

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přirodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Syntéza a biologické testování potencionálních léčiv  
pro terapii pásmové nemoci (jet-lag)**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Autor:** Bc. Tereza Mičkerová

**Studijní program:** B1501 Biologie

**Studijní obor:** Experimentální biologie

**Forma studia:** Prezenční

**Vedoucí práce:** Mgr. Václav Mik, Ph.D.

**Termín odevzdání práce:** 2021

## Bibliografická identifikace

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>Jméno a příjmení autora</b> | Bc. Tereza Mičkerová   |
| <b>Název práce</b>             | Syntéza a biologické testování potencionálních léčiv pro terapii pásmové nemoci (jet-lag)  |
| <b>Typ práce</b>               | Diplomová  |
| <b>Pracoviště</b>              | Laboratoř růstových regulátorů   |
| <b>Vedoucí práce</b>           | Mgr. Václav Mik, Ph.D.   |
| <b>Rok obhajoby práce</b>      | 2021   |
| <b>Abstrakt</b>                | <p>Cirkadiánní rytmus je biologický rytmus, který vznikl adaptací na střídání cyklu dne a noci (světla/tmy). Prostřednictvím transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček reguluje genovou expresi a řídí fyziologické, biochemické a behaviorální procesy s periodou přibližně 24 hod (lat. <i>circa diem</i>, „okolo dne“). Nesoulad vnitřních hodin s vnějším prostředím může vést k rozvoji řady psychických, spánkových, gastrointestinálních a imunitních poruch. Zároveň je také rizikovým faktorem některých nádorových onemocnění. Jedním z takovýchto onemocnění je jet-lag, česky pásmová nemoc, která postihuje pasažéry cestující přes více časových pásem a projevuje se například únavou, nespavostí, pocitem podrážděnosti, vyčerpaností, žaludečními obtížemi nebo bolestmi svalů a hlavy. Cílem diplomové práce byla syntéza nových modulátorů cirkadiánního rytmu a jejich testování na buněčné linii nesoucí gen pro luciferázu pod kontrolou promotoru hodinového genu <i>bmal1</i>. Většina látek prodloužila periodu cirkadiánního rytmu v koncentracích nevykazujících toxický efekt na nenádorové lidské buňky. Nejúčinnější látka prodloužila periodu o 4 h. Prezentovaná práce ukazuje potenciál nových derivátů v modulaci cirkadiánní aktivity.</p> |
| <b>Klíčová slova</b>           | Cirkadiánní rytmus, modulátory cirkadiánních rytmů, syntéza, biologická aktivita, BMAL1-LUC.   |
| <b>Počet stran</b>             | 69   |
| <b>Počet příloh</b>            | 2  |

## **Bibliographical identification**

|  |  |
|--|--|
| <b>Author's first name and surname</b> | Bc. Tereza Mičkerová   |
| <b>Title of thesis</b>                 | Synthesis and biological screening of potential drugs for jet-lag therapy  |
| <b>Type of thesis</b>                  | Master   |
| <b>Department</b>                      | Laboratory of Growth Regulators  |
| <b>Supervisor</b>                      | Mgr. Václav Mik, Ph.D.   |
| <b>The year of presentation</b>        | 2021   |
| <b>Abstract</b>                        | <p>The circadian rhythm is a biological rhythm which developed as an adaptation to the alternation of the day and night (light/dark) cycle. Through the transcription-translation feedback loops regulates gene expression and controls physiological, biochemical, and behavioral processes with a period of about 24 hours (lat. Circa diem, "around the day"). Inconsistency of the internal clock with the external environment can lead to the development of several mental, sleep, gastrointestinal and immune disorders. It is also a risk factor for some cancers. One such disease is jet-lag that affects passengers traveling across multiple time zones and manifests itself in, for example, fatigue, insomnia, irritability, exhaustion, stomach upset or muscle and headaches. The aim of this diploma thesis was synthesis of novel potential modulators of circadian rhythm and their testing on the cell line carrying the luciferase gene under the control of the propagating <i>bmal1</i> clock gene. Most substances prolonged the circadian rhythm period at concentration that didn't show a toxic effect on the non-tumor human cells. The most effective substance extended the period by 4 h. The work presenting here has shown potential of novel derivatives in modulation of circadian activity.</p> |
| <b>Keywords</b>                        | Circadian rhythm, modulators of circadian rhythms, synthesis, biological activity, BMAL1-LUC.  |
| <b>Number of pages</b>                 | 69   |
| <b>Number of appendices</b>            | 2  |
| <b>Language</b>                        | Czech  |

**Prohlášení**

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za využití citované literatury,  
pod vedením Mgr. Václava Mika, Ph.D.“

.....

V Olomouci, dne

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Velké poděkování patří v první řadě především vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivé a přátelské jednání, obětavost a cenné rady jednak při praktické práci v laboratoři a rovněž při sepisování práce. Poděkování patří rovněž celému kolektivu laboratoře organické syntézy na bývalém Oddělení chemické biologie a genetiky CRH za poskytnuté rady a především Mgr. Markétě Dokonalové za pomoc v laboratoři při syntéze látek. Také děkuji Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. a Kateřině Fakové za provedení biologického testování látek na buněčných kulturách a za rady a konzultace během sepisování práce. Dále děkuji Mgr. Haně Omámikové za purifikaci látek pomocí preparativní HPLC a za měření a zpracování HPLC-UV/VIS-MS dat a internímu grantu UP (IGA\_PrF\_2021\_007) za finanční podporu při realizaci práce.

## OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Bibliografická identifikace .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>Bibliographical identification.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>  | <b>10</b> |
| 2.1 Cirkadiánní rytmy .....   | 10        |
| 2.1.1 Cirkadiánní systém savců a člověka.....   | 11        |
| 2.1.2 Neurohumorální regulace cirkadiánního rytmu.....                                | 12        |
| 2.1.3 Cirkadiánní oscilace na úrovni buňky .....                                      | 15        |
| 2.2 Patofyziologie cirkadiánních rytmů .....  | 19        |
| 2.2.1 Spánkové poruchy .....  | 19        |
| 2.2.2 Pásmová nemoc.....  | 20        |
| 2.3 Modulátory cirkadiánních rytmů.....   | 21        |
| 2.3.1 Modulátory základních komponent cirkadiánních rytmů.....                        | 23        |
| 2.3.2 Regulace cirkadiánního rytmu pomocí sekundárních molekulárních cílů.....        | 30        |
| 2.3.3 Terapie pásmové nemoci.....   | 31        |
| 2.3.4 Chronoterapie .....   | 32        |
| <b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>  | <b>33</b> |
| 3.1 Chemikálie .....  | 33        |
| 3.2 Buněčné linie.....  | 33        |
| 3.3 Metody .....  | 34        |
| 3.4 Syntéza.....  | 35        |
| 3.4.1 Syntéza N9 substituovaných prekurzorů hydroaminací .....                        | 35        |
| 3.4.2 Syntéza finálních produktů prostřednictvím nukleofilní substituce v pozici C6.. | 35        |
| 3.5 Biologické testování.....   | 36        |
| 3.5.1 Testování vlivu na cirkadiánní rytmus .....                                     | 36        |
| 3.5.2 Testování cytotoxicity látek.....   | 36        |
| <b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5 ZÁVĚR.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>PŘÍLOHY .....</b>  | <b>55</b> |

## SEZNAM ZKRATEK

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>AMPK</b>                      | 5'AMP-aktivovaná proteinkináza  |
| <b>BMAL1</b>                     | Brain Muscle Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) Like 1 |
| <b>bd</b>                        | široký doublet  |
| <b>bs</b>                        | široký singlet  |
| <b>cAMP</b>                      | cyklický adenosinmonofosfát   |
| <b>cGMP</b>                      | cyklický guanosinmonofosfát   |
| <b>CKI, CKII</b>                 | kasein kináza 1, kasein kináza 2  |
| <b>CLOCK</b>                     | Circadian Locomotor Output Cycles Kaput                                   |
| <b>cP</b>                        | cyklopentyl   |
| <b>CR</b>                        | cirkadiánní rytmy   |
| <b>CRSD</b>                      | spánkové poruchy; circadian rhythm sleep disorders                        |
| <i>cry</i>                       | krytochrom  |
| <b>d</b>                         | doublet   |
| <b>dd</b>                        | doublet doubletu  |
| <b>DAD</b>                       | detektor s diodovým polem   |
| <b>DAG</b>                       | 1,2-diacylglycerol  |
| <b>DBP</b>                       | albumin side D binding protein  |
| <b>DMEM</b>                      | Dulbecco's Modified Eagle's Medium  |
| <b>DMSO</b>                      | dimethylsulfoxid  |
| <b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b> | deuterovaný dimethylsulfoxid  |
| <b>DNA</b>                       | deoxyribonukleová kyselina  |
| <b>DRD3</b>                      | dopaminový receptor 3   |
| <b>ekv.</b>                      | ekvivalent  |
| <b>ESI+-MS</b>                   | hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód         |
| <b>EtOAc</b>                     | ethyl-acetát  |
| <b>FAD</b>                       | flavinadenindinukleotid   |
| <b>FBS</b>                       | fetální bovinní sérum   |
| <b>GABA</b>                      | kyselina $\gamma$ -aminomáselná   |
| <b>GSK3</b>                      | glykogensyntázakináza 3   |
| <b>HPLC</b>                      | vysokoúčinná kapalinová chromatografie                                    |
| <b>IP3</b>                       | inositol-1,4,5-trifosfát  |
| <b><i>J</i></b>                  | interakční konstanta  |
| <b>LUC</b>                       | luciferáza  |
| <b>m</b>                         | multiplet   |
| <b>MT1, MT2, MT3</b>             | receptory melatoninu  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>NFIL3</b>            | nukleární faktor regulovaný Interleukinem 3   |
| <b>NMDA</b>             | <i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspartátový receptor   |
| <b>NMR</b>              | nukleární magnetická rezonance  |
| <b><i>n</i>PrOH</b>     | <i>n</i> -propanol  |
| <b>PACAP</b>            | peptid aktivující hypofyzární adenylátcyklázu   |
| <b>PAS</b>              | Per – period, Arnt – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein,<br>Sim – single-minded protein |
| <b>PBS</b>              | fosfátový pufr  |
| <b>PE</b>               | petrolether   |
| <b><i>per</i></b>       | period  |
| <b>PKA</b>              | proteinkináza A   |
| <b>PPAR</b>             | peroxisome proliferator-activated receptors   |
| <b>PP1, PP5</b>         | proteinová fosfatáza 1  |
| <b>ppm</b>              | parts per million   |
| <b><i>p</i>TSA</b>      | <i>p</i> -toluensulfonová kyselina  |
| <b>pur</b>              | purin   |
| <b>py</b>               | pyridin   |
| <b>RHT</b>              | retinohypotalamický trakt   |
| <b>ROR</b>              | retinoic acid-related orphan receptors  |
| <b>REV-ERB</b>          | nuclear receptor subfamily  |
| <b>RVO</b>              | rotační vakuová odparka   |
| <b>SAR</b>              | structure-activity relationship – vztah struktury a aktivity  |
| <b>s</b>                | singlet   |
| <b>SCN</b>              | suprachiasmatická jádra   |
| <b>SIRT1</b>            | silent information regulator 1  |
| <b>t</b>                | triplet   |
| <b>TEA</b>              | triethylamin  |
| <b>TFA</b>              | trifluoroctová kyselina   |
| <b>THP</b>              | tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-yl   |
| <b>TLC</b>              | tenkovrstevná chromatografie  |
| <b>TTFL</b>             | transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka  |
| <b>VPAC2</b>            | receptor PACAP polypeptidu  |
| <b>δ</b>                | chemický posun  |
| <b>5-HT<sub>7</sub></b> | 5-hydroxytryptaminový (serotoninový) receptor 7   |



## 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Jakožto obyvatelé planety Země jsme neustále pod vlivem nejrůznějších geofyzikálních faktorů a událostí, které ovlivňují nastavení našeho vnitřního řídicího systému. Jedním z těchto faktorů je rotace planety kolem své osy, díky níž dochází ke střídání cyklů dne a noci. Adaptací na tento podnět je cirkadiánní rytmus (CR), biorytmus s periodou o délce přibližně 24 hodin, který představuje jeden z nejdůležitějších řídicích mechanismů lidského těla, neboť je propojen s celou řadou životně důležitých procesů. Jedná se o rytmicky se opakující změny v chování a fyziologii, které zahrnují cyklus spánku a bdění nebo oscilace v neurologických, metabolických, endokrinních, kardiovaskulárních a imunitních funkcích. Disharmonie cirkadiánního systému tak může mít za následek rozvoj řady spánkových či psychických poruch, nejrůznějších onemocnění metabolického charakteru, jako jsou například porucha glukózové tolerance, metabolický syndrom nebo diabetes mellitus druhého typu, nebo zánětlivých či nádorových onemocnění. Komplikací narušení CR je skutečnost, že tuto dysfunkci v mnohých případech nevnímáme, neboť často nezpůsobuje bolest, dokud nedojde vlivem permanentního stresu organismu k deregulaci fyziologických funkcí a k rozvoji onemocnění.

Vlivem současného životního stylu, který zahrnuje vícesměnný provoz, cestování přes více časových pásem, práci dlouho do noci, či naopak pozdní vstávání a často i špatné stravovací návyky, dochází u většiny populace k narušení CR. V současné době probíhá stále intenzivnější výzkum nízkomolekulárních modulátorů CR, pomocí kterých by šlo normalizovat parametry CR. A právě těmto nízkomolekulárním modulátorům, v našem případě purinového charakteru, je věnována tato diplomová práce.

Cílem diplomové práce bylo v první řadě provedení literární rešerše na téma cirkadiánní rytmus u člověka, pásmová nemoc (jet-lag) a nízkomolekulární modulátory cirkadiánního rytmu. Praktická část poté zahrnovala syntézu potenciálních modulátorů založených na purinovém skeletu a jejich testování na a jejich testování na buněčné linii nesoucí gen pro luciferázu pod kontrolou promotoru hodinového genu BMAL1. Cytotoxicita připravených látek byla testována na buněčných liniích lidských fibroblastů BJ a keratinocytů HaCaT.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

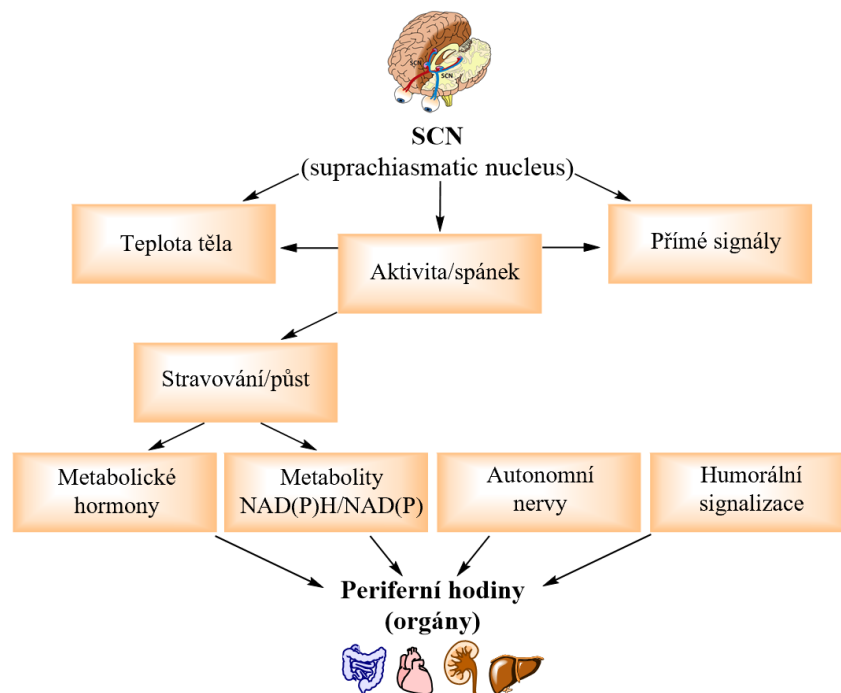
### 2.1 Cirkadiánní rytmy

V průběhu miliónů let evoluce prošly živé organismy na Zemi vývojem od jednobuněčných organismů přes organismy mnohobuněčné až k vývoji člověka (*Homo sapiens*). Přestože z hlediska morfologie i vývoje jsou jednobuněčné organismy od člověka velmi odlišné a leží na opačných stranách fylogenetického stromu, najdeme zde řadu podobností v oblasti fyziologie, genetiky, biochemie a rytmicity (Levi a Schibler, 2007). Rytmicity se vyvinula především jako adaptace na okolní opakující se geofyzikální události, které zahrnují střídání dne a noci, ročních období, přílivu a odlivu, sluneční cyklus nebo synchronní rotaci Měsíce. Z těchto faktorů má na živé organismy na Zemi patrně větší vliv střídání cyklů světla a tmy (dne a noci) generovaných rotací Země kolem své osy. Tento 24hodinový cyklus světla a tmy je jeden z vsudypřítomných epigenetických vlivů, které vedly ke vzniku a vývoji člověka z jednobuněčného organismu (Bunney a Bunney, 2000), a přetrvává-li za stálých podmínek v závislosti na teplotě, mluvíme o tzv. cirkadiánním rytmu. Slovo „cirkadiánní“ je složeninou slov latinského původu *circa-* a *-diem*, což v překladu znamená „okolo dne“. Cirkadiánní cyklus není extrémně přesný a nedosahuje přesně a pouze periody ( $\tau$ ) 24 hodin, ale délka periody se může pohybovat v rozmezí 20 – 30 h v závislosti na druhu. Na základě délky periody rozlišujeme dále rytmy ultradiánní s  $\tau < 20$  h a infradiánní s  $\tau > 30$  h (Levi a Schibler, 2007).

Cirkadiánní hodiny jsou jedny z nejdůležitějších biologických oscilátorů. U cyanobakterií podléhá cirkadiánní kontrole fotosyntéza, fixace dusíku či dělení buněk, u rostlin například pohyb listů či otevírání a zavírání květních plátků (Harmer et al., 2001). U savců je prostřednictvím cirkadiánní rytmicity řízena celá řada fyziologických, behaviorálních a biochemických procesů, jako je střídání cyklu spánku a bdění, udržení a změny tělesné teploty, krevní tlak, funkce imunitního systému či syntéza hormonů, především insulínu, glukagonu a glukokortikoidů (Bellet a Sassone-Corsi, 2010, Reddy a Rey, 2014). Napříč fylogenetickým stromem vykazují všechny cirkadiánní hodiny míru podobnosti a sdílejí několik základních vlastností: generují rytmus a jsou synchronizovatelné vnějším stimulem. Tyto signály, které umožňují synchronizaci vnitřních hodin s vnějším časem, jsou označovány jako tzv. zeitgebery neboli ve volném překladu „dárce času“. Kromě střídání dne a noci mezi ně patří změny teploty, aktivity, fáze měsíce či dostupnosti živin (Biscontin et al., 2019). Pokud není organismus vystaven vnějším cyklům, dojde k aktivaci a řízení cirkadiánního rytmu pouze prostřednictvím vnitřních hodin, které se vyznačují také schopností spuštění režimu nového dne či noci, a cyklus běží tzv. volným během (Reddy a Rey, 2014). Denní synchronizace se změnami ve fotoperiodě je usnadňována díky kaskádě molekulárních procesů, jako je například exprese hodinových genů, které jsou spuštěny jako reakce cirkadiánních hodin na světlo (Bunney a Bunney, 2000).

### 2.1.1 Cirkadiánní systém savců a člověka

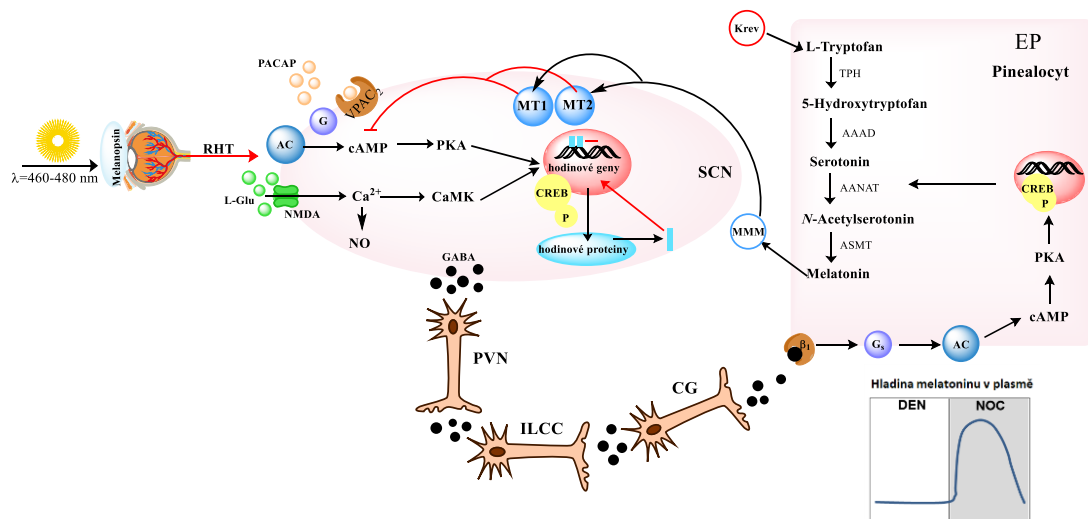
Centrálním oscilátorem je suprachiasmatické jádro (SCN), které se nachází v předním hypothalamu (Saini et al., 2019). Název je odvozen od jeho umístění nad (z lat. *supra*) *chiasma opticum*, které spojuje oba oční nervy, a je místem křížení drah zrakových nervů. U člověka je SCN tvořeno přibližně 20 000 heterogenními neurony vytvářejících vysoce integrovanou síť. Na základě produkce rozdílných neuropeptidů je rozdělováno na přední a zadní (Bellet a Sassone-Corsi, 2010). Suprachiasmatické jádro řídí průběh tří základních dějů, a to střídání cyklu bdění a spánku, příjmu potravy a produkci hormonů – tyreotropního hormonu, kortizolu a melatoninu. Aktivita SCN pravidelně osciluje v závislosti na světelných signálech přijímaných z okolí, díky čemuž pravidelně osciluje také hladina melatoninu. Během dne, kdy je dostatek světla, je aktivita SCN vysoká, což vede k inhibici syntézy melatoninu. Naopak v podvečer, kdy je intenzita světla nízká, začíná narůstat koncentrace melatoninu, který zpětně tlumí aktivitu SCN. Některé orgány jako ledviny, játra, srdce či kosterní svaly mají vlastní autonomní interní cirkadiánní oscilátor, který je označován jako periferní, a ovlivňuje pouze lokální příslušnou tkáň či orgán. Například oscilátor přítomný v játrech je klíčový pro udržování homeostázy jater, regulaci energie a metabolismu a expresi enzymů ovlivňujících anabolismus a katabolismus živin a xenobiotik (Tahara a Shibata, 2016). Tyto periferní hodiny jsou řízeny a regulovány kaskádovitě prostřednictvím neurohumorální signalizace (Obrázek 1), kde centrálním oscilátorem je suprachiasmatické jádro (Harmer et al., 2001).



Obrázek 1: Dráhy strhávání periferních hodin. Upraveno podle Dibner et al., 2010.

### 2.1.2 Neurohumorální regulace cirkadiálního rytmu

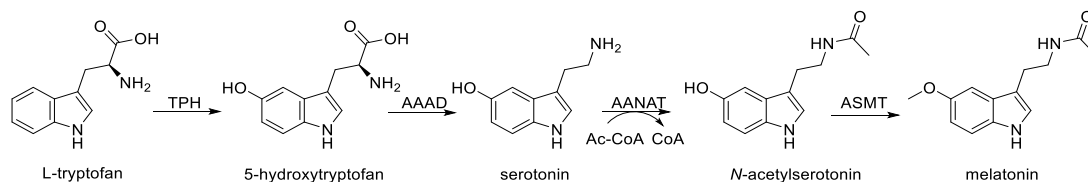
Endogenní cirkadiální hodiny jsou synchronizovány s vnějším okolím prostřednictvím cyklu světla/ tmy a jsou tak restartovány každých 24 hodin. Pro generaci oscilací je klíčové oko a samotný světelný stimul. Oko představuje prostředníka mezi mozkiem a vnějším prostředím a umožňuje následné synchronizační efekty díky melanopsinu, fotopigmentu, který se nachází v gangliových buňkách sítnice a je velmi citlivý na modré světlo ( $\lambda = 460-480$  nm). Ze sítnice dochází k promítání informací do SCN přes retinohypotalamický trakt (RHT) očního nervu (Pfeffer et al., 2018). Přenos signálu z neuronů retinohypotalamického traktu na buňky SCN je zprostředkován dvěma druhy neurotransmiterů, L-glutamátem a peptidem aktivujícím hypofyzární adenylátcyklázu (PACAP) (Obrázek 2). L-Glutamát vazbou na *N*-methyl-*D*-aspartátový membránový receptor (NMDA) indukuje v cytoplazmě buněk SCN akumulaci vápenatých iontů, které následně aktivují kalmodulin kinázu (CaMK). Interakce PACAP s receptorem VPAC2 spouští prostřednictvím G proteinu syntézu cAMP adenylátcyklázou. Zvýšení koncentrace cAMP vede k aktivaci proteinkinázy A (PKA), která se společně s CaMK podílí na fosforylaci transkripčního faktoru cAMP-responsive element binding protein (CREB), jenž indukuje expresi hodinových genů *per1* a *per2* (Reiter et al., 2010).



**Obrázek 2: Přenos světelného signálu po dopadu na sítnici a signální dráha biosyntézy melatoninu.** Melanopsin v sítnicových gangliových buňkách oka zachytává světelný signál specifické vlnové délky ( $\lambda = 460-480$  nm), který je převáděn retinohypotalamickým traktem (RHT) očního nervu do suprachiasmatického jádra (SCN). Prostřednictvím glutamátu a polypeptidu PACAP dochází uvnitř buněk SCN k aktivaci a indukcii exprese časových genů. Signál ke stimulaci epifyzární produkce melatoninu v noci je z SCN prostřednictvím  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA) přenášen do paraventriculárních hypotalamických jader (PVN). Odtud dochází k přenosu nervového signálu sestupnými nervy přes intermediolaterální jádra (ILCC) do cervikálního ganglionu (CG) a následně do epifyzy (EP). Uvolnění noradrenalinu vede v pinealocytech k aktivaci  $\beta_1$ -adrenergických receptorů, stimuluje expresi aralkynamin-N-acetyltransferázy (AANAT) a ke zvýšené produkci melatoninu. Ten je uvolňován do krevního řečiště a mozkomíšního moku, který putuje do třetí mozkové komory. Vazbou na melatoninové receptory MT1 a MT2 aktivuje signální dráhy vedoucí k resetování cirkadiální hodiny. AAAD (dekarboxyláza aromatických aminokyselin) (EC 4.1.1.28), AANAT (aralkylamin N-acetyltransferáza), AC (adenylátcykláza), ASMT (N-acetylserotonin-O-methyltransferáza),  $\beta_1$  ( $\beta$ -adrenergní receptor), CaMK (kalmodulinkináza), CREB/P (transkripční faktor), Gs (G stimulační protein), MT1, MT2 (receptory melatoninu), NMDA (receptor glutamátu), VPAC2 (receptor PACAP polypeptidu), PKA (proteinkináza A), TPH (tryptofanhydroxyláza) (EC 1.14.16.4). Upraveno podle Ma et al., 2016, Reiter et al., 2010.

S nástupem noci a snížením světelné intenzity dochází k indukci tvorby melatoninu. Dráha vedoucí k jeho syntéze vede z SCN do paraventriculárních hypotalamických jader a je zprostředkována uvolněním kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA). Odsud je nervový signál přenášen sestupnými nervy přes intermediolaterální jádra do krční míchy, kde dochází ke styku s pregangliovými synapsemi ganglií krční míchy, konkrétně sympatického cervikálního ganglia (*ganglion cervicale superius*). Neurony ganglia přenášejí signál do šišinky (*glandula pinealis*). Samotná syntéza melatoninu probíhá v pinealocytech a je v iniciována vazbou noradrenalinu na  $\beta$ 1-adrenergní receptory, které jsou spřažené s G-proteiny ( $G_s$ ), jejichž působením následně dochází k aktivaci adenylátcyklázy. Nárůst koncentrace cAMP vede ke stimulaci PKA, jejíž molekulárním cílem je transkripční faktor CREB, který následně indukuje syntézu aralkylamin-*N*-acetyltransferázy (serotonin-*N*-acetyltransferázy, AANAT, EC 2.3.1.87) (Pfeffer et al., 2018, Reiter et al., 2010).

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamin) je stabilizátor rytmů, který podává informaci o aktuálně probíhající noci tlumením aktivity neuronů SCN, poklesem centrální teploty (Claustrat et al., 2005) a poklesem systolického a diastolického tlaku krve (Badeli a Assadi, 2014). Zároveň působí jako neuromodulátor, cytokin a silný fyziologický antioxidant, který likviduje vysoce toxické hydroxylové a kyslíkové radikály, a zároveň zvyšuje hladinu některých antioxidantních enzymů, jako jsou superoxidodismutáza (EC 1.15.1.1), glutathionperoxidáza (EC 1.11.1.9) nebo glutathionreduktáza (EC 1.6.4.2) (Ma et al., 2016). Jedná se o derivát serotoninu, vznikajícího hydroxylací a následnou dekarboxylací tryptofanu (Obrázek 3). Samotný cirkadiánní rytmus syntézy melatoninu je umožněn rytmickou expresí enzymu aralkylamin-*N*-acetyltransferázy, který je limitujícím faktorem v syntetické dráze melatoninu a katalyzuje přenos acetylové skupiny acetylkoenzymu A na primární aminoskupinu serotoninu za vzniku *N*-acetylserotoninu. Ten je následně methylován *N*-acetylserotonin-*O*-methyltransferázou (EC 2.1.1.4) za vzniku melatoninu.

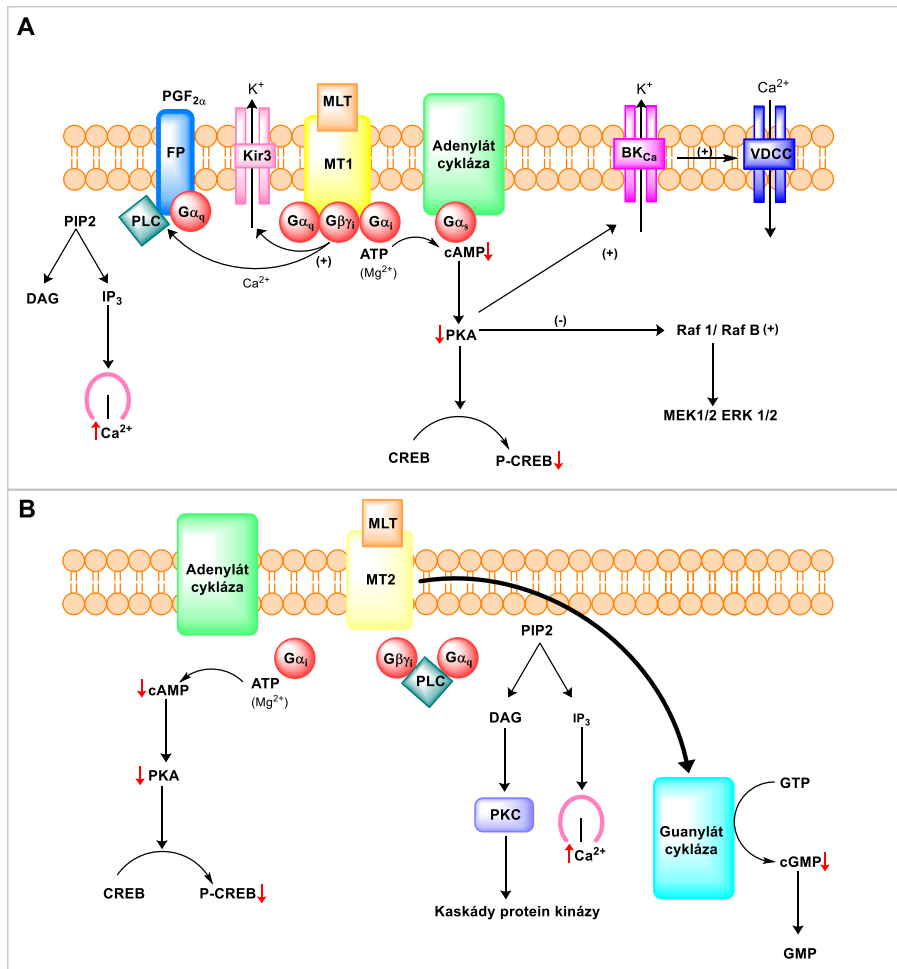


**Obrázek 3: Biosyntetická dráha melatoninu.** AAAD (dekarboxyláza aromatických aminokyselin, EC 4.1.1.28), AANAT (aralkylamin *N*-acetyltransferáza, EC 2.3.1.87), ASMT (*N*-acetylserotonin-*O*-methyltransferáza, EC 2.1.1.4), TPH (tryptofanhydroxyláza, EC 1.14.16.4).

Distribuci melatoninu do mozku a SCN zajišťuje pravděpodobně mozkomíšni mok, kde hladina melatoninu během noci dosahuje cca 20× vyšších hodnot než bylo zjištěno v krevní plasmě (Reiter et al., 2014). Melatonin sekretovaný z pinealocytů protéká sběrnými kanálky v parenchymu epifýzy do subependymální oblasti epifýzového výklenku, kde za účasti

specializovaných buněk tancycytů vstupuje do 3. mozkové komory (Tricoire et al., 2003). Melatonin se může prostřednictvím mozkomíšního moku šířit i do ostatních částí mozku. Z báze 3. mozkové komory do postranních komor přes intraventrikulární otvor (*foramen monroi*), dále přes akvadukt mozkového kmene do 4. komory (Reiter et al., 2014), dále subarachnoidálního prostoru obklopující mozek (Legros et al., 2014) a přes Virchowův-Robinův perivaskulární prostor může hlouběji pronikat do nervového parenchymu. Melatonin vstupuje do SCN z supraoptického výklenku, který je prodloužením 3. mozkové komory v předním hypothalamu, odkud se přenáší difúzí nebo pomocí tancycytů (Reiter et al., 2014).

Melatonin ovlivňuje CR změnou neurální aktivity SCN vazbou na melatoninové receptory MT1 a MT2. Třetí, předpokládaný melatoninový receptor MT3, byl identifikován jako chinonreduktáza 2 a melatonin zde hraje roli ko-substrátu, což může vysvětlovat jeho silné antioxidační vlastnosti (Pfeffer et al., 2018). Receptory MT1 a MT2 po vazbě melatoninu spouští prostřednictvím G proteinů celou řadu buněčných odpovědí jednak v SCN a jednak v periferních tkáních.  $G_{\alpha}$  podjednotky G proteinů inhibují primárně adenylátcyklázu a následnou signální dráhu vedoucí k expresi hodinových genů, zatímco  $G_{\beta\gamma}$  podjednotky zvyšují hladiny inositol-1,4,5-trifosfátu (IP3) a 1,2-diacylglycerolu (DAG) aktivací fosfolipázy C- $\beta$  (Obrázek 4) (Reiter et al., 2010). Aktivace MT1 receptoru v neurálních buňkách navíc zvyšuje fosforylaci mitogenem aktivovaných proteinkináz MEK1/MEK2 a mitogenem aktivovaných proteinkináz ERK1/2 (Bordt et al., 2001). Aktivovaný MT2 receptor naopak vede k inhibici tvorby cGMP (Dubocovich et al., 2010). Dále aktivace MT2 receptoru výrazně ovlivňuje buněčnou morfologii a organizaci cytoskeletu (Bordt et al., 2001), moduluje neurální aktivitu hipokampu (Dubocovich et al., 2010), vede ke snížení exprese glukózových transportérů Glu4 a snížené absorpci glukózy v adipocytech (Brydon et al., 2001). Melatonin vykazuje vazodilatační a rovněž vazokonstrikční účinky. Aktivované MT2 receptory indukují vazodilataci aorty, plicního a břišního cévního systému (Cook et al., 2011) zvýšenou produkcí oxidu dusnatého (Paulis a Simko, 2007). Aktivace MT1 vede k vazokonstrikci koronárních tepen a renálního cévního systému (Cook et al., 2011). Po navázání melatoninu na MT1 receptory dochází k blokaci  $BK_{Ca}$  iontových kanálů, které se hojně vyskytují v buňkách hladkého svalstva a regulují vaskulární tonus. Blokaci se zvyšuje intracelulární hladina vápníku prostřednictvím G proteinů a dochází k vazokonstrikci svalstva (Dubocovich et al., 2010). Aktivace MT1 je spojena s poklesem hladiny cAMP a hydrolýzou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu, což může způsobit inhibici vazodilatace a vazokonstrikce (Paulis a Simko, 2007).

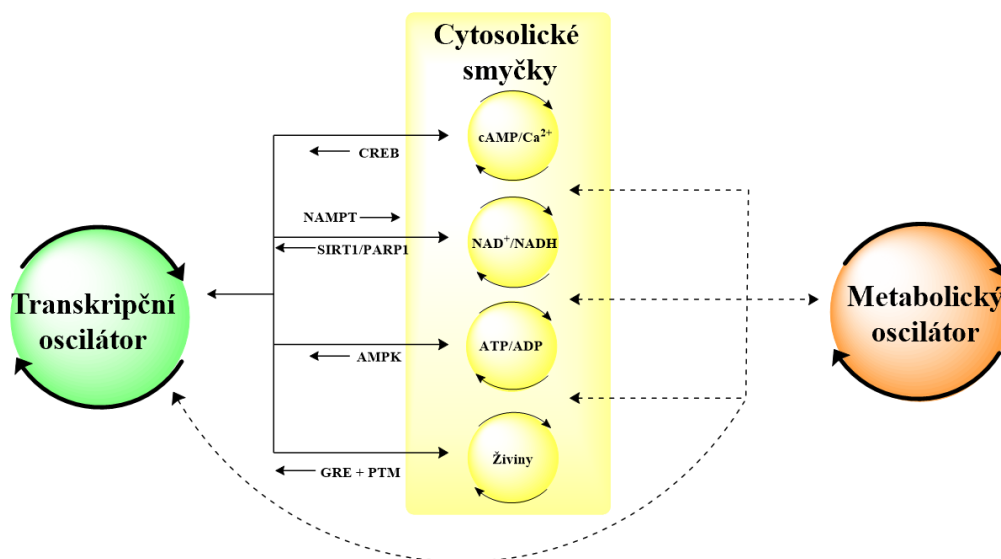


**Obrázek 4: Signální dráhy aktivované prostřednictvím MT1 a MT2 receptorů. A** Signální dráhy po aktivaci receptoru MT1 spojené s G proteiny Gα<sub>i</sub> a Gα<sub>q</sub>. **B** Signální dráha spojená s aktivací receptoru MT2. ATP (adenosintrifosfát), BK<sub>Ca</sub> (vápníkem aktivovaný draslíkový kanál), cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), cGMP (cyklický guanosinmonofosfát), CREB (cAMP-responsive element binding protein), DAG (1,2-diacylglycerol), FP (receptor pro prostaglandin F<sub>2α</sub>), Ga (G-proteiny), GMP (guanosinmonofosfát), GTP (guanosintrifosfát), IP<sub>3</sub> (inositol-1,4,5-trifosfát), Kir3 (draselný kanál spřažený s G proteinem), MEK1/MEK2 (mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza; EC 2.7.12.2), MLT (melatonin), PKA (proteinkináza A; EC 2.7.11.11), P-CREB (fosforylovaný CREB), PIP 2 (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát), PGF<sub>2α</sub> (prostaglandin F<sub>2α</sub>), PKC (proteinkináza C; EC 2.7.11.13), PLC (fosfolipáza C; EC 3.1.4.3), Raf 1/Raf B (proto-onkogen serin/threonin proteinkináza; EC 2.7.11.1), VDCC (na napětí závislý Ca<sup>2+</sup> kanál). (Upraveno podle Masana a Dubocovich, 2001).

### 2.1.3 Cirkadiánní oscilace na úrovni buňky

Cirkadiánní hodiny jsou autonomní a samotné cirkadiánní oscilace jsou udržovány pomocí transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček (TTFL) (Akhtar et al., 2002). Transkripční oscilace vytvářejí cytosolické oscilace v podobě změn energetického a redoxního metabolismu a signalizace (Hastings et al., 2008), které prostřednictvím interakce jednotlivých specifických transkripčních faktorů modulují expresi více než 10 % buněčných transkriptů (Akhtar et al., 2002). Ty se následně promítají do buněčné fyziologie a přenášejí zpětnou vazbu zpět k transkripčnímu oscilátoru (Obrázek 5). Zároveň je celý systém propojen ještě cirkadiánními metabolickými oscilacemi, které jsou nezávislé na TTFL, ale jsou do nich recipročně promítány (Rey a Reddy, 2013). Následná exprese jednotlivých proteinů se liší

v závislosti na tom, zda se jedná o buňky SCN nebo periferních tkání (ledviny, játra, srdce), protože každé vykazují jinou míru citlivosti na jiné podněty (Damiola et al., 2000).



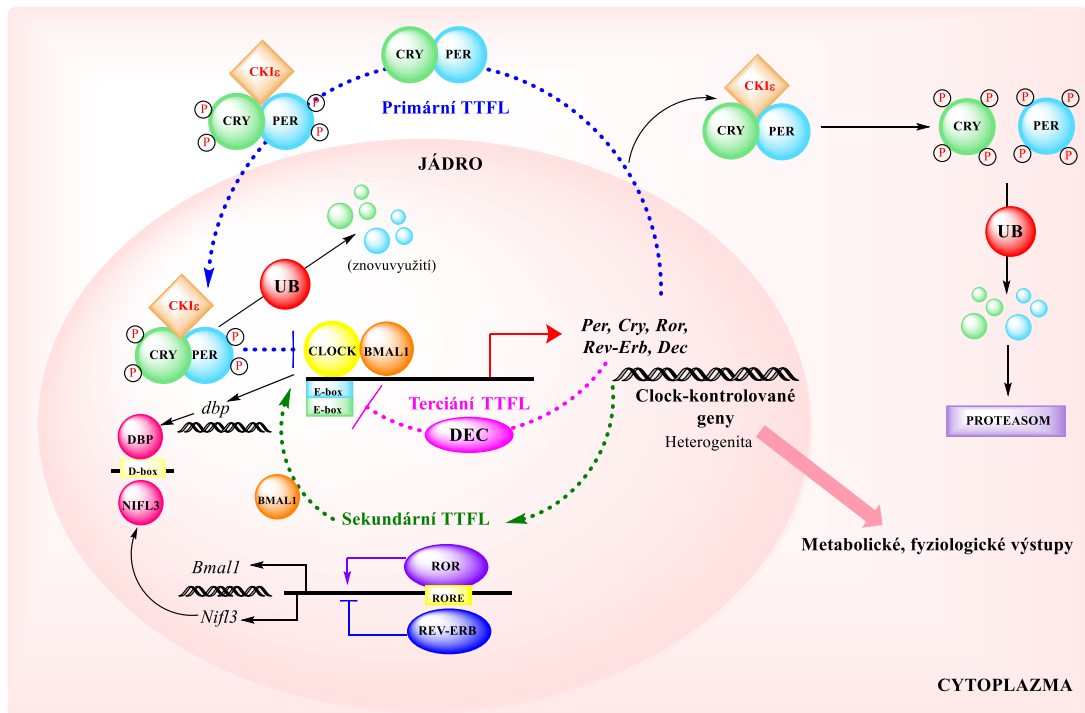
**Obrázek 5: Vazba mezi transkripčními, cytosolickými a metabolickými cykly.** Jednotlivé cytosolické procesy, jako jsou změny v energetickém a redoxním metabolismu a signalizaci (cAMP/Ca<sup>2+</sup>, ATP/ADP, NAD<sup>+</sup>/NADH a koloběh a distribuce živin) jsou součástí TTFL. Zároveň hraje důležitou roli přítomnost metabolických smyček, které fungují kooperativně společně s TTFL. CREB (cAMP response element-binding protein), GRE (glucose response element), PARP (poly-ADP-ribóza-polymeráza), PTM (postranlační modifikace) SIRT1 (Silent information regulator 1) (Upraveno podle Reddy a Rey, 2014).

Významnou roli v TTFL hrají i posttranslační modifikace klíčových proteinů (zejména fosforylace, methylace, sumoylace, acetylace nebo glykosylace), dále jejich translokace, ubikvitinace a následná proteasomální degradace (Reddy a Rey, 2014). Centrální úlohu v TTFL mají časové proteiny Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK) a Brain and Muscle ARNT-Like 1 (BMAL1). CLOCK a BMAL1 představují podjednotky heterodimerního helix-loop-helix-PAS (Per-Arnt-Sim) transkripčního faktoru CLOCK:BMAL1, který se váže do regulačních oblastí promotorů cílových genů na tzv. E-box s palindromickou sekvencí CACGTG a aktivuje transkripci klíčových hodinových genů (*per1-3*, *cry1-2*, *Ror*, *Rev-Erb a Dec1-2*) a Clock-kontrolovaných genů. Ty kódují transkripční faktory, strukturní peptidy, metabolické enzymy, iontové kanály, kinázy a mnoho dalších, díky nimž dochází k řízené periodicitě různých buněčných procesů (Bellet a Sassone-Corsi, 2010).

Primární TTFL tvoří proteiny PER a CRY, které v cytoplazmě heterodimerizují a dochází k jejich translokaci do jádra a inhibici transkripční aktivity komplexu CLOCK:BMAL během cirkadiánní noci (Obrázek 6) (Sato et al., 2006). Na lokalizaci a stabilizaci PER:CRY dimeru se podílejí kaseinkinázy (CSNK1, CKI, EC 2.7.11.1), konkrétně isoformy CKI $\delta$  a CKI $\epsilon$  (Eide et al., 2005), a proteinové fosfatázy PP1 a PP5 (Partch et al., 2006). Cyklická proteolytická degradace PER a CRY je uskutečňována přes ubikvitin-dependentní dráhy prostřednictvím CKI $\epsilon$  a CKI $\delta$ , které vytváří vazebné místo pro ubikvitinligázu  $\beta$ -TrCP (Eide et al., 2005).



Tato degradace představuje základní roli v udržení amplitudy oscilace, a dochází tak k uvolnění CLOCK:BMAL1, čímž je znovu spuštěn celý 24 hodinový cyklus (Brancaccio et al., 2019; Bellet a Sassone-Corsi, 2010).



**Obrázek 6: Model molekulární cirkadiánní oscilace centrální TTFL u savců:** Model znázorňující tři základní oscilační smyčky cirkadiánního rytmu. Primární, zahrnující vznik komplexu CRY:PER a jeho následnou fosforylaci skrze CKIε a translokaci do jádra, kde interagují s komplexem CLOCK:BMAL1, což vede k inhibici transkripce v průběhu noci. Sekundární smyčka představuje zapojení transkripčních faktorů ROR a REV-ERBs, které mají funkci transkripčních aktivátorů a represorů rytmického řízení transkripce BMAL1. Terciální smyčka představuje transkripční represory DEC, které inhibují transkripci indukovanou komplexem CLOCK:BMAL1 kompeticí při vazbě na E-box regulační sekvence genů. BMAL1 (Brain muscle arnt like 1), CKIε (kaseinkináza ε; EC:2.7.11.1), CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput), CRY (krytochrom), DBP (albumin side D-binding protein), NIFL3 (Nuclear factor Interleukin 3 regulated), P (fosfát), PER (period), ROR (retinoic acid-related orphan receptor), TTFL (transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka), UB (ubikvitinace) (Upraveno podle Ki et al., 2015).

Mimo tuto primární TTFL je v systému oscilace zapojena ještě sekundární a terciální TTFL. Sekundární TTFL zahrnuje dvě podrodiny jaderných receptorů spřažených s kyselinovou retinovou, a to ROR a REV-ERB. Jedná se o kritické regulátory CR, které regulují cirkadiánní expresi *bmal1* a fungují jako ligandem regulované transkripční faktory (Solt et al., 2011a). Mezi členy ROR jaderných receptorů patří RORα, RORβ a RORγ. Všechny ROR receptory mají funkci aktivátorů. Rozpoznávají specifické sekvence DNA označované jako ROR responzivní element (RORE), na které se váží ve formě monomeru, čímž dochází k aktivaci transkripce cílových genů, tedy i *bmal1* (Solt a Burris, 2012). Přírodními ligandy ROR jsou kyselina retinová a steroly, především oxysteroly (Solt a Burris, 2012). Druhou skupinou jaderných receptorů jsou REV-ERB (REV-ERBα a REV-ERBβ), které zastávají opačnou roli. REV-ERB se vážou rovněž na RORE jednak ve formě monomeru, kdy fungují jako transkripční tlumiče či častěji ve formě homodimeru (stabilnější forma), čímž dochází k úplnému potlačení transkripce cílových genů (Kojetin a Burris, 2014). Jsou také schopny interagovat s dalšími jadernými

proteiny jako je například NCoR1 (nukleární receptorový korepresor 1). Hlavním přirozeným ligandem pro REV-ERB $\alpha/\beta$  je hem. Kromě řízení exprese *bmal1* se tyto jaderné receptory uplatňují především v regulaci metabolismu sacharidů a lipidů (Boukhtouche et al., 2004).

Terciální TTFL je tvořena základními helix-loop-helix transkripčními faktory DEC (DEC1, DEC2), které slouží jako transkripční represory komplexu CLOCK:BMAL1 (Obrázek 6). DEC1/2 vytvářejí homo- či heterodimery a k potlačení transkripce dochází kompeticí při vazbě na E-box v promotorech cílových genů nebo k přímé interakci s BMAL1 (Kawamoto et al., 2004).

Kromě E-box elementů (CLOCK, BMAL1) a RORE elementů (ROR, REV-ERB) formují regulační síť rytmické genové exprese také D-box elementy. Ty jsou rozpoznávány transkripčními faktory s leucinovým zipem (proline and acidic-rich (PAR) leucine zipper protein family), v podobě aktivátoru DBP (albumin side D-binding protein) a represoru NFIL3 (Nuclear factor Interleukin 3 regulated, známým také jako E4 binding protein 4, E4BP4) (Keniry et al., 2014). Transkripce DBP je aktivována komplexem CLOCK:BMAL1. DBP se následně váže v jádře na regulační D-box sekvence (TTAYGTAA) (Ueda et al., 2005) v promotorech genů a aktivuje jejich transkripci. Rytmická exprese DBP potom odpovídá mimo jiné za regulaci amplitudy *per1* transkriptu (Yamaguchi et al., 2000). Na druhé straně stojí NFIL3 (E4BP4), jehož transkripce je regulována prostřednictvím ROR/REV-ERB a dosahuje opačného maxima akumulace než DBP. NFIL3 se váže na D-box kompetitivně s DBP a funguje jako represor transkripce (Keniry et al., 2014). Transkripce D-box proteinů má významný vliv také na fyziologii. DBP například aktivuje v játrech transkripci genů kódujících albumin, cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylázu nebo cytochrom P450 (CYP2C6) (Falvey et al., 1996). NFIL3 inhibuje apoptózu B-lymfocytů a motorických neuronů (Ikushima et al., 1997), zároveň je vyžadován pro přirozený vývoj NK buněk (Gascoyne et al., 2009) a switching (izotypová komutace) IgE imunoglobulinů (Kashiwada et al., 2010). NFIL3 také mění chování rakovinných buněk a funkci FOXO transkripčních faktorů působením na chromatin (Keniry et al., 2013) a je potřebný pro glukokortikoidy indukovanou apoptózu T-lymfocytů (Carey et al., 2013).

## 2.2 Patofyziologie cirkadiánních rytmů

Jak je již uvedeno výše, správné fungování CR je esenciální pro správné fungování a prospívání lidského organismu. Nesoulad vnitřních časových systémů zahrnující centrální SCN i periferní hodiny ve tkáních a orgánech s vnějším prostředím může přispívat k rozvoji celé škály onemocnění, jako jsou spánkové poruchy (Zhu a Zee, 2012), metabolické a gastrointestinální poruchy (diabetes mellitus druhého typu, obezita, hypertenze, zácpa, průjem, metabolický syndrom, poruchy glukózové tolerance, hyperinzulinémie), psychické poruchy (časté změny nálad, zimní deprese), poruchy imunitního systému (především ovlivnění vrozené imunity), či rozvoj nádorového onemocnění (rakovina prsu, rakovina prostaty, kolorektální karcinom) (He a Chen, 2016).

Cirkadiánní systém jako součást fyziologie se podílí v průběhu 24 hodin na modulaci genové exprese, metabolismu, imunity (funkce monocytů a makrofágů, sekrece specifických cytokinů) (Labrecque a Cermakian, 2015), endokrinního systému, chování a spánkového cyklu. Základem homeostázy je existence vztahového trojúhelníku mezi vnitřními hodinami, spánkem a chováním (Clock-sleep-behaviour), kde naše chování ovlivňuje časový systém prostřednictvím expozice světlu (přes SCN) a konzumace jídla (skrze ledviny). Deregulace cirkadiánního systému může být způsobena například často se měnícím vícesměnným pracovním provozem, špatnými návyky, dysfunkcí časových hodin či přeletem přes více časových pásem (Roenneberg a Merrow, 2016).

### 2.2.1 Spánkové poruchy

Poruchy spánkového cyklu (CRSD-Circadian Rhythm Sleep Disorders) patří mezi nejčastější poruchy způsobené poruchou cirkadiánního rytmu. Sdílejí společný chronofyziologický základ a vznikají z chronické nebo opakující se poruchy cyklu bdění a spánku, která je způsobena dysfunkcí cirkadiánních hodin nebo nesouladem s endogenními faktory (Zhu a Zee, 2012). Hlavním rysem CRSD je přetrvávající nebo opakující se nesoulad mezi spánkovým vzorem pacienta a vzorem, který je považován za společenskou normu (Thorpy, 2012). Diagnóza jednotlivých CRSD je časově náročná, založena na detailním zkoumání spánkového deníku pacienta, vedeného minimálně po dobu 7 dnů a zároveň dochází k využití aktinografie, která zaznamenává a měří pohyby pacienta v průběhu spánku. Doplňující je také stanovení markerů fyziologického cirkadiánního systému, jako je tělesná teplota či hladiny melatoninu (Zhu a Zee, 2012). Následná terapie CRSD je založena především na expozici světla v různých denních hodinách v závislosti na onemocnění a podávání melatoninu. Dále je doporučována doplňující fyzická či sociální aktivita, která člověka v průběhu dne udrží více soustředěného a v bdělém stavu. Seznam spánkových poruch shrnut v tabulce (Tabulka 1) a nebude více rozebírán. Práce se zaměřuje především na poruchu v podobě pásmové nemoci, na kterou mohou být aplikovány syntetizované látky.

**Tabulka 1: Poruchy spánkového cyklu a jejich charakterizace**

| Zkratka             | Název   | Projevy  | Příčiny vzniku   |
|---------------------|---|--|--|
| <b>DSPD</b>         | Zpožděná fáze spánku (Delayed Sleep-Wake Phase Disorder)                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronická neschopnost usnout</li> <li>• Nadměrná denní spavost</li> <li>• Úzkosti, deprese, rozvoj psychických problémů (Zee a Vitiello, 2009, Zhu a Zee, 2012)</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Světelné záření v nevhodnou denní dobu</li> <li>• Nedostatečná expozice rannímu světlu</li> <li>• Genetický faktor (mutace genu <i>per3</i>) (Hida et al., 2014)</li> </ul> |
| <b>ASPD (FASPS)</b> | Předběhnutá fáze spánku ((Familial) Advanced Sleep Phase Disorder)        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Příchod spánku v brzkou dobu</li> <li>• Chronické potíže zůstat déle vzhůru (Zee a Vitiello, 2009, Zhu a Zee, 2012)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetický faktor (mutace S662G genu <i>per2</i> a CK1ε) (Xu et al., 2005)</li> </ul>  |
| <b>ISWRD</b>        | Nepravidelný rytmus spánku a bdění (Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Časová dezorganizace cirkadiálního cyklu spánku a bdění</li> <li>• Střídání krátkých fází spánku a bdění během 24 hodin</li> <li>• Potíže udržet spánek v noci, denní spavost (Hartley et al., 2018)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stárnutí</li> <li>• Traumatická poškození mozku</li> <li>• Neurodegenerativní choroby (Alzheimerova choroba) (Zee a Vitiello, 2009)</li> </ul>                              |
| <b>N24SWD</b>       | Volně běžící rytmus (Non 24-hour Sleep-Wake Rhythm Disorder)              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronické nebo opakované střídání období spánku a bdění</li> <li>• Existence předvídatelného driftu spánku</li> <li>• Z velké části nevidomé osoby (absence vnímání světla) (Hartley et al., 2018)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Snížená odezva cirkadiálních hodin na světlo</li> <li>• Snížení sociálních podnětů</li> <li>• Mutace v genu pro CK1 ε (Zhu a Zee, 2012)</li> </ul>                          |
| <b>SWSD</b>         | Porucha spánku a bdění při směnném provozu (Shift Work sleep Disorder)    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronická nespavost během noci</li> <li>• Denní spavost (Zhu a Zee, 2012)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Noční a časné ranní směny</li> <li>• Přídavné spánkové poruchy (apnoe, narkolepsie) (Zhu a Zee, 2012)</li> </ul>  |

## 2.2.2 Pásmová nemoc

Jet-lag, česky označován jako pásmová nemoc, je letová arytmie, která postihuje pasažéry překonávající více časových pásem najednou. Dochází k desynchronizaci vnitřního CR a cyklu střídání dne a noci vzhledem k destinaci, do které pasažér dorazí (Vosko et al., 2010). V průběhu trvání pásmové nemoci dochází ke změnám v cirkadiálních neuroendokrinních systémech, zahrnující především změny hladin melatoninu, kortizolu a thyreostimulačního hormonu. Mezi nejčastější symptomy patří únava, nespavost, časté buzení, pocit podrážděnosti, vyčerpanost, žaludeční obtíže, zácpa, průjem, pálení žáhy, pocení, bolesti svalů, bolesti hlavy či u žen narušení menstruačního cyklu (Cingi et al., 2018). Následná rekonvalescence se odvíjí orientačně podle přeletěných časových pásem, kdy počet těchto pásem poté odpovídá přibližně počtům dnů rekonvalescence (1-2 pásma za den). Cestování na východ vyvolává fázový posun

směrem dopředu v CR těla, zatímco cestování na západ vytváří efekt opačný a vyvolává zpoždění fáze (Cingi et al., 2018). Cestující na východ mají tendenci synchronizovat své tělesné rytmy rychlostí 1,5 hodiny denně a cestující na západ rychlostí 1 hodiny denně. Přičemž nehraje roli, zda let do cílové destinace probíhá ve dne či v noci (Katz et al., 2002).

Pásmová nemoc působí na každého cestovatele velmi individuálně, a ne každý zažívá stejné symptomy ve stejné míře. Schopnosti snášet pásmovou nemoc jsou pravděpodobně výsledkem individuálních tolerancí každého jedince na posuny svého CR. Starší osoby a lidé s pravidelnými režimy mají menší toleranci na výkyvy svých rytmů a jejich zotavení může trvat o něco déle (Vosko et al., 2010). Pásmová nemoc rovněž může zhoršit příznaky některých psychických onemocnění (Katz et al., 2002).

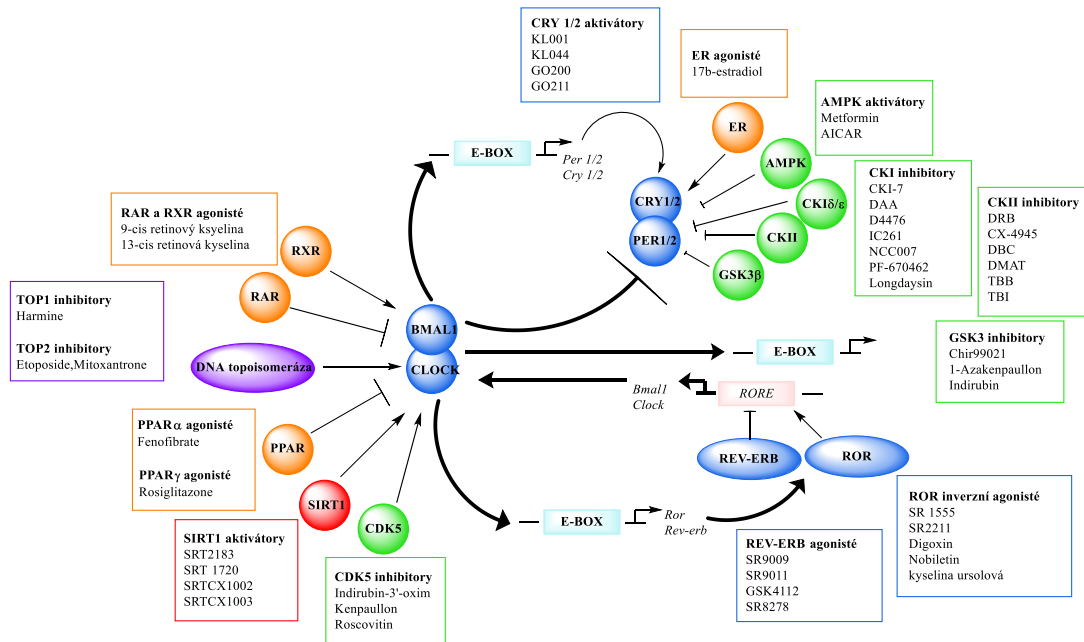
Kromě „klasického“ jet-lagu, způsobeného přeletem přes více časových pásem je popsán také sociální jet-lag. Sociální jet-lag je formou dysfunkce CR způsobený moderními společenskými a pracovními návyky a režimy. Vlivem pracovní doby je člověk nucen vstávat dříve, než je pro něj přirozené a spánkový deficit se snaží vykompenzovat delší dobou spánku o víkend. Tím dochází k desynchronizaci mezi vnitřními hodinami jednotlivce a dobou spánku (Wong et al., 2015). Ačkoliv sociální jet-lag zatěžuje nejvíce populaci v době dospívání, obvykle pokračuje po celou dobu aktivního pracovního života až do důchodu se symptomy podobnými klasickému jet-lagu (Roenneberg et al., 2012).

### **2.3 Modulátory cirkadiálních rytmů**

Kromě přirozené regulace hodin světlem a střídáním dne a noci mohou být CR při dysfunkci systému ovlivněny také uměle pomocí farmakologických i nefarmakologických postupů. Pomocí modulátorů je možné ovlivnit různé parametry rytmu. Základní nefarmakologickou metodou modulace je využití světelné terapie, která spočívá v ozařování pacienta světlem složeného z celého spektra nebo izolovaným modrým světlem nejčastěji o intenzitě 2000-2500 lux většinou v časných ranních hodinách (Zhu et al., 2012). Světelná terapie je užívána především k terapii CRSB, depresí, Alzheimerovy choroby či insomnie (Berson et al., 2002, Cajochen, 2007). Světelná terapie je často preferována kvůli dostupnosti, přirozenosti, nízké ceně a především skutečnosti, že nevede k reziduálním účinkům a toleranci, jako tomu bývá při užívání farmak. Mezi nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, únavy očí, autonomní hyperaktivita či hypománie (van Maanen et al., 2016).

Existuje celá řada přirozených endogenních molekul, účastnících se modulace cirkadiálních hodin, jako je například fibroblastový růstový faktor, epidermální růstový faktor, inzulín, hem, melatonin, cAMP či dopamin. Tato kapitola je ovšem zaměřena především na syntetické nízkomolekulární látky mající schopnost manipulovat s cirkadiálním načasováním. Řada takových modulátorů byla objevena prostřednictvím screeningu knihoven látek

na cirkadiálních reportérových buněčných liniích (Tamai, et al., 2018). Informace o dosud identifikovaných modulátorech cirkadiálních rytmů byly přehledně shrnuty v několika review (He a Chen, 2016, Tamai et al., 2018, Cha et al., 2019). Na základě příslušných molekulárních cílů můžeme tyto modulátory rozdělit do několika skupin: na modulátory proteinů hodinového jádra (BMAL1, CLOCK, CRY1/2, PER1/2, REV-ERB, ROR), regulačních kináz (CDK5, CKI/II, AMPK, GSK3), SIRT1, ostatních jaderných receptorů (RXR, RAR, PPAR, ER) a DNA topoizomeráz (TOP I/II) (Obrázek 7).

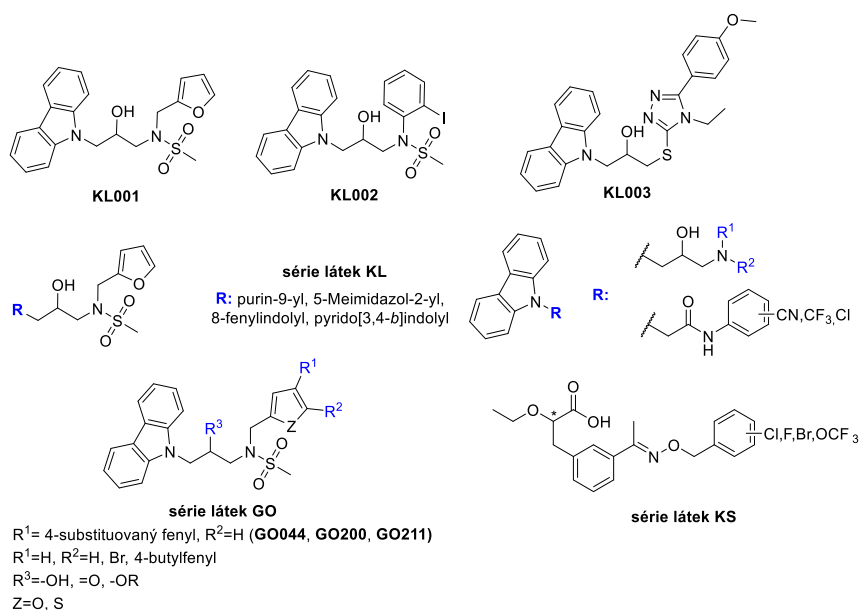


**Obrázek 7: Model jednotlivých TTFL společně se zástupci jejich klíčových modulátorů.** Modře proteiny hodinového jádra, zeleně regulační kinázy, oranžově ostatní jaderné receptory, červeně SIRT1 modulátory, fialově DNA topoizomerázy. Základní komponenty TTFL představují CLOCK:BMAL1, PER:CRY a ROR/REV-ERV, jejichž modulací dochází ke změnám cirkadiální amplitudy, fáze a periody. AMPK (5'AMP-aktivovaná proteinkináza), AR (androgenní receptory), CDK5 (cyklindependentní kináza 5), CKI kaseinkináza 1), CKII (kaseinkináza 2), CRY1/2 (krytochrom 1/2), GSK3 (glykogensyntázakináza 3), PPAR (receptory aktivované peroxizomovými proliferátory), RAR (receptory kyseliny retinové), REV-ERB (retinoic acid-related orphan receptor), ROR (retinoic acid-related orphan receptor), RXR (retinoid X receptory), SIRT 1(silent information regulator 1) (He a Chen, 2016).

### 2.3.1 Modulátory základních komponent cirkadiánních rytmů

#### 2.3.1.1 Modulátory CRY 1/2

Jak bylo zmíněno výše, CRY 1/2 vytváří spolu s PER1/2 heterodimerní komplex regulující transkripční aktivitu komplexu CLOCK:BMAL1. První skupinu modulátorů CRY1/2 představují deriváty karbazolu KL001, KL002, KL003 (Obrázek 8), které byly objeveny při screeningu látek na U2OS BMAL1-LUC reportérové buněčné linii (Hirota et al., 2012). Bylo prokázáno, že KL001 se váže do vazebného místa FAD kofaktoru CRY, brání vazbě ubikvitinligázy FBXL3 a následné ubikvitinaci a proteasomální degradaci CRY. Výsledkem bylo prodloužení cirkadiánní periody a snížení amplitudy (Hirota et al., 2012). Následná série KL derivátů ukázala, že karbazolový kruh je nezbytným strukturním motivem, neboť jeho náhrada jinými dusíkatými heterocykly vedla ke snížení nebo ztrátě biologické aktivity. Naopak vyšší aktivita byla zaznamenána u derivátů karbazolu s acetamidovým linkerem (Lee et al., 2015). V rámci dalších modifikací „lead compound“ KL001 byla připravena série látek s označením GO (Oshima et al., 2015). SAR studie ukázala, že hydroxyskupina je důležitá, ale není kritická pro zachování biologické aktivity, neboť keto či alkoxy analoga nadále prodlužovala cirkadiánní periodu. Také thiofenová analoga se substitucí v poloze C5 prodlužovala cirkadiánní periodu a dokonce vykazovala vyšší biologickou aktivitu než výchozí KL001 ( $\tau + 2,1$  h), zejména pak C5-bromderivát ( $\tau + 2,6$  h). Substituce thiofenu v pozici C4 4-butylfenylem nebo 4-hydroxyfenylem s chráněnou OH skupinou methoxymethylem nebo TBDMS vedla překvapivě ke zkrácení periody o 0,4; 0,7, respektive 0,6 h. Derivát s 4-methoxyfenylem však periodu opět mírně prodlužoval ( $\tau + 0,5$  h).

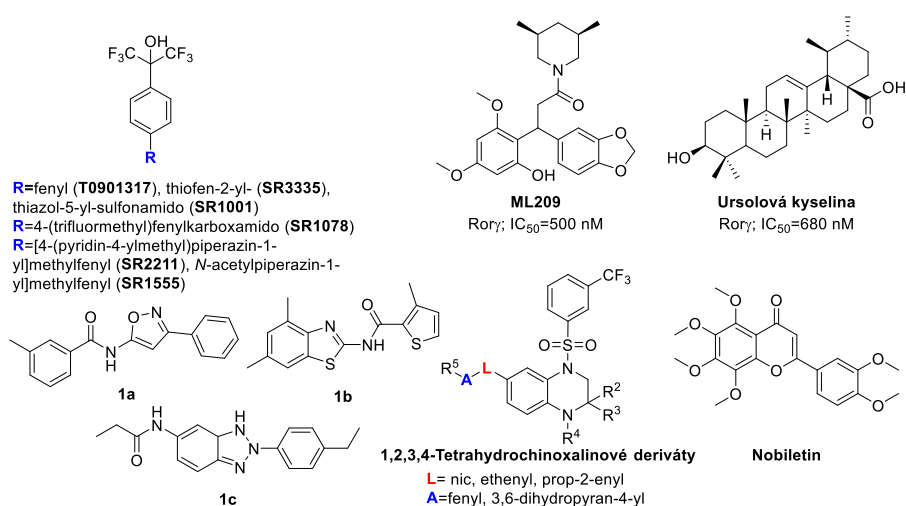


Obrázek 8: Modulátory CRY1/2.

Strukturně odlišnými modulatory CRY s jiným mechanismem účinku jsou deriváty 2-ethoxypropanové kyseliny (Chun et al., 2014). Látky obsahují chirální uhlík na pozici C2 a vliv na transkripci v E-box-Luc reportérové linii vykazovaly pouze (*R*)-stereoisomery, nejvíce z nich 4-bromderivát (KS15). Bylo prokázáno, že KS15 se váže na C-terminální konec CRY1 a CRY2, inhibuje účinky negativních regulátorů v primární TTFL, a díky tomu byla zachována transkripční aktivita komplexu CLOCK:BMAL1. Testování na BMAL1-LUC reportérové linii ukázalo, že KS15 tlumí cirkadiánní oscilace (mění výšku amplitudy), aniž by výrazně ovlivňovala periodu (Cha et al., 2019).

### 2.3.1.2 Modulatory ROR receptorů

Rodina ROR receptorů se skládá z ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  a ROR $\gamma$ . Do ovlivnění cirkadiánních rytmů jsou zapojeny ROR $\alpha$  a ROR $\gamma$ , které aktivují transkripci *bmal1* prostřednictvím vazby na RORE elementy protomoru. Mezi přirozené ligandy ROR receptorů patří cholesterol a jeho metabolity a oxysteroly, které mají vysokou afinitu a váží se přímo do ROR $\alpha/\gamma$  (Cha et al., 2019). Mezi inverzní agonisty ROR patří deriváty 2-fenyl-1,1,1,3,3,3-hexafluorpropan-2-olu se sulfonamidovým T0901317 (Kumar et al., 2010), SR1555 (Solt et al., 2011b), SR3335, SR1001 (Kumar et al., 2011), SR2211 s piperazinovým strukturním motivem (Kumar et al., 2012), ML209 (Huang et al., 2010) nebo přírodní látky digoxin a kyselina ursolová (Kojetin a Burris, 2014) (Obrázek 9). Tyto sloučeniny potlačují ROR $\alpha/\gamma$  dependentní transaktivaci cílových genů a inhibují tak transkripci *bmal1*. Naopak agonisty a aktivátory ROR jsou například SR1078 (Wang et al., 2010), arylamidové deriváty 1a-c (Zhang et al., 2012), 1,2,3,4-tetrahydrochinoxalínové deriváty (Zhang et al., 2012) nebo přírodní polymethoxylovaný flavon Nobiletin (He et al., 2016).

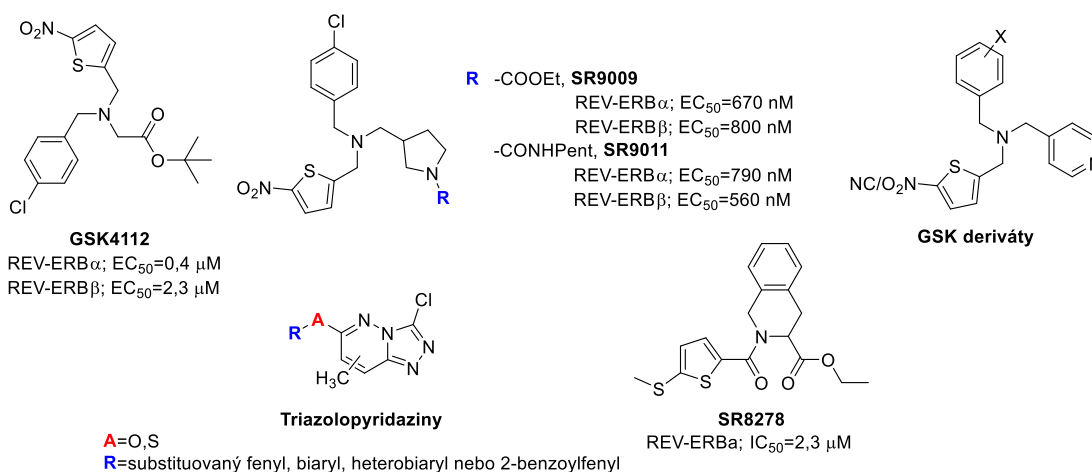


Obrázek 9: Modulatory ROR.



### 2.3.1.3 Modulátory REV-ERB receptorů

Rodinu jaderných receptorů REV-ERB tvoří REV-ERB $\alpha$  (NR1D1) a REV-ERB $\beta$  (NR1D2), což jsou hemem aktivované transkripční represory, které potlačují transkripci *bmal1* vazbou na RORE element promotoru (Kojetin a Burris, 2014). Prvním popsáním agonistou REV-ERB $\alpha$  byl GSK4112 (Obrázek 10), který výrazně a specificky zvyšoval interakci REV-ERB $\alpha$  s NCoR1 a silně tak potlačoval expresi BMAL1. Jeho aplikace na reportérové buněčné linie, primární plicní fibroblasty a ektopické plicní řezy s PER2::LUC reportérem v různých fázích cirkadiánní oscilace vedla k resetování fáze cyklu, způsobených posuny fáze v obou směrech bez ovlivnění periody rytmu (Meng et al., 2008). Modifikace „lead compound“ GSK4112 vedla k látkám s lepšími farmakologickými vlastnostmi SR9009 a SR9011 (Solt et al., 2012) nebo vybraným GSK derivátům (Trump et al., 2013). Další skupinu REV-ERB agonistů představují 6-substituované triazolopyridaziny (Bourotte et al., 2020). Jediným dosud identifikovaným antagonistou REV-ERB receptorů je SR8278, který inhibuje REV-ERB $\alpha$  (IC<sub>50</sub> = 2,3  $\mu$ M) a zvyšuje expresi REV-ERB $\alpha$  cílových genů (Kojetin et al., 2011).



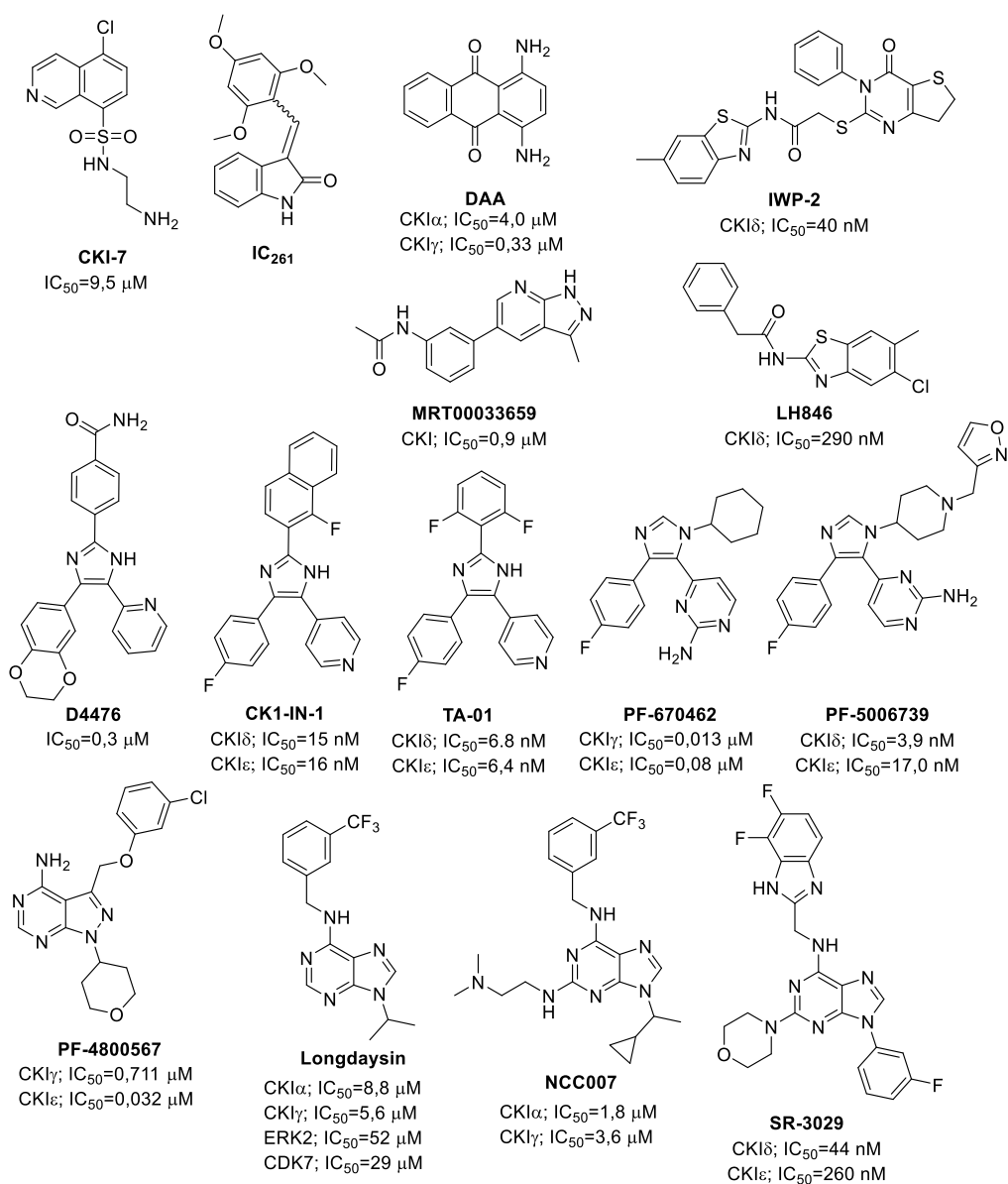
Obrázek 10: Modulátory REV-ERB.

### 2.3.1.4 Modulátory proteinkináz

Proteinkinázy představují skupinu enzymů, které přenášejí fosfátovou skupinu z vysokoenergetické molekuly ATP na vybraná aminokyselinová residua (Ser/Thr, Tyr, His/Asp) cílového proteinu. Fosforylace představuje jednu z hlavních posttranslačních modifikací proteinů a v rámci cirkadiánního rytmu reguluje degradaci, tvorbu komplexů, subcelulární lokalizaci a aktivitu klíčových komponent cirkadiánních oscilací (Reischl a Kramer, 2011).

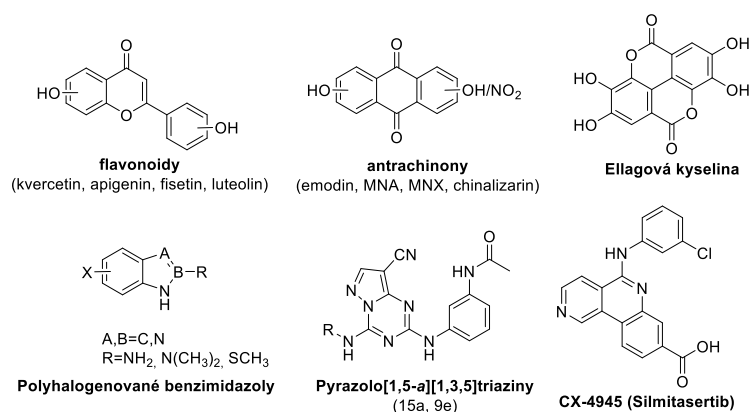
Kaseinkináza 1 (CKI, CSNK1) je monomerní konstitutivně aktivní Ser/Thr proteinkináza. V genomu savců je 7 genů kódujících isoformy CKI ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), přičemž regulace cirkadiánního rytmu se účastní pouze isoformy  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Reischl a Kramer, 2011). Substráty CKI  $\delta/\epsilon$  jsou PER1, PER2, BMAL a CRY (Camacho et al., 2001, Eide et al., 2002)

proteiny a jejich inhibicí dochází k prodloužení periody (Isojima et al., 2009). Inhibitory CKI představují strukturně velmi pestrou paletu látek (Obrázek 11) a byly objeveny buď přímo ve spojitosti s cirkadiánním rytmem (např. CKI-7, IC<sub>261</sub>, D4476, PF-670462, LH846 nebo Longdaysin) nebo byla CKI identifikována jako off-target při studiu jiných molekulárních cílů. Strukturním základem těchto inhibitorů může být chinolin jako v případě CKI-7 (Qiao et al., 2019), 2-oxindol IC<sub>261</sub> (Mashhoon et al., 2000), trisubstituovaný imidazol – D4476 (Hirota et al., 2008) nebo PF-670462 (Walton et al., 2009) nebo purin - Longdaysin (Hirota et al., 2010) nebo NCC007 (Lee et al., 2019.)



Obrázek 11. Vybrané inhibitory kaseinkinázy 1.

Kaseinkináza 2 (CKII, CSNK2) je Ser/Thr proteinkináza, která ovlivňuje cirkadiánní systém fosforylací BMAL1 a PER2 proteinů. Fosforylace Ser90 na BMAL1 prostřednictvím CKII stimuluje jeho translokaci do jádra a mutace tohoto residua vede ke ztrátě cirkadiánní rytmicity (Tamaru et al., 2009). Dvě publikace ukazují, že PER2 je také molekulárním cílem CKII a jejím působením dochází k fosforylaci Ser residuí v N-terminální části PER2. V důsledcích fosforylace na stabilitu PER2 se však liší (Tsuchiya et al., 2009). Aktivita CKII je inhibována některými přírodními sloučeninami – flavonoidy (kvercetin, apigenin nebo fisetin), antrachinony (Emodin a jeho deriváty MNX a MNA) nebo kumariny (např. ellagová kyselina) (Sarno et al., 2011). Ze syntetických látek jsou to především polyhalogenované deriváty benzimidazolu (Andrzejewska et al., 2003, Pagano et al., 2004) nebo pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triaziny (Nie et al., 2008). Zatím jediným inhibítorem CKII v klinickém testování je CX-4945, neboli Silmitasertib, s benzo[*c*][2,6]naftyridinovým skeletem (Clinicaltrial.gov).

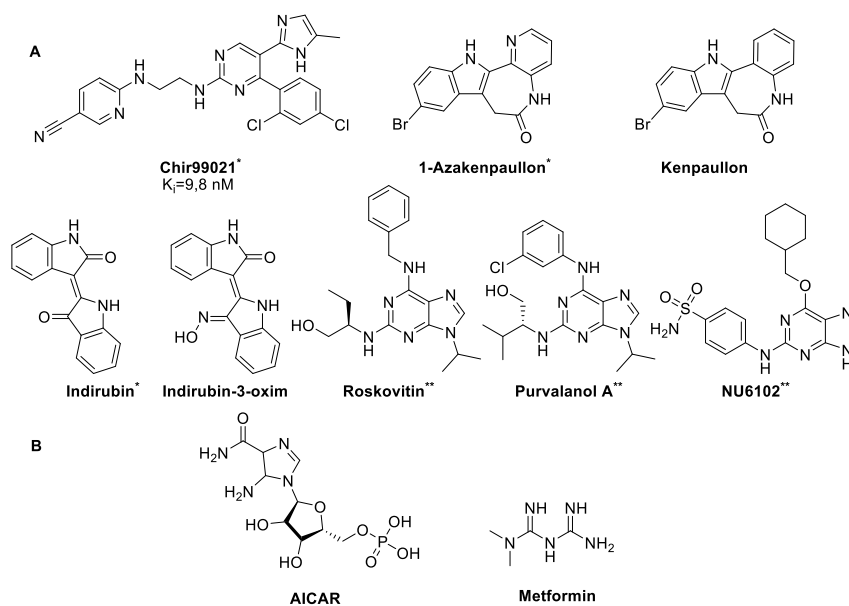


**Obrázek 11: Inhibitory kaseinkinázy 2.**

Dalšími kinázami zapojenými do regulace CR jsou glykogensyntázakináza 3 (GSK3) a 5'AMP-aktivovaná kináza (AMPK), které fosforylují a destabilizují hodinové proteiny CLOCK, PER, REV-ERB $\alpha$  a CRY (Reischl a Kramer, 2011). Specifickými inhibitory GSK3 (GSK3 $\beta$ ) jsou Chir99021 (Ring et al., 2003), 1-azakenpaullon (Kunick et al., 2004) a indirubin (Obrázek 12). Mezi nejznámější aktivátory AMPK patří AICAR (5-aminoimidazole-4-karboxamid-1- $\beta$ -*D*-ribofuranosid), který snižuje amplitudu oscilací a prodlužuje periodu cirkadiánního rytmu (Lamia et al., 2009), a metformin, který je používán pro léčbu cukrovky 2. typu, neboť snižuje jaterní produkci glukózy a zlepšuje glykémii, aniž by stimuloval sekreci inzulínu (Mosenzon et al., 2021). Metformin aktivuje AMPK a zároveň také jaterní CKI $\alpha$  a svalovou CKI $\epsilon$ . Tím dochází k fázovému posunu genové exprese v játrech a zpoždění ve svalích (Barnea et al., 2012).

Další proteinkinázou, jejíž substrátem je jedna z klíčových komponent cirkadiánního rytmu, je cyklin-dependentní kináza 5 (CDK5), která fosforyluje CLOCK na reziduích Thr-451 a Thr-461 (Kwak et al., 2013). Fosforylace CLOCK proteinu vede k aktivaci transkripce díky

změnám v jeho stabilitě a subcelulární distribuci. Screening více než 1200 farmakologicky aktivních látek na cirkadiánní BMAL1-LUC reportérové linii odhalil 11 látek, které v koncentrační závislosti modulovaly periodu CR (Hirota et al., 2008). Mezi těmito látkami byly inhibitory/aktivátory proteinkináz, inhibitory polymerace mikrotubulů, inhibitory vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů nebo induktory DNA poškození. Indirubin-3'-oxim a Kenpaullon, inhibitory CDK a GSK3 (Obrázek 12) zkracovaly periodu cyklu, zatímco Roskovitin (inhibitor CDK) ji prodlužoval. Následné testování GSK3 specifických inhibitorů (Chir99021, 1-Azakenpaullonu) a umlčování *GSK-3 $\beta$*  pomocí siRNA ukázalo, že inhibice GSK3 $\beta$  vede k fenotypu se zkrácenou periodou. Aplikace CDK specifických inhibitory Purvalanolu A a NU6102 periodu CR spíše prodlužovaly (Hirota et al., 2008).



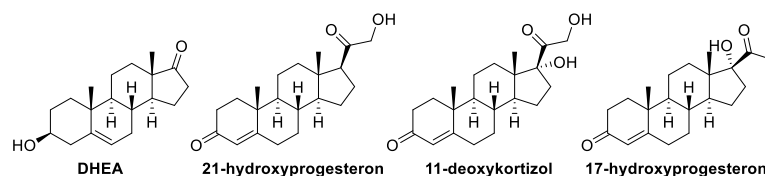
**Obrázek 12: Modulátory dalších kináz. A/ inhibitory GSK3 a CDK.\* - GSK3 specifické inhibitory, \*\* - CDK specifické inhibitory. B/ aktivátory AMPK.**

### 2.3.1.5 Modulátory jaderných receptorů

Jaderné receptory hrají v regulaci cirkadiánních hodin klíčovou funkci. Kromě ROR a REV-ERB receptorů stabilizační smyčky centrálního oscilátoru jsou přítomny také glukokortikoidový receptor (GR), androgenní receptory (AR), receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPAR), receptory kyseliny retinové (RAR) a retinoid X receptory (RXR), které se účastní regulace prostřednictvím implikace svých ligandů, jako modulátorů cirkadiánního systému.

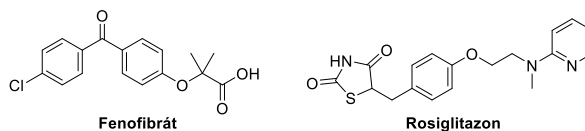
Androgenní receptor se řadí do skupiny steroidních receptorů, které zahrnují dále receptory estrogenní, progesteronové, glukokortikoidové, mineralokortikoidové a receptory vitamínu D (Brinkmann et al., 1989). Základním modulátorem AR je dehydroepiandrosteron (DHEA /prasteron) (Obrázek 13). DHEA je metabolitem androgenního 17-ketosteroidu androsteronu a jedná se o jeden z nejvíce zastoupených cirkulujících steroidních hormonů

v lidském těle. Je produkovaný v nadledvinách, pohlavních orgánech a mozku a slouží jako prekurzor testosteronu a estrogenů (estradiolu nebo estronu) Tamai a kol. ukázali, že dietární podávání DHEA vede u myši k výraznému zkrácení periody cirkadiálního rytmu a urychluje přechod do následujícího cirkadiálního cyklu, čímž redukoval u myši navozený jet-lag (Tamai et al., 2018). Opačný efekt byl pozorován při podávání velmi vysokých dávek DHEA, kdy došlo naopak k prodloužení cirkadiálního periody a snížení amplitudy (Rey et al., 2016). Dalšími potencionálními modulátory jsou deoxykortikosteron (21-hydroxyprogesteron), 11-deoxykortizol a 17-hydroxyprogesteron, u kterých bylo pozorováno prodloužení cirkadiální periody (Tamai et al., 2018).



**Obrázek 13: Modulátory androgenních receptorů.**

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR $\alpha$ - $\gamma$ ) jsou skupinou jaderných receptorů, které fungují jako transkripční faktory regulující genovou expresi (Michalik et al., 2006). PPAR hrají významnou roli v regulaci buněčné diferenciaci, vývoji a metabolismu (Kersten et al., 2000). PPAR $\alpha$  se podílí na udržování cirkadiálních oscilací v játrech, neboť je přímým regulátorem exprese *bmal1* vazbou na PPAR $\alpha$  response element (PPRE) umístěným na *bmal1* promotoru (Canaple et al., 2006). Bylo ukázáno, že Fenofibrát (Obrázek 14), syntetický agonista PPAR, je schopen dočasně indukovat rytmickou expresi *bmal1* a dalších hodinových genů *cry1* a *rev-erb $\alpha$* . Zároveň je však BMAL1 nadřazeným regulátorem exprese PPAR $\alpha$ . Tím vzniká nová regulační dráha cirkadiálního systému, v níž některé transkripční faktory mohou v rámci periferních oscilátorů plnit specifickou roli. V následné studii bylo ukázáno, že na expresi *bmal1* a regulaci kardiovaskulárního rytmu se podílí PPAR $\gamma$  a rosiglitazon aktivátor PPAR $\gamma$  (Wang et al., 2008).

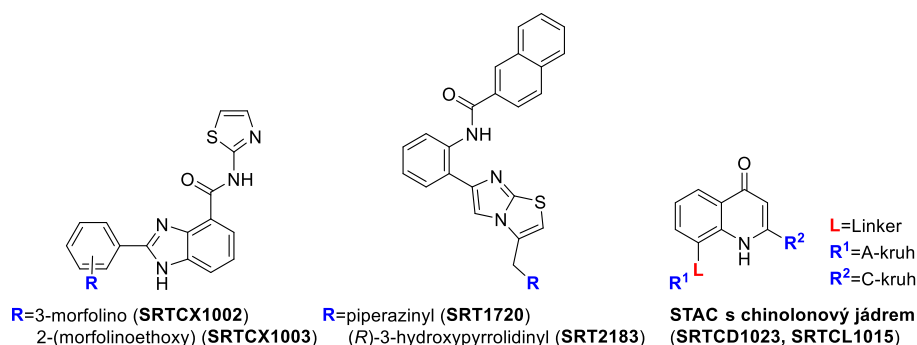


**Obrázek 14: Modulátory PPAR receptorů.**

### 2.3.1.6 Modulátory dalších molekulárních cílů

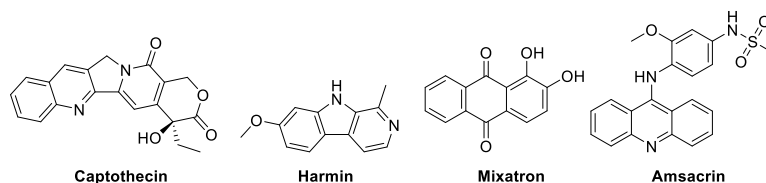
Silent information regulator 1 (SIRT1, Sirtuin 1) je NAD-dependentní deacetyláza, která je lokalizována primárně v buněčném jádře a odstraňuje acetylové zbytky proteinů nehistonové povahy (Pillarsetti, 2008). SIRT asociuje s CLOCK a je přijímán do CLOCK:BMAL1 chromatinového komplexu u cirkadiálních promotorů. Jeho vazbou dochází k potlačení

cirkadiální transkripce (Belden a Dunlap, 2008). Bylo popsáno několik SIRT1 aktivátorů (STAC). Jedná se o zástupce benzimidazolových sloučenin (SRTCX1002, SRTCX1003), chinolových sloučenin (SRTCD1023, SRTCL1015) a SRT2183 a SRT1720 (Yang et al., 2012) (Obrázek 15), které snižují expresi cirkadiálních genů, a které také snižují amplitudu a prodlužují oscilaci (Bellet et al., 2013). Vyšší účinnost vykazují jeho deriváty SRT1460 a SRT2183 (Wood et al., 2004).



**Obrázek 15: Modulátory SIRT1.**

DNA topoizomerázy jsou enzymy měnící terciální strukturu DNA (nadšroubovicové vinutí). Jsou klíčovými enzymy pro replikaci DNA, transkripci, rekombinaci a remodeling chromatinu (Champoux, 2001). Potlačují transkripci *bmal1* vazbou na střední oblast mezi dvěma RORE elementy v promotoru. Inhibitory TOP1 jsou Camptothecin a Harmin. Camptothecin potlačuje vazbu TOP a dochází tak ke zlepšení *bmal1* transkripce a prodloužení cirkadiální periody (Onishi a Kawano, 2012). Harmin prodlužuje cirkadiální periodu zvýšením transaktivační funkce ROR $\alpha$  (Kondoh et al., 2014). Inhibitory TOP2 Etoposid, Mítosantron a Amsacrin indukují poškození DNA a cirkadiální periodu zkracují (Hirota et al., 2008).

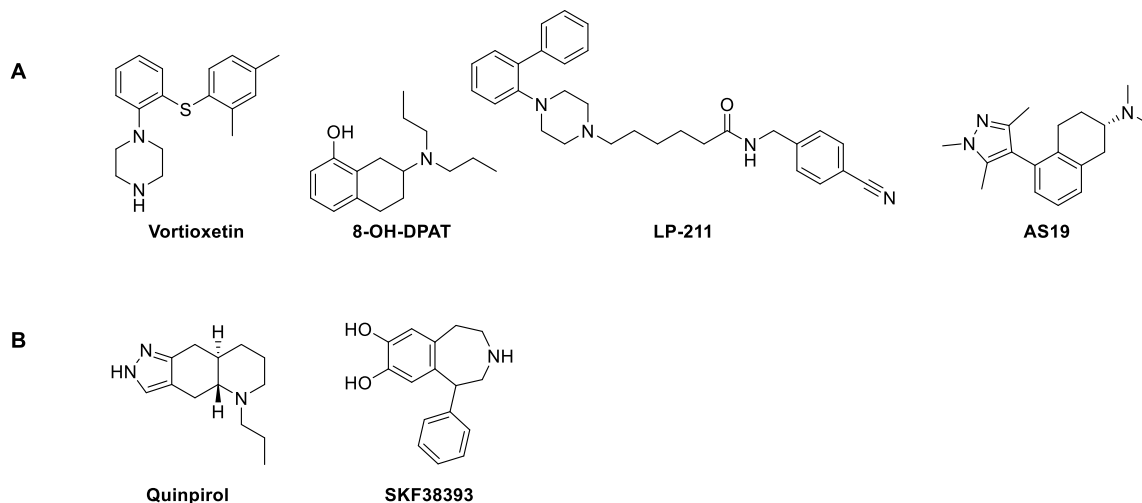


**Obrázek 16: Vybrané modulátory TOP.**

### 2.3.2 Regulace cirkadiálního rytmu pomocí sekundárních molekulárních cílů

V rámci patentové ochrany látek existuje celá řada modulátorů, které upravují cirkadiální oscilace, ale zároveň neinteragují s hlavními komponenty TTFL. Významným cílem je serotoninový receptor 7 (5-HT<sub>7</sub>), který je spřažen s Gs proteiny a stimuluje produkci cAMP aktivací adenylátcyklázy. Hraje důležitou roli v regulaci cirkadiálního rytmu, spánku, nálady a kognitivních funkcí (Liu et al., 2021). Ovlivňuje světelnou i nesvětelnou regulaci CR změnou citlivosti na světlo, nebo modulací uvolňování serotoninu (Shelton et al., 2015).

Příkladem inhibitoru 5-HT<sub>7</sub> je antidepressivum Vortioxetin (Obrázek 17A), který prodlužuje délku periody bioluminiscence PER2 (PER2:LUC) a indukuje opoždění fáze (Westrich et al., 2015). Dalším modulátorem 5-HT<sub>7</sub> je 2-dipropylamin-8-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-naftalen (8-OH-DPAT), který indukuje nesvětelný restart rytmu. Dále selektivní agonista LP-211 indukující fázový posun na spontánní cirkadiánní rytmus a agonista AS19 zkracující délku periody bioluminiscence PER2 (PER2:LUC) (Nikiforuk, 2015).



**Obrázek 17:** Vybrané modulátory dalších molekulárních cílů. **A/** Modulátory 5-HT<sub>7</sub>, **B/** modulátory DRD3.

Dalšími cíli jsou trace amine receptor 1 (TAAR1), který je modulován pomocí substituovaných azetinidových sloučenin (Cecere et al., 2021b), morfolino-pyridinových derivátů (Galley et al., 2018), 2-oxo-5-azabicyklo[2.2.1]heptan-3-yl derivátů (Cecere et al., 2021a), 5-ethyl-4-methyl-pyrazol-3-karboxamidových derivátů (Galley et al., 2020), pyrazinových derivátů (Galley et al., 2016) či substituovaných pyrazin[2.1.-A]isochinolinových derivátů (Cecere et al., 2018c). Dále  $\alpha$ 7-nikotin acetylcholinový receptor modulován pomocí aza(indolových) derivátů (Ledne et al., 2020a), thiadiazinových derivátů (Ledne et al., 2020b) nebo derivátů pyrrolu (Sinha et al., 2013). Histaminový H3 receptor modulován antagonisty s piperidinovým jádrem (Ligneau et al., 2020) či inverzními agonisty s 1-(1-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)piperidin-4-yl 4-cyklobutylpiperazin-1 karboxylátovým základem (Johns et al., 2020), nebo dopaminový receptor D3 (DRD3) modulová agonisty quinpirolem a (Obrázek 17B) (Imbesi et al., 2009).

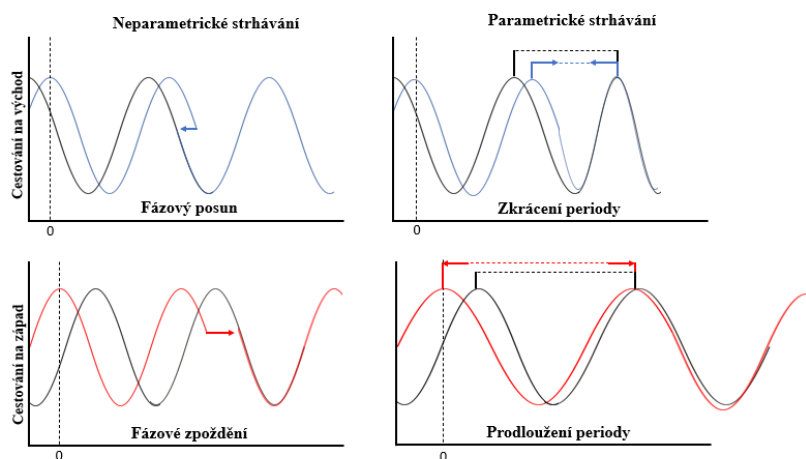
### 2.3.3 *Terapie pásmové nemoci*

Pro léčbu jet-lagu mohou být využity farmakologické i nefarmakologické postupy. Důležitou roli hraje případné preventivní opatření, jako je například spánek během letu ideálně v době, která odpovídá nočním hodinám ve vybrané destinaci či alespoň krátké cykly odpočinku, které sníží spánkovou deprivaci. Dále je vhodné zdržet se alkoholu a kofeinu a snažit se co nejdříve

přizpůsobit časovému pásmu vybrané destinace a vystavovat se dennímu záření (Mendelson, 2007). Další možností je aplikace farmak ze skupiny chronobiotik, která se používají k léčbě desynchronizace cirkadiálního rytmu, jako melatonin (Herxheimer a Petrie, 2002), Amelteon či Agomelatin. Ramelteon a Agomelatin jsou specifickými agonisty receptoru M1/M2 melatoninu. V porovnání s melatoninem jsou vyhledávanější díky svému až o 1-2 hodiny delšímu biologickému poločasu a lepší kompatibilitě vůči M1/M2 (Srinivasan et al., 2008). Ramelteon je také pro své hypnotické účinky často používám pro navození spánku v průběhu letu (Mendelson, 2007). Jinou možností je aplikace hypnotik v podobě benzodiazepinů nebo nondiazepinových GABA-A agonistů (Zolpidem, Zaleton), která se neváží na M receptory jako chronobiotika, ale navodí spánek při příjezdu do cílové destinace (Mendelson, 2007).

### 2.3.4 Chronoterapie

Terapeutický význam cirkadiálních hodin je omezen především na doménu chronoterapie. Ta zahrnuje výběr nejlepšího časového úseku během denního cyklu pro podání léčiva tak, aby byl zaručen optimální terapeutický index a farmakokinetický profil, a zároveň došlo ke snížení či eliminaci vedlejších účinků, jako je např. hematologická toxicita (He a Chen, 2016). Hlavními zdroji časově proměnlivých účinků léčiv jsou právě cirkadiální změny ve farmakokinetice a farmakodynamice (Dong et al., 2020). Personalizace chronoterapie vyžaduje především znalosti cirkadiálního rytmu a farmakogenomického profilu pacienta (Levi a Schibler, 2007). V současné době je věnována pozornost právě nízkomolekulárním modulátorům cirkadiálního rytmu, jako preventivnímu opatření patologických stavů.



**Obrázek 18: Modely normalizace cirkadiálních rytmů enviromentálním prostředím.** V „neparаметrickém“ modelu je normalizace dosáhnuta fázovým posunem, který způsobují podněty enviromentálního prostředí (cyklus světla a tmy). Na druhé straně „parametrický“ model se soustředí na rychlost pohybu cirkadiálních hodin, a normalizace se dosahuje modulací volně běžící periody. Na základě toho se předpokládá, že sloučeniny, které zvyšují velikost fázového posunu snižují pásmovou nemoc prostřednictvím neparаметrického mechanismu, zatímco sloučeniny ke zkrácení a prodloužení periody snižují pásmovou nemoc zrychlením nebo zpomalením hodin, čímž se zrychluje opětovná normalizace při cestování na východ, respektive na západ (Tamai et al., 2018).



## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Chemikálie

Pro přípravu derivátů byly použity chemikálie: 2-aminomethylpyrazin, 4-aminomethylpyrimidin, cyklopentylmethanamin hydrochlorid, 2-isopropoxyethan-1-amin, (1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)methanamin, oxan-2-ylmethanamin, oxetan-2-ylmethanamin, oxetan-3-ylmethanamin, pyridin-2-ylmethanamin, pyridin-3-ylmethanamin, pyridin-4-ylmethanamin, pyridazin-3-ylmethanamin, (1*H*-pyrrol-2-yl)methanamin, thiazol-2-ylmethanamin (Enamine); pyrimidin-4-yl-methanamin dihydrochlorid (Synthonix); kyselina trifluoroctová (TFA) (Alfa Aesar); absolutní ethanol (EtOH), bezvodý síran sodný, diethylether, ethyl-acetát (EtOAc), hydrogenuhličitan sodný, chloroform, methanol (MeOH), *n*-propanol (*n*PrOH), chlorid sodný, petrolether (PE) 40-60 °C, kyselina sírová (Lachner); triethylamin (TEA), 25% vodný amoniak, 96% ethanol (VWR); 3,4-dihydro-2*H*-pyran, fetální hovězí sérum (FBS), 6-chlorpurin, Penicilin/Streptomycin roztok, rezasurin, trypsin, vanilin (Sigma Aldrich); 2,6-dichlorpurin, (Olchemin); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen).

Roztok vanilinu pro vizualizaci skvrn byl připraven smícháním 3,2 g vanilinu, 200 ml EtOH, 1 ml koncentrované kyseliny octové a 2 ml koncentrované kyseliny sírové. Suchá rozpouštědla, konkrétně suchý EtOAc byl připraven dle protokolu Williams a Lawton, prostřednictvím sušením molekulovým sítem. Síto bylo žiháno 24 h při 300 °C a poté chlazeno v exsikátoru. Po vychladnutí bylo aktivované molekulové síto přemístěno do vysušené Erlenmayerovy baňky (120 °C, 2 h) a bylo přidáno rozpouštědlo (20 %, m/v). Následně probíhalo sušení po dobu 5 dní pod chlor-kalciovým uzávěrem (Williams a Lawton, 2010).

Roztok fosfátového pufru (PBS) byl připraven smícháním 3,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g NaCl, 0,2 g KCl v 950 ml H<sub>2</sub>O s následnou úpravou pH na 7,4 doplněním do 1 l vodou a přefiltrováním roztoku přes 0,22 µm filtr.

#### 3.2 Buněčné linie

Lidská osteosarkomová buněčná linie U2OS s BMAL-1-LUC reportérem (Poskytl Dr. Marin Sládek, Fyziologický ústav AV ČR), buněčná linie lidských kožních fibroblastů BJ (ATCC® CRL-2522™) byla pořízeny z American Type Culture Collection (ATCC) a linie lidských keratinocytů HaCaT z DKFZ Cell Line Service.

Kultivace buněk probíhala v DMEM médiu, obsahujícím 5 g/l glukózy, 2mM L-glutamin, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin a 10% fetální hovězí sérum (Sigma) za standardních kultivačních podmínek (5,5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100% relativní vlhkost). Subkultivace byla prováděna každé 2-3 dny.

### 3.3 Metody

Průběh reakcí byl monitorován prostřednictvím tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových deskách obsahující vrstvu silikagelu 60 F<sub>254</sub> (Macherey Nagel). Jako mobilní fáze byly používány směsi chloroform/methanol (9:1, v/v) nebo petrolether/ethyl-acetát (1:1, v/v). Po vyvinutí byla vizualizace skvrn na TLC deskách provedena vystavením desek ultrafialovému záření (254 nm) v UV kabinetu (Camag) nebo použitím roztoku vanilinu jako vizualizačního činidla.

Purifikace připravených látek byla prováděna pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ve skleněných kolonách na silikagelu Normasil 60 40-63  $\mu\text{m}$  (VWR) a s použitím mobilních směsí chloroform/methanol s gradientem methanolu, či petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu. Některé produkty byly přečištěny pomocí preparativní HPLC na přístroji Agilent 1290 Infinity II s UV-VIS detektorem a hmotnostním detektorem Agilent InfinityLab LC/MAD (Agilent Technologies). Látky byly rozpuštěny v 50% methanolu a purifikovány na koloně Agilent 5Prep-C18 50 $\times$ 21,2 mm v lineárním gradientu 0 min – 10 % B, 0-12 min – 90 % B při průtoku 20 ml/min s použitím vody (A) a methanolu (B).

Stanovení spektrofotometrické čistoty látek a jejich molekulové hmotnosti bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí diodovým polem ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD-MS) na přístroji ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-class System (Waters) a hmotnostním spektrometru QDa (Waters) s kvadrupólovým analyzátozem. Vzorek byl připraven rozpuštěním 1 mg látky v 1 ml methanolu a následným 100 $\times$  naředěním vodou. Na kolonu Symmetry C18 (150 $\times$ 2,1 mm a pórovitosti 5  $\mu\text{m}$ , Waters) bylo aplikováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku a separace probíhala gradientovou elucí v následujícím gradientu: 0' - 90% A, 25' -10% A, 35' - 10% A, 45' - 90% A. Jako mobilní fáze byl použit 15 mM roztok mravenčanu amonného, pH = 4 (A) a methanol (B). Detekce eluentů byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 210-400 nm. Následně byl eluent z HPLC veden do iontového zdroje, kde docházelo k ionizaci molekul prostřednictvím elektrospreje. Měření byla prováděna v pozitivním módu (ESI<sup>+</sup>) a ionty byly detekovány ve FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-1000.

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla měřena na spektrometru Jeol ECA-500 při frekvencích 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 125 MHz pro <sup>13</sup>C. Látky byly rozpuštěny v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>), na jehož signál byly poté kalibrovány chemické posuny (<sup>1</sup>H = 2,49 ppm (DMSO-*d*<sub>5</sub>) a <sup>13</sup>C = 39,5 ppm). Pro přiřazení <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C signálů byly změněny a použity také potřebné 2D experimenty jako COSY, HMQC nebo HMBC.

### 3.4 Syntéza

#### 3.4.1 Syntéza N9 substituovaných prekurzorů hydroaminací

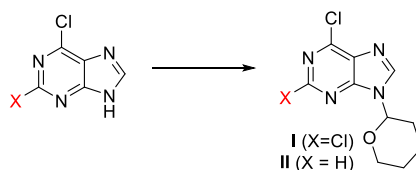


Schéma 1: Postup přípravy prekurzorů I a II pomocí hydroaminace. Reakční činidla a podmínky: 3,4-dihydro-2H-pyran, TFA, EtOAc, 0 °C → lt, 2 h.

K suspenzi 2,6-chlorpurinu/6-dichlorpurinu (2 g, 10,58 mmol/2 g, 12,94 mmol), 3,4-dihydro-2H-pyranu (2 ekv., 1,92 ml/1,3 ekv., 1,52 ml) v suchém EtOAc (21,16 ml/19,6 ml) pod argonovou atmosférou byla za chlazení v ledové lázni postupně přikapána TFA (1,8 ekv., 1,41 ml/1,5 ekv., 1,49 ml). Poté byla ledová lázeň odstraněna a suspenze byla vytemperována na laboratorní teplotu a míchána po dobu 2 h. Po provedení kontrolního TLC bylo za chlazení v ledové lázni upraveno pH reakční směsi pomocí vodného amoniaku (25% roztok NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O, 2:3, v/v) na hodnotu pH 9. V případě reakce I došlo alkalizací ke vzniku bílé sraženiny. Pevný produkt byl zfiltrován a promyt vychlazenou H<sub>2</sub>O (2 × 10 ml) vysušen v sušárně při 50 °C. Filtrát byl dále extrahován EtOAc (3 × 25 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (10 ml), vysušeny síranem sodným zahuštěny na rotační vakuové odparce (RVO). Produkt byl rekrystalován z methanolu. V případě reakce II byla reakční směs extrahována EtOAc (4 × 10 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (10 ml), vysušeny síranem sodným a zahuštěny prostřednictvím rotační vakuové odparky. Pevný produkt byl získán vymícháním odparku za chlazení v petroletheru.

#### 3.4.2 Syntéza finálních produktů prostřednictvím nukleofilní substituce v pozici C6

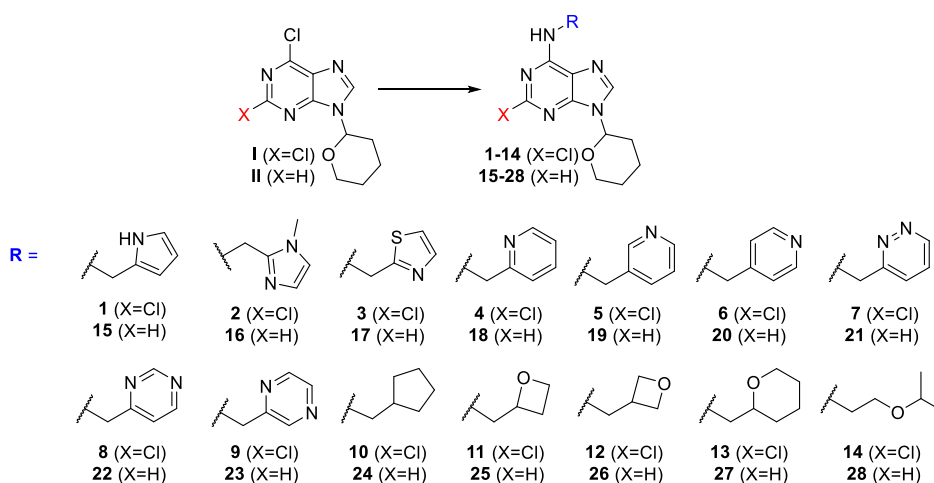


Schéma 2: Schéma přípravy finálních látek: Reakční činidla a podmínky: R-NH<sub>2</sub>, TEA, *n*-PrOH, 80/100 °C, 4/5/24 h.

V tlakové ampuli (Ace pressure tube) byla pod argonovou atmosférou zahřívána suspenze intermediátu I nebo II (typicky 100 mg, 0,366 mmol I/ 0,4189 mmol II) s příslušným aminem

(1,2 ekv.) a TEA (typicky 2,5 ekv., 3,5 ekv., respektive 5 ekv. v případě mono- a di-HCl solí) v *n*PrOH (3,6 ml **I**/4,2 ml **II**) při reakční teplotě 80/100 °C po dobu 4/5/24 hodin. Po odreagování výchozí látky byla reakční směs zahuštěna na RVO. Odparek byl rozředěn vodou (10 ml) a produkt extrahován EtOAc (4× 10 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou (10 ml), vysušeny síranem sodným a zakoncentrovány na RVO. Produkty byly přečištěny sloupcovou chromatografií s mobilními fázemi chloroform/methanol, PE/EtOAc nebo pomocí preparativní HPLC.

### 3.5 Biologické testování

#### 3.5.1 Testování vlivu na cirkadiánní rytmus

Testování vlivu látek na cirkadiánní rytmus bylo prováděno na lidské osteosarkomové buněčné linii U2OS nesoucí BMAL1-LUC reportérový systém (ATCC® HTB-96™). Do 384 jamkové desky byly vneseny buňky v koncentraci 10 000 buněk/jamku v 20 µl kultivačního média. Po dvou dnech byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami o finální koncentraci 10 µM v sedmi opakováních. Látky byly dávkovány pomocí přístroje Echo® Nanodrop (Labcyte). Jako pozitivní kontroly byly použity kinetin (*N*-furfurylpurin-6-amin) a 2,6-disubstituovaný purin identifikovaný v knihovně látek Laboratoře růstových regulátorů (označený v této práci jako PK). Negativní kontrola bylo DMSO vehikulum. Do každé jamky bylo přidáno 80 µl DMEM média bez fenolové červeně, s vysokým obsahem glukózy (4500 mg/l) s 10% FBS, HEPES (10mM) a luciferiniem (0,1mM). Deska byla překryta PCR fólií a luminiscence každé jamky byla měřena 10 sekund každou hodinu po dobu 120 hodin pomocí přístroje M2 plate reader (Tecan Systems, 37°C). Konečná analýza experimentu byla provedena s využitím skriptu CellularRhythm v programovacím jazyce R (Hirota et al., 2008), který proložil periodickou funkcí naměřenými hodnotami (body), přičemž prvních 20 hodin záznamu bylo vyřazeno a následujících 100 hodin bylo použito pro analýzu.

#### 3.5.2 Testování cytotoxicity látek

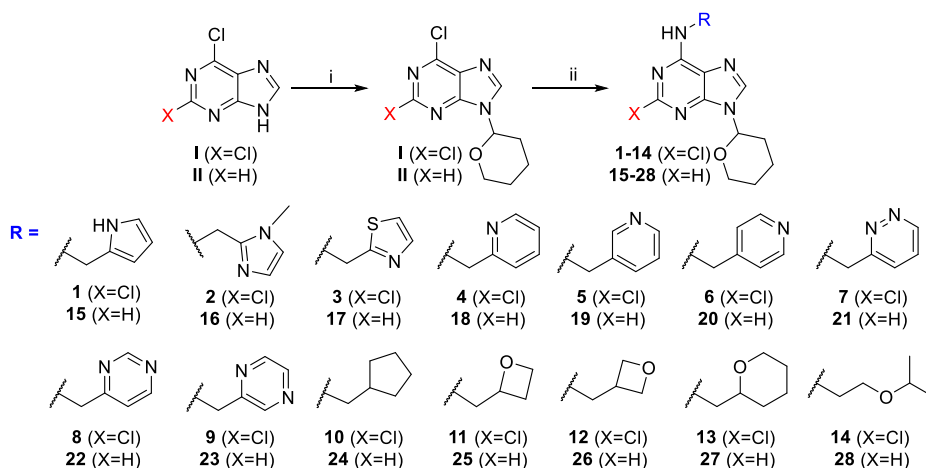
Testování cytotoxicity látek bylo prováděno na buněčných liniích lidských fibroblastů BJ a lidských keratinocytů HaCaT. Buňky byly vneseny do 96 jamkových desek v koncentracích 5 000 buněk (BJ), 7 000 buněk (HaCaT) v 80 µl kultivačního média. Po 24 hodinách bylo provedeno ošetření buněk testovanými látkami, kdy do jamky bylo přidáno 20 µl roztoku testované látky ve finální koncentraci 100 µM (0,1 % DMSO). DMSO bylo použito jako negativní kontrola. Po 72 h inkubaci bylo do jamek přidáno 20 µl 5-krát koncentrovaného roztoku resazurinu v kultivačním médiu (finální koncentrace 12,5 µg/ml) a po třech hodinách byla změřena fluorescence při vlnových délkách  $\lambda_{ex} = 544$  nm a  $\lambda_{em} = 590$  nm.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s výzkumnou skupinou Dr. Jiřího Vollera, která se dlouhodobě zabývá studiem vlivu rostlinných hormonů na cirkadiánní rytmus lidských buněk. Inspirací bylo zjištění, že kinetin (*N*-furfurylpurin-6-amin) v různých modelech prodlužuje periodu cirkadiánního rytmu (Dr. J.Voller – ústní sdělení).

Cílem práce bylo zjistit, jak v sérii 9-substituovaných purinů skupina v pozici C6 s alifatickým, cyklickým nebo heterocyklickým charakterem ovlivní cirkadiánní periodu lidské osteosarkomové buněčné linie nesoucí gen pro luciferázu pod kontrolou promotoru hodinového genu *bm11* (Poskytl Dr. Martin Sládek, Fyziologický ústav AV ČR).

Modifikace výchozích molekul purinu (2,6-dichlorpurin – 2Cl linie, 6-chlorpurin – 2H linie) spočívala v prvním kroku v hydroaminaci purinu v pozici N9 na 3,4-dihydro-2*H*-pyran katalyzovanou trifluoroctovou kyselinou a následně v nukleofilní substituci chloru v pozici C6 pomocí odpovídajícího aminu a TEA jako pomocné báze za horka v *n*PrOH (Schéma 3).



**Schéma 3: Schéma syntézy finálních produktů.** Reakční činidla a podmínky: i) 3,4-dihydro-2*H*-pyran, TFA, EtOAc, 0 °C → lt, 2 h, ii) R-NH<sub>2</sub>, TEA, *n*-PrOH, 80/100 °C, 4/5/24 h.

Prvním krokem syntézy byla tetrahydropyranylace purinu v poloze N9. Tato hydroaminační reakce se obvykle provádí v ethyl-acetátu při teplotách (od laboratorní po reflux, nejčastěji při 50 °C) a v kyselém prostředí, nejčastěji v přítomnosti kyseliny *p*-toluensulfonové (Wu et al., 2015), dále například kyseliny benzensulfonové (Moon et al., 2020), kafr-10-sulfonové (Matheson et al., 2020) nebo TFA (Szüčová et al., 2009). Výtěžky reakcí se pohybují v rozmezí od 62-100 %. V porovnání s dříve publikovaným postupem pro syntézu prekurzoru II (Szüčová et al., 2009), byl zvolen menší nadbytek reakčního činidla a lehce pozměněno zpracování reakční směsi. Výtěžky reakcí však zůstaly srovnatelné (90 %), viz Tabulka 2. Pro přípravu prekurzoru I byl zvolen analogický postup jako u II, přičemž v průběhu chlazení a úpravy pH reakční směsi došlo k vypadnutí pevného podílu ve vysoké čistotě. Zbývající část produktu byla získána

extrakcí matečného louhu ethyl-acetátem a následnou rekrystalizací z methanolu. Celkový výtěžek reakce byl však jen 67 %.

**Tabulka 2: Přehled N9-substitovaných prekurzorů s jejich charakteristikou připravených prostřednictvím hydroaminačních reakcí.** <sup>a</sup> V hmotnostním spektru byly pozorovány pouze píky m/z odpovídající fragmentům [M-THP+H]<sup>+</sup>.

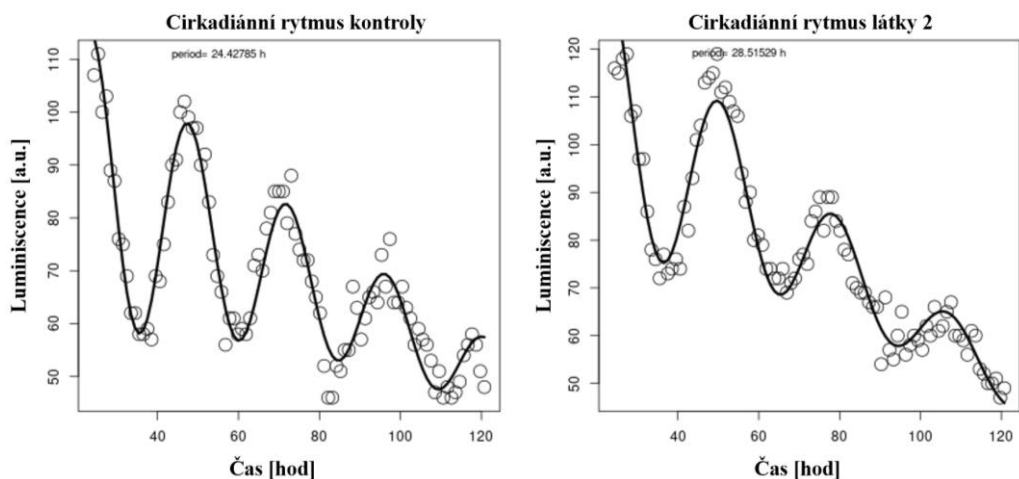
| Látka     | Substituce na purinu |           | Výtěžek [%] | HPLC-UV/VIS [min; %] | ESI <sup>+</sup> -MS |
|-----------|----------------------|-----------|-------------|----------------------|----------------------|
|           | Poloha C2            | Poloha C6 |             |                      |                      |
| <b>I</b>  | Cl                   | Cl        | 67          | 19,7; 100            | 189,1 <sup>a</sup>   |
| <b>II</b> | H                    | Cl        | 90          | 14,3; 99,9           | 155,1 <sup>a</sup>   |

Následně byl u prekurzorů **I** a **II** substituován chlor v pozici C6 čtrnácti odlišnými aminy s alifatickým, cyklickým nebo heterocyklickým charakterem. Bylo tak připraveno celkem 28 finálních látek vytvářejících dvě syntetické větve na základě rozdílného substituentu v pozici C2 (Tabulka 3). Reakce byly prováděny zahříváním výchozích látek v tlakových ampulích v *n*PrOH a přítomnosti TEA jako pomocné báze při 100 °C po dobu 4 h. Poté byla provedena kontrolní TLC, zda došlo k odreagování výchozích intermediátů **I** a **II**, a reakční směsi byly zpracovány dle standardního protokolu. U látek **2**, **7** a **15** bylo nezbytné prodloužit reakční čas o 1 hodinu a v případě látek **13**, **18**, **22**, **28** byly reakční směsi zahřívány do následujícího dne. V případě látek **8**, **22** a **26** byly reakce prováděny pouze při 80 °C. Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí od 11 do 95 %. Tato fluktuace byla způsobena obtížnou purifikací produktů, danou především polaritou látek, kdy kromě klasické sloupcové chromatografie byly některé látky purifikovány pomocí preparativní HPLC (**17**, **20**, **22**, **25**, **27**). Látku **26** se zatím bohužel nepodařilo purifikovat.

**Tabulka 3: Přehled připravených finálních látek s jejich charakteristikou syntetizovaných z prekursorů I a II nukleofilní substitucí chloru v pozici C6.** Reakce byla prováděna s TEA jako pomocnou bází a v *n*PrOH při teplotě 80<sup>a</sup>/ 100 °C a reakčním čase 4/ 5/ 24 hodin. RČ (reakční doba): <sup>a</sup> – reakční teplota 80 °C, <sup>b</sup> - přečištěno pomocí preparativní HPLC, \* - amin ve formě hydrochloridu, použito 3,5 ekv. TEA, \*\* - amin ve formě dihydrochloridu, použito 5 ekv. TEA.

| Látka | Substituce na 9-(tetrahydropyran-2-yl)-9H-purinu |                                    | RČ [h]          | Výtěžek [%]     | HPLC-UV/VIS [min; %] | ESI+-MS [M+H] <sup>+</sup> |
|-------|--|------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------------------|
|       | C2   | C6                                 |                 |                 |                      |                            |
| 1     | Cl   | (pyrrol-2-yl)methylamino           | 4               | 44              | 20,5; 97,9           | 333,3                      |
| 2     | Cl   | (1-methylimidazol-2-yl)methylamino | 5               | 47              | 12,8; 99,9           | 348,2                      |
| 3     | Cl   | (1,3-thiazol-2-yl)methylamino      | 4               | 91              | 20,2; 99,9           | 351,2                      |
| 4     | Cl   | (pyridin-2-yl)methylamino          | 4               | 87              | 19,5; 99,9           | 345,2                      |
| 5     | Cl   | (pyridin-3-yl)methylamino          | 4               | 79              | 19,0; 99,1           | 345,2                      |
| 6     | Cl   | (pyridin-4-yl)methylamino          | 4               | 87              | 18,4; 99,9           | 345,2                      |
| 7     | Cl   | (pyridazin-3-yl)methylamino        | 5               | 27              | 17,1; 98,0           | 346,2                      |
| 8     | Cl   | (pyrimidin-4-yl)methylamino**      | 4 <sup>a</sup>  | 59              | 17,2; 93,0           | 346,3                      |
| 9     | Cl   | (pyrazin-2-yl)methylamino          | 4               | 77              | 17,7; 99,0           | 346,3                      |
| 10    | Cl   | (cyklopentyl)methylamino*          | 4               | 52              | 26,0; 99,9           | 336,3                      |
| 11    | Cl   | (oxetan-2-yl)methylamino           | 4               | 80              | 18,6; 99,9           | 324,3                      |
| 12    | Cl   | (oxetan-3-yl)methylamino           | 4               | 85              | 18,1; 99,9           | 324,2                      |
| 13    | Cl   | (oxan-2-yl)methylamino             | 24              | 87              | 22,5; 99,9           | 352,3                      |
| 14    | Cl   | 2-isopropoxyethylamino*            | 4               | 54              | 22,1; 99,0           | 340,0                      |
| 15    | H  | (pyrrol-2-yl)methylamino           | 5               | 46              | 16,6; 97,0           | 299,1                      |
| 16    | H  | (1-methylimidazol-2-yl)methylamino | 4               | 38              | 8,4; 99,0            | 314,1                      |
| 17    | H  | (1,3-thiazol-2-yl)methylamino      | 4               | 11 <sup>b</sup> | 15,7; 99,9           | 317,2                      |
| 18    | H  | (pyridin-2-yl)methylamino          | 24              | 51              | 15,6; 99,0           | 311,3                      |
| 19    | H  | (pyridin-3-yl)methylamino          | 4               | 54              | 14,5; 99,0           | 312,1                      |
| 20    | H  | (pyridin-4-yl)methylamino          | 4               | 95 <sup>b</sup> | 13,0; 99,9           | 311,3                      |
| 21    | H  | (pyridazin-3-yl)methylamino        | 4               | 60              | 12,7; 99,9           | 312,3                      |
| 22    | H  | (pyrimidin-4-yl)methylamino**      | 24 <sup>a</sup> | 33 <sup>b</sup> | 13,3; 99,9           | 312,2                      |
| 23    | H  | (pyrazin-2-yl)methylamino          | 4               | 43              | 13,7; 99,9           | 312,3                      |
| 24    | H  | (cyklopentyl)methylamino*          | 4               | 80              | 22,1; 98,0           | 302,3                      |
| 25    | H  | (oxetan-2-yl)methylamino           | 4               | 83 <sup>b</sup> | 14,1; 99,9           | 290,2                      |
| 26    | H  | (oxetan-3-yl)methylamino           | 4 <sup>a</sup>  | 43 <sup>b</sup> | 13,6; 42,6           | 290,3                      |
| 27    | H  | (oxan-2-yl)methylamino             | 4               | 70 <sup>b</sup> | 19,2; 99,9           | 318,3                      |
| 28    | H  | 2-isopropoxyethylamino*            | 24              | 74              | 18,5; 99,9           | 306,1                      |

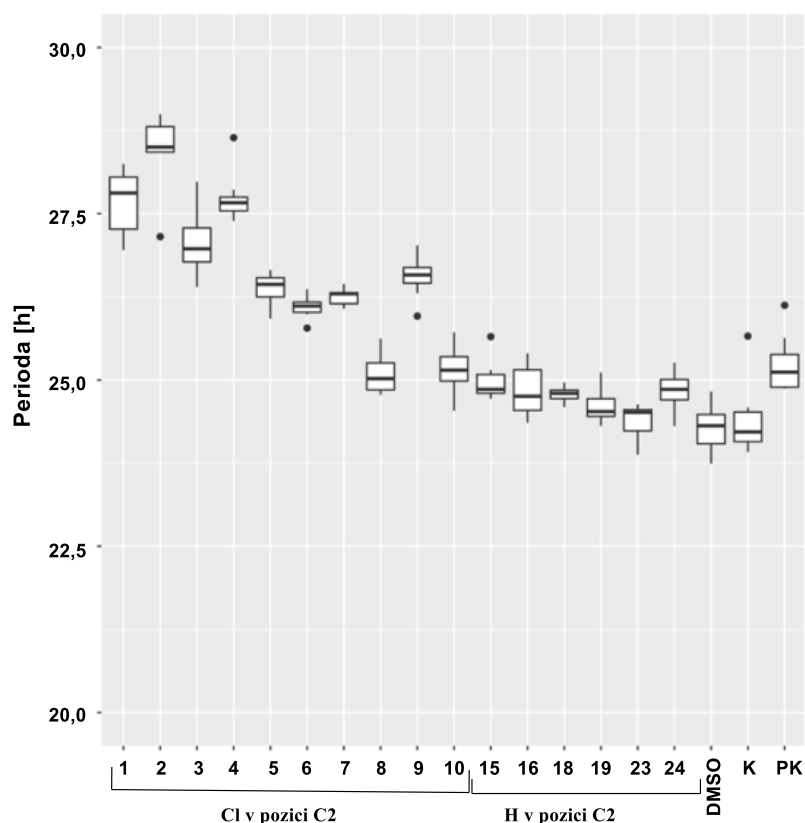
Modulace periody cirkadiánního rytmu byla sledována na lidské osteosarkomové buněčné linii U2OS s BMAL1-LUC reportérovým systémem, který je založen na rytmické expresi luciferázy (LUC) pod kontrolou *bmal1* promotoru. V přítomnosti enzymu dochází k oxidaci luciferinu a následně k jeho dekarboxylaci. Rozklad luciferinu je doprovázen emisí energie ve formě světla (bioluminiscence). Pro buněčnou linii U2OS se přirozená perioda pohybovala kolem 24 hodin (Graf 1).



**Graf 1** : Ukázka záznamu měření luminescence v jednotlivých jamkách 384-jamkové desky a proložení periodické funkce pro buněčnou linii U2OS. Zobrazena záznam cirkadiánního rytmu kontroly syntetizované látky 2. Průměrná délka periody kontroly je přibližně 24 hodin. V případě látky 2 bylo naměřeno prodloužení periody na 28,5 hodin.

Látky byly testovány ve fixní koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a jako pozitivní kontrola byl použit ekvimolární kinetin a 2,6-disubstituovaný purin identifikovaný J. Vollerem v knihovně látek Laboratoře růstových regulátorů a označený v této práci jako PK. Jako negativní kontrola sloužilo DMSO vehikulum. Všechny testované látky prodlužovaly periodu oproti DMSO. U méně aktivních látek (**5-10**, **15**, **16**, **18**, **19**, **23**, **24**) došlo k prodloužení od několika minut po 2 hodiny (Graf 2). Aktivnější látky (**1-4**) prodlužovaly periodu nad 2 hodiny, přičemž u neaktivnější látky **2** bylo pozorováno prodloužení o 4 hodiny. V případě kinetinu nebyl naměřen žádný vliv při použité koncentraci ( $\tau = 24,4$  h), látka PK periodu prodloužila na  $\tau = 25,0$  h. Látky s chlorem v pozici C2 vykazovaly obecně vyšší biologickou aktivitu než odpovídající 2H analoga. U série látek s 2-chlor substitucí patřily sloučeniny **8** ( $\tau = 26,0$  h) a **10** ( $\tau = 25,1$  h) k méně aktivním. Tyto deriváty zahrnovaly (pyrimidin-4-yl)methylamino a (cyklopentyl)methylamino substituent v pozici C6. K neaktivnějším naopak patřily látky **1-4** substituované v pozici C6 (pyrrol-2-yl)methylamino, (1-metylimidazol-2-yl)methylamino, (1,3-thiazol-2-yl)methylamino, (pyridin-2-yl)methylamino, (pyrazin-2-yl)methylamino skupinou. Preferovány jsou tedy pětičlenné dusíkaté heterocykly před šestičlennými dusíkatými heterocykly s výjimkou (pyridin-2-yl)methylamino substituentu. Biologická aktivita látek 2H série derivátů byla víceméně srovnatelná a žádná z látek v rámci této série extrémně nevybočovala.

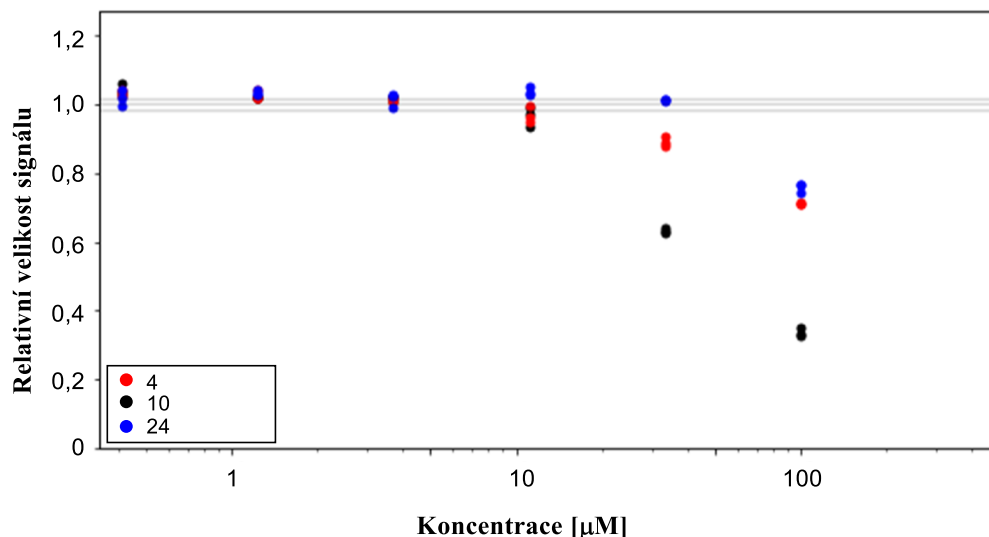




**Graf 2: Vliv látek na periodu cirkadiánního rytmu.** Látky byly testovány v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci. Jako pozitivní kontroly byly použity K (kinetin), PK (pozitivní kontrola 6,9-disubstituovaný purin) a jako negativní kontrola DMSO. Naměřené periody pro neaktivnější látky byly **1** ( $\tau=26,7$  h), **2** ( $\tau=28,5$  h), **3** ( $\tau=27,0$  h), **4** ( $\tau=27,7$  h). Dolní a horní hranice bílého obdélníku označují první a třetí kvartil, silná čára uprostřed medián. Úsečky odpovídají vzdálenosti mezi horní/spodní hranicí obdélníku a posledním bodem, jehož vzdálenost od hranice obdélníku nepřesahuje  $\pm 1,5\times$  hodnotu rozdílu mezi kvartily. Body jsou odlehlé hodnoty.

K orientačnímu hodnocení terapeutického indexu v 96 jamkových mikrotitračních deskách byly látky testovány na nenádorových lidských liniích BJ (kožní fibroblasty) a HaCaT (keratinocyty). Byl použit test založený na kvantifikaci metabolické redukce slabě fluorescentního resazurinu na silně fluorescenční resofurin. Byl sledován vliv 72 hodinového působení látek o 6 koncentracích, kdy maximální koncentrace byla 100  $\mu\text{M}$ . Další koncentrace poté odpovídaly trojnásobné (případně dvojnásobné) ředící řadě. Kontrolní série buněk byla ovlivněna DMSO vehikulem.

Látky neměly žádný nebo limitovaný (snížení signálu  $< 20\%$ ) toxický efekt v koncentracích 11,1  $\mu\text{M}$  nebo 12,5  $\mu\text{M}$ , které jsou blízké použité koncentraci při testování vlivu na periodu cirkadiánních oscilací (10  $\mu\text{M}$ ). Pokles o více než 50 % ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen jen v případě látek **2**, **6**, **10** pro linii HaCaT a **2** pro linii BJ (Graf 3).



**Graf 3: Ukázka hodnocení toxicity látek vůči linii HaCaT pro látky na jedné mikrotitrační desce.** Látky byly testovány v triplicátu, body se ale částečně překrývají. Šedé čáry označují minimum, průměr a maximum signálu pro hexaplikát kontrolních buněk. Je zobrazeno hodnocení toxicity látek **4, 10, 24** při maximální koncentraci 100 µM. Grafy hodnocení toxicity ostatních látek jsou součástí přílohy na CD.

Všechny připravené látky jsou chirální, přičemž některé obsahují více chirálních center (C2 na THP, C2/C3 na oxetanu, C2 na oxepanu), a je možné, že jsou testované vzorky směsmi *R* a *S* enantiomerů. Enantiomery mohou vykazovat odlišnou biologickou aktivitu a v případě 2 chirálních center dostáváme potenciálně až 4 látky, které se mohou lišit biologickou aktivitou. Stávající analytické techniky pracoviště neumožňují jednoznačně určit složení směsi a poměr enantiomerů/diastereomerů. Zároveň může směs vykazovat odlišnou aktivitu od izolovaných čistých látek jednoho druhu. Pro budoucí testování by tudíž mělo dojít k separaci jednotlivých enantiomerů/diastereomerů a biologickému testování čistých látek.

Na modulaci periody cirkadiálního rytmu reportérové buněčné linie se zatím bohužel povedlo otestovat pouze vybrané syntetizované látky (**1-10, 15, 16, 18, 19, 23, 24**). Testování ostatních látek v době odevzdání práce ještě stále probíhalo.

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo v první řadě provedení literární rešerše na téma cirkadiánní rytmus u člověka a jeho patologie, pásmová nemoc (jet-lag) a nízkomolekulární organické modulatory cirkadiánního rytmu. Praktická část poté zahrnovala syntézu potenciálních modulatorů založených na purinovém skeletu a jejich testování na lidské osteosarkomové buněčné linii nesoucí gen pro luciferázu pod kontrolou promotoru hodinového genu *bmal1*.

Celkem bylo připraveno celkem 28 derivátů 9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)purinu se substituentem alifatického, cyklického nebo heterocyklického charakteru v pozici C6. Jejich čistota a struktura byla ověřena dostupnými fyzikálně-chemickými metodami. Tento soubor látek tvořily dvě paralelní série, jedna s atomem chloru v pozici C2 a druhá s atomem vodíku. Záměrem bylo zjistit, jak substituent v pozici C6 ovlivní periodu cirkadiánního rytmu reportérové linie a jak se budou funkčně lišit 2Cl a 2H deriváty. Převážná část připravených látek v koncentraci netoxické pro nenádorové buňky prodlužovala periodu cirkadiánního rytmu v rozmezí od několika desítek minut po 2 hodiny (**5-10, 15, 16, 18, 19, 23, 24**). Aplikace látek **1, 2, 3, 4, 9** vedla k prodloužení periody nad 2 hodiny, přičemž u neaktivnější látky **2** bylo zaznamenáno prodloužení o 4 hodiny. Největší aktivita byla zaznamenána u látek, které obsahovaly chlor v pozici C2 purinu. Z výsledků vyplývá, že atom chloru v pozici C2 purinu má pozitivní roli, a zároveň jsou v pozici 6 preferovány pětičlenné heterocykly. Při testování cytotoxicity na buněčných liniích HaCaT a BJ nevykazovala žádná látka významný cytotoxický efekt v koncentracích použitých pro studium vlivu na cirkadiánní rytmus.

Vzhledem k tomu, že všechny aktivní molekuly jsou chirální a v některých případech obsahují dokonce více chirálních center, bylo by vhodné izolovat jejich *R* a *S* enantiomery pro ověření biologického vlivu a zjistit, zda má konfigurace chirálního centra vliv na biologickou aktivitu látky nebo ne. Předmětem dalších studií bude také zjištění a popis mechanismu účinku testovaných látek, který není dosud znám.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Akhtar R. A., Reddy A. B., Maywood E. S., Clayton J. D., King V. M., Smith A. G., Gant T. W., Hastings M. H. a Kyriacou C. P. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus *Curr. Biol.* **12**, 540-550.
- Andrzejewska M., Pagano M. A., Meggio F., Brunati A. M. a Kazimierczuk Z. (2003) Polyhalogenobenzimidazoles: Synthesis and their inhibitory activity against casein kinases *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 3997-4002.
- Badeli H. a Assadi F. (2014) Strategies to reduce pitfalls in measuring blood pressure *Int J Prev Med* **5**, 17-20.
- Barnea M., Haviv L., Gutman R., Chapnik N., Madar Z. a Froy O. (2012) Metformin affects the circadian clock and metabolic rhythms in a tissue-specific manner *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1822**, 1796-1806.
- Belden W. J. a Dunlap J. C. (2008) Sirt1 is a circadian deacetylase for core clock components *Cell* **134**, 212-214.
- Bellet M. M., Nakahata Y., Boudjelal M., Watts E., Mossakowska D. E., Edwards K. A., Cervantes M., Astarita G., Loh C., Ellis J. L., Vlasuk G. P. a Sassone-Corsi P. (2013) Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase sirt1 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3333-3339.
- Bellet M. M. a Sassone-Corsi P. (2010) Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link *J. Cell Sci.* **123**, 3837-3848.
- Berson D. M., Dunn F. A. a Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock *Science* **295**, 1070-1073.
- Biscontin A., Martini P., Costa R., Kramer A., Meyer B., Kawaguchi S., Teschke M. a De Pitta C. (2019) Analysis of the circadian transcriptome of the antarctic krill *euphausia superba* *Sci. Rep-UK* **9**, 13894-13905.
- Bordt S. L., McKeon R. M., Li P. K., Witt-Enderby P. A. a Melan M. A. (2001) N1e-115 mouse neuroblastoma cells express mt1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin *Biochim. Biophys. Acta* **1499**, 257-264.
- Boukhtouche F., Mariani J. a Tedgui A. (2004) The &#x201c;cholesterol&#x201d; protective pathway in the vascular system *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 637-643.
- Bourotte M., Delhomel J.-F., Dubernet M. a Gouy M.-H. (2020) Derivatives of 6-substituted triazolopyridazines as rev-erb agonists.
- Brancaccio M., Edwards M. D., Patton A. P., Smyllie N. J., Chesham J. E., Maywood E. S. a Hastings M. H. (2019) Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals *Science* **363**, 187-192.

- Brinkmann A. O., Faber P. W., van Rooij H. C., Kuiper G. G., Ris C., Klaassen P., van der Korput J. A., Voorhorst M. M., van Laar J. H., Mulder E. a et al. (1989) The human androgen receptor: Domain structure, genomic organization and regulation of expression *J. Steroid Biochem.* **34**, 307-310.
- Brydon L., Petit L., Delagrangre P., Strosberg A. D. a Jockers R. (2001) Functional expression of mt2 (mel1b) melatonin receptors in human paz6 adipocytes *Endocrinology* **142**, 4264-4271.
- Bunney W. E. a Bunney B. G. (2000) Molecular clock genes in man and lower animals: Possible implications for circadian abnormalities in depression *Neuropsychopharmacology* **22**, 335-345.
- Cajochen C. (2007) Alerting effects of light *Sleep Med Rev* **11**, 453-464.
- Camacho F., Cilio M., Guo Y., Virshup D. M., Patel K., Khorkova O., Styren S., Morse B., Yao Z. a Keesler G. A. (2001) Human casein kinase  $\delta$  phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2 *FEBS Lett.* **489**, 159-165.
- Canaple L., Rambaud J., Dkhissi-Benyahya O., Rayet B. a., Tan N. S., Michalik L., Delaunay F., Wahli W. a Laudet V. (2006) Reciprocal regulation of brain and muscle arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock *Mol. Endocrinol.* **20**, 1715-1727.
- Carey K. T., Tan K. H., Ng J., Liddicoat D. R., Godfrey D. I. a Cole T. J. (2013) Nfil3 is a glucocorticoid-regulated gene required for glucocorticoid-induced apoptosis in male murine t cells *Endocrinology* **154**, 1540-1552.
- Cecere G., Galley G., Hu Y., Norcross R., Pflieger P. a Shen H. (2021a) 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl derivatives. EP-3174886-B1.
- Cecere G., Galley G., Norcross R., Pflieger P. a Patiny-Adam A. (2018) Substituted pyrazino[2,1-a]isoquinoline derivatives for the treatment of cns disorders. EP-3186250-B1.
- Cecere G., Galley G., Norcross R., Pflieger P. a Rauber E. (2021b) Substituted azetidine derivatives as taar ligands. EP-3186224-B1.
- Cingi C., Emre I. a Bayar Muluk N. (2018) Jetlag related sleep problems and its management: A review *Travel Med. Infect. Dis.* **24**, 59-64.
- Cook J. S., Sauder C. L. a Ray C. A. (2011) Melatonin differentially affects vascular blood flow in humans *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, 670-674.
- Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F. a Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus *Genes Dev.* **14**, 2950-2961.
- Dibner C., Schibler U. a Albrecht U. (2010) The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 517-549.

- Dong D., Yang D., Lin L., Wang S. a Wu B. (2020) Circadian rhythm in pharmacokinetics and its relevance to chronotherapy *Biochem. Pharmacol.* **178**, 114045.
- Dubocovich M. L., Delagrange P., Krause D. N., Sugden D., Cardinali D. P. a Olcese J. (2010) International union of basic and clinical pharmacology. Lxxv. Nomenclature, classification, and pharmacology of g protein-coupled melatonin receptors *Pharmacol. Rev.* **62**, 343-380.
- Eide E. J., Vielhaber E. L., Hinz W. A. a Virshup D. M. (2002) The circadian regulatory proteins bmal1 and cryptochromes are substrates of casein kinase iepsilon *The Journal of biological chemistry* **277**, 17248-17254.
- Eide E. J., Woolf M. F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E. L., Giovanni A. a Virshup D. M. (2005) Control of mammalian circadian rhythm by ckiepsilon-regulated proteasome-mediated per2 degradation *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2795-2807.
- Falvey E., Marcacci L. a Schibler U. (1996) DNA-binding specificity of par and c/ebp leucine zipper proteins: A single amino acid substitution in the c/ebp DNA-binding domain confers par-like specificity to c/ebp *Biol. Chem.* **377**, 797-809.
- Galley G., Hoener M., Norcross R. a Pflieger P. (2020) 5-ethyl-4-methyl-pyrazole-3-carboxamide derivative having activity as agonist of taar.
- Galley G., Norcross R. a Pflieger P. (2016) Pyrazine derivatives. US-20160272626-A1.
- Galley G., Pflieger P., Norcross R., Cecere G., Shen H. a Hu Y. (2018) Morpholin-pyridine derivatives having affinity to the taar1 receptor. EP-3137459-B1.
- Gascoyne D. M., Long E., Veiga-Fernandes H., de Boer J., Williams O., Seddon B., Coles M., Kioussis D. a Brady H. J. M. (2009) The basic leucine zipper transcription factor e4bp4 is essential for natural killer cell development *Nat. Immunol.* **10**, 1118-1124.
- Harmer S. L., Panda S. a Kay S. A. (2001) Molecular bases of circadian rhythms *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 215-253.
- Hartley S., Dauvilliers Y. a Quera-Salva M. A. (2018) Circadian rhythm disturbances in the blind *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **18**, 65.
- Hastings M. H., Maywood E. S. a O'Neill J. S. (2008) Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms *Curr. Biol.* **18**, 805-815.
- He B. a Chen Z. (2016) Molecular targets for small-molecule modulators of circadian clocks *Curr. Drug Metab.* **17**, 503-512.
- He B., Nohara K., Park N., Park Y.-S., Guillory B., Zhao Z., Garcia J. M., Koike N., Lee C. C., Takahashi J. S., Yoo S.-H. a Chen Z. (2016) The small molecule nobiletin targets the molecular oscillator to enhance circadian rhythms and protect against metabolic syndrome *Cell Metab.* **23**, 610-621.
- Herxheimer A. a Petrie K. J. (2002) Melatonin for the prevention and treatment of jet lag *Cochrane Database Syst. Rev.*

- 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. a Kay S. A. (2010) High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals cklalpha as a clock regulatory kinase *PLoS Biol.* **8**, 1000559.
- Hirota T., Lee J. W., St John P. C., Sawa M., Iwaisako K., Noguchi T., Pongsawakul P. Y., Sonntag T., Welsh D. K., Brenner D. A., Doyle F. J., 3rd, Schultz P. G. a Kay S. A. (2012) Identification of small molecule activators of cryptochrome *Science* **337**, 1094-1097.
- Hirota T., Lewis W. G., Liu A. C., Lee J. W., Schultz P. G. a Kay S. A. (2008) A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of gsk-3beta *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20746.
- Cha H. K., Chung S., Lim H. Y., Jung J. W. a Son G. H. (2019) Small molecule modulators of the circadian molecular clock with implications for neuropsychiatric diseases *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 496-506.
- Ikushima S., Inukai T., Inaba T., Nimer S. D., Cleveland J. L. a Look A. T. (1997) Pivotal role for the nfil3/e4bp4 transcription factor in interleukin 3-mediated survival of pro-b lymphocytes *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2609-2614.
- Imbesi M., Yildiz S., Dirim Arslan A., Sharma R., Manev H. a Uz T. (2009) Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal "clock" gene expression *Neuroscience* **158**, 537-544.
- 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., Takahashi J. S. a Ueda H. R. (2009) Cki $\epsilon/\delta$ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 15744-15749.
- Johns D., Kucher K. a Sovago J. (2020) The use of a h3r inverse agonist for the treatment of shif work disorder. US-20200121679-A1.
- Kashiwada M., Levy D. M., McKeag L., Murray K., Schröder A. J., Canfield S. M., Traver G. a Rothman P. B. (2010) Il-4-induced transcription factor nfil3/e4bp4 controls ige class switching *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 821-826.
- Katz G., Knobler H. Y., Laibel Z., Strauss Z. a Durst R. (2002) Time zone change and major psychiatric morbidity: The results of a 6-year study in jerusalem *Compr. Psychiatry* **43**, 37-40.
- Kawamoto T., Noshiro M., Sato F., Maemura K., Takeda N., Nagai R., Iwata T., Fujimoto K., Furukawa M., Miyazaki K., Honma S., Honma K.-i. a Kato Y. (2004) A novel autofeedback loop of dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 117-124.

- Keniry M., Dearth R. K., Persans M. a Parsons R. (2014) New frontiers for the nfil3 bzip transcription factor in cancer, metabolism and beyond *Discoveries (Craiova)* **2**, e15.
- Keniry M., Pires M. M., Mense S., Lefebvre C., Gan B., Justiano K., Lau Y.-K. I., Hopkins B., Hodakoski C., Koujak S., Toole J., Fenton F., Calahan A., Califano A., DePinho R. A., Maurer M. a Parsons R. (2013) Survival factor nfil3 restricts foxo-induced gene expression in cancer *Genes Dev.* **27**, 916-927.
- Kersten S., Desvergne B. a Wahli W. (2000) Roles of ppar $\alpha$  in health and disease *Nature* **405**, 421-424.
- Ki Y., Ri H., Lee H., Yoo E., Choe J. a Lim C. (2015) Warming up your tick-tock: Temperature-dependent regulation of circadian clocks *Neuroscientist* **21**, 503-518.
- Kojetin D., Wang Y., Kamenecka T. M. a Burris T. P. (2011) Identification of sr8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor rev-erb *ACS Chem. Biol.* **6**, 131-134.
- Kojetin D. J. a Burris T. P. (2014) Rev-erb and ror nuclear receptors as drug targets *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 197-216.
- Kondoh D., Yamamoto S., Tomita T., Miyazaki K., Itoh N., Yasumoto Y., Oike H., Doi R. a Oishi K. (2014) Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1422-1427.
- Kumar N., Kojetin D. J., Solt L. A., Kumar K. G., Nuhant P., Duckett D. R., Cameron M. D., Butler A. A., Roush W. R., Griffin P. R. a Burris T. P. (2011) Identification of sr3335 (ml-176): A synthetic roralpha selective inverse agonist *ACS Chem. Biol.* **6**, 218-222.
- Kumar N., Lyda B., Chang M. R., Lauer J. L., Solt L. A., Burris T. P., Kamenecka T. M. a Griffin P. R. (2012) Identification of sr2211: A potent synthetic ror $\gamma$ -selective modulator *ACS Chem. Biol.* **7**, 672-677.
- Kumar N., Solt L. A., Conkright J. J., Wang Y., Istrate M. A., Busby S. A., Garcia-Ordonez R. D., Burris T. P. a Griffin P. R. (2010) The benzenesulfoamide t0901317 [*n*-(2,2,2-trifluoroethyl)-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] is a novel retinoic acid receptor-related orphan receptor- $\alpha/\gamma$  inverse agonist *Mol. Pharmacol.* **77**, 228-236.
- Kunick C., Lauenroth K., Leost M., Meijer L. a Lemcke T. (2004) 1-azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 413-416.
- Kwak Y., Jeong J., Lee S., Park Y. U., Lee S. A., Han D. H., Kim J. H., Ohshima T., Mikoshiba K., Suh Y. H., Cho S. a Park S. K. (2013) Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates the function of clock protein by direct phosphorylation *J. Biol. Chem.* **288**, 36878-36889.
- Labrecque N. a Cermakian N. (2015) Circadian clocks in the immune system *J. Biol. Rhythms* **30**, 277-290.
- Lamia K. A., Sachdeva U. M., DiTacchio L., Williams E. C., Alvarez J. G., Egan D. F., Vasquez D. S., Juguilon H., Panda S., Shaw R. J., Thompson C. B. a Evans R. M. (2009) Ampk



- regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation *Science* **326**, 437-440.
- Ledne I., Éles J., Tapolcsányi P., Horváth A., Némethy Z., Lévy G. I. a Galambos J. (2020a) Substituted aza(indole) derivatives. WO-2020012424-A1.
- Ledne I., Éles J., Tapolcsányi P., Jablonkai E., Gábor E., Visegrádi A., Némethy Z., Lévy G. I., Petro J. L. a Selényi G. (2020b) Thiadiazine derivatives. WO-2020012423-A1.
- Lee J. W., Hirota T., Kumar A., Kim N.-J., Irle S. a Kay S. A. (2015) Development of small-molecule cryptochrome stabilizer derivatives as modulators of the circadian clock *Chemmedchem* **10**, 1489-1497.
- Lee J. W., Hirota T., Ono D., Honma S., Honma K.-i., Park K. a Kay S. A. (2019) Chemical control of mammalian circadian behavior through dual inhibition of casein kinase  $\alpha$  and  $\delta$  *J. Med. Chem.* **62**, 1989-1998.
- Legros C., Chesneau D., Boutin J. A., Barc C. a Malpoux B. (2014) Melatonin from cerebrospinal fluid but not from blood reaches sheep cerebral tissues under physiological conditions *J. Neuroendocrinol.* **26**, 151-163.
- Levi F. a Schibler U. (2007) Circadian rhythms: Mechanisms and therapeutic implications *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 593-628.
- Ligneau X., Landais L., Perrin D., Lecomte J. M. a Schwartz J. C. (2020) Novel combinations of a h3 antagonist and a noradrenaline reuptake inhibitor, and the therapeutical uses thereof. US-20200030310-A1.
- Liu B., Chu S., Liu T., Song J., Ma Z., Gu X. a Xia T. (2021) Effects of 5-ht7 receptors on circadian rhythm of mice anesthetized with isoflurane *Chronobiol. Int.* **38**, 38-45.
- Ma Z., Yang Y., Fan C., Han J., Wang D., Di S., Hu W., Liu D., Li X., Reiter R. J. a Yan X. (2016) Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer *Oncotarget* **7**, 46768-46784.
- Masana M. a Dubocovich M. (2001) Melatonin receptor signaling: Finding the path through the dark *Sci STKE* **2001**, 39.
- Mashhoon N., DeMaggio A. J., Tereshko V., Bergmeier S. C., Egli M., Hoekstra M. F. a Kuret J. (2000) Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor\* *J. Biol. Chem.* **275**, 20052-20060.
- Matheson C. J., Coxon C. R., Bayliss R., Boxall K., Carbain B., Fry A. M., Hardcastle I. R., Harnor S. J., Mas-Droux C., Newell D. R., Richards M. W., Sivaprakasam M., Turner D., Griffin R. J., Golding B. T. a Cano C. (2020) 2-arylamino-6-ethynylpurines are cysteine-targeting irreversible inhibitors of nek2 kinase *RSC Medicinal Chemistry* **11**, 707-731.
- Meng Q. J., McMaster A., Beesley S., Lu W. Q., Gibbs J., Parks D., Collins J., Farrow S., Donn R., Ray D. a Loudon A. (2008) Ligand modulation of rev-erba function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner *J. Cell Sci.* **121**, 3629-3635.

- Michalik L., Auwerx J., Berger J. P., Chatterjee V. K., Glass C. K., Gonzalez F. J., Grimaldi P. A., Kadowaki T., Lazar M. A., O'Rahilly S., Palmer C. N. A., Plutzky J., Reddy J. K., Spiegelman B. M., Staels B. a Wahli W. (2006) International union of pharmacology. Lxi. Peroxisome proliferator-activated receptors *Pharmacol. Rev.* **58**, 726-741.
- Moon S.-J., Leon B., Kang M., Knudsen N., Wang J., Sakamuri S. a Tian F. (2020) Compositions containing, methods and uses of antibody-tlr agonist conjugates. WO/2020/168017.
- Mosenzon O., Del Prato S., Schechter M., Leiter L. A., Ceriello A., DeFronzo R. A. a Raz I. (2021) From glucose lowering agents to disease/diabetes modifying drugs: A "simple" approach for the treatment of type 2 diabetes *Cardiovasc. Diabetol.* **20**, 92-92.
- Nie Z., Perretta C., Erickson P., Margosiak S., Lu J., Averill A., Almasy R. a Chu S. (2008) Structure-based design and synthesis of novel macrocyclic pyrazolo[1,5-a] [1,3,5]triazine compounds as potent inhibitors of protein kinase ck2 and their anticancer activities *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 619-623.
- Nikiforuk A. (2015) Targeting the serotonin 5-ht7 receptor in the search for treatments for cns disorders: Rationale and progress to date *CNS Drugs* **29**, 265-275.
- Onishi Y. a Kawano Y. (2012) Rhythmic binding of topoisomerase i impacts on the transcription of bmal1 and circadian period *Nucleic Acids Res.* **40**, 9482-9492.
- Oshima T., Yamanaka I., Kumar A., Yamaguchi J., Nishiwaki-Ohkawa T., Muto K., Kawamura R., Hirota T., Yagita K., Irle S., Kay S. A., Yoshimura T. a Itami K. (2015) C-h activation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock *Angewandte Chemie International Edition* **54**, 7193-7197.
- Pagano M. A., Andrzejewska M., Ruzzene M., Sarno S., Cesaro L., Bain J., Elliott M., Meggio F., Kazimierczuk Z. a Pinna L. A. (2004) Optimization of protein kinase ck2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole *J. Med. Chem.* **47**, 6239-6247.
- Partch C. L., Shields K. F., Thompson C. L., Selby C. P. a Sancar A. (2006) Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10467-10472.
- Paulis L. a Simko F. (2007) Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: Potential mechanisms behind *Physiol. Res.* **56**, 671-684.
- Pfeffer M., Korf H. W. a Wicht H. (2018) Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms *Gen. Comp. Endocrinol.* **258**, 215-221.
- Pillarsetti S. (2008) A review of sirt1 and sirt1 modulators in cardiovascular and metabolic diseases *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* **3**, 156-164.
- Qiao Y., Chen T., Yang H., Chen Y., Lin H., Qu W., Feng F., Liu W., Guo Q., Liu Z. a Sun H. (2019) Small molecule modulators targeting protein kinase ck1 and ck2 *Eur. J. Med. Chem.* **181**, 111581-11165.

- Reddy A. B. a Rey G. (2014) Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: Eukaryotes *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 165-189.
- Reischl S. a Kramer A. (2011) Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock *FEBS Lett.* **585**, 1393-1399.
- Reiter R., Tan D.-X. a Fuentes-Broto L. (2010) Melatonin: A multitasking molecule *Prog. Brain Res.* **181**, 127-151.
- Reiter R. J., Tan D. X., Kim S. J. a Cruz M. H. C. (2014) Delivery of pineal melatonin to the brain and scn: Role of canaliculi, cerebrospinal fluid, tanycytes and virchow-robin perivascular spaces *Brain Struct. Funct.* **219**, 1873-1887.
- Rey G. a Reddy A. B. (2013) Connecting cellular metabolism to circadian clocks *Trends Cell Biol.* **23**, 234-241.
- Rey G., Valekunja U. K., Feeney K. A., Wulund L., Milev N. B., Stangherlin A., Ansel-Bollepalli L., Velagapudi V., O'Neill J. S. a Reddy A. B. (2016) The pentose phosphate pathway regulates the circadian clock *Cell Metab.* **24**, 462-473.
- Ring D. B., Johnson K. W., Henriksen E. J., Nuss J. M., Goff D., Kinnick T. R., Ma S. T., Reeder J. W., Samuels I., Slabiak T., Wagman A. S., Hammond M.-E. W. a Harrison S. D. (2003) Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo *Diabetes* **52**, 588-595.
- Roenneberg T., Allebrandt Karla V., Meroow M. a Vetter C. (2012) Social jetlag and obesity *Curr. Biol.* **22**, 939-943.
- Roenneberg T. a Meroow M. (2016) The circadian clock and human health *Curr. Biol.* **26**, 432-443.
- Saini R., Jaskolski M. a Davis S. J. (2019) Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: Structural aspects *BMC Biol.* **17**, 13-52.
- Sarno S., Papinutto E., Franchin C., Bain J., Elliott M., Meggio F., Kazimierczuk Z., Andrzej O., Zanotti G., Battistutta R. a Pinna L. A. (2011) Atp site-directed inhibitors of protein kinase ck2: An update *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 1340-1351.
- Sato T. K., Yamada R. G., Ukai H., Baggs J. E., Miraglia L. J., Kobayashi T. J., Welsh D. K., Kay S. A., Ueda H. R. a Hogenesch J. B. (2006) Feedback repression is required for mammalian circadian clock function *Nat. Genet.* **38**, 312-319.
- Shelton J., Yun S., Losee Olson S., Turek F., Bonaventure P., Dvorak C., Lovenberg T. a Dugovic C. (2015) Selective pharmacological blockade of the 5-ht7 receptor attenuates light and 8-oh-dpat induced phase shifts of mouse circadian wheel running activity *Front. Behav. Neurosci.* **8**, 453-453.
- Sinha N., Karche Navnath P., Adurkar Shrinidhar K., Venkata P. a Kamboj Rajender K. (2013) Pyrrole derivatives as alpha 7 nachr modulators. WO-2014141091-A1

- Solt L. A. a Burris T. P. (2012) Action of rors and their ligands in (patho)physiology *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 619-627.
- Solt L. A., Kojetin D. J. a Burris T. P. (2011a) The rev-erbs and rors: Molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis *Future medicinal chemistry* **3**, 623-638.
- Solt L. A., Kumar N., Nuhant P., Wang Y., Lauer J. L., Liu J., Istrate M. A., Kamenecka T. M., Roush W. R., Vidović D., Schürer S. C., Xu J., Wagoner G., Drew P. D., Griffin P. R. a Burris T. P. (2011b) Suppression of th17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ror ligand *Nature* **472**, 491-494.
- Solt L. A., Wang Y., Banerjee S., Hughes T., Kojetin D. J., Lundasen T., Shin Y., Liu J., Cameron M. D., Noel R., Yoo S. H., Takahashi J. S., Butler A. A., Kamenecka T. M. a Burris T. P. (2012) Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic rev-erb agonists *Nature* **485**, 62-68.
- Srinivasan V., Spence D. W., Pandi-Perumal S. R., Trakht I. a Cardinali D. P. (2008) Jet lag: Therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs *Travel Med. Infect. Dis.* **6**, 17-28.
- Szüčová L., Spichal L., Doležal K., Zatloukal M., Greplová J., Galuszka P., Krystof V., Voller J., Popa I., Massino F., Jørgensen J.-E. a Strnad M. (2009) Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1938-1947.
- Tahara Y. a Shibata S. (2016) Circadian rhythms of liver physiology and disease: Experimental and clinical evidence *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 217-226.
- Tamai T. K., Nakane Y., Ota W., Kobayashi A., Ishiguro M., Kadofusa N., Ikegami K., Yagita K., Shigeyoshi Y., Sudo M., Nishiwaki-Ohkawa T., Sato A. a Yoshimura T. (2018) Identification of circadian clock modulators from existing drugs *EMBO Mol. Med.* **10**, 8724-8736.
- Tamaru T., Hirayama J., Isojima Y., Nagai K., Norioka S., Takamatsu K. a Sassone-Corsi P. (2009) Ck2alpha phosphorylates bmal1 to regulate the mammalian clock *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 446-448.
- Thorpy M. J. (2012) Classification of sleep disorders *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **9**, 687-701.
- Tricoire H., Malpoux B. a Møller M. (2003) Cellular lining of the sheep pineal recess studied by light-, transmission-, and scanning electron microscopy: Morphologic indications for a direct secretion of melatonin from the pineal gland to the cerebrospinal fluid *J. Comp. Neurol.* **456**, 39-47.
- Trump R. P., Bresciani S., Cooper A. W. J., Tellam J. P., Wojno J., Blaikley J., Orband-Miller L. A., Kashatus J. A., Boudjelal M., Dawson H. C., Loudon A., Ray D., Grant D., Farrow S. N.,

- Willson T. M. a Tomkinson N. C. O. (2013) Optimized chemical probes for rev-erb $\alpha$  *J. Med. Chem.* **56**, 4729-4737.
- Tsuchiya Y., Akashi M., Matsuda M., Goto K., Miyata Y., Node K. a Nishida E. (2009) Involvement of the protein kinase ck2 in the regulation of mammalian circadian rhythms *Sci. Signal.* **2**, ra26-ra26.
- Ueda H. R., Hayashi S., Chen W., Sano M., Machida M., Shigeyoshi Y., Iino M. a Hashimoto S. (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks *Nat. Genet.* **37**, 187-192.
- van Maanen A., Meijer A. M., van der Heijden K. B. a Oort F. J. (2016) The effects of light therapy on sleep problems: A systematic review and meta-analysis *Sleep Med Rev* **29**, 52-62.
- Vosko A. M., Colwell C. S. a Avidan A. Y. (2010) Jet lag syndrome: Circadian organization, pathophysiology, and management strategies *Nature and science of sleep* **2**, 187-198.
- Walton K. M., Fisher K., Rubitski D., Marconi M., Meng Q.-J., Sládek M., Adams J., Bass M., Chandrasekaran R., Butler T., Griffor M., Rajamohan F., Serpa M., Chen Y., Claffey M., Hastings M., Loudon A., Maywood E., Ohren J., Doran A. a Wager T. T. (2009) Selective inhibition of casein kinase 1 $\epsilon$  minimally alters circadian clock period *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 430-439.
- Wang N., Yang G., Jia Z., Zhang H., Aoyagi T., Soodvilai S., Symons J. D., Schnermann J. B., Gonzalez F. J., Litwin S. E. a Yang T. (2008) Vascular ppar $\beta$ ; controls circadian variation in blood pressure and heart rate through bmal1 *Cell Metab.* **8**, 482-491.
- Wang Y., Kumar N., Nuhant P., Cameron M. D., Istrate M. A., Roush W. R., Griffin P. R. a Burris T. P. (2010) Identification of sr1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors roralpha and rogamma *ACS Chem. Biol.* **5**, 1029-1034.
- Westrich L., Haddjeri N., Dkhissi-Benyahya O. a Sánchez C. (2015) Involvement of 5-ht7 receptors in vortioxetine's modulation of circadian rhythms and episodic memory in rodents *Neuropharmacology* **89**, 382-390.
- Williams D. B. a Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.
- Wong P. M., Hasler B. P., Kamarck T. W., Muldoon M. F. a Manuck S. B. (2015) Social jetlag, chronotype, and cardiometabolic risk *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 4612-4620.
- Wood J. G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S. L., Tatar M. a Sinclair D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans *Nature* **430**, 686-689.
- Wu C.-H., Wang C.-J., Chang C.-P., Cheng Y.-C., Song J.-S., Jan J.-J., Chou M.-C., Ke Y.-Y., Ma J., Wong Y.-C., Hsieh T.-C., Tien Y.-C., Gullen E. A., Lo C.-F., Cheng C.-Y., Liu Y.-W., Sadani A. A., Tsai C.-H., Hsieh H.-P., Tsou L. K. a Shia K.-S. (2015) Function-oriented development of cxcr4 antagonists as selective human immunodeficiency virus (hiv)-1 entry inhibitors *J. Med. Chem.* **58**, 1452-1465.

- Xu Y., Padiath Q. S., Shapiro R. E., Jones C. R., Wu S. C., Saigoh N., Saigoh K., Ptáček L. J. a Fu Y.-H. (2005) Functional consequences of a *ckiδ* mutation causing familial advanced sleep phase syndrome *Nature* **434**, 640-644.
- Yamaguchi S., Mitsui S., Yan L., Yagita K., Miyake S. a Okamura H. (2000) Role of *dbp* in the circadian oscillatory mechanism *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4773-4781.
- Yang H., Zhang W., Pan H., Feldser H. G., Lainez E., Miller C., Leung S., Zhong Z., Zhao H., Sweitzer S., Considine T., Riera T., Suri V., White B., Ellis J. L., Vlasuk G. P. a Loh C. (2012) Sirt1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of *nf-κb* activity *PLoS ONE* **7**, e46364.
- Zee P. C. a Vitiello M. V. (2009) Circadian rhythm sleep disorder: Irregular sleep wake rhythm type *Sleep medicine clinics* **4**, 213-218.
- Zhang W., Zhang J., Fang L., Zhou L., Wang S., Xiang Z., Li Y., Wisely B., Zhang G., An G., Wang Y., Leung S. a Zhong Z. (2012) Increasing human *th17* differentiation through activation of orphan nuclear receptor retinoid acid-related orphan receptor  $\gamma$  (*rory*) by a class of aryl amide compounds *Mol. Pharmacol.* **82**, 583-590.
- Zhu L. a Zee P. C. (2012) Circadian rhythm sleep disorders *Neurol. Clin.* **30**, 1167-1191.

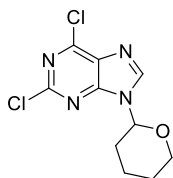
### **Internetové zdroje:**

- Mendelson W. (2007) Insomnia and travel: Challenges and solutions *Medscape Neurology*  
[https://www.medscape.org/viewarticle/551996\\_1](https://www.medscape.org/viewarticle/551996_1) (Accessed online at March 6, 2021).  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CX-4945&cntry=&state=&city=&dist=>  
(Accessed online at June10, 2021).

## PŘÍLOHY

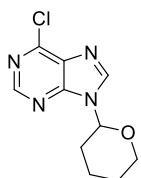
### Příloha 1: Fyzikálně chemické vlastnosti připravených látek

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



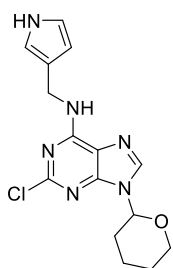
Bílá pevná látka, sumární vzorec:  $C_{10}H_{10}Cl_2N_4O$ , výtěžek: 44 %, HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,68; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 189,1 (100, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 191,1 (62, [<sup>35</sup>Cl,<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 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). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 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).

#### 6-chlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin (II)



Nažloutlá pevná látka, sumární vzorec:  $C_{10}H_{11}ClN_4O$ , výtěžek: 90 %, HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 14,32; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 155,1 (100, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 157,1 (32, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,56-1,61 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,69-1,79 (m, 1H, THP H4), 1,96-2,02 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,29-2,37 (m, 1H, THP H3'), 3,68-3,74 (m, 1H, THP H6), 3,99-4,03 (m, 1H, THP H6'), 5,78 (dd, *J* = 10,9; 2,3 Hz, 1H), 8,80 (s, 1H, pur H2), 8,92 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,2 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,6 (THP C3), 67,7 (THP C6), 81,6 (THP C2), 130,9 (pur C5), 145,6 (pur C8), 149,2 (pur C6), 151,3 (pur C4), 151,8 (pur C2).

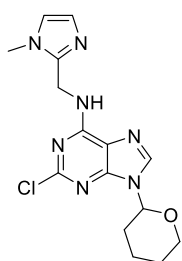
#### N-[(1H-pyrrol-3-yl)methyl]-2-chlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-amin (1)



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází PE/EtOAc (6:1, v/v) s gradientem EtOAc. Bílá pevná látka, sumární vzorec:  $C_{15}H_{17}ClN_6O$ , výtěžek: 44 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 20,45; 96,5. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 170,1 (40, [<sup>35</sup>Cl-Ade+H]<sup>+</sup>), 172,1 (12, [<sup>37</sup>Cl-Ade+H]<sup>+</sup>), 249,0 (92, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 251,0 (30, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 254,2 (52, [<sup>35</sup>Cl-Ade-THP+H]<sup>+</sup>), 256,0 (15, [<sup>37</sup>Cl-Ade-THP+H]<sup>+</sup>), 333,3 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>) 335,3 (40, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,68-1,77 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,95 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,16-2,24 (m, 1H, THP H3'), 3,65-3,70 (m, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, THP H6'), 4,58 (bd, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrrol), 5,56 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H, THP H2), 5,90 (s, 2H, pyrrol H3, pyrrol H4), 6,62 (dd, *J* = 4,1; 2,3 Hz, 1H, pyrrol H5), 8,37 (s, 1H, H8), 8,50 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, pur NH), 10,53 (bs, 1H, pyrrol

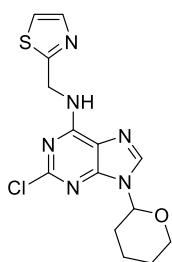
NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 22,3 (THP C4), 24,5 (THP C5), 29,9 (THP C3), 36,7 ( $\text{CH}_2$ -pyrrol), 67,6 (THP C6), 80,8 (THP C2), 105,9 (pyrrol C3), 107,2 (pyrrol C4), 117,1 (pyrrol H5), 118,1 (pur C5), 128,5 (pyrrol C2), 139,3 (pur C8), 149,2 (pur C4), 153,3 (pur C2), 154,7 (pur C6).

**2-chlor-*N*-[(1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (2)**



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec:  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{ClN}_7\text{O}$ , výtěžek: 47 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 12,77; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS  $m/z$  (intenzita, [ion]): 264,1 (80, [ $^{35}\text{Cl-M-THP+H}$ ]<sup>+</sup>), 266,1 (28, [ $^{37}\text{Cl-M-THP+H}$ ]<sup>+</sup>), 348,2 (100, [ $^{35}\text{Cl-M+H}$ ]<sup>+</sup>), 350,2 (30, [ $^{37}\text{Cl-M-THP+H}$ ]<sup>+</sup>).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,95 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,19 (qd,  $J = 11,9; 3,4$  Hz, 1H, THP H3'), 3,65-3,69 (m, 1H, THP H6), 3,71 (s, 3H, imidazol-Me), 3,98 (d,  $J = 12,2$  Hz, 1H, THP H6'), 4,63 (bd,  $J = 4,3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -imidazol), 5,56 (dd,  $J = 10,7; 1,5$  Hz, 1H, THP H2), 6,76 (s, 1H, imidazol H4), 7,05 (s, 1H, imidazol H5), 8,39 (s, 1H, pur H8), 8,65 (t,  $J = 4,9$  Hz, 1H, pur NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 22,3 (THP C4), 24,5 (THP C5), 29,9 (THP C3), 32,4 (imidazol-Me), 36,0 ( $\text{CH}_2$ -imidazol), 67,6 (THP C6), 80,8 (THP C2), 118,1 (pur C5), 121,6 (imidazol C5), 126,4 (imidazol C4), 139,6 (pur C8), 144,2 (imidazol C2), 149,3 (pur C4), 153,0 (pur C2), 154,6 (pur C6).

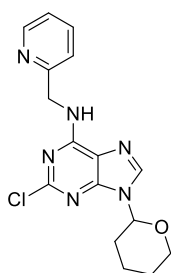
**2-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-*N*-[(thiazol-2-yl)methyl]-9*H*-purin-6-amin (3)**



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH a poté pomocí preparativní HPLC. Bílá pevná látka, sumární vzorec:  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_6\text{OS}$ , výtěžek: 91 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 20,16; 99,9 ESI<sup>+</sup>-MS  $m/z$  (intenzita, [ion]): 267,0 (100, [ $^{35}\text{Cl-M-THP+H}$ ]<sup>+</sup>), 269,0 (35, [ $^{37}\text{Cl-M-THP+H}$ ]<sup>+</sup>).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,68-1,77 (m, 1H, THP H4), 1,94 (bd,  $J = 10,7$  Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,21 (q,  $J = 11,3$  Hz, 1H, THP H3'), 3,66-3,71 (m, 1H, THP H6), 3,99 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1H, THP H6'), 4,90 (bd,  $J = 4,6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -thiazol), 5,58 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1H, THP H2), 7,59 (d,  $J = 3,1$  Hz, 1H, thiazol H5), 7,73 (d,  $J = 3,4$  Hz, 1H, thiazol H4), 8,44 (s, 1H, pur H8), 9,15 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H, pur NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,8 (THP C3), 41,6 ( $\text{CH}_2$ -thiazol), 67,7 (THP C6), 80,9 (THP C2), 118,2 (pur C5), 120,1 (thiazol C5), 140,0 (pur C8), 142,2 (thiazol C4), 149,6 (pur C4), 153,0 (pur C2), 154,6 (pur C6), 168,8 (thiazol C2).

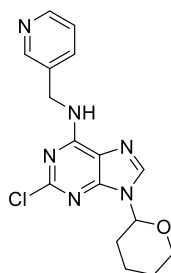


#### 2-chlor-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (4)



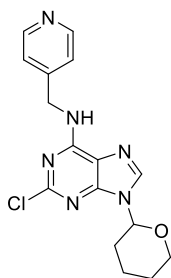
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec:  $C_{16}H_{17}ClN_6O$ , výtěžek: 87 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,47; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 261,1 (100, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 263,1 (30, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 345,2 (20, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>) 347,2 (8, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,56 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,68-1,77 (m, 1H, THP H4), 1,94 (bd, *J* = 9,2 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,22 (qd, *J* = 12,2; 3,5 Hz, 1H, THP H3'), 3,766-3,71 (m, 1H, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H, THP H6'), 4,74 (bd, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-py), 5,57 (d, *J* = 9,8 Hz, 1H, THP H2), 7,26 (dd, *J* = 7,0; 4,8 Hz, 1H, py H5), 7,29 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, py H3), 7,73 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, py H4), 8,42 (s, 1H, pur H8), 8,50 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H, py H6), 8,81 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,5 (THP C5), 29,9 (THP C3), 44,9 (CH<sub>2</sub>-py), 67,6 (THP H6), 80,9 (THP H2), 118,2 (pur C5), 120,8 (py C3), 122,1 (py C5), 136,7 (py C4), 139,6 (pur C8), 148,9 (py C6), 149,3 (pur C4), 153,2 (pur C2), 155,0 (pur C6), 158,0 (py C2).

#### 2-chlor-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (5)



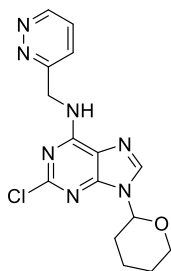
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Oranžová pevná látka, sumární vzorec:  $C_{16}H_{17}ClN_6O$ , výtěžek: 79 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,01; 99,1. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 345,2 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 347,2 (32, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,95 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,15-2,23 (m, 1H, THP H3'), 3,65-3,70 (m, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H, THP H6'), 4,64 (bd, *J* = 4,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-py), 5,56 (dd, *J* = 10,9; 2,0 Hz, 1H, THP H2), 7,34 (dd, *J* = 7,6; 4,9 Hz, 1H, py H5), 7,74 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, py H4), 8,40 (s, 1H, pur H8), 8,44 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, py H6), 8,57 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, py H2), 8,93 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C3), 41,0 (CH<sub>2</sub>-py), 67,6 (THP C6), 80,8 (THP C2), 118,1 (pur C5), 123,5 (py C5), 134,6 (py C3), 135,3 (py C4), 139,6 (pur C8), 148,0 (py C6), 148,8 (py C2), 149,3 (pur C4), 154,8 (pur C6).

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



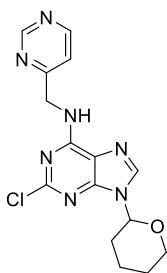
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH a poté pomocí preparativní HPLC. Světle hnědá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O, výtěžek: 87 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,36; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 345,2 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>) 347,2 (32, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,77 (m, 1H, THP H4), 1,93 (bd, *J* = 8,9 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,17-2,25 (m, 1H, THP H3'), 3,65-3,70 (m, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 4,66 (bd, *J* = 5,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-py), 5,56 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, THP H2), 7,30 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H, H<sub>o</sub>), 8,42 (s, 1H, H8), 8,48 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H, H<sub>m</sub>), 8,95 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C2), 42,3 (CH<sub>2</sub>-py), 67,6 (THP C6), 80,9 (THP C2), 118,15 (pur C5), 122,1 (2× C, py C<sub>o</sub>), 139,7 (pur C8), 148,2 (py C1), 149,4 (3× C, pur C4, py C<sub>m</sub>), 153,2 (pur C2), 154,9 (pur C6).

### 2-chlor-*N*-(pyridazin-3-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (7)



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>7</sub>O, výtěžek: 27 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,09; 97,8. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 262,1 (100, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 264,1 (30, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 346,2 (5, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,68-1,77 (m, 1H, THP H4), 1,93 (bd, *J* = 7,9 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,17-2,25 (m, 1H, THP H3'), 3,65-3,71 (m, 1H, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, THP H6'), 4,93 (bd, *J* = 5,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-pyridazin), 5,57 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H, THP H2), 7,60 (dd, *J* = 8,2; 1,5 Hz, pyridazin H4), 7,63 (td, *J* = 8,5; 4,8 Hz, pyridazin H5), 8,43 (s, 1H, pur H8), 8,96 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, pur NH), 9,13 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, pyridazin H6). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C3), 43,6 (CH<sub>2</sub>-pyridazin), 67,6 (THP C6), 80,9 (THP C2), 118,2 (pur C8), 125,3 (pyridazin C4), 127,2 (pyridazin C5), 139,8 (pur C8), 149,4 (pur C4), 150,7 (pyridazin C6), 153,1 (pur C2), 155,0 (pur C6), 160,4 (pyridazin C3).

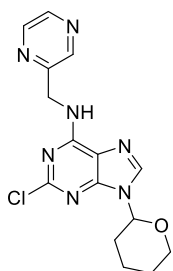
### 2-chlor-*N*-(pyrimidin-4-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (8)



Molecular Weight: 345,79

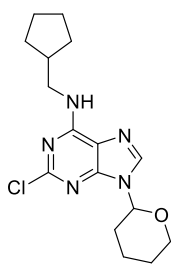
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Žlutá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>7</sub>O, výtěžek: 59 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,21; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 262,2 (100 [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 264,1 (34 [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 346,2 (18 [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 348,3 (5 [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1.54-1.59 (m, 2H, THP H3, THP H5'), 1.68-1.77 (m, 1H, THP H4), 1.94 (bd, *J* = 10.4 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2.22 (qd, *J* = 12.1, 3.7 Hz, 1H, THP H3'), 3.66-3.71 (m, 1H, THP H6), 3.99 (bd, *J* = 11.3 Hz, 1H, THP H6'), 4.72 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrimidin), 5.57 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, THP H2), 7.39 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, pyrimidin H5), 8.45 (s, 1H, pur H8), 8.69 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, pyrimidin H6), 8.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, pur NH), 9.10 (s, 1H, pyrimidin H2). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22.3 (THP C4), 24.5 (THP C5), 29.9 (THP C3), 44.6 (CH<sub>2</sub>-pyrimidin), 67.7 (THP C6), 80.9 (THP C2), 118.3 (pur C5), 118.6 (pyrimidin C5), 139.9 (pur C8), 149.5 (pur C4), 153.1 (pur C2), 155.0 (pur C6), 157.3 (pyrimidin C6), 158.2 (pyrimidin C2), 167.2 (pyrimidin C4).

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



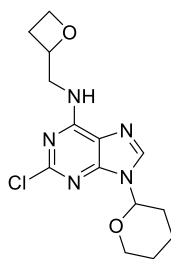
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>7</sub>O, výtěžek: 77 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,68; 98,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 262,1 (100, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 264,1 (30, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 346,3 (22, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 348,2 (8, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,77 (m, 1H, THP H4), 1,93 (bd, *J* = 8,6 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,17-2,25 (m, 1H, THP H3'), 3,65-3,70 (m, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 4,79 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrazin), 5,56 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, THP H2), 8,42 (s, 1H, pur H8), 8,52 (s, 1H, pyrazin H5), 8,57 (s, 1H, pyrazin H6), 8,63 (s, 1H, pyrazin H3), 8,90 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C3), 43,2 (CH<sub>2</sub>-pyrazin), 67,6 (THP C6), 80,9 (THP C2), 118,2 (pur C5), 139,7 (pur C8), 143,2 (pyrazin C5), 143,5 (pyrazin C3), 143,9 (pyrazin C6), 149,4 (pur C4), 153,1 (pur C2), 153,8 (pur C6), 154,9 (pyrazin C2).

### 2-chlor-*N*-(cyklopentylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (10)



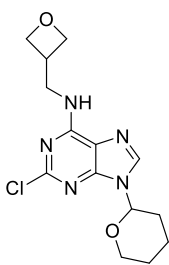
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází PE/EtOAc (4:1, v/v) s gradientem EtOAc. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>5</sub>O, výtěžek: 52 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 26,03; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 252,1 (65, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 254,1 (22, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 336,2 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 338,3 (38, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,22-1,28 (m, 2H, cP H2, cP H2'), 1,46-1,48 (m, 2H, cP H3, cyclop H3'), 1,53-1,59 (m, 4H, cP H4, cP H4', THP H5, THP H5'), 1,63-1,76 (m, 3H, cP H5, cP H5', THP H4), 1,92 (appear t, *J* = 10,1 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,15-2,26 (m, 2H, cP H1, THP H2), 3,33 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-cP), 3,64-3,69 (m, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 5,54 (dd, *J* = 11,0; 1,2 Hz, 1H, THP H2), 8,33 (s, 1H, pur H8), 8,35 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 24,7 (2× C; cP C3, cP C4); 29,5 (cP C5); 29,7 (cP C2); 29,9 (THP C3); 38,8 (cP C1); 44,7 (CH<sub>2</sub>-cP), 67,6 (THP C6), 80,82 (THP C2), 117,9 (pur C5), 139,0 (pur C8), 149,0 (pur C4), 153,3 (pur C2), 155,1 (pur C6).

### 2-chlor-*N*-(oxetan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (11)



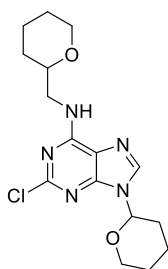
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH a poté pomocí preparativní HPLC. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 80 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,57; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 240,2 (36, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 242,2 (12, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 324,3 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 326,3 (32, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,93 (appear t, *J* = 10,9 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,20 (qd, *J* = 12,0; 3,3 Hz, 1H, THP H3'), 2,41-2,46 (m, 1H, oxetan H3), 2,58-2,64 (m, 1H, oxetan H3'), 3,60-3,70 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-oxetan, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 4,39-4,44 (m, 1H, oxetan H4), 4,49 (dd, *J* = 13,9; 7,5 Hz, 1H, oxetan H4'), 4,85-4,89 (m, 1H, oxetan H2), 5,55 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H, THP H2), 8,38 (s, 1H, pur H8), 8,39 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,5 (THP C5), 24,7 (oxetan C3), 29,9 (THP C3), 45,5 (CH<sub>2</sub>-oxetan), 67,4 (oxetan C4), 67,6 (THP C6), 79,1 (oxetan C2), 80,8 (THP C2), 118,0 (pur C6), 139,4 (pur C8), 149,3 (pur C4), 153,2 (pur C2), 155,2 (pur C6).

### 2-chlor-*N*-(oxetan-3-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (12)



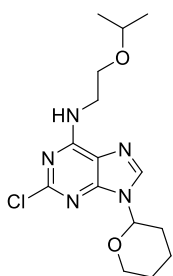
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 85 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,13; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 240,2 (80, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 242,2 (28, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 324,2 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 326,3 (32, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,92 (appear t, *J* = 11,2 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,19 (q, *J* = 11,3 Hz, 1H, THP H3'), 3,17-3,25 (m, 1H, oxetan H3), 3,65-3,71 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-oxetan, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 4,35 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, oxetan H2, oxetan H4), 4,62 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, oxetan H2', oxetan H4'), 5,55 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H, THP H2), 8,37 (s, 1H, pur H8), 8,52 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C3), 34,2 (oxetan C3), 42,7 (CH<sub>2</sub>-oxetan), 67,6 (THP C6), 74,0 (2× C, oxetan C2, oxetan C4), 80,8 (THP C2), 118,0 (pur C5), 139,3 (pur C8), 149,2 (pur C4), 153,2 (pur C2), 155,1 (pur C6).

### 2-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)methyl]-9*H*-purin-6-amin (13)



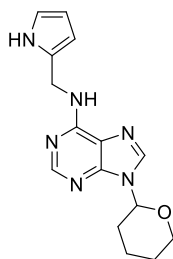
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 87 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,54; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 268,1 (20, [<sup>35</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 270,2 (5, [<sup>37</sup>Cl-M-THP+H]<sup>+</sup>), 352,3 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 354,2 (35, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,14-1,21 (m, 1H, C6 THP H3), 1,43 (bs, 3H, C6 THP H4, C6 THP H5, C6 THP H5'), 1,53-1,55 (m, 2H, N9 THP H5, N9 THP H5'), 1,59 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, C6 THP H3'), 1,70-1,75 (m, 2H, C6 THP H4', N9 THP H4), 1,92 (appear t, *J* = 11,3 Hz, 2H, N9 THP H3, N9 THP H4'), 2,18 (td, *J* = 11,7; 3,4 Hz, 1H, N9 THP H3'), 3,27-3,30 (m, 1H, C6 THP H6), 3,36-3,40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-THP), 3,44-3,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-THP, C6 THP H2), 3,65-3,70 (m, 1H, N9 THP H6), 3,84 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, C6 THP H6'), 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, N9 THP H6'), 5,54 (dd, *J* = 11,0, 1,5 Hz, 1H, N9 THP H2), 8,16 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, pur NH), 8,36 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,3 (C6 THP C4), 22,6 (N9 THP C4), 24,5 (N9 THP C5), 25,6 (C6 THP C5), 29,1 (C6 THP C3), 29,9 (N9 THP C3), 44,9 (CH<sub>2</sub>-THP), 67,2 (C6 THP C6), 67,6 (N9 THP C6), 75,2 (C6 THP C2), 80,8 (N9 THP C2), 118,0 (pur C5), 139,3 (pur C8), 149,1 (pur C4), 153,2 (pur C2), 155,0 (pur C6).

### 2-chlor-*N*-(2-isopropoxyethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (14)



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází PE/EtOAc (4:1, v/v) s gradientem EtOAc. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 54 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,12; 99,1. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 340,3 (100, [<sup>35</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>), 342,2 (32, [<sup>37</sup>Cl-M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,06 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,55 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,93 (appear t, *J* = 11,2 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,20 (qd, *J* = 12,2; 3,6 Hz, 1H, THP H3'), 3,53 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,57 (sept, *J* = 6,1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,65-3,70 (m, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, THP H6'), 5,55 (dd, *J* = 10,9; 1,4 Hz, 1H, THP H2), 8,20 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H, pur NH), 8,36 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,0 (2× C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22,3 (THP C4), 24,4 (THP C5), 29,9 (THP C3), 40,0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 65,2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 67,6 (THP C6), 70,6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 80,8 (THP C2), 118,0 (pur C5), 139,3 (pur C8), 149,1 (pur C4), 153,3 (pur C2), 155,1 (pur C6).

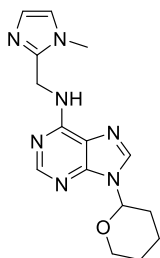
### *N*-[(1*H*-pyrrol-2-yl)methyl]-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (15)



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází PE/EtOAc (4:1, v/v) s gradientem EtOAc. Oranžovo hnědá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O, výtěžek: 46 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,78; 98. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 136,0 (22, [Ade+H]<sup>+</sup>), 215,1 (40, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 220,2 (72, [Ade-THP+H]<sup>+</sup>), 299,1 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,56 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,96 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,22-2,29 (m, 1H, THP H3'), 3,63-3,68 (m, 1H, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, THP H6'), 4,61 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrrol), 5,62 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H, THP H2), 5,88 (bd, *J* = 2,4 Hz, 2H, pyrrol H3, pyrrol H4), 6,61 (s, 1H, pyrrol H5), 7,96 (bs, 1H, pur NH), 8,26 (bs, 1H, pur H2), 8,34 (s, 1H, pur H8), 10,52 (bs, 1H, pyrrol NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 23,0 (THP C4), 25,0 (THP C5), 30,5 (THP C3), 37,0 (CH<sub>2</sub>-pyrrol), 68,2 (THP C6), 81,3 (THP C2), 106,2 (pyrrol C3), 107,5 (pyrrol C4), 117,5 (pyrrol C5), 119,5 (pur C5), 129,9 (pyrrol C2), 139,3 (pur C8), 148,8 (pur C4), 153,1 (pur C2), 154,7 (pur C6).

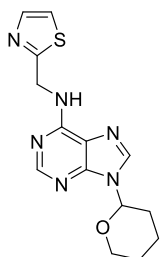
***N*-[(1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin**

**(16)**



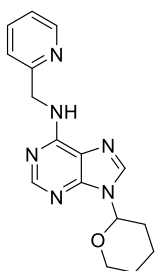
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O, výtěžek: 38 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 8,38; 98,6. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 230,1 (68, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 314,1 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55-1,59 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,68-1,73 (m, 1H, THP H4), 1,91-1,97 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,22-2,30 (m, 1H, THP H3'), 3,64-3,69 (m, 4H, imidazol-Me, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 4,72 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-imidazol), 5,62-5,64 (m, 1H, THP H2), 6,75 (s, 1H, imidazol H4), 7,05 (s, 1H, imidazol H5), 8,00 (bs, 1H, pur NH), 8,25 (s, 1H, pur H2), 8,36 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,0 (THP C3), 32,4 (imidazol-Me), 36,0 (CH<sub>2</sub>-imidazol), 67,7 (THP C6), 80,9 (THP C2), 119,2 (pur C5), 121,6 (imidazol C5), 126,3 (imidazol C4), 139,0 (pur C8), 144,8 (imidazol C2), 148,6 (pur C4), 152,4 (pur C2), 154,0 (pur C6).

**9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (17)**



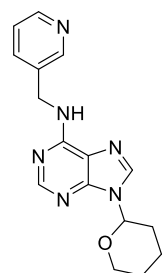
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>OS, výtěžek: 11 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 15,65; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 233,1 (100, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 317,2 (40, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55-1,60 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,93-1,97 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,28 (q, *J* = 10,7 Hz, 1H, THP H3'), 3,64-3,69 (m, 1H, THP H6), 3,99 (dd, *J* = 10,9; 2,0 Hz, 1H, THP H6'), 4,95 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-thiazol), 5,64 (dd, *J* = 11,0; 2,1 Hz, 1H, THP H2), 7,55 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, thiazol H5), 7,71 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, thiazol H4), 8,25 (s, 1H, pur H2), 8,41 (s, 1H, pur H8), 8,67 (bs, 1H, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 29,9 (THP C3), 41,5 (CH<sub>2</sub>-thiazol), 67,7 (THP C6), 80,9 (THP C), 119,2 (pur C5), 119,7 (thiazol C5), 139,4 (pur C8), 142,3 (thiazol C4), 148,7 (pur C4), 152,5 (pur C2), 153,9 (pur C6), 170,4 (thiazol C2).

### ***N*-(pyridin-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (18)**



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O, výtěžek: 51 %, HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %):15,63; 99,3. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 227,2 (100, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 311,3 (12, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,55-1,59 (m, 2H, THP H5, THP H5<sup>′</sup>), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,94 (appear t, *J* = 12,7 Hz, 2H, THP H3, THP H4<sup>′</sup>), 2,25-2,31 (m, 1H, THP H3<sup>′</sup>), 3,66 (td, *J* = 11,0; 3,8 Hz, 1H, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6<sup>′</sup>), 4,78 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-py), 5,63 (dd, *J* = 11,0; 1,8 Hz, 1H, THP C2), 7,22 (dd, *J* = 4,9; 2,5 Hz, 1H, py H5), 7,26 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, py H3), 7,69 (td, *J* = 7,7; 1,7 Hz, 1H, py H4), 8,19 (s, 1H, pur H2), 8,35 (bs, 1H), 8,39 (bs, 1H, pur H8), 8,49 (ddd, *J* = 4,9; 1,5; 0,9 Hz, 1H, py H6). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,4 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,0 (THP C3), 44,9 (CH<sub>2</sub>-py), 67,7 (THP C6), 80,9 (THP C2), 119,1 (pur C5), 120,6 (py C3), 122,0 (py C5), 136,6 (py C4), 139,0 (pur C8), 148,5 (pur C4), 148,8 (py C6), 152,6 (pur C2), 154,4 (pur C6), 159,0 (py C2).

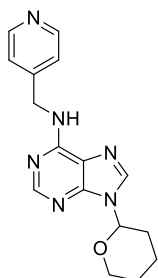
### ***N*-(pyridin-3-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (19)**



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O, výtěžek: 54 %, HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 14,48; 99,1. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 227,1 (25, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 311,2 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,54 (bs, 2H, THP H5, THP H5<sup>′</sup>), 1,65-1,74 (m, 1H, THP H4), 1,92 (appear t, *J* = 12,2 Hz, 2H, THP H3, THP H4<sup>′</sup>), 2,25 (q, *J* = 10,6 Hz, 1H, THP H3<sup>′</sup>), 3,65 (td, *J* = 11,0; 3,6 Hz, 1H, THP H6), 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6<sup>′</sup>), 4,71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-py), 5,62 (dd, *J* = 11,0; 1,8 Hz, 1H, THP H2), 7,30 (dd, *J* = 7,5; 4,7 Hz, 1H, py H5), 7,72 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, py H4), 8,22 (s, 1H, pur H2), 8,36 (s, 1H, pur H2), 8,41 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H, py H6), 8,45 (bs, 1H, pur NH), 8,57 (s, 1H, py H2). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,4 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,0 (THP C3), 40,7 (CH<sub>2</sub>-py), 67,6 (THP C6), 80,8 (THP C2), 119,0 (pur C5), 123,4 (py C5), 135,0 (py C4), 135,4 (py C3), 139,0 (pur C8), 147,9 (py C6), 148,4 (pur C4), 148,8 (py C2), 152,5 (pur C2), 154,2 (pur C6).

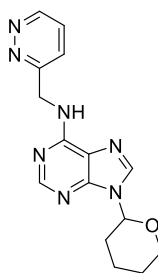


### ***N*-(pyridin-4-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (20)**



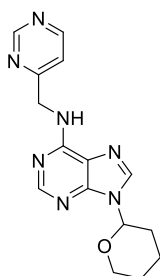
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH a poté prostřednictvím preparativní HPLC. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O, výtěžek: 95 %, HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,02; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 227,2 (12, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 311,2 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,56 (bs, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,94 (appear t, *J* = 12,5 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,27 (q, *J* = 11,2 Hz, 1H, THP H3'), 3,66 (td, *J* = 11,0; 3,7 Hz, 1H, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, THP H6'), 4,70 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-py), 5,63 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H, THP H2), 7,29 (d, *J* = 4,6 Hz, 2H, py H<sub>o</sub>), 8,19 (s, 1H, pur H2), 8,39 (bs, 1H, pur H8), 8,46 (bs, 3H, py H<sub>m</sub>, pur NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,4 (THP C4), 24,5 (THP C5), 29,9 (THP C3), 42,1 (CH<sub>2</sub>-py), 67,6 (THP C6), 80,8 (THP C2), 119,0 (pur C8), 122,0 (2× C, py C<sub>o</sub>), 139,1 (pur C8), 148,5 (pur C4), 149,1 (py C1), 149,4 (2× C, py C<sub>m</sub>), 152,5 (pur C2), 154,3 (pur C6).

### ***N*-(pyridazin-3-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (21)**



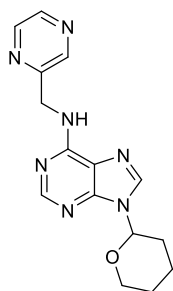
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Světle hnědá pevná látka, sumární vzorec C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O, výtěžek: 60%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 12,68; 99,9 %. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 228,2 (100, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 312,3 (65 [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,54-1,59 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,94 (t, *J* = 13,0 Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,26 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H, THP H3'), 3,64-3,69 (m, 1H, THP H6), 3,98-4,00 (m, 1H, THP H6'), 4,97 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-pyridazin), 5,63 (dd, *J* = 11,0; 1,8 Hz, 1H, THP H2), 7,55 (dd, *J* = 8,6; 1,5 Hz, 1H, pyridazin H4), 7,60 (dd, *J* = 8,6; 4,9 Hz, 1H, pyridazin H5), 8,20 (s, 1H, pur H2), 8,40 (bs, 1H, pur H8), 8,51 (bs, 1H, pur NH), 9,10 (dd, *J* = 4,7; 1,7 Hz, 1H, pyridazin H6). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,0 (THP C3), 43,5 (CH<sub>2</sub>-pyridazin), 67,7 (THP C5), 80,9 (THP C2), 119,2 (pur C5), 125,0 (pyridazin C4), 127,2 (pyridazin C5), 139,2 (pur C8), 148,5 (pur C4), 150,6 (pyridazin C6), 152,5 (pur C2), 154,3 (pur C6), 161,3 (pyridazin C3).

### ***N*-(pyrimidin-4-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (22)**



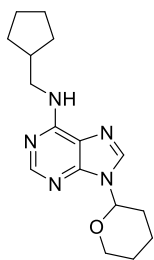
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH a poté pomocí preparativní HPLC. Světle žlutá pevná látka, sumární vzorec  $C_{15}H_{17}N_7O$ , výtěžek: 33%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,31; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 228,2 (100, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 312,2 (60, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,55-1,59 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP 4), 1,94 (t,  $J = 12,2$  Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,26-2,62 (m, 1H, THP H3'), 3,64-3,69 (m, 1H, THP H6), 3,99 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1H, THP H6'), 4,75 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrimidin), 5,64 (dd,  $J = 11,3; 1,8$  Hz, 1H, THP H2), 7,34 (d,  $J = 4,9$  Hz, 1H, pyrimidin H5), 8,18 (s, 1H, pur H2), 8,42 (bs, 1H, pur H8), 8,45 (s, 1H, pur NH), 8,66 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H, pyrimidin H6), 9,08 (d,  $J = 1,1$  Hz, 1H, pyrimidin H2). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,0 (THP C3), 44,6 (CH<sub>2</sub>-pyrimidin), 67,7 (THP C4), 80,9 (THP C2), 118,4 (pyrimidin C5), 119,2 (pur C5), 139,3 (pur C8), 148,5 (pur C4), 152,5 (pur C2), 154,3 (pur C6), 157,2 (pyrimidin C6), 158,1 (pyrimidin C2), 168,1 (pyrimidin C4).

### ***N*-(pyrazin-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (23)**



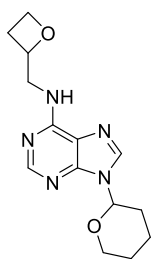
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Bílá látka, sumární vzorec:  $C_{15}H_{17}N_7O$ , výtěžek: 43 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,69; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 228,1 (100, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 312,3 (62, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,56-1,58 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,70-1,72 (m, 1H, THP H4), 1,94 (t,  $J = 11,3$  Hz, 2H, THP H3, THP H4'), 2,27 (q,  $J = 11,4$  Hz, 1H, THP H3'), 3,66 (td,  $J = 11,3; 3,7$  Hz, 1H, THP H6), 3,99 (d,  $J = 11,6$  Hz, 1H, THP H6'), 4,83 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrazin), 5,63 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1H, THP H2), 8,20 (s, 1H, pur H2), 8,39 (s, 1H, pur H8), 8,43 (bs, 1H, pur NH), 8,49 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H, pyrazin H6), 8,55 (s, 1H, pyrazin H5), 8,58 (s, 1H, pyrazin H3). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,00 (THP C3), 43,2 (CH<sub>2</sub>-pyrazin), 67,7 (THP C6), 80,9 (THP C2), 119,2 (pur C5), 139,2 (pur C8), 143,0 (pyrazin C6), 143,2 (pyrazin C3), 143,9 (pyrazin C5), 148,6 (pur C4), 152,5 (pur C2), 154,3 (pur C6), 154,7 (pyrazin C2).

### ***N*-(cyclopentylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (24)**



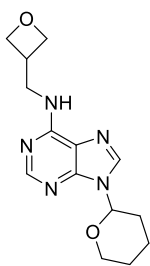
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0, v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O, výtěžek: 80 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 22,1; 98,2. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 218,1 (62, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 302,3 (100 [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,22-1,29 (m, 2H, cP H2, cP H2'), 1,46-1,50 (m, 2H, cP H3, cP H3'), 1,54-1,60 (m, 4H, cP H4, cP H4', THP H5, THP H5'), 1,61-1,66 (m, 2H, cP H5, cP H5'), 1,69-1,72 (m, 1H, THP C4), 1,90-1,96 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,22-2,29 (m, 2H, cP H1, THP H3'), 3,38 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>-cP), 3,63-3,68 (m, 1H, THP H6), 3,99 (dd, *J* = 10,7; 1,5 Hz, 1H, THP H6'), 5,60 (dd, *J* = 11,0; 1,8 Hz, 1H, THP H2), 7,84 (bs, 1H, pur NH), 8,19 (bs, 1H, pur H2), 8,31 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 24,7 (2× C, cP C3, cP C4), 29,7 (2× C, cP C2, cP C5), 30,0 (THP C3), 39,0 (cP C1), 44,5 (CH<sub>2</sub>-cP), 67,6 (THP C6), 80,7 (THP C2), 118,8 (pur C5), 138,4 (pur C8), 148,1 (pur C4), 152,6 (pur C2), 154,6 (pur C6).

### ***N*-(oxetan-2-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (25)**



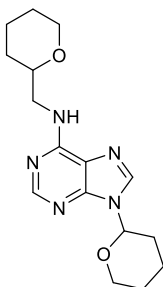
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 83 %. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 14,09; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* (intenzita, [ion]): 206,2 (18, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 290,2 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,54-1,59 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,66-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,96 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,25 (q, *J* = 10,6, 1H, THP H3'), 2,41-2,46 (m, 1H, oxetan H3), 2,57-2,63 (m, 1H, oxetan H3'), 3,63-3,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-oxetan, THP H6), 3,78 (bs, 1H, CH<sub>2</sub>-oxetan), 3,99 (dd, *J* = 10,9; 1,7 Hz, 1H, THP H6'), 4,39-4,43 (m, 1H, oxetan H4), 4,48 (m, 1H, oxetan H4'), 4,85-4,90 (m, 1H, oxetan H2), 5,62 (dd, *J* = 11,0; 1,5 Hz, 1H, THP H2), 7,84 (bs, 1H, pur NH), 8,22 (bs, 1H, pur H2), 8,34 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 24,7 (oxetan C3), 30,0 (THP C3), 45,3 (CH<sub>2</sub>-oxetan), 67,4 (oxetan C4), 67,6 (THP C6), 79,4 (oxetan C2), 80,8 (THP C2), 119,0 (pur C5), 138,8 (pur C8), 148,3 (pur C4), 152,5 (pur C2), 154,6 (pur C6).

### ***N*-(oxetan-3-ylmethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (26)**



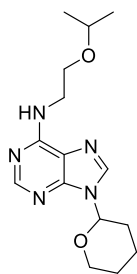
Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Přečištěno preparativní HPLC. Fyzikální vlastnosti: Bezbarvý gel, sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 43%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,62; 42,6. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 206,2 (28 [M-THP+H]<sup>+</sup>), 290,3 (100, [M+H]<sup>+</sup>). Látku se nepodařilo přečistit. Změření NMR spektra bude provedeno v budoucnu.

### **9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)methyl]-9*H*-purin-6-amin (27)**



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Přečištěno preparativní HPLC. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 72%. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 19,18; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 234,2 (8, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 318,3 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,14-1,22 (m, 1H, *N*9 THP H3), 1,43 (bs, 3H, C6 THP H4, C6 THP H5, C6 THP H5'), 1,56 (bs, 2H, *N*9 THP H5, *N*9 THP H5'), 1,60 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H, C6 THP H3'), 1,67-1,75 (m, 2H, C6 THP H4', *N*9 THP H4), 1,90-1,96 (m, 2H, *N*9 THP H3, *N*9 THP H4'), 2,26 (q, *J* = 10,1 Hz, 1H, *N*9 THP H3'), 3,26-3,31 (m, 1H, C6 THP H6), 3,48 (bs, 3H, CH<sub>2</sub>-THP, C6 THP H2), 3,63-3,68 (m, 1H, *N*9 THP H6), 3,84 (dd, *J* = 11,3, 2,1 Hz, 1H, C6 THP H6'), 3,99 (dd, *J* = 10,9; 1,4 Hz, 1H, *N*9 THP H6'), 5,61 (dd, *J* = 11,0; 1,5 Hz, 1H, *N*9 THP H2), 7,60 (bs, 1H, pur NH), 8,21 (s, 1H, pur H2), 8,33 (s, 1H, pur H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,5 (C6 THP C4), 22,6 (*N*9 THP C4), 24,5 (*N*9 THP C5), 25,7 (C6 THP C5), 29,1 (C6 THP C3), 30,0 (*N*9 THP C3), 44,7 (CH<sub>2</sub>-THP), 67,3 (C6 THP C6), 67,7 (*N*9 THP C6), 75,5 (C6 THP C2), 80,8 (*N*9 THP C2), 118,9 (pur C5), 138,7 (pur C8), 148,2 (pur C4), 152,5 (pur C2), 154,4 (pur C6).

### ***N*-(2-isopropoxyethyl)-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-amin (28)**



Purifikováno sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/MeOH (100:0 v/v) s gradientem MeOH. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, výtěžek: 74 %, HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,52; 99,9. ESI<sup>+</sup>-MS m/z (intenzita, [ion]): 222,2 (8, [M-THP+H]<sup>+</sup>), 306,1 (100, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,06 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,54-1,58 (m, 2H, THP H5, THP H5'), 1,67-1,76 (m, 1H, THP H4), 1,90-1,96 (m, 2H, THP H3, THP H4'), 2,26 (q, *J* = 10,7 Hz, 1H, THP H3'), 3,52-3,58 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,63-3,68 (m, 1H, THP H6), 3,99 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, THP H6'), 5,61 (dd, *J* = 10,9; 1,4 Hz, 1H, THP H2), 7,62 (bs, 1H, pur NH), 8,22 (bs, 1H, H2), 8,33 (s, 1H, H8). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm): 22,1 (2x C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),

22,5 (THP C4), 24,5 (THP C5), 30,0 (THP C3), 39,7 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 65,7 ( $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 67,7 (THP C6), 70,8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{O}}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 80,8 (THP C2), 119,0 (pur C5), 138,7 (pur C8), 148,3 (pur C4), 152,6 (pur C2), 154,5 (pur C6).

**Příloha 2: Hodnocení toxicity syntetizovaných látek (CD)**