °C v mikrovlnném reaktoru Discover SP (CEM) v dynamickém režimu s maximálním výkonem 200 W. Směs byla následně zakoncentrována za sníženého tlaku. Odparek byl rozředěn vodou a extrahován EtOAc. Spojené organické vrstvy byly promyty solankou, vysušeny nad Na₂SO₄, zfiltrány a zakoncentrovány na vakuové odparce. Surový produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií s použitím mobilních směsí CHCl₃/MeOH (100:0, v/v) nebo PE/EtOAc (5:1, v/v) s gradientovou elucí.

Metoda E – Nukleofilní substituce s konvenčním zahříváním (produkty 14–18)

Směs příslušného purinu III-VII v *n*-PrOH (0,25M) společně s furfurylaminem (1,2 ekv.) a Et₃N (2,5 ekv.) byla zahřívána 4 h při 100 °C v baňce pod zpětným chladičem nebo tlakové ampuli. Směs byla následně zakoncentrována za sníženého tlaku. Odparek byl rozředěn vodou a extrahován do EtOAc. Spojené organické vrstvy byly

promyty solankou, vysušeny nad Na₂SO₄, zfiltrány a zakoncentrovány na vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s použitím mobilních směsí CHCl₃/MeOH (100:0, v/v) nebo PE/EtOAc (5:1, v/v) s gradientovou elucí.

4.4.3 Funkcionalizace purinového heterocyklu v pozici C2

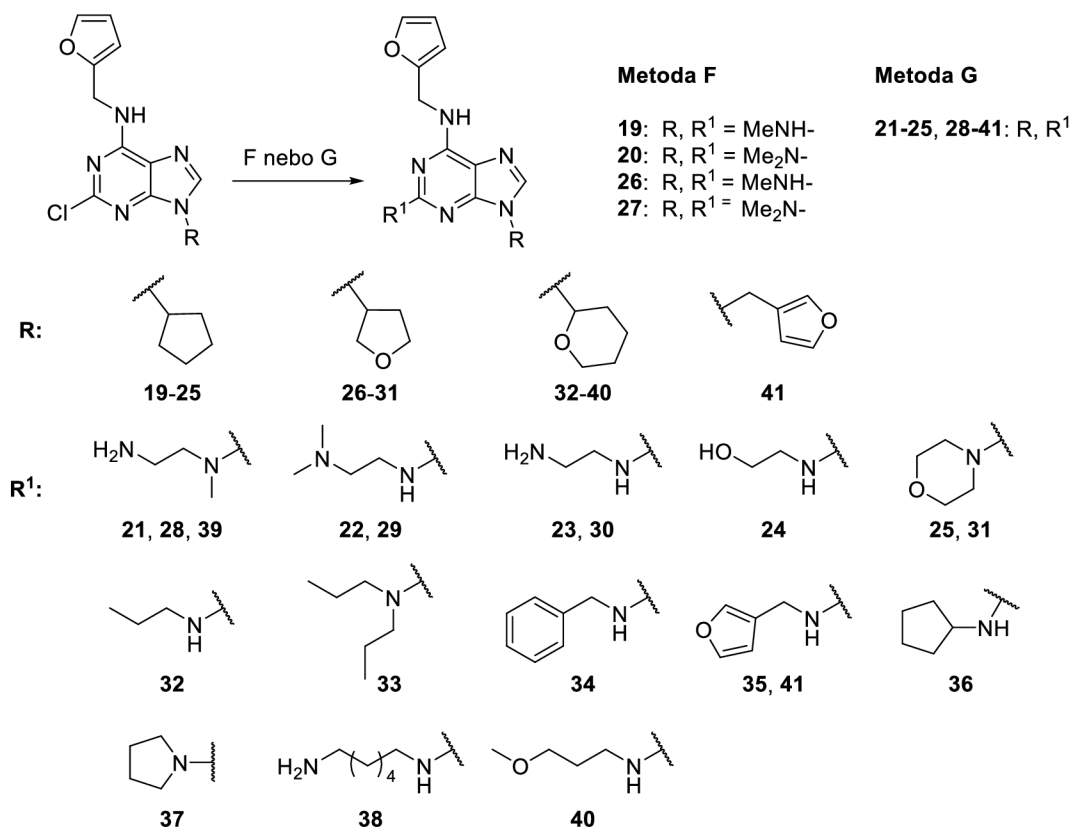


Schéma 3: Reakční schéma nukleofilní substituce v poloze C2 na purinovém heterocyklu.
 Metoda F: R¹-amin, 100 °C, 24 h; Metoda G: R¹-amin, DIPEA, 120-165 °C, 3 h.

Metoda F – reakce v ethanolickém roztoku aminu (produkty 19, 20, 26, 27)

Suspenze kinetinových derivátů **14**, **15** a 33% methylaminu v absolutním ethanolu (30 ekv.) nebo 5,6M dimethylaminu v absolutním ethanolu (20 ekv.) byla zahřívána pod inertní dusíkovou atmosférou v tlakové ampuli na 100 °C přes noc. Konec reakce byl kontrolován za pomoci TLC analýzy. Směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií s použitím mobilních směsí CHCl₃/MeOH (100:0, v/v) s gradientovou elucí, popřípadě pomocí preparativní HPLC.

Metoda G – reakce v nadbytku aminu, případně s přidavkem DIPEA (produkty 21-25, 28-41)

Suspenze příslušného derivátu kinetinu **14-17** byla zahřívána 3 h v tlakové ampuli při 120-165 °C pod inertní dusíkovou atmosférou v nadbytku odpovídajícího aminu (10-30 ekv.) a s přidavkem DIPEA (5 ekv.) jako pomocné báze, případně bez DIPEA (reakce s ethan-1,2-diaminem, hexan-1,6-diaminem, ethanolaminem). Po ochlazení byla směs naředěna vodou a extrahována do EtOAc. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny nad Na₂SO₄, zfiltrány a zakoncentrovány za sníženého tlaku. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s použitím mobilních směsí CHCl₃/MeOH (100:0, v/v) nebo PE/EtOAc (5:1, v/v) s gradientovou elucí, popřípadě pomocí preparativní HPLC.

4.5 Biologické testování

4.5.1 Cirkadiánní test

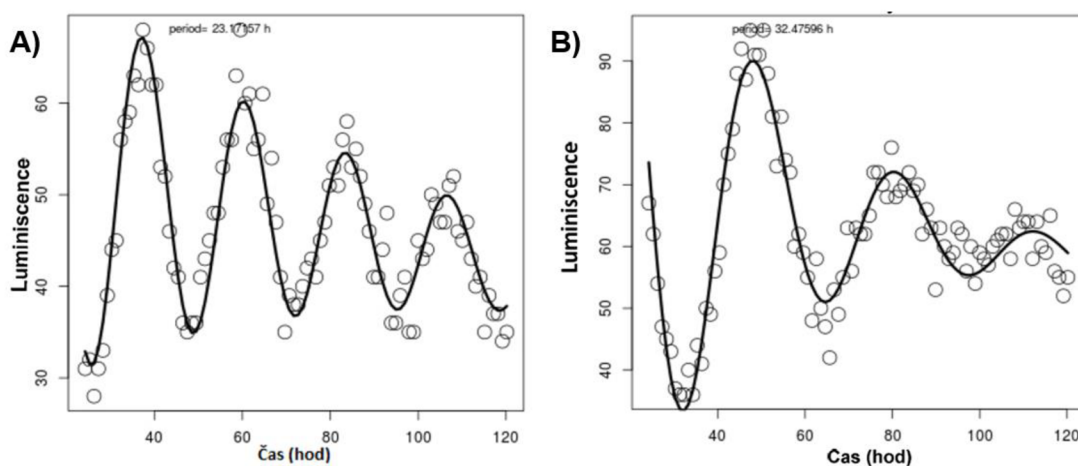
Buňky U2OS obsahující reportér *BMAL1:LUC* byly kultivovány v 384jamkové destičce v růstovém médiu do > 90% konfluence při stabilních podmínkách (37 °C, 5,5 % CO₂). Záznamové médium obsahovalo 10 000 buněk na jamku v 20 µl DMEM média a testovanou sloučeninu v sedmi opakováních nebo vehikulum (DMSO) v 80 µl DMEM média bez fenolové červeně s vysokým obsahem glukózy (4,5 g/l) obohaceného o 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES a 0,1mM Luciferin-EF. Po překrytí destičky PCR folií byla měřena luminiscence buněk pomocí přístroje M2 Tecan reader. Záznam luminiscence jednotlivých jamek probíhal 10 s každou hodinu během následujících 120 hodin. Analýza cirkadiánního rytmu byla provedena pomocí skriptu CellulaRhythm v programovacím jazyce R (Hirota et al., 2008), který naměřenými hodnotami proložil periodickou funkci, přičemž prvních 20 hodin záznamu bylo vyřazeno a následných 100 hodin bylo použito pro analýzu. Délka periody cirkadiánního rytmu byla určena relativně k periodě buněk ovlivněných pouze vehikulem DMSO (jejich perioda se rovná 1,00). Aktivita připravených látek byla porovnána s aktivitou kinetinu, 2-chlorkinetinu a KTHP.

4.5.2 Inhibice kaseinkinasy 1 δ (CSNK1 δ)

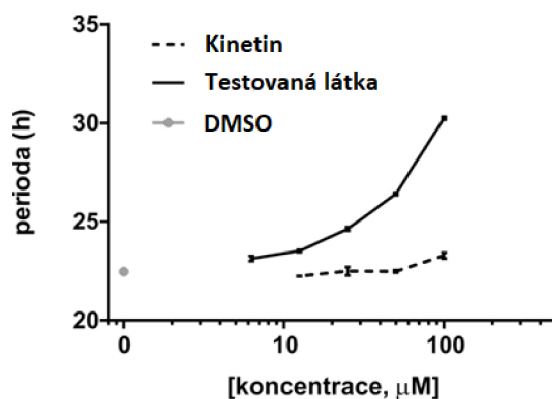
Inhibice CSNK1 δ připravenými látkami byla provedena radiometricky podle protokolu publikovaného v diplomové práci Daniela Schuberta (Schubert D., 2016). Princip metody je založen na schopnosti CSNK1 δ přenést radioaktivně značený fosfátový zbytek ze značeného ATP na peptidový substrát. V přítomnosti inhibitoru aktivita CSNK1 δ klesá a výsledkem je v porovnání s kontrolou slabší signál. Enzymatické reakce byly nastaveny dle standardního protokolu a probíhaly v mikrotitrační desce inkubované 15 minut při 30 °C. Reakce byly zastaveny přidávkem 3% kyseliny fosforečné. 1/3 objemu jamek byla poté přenesena na nitrocelulosovou membránu. Po zaschnutí (6 minut) byla membrána 3 \times promyta ve zředěné kyselině fosforečné a na závěr v 96% ethanolu. Po vyschnutí byla membrána zabalena do potravinářské fólie a přes noc uzavřena v kazetě s citlivou deskou Imaging plate BAS-MS2025. Měření signálu bylo provedeno pomocí BAS1800 Bioimage readeru (FujiFilm) s vyhodnocením v programu AIDA Image Analysis (Elysia).

5 Výsledky a diskuze

Kinetin od svého objevení v 50. letech minulého století ukázal řadu pozitivních účinků na rostlinné i živočné buňky (Kadlecová a kol., 2019). Na našem pracovišti bylo ukázáno, že je schopen také modulovat cirkadiánní rytmy a prodlužovat periodu cirkadiánních hodin (Voller a kol., PV 2019-757). V návaznosti na tento objev byla v rámci diplomové práce (Dokonalová, 2019) připravena série kinetinových derivátů, které mají v pozici C2 na purinovém kruhu atom vodíku nebo chloru a dále jsou substituovány v pozici N9 alkoxyalkylovými nebo oxocykloalkylovými skupinami. V cirkadiánním testu na buněčné linii U2OS s *BMAL1:LUC* reportérovým systémem zaznamenaly nejvyšší aktivitu látky s oxocykloalkylovými substituenty a chlorem v pozici C2, prodlužující periodu cirkadiánního cyklu až ke 32 hodinám (Graf 1) v závislosti na použité koncentraci (Graf 2). Získaná data naznačují, že chemická modifikace kinetinu může v cirkadiánním testu potencovat jeho účinky.



Graf 1: Ukázka záznamu měření luminiscence a proložení periodické funkce. A) Perioda kontroly. Průměrná perioda kontroly je 23 hodin. **B)** Perioda testované látky prodloužená na 32 hodin. Testovaná látka: 2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)-9*H*-purin-6-amin. (Převzato z: Dokonalová, 2019).



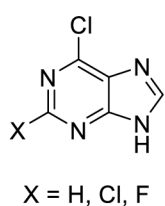
Graf 2: Srovnání vlivu testované látky a kinetinu na periodu cirkadiálního rytmu v buněčné linii U2OS. Graf zobrazuje koncentrační křivku závislosti koncentrace (μM) na cirkadiální periodě (h). Testovaná látka: *N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (KTHP).

Cílem této práce tak bylo rozšíření stávající knihovny látek o nové deriváty kinetinu a otestování jejich aktivity v cirkadiálním testu. Knihovna byla doplněna o nové *N9*-substituované deriváty kinetinu a 2-chlorkinetinu. Na základě získaných biologických dat z diplomové práce byla u vytipovaných nejaktivnějších derivátů kinetinu provedena také substituce chloru v pozici C2. Jednalo se o sloučeniny, které v pozici *N9* obsahovaly následující substituenty: cyklopentyl nebo heterocyklický kruh tetrahydrofuran-3-yl a tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl.

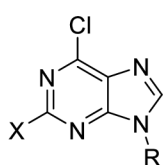
5.1 Syntéza

V rámci experimentální části této práce bylo připraveno 41 derivátů kinetinu se substitucí v poloze 9 a vodíkem (7 látek), chlorem (11 látek) nebo různými substituenty (23 látek) v pozici C2 na purinovém kruhu. Při syntéze kinetinových derivátů byly použity dvě syntetické cesty – cesta A a B (Schéma 4).

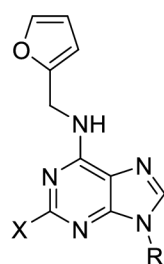
Syntetická cesta A



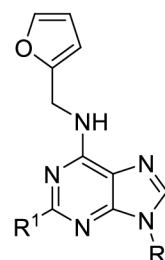
A nebo B



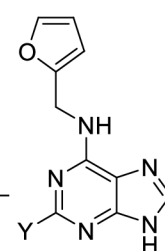
D nebo E



F nebo G



Syntetická cesta B



C

Schéma 4: Reakční schéma pro syntézu derivátů odvozených od kinetinu. A) R-OH, PPh₃, DIAD, THF, lab. tepl., 1 h; B) 3,4-dihydro-2H-pyran, TFA, EtOAc, 0 °C – lab. tepl., 2 h; C) R-Cl/Br, DMF, K₂CO₃, lab. tepl., 24 h; D) furfurylamin, Et₃N, MeOH, MW, 120 °C, 15-30 min; E) furfurylamin, Et₃N, *n*-PrOH, 100 °C, 4 h; F) R¹-amin, EtOH, 100 °C, 24 h; G) R¹-amin, DIPEA/bez DIPEA, 120-165 °C, 3 h.

Dvě syntetické cesty byly zvoleny z důvodu rozmanitosti použitých výchozích látek. Výhodou syntetické cesty A je relativně vyšší rozpustnost výchozích chlorderivátů a její univerzálnější použití, kdy pro substituci polohy N9 se dají využít různé metody syntézy (Mitsunobuova alkylace, hydroaminace). Nevýhodou této syntetické cesty je vznik vyššího množství N7 izomeru kvůli nedostatečné sterické zábraně, čím dochází ke snížení výtěžku reakce. Naopak substituce polohy N9 v případě syntetické cesty B je regioselektivnější kvůli substituentu v poloze C6, který je schopen díky své velikosti zabránit přístupu substituentu během reakce do polohy N7. V závislosti na použitých podmínkách reakce může však minoritně docházet ke vzniku N3 izomeru (Dokonalová, 2017). Nevýhodou této cesty je obtížnější rozpustnost výchozích látek, proto je nutné použití vysokovroucích polárních aprotických rozpouštědel jako DMF a DMSO.

V případě **cesty A** byly použity komerčně dostupné výchozí stavební látky 6-chlorpurin, 2,6-dichlorpurin a 2-fluor-6-chlorpurin. Jednotlivé substituenty v podobě odpovídajících alkoholů byly do polohy N9 připojeny Mitsunobuovou alkylací, meziprodukty (I–V) nebo hydroaminací s 3,4-dihydro-2H-pyranem látka VI (Tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled připravených intermediátů metodou Mitsunobuovy alkylace a hydroaminace.

Číslo látky	C2	C6	N9	HPLC [min/%]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺
I	H	Cl	cyklopentyl	17,22/99,9	223,1
II	H	Cl	tetrahydrofuran-3-yl	9,93/92,5	225,1
III	Cl	Cl	cyklopentyl	21,25/98,5	257,1
IV	Cl	Cl	tetrahydrofuran-3-yl	18,85/61,4	259,4
V	F	Cl	cyklopentyl	12,96/99,9	240,6
VI	Cl	Cl	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	19,06/99,9	189,1

Výhodou Mitsunobuovy alkylace je relativně krátká reakční doba (většinou okolo 1 h). Nevýhodou je problematické odstranění trifenylofosfinoxidu (PPh₃O), který v reakci vzniká jako vedlejší produkt. V rámci minulé práce (Dokonalová, 2019) byly publikovány možnosti odstranění PPh₃O: odkrystalování PPh₃O z toluenu, purifikace pomocí sloupcové chromatografie, krystalizace produktu z MeOH, popřípadě precipitace pomocí chloridu zinečnatého v ethyl-acetátu podle postupu publikovaného v literatuře (Batesky a kol., 2017). Ve většině případů se jednou z použitých metod, případně jejich kombinací podařilo PPh₃O odstranit. Vyjímkou byla látka **IV**, kde čistota byla pouhých 61 %.

Výsledné meziproducty (**I-VI**) byly následně substituovány furfurylaminem v poloze C6 v přítomnosti triethylaminu jako pomocné báze buď pomocí mikrovlnné syntézy v mikrovlnném reaktoru Discover SP (CEM) s fokusovaným mikrovlnným zářením (**6, 7**) nebo konvenčním zahříváním (**14-18**). V mikrovlnném reaktoru byly připraveny pouze deriváty 6-chlorpurinu **6** a **7**, protože oproti 2,6-dichlorderivátům obsahují pouze jedno reaktivní centrum (C6 pozice s chlorem). Metoda pro syntézu v mikrovlnném reaktoru vznikla optimalizací postupu dle publikace Huang a kol. (2007) s cílem minimalizovat množství použitého nukleofilu a nalezením vhodného rozpouštědla. Reakce probíhala v MeOH s mírným nadbytkem furfurylaminu a Et₃N jako pomocné báze (Dokonalová, 2019). Obrovskou výhodou mikrovlnné syntézy je výrazné urychlení reakční doby oproti konvenčnímu zahřívání ze 4 hodin na pouhých 10–30 minut. V případě 2,6-dichlorderivátů **14–18** bylo nezbytné zůstat u metody konvenčního zahřívání, aby nedošlo ke vzniku 2,6-homosubstituovaných derivátů.

Syntetická **cesta B** byla založena na substituci kinetinu a 2-chlorkinetinu v poloze N9. Reakce probíhala v přítomnosti příslušného alkylhalogenidu s bází K₂CO₃ (v heterogenním systému) v suchém DMF za vzniku derivátů kinetinu (**1–5**) a 2-chlorkinetinu (**8–13**) (Tabulka 2).

Tabulka 2: Přehled připravených derivátů kinetinu a 2-chlorkinetinu a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.

Číslo látky	C2	C6	N9	HPLC [min/%]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺
1	H	furfurylamino	pentan-3-yl	20,31/97,5	286,3
2	H	furfurylamino	2-methoxymethyl	14,59/97,0	260,1
3	H	furfurylamino	2-ethoxymethyl	16,93/99,3	274,2
4	H	furfurylamino	2-ethoxyethyl	17,01/95,7	288,3
5	H	furfurylamino	3-methoxypropyl	16,53/99,5	288,3
6	H	furfurylamino	cyklopentyl	19,92/99,7	284,3
7	H	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	14,99/99,9	286,2
8	Cl	furfurylamino	pentan-3-yl	23,84/96,8	320,7
9	Cl	furfurylamino	2-methoxymethyl	19,19/99,9	294,7
10	Cl	furfurylamino	2-ethoxymethyl	21,4/97,3	308,7
11	Cl	furfurylamino	2-propoxymethyl	22,37/98,0	322,7
12	Cl	furfurylamino	2-ethoxyethyl	21,04/97,9	322,1
13	Cl	furfurylamino	oxetan-3-ylmethyl	18,54/99,9	320,8
14	Cl	furfurylamino	cyklopentyl	27,32/99,9	317,8
15	Cl	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	19,56/99,9	320,1
16	Cl	furfurylamino	tetrahydro-2H-pyran-2-yl	21,62/99,9	334,8
17	Cl	furfurylamino	furan-3-ylmethyl	21,58/99,9	330,1
18	F	furfurylamino	cyklopentyl	22,10/99,9	302,3

Postup této reakce vycházel z kombinováním postupů ze dvou publikací (Itaya a kol., 1980, Ramzaeva a kol., 1987), kde použití báze K₂CO₃, vhodného rozpouštědla, a především díky stérické zábraně N7 pozice furfurylamino skupinou vedlo ke zvýšení poměru vzniklých izomerů ve prospěch N9, a tím pádem k lepším celkovým výtěžkům reakcí. V rámci heterogenní katalýzy může v tomto případě minoritně vznikat i N3 izomer, který byl v případě některých derivátů pravděpodobně i pozorován při ověřování průběhu reakce pomocí TLC. Vzhledem k velmi nízkým výtěžkům N3 izomeru se tento vedlejší produkt nepodařilo vyizolovat a charakterizovat.

Substitucí atomu chloru v poloze C2 u látek **14–17** byla připravena poslední skupina 2,6,9-trisubstituovaných derivátů kinetinu (**19–41**, Tabulka 3). Atom chloru v poloze C2 je méně reaktivnější než chlor v pozici C6, proto byl substituován za výrazně tvrdších podmínek – teplota reakce >120 °C a delší reakční čas v závislosti na použitém nukleofilu. Skupina produktů (**19**, **20**, **26**, **27**) byla připravena zahříváním výchozích látek v ethanolickém roztoku odpovídajícího aminu (methylamin, dimethylamin) v tlakové ampuli při 100 °C. Methylamin a dimethylamin jsou nukleofily

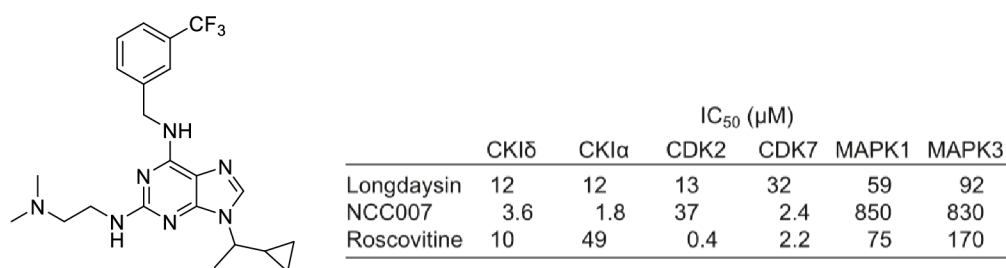
s nízkým bodem varu, proto pro odreagování výchozí látky byla dostačující teplota reakce 100 °C.

Většina trisubstituovaných finálních produktů (**21–25**, **28–41**) byla syntetizována v přítomnosti nadbytku odpovídajícího výše vroucího aminu a pomocné Hünigovy báze DIPEA bez rozpouštědla, tzv. „neat“ (Kubiasová a kol., 2018). Metoda „neat“ byla zvolena kvůli možné nežádoucí vedlejší reakci s rozpouštědly jako *n*-BuOH a DMF, a případně kvůli předpokládaným problémům s izolací a purifikací získaného produktu při použití DMSO nebo ethylenglykolu. Surové produkty vzniklé v rámci obou metod syntézy byly přečištěny sloupcovou chromatografií s gradientovou elucí využívající mobilní směs chloroform/methanol, popřípadě petroether/ethyl-acetát. Produkty, které se nepodařilo přečistit pomocí sloupcové chromatografie, byly purifikovány pomocí preparativní HPLC.

Tabulka 3: Přehled připravených finálních 2,6,9-trisubstituovaných produktů a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.

Číslo látky	C2	C6	N9	HPLC [min/%]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺
19	methylamino	furfurylamino	cyklopentyl	21,79/98,6	313,4
20	dimethylamino	furfurylamino	cyklopentyl	26,14/99,9	327,4
21	(2-aminoethyl)methylamino	furfurylamino	cyklopentyl	16,41/97,2	356,4
22	(2-dimethylamino)ethylamino	furfurylamino	cyklopentyl	13,83/97,7	370,5
23	2-aminoethylamino	furfurylamino	cyklopentyl	13,96/97,4	342,2
24	2-hydroxyethylamino	furfurylamino	cyklopentyl	19,14/99,9	343,3
25	morfolino	furfurylamino	cyklopentyl	24,37/98,7	369,2
26	methylamino	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	17,51/99,3	315,2
27	dimethylamino	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	22,38/99,3	329,2
28	(2-aminoethyl)methylamino	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	9,86/99,9	358,2
29	(2-dimethylamino)ethylamino	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	9,02/97,1	372,2
30	2-aminoethylamino	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	8,31/99,9	344,2
31	morfolino	furfurylamino	tetrahydrofuran-3-yl	20,43/98,2	371,2
32	propylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	23,42/99,9	357,2
33	dipropylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	18,67/99,9	399,4
34	benzylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	24,43/99,9	405,2
35	furfurylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	22,84/96,6	395,3
36	cyklopentylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	25,11/99,9	383,2
37	pyrrolidin-1-yl	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	25,35/99,9	369,2
38	6-aminohexylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	17,13/96,0	414,3
39	(2-aminoethyl)methylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	18,35/97,5	372,3
40	3-methoxypropylamino	furfurylamino	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl	21,09/99,9	387,3
41	furan-2-ylmethyl	furfurylamino	furan-3-ylmethyl	22,48/99,9	391,4

Jak bylo zmíněno výše, kinetin strukturně připomíná roskovitin, který je v pozici C2 substituován chirálním aminoalkoholem, (*R*)-2-aminobutanolem. V našem případě jsme pro substituci do C2 polohy zvolili různě dlouhé alkylové, alkoxyalkylové, aminoalkylové, hydroxyalkylové, arylalkylové, heteroarylalkylové, cyklické nebo heterocyklické substituenty připojené prostřednictvím aminoskupiny. Jak se ukázalo později, stejnou myšlenku měli i Lee a kol. (2019), kteří se inspirovali longdaysinem a připravili sérii jeho derivátů, kde isopropylovou vidličku v N9 pozici nahradili 1-cyklopropylethylem a C2 pozici modifikovali obdobnými substituenty jako v našem případě, popřípadě krátkými alkoxyskupinami (Lee a kol., 2019). Nejúčinnější sloučeninou z této série byla látka s označením NCC007 (Obr. 10), která měla v pozici C2 2-(dimethylamino)ethylamino- substituent a výrazně prodlužovala periodu cirkadiánního rytmu (o 1 h při koncentraci 22 nmol/l a o 5 h při 320 nmol/l) *in vitro* a byla aktivní i *in vivo* na vyšším modelu.



Obr. 10: Struktura NCC007 a hodnoty IC₅₀ pro vybrané kinasy v porovnání s longdaysinem a roskovitinem.

Stejně jako v případě longdaysinu byla i u NCC007 primárním molekulárním cílem kaseinkinasa 1. Provedené substituce vedly oproti longdaysinu ke snížení IC₅₀ vůči CSNK1δ z 12 μmol/l na 3,6 μmol/l a CSNK1α z 12 μmol/l na 1,8 μmol/l, a zvýšení selektivity oproti MAPK1 a MAPK3 (Obr. 10).

5.2 Biologická aktivita

Připravené látky (1-41) byly otestovány v cirkadiánním testu na katedře Experimentální biologie Mgr. Jiří Vollerem, Ph.D. V experimentu byla použita buněčná linie lidského osteosarkomu U2OS obsahující luminiscenční reportérový systém *BMAL1:LUC*, který generuje rytmickou expresi luciferasy pod kontrolou promotoru *BMAL1*. Luciferasa následně katalyzuje rozklad přítomného luciferinu na jeho oxidovanou formu oxoluciferin s přebytkem energie v excitovaném stavu, jenž se uvolní emisí světla

v rozmezí vlnových délek 550–570 nm. Uvolněná luminiscence z jednotlivých jamek byla snímána během následujících 120 hodin každou hodinu po dobu 10 s. Z důvodů synchronizace buněk bylo z analýzy vyloučeno prvních 20 hodin měření a zbylých 100 h bylo použito pro analýzu. Délka periody cirkadiánního rytmu byla vyjádřena relativně k periodě buněk ovlivněných pouze DMSO (jejich perioda je tedy 1,00).

Cílem tohoto testu bylo zjištění, jestli připravené deriváty jsou schopny modulovat cirkadiánní rytmus a modulovat aktivitu molekulárních komponent (*BMAL1/CLOCK* a *PER/CRY*) savčího buněčného cirkadiánního oscilátoru a prodlužovat tak periodu cirkadiánních hodin. Prodloužení periody cirkadiánního rytmu znamená prodloužení vnitřní periody cirkadiánního rytmu buněk, tkání, či celého organismu oproti původní periodě cirkadiánního rytmu.

Připravené látky byly testovány v jedné, popřípadě dvou koncentracích v rozmezí 1-50 $\mu\text{mol/l}$ a jejich aktivita byla porovnána s kinetinem, 2-chlorkinetinem a KTHP (Tabulka 4). Obecně lze konstatovat, že všechny testované látky, některé pouze nepatrně, prodlužovaly periodu cirkadiánního rytmu a byly aktivnější než srovnávací látky kinetin, 2-chlorkinetin a KTHP. U produktů **20**, **21**, **24** a **25**, které byly testovány ve dvou koncentracích bylo pozorováno výraznější prodloužení periody při vyšší testované koncentraci.

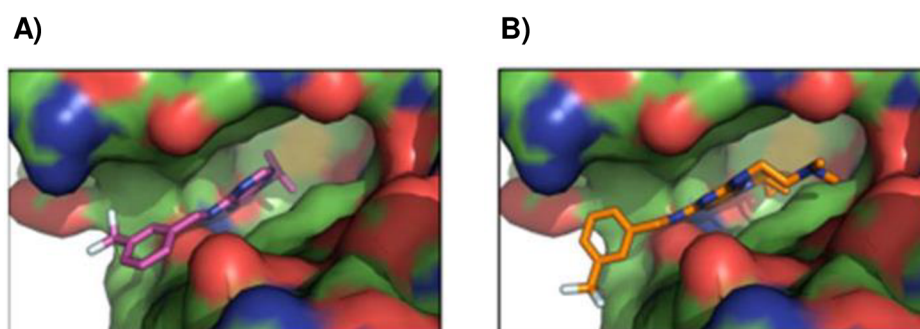
Vzhledem k nekompletním poskytnutým datům, kdy látky byly navíc testovány při různých koncentracích, je velmi obtížné vyvozovat vztah mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou. Aktivita připravených látek závisí jak na použitém substituentu v pozici C2, tak i v pozici N9. V uvedené tabulce 4 je pozorován rozdíl v aktivitě v závislosti na použitém C2 substituentu. Látky obsahující pouze vodík (**6**, **7**) v pozici C2 mají obecně nižší aktivitu než látky s chlorem (**14-16**), či jiným použitým substituentem (**20-40**) na pozici C2. V rámci vytipovaných substituentů kinetinu v pozici N9 (cyklopentyl, tetrahydrofuran-3-yl, tetrahydro-2H-pyran-2-yl) vykázaly po substituci v poloze C2 nejvyšší aktivitu sloučeniny v kombinaci s cyklopentylem (**20-25**). Nejvýraznější posun v délce periody byl zaznamenán u kinetinu s cyklopentylem v kombinaci s 2-aminoethyl(methyl)amino (**21**), (2-dimethylamino)ethylamino (**22**) a morfolino (**25**) substituenty, kdy došlo k výraznému prodloužení periody z 24-hodinového intervalu na 47 hodin (**21**), 36 hodin (**22**) a 40 hodin (**25**). Právě tyto tři substituenty vykazovaly i u jiných N9-substituovaných kinetinu a 2-chlorkinetinů nejvýraznější prodloužení periody.

Tabulka 4: Efekt sloučenin na délku periody cirkadiálního rytmu v buněčné linii U2OS.

Číslo látky nebo název srovnávací látky	Koncentrace testované látky ($\mu\text{mol/l}$)	Délka periody \pm střední chyba průměru (vyjádřená relativně ke kontrole)
6	10	$1,19 \pm 0,02$
7	10	$1,06 \pm 0,01$
14	5	$1,23 \pm 0,03$
15	20	$1,22 \pm 0,01$
16	20	$1,11 \pm 0,01$
20	1	$1,05 \pm 0,01$
	4	$1,15 \pm 0,01$
21	10	$1,26 \pm 0,07$
	20	$1,95 \pm 0,14$
22	10	$1,48 \pm 0,28$
23	1	$1,16 \pm 0,03$
24	1	$1,07 \pm 0,01$
	4	$1,21 \pm 0,01$
25	1	$1,09 \pm 0,01$
	4	$1,67 \pm 0,33$
26	20	$1,06 \pm 0,01$
28	20	$1,25 \pm 0,01$
29	20	$1,16 \pm 0$
30	20	$1,09 \pm 0$
31	20	$1,13 \pm 0,01$
32	10	$1,05 \pm 0,01$
35	10	$1,1 \pm 0,02$
36	20	$1,05 \pm 0,01$
37	10	$1,04 \pm 0$
39	1	$1,08 \pm 0,01$
40	20	$1,05 \pm 0,01$
kinetin	20	$1,02 \pm 0,01$
2-chlorkinetin	20	$1,00 \pm 0,03$
KTHP	20	$1,08 \pm 0,01$

V porovnání s *N9* substituovanými deriváty kinetinu a 2-chlorkinetinu připravenými v diplomové práci (Dokonalová, 2019) vede modifikace v C2 pozici vhodným substituentem k potentnějším látkám. Výsledkem tohoto zkoumání je česká a mezinárodní patentová přihláška na deriváty kinetinu k modulaci cirkadiálních rytmů (Voller a kol., PV 2022-227).

Jak bylo zmíněno výše Lee a kol. (2019) v sérii derivátů odvozených od longdaysinu připravili aktivnější sloučeninu s označením NCC007. Dockingové studie NCC007 a longdaysinu do aktivního místa CSNK1 δ v této studii ukazují, že nepolární C2 a N9 substituenty jsou zanořeny hluboko v aktivním místě, planární purin toto vazebné místo uzavírá a 3-(trifluormethyl)benzylamino substituent v pozici C6 je orientován ven z aktivního místa (Obr. 11). Pomíneme-li rozdíl v C2 a N9 substituentech mezi roskovitinem, longdaysinem, NCC007 a látkami připravenými v naší sérii, je to patrně i C6 substituent, který hraje při vazbě důležitou roli, ačkoli je orientován mimo vazebné místo. Může to být způsobeno velikostí kruhu, v rámci něho distribucí elektronové hustoty, přítomností heteroatomu nebo substituentu, které tuto vazbu mohou ovlivnit. Jak se ukázalo v předešlé diplomové práci, deriváty substituované pouhým benzylaminem vykazovaly vyšší aktivitu než příslušná furfurylaminová analoga (Dokonalová, 2019). NCC007 nese v C2 pozici stejný substituent jako látka (**22**), přičemž aktivnější látkou v naší sérii byla ta modifikovaná morfolinem. Je tak otázkou, zda by substituce NCC007 v pozici C2 morfolinem nevedla k účinnější molekule.



Obr. 11: Ukázka možné vazby longdaysinu (A) a NCC007 (B) do aktivního místa CSNK1 δ v dockingové studii. (Převzato z: Lee a kol., 2019)

Nejen z důvodů strukturní podobnosti připravených látek s longdaysinem, NCC007 a roskovitinem, a způsobem, jakým ovlivňují cirkadiánní cyklus (všechny látky prodlužují periodu cirkadiánního rytmu), se jako možný molekulární mechanismus účinku jeví inhibice CSNK1. Fosforylace hodinových komponent pomocí CSNK1 δ je stěžejním elementem regulačního mechanismu cirkadiánní smyčky. Pro potvrzení této hypotézy byly látky otestovány v *in vitro* kinásovém testu, který je založen na schopnosti CSNK1 δ přenést radioaktivně značený fosfátový zbytek ze značeného ATP na peptidový substrát. V přítomnosti daného inhibitoru aktivita CSNK1 δ klesá a výsledkem je v porovnání s kontrolou slabší signál, tzv. residuální aktivita vyjádřená v procentech. Na ověření schopnosti inhibice CSNK1 δ byly látky otestovány ve dvou koncentracích 2 a 20 $\mu\text{mol/l}$ a jako standardy byly použity komerční inhibitor

PF-670462, kinetin a longdaysin. Testování bohužel bylo provedeno opět jen na malém vzorku látek (**14-16**) a navíc ne u neaktivnějších látek z celé série. Výsledky však ukazují, že připravené látky jsou schopny inhibovat aktivitu kaseinkinasy 1 δ , a že v některých případech vykazují nižší hodnotu IC₅₀ než longdaysin (Tabulka 5).

Tabulka 5: Hodnocení inhibice CSNK1 δ u vybraných látek.

Číslo látky	Residuální aktivita (%)		IC ₅₀ μmol/l
	Testovaná koncentrace 20 μmol/l	Testovaná koncentrace 2 μmol/l	
14	1,93	12,16	0,309
15	49,34	89,88	11,81
16	13,64	22,73	2,22
Standard PF-670462	2,02	2,48	-
kinetin	88,34	21,81	>40
longdaysin	1,39	28,68	0,731

Na základě těchto dat lze předpokládat, že i aktivnější látky z této série budou potenciálními inhibitory CSNK1 δ a mohly by vykazovat dokonce lepší inhibiční parametry. Mechanismus inhibice pomocí sloučenin tohoto typu je založen na kompetici o vazebné místo s ATP, což může inhibovat celé spektrum kinas včetně MAPkinas nebo cyklin-dependentních kinas. Z tohoto důvodu by do budoucna bylo vhodné u neaktivnějších látek provést *in vitro* test na inhibici kaseinkinasy 1, a dále otestovat jejich selektivitu na dostupném panelu kinas. Přítomnost furanového kruhu v připravených látkách, který pravděpodobně představuje strukturní nevýhodu při inhibici kaseinkinasy CSNK1 δ , se naopak může ukázat jako strukturní výhoda z hlediska kinasové selektivity.

Zjištění, že testované sloučeniny prodlužují periodu rytmu a zároveň by se mohlo jednat o inhibitory CSNK1 δ , vede k celé řadě terapeutických aplikací. Jednou z možností je korekce defektního cirkadiánního rytmu, kde je perioda rytmu zkrácená jako například u dědičného onemocnění FASPS. Další možná aplikace se nabízí v případě neurodegenerativních onemocnění, kde je prokázána abnormální cirkadiánní aktivita nebo nesoulad cirkadiánního rytmu s vnějším prostředím u pásmové nemoci a při práci na směny. I v jiných studiích modulátorů cirkadiánního rytmu potvrzují jejich terapeutický účinek u různých onemocněních (Ribeiro a kol., 2021).

6 Závěr

Tato práce byla zaměřena na shrnutí znalostí ohledně kinetinu a jeho účinků na živočišný a lidský organismus. V experimentální části práce jsou prezentovány nově připravené deriváty kinetinu, je zde popsána jejich syntetická cesta a v případě některých derivátů je zde ukázána i jejich schopnost modulovat cirkadiánní hodiny.

V rámci syntézy bylo připraveno sedm *N*9-substituovaných derivátů kinetinu, jedenáct *N*9-substituovaných derivátů 2-chlorkinetinu a dvacet tři *C*2,*N*9-disubstituovaných derivátů kinetinu. Během syntetické cesty produktů bylo použito celkem sedm různých syntetických metod A – G. Připravené sloučeniny byly otestovány v cirkadiánním testu na buněčné linii lidského osteosarkomu U2OS obsahující luminiscenční reportér *BMAL1:LUC*, který umožnil sledovat vliv látek na cirkadiánní rytmus. Všechny připravené látky vykazovaly stejný efekt, a to prodloužení periody cirkadiánního rytmu, a měly srovnatelnou nebo vyšší aktivitu než samotný kinetin. U derivátu kinetinu s vytipovanými *N*9 substituenty došlo po substituci v poloze *C*2 v některých případech k výraznému nárůstu biologické aktivity, zejména po substituci *N*-methylethylendiaminem, 2-(dimethylamino)ethylaminem a morfolinem. Kombinace cyklopentylu v *N*9 pozici a zmíněných substituentů vedla v závislosti na koncentraci k prodloužení periody z 24 hodin až téměř na 47 hodin (**21**), 36 hodin (**22**), resp. 40 hodin (**25**). Přesný mechanismus účinku připravených derivátů je prozatím neznámý, ale zmíněná hypotéza naznačuje, že by se mohlo jednat o inhibitory CSNK1δ. Tato myšlenka se tak do budoucna nabízí jako předmět dalšího zkoumání.

Vzhledem k dosaženým slibným výsledkům by kinetin a jeho deriváty mohly najít uplatnění nejen jako potenciální modulátory dysfunkčních cirkadiánních rytmů, ale i u jiných onemocnění jako jsou neurodegenerativní, kardiovaskulární a metabolické poruchy.

7 Seznam literatury

- Abbott, S.M., Malkani, R.G., Zee, P.C. (2020) Circadian disruption and human health: A bidirectional relationship. *Eur J Neurosci* **51**(1), 567-583.
- An, Y., Yuan, B., Xie, P., Gu, Y., Liu, Z., Wang, T., Li, Z., Xu, Y., Liu, Y. (2022) Decoupling PER phosphorylation, stability and rhythmic expression from circadian clock function by abolishing PER-CK1 interaction. *Nat Commun*, **13**(1), 139-148.
- Ars, E., Serra, E., Garcia, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lazaro, C., Estivill, X. (2000) Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* **9** (2), 237–247.
- Barciszewski, J., Mielcarek, M., Stobiecki, M., Siboska, G., Clark, B. F. (2000) Identification of 6-furfuryladenine (kinetin) in human urine. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(1), 69–73.
- 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**(2), 457–460.
- Barciszewski, J, Siboska, G.E., Pedersen, B.O., Clark, B.F., Rattan S.I.S. (1997a) Furfural, a precursor of the cytokinin hormone kinetin, and base propanals are formed by hydroxyl radical damage of DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **238**(2), 317-319.
- Batesky, D.C., Goldfogel, M.J., Weix, D.J. (2017) Removal of triphenylphosphine oxide by precipitation with zinc chloride in polar solvents. *J Org Chem* **82**(19), 9931-9936.
- Baynes, J. W. (2000) From life to death. The struggle between chemistry and biology during aging. The Maillard reaction as an amplifier of genomic damage. *Biogerontology* **1**(3), 235-246.
- Berge, U., Kristensen, P., Rattan, S.I. (2008) Hormetic modulation of differentiation of normal human epidermal keratinocytes undergoing replicative senescence *in vitro*. *Exp Gerontol* **43**(7), 658–662.
- Blagov, A.V., Goncharov, A.G., Babich, O.O., Larina, V.V., Orekhov, A.N., Melnichenko, A.A. (2022) Prospects for the development of pink1 and parkin activators for the treatment of parkinson's disease. *Pharmaceutics* **14**(11), 2514.
- Boone, N., Bergon, A., Loriod, B., Deveze, A., Nguyen, C., Axelrod, F.B., Ibrahim, E.C. (2012) Genome-wide analysis of familial dysautonomia and kinetin target genes with patient olfactory ecto-mesenchymal stem cells. *Hum Mutat* **33**(3), 530-540.
- Bowie, L.E., Maiuri, T., Alpaugh, M., Gabriel, M., Arbez, N., Galleguillos, D., Hung, C.L., Patel, S., Xia, J., Hertz, N.T., Ross, C.A., Litchfield, D.W., Sipione S., Truant,

- R. (2018) *N*⁶-furfuryladenine is protective in Huntington's disease models by signaling huntingtin phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**(30), 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**(24), 8351-8354.
- Dokonalová M. (2017) Syntéza, charakterizace a biologická aktivita *N*3-substituovaných derivátů cytokininů. Bakalářská práce. Olomouc. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta Přírodovědecká. 1-48.
- Dokonalová M. (2019) Syntéza a biologické testování purinových modulátorů funkcí nervové soustavy. Diplomová práce. Olomouc. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta Přírodovědecká. 1-75.
- Fathy, M., Saad-Eldin, S.M., Naseem, M., Dandekar, T., Othman, E.M. (2022) Cytokinins: wide-spread signaling hormones from plants to humans with high medical potential. *Nutrients* **14**(7), 1495.
- Fishbein, A.B., Knutson, K.L., Zee, P.C. (2021) Circadian disruption and human health. *J Clin Invest* **131**(19), 148-286.
- Friedman, J.M. (update 2022) Neurofibromatosis 1. *GeneReviews* PMID: 20301288.
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., Lee, C. (2002) The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**(1), 41-50.
- Gaikwad S. (2018) The biological clock: Future of neurological disorders therapy. *Neural Regen Res* **13**(3), 567-568.
- Gallego, M., Virshup, D. M. (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2), 139–148.
- Gaspar, T., Xhaufflaire, A. (1966) Effect of kinetin on growth, auxin catabolism, peroxidase and catalase activities. *Planta* **72**(3), 252–257.
- 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**(1–2), 26–34.
- Gonzalez, G., Grúz, J., D'Acunto, C.W., Kaňovský, P., Strnad, M. (2021) Cytokinin plant hormones have neuroprotective activity in vitro models of Parkinson's disease. *Molecules* **26**(2), 361.
- Hall, R. H., de Ropp, R. S. (1955) Formation of 6-furfurylaminopurine from DNA breakdown products. *J Am Chem Soc* **77**(23), 6400–6400.

- Hashem, E.Z., Eslami, M. (2016) Kinetin improves motility, viability and antioxidative parameters of ram semen during storage at refrigerator temperature. *Cell Tissue Bank* **19**(1), 97–111.
- He, B., Chen, Z. (2016) Molecular targets for small-molecule modulators of circadian Clocks. *Curr Drug Metab* **17**(5), 503-512.
- Hertz, N.T., Berthet, A., Sos, M.L., Thorn, K.S., Burlingame, A.L., Nakamura, K., Shokat, K.M. (2013) A neo-substrate that amplifies catalytic activity of Parkinson's-diseaserelated kinase PINK1. *Cell* **154**(4), 737–747.
- Hims, M.M., Leyne, M., Mull, J., Liu, L., Lazaro, C., Shetty, R.S., Gill, S., Gusella, J.F., Reed, R., Slaugenhaupt, S.A. (2007) Therapeutic potential and mechanism of kinetin as a treatment for the human splicing disease familial dysautonomia. *J Mol Med* **85**(2), 149–161.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**(1), 75–83.
- Hirota, T., Lewis, W.G., Liu, A.C., Lee, J.W., Schultz, P.G., Kay, S.A. (2008) A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β . *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(52), 20746-20751.
- Hirota, T., Lee, J.W., Lewis, W.G., Zhang, E.E., Breton, G., Liu, X., 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 CK1 α as a clock regulatory kinase. *PLoS Biol* **8**(12), 1000559.
- Huang, L. K., Cherng, Y. C., Cheng, Y. R., Jang, J. P., Chao, Y. L., Cherng, Y. J. (2007) An efficient synthesis of substituted cytosines and purines under focused microwave irradiation. *Tetrahedron* **63**(24), 5323-5327.
- Cha, H. K., Chung, S., Lim, H. Y., Jung, J. W., Son, G. H. (2019) Small molecule modulators of the circadian molecular clock with implications for neuropsychiatric diseases. *Front Molecul Neuro* **11**(496), 1-10.
- Chen, Z., Yoo, S.H., Takahashi, J.S. (2018) Development and therapeutic potential of small-molecule modulators of circadian systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **58**, 231-252.
- Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R. G., Masumoto, K. H., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S. H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., Sakaki, Y., Ueda, H. R. (2009) CK1 ϵ /delta-dependent

- phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Nat Acad Sci USA* **106**(37), 15744-15749.
- 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**(6), 1920-1924.
- Jones, C.R., Huang, A.L., Ptáček, L.J., Fu, Y.H. (2013) Genetic basis of human circadian rhythm disorders. *Exp Neurol* **243**, 28-33.
- 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**(2), 109–120.
- Kadlecová, A., Maková, B., Artal-Sanz, M., Strnad, M., Voller, J. (2019) The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. *Ageing Res Rev* **55**, 100958.
- Kar, M., Feierabend, J. (1984) Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta* **160**(5), 385–391.
- Kondratov, R.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Vykhovanets, O.V., Antoch, M.P. (2006) Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* **20**(14), 1868-1873.
- Kubiasová, K., Mik, V., Nisler, J., Hönig, M., Husičková, A., Spíchal, L., Pěkná, Z., Šamajová, O., Doležal, K., Plíhal, O., Benková, E., Strnad, M., Plíhalová, L. (2018) Design, synthesis and perception of fluorescently labeled isoprenoid cytokinins. *Phytochemistry* **150**, 1–11.
- Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., Studer, L. (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* **461**(7262), 402-406.
- Lee, J.H., Chung, K.Y., Bang, D., Lee, K.H. (2006). Searching for aging-related proteins in human dermal microvascular endothelial cells treated with anti-aging agents. *Proteomics* **6**(4), 1351-1361.
- Lee, J. W., Hirota, T., Ono, D., Honma, S., Honma, K. I., Park, K., & Kay, S. A. (2019) Chemical control of mammalian circadian behavior through dual inhibition of casein kinase α and δ . *J Med Chem* **62**(4), 1989-1998.
- Liang, S., Zhou, J., Yu, X., Lu, S., Liu, R. (2023) Neuronal conversion from glia to replenish the lost neurons. *Neural Regen Res* **19**(7), 1446-1453.

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* **13**, 757-772.
- Lin, M., T., Beal, M., F. (2003) The oxidative damage theory of aging. *Clin Neur Res* **2**(5), 305-315.
- Liu, H., Liu, Y., Hai, R., Liao, W., Luo, X. (2022) The role of circadian clocks in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Genes Dis* **10**(4), 1279-1290.
- Liu, Y., Zhang, Z., Yang, X. (2011) Kinetin protects against lipid peroxidation and improves antioxidant status in cultured astrocytes and mouse brain exposed to D-galactose. *Afr J Biotechnol* **10**(55), 11721-11727.
- Maková, B., Mik, V., Lišková, B., Gonzalez, G., Vitek, D., Medvedíková, M., Monfort, B., Ručilová, V., Kadlecová, A., Khirsariya, P., Gándara Barreiro, Z., Havlíček, L., Zatloukal, M., Sural, M., Paruch, K., D'Autréaux, B., Hajdúch, M., Strnad, M., Voller, J. (2021) Cytoprotective activities of kinetin purine isosteres. *Bioorg Med Chem* **33**, 1-14.
- Maury, E. (2019) Off the clock: From circadian disruption to metabolic disease. *Int J Mol Sci* **20**(7),1597.
- Maywood, E.S. (2020) Synchronization and maintenance of circadian timing in the mammalian clockwork. *Eur J Neurosci* **51**(1), 229-240.
- McCullough, J.L., Garcia, R.L., Reece, B. (2008) A clinical study of topical Pyratine 6 for improving the appearance of photodamaged skin. *J Drugs Dermatol* **7**(2), 131–135.
- McCullough, J.L., Weinstein, G.W. (2002) Clinical study of safety and efficacy of using topical kinetin 0.10% (Kinerase) to treat photodamaged skin. *Cosmet Dermatol* **15**(9), 29–32.
- McDaniel, D.H., Neudecker, B.A., DiNardo, J.C., Lewis, J.A., Maibach H.I. (2005) Idebenone: a new antioxidant—Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants. *J Cosmet Dermatol* **4**(1), 10–17.
- Mik, V., Szüčová, L., Smehilová, M., Zatloukal, M., Doležal, K., Nisler, J., Grúz, J., Galuszka, P., Strnad, M., & Spíchal, L. (2011) N9-substituted derivatives of kinetin: effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* **72**(8), 821–831.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Von Saltza, M.H., Strong, F. (1955). Structure and synthesis of kinetin. *J Am Chem Soc* **77**(9), 2662–2663.
- Musiek, E.S (2015) Circadian clock disruption in neurodegenerative diseases: cause and effect? *Front Pharmacol* **6**, 29.

- Nittari, G., Roy, P., Martinelli, I., Bellitto, V., Tomassoni, D., Traini, E., Tayebati, S.K., Amenta, F. (2023) Rodent models of huntington's disease: An overview. *Biomedicines* **11**(12), 3331.
- Norcliffe-Kaufmann, L., Slaugenhaupt, S.A., Kaufmann, H. (2017) Familial dysautonomia: History, genotype, phenotype and translational research. *Prog Neurobiol* **152**, 131-148.
- Okada, Y., Kaneko, M., Okajima, H. (1996) Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids. *Biol Pharm Bull* **19**(12), 1607–1610.
- Olsen, A., Siboska, G.E., Clark, B.F., Rattan, S.I. (1999) *N*⁶-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(2), 499–502.
- Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., Holsinger, R. M. D. (2023) Oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative disorders. *Antioxidants* **12**(2), 517-547.
- Pačesová, D., Moravcová, S., Kopřivová, J, Bendová, Z. (2019) Circadian system disturbances in Huntigton´s disease – implication for light therapy. *Cesk Slov Neurol N* **82**(3), 289–294.
- Parvez, M., Birdsall, W. (1990) Structure of a copper (II) kinetin complex. *Acta Cryst C* **46**, 1775–1778.
- Qamar, A.Y., Fang, X., Bang, S., Kim, M.J., Cho, J. (2020) Effects of kinetin supplementation on the post-thaw motility, viability, and structural integrity of dog sperm. *Cryobiology* **95**, 90–96.
- Raman, N., Elumalai, S. (1996) Presence of cytokinin in the root nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Indian J Exp Biol* **34**(6), 577–579.
- Ramzaeva, N. P., Goncharova, I. N., Lidak, M. Y., Gol'dberg, Y. S., Shimanskaya, M. V. (1987) Alkylolation of some 6-substituted purines under interphase catalysisconditions. *Chem Heterocycl Compd* **23**, 93-98.
- Rattan, S., Clark, B. (1994) Kinetin delays the onset of aging characteristics in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **201**(2), 665–672.
- Ratti, N. and Jonardhanan K.K. (1996) Effect on growth, phosphorus and cytokinin contents of palmarosa (*Cymbopogon martini* var motia) by Glomus inoculation. *Ind J Exp Biol* **34**, 1126–1128.
- Ribeiro, R.F.N., Cavadas, C., Silva, M.M.C. (2021) Small-molecule modulators of the circadian clock: Pharmacological potentials in circadian-related diseases. *Drug Discov Today* **26**(7),1620-1641.

- Richardson, B., Goedert, T., Quraishe, S., Deinhardt, K., Mudher, A. (2024) How do neurons age? A focused review on the aging of the microtubular cytoskeleton. *Neural Regen Res* **19**(9), 1899-1907.
- Sharma, S.P., Kaur, P., Rattan, S.I. (1995) Plant growth hormone kinetin delays ageing, prolongs the lifespan and slows down development of the fruitfly *Zaprionus paravittiger*. *Biochem Biophys Res Commun* **216**(3), 1067–1071.
- Shetty, R.S., Gallagher, C.S., Chen, Y.T., Hims, M.M., Mull, J., Leyne, M., Pickel, J., Kwok, D., Slaugenhaupt, S.A. (2011) Specific correction of a splice defect in brain by nutritional supplementation. *Hum Mol Genet* **20**(21), 4093–4101.
- Schubert D. (2016) Hodnocení cytoprotektivní aktivity fytohormonů a jejich derivátů. Diplomová práce. Olomouc. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta Přírodovědecká. 1-120.
- 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**(4), 429–436.
- Spíchal, L. (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct Plant Biol* **39**(4), 267-284.
- Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* **101**(4), 674–688.
- Strong, F., Skoog, F., Miller, C.O. (1965) Cytokinins. *Science* **148**(3669), 532–533.
- Takahashi J. S. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* **18**, 164-179.
- Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., Eckel, R.H., Takahashi, J.S., Bass, J. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* **308**(5724), 1043-1045.
- Univerzita Palackého v Olomouci, Fyziologický ústav AV ČR Praha. *Heterocyklické sloučeniny pro prevenci a terapii poruch cirkadiálního rytmu*. Voller, J., Mik, V., Dokonalová, M., Sládek, M., Sumová, A., Strnad, M. Česká republika. PV-2022-227. Přihláška vynálezu. Přihl.: 30.05.2022.
- Univerzita Palackého v Olomouci, Fyziologický ústav AV ČR Praha. *N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin pro modulaci cirkadiálních rytmů, zvýšení kvality spánku a zvýšení účinnosti a bezpečnosti terapie*. Voller, J., Sládek, M., Hajdúch, M., Sumová, A., Strnad, M. Česká republika. PV-2019-757. Přihláška vynálezu. Přihl.: 09.12.2019.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Internat J Biochem Cell Biol* **39**(1), 44–84.
- Verbeke, P., Siboska, G.E., Clark, B.F., Rattan, S.I. (2000) Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3), 1265–1270.
- Walker, W.H. II, Walton, J.C., DeVries, A.C., Nelson, R.J. (2020) Circadian rhythm disruption and mental health. *Transl Psychiatry* **10**(1), 28.
- Wanitphakdeedecha, R., Meeprathom, W., Manuskiatti, W. (2015) Efficacy and safety of 0.1% kinetin cream in the treatment of photoaging skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **81**(5), 547.
- Wei, Y., Liu, D., Zheng, Y., Hao, C., Li, H., Ouyang, W. (2018) Neuroprotective effects of kinetin against glutamate-induced oxidative cytotoxicity in HT22 cells: involvement of Nrf2 and Heme Oxygenase-1. *Neurotox Res* **33**(4), 725–737.
- Werner, T., Schmülling, T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**(5), 527–538.
- Zee, P.C., Attarian, H., Videnovic, A. (2013) Circadian rhythm abnormalities. *Continuum (Minneap Minn)* **19**(1), 132-147.
- Zhu, L., Zee, P. C. (2012) Circadian rhythm sleep disorders. *Neurol Clin* **30**(4), 1167–1191.

Internetový zdroj

www.clinicaltrials.gov/NCT03920774

30.05.2024

8 Přílohy

8.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených látek

6-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin (I)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₀H₁₁ClN₄, výtěžek: 72%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,22; 99,99. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 223,1 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 225,1 (30, [³⁷Cl-M+H]⁺). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,68-1,72 (m, 2H, cP H3, cP H3'), 1,86-1,90 (m, 2H, cP H3, cP H3'), 2,02-2,06 (m, 2H, cP H2, cP H2'), 2,16-2,21 (m, 2H, cP H2, cP H2'), 4,93-5,02 (m, 1H, cP H1), 8,76 (s, 1H, pur H2), 8,77 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,6 (2× C, cP C3), 31,8 (2× C, cP C2), 56,4 (cP C1), 131,3 (pur C5), 146,2 (pur C8), 148,9 (pur C6), 151,2 (pur C2), 151,8 (pur C4).

6-chlor-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9H-purin (II)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₉H₉ClN₄O, výtěžek: 23%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 9,93; 92,5. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 225,1 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 227,1 (31, [³⁷Cl-M+H]⁺). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,32-2,38 (m, 1H, THF H4), 2,43-2,46 (m, 1H, THF H4'), 3,86 (td, *J* = 8,7; 5,6 Hz, 1H, THF H5), 3,97 (dd, *J* = 9,8; 5,8 Hz, 1H, THF H2'), 4,03 (dd, *J* = 9,8; 3,1 Hz, 1H, THF H2'), 4,10-4,16 (m, 1H, THF H5'), 5,30-5,35 (m, 1H, THF H3), 8,68 (s, 1H, pur H8), 8,79 (s, 1H, pur H2). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,6 (THF C4), 55,0 (THF C3), 66,5 (THF C5), 71,6 (THF C2), 130,9 (pur C5), 145,7 (pur C8), 149,0 (pur C6), 151,3 (2× C, pur C2, pur C4).

2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (III)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₀H₁₀Cl₂N₄, výtěžek: 53%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,25; 98,5. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 257,1 (100, [³⁵Cl,³⁵Cl-M+H]⁺), 259,0 (64, [³⁵Cl,³⁷Cl-M+H]⁺), 261,1 (9, [³⁷Cl,³⁷Cl-M+H]⁺). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,65-1,74 (m, 2H), 1,83-1,91 (m, 2H), 1,97-2,03 (m, 2H), 2,15-2,22 (m, 2H), 4,89-4,95 (m, 1H, cP H1), 8,82 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,5 (2× C, cP C3), 31,8 (2× C, cP C2), 56,4 (cP C1), 130,8 (pur C5), 147,1 (pur C8), 149,5 (pur C6), 150,6 (pur C2), 153,3 (pur C4).

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

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_9H_8Cl_2N_5O$, výtěžek: 64%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,85; 61,4. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 259,4 (100, [³⁵Cl,³⁵Cl-M+H]⁺), 261,4 (73, [³⁵Cl,³⁷Cl-M+H]⁺), 263,4 (18, [³⁷Cl,³⁷Cl-M+H]⁺). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,28-2,36 (m, 1H, THF H4), 2,52-2,56 (m, 1H, THF H4'), 3,84 (td, *J* = 8,7; 5,7 Hz, 1H, THF H5), 3,93 (dd, *J* = 9,8; 5,5 Hz, 1H, THF H2), 4,02 (dd, *J* = 9,8; 2,8 Hz, 1H, H2'), 4,12 (td, *J* = 8,1; 6,9 Hz, 1H, THF H5'), 5,27 (qd, *J* = 5,6; 2,8 Hz, 1H, THF H3), 8,69 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, 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 C2), 153,2 (pur C4).

6-chlor-9-cyklopentyl-2-fluor-9H-purin (V)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{10}H_{10}ClFN_4$, výtěžek: 38%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 12,96; 99,9. ESI⁺-MS m/z: 240,6 [M+H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,65-1,73 (m, 2H, cP H3), 1,83-1,91 (m, 2H, cP H3'), 1,98-2,04 (m, 2H, cP H2), 2,14-2,21 (m, 2H, cP H2'), 4,89 (pent, *J* = 7,3 Hz, 1H, cP H1), 8,78 (s, 1H, pur H8).

2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin (VI)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{10}H_{10}Cl_2N_4O$, výtěžek: 82%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,06; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 189,1 (100, [³⁵Cl,³⁵Cl-M-THP +H]⁺), 191,0 (63, [³⁵Cl,³⁷Cl-M-THP+H]⁺), 193,0 (10, [³⁷Cl,³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,56-1,61 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,70-1,80 (m, 1H, THP H4), 1,94-2,01 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,21-2,29 (m, 1H, THP H3'), 3,70-3,76 (m, 1H, THP H6), 4,01 (dd, *J* = 10,7; 1,5 Hz, 1H, THP H6'), 5,73 (dd, *J* = 10,9; 2,0 Hz, 1H, THP H2'), 8,95 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,0 (THP C4), 24,3 (THP C5), 29,6 (THP C3), 67,7 (THP C6), 81,6 (THP C2), 130,5 (pur C5), 146,4 (pur C8), 149,9 (pur C6), 151,23 (pur C2), 152,75 (pur C4).

N-(furan-2-ylmethyl)-9-(pentan-3-yl)-9H-purin-6-amin (1)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{15}H_{19}N_5O$, výtěžek: 50%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 20,31; 97,54. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 286,3 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $C_{15}H_{19}N_5O$ [M+H]⁺ 286,1662, změřeno 285,1662. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,67 (t, *J* = 7,3 Hz, 6H, -CH(CH₂CH₃)₂), 1,82-1,91 (m, 2H, -CH(CH₂CH₃)₂), 1,92-2,01 (m, 2H, -CH(CH₂CH₃)₂), 4,26 (sept, *J* = 4,9 Hz,

1H, -CH(CH₂CH₃)₂, 4,67 (bs, 2H, CH₂-fur), 6,24 (dd, *J* = 3,2; 0,8 Hz, 1H, fur H3), 6,35 (dd, *J* = 3,4; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,53 (dd, *J* = 1,5; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 8,18 (bs, 1H, pur NH), 8,19 (s, 2H, pur H2, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,6 (2× C, -CH(CH₂CH₃)₂), 27,0 (2× C, -CH(CH₂CH₃)₂), 36,4 (CH₂-fur), 58,7 (-CH(CH₂CH₃)₂), 106,7 (fur C3), 110,5 (fur C4), 119,4 (pur C5), 140,0 (pur C8), 141,8 (fur C5), 149,3 (pur C4), 152,0 (fur C2), 153,0 (pur C2), 154,1 (pur C6).

***N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(methoxymethyl)-9*H*-purin-6-amin (2)**

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₂H₁₃N₅O₂, výtěžek: 28%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 14,59; 97,0. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 260,1 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₂H₁₃N₅O₂ [M+H]⁺ 260,1142, změř. 260,1144. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,25 (s, 3H, -CH₂OCH₃), 4,68 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,49 (s, 2H, -CH₂OCH₃), 6,23 (dd, *J* = 3,2; 0,8 Hz, 1H, fur H3), 6,35 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,53 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,27 (bs, 2H, pur H2, pur NH), 8,34 (1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 36,5 (CH₂-fur), 56,3 (-CH₂OCH₃), 73,4 (-CH₂OCH₃), 106,7 (fur C3), 110,5 (fur C4), 119,0 (pur C5), 141,4 (pur C8), 141,8 (fur C5), 149,4 (pur C4), 152,8 (pur C2), 152,9 (fur C2), 154,1 (pur C6).

9-(ethoxymethyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (3)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₃H₁₅N₅O₂, výtěžek: 22%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 16,93; 99,32. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 274,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₃H₁₅N₅O₂ [M+H]⁺ 274,1299, změř. 274,1298. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,06 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, -CH₂OCH₂CH₃), 3,50 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, -CH₂OCH₂CH₃), 4,68 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,52 (s, 2H, -CH₂OCH₂CH₃), 6,23 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,35 (dd, *J* = 3,2; 2,0 Hz, 1H, fur H4), 7,53 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,26 (bs, 2H, pur NH, pur H2), 8,30 (s, 1H, pur C8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 14,8 (-CH₂OCH₂CH₃), 36,4 (CH₂-fur), 64,2 (-CH₂OCH₂CH₃), 71,8 (-CH₂OCH₂CH₃), 106,7 (fur C3), 110,5 (fur C4), 119,0 (pur C5), 141,3 (pur C8), 141,8 (fur C5), 149,2 (pur C4), 152,8 (pur C2), 152,9 (fur C2), 154,2 (pur C6).

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

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₇N₅O₂, výtěžek: 47%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,01; 95,68. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 288,3 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₄H₁₇N₅O₂ [M+H]⁺ 288,1455, změř. 288,1457. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,02 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, -CH₂CH₂OCH₂CH₃), 3,40 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, -CH₂CH₂OCH₂CH₃), 3,71 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H,

-CH₂CH₂OCH₂CH₃), 4,29 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H, -CH₂CH₂OCH₂CH₃), 4,68 (bs, 2H, CH₂-fur), 6,22 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 3,1; 1,8$ Hz, 1H, fur H4), 7,52 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, fur H5), 8,10 (s, 1H, pur H8), 8,17 (bs, 1H, pur NH), 8,23 (bs, 1H, pur H2). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 15,0 (-CH₂CH₂OCH₂CH₃), 36,5 (CH₂-fur), 42,9 (-CH₂CH₂OCH₂CH₃), 65,3 (-CH₂CH₂OCH₂CH₃), 67,6 (-CH₂CH₂OCH₂CH₃), 106,6 (fur C3), 110,4 (fur C4), 119,0 (pur C5), 141,3 (pur C8), 141,8 (fur C5), 149,1 (pur C4), 152,2 (pur C2), 153,0 (fur C2), 154,1 (pur C6).

***N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(3-methoxypropyl)-9*H*-purin-6-amin (5)**

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₇N₅O₂, výtěžek: 73%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 16,53; 99,46. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 288,3 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₄H₁₇N₅O₂ [M+H]⁺ 288,1455, změř. 288,1455. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,99-2,06 (m, $J = 6,6$ Hz, 2H, -CH₂CH₂CH₂OCH₃), 3,20 (s, 3H, -CH₂CH₂CH₂OCH₃), 3,29 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, -CH₂CH₂CH₂OCH₃), 4,19 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, -CH₂CH₂CH₂OCH₃), 4,67 (bs, 2H, CH₂-fur), 6,22 (dd, $J = 3,4; 0,6$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 3,1; 1,8$ Hz, 1H, fur H4), 7,53 (dd, $J = 1,7; 0,8$ Hz, 1H, fur H5), 8,13 (s, 1H, pur H8), 8,16 (bs, 1H, pur NH), 8,22 (bs, 1H, pur H2). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29,3 (-CH₂CH₂CH₂OCH₃), 36,4 (CH₂-fur), 40,4 (-CH₂CH₂CH₂OCH₃), 58,0 (-CH₂CH₂CH₂OCH₃), 68,8 (-CH₂CH₂CH₂OCH₃), 106,6 (fur C3), 110,5 (fur C4), 119,2 (pur C5), 141,0 (pur C8), 141,8 (fur C5), 149,0 (pur C4), 152,2 (pur C2), 153,1 (fur C2), 154,1 (pur C6).

9-cyklopentyl-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (6)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₇N₅O, výtěžek: 85%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,92; 99,72. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 284,3 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₅H₁₇N₅O [M+H]⁺ 284,1506, změř. 284,1508. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,63-1,71 (m, 2H, cP H3), 1,82-1,90 (m, 2H, cP H3'), 1,95-2,02 (m, 2H, cP H2), 2,09-2,16 (m, 2H, cP H2'), 4,67 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,78-4,88 (m, 1H, cP H1), 6,21 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 3,2; 1,7$ Hz, 1H, fur H4), 7,52 (d, $J = 0,8$ Hz, 1H, fur H5), 8,16 (bs, 1H, pur NH), 8,22 (s, 2H, pur H2, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,6 (2× C, cP C3), 31,9 (2× C, cP C2), 36,4 (CH₂-fur), 55,4 (cP C1), 106,6 (fur C3), 110,4 (fur C4), 119,6 (pur C5), 139,4 (pur C8), 141,8 (fur C5), 148,9 (pur C4), 152,0 (pur C2), 153,1 (fur C2), 154,1 (pur C6).

***N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-6-amin (7)**

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₅N₅O₂, výtěžek: 65%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 14,99; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 286,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₄H₁₅N₅O₂ [M+H]⁺ 286,1299, změř. 286,1298. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,25-2,31 (m, 1H, THF H4), 2,43-2,48 (m, 1H, THF H4'), 3,85 (td, *J* = 8,6; 5,6 Hz, 1H, THF H5), 3,92-3,98 (m, 2H, THF H2, THF H2'), 4,09 (td, *J* = 8,1; 6,9 Hz, 1H, THF H5'), 4,67 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,15-5,19 (m, 1H, THF H3), 6,21 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,4; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,52 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,16 (s, 1H, pur H8), 8,24 (bs, 2H, pur NH, pur H2). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,8 (THF C4), 36,4 (CH₂-fur), 54,0 (THF C3), 66,5 (THF C5), 71,7 (THF C2), 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 (pur C2), 153,0 (fur C2), 154,1 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(pentan-3-yl)-9*H*-purin-6-amin (8)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₈ClN₅O, výtěžek: 70%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,84; 96,82. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 320,7 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 322,3 (34, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₅H₁₈ClN₅O [M+H]⁺ 320,1273, změř. 320,1274. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,68 (t, *J* = 7,3 Hz, 6H, -CH(CH₂CH₃)₂), 1,81-1,96 (m, 4H, -CH(CH₂CH₃)₂), 4,17-4,22 (m, 1H, -CH(CH₂CH₃)₂), 4,61 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 6,27 (dd, *J* = 3,1; 0,6 Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,25 (s, 1H, pur H8), 8,73 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,5 (2× C, -CH(CH₂CH₃)₂), 26,9 (2× C, -CH(CH₂CH₃)₂), 36,6 (CH₂-fur), 58,8 (-CH(CH₂CH₃)₂), 107,2 (fur C3), 110,5 (fur C4), 118,3 (pur C5), 140,5 (pur C8), 142,0 (fur C5), 150,3 (pur C4), 152,1 (fur C2), 152,7 (pur C2), 154,7 (pur C6).

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

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₂H₁₂ClN₅O₂, výtěžek: 36%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,19; 99,99. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 294,7 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 296,1 (35, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₂H₁₂ClN₅O₂ [M+H]⁺ 294,0752, změř. 294,0753. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,25 (s, 3H, -CH₂OCH₃), 4,62 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH₂-fur), 5,44 (s, 2H, -CH₂OCH₃), 6,27 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,31 (s, 1H, pur H8), 8,81 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 36,7 (CH₂-fur), 56,2 (-CH₂OCH₃), 73,6 (-CH₂OCH₃), 107,2 (fur C3), 110,5 (fur C4),

118,1 (pur C5), 142,0 (pur C8), 142,1 (fur C5), 150,2 (pur C4), 152,0 (fur C2), 153,4 (pur C2), 154,7 (pur C6).

2-chlor-9-(ethoxymethyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (10)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₃H₁₄ClN₅O₂, výtěžek: 79%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,04; 97,34. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 308,7 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 310,2 (37, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₃H₁₄ClN₅O₂ [M+H]⁺ 308,0909, změř. 308,0910. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,06 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, -CH₂OCH₂CH₃), 3,49 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, -CH₂OCH₂CH₃), 4,62 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH₂-fur), 5,48 (s, 2H, -CH₂OCH₂CH₃), 6,27 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, *J* = 1,7; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 8,31 (s, 1H, pur H8), 8,80 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 14,7 (-CH₂OCH₂CH₃), 36,7 (CH₂-fur), 64,3 (-CH₂OCH₂CH₃), 72,1 (-CH₂OCH₂CH₃), 107,2 (fur C3), 110,6 (fur C4), 118,2 (pur C5), 142,0 (pur C8), 142,1 (fur C5), 150,2 (pur C4), 152,0 (fur C2), 153,4 (pur C2), 154,8 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(propoxymethyl)-9*H*-purin-6-amin (11)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₆ClN₅O₂, výtěžek: 65%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,37; 98,0. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 322,7 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 322,7 (30, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₄H₁₆ClN₅O₂ [M+H]⁺ 322,1065, změř. 322,1066. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,77 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, -CH₂OCH₂CH₂CH₃), 1,41-1,48 (m, 2H, -CH₂OCH₂CH₂CH₃), 3,40 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, -CH₂OCH₂CH₂CH₃), 4,62 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH₂-fur), 5,49 (s, 2H, -CH₂OCH₂CH₂CH₃), 6,27 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, fur H3), 6,38 (bs, 1H, fur H4), 7,56 (dd, *J* = 1,7; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 8,32 (s, 1H, pur H8), 8,82 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,9 (-CH₂OCH₂CH₂CH₃), 22,6 (-CH₂OCH₂CH₂CH₃), 37,2 (CH₂-fur), 70,8 (-CH₂OCH₂CH₂CH₃), 72,8 (-CH₂OCH₂CH₂CH₃), 107,7 (fur C3), 111,1 (fur C4), 118,6 (pur C5), 142,5 (pur C8), 142,6 (fur C5), 150,7 (pur C4), 152,5 (fur C2), 153,9 (pur C2), 155,3 (pur C6).

2-chlor-9-(2-ethoxyethyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (12)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₆ClN₅O₂, výtěžek: 34%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,04; 97,87. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 322,1 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 324,2 (34, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₄H₁₆ClN₅O₂ [M+H]⁺ 322,1065, změř. 322,1065. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,02 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, -CH₂CH₂OCH₂CH₃), 3,41 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, -CH₂CH₂OCH₂CH₃), 3,69

(t, $J = 5,3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 4,25 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 4,61 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-fur}$), 6,26 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, $J = 1,8; 0,9$ Hz, 1H, fur H5), 8,11 (s, 1H, pur H8), 8,71 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, pur NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 14,9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 36,7 ($\text{CH}_2\text{-fur}$), 43,1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 65,4 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 67,6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 107,1 (fur C3), 110,6 (fur C4), 118,1 (pur C5), 141,9 (pur C8), 142,0 (fur C5), 150,1 (pur C4), 152,1 (fur C2), 152,9 (pur C2), 154,7 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(oxetan-3-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (13)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2$, výtěžek: 73%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,54; 99,99. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 320,1 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 320,0909, změř. 320,0909. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,38-3,46 (m, 1H, oxetan H3), 4,38 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, oxetan H2), 4,42 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-oxetan}$), 4,60 (d, $J = 4,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-fur}$), 4,63 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, oxetan H2'), 6,25 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, $J = 1,8; 0,6$ Hz, 1H, fur H5), 8,22 (s, 1H, pur H8), 8,76 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, pur NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 34,5 (oxetan C3), 36,6 ($\text{CH}_2\text{-fur}$), 45,5 ($\text{CH}_2\text{-oxetan}$), 73,4 (2× C, oxetan C2), 107,2 (fur C3), 110,5 (fur C4), 118,2 (pur C5), 141,5 (pur C8), 142,0 (fur C5), 150,1 (pur C4), 152,1 (fur C2), 153,0 (pur C2), 154,6 (pur C6).

2-chloro-9-cyklopentyl-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin (14)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}$, výtěžek: 82%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 27,32; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 317,8 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 319,8 (51, $[\text{M}+\text{H}]^+$). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318,1116, změř. 318,1116. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.65-1.71 (m, 2H, cP H3), 1.80-1.87 (m, 2H, cP H3'), 1.89-1.96 (m, 2H, cP H2), 2.09-2.15 (m, 2H, cP H2'), 4.61 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-fur}$), 4.77 (pent, $J = 7,3$ Hz, 1H, cP H1), 6.25 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, fur H3), 6.36 (bs, 1H, fur H4), 7.54 (dd, $J = 1,8, 0,9$ Hz, 1H, fur H5), 8.25 (s, 1H, pur H8), 8.70 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, pur NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 23.5 (2× C, cP C3), 32.0 (2× C, cP C2), 36.6 ($\text{CH}_2\text{-fur}$), 55.5 (cP C1), 107.1 (fur C3), 110.5 (fur C4), 118.6 (pur C5), 140.0 (pur C8), 142.0 (fur C5), 149.9 (pur C4), 152.1 (fur C2), 152.7 (pur C2), 154.7 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-6-amin (15)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₄ClN₅O₂, výtěžek: 26%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,56; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 320,1 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 322,2 (32, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₄H₁₄ClN₅O₂ [M+H]⁺ 320,0909, změř. 320,0909. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,20-2,26 (m, 1H, THF H4), 2,43-2,48 (m, 1H, THF H4'), 3,83 (td, *J* = 8,7; 5,5 Hz, 1H, THF H5), 3,91-3,95 (m, 2H, THF H2, THF H2'), 4,08 (td, *J* = 8,2; 6,9 Hz, 1H, THF H5'), 4,61 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH₂-fur), 5,12 (td, *J* = 8,2; 3,5 Hz, 1H, THF H3), 6,25 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,16 (s, 1H, pur H8), 8,77 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,9 (THF C4), 36,6 (CH₂-fur), 54,2 (THF C3), 66,5 (THF C5), 71,9 (THF C2), 107,1 (fur C3), 110,5 (fur C4), 118,3 (pur C5), 139,6 (pur C8), 142,0 (fur C5), 149,8 (pur C4), 152,1 (fur C2), 152,8 (pur C2), 154,7 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (16)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₆ClN₅O₂, výtěžek: 89%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,62; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 334,8 (64, [³⁵Cl-M+H]⁺), 336,2 (22, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₅H₁₆ClN₅O₂ [M+H]⁺ 334,1065, změř. 334,1072. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,96 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,15-2,23 (m, 1H, THP H3'), 3,65-3,70 (m, 1H, THP H6), 3,98 (dd, *J* = 10,9; 1,7 Hz, 1H, THP H6'), 4,62 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H, CH₂-fur), 5,56 (dd, *J* = 11,0; 1,2 Hz, 1H, THP H2), 6,26 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,37 (bs, 1H, fur H4), 7,55 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 8,39 (s, 1H, pur H8), 8,78 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, pur NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,2 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C3), 36,6 (CH₂-fur), 67,6 (THP C6), 80,8 (THP C2), 107,0 (fur C3), 110,4 (fur C4), 118,1 (pur C5), 139,5 (pur C8), 142,0 (fur C5), 149,4 (pur C4), 152,0 (fur C2), 153,1 (pur C2), 154,7 (pur C6).

2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9-(furan-3-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (17)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₂ClN₅O₂, výtěžek: 76%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,58; 99,99. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 330,1 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 332,2 (30, [³⁷Cl-M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₅H₁₂ClN₅O₂ [M+H]⁺ 330,0752, změř. 330,0753. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,61 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, C6 CH₂-fur), 5,17 (s, 2H, N9 CH₂-fur), 6,25 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, C6 fur H3), 6,37 (bs, 1H, C6 fur H4), 6,49 (bs, 1H, N9 fur H4), 7,55 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H, C6 fur H5),

7,62 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H, N_9 fur H5), 7,69 (bs, 1H, N_9 fur H2), 8,21 (s, 1H, pur H8), 8,74 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, pur NH). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 36,7 (C6 $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 37,8 (N_9 $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 107,2 (C6 fur C3), 110,4 (C6 fur C4), 110,5 (N_9 fur C4), 118,2 (pur C5), 120,9 (N_9 fur C3), 141,0 (N_9 fur C2), 141,3 (pur C8), 142,0 (C6 fur C5), 144,1 (N_9 fur C5), 149,9 (pur C4), 152,1 (C6 fur C2), 153,0 (pur C2), 154,7 (pur C6).

9-cyklopentyl-2-fluor- N -(furan-2-ylmethyl)-9H-purin-6-amin (18)

Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{O}$, výtěžek: 7%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,10; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 302,3 (100, [^{35}Cl -M+H]⁺), 303,2 (20, [^{37}Cl -M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{O}$ [M+H]⁺ 302,1412, změř. 302,1412. ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,65-1,71 (m, 2H, cP H3, cP H3'), 1,81-1,87 (m, 2H, cP H3, cP H3'), 1,90-1,97 (m, 2H, cP H2, cP H2'), 2,08-2,15 (m, 2H, cP H2, cP H2'), 4,60 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 4,70-4,76 (m, 1H, cP H1), 6,24 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, fur H3), 6,36 (dd, $J = 2,8$; 1,8 Hz, 1H), 7,55 (bs, 1H, fur H5), 8,21 (s, 1H, pur H8), 8,77 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, pur NH). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 23,5 (2 \times C, cP C3), 31,9 (2 \times C, cP C2), 36,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 55,5 (cP C1), 107,0 (fur C3), 110,5 (fur C4), 117,9 (pur C5), 139,9 (pur C8), 142,0 (fur C5), 150,0 (d, $^3J_{\text{CF}} = 19,2$ Hz, pur C4), 152,1 (fur C5), 155,7 (d, $^3J_{\text{CF}} = 20,4$ Hz, pur C6), 158,3 (d, $^1J_{\text{CF}} = 202,7$ Hz, pur C2).

9-cyklopentyl- N^6 -(furan-2-ylmethyl)- N^2 -methyl-9H-purin-2,6-diamin (19)

Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}$, výtěžek: 77%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,79; 98,6. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 313,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$ [M+H]⁺ 313,1771, změř. 313,1769. ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,63-1,67 (m, 2H, cP H3), 1,83-1,87 (m, 2H, cP H3'), 1,89-1,96 (m, 2H, cP H2), 2,03-2,08 (m, 2H, cP H2'), 2,76 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H, -NH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 4,60 (bs, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 4,66 (pent, $J = 7,6$ Hz, 1H, cP H1), 6,21 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,28 (bs, 1H, -NH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 6,34 (dd, $J = 3,1$; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, $J = 1,8$; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,61 (bs, 1H, pur NH), 7,75 (s, 1H, pur H8). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 23,7 (2 \times C, cP C3), 28,3 (-NH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 31,8 (2 \times C, cP C2), 36,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 54,6 (cP C1), 106,5 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,7 (pur C5), 135,7 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,3 (pur C4), 153,6 (fur C2), 154,2 (pur C6), 159,6 (pur C2).

9-cyklopentyl-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²,*N*²-dimethyl-9*H*-purin-2,6-diamin (20)

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₂₂N₆O, výtěžek: 83%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 26,14; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 327,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₇H₂₂N₆O [M+H]⁺ 327,1931, změř. 327,1931. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,61-1,69 (m, 2H, cP H3), 1,81-1,89 (m, 2H, cP H3'), 1,91-1,98 (m, 2H, cP H2), 2,04-2,10 (m, 2H, cP H2'), 3,06 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 4,58 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,67 (pent, *J* = 7,6 Hz, 1H, cP H1), 6,21 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,73 (bs, 1H, pur NH), 7,78 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,8 (2× C, cP C3), 31,7 (2× C, cP C2), 36,4 (CH₂-fur), 36,9 (2× C, -N(CH₃)₂), 54,8 (cP C1), 106,5 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,1 (pur C5), 136,2 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,2 (pur C4), 153,6 (fur C2), 153,7 (pur C6), 158,8 (pur C2).

***N*²-(2-aminoethyl)-9-cyklopentyl-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²-methyl-9*H*-purin-2,6-diamin (21)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₅N₇O, výtěžek: 36%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 16,41; 97,2. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 356,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₈H₂₅N₇O [M+H]⁺ 356,2193, změř. 356,2190. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,60-1,68 (m, 2H, cP H3), 1,82-1,90 (m, 2H, cP H3), 1,92-1,99 (m, 2H, cP H2), 2,04-2,10 (m, 2H, cP H2), 2,75 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, -N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 3,08 (s, 3H, -N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 3,55 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, -N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 4,61 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,67 (pent, *J* = 7,5 Hz, 1H, cP H1), 6,21 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,70 (bs, 1H, pur NH), 7,76 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,9 (2× C, cP C3), 31,7 (2× C, cP C2), 35,9 (-N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 36,4 (CH₂-fur), 39,4 (-N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 51,8 (-N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 54,8 (cP C1), 106,4 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,3 (pur C5), 136,2 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,1 (pur C4), 153,6 (fur C2), 153,8 (pur C6), 158,3 (pur C2).

9-cyklopentyl-*N*²-[2-(dimethylamino)ethyl]-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (22)

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₉H₂₇N₇O, výtěžek: 65%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,83; 97,7. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 370,5 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₉H₂₇N₇O [M+H]⁺ 370,2347, změř. 370,2347. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,60-1,68 (m, 2H, cP H3), 1,80-1,88 (m, 2H, cP

H3'), 1,91-1,98 (m, 2H, cP H2), 2,02-2,09 (m, 2H, cP H2'), 2,20 (s, 6H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 2,45 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 3,34 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 4,59 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,64 (pent, *J* = 7,3 Hz, 1H, cP H1), 6,18 (bs, 1H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 6,20 (dd, *J* = 3,3; 0,6 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 1,0 Hz, 1H, fur H8), 7,64 (bs, 1H, pur NH), 7,75 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,7 (2× C, cP C3), 31,7 (2× C, cP C2), 36,2 (CH₂-fur), 38,8 (-NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 45,0 (2× C, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 54,8 (cP C1), 58,2 (-NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 106,4 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,8 (pur C5), 135,9 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,9 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,2 (pur C6), 158,8 (pur C2).

***N*'-(2-aminoethyl)-9-cyklopentyl-*N*'-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (23)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₂₃N₇O, výtěžek: 47%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,96; 97,4. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 342,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₇H₂₃N₇O [M+H]⁺ 342,2038, změř. 342,2038. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,62-1,66 (m, 2H, cP H3), 1,82-1,86 (m, 2H, cP H3'), 1,89-1,95 (m, 2H, cP H2), 2,02-2,07 (m, 2H cP H'), 2,72 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂NH₂), 3,16 (bs, 2H, -NHCH₂CH₂NH₂), 3,27 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂NH₂), 4,61 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,63 (pent, *J* = 7,3 Hz, 1H, cP H2), 6,22 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 6,37 (bs, 1H, -NHCH₂CH₂NH₂), 7,51 (dd, *J* = 1,7; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 7,69 (bs, 1H, pur NH), 7,76 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,7 (2× C, cP C3), 31,8 (2× C, cP C2), 36,2 (CH₂-fur), 41,1 (-NHCH₂CH₂NH₂), 44,1 (-NHCH₂CH₂NH₂), 54,7 (cP C1), 106,5 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,8 (pur C5), 135,8 (pur C8), 141,6 (fur C2), 151,0 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,3 (pur C6), 159,1 (pur C2).

2-({9-cyklopentyl-6-[(furan-2-ylmethyl)amino]-9*H*-purin-2-yl}amino)ethan-1-ol (24)

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₂₂N₆O₂, výtěžek: 69%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,14; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 343,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₇H₂₂N₆O₂ [M+H]⁺ 343,1879, změř. 343,1879. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,61-1,68 (m, 2H, cP H3), 1,81-1,88 (m, 2H, cP H3'), 1,89-1,96 (m, 2H, cP H2), 2,03-2,09 (m, 2H, cP H2'), 3,30-3,33 (m, *J* = 6,1 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂OH), 3,51 (app t, *J* = 6,1 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂OH), 4,59-4,66 (m, 4H, CH₂-fur, cP C1, -NHCH₂CH₂OH), 6,22 (d, *J* = 2,8 Hz, 2H, fur H3, -NHCH₂CH₂OH), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 7,66 (bs, 1H, pur NH), 7,76 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,2 (2× C, cP C3),

32,3 (2× C, cP C2), 36,7 (CH₂-fur), 44,5 (-NHCH₂CH₂OH), 55,2 (cP C1), 60,8 (-NHCH₂CH₂OH), 107,1 (fur C3), 110,9 (fur C4), 114,3 (pur C5), 136,4 (pur C8), 142,1 (fur C5), 151,6 (pur C4), 154,0 (fur C2), 154,8 (pur C6), 159,5 (pur C2).

9-cyklopentyl-*N*-(furan-2-ylmethyl)-2-morfolino-9*H*-purin-6-amin (25)

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₉H₂₄N₆O₂, výtěžek: 86%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 24,37; 98,7. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 369,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₉H₂₄N₆O₂ [M+H]⁺ 369,2035, změř. 369,2035. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,62-1,68 (m, 2H, cP H3), 1,81-1,88 (m, 2H, cP H3'), 1,89-1,96 (m, 2H, cP H2), 2,04-2,11 (m, 2H, cP H2'), 3,62 (s, 8H, morfolin H2, morfolin H3), 4,57 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,67 (pent, *J* = 7,6 Hz, 1H, cP H1), 6,21 (dd, *J* = 3,1; 0,6 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 0,6 Hz, 1H, fur H5), 7,84 (s, 1H, pur H8), 7,85 (bs, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,7 (2× C, cP C3), 31,8 (2× C, cP C2), 36,4 (CH₂-fur), 44,7 (2× C, morfolin C2), 54,8 (cP C1), 66,1 (2× C, morfolin C3), 106,5 (fur C3), 110,4 (fur C4), 114,0 (pur C5), 136,8 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,8 (pur C4), 153,4 (fur C2), 153,9 (pur C6), 158,2 (pur C2).

***N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*⁶-methyl-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (26)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₈N₆O₂, výtěžek: 72%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,51; 99,3. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 315,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₅H₁₈N₆O₂ [M+H]⁺ 315,1564, změř. 315,1565. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,19-2,25 (m, 1H, THF H4), 2,37-2,44 (m, 1H, THF H4'), 2,76 (d, *J* = 4,6 Hz, 3H, -NHCH₃), 3,83 (td, *J* = 8,6, 5,5 Hz, 1H, THF H5), 3,88 (dd, *J* = 9,3, 3,8 Hz, 1H, THF H2), 3,93 (dd, *J* = 9,2, 5,8 Hz, 1H, THF H2'), 4,07 (q, *J* = 7,7 Hz, 1H, THF H5'), 4,59 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,96-5,00 (m, 1H, THF H3), 6,22 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 6,36 (bs, 1H, -NHCH₃), 7,51 (dd, *J* = 1,6; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 7,71 (s, 2H, pur NH, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 28,3 (-NHCH₃), 31,7 (THF C4), 36,2 (CH₂-fur), 53,3 (THF C3), 66,6 (THF C5), 71,7 (THF C2), 106,6 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,3 (pur C5), 135,3 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,1 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,2 (pur C6), 159,7 (pur C2).

***N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²,*N*²-dimethyl-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (27)**

Žlutá pevná látka, sumární vzorec: C₁₆H₂₀N₆O₂, výtěžek: 77%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,38; 99,3. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 329,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₆H₂₀N₆O₂ [M+H]⁺ 329,1721, změř. 329,1721. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,21-2,27 (m, 1H, THF H4), 2,37-2,44 (m, 1H, THF H4'), 3,07 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 3,82-3,89 (m, 2H, THF H2, THF H5), 3,95 (dd, *J* = 9,3; 6,0 Hz, 1H, THF H2'), 4,07 (q, *J* = 7,7 Hz, 1H, THF H5'), 4,59 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,98-5,02 (m, 1H, THF H3), 6,21 (dd, *J* = 3,1; 0,6 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,4; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,74 (s, 1H, pur H8), 7,80 (bs, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,6 (THF C4), 36,4 (CH₂-fur), 37,0 (-N(CH₃)₂), 53,4 (THF C3), 66,7 (THF C5), 71,6 (THF C2), 106,5 (fur C3), 110,4 (fur C4), 112,7 (pur C5), 135,8 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,0 (pur C4), 153,5 (fur C2), 153,7 (pur C6), 159,0 (pur C2).

***N*²-(2-aminoethyl)-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²-methyl-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (28)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₇H₂₃N₇O₂, výtěžek: 28%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 9,86; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 358,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₇H₂₃N₇O₂ [M+H]⁺ 358,1986, změř. 358,1990. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,22-2,28 (m, 1H, THF H4), 2,35-2,44 (m, 1H, THF H4'), 2,76 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, -N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 3,08 (s, 3H, -N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 3,57 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, -N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 3,84 (dd, *J* = 8,6; 5,5 Hz, 1H, THF H5), 3,86 (dd, *J* = 9,3; 4,0 Hz, 1H, THF H2), 3,95 (dd, *J* = 9,2; 6,1 Hz, 1H, THF H2'), 4,07 (q, *J* = 7,8 Hz, 1H, THF H5'), 4,58 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,97-5,01 (m, 1H, THF H3), 6,22 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,9; 0,5 Hz, 1H, fur H), 7,73 (s, 1H, pur H8), 7,79 (bs, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,5 (THF C4), 35,9 (-N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 36,4 (CH₂-fur), 39,5 (-N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 51,6 (-N(CH₃)CH₂CH₂NH₂), 53,4 (THF C3), 66,7 (THF C5), 71,5 (THF C2), 106,5 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,0 (pur C5), 135,8 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,0 (pur C4), 153,6 (fur C2), 153,8 (pur C6), 158,5 (pur C2).

***N*⁶-[2-(dimethylamino)ethyl]-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (29)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₅N₇O₂, výtěžek: 35%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 9,02; 97,1. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 372,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₈H₂₅N₇O₂ [M+H]⁺ 372,2142, změř. 372,2143. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,16 (s, 6H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 2,21-2,27 (m, 1H, THF H4), 2,38-2,41 (m, 3H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂, THF H4'), 3,33 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 3,84 (td, *J* = 8,6; 5,5 Hz, 1H, THF H5), 3,88 (dd, *J* = 9,3; 4,1 Hz, 1H, THF H2), 3,93 (dd, *J* = 9,2; 5,8 Hz, 1H, THF H2'), 4,06 (q, *J* = 7,7 Hz, 1H, THF H5'), 4,59 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,93-4,98 (m, 1H, THF H3), 6,20 (dd, *J* = 3,1; 0,6 Hz, 2H, fur H3, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,7; 0,8 Hz, 1H, fur H5), 7,71 (s, 2H, pur NH, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,6 (THF C4), 36,2 (CH₂-fur), 39,0 (-NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 45,2 (2× C, -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 53,4 (THF C3), 58,3 (-NHCH₂CH₂N(CH₃)₂), 66,6 (THF C5), 71,6 (THF C2), 106,4 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,5 (pur C5), 135,4 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,1 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,3 (pur C6), 159,0 (pur C2).

***N*⁶-(2-aminoethyl)-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (30)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₆H₂₁N₇O₂, výtěžek: 31%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 8,31; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 344,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₆H₂₁N₇O₂ [M+H]⁺ 344,1832, změř. 344,1832. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,19-2,26 (m, 1H, THF H4), 2,35-2,45 (m, 1H, THF H4'), 2,76 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂NH₂), 3,31 (q, *J* = 5,9 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂NH₂), 3,83 (td, *J* = 8,7; 5,5 Hz, 1H, THF H6), 3,87 (dd, *J* = 9,6; 3,7 Hz, 1H, THF H2), 3,93 (dd, *J* = 9,1; 5,9 Hz, 1H, THF H2'), 4,06 (q, *J* = 7,8 Hz, 1H, H5'), 4,60 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,94-4,99 (m, 1H, THF H3), 6,22 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 2,7; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 6,46 (t, *J* = 4,6 Hz, 1H, -NHCH₂CH₂NH₂), 7,51 (s, 1H, fur H5), 7,72 (s, 2H, pur NH, pur H8). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,7 (THF C4), 36,3 (CH₂-fur), 40,8 (-NHCH₂CH₂NH₂), 43,1 (-NHCH₂CH₂NH₂), 53,4 (THF H3), 66,6 (THF C5), 71,7 (THF C2), 106,6 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,5 (pur C5), 135,4 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,0 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,3 (pur C6), 159,1 (pur C2).

***N*-(furan-2-ylmethyl)-2-morfolino-9-(tetrahydrofuran-3-yl)-9*H*-purin-6-amin (31)**

Světle žlutá pevná látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₂N₆O₃, výtěžek: 97%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 20,43; 98,2. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 371,2 (100,

[M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₆H₂₂N₆O₃ [M+H]⁺ 371,1826, změř. 371,1828. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,20-2,26 (m, 1H, THF H4), 2,37-2,45 (m, 1H, THF H4'), 3,63 (s, 8H, morfolin H2, morfolin H3), 3,81-3,88 (m, 2H, THF H2, THF H5), 3,94 (dd, *J* = 9,3; 6,0 Hz, 1H, THF H2'), 4,06 (td, *J* = 8,1; 7,1 Hz, 1H, THF H5'), 4,57 (bs, 2H, CH₂-fur), 4,99-5,03 (m, 1H, THF H3), 6,21 (dd, *J* = 3,1; 0,6 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 0,6 Hz, 1H, fur H5), 7,79 (s, 1H, pur H8), 7,93 (s, 1H, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31,7 (THF C4), 36,4 (CH₂-fur), 44,7 (2× C, morfolin C3), 53,4 (THF C3), 66,1 (2× C, morfolin C2), 66,7 (THF C5), 71,6 (THF C2), 106,6 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,6 (pur C5), 136,3 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,8 (pur C4), 153,4 (fur C2), 153,9 (pur C6), 158,3 (pur C2).

***N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²-propyl-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (32)**

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₄N₆O₂, výtěžek: 47%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 23,42; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 357,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₁₈H₂₄N₆O₂ [M+H]⁺ 357,2034, změř. 357,2035. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,86 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, -NHCH₂CH₂CH₃), 1,47-1,58 (m, 4H, THP H5, THP H5', -NHCH₂CH₂CH₃), 1,61-1,70 (m, 1H, THP H4), 1,84 (ddd, *J* = 12,5; 5,2; 3,4 Hz, 1H, THP H3), 1,92 (bd, *J* = 11,6 Hz, 1H, THP H4'), 2,16 (qd, *J* = 11,6; 2,8 Hz, 1H, THP H3'), 3,20 (dt, *J* = 7,0; 6,4 Hz, 2H, -NHCH₂CH₂CH₃), 3,55-3,60 (m, 1H, THP H6), 3,97 (bd, *J* = 11,3 Hz, 1H, THP H6'), 4,61 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,40 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H, THP H2), 6,20 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 6,44 (bs, 1H, -NHCH₂CH₂CH₃), 7,51 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,70 (bs, 1H, pur NH), 7,87 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11,6 (-NHCH₂CH₂CH₃), 22,5 (-NHCH₂CH₂CH₃), 22,7 (THP C4), 24,6 (THP C5), 30,2 (THP C3), 36,3 (CH₂-fur), 43,0 (-NHCH₂CH₂CH₃), 67,6 (THP C6), 80,3 (THP C2), 106,4 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,0 (pur C5), 135,0 (pur C8), 141,6 (fur C5), 151,0 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,2 (pur C6), 159,4 (pur C2).

***N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²,*N*²-dipropyl-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (33)**

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₂₁H₃₀N₆O₂, výtěžek: 39%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,67; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 399,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₂₁H₃₀N₆O₂ [M+H]⁺ 399,2503, změř. 399,2505. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0,84 (t, *J* = 7,5 Hz, 6H, -N(CH₂CH₂CH₃)₂),

1,51-1,57 (m, 6H, THP H5, THP H5', -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 1,63-1,69 (m, 1H, THP H4), 1,85 (ddd, *J* = 12,8; 5,4; 3,1 Hz, 1H, THP H3), 1,90-1,93 (m, 1H, THP H4'), 2,28 (qd, *J* = 12,1; 3,7 Hz, 1H, THP H3'), 3,39-3,48 (m, 4H, -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 3,55-3,60 (m, 1H, THP H6), 3,97 (ddd, *J* = 11,1; 4,7; 3,1 Hz, 1H, THP H6'), 4,58 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,40 (dd, *J* = 10,9; 2,0 Hz, 1H, THP H2), 6,15 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, *J* = 3,1; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 7,50 (dd, *J* = 1,8; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,75 (bs, 1H, pur NH), 7,85 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11,4 (2× C, -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 20,9 (2× C, -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 22,6 (THP C4), 24,6 (THP C5), 29,8 (THP C3), 36,5 (CH₂-fur), 49,4 (2× C, -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 67,5 (THP C6), 80,8 (THP C2), 106,0 (fur C3), 110,3 (fur C4), 112,6 (pur C5), 135,4 (pur C8), 141,5 (fur C5), 151,0 (pur C4), 153,7 (fur C2), 153,8 (pur C6), 158,1 (pur C2).

***N*⁶-benzyl-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (34)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₂H₂₄N₆O₂, výtěžek: 49%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 24,43; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 405,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₂₂H₂₄N₆O₂ [M+H]⁺ 405,2034, změř. 405,2035. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.51-1.56 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1.64-1.69 (m, 1H, THP H4), 1.80-1.85 (m, 1H, THP H3), 1.90-1.95 (m, 1H, THP H4'), 2.12-2.20 (m, 2H, THP H3'), 3.56-3.62 (m, 1H, THP H6), 3.97 (bd, *J* = 12.2 Hz, 1H, THP H6'), 4.44 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, PheCH₂NH-), 4.55 (bs, 2H, CH₂-fur), 5.40 (dd, *J* = 10.9, 2.0 Hz, 1H, THP H2), 6.12 (bs, 1H, fur H3), 6.31 (s, 1H, fur H4), 7.08 (bs, 1H, PheCH₂NH-), 7.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Phe H_{*p*}), 7.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Phe H_{*m*}), 7.33 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, Phe H_{*o*}), 7.50 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, fur H5), 7.74 (bs, 1H, pur NH), 7.88 (s, 1H, pur H8).

***N*⁶,*N*⁶-bis(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (35)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₀H₂₂N₆O₃, výtěžek: 17%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,84; 96,6. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 395,3 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₂₀H₂₂N₆O₃ [M+H]⁺ 395,1826, změř. 395,1827. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,52-1,56 (m, 2H), 1,63-1,72 (m, 1H, THP H4), 1,84 (ddd, *J* = 12,5; 5,7; 3,3 Hz, 1H, THP H3), 1,93 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, THF H4'), 2,18 (qd, *J* = 12,0; 2,9 Hz, 1H, THP H3'), 3,57-3,62 (m, 1H, THP H6), 3,97 (dd, *J* = 11,0; 1,8 Hz, 1H, THP H6'), 4,43 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H, C2 CH₂-fur), 4,58 (bs, 2H, C6 CH₂-fur), 5,42 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, THP H2), 6,19 (bs, 2H, C2 fur H3, C6 fur H3), 6,32-6,34 (m, 2H, C2 fur H4, C6 fur H4), 6,90 (bs, 1H, C2 -NHCH₂-fur), 7,50 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H, C2 fur

H5) 7,51 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, C6 fur H5), 7,79 (bs, 1H, pur NH), 7,91 (s, 1H, pur H8). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,6 (THP C4), 24,6 (THP C5), 30,1 (THP C3), 36,2 (C6 CH_2 -fur), 38,1 (C2 CH_2 -fur), 67,6 (THP C6), 80,4 (THP C2), 106,2 (C2 fur C3), 106,6 (C6 fur C3), 110,3 (C2 fur C4), 110,4 (C6 fur C4), 113,3 (pur C5), 135,3 (pur C8), 141,3 (C2 fur C5), 141,6 (C6 fur C5), 150,7 (pur C4), 153,3 (C6 fur C2), 154,2 (pur C6, C2 fur C2), 158,8 (pur C2).

***N*⁶-cyklopentyl-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (36)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek: 50%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 25,11; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 383,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2$ [M+H]⁺ 383,2190, změř. 383,2190. ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,42-1,56 (m, 6H, cP H3, cP H3', THP H5, THP H5'), 1,61-1,68 (m, 3H, cP H2, THP H4), 1,87-1,83 (m, 3H, cP H2', THP H3), 1,93 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H, THP H4'), 2,17 (qd, $J = 12,1; 3,4$ Hz, 1H), 3,55-3,60 (m, 1H, THP H6), 3,95-3,99 (m, 1H, THP H6'), 4,11-4,18 (m, 1H, cP H1), 4,60 (bs, 2H, CH_2 -fur), 5,39 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H, THP H2), 6,19 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,35 (dd, $J = 3,1; 1,8$ Hz, 1H, fur H4), 6,38 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, -NHcP), 7,51 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, fur H5), 7,70 (bs, 1H, pur NH), 7,87 (s, 1H, pur H8). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,7 (THP C4), 23,5 (2 \times C, cP C3), 24,6 (THP C5), 30,1 (THP C3), 32,5 (2 \times C, cP C2), 36,4 (CH_2 -fur), 52,7 (cP C1), 67,6 (THP C6), 80,3 (THP C2), 106,4 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,1 (pur C5), 135,0 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,9 (pur C4), 153,6 (fur C2), 154,2 (pur C6), 159,0 (pur C6).

***N*-(furan-2-ylmethyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (37)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek: 75%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 25,35; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 369,2 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$ [M+H]⁺ 369,2034, změř. 369,2034. ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,50-1,56 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,62-1,72 (m, 1H, THP H4), 1,83-1,93 (m, 6H, pyrrolidin H3, THP H3, THP H4'), 2,18 (qd, $J = 12,2; 3,7$ Hz, 1H, THP H3'), 3,46 (s, 4H, pyrrolidin H2), 3,57-3,62 (m, 1H, THP H6), 3,96 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H, THP H6'), 4,60 (bs, 2H, CH_2 -fur), 5,44 (dd, $J = 10,7; 1,8$ Hz, 1H, THP H2), 6,21 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 2,8; 1,8$ Hz, 1H, fur H4),

7,51 (d, $J = 0,6$ Hz, 1H, fur H5), 7,75 (bs, 1H, pur NH), 7,88 (s, 1H, pur H8). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,7 (THP C4), 24,6 (THP C5), 25,1 (2 \times C, pyrrolidin C3), 30,2 (THP C3), 36,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 46,5 (2 \times C, pyrrolidin C2), 67,6 (THP C6), 80,3 (THP C2), 106,6 (fur C3), 110,4 (fur C4), 112,6 (pur C5), 135,2 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,9 (pur C4), 153,6 (fur C2), 153,9 (pur C6), 157,4 (pur C2).

***N*⁶-(6-aminohexyl)-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (38)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_2$, výtěžek: 85%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,13; 96,0. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 414,3 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414,2612, změř. 414,2612. ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,27-1,30 (m, 4H, -NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 1,38-1,43 (m, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂CH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂NH₂), 1,47-1,57 (m, 4H, THP H5, THP H5'), -NHCH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 1,63-1,71 (m, 1H, THP H4), 1,85 (dq, $J = 12,9$; 2,8 Hz, 1H, THP H3), 1,91-1,96 (m, 1H, THP H4'), 2,13-2,22 (m, 1H, THP H3'), 2,58 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ NH₂), 3,23 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H, -NH $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 3,56-3,61 (m, 1H, THP H6), 3,96-3,99 (m, 1H, THP H6'), 4,62 (bs, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 5,40 (dd, $J = 10,7$; 1,8 Hz, 1H, THP H2), 6,20 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 3,1$; 1,8 Hz, 1H, fur H4), 6,38 (bs, 1H, -NH $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 7,51 (dd, $J = 1,8$; 0,9 Hz, 1H, fur H5), 7,61 (bs, 1H, pur NH), 7,85 (s, 1H, pur H8). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,6 (THP C4), 24,5 (THP C5), 26,0 (-NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 26,3 (-NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 29,2 (-NHCH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 30,1 (THP C3), 30,7 (-NHCH₂CH₂CH₂CH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂NH₂), 36,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -fur), 40,2 (-NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ NH₂), 41,0 (-NH $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 67,5 (THP C6), 80,3 (THP C2), 106,3 (fur C3), 110,3 (fur C4), 112,9 (pur C5), 134,9 (pur C8), 141,5 (fur C5), 151,0 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,2 (pur C6), 159,3 (pur C2).

***N*⁶-(2-aminoethyl)-*N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*⁶-methyl-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (39)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_2$, výtěžek: 41%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,35; 97,5. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 372,3 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 372,2146, změř. 372,2146. ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,52-1,57 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,64-

1,73 (m, 1H, THP H4), 1,85 (dd, $J = 12,5; 2,4$ Hz, 1H, THP H3), 1,91-1,95 (m, 1H, THP H4'), 2,20 (qd, $J = 12,2; 3,8$ Hz, 1H, THP H3'), 2,76 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, -N(CH)₃CH₂CH₂NH₂), 3,08 (s, 3H, -N(CH)₃CH₂CH₂NH₂), 3,57 (td, $J = 6,6; 1,8$ Hz, 2H, -N(CH)₃CH₂CH₂NH₂), 3,60-3,64 (m, 1H, THP H6), 3,97 (dd, $J = 10,9; 1,7$ Hz, 1H, THP H6'), 4,59 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,45 (dd, $J = 10,9; 2,0$ Hz, 1H, THP H2), 6,22 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 3,1; 1,8$ Hz, 1H, fur H4), 7,51 (dd, $J = 1,8; 0,9$ Hz, 1H, fur H5), 7,78 (bs, 1H, pur NH), 7,90 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6 (THP C4), 24,6 (THP C5), 30,1 (THP C3), 35,8 (-N(CH)₃CH₂CH₂NH₂), 36,4 (CH₂-fur), 39,3 (-N(CH)₃CH₂CH₂NH₂), 51,4 (-N(CH)₃CH₂CH₂NH₂), 67,5 (THP C6), 80,3 (THP C2), 106,4 (fur H3), 110,4 (fur H4), 112,6 (pur C5), 135,5 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,8 (pur C4), 153,5 (fur C2), 153,8 (pur C6), 158,7 (pur C2).

***N*⁶-(furan-2-ylmethyl)-*N*²-(3-methoxypropyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-2,6-diamin (40)**

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₉H₂₆N₆O₃, výtěžek: 62%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 21,09; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (intenzita, iont): 387,3 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* kalk. pro C₁₉H₂₆N₆O₃ [M+H]⁺ 387,2139, změř. 387,2140. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,51-1,59 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,62-1,69 (m, 1H, THP H4), 1,73 (pent, $J = 6,7$ Hz, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 1,85 (ddd, $J = 12,7; 5,3; 3,1$ Hz, 1H, THP H3), 1,93 (ddd, $J = 13,0; 5,2; 3,5$ Hz, 1H, THP H4'), 2,17 (qd, $J = 11,9; 2,8$ Hz, 1H, THP H3'), 3,21 (s, 3H, -NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 3,28 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 3,36 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 3,56-3,61 (m, 1H, THP H6), 3,97 (ddd, $J = 10,7; 4,6; 2,8$ Hz, 1H, THP H6'), 4,60 (bs, 2H, CH₂-fur), 5,40 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H, THP H2), 6,21 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, fur H3), 6,34 (dd, $J = 3,4; 1,8$ Hz, 1H, fur H4), 6,43 (bs, 1H, -NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 7,51 (dd, $J = 2,0; 0,6$ Hz, 1H, fur H5), 7,70 (bs, 1H, pur NH), 7,88 (s, 1H, pur H8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,7 (THP C4), 24,6 (THP C5), 29,4 (-NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 30,1 (THP C3), 36,3 (CH₂-fur), 38,5 (-NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 57,8 (-NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 67,6 (THP C6), 70,1 (-NHCH₂CH₂CH₂OCH₃), 80,3 (THP C2), 106,4 (fur C3), 110,4 (fur C4), 113,0 (pur C5), 135,0 (pur C8), 141,6 (fur C5), 150,9 (pur C4), 153,5 (fur C2), 154,2 (pur C6), 159,3 (pur C2).

***N*⁶,*N*⁹-bis(furan-2-ylmethyl)-9-(furan-3-ylmethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (41)**

Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₂₀H₁₈N₆O₃, výtěžek: 62%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,48; 99,9. ESI⁺-MS m/z (intenzita, iont): 391,4 (100, [M+H]⁺). HRMS (ESI⁺-TOF) m/z kalk. pro C₂₀H₁₈N₆O₃ [M+H]⁺ 391,1513, změř. 391,1514. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,45 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, C6 CH₂-fur), 4,58 (bs, 2H, C2 CH₂-fur), 5,01 (s, 2H, N9 CH₂-fur), 6,17 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, C6 fur H3), 6,20 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, C2 fur H3), 6,32-6,34 (m, 2H, C2 fur H4, C6 fur H4), 6,47 (dd, *J* = 1,7, 0,8 Hz, 1H, N9 fur H4), 6,89 (bs, 1H, C2 -NHCH₂-fur), 7,51 (dd, *J* = 1,7; 0,8 Hz, 2H, C2 fur H5, C6 fur H5), 7,57 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H, N9 fur H5), 7,63 (bs, 1H, N9 fur H2), 7,75 (bs, 2H, pur H8, pur NH). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 36,2 (C2 CH₂-fur), 36,9 (N9 CH₂-fur), 38,1 (C6 CH₂-fur), 106,2 (C6 fur C3), 106,6 (C2 fur C3), 110,4 (C6 C3 fur), 110,4 (C2 C3 fur), 110,7 (N9 fur C4), 113,4 (pur C5), 121,6 (N9 fur C3), 137,2 (pur C8), 140,8 (N9 fur C2), 141,4 (C6 fur C5), 141,6 (C2 fur C5), 143,7 (N9 fur C5), 150,7 (pur C4), 153,4 (C2 fur C2), 154,3 (2× C, pur C2, C6 fur C2), 158,9 (pur C6).