



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu
s potencionálními neuroprotektivními účinky v *in vitro*
modelu Parkinsonovy choroby**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Helena Kordinová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Václav Mik, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Helena Kordinová
Název práce	Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potencionálními neuroprotektivními účinky v <i>in vitro</i> modelu Parkinsonovy choroby
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Látky s purinovým strukturním motivem mají celou řadu farmakologických účinků včetně efektů na nervovou tkáň. Cílem experimentální části bylo připravit knihovnu nových purinových derivátů a otestovat jejich aktivitu v <i>in vitro</i> modelu Parkinsonovy nemoci. Test byl založen na toxinem indukovaném mitochondriálním poškození s následným měřením viability buněk pomocí Calcein AM testu. Čtyři z připravených látek (3, 5, 6, 9) výrazně zvyšovaly přežití buněk a některé zcela eliminovaly přítomnost toxinu v kultivačním médiu. Připravené látky jsou tak zajímavé z hlediska neuroprotektivity a ukazují možný potenciál při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Přesný mechanismus působení připravených látek není ale známý a do budoucna bude cílem dalších studií.</p>
Klíčová slova	Parkinsonova choroba, 2,6,9-trisubstituované puriny, syntéza, neuroprotektce, biologická aktivita
Počet stran	50
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Helena Kordinová
Title of thesis	Synthesis of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives with potential neuroprotective effect in in vitro model of Parkinson's disease.
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>Purine based compounds possess a wide spectrum of pharmacological activities including effects on neuronal tissue. The aim of this study was the synthesis of a library of new purine derivatives and testing of their activity in <i>in vitro</i> model of Parkinson's disease. The test was based on a toxin induced mitochondrial damage with a subsequent measurement of cell viability by Calcein AM assay. Four of the prepared substances (compounds 3, 5, 6 and 9) significantly increased cell survival and some of them were able to completely counteract toxin induced effect. The most active compounds displayed potent neuroprotective activity and they might find an application for the treatment of neurodegenerative diseases. The specific mechanism of their action is not known yet, and it will be the aim of future studies.</p>
Keywords	Parkinson's disease, 2,6,9-trisubstituted purine, synthesis, neuroprotection, biological activity
Number of pages	50
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Helena Kordinová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu, čas a cenné rady. Dále Mgr. Gabrielu Gonzalezovi a Bc. Veronice Górové za biologické testování syntetizovaných látek, Mgr. Haně Omámkové za změření a zpracování HPLC/MS dat, Mgr. Janě Kocířové za asistenci a pomoc při měření elementárního složení látek a v neposlední řadě celému kolektivu laboratoře organické syntézy na Oddělení chemické biologie a genetiky CRH za jejich vstřícnost a rady během práce v laboratoři.

Tato práce vznikla za finanční podpory univerzitního grantu IGA_PrF_2020_21.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
2. PARKINSONOVA NEMOC	10
2.1. Dopamin a dopaminové signální dráhy.....	11
2.2. Patogeneze a farmakoterapie PN.....	13
2.2.1. Agregace a nesprávné složení proteinů	14
2.2.2. Dopaminové ztráty	15
2.2.3. Další molekulární cíle	20
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3. MATERIÁL A METODY.....	26
3.1. Přístrojové vybavení.....	26
3.2. Použité chemikálie	26
3.3. Metody	26
3.4. Syntéza.....	27
3.4.1. Substituce purinu v poloze N9.....	27
3.4.2. Finální látky se symetrickou substitucí v polohách C2 a C6.....	29
3.4.3. Syntéze látek s asymetrickými substituenty v polohách C2 a C6.....	29
3.4.4. Optimalizace syntézy C2, C6 symetricky substituovaných látek pomocí mikrovlnného záření.....	30
3.4.5. Biologické testování	31
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
4.1. Syntéza	32
4.2. Biologické testování	35
5. ZÁVĚR.....	37
6. POUŽITÁ LITERATURA.....	38
Přílohy	45

SEZNAM ZKRATEK

α -syn	α -synuklein
AMPA	receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny
bs	široký singlet
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
COMT	katechol-O-methyltransferáza (EC 2.1.1.6)
d	doublet
DIAD	diisopropyl-azodikarboxylát
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>J</i>	štěpící konstanta
m	multiplet
MAO	monoaminoxidáza (EC 1.4.3.4)
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDAR	<i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
PN	Parkinsonova nemoc
PPh ₃ O	trifenylfosfin oxid
s	singlet
t	triplet
TLC	tenkovrstevná chromatografie
VMAT2	vezikulární monoaminový transportér 2
δ	chemický posun

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Parkinsonova nemoc (PN) je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění postihující hlavně osoby nad 60 let. Uvádí se, že prevalence je v 65 letech věku kolem 1-2 % populace, v 85 letech je to už 4-5 %. Hlavním patologickým rysem je značný úbytek dopaminergních neuronů v mozkové tkáni v oblasti bazálních gangliích. Následkem je nedostatek dopaminu, který se u pacienta projevuje především poruchou motoriky s typickými příznaky jako bradykineze, rigidita, posturální nestabilita nebo klidový třes. Doposud existuje léčba pouze symptomatická, kdy jsou léčeny příznaky nemoci, nebo substituční, jejíž snahou je nahradit chybějící dopamin. Nejpoužívanějším lékem při léčbě PN je L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), metabolický prekurzor dopaminu, který je aplikován v kombinaci s inhibitory metabolismu dopaminu nebo agonisty dopaminergních receptorů. Mechanismus vzniku a rozvoje onemocnění není zcela známý, existuje řada faktorů zapojujících se do patogeneze onemocnění, a díky tomu je i mnoho farmakologických cílů, na které se dá cílit.

Cíle práce:

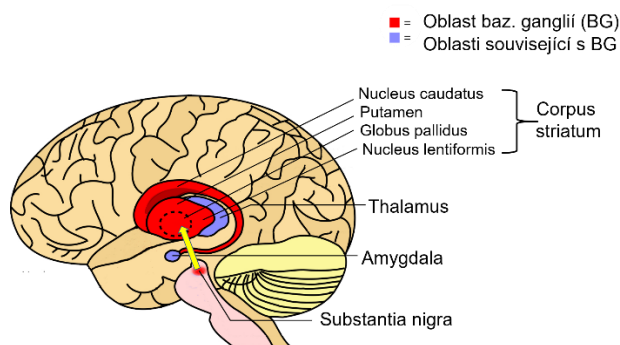
- Rešerše literatury na téma Parkinsonova choroba a přehled látek s neuroprotektivní aktivitou ve vztahu k Parkinsonově chorobě
- Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potencionálními neuroprotektivními účinky
- Testování biologické aktivity připravených látek

TEORETICKÁ ČÁST

2. PARKINSONOVA NEMOC

Parkinsonova nemoc (PN) je hned po Alzheimerově chorobě druhým nejběžnějším neurodegenerativním onemocněním ve starší populaci (Cacabelos, 2017). Ve věku nad 65 let se udává, že PN postihuje 1-2 % populace a výskyt roste až na 4-5 % u pacientů nad 85 let (Maiti a kol., 2017). Na základě získaných údajů se odhaduje, že celosvětově s narůstajícím věkem roste i počet nemocných, a to v průměru na 41 osob/ 100 000 obyvatel ve věku 40-49 let; 107 ve věku 50-59 let; 428 ve věku 60-69 let; 1087 ve věku 70-70 let a 1903 osob na 100 000 obyvatel ve věku nad 80 let (Cacabelos, 2017). Z geografického hlediska se dále odhaduje, že průměrný výskyt PN je 1601 na 100 000 obyvatel v Severní Americe, Evropě a Austrálii, a zhruba 646 na 100 000 obyvatel v Asii. Častější výskyt PN je zaznamenán u mužů oproti ženám, a to v poměru 3:2 (Kalia a kol., 2013). Vzhledem k nárůstu průměrné délky života a k tomu, že populace stárne, se očekává, že do roku 2030 počet nemocných s PN vzroste o více než 50 % (Dorsey a kol., 2007). Situace v ČR byla v roce 2015 odhadována na 1000-3000 nemocných na 100 000 obyvatel (Feigin, 2017).

PN je charakteristická pro značný úbytek dopaminergních neuronů, ke kterému dochází hlavně v oblasti bazálních ganglií, konkrétně pak v části substantia nigra pars compacta (Obr. 1). Následkem je nedostatek dopaminu, který se u pacientů projevuje pohybovými motorickými poruchami, které z diagnostického hlediska mají tyto 4 hlavní příznaky: klidový třes, bradykinezi (pohybové zpomalení), rigiditu (tuhost, neohebnost) a posturální nestabilitu (ztráta schopnosti držet tělo ve vzpřímené poloze) (Kalia a Lang, 2015). PN byla diagnostikována i u slavných osobností – u herců Alana Aldy, Iana Holma, Boba Hoskinse, Robina Williamse, zpěváků Neila Diamonda, Ozzyho Osbourny, boxera Muhammada Aliho, papeže Jana Pavla II., a bývalého prezidenta USA George H. W. Bushe (Parkinson.org).



Obr. 1: Schéma mozku s vyznačenými oblastmi bazálních ganglií, thalamem, corpus striatem a amygdalou, které jsou důležité z hlediska PN. V bazálních gangliích dochází k výraznému úbytku dopaminergních neuronů. Žlutá šipka značí nigrostriální dráhu. Převzato a upraveno z Wikipedie1.

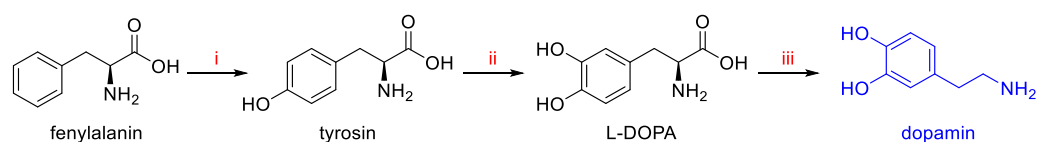
Dále se pak také mohou objevovat poruchy nemotorické, které zahrnují poruchy čichu, spánku, psychické problémy, kognitivní poškození, bolesti, únavu a autonomní disfunkci (Kalia a Lang, 2015). Nemotorické příznaky se mohou vyskytovat ještě před samotnou diagnózou PN a motorickými příznaky, a to i o více než 20 let (Postuma a kol., 2012). Tato doba se označuje jako pre-motorická, a kromě již zmíněných obtíží jako je zhoršení čichu, deprese a únava, se mohou objevovat časté zácpy, zvýšená spavost v průběhu dne a abnormální chování během REM fáze spánku zahrnující zrychlený pohyb očí (Noyce a kol., 2012).

Na vznik a vývoj onemocnění má vliv celá řada faktorů. K těm rizikovým patří vystavení pesticidům, užívání β -blokátorů, úzkosti a deprese, poranění hlavy v průběhu života a větší příjem mléčných výrobků (Pang a kol., 2019). Naopak mezi faktory, které snižují riziko vzniku nebo progresi PN, lze zařadit užívání léků s protizánětlivým účinkem, blokátorů vápenatých kanálů, fyzickou aktivitu, konzumaci kofeinu nebo paradoxně i kouření.

Samotnou PN můžeme rozdělit na idiopaticko-sporadickou, která se vyskytuje zhruba v 90-95 % případů, a na familiární, která je způsobena dědičnými genetickými mutacemi (Harikrishna Reddy a kol., 2014). Mnoho forem familiární PN má odlišné charakteristiky oproti klasickým příznakům, jakými jsou například dřívější nástup onemocnění, svalová dystonie či rychlejší nástup demence. Existují ale i formy, které jsou od idiopatické PN nerozeznatelné (de Lau a Breteler, 2006). Ve spojení s PN se doposud podařilo objevit 21 genů, na kterých dochází k mutacím, a které jsou označovány PARK1 – PARK21 (Blauwendraat a kol., 2020). Tyto geny kódují například α -synuklein (SNCA, PARK1) nebo jsou zapojeny do proteazomové a chaperonové aktivity, buněčné signalizace, transportu iontů přes membrány, regulace transkripce, zapojeny do ochrany před oxidativním stresem nebo apoptózy (de Lau a Breteler, 2006).

2.1. Dopamin a dopaminové signální dráhy

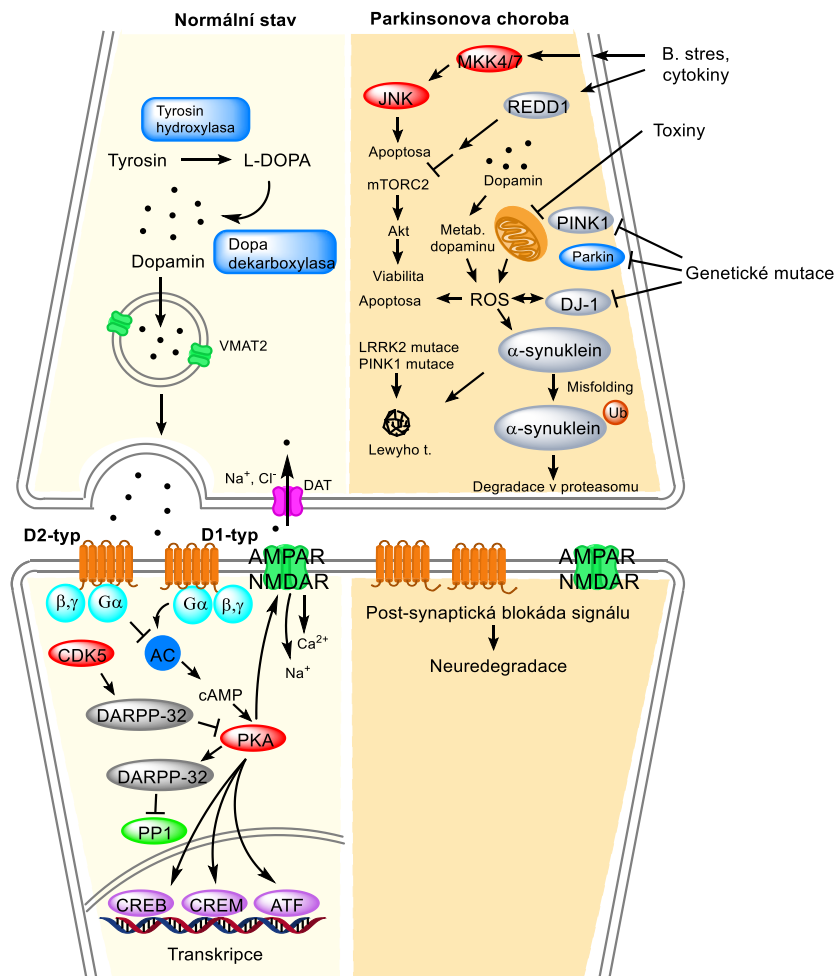
Klíčovou látkou spojovanou s PN je dopamin. Ten působí jako neuromodulátor v CNS a zároveň reguluje krevní tlak, metabolismus glukózy, endokrinní a imunitní funkce a neuroimunitní odpovědi (Mackie a kol., 2018). Syntéza dopaminu v mozku probíhá pouze v dopaminergních neuronech, a to z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu, které jsou převedeny na L-DOPA. Následnou dekarboxylací vzniká dopamin (Obr. 2) (Runegaard a kol., 2019).



Obr. 2: Hlavní metabolická dráha vzniku dopaminu. i – fenylylaninhydroxyláza (EC 1.14.16.1), ii – tyrozináza (EC 1.14.16.2), iii – dekarboxyláza aromatických aminokyselin (EC 4.1.1.28). Převzato a upraveno z publikace Meiser a kol., 2013.

Dopamin je dále pomocí vezikulárního monoaminového transportéru 2 (VMAT2) přenášen z cytoplazmy do synaptických váčků a exocytózou uvolňován do synaptických štěrbin. Na postsynaptických neuronech pak může interagovat s dopaminergními receptory (Obr. 3 vlevo) (German a kol., 2015, Runegaard a kol., 2019). Celkem je známo 5 dopaminergních receptorů, které jsou spřaženy s G proteiny a z hlediska funkce jsou rozděleny na dvě třídy – D1 (kam patří D₁ a D₅ receptory) a D2 (D₂, D₃ a D₄) receptory (Beaulieu a Gainetdinov, 2011). D1 receptory plní roli stimulační a obecně mají nižší afinitu k dopaminu. Prostřednictvím G proteinů stimulují adenylátcyklázu (EC 4.6.1.1), což vede k nárůstu koncentrace cAMP v postsynaptických neuronech a následně k aktivaci proteinkinázy A (EC 2.7.11.11). Ta dále ovlivňuje například genovou expresi nebo reguluje aktivitu některých membránových kationtových kanálů (Na⁺, Ca²⁺). D2 receptory naopak mají inhibiční roli a jejich afinita k dopaminu je vyšší (Runegaard a kol., 2019). Hladina dopaminu v synaptických štěrbinách je regulována také pomocí dopaminového transportéru, který se nachází v presynaptických neuronech a zajišťuje zpětné vychytávání uvolněného dopaminu pomocí transmembránového sodíkového gradientu.

V mozku existuje 5 konkrétních dopaminových drah (nigrostriatální, mezolimbická, mezokortikální, tuberoinfundibulární a intrahypotalamická), přičemž nigrostriatální dráha je z pohledu PN nejdůležitější (Obr. 1) (Runegaard a kol., 2019). Ta vede ze středního mozku, konkrétně ze substantia nigra pars compacta do oblastí bazálních ganglií v koncovém mozku corpus striatum, globus pallidus a putamen. Má vliv na plánování a exekuci korových aktivit a působí nejsilněji na motorickou kůru (Maďa, 2014).



Obr. 3. Dopaminová signalizace. Porovnání dopaminové signalizace ve zdravém neuronu (vlevo) a při PN (vpravo): vlevo – ve zdravém neuronu probíhá syntéza dopaminu z aromatických aminokyselin (Phe, Tyr), který je následně pomocí přenašeče VMAT2 inkorporován do vezikul a exocytózou transportován do synaptické štěrbině. Na postsynaptickém neuronu dopamin interaguje s dopaminergními receptory (D₁-D₅). Aktivace D1 třídy receptorů vede ke zvýšení koncentrace cAMP, aktivaci PKA, stimulaci genové exprese nebo regulaci iontových kanálů. Vpravo – v poškozeném neuronu dochází řadou mechanismů (genetické mutace, buněčný stres, kumulace ROS, účinek toxinů apod.) k poklesu koncentrace dopaminu případně k zablokování dopaminové signalizace, což má za následek neurodegeneraci postsynaptického neuronu (Upraveno dle Cell Signaling technology).

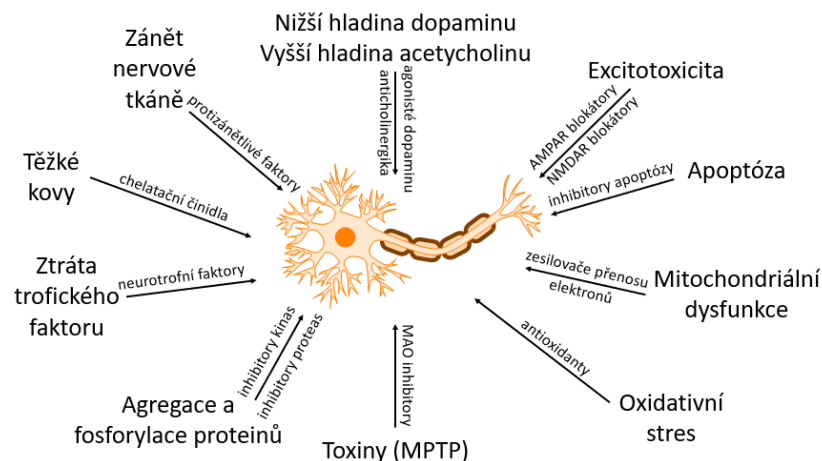
Změna v homeostázi dopaminu vede k neurologickým i psychiatrickým nemocem, jakými jsou PN, schizofrenie, bipolární porucha atd. (Runegaard a kol., 2019). V případě PN je neurodegenerace spojována s poruchou v metabolismu dopaminu a jeho signálních drah. Tyto změny jsou zapříčiněny řadou různých mechanismů, které budou popsány v následující kapitole i spolu s příslušnými molekulárními cíli jejich možnou farmakologickou regulací pomocí nízkomolekulárních látek.

2.2. Patogeneze a farmakoterapie PN

Pochopení patogeneze PN předcházelo několik kroků, a to popsání epidemiologických nálezů, patologických pozorování a spojení PN s genetikou (Kalia a Lang, 2015). Jako zásadní pro patogenezi PN byly označeny některé mechanismy – agregace a nesprávné

složení proteinů, oxidativní stres, mitochondriální dysfunkce, zánět nervové tkáně, ztráta trofického faktoru, excitotoxicita, apoptóza a další dráhy buněčné smrti, nižší hladiny dopaminu a působení těžkých kovů (), které, jak se zdá, nepůsobí samostatně, ale na vývoji neurodegenerace se podílí pomocí komplexních interakcí mezi sebou (Harikrishna Reddy a kol., 2014, Yacoubian a Standaert, 2009).

Léčba PN je v současné době založena hlavně na léčbě symptomů – tedy motorických a nemotorických rysů, většina používaných léků má ale z dlouhodobého hlediska množství vedlejších účinků, které úspěšnost léčby snižují (Toulouse a Sullivan, 2008).



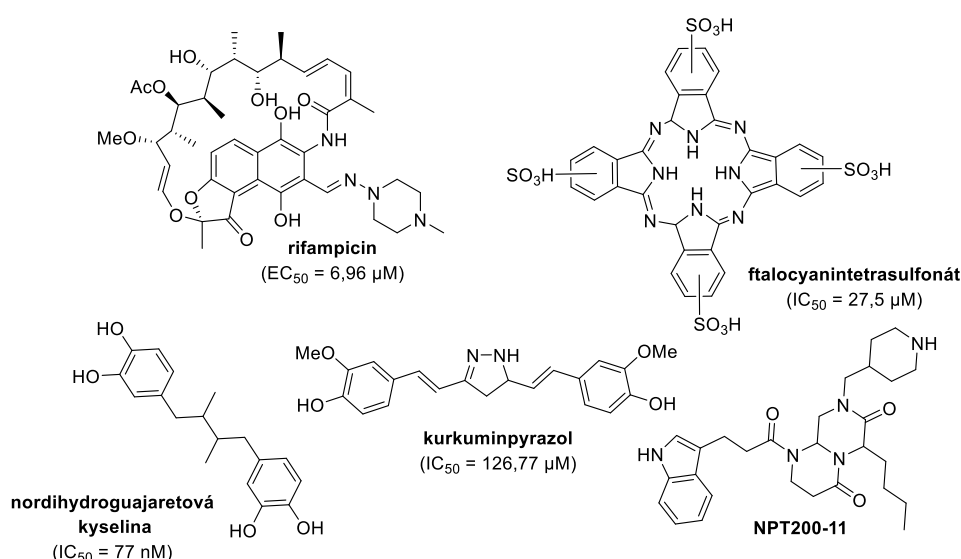
Obr. 4: Obrázek znázorňující působení mnoha faktorů na vznik a vývoj PN. Obrázek upraven dle Harikrishna Reddy a kol., 2014.

2.2.1. Agregace a nesprávné složení proteinů

Pro některá neurodegenerativní onemocnění včetně PN je zcela typické abnormální ukládání proteinů v mozkové tkáni (Dauer a Przedborski, 2003). V rámci PN je primárním agregovaným proteinem α -synuklein (α -syn), který tvoří hlavní složku Lewyho tělísek a Lewyho neuritů (Yacoubian a Standaert, 2009). Fyziologická funkce α -syn není zcela známá, interaguje s fosfolipidy, vykazuje chaperonovou aktivitu a pravděpodobně se podílí na vezikulárním transportu, uvolňování neuromediátorů, synaptické plasticitě a regulaci biosyntézy dopaminu (Burré a kol., 2018). Molekula α -syn je tvořena 140 aminokyselinami a je kódovaná genem SNCA označovaným jako PARK 1 (Spillantini a kol., 1997). U pacientů s geneticky podmíněnou formou PN byly popsány následné bodové mutace A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A53T, nebo multiplikace tohoto genu. Volný cytosolický α -synuklein nemá stabilní konformaci, chová se jako nativní protein, po vazbě na buněčnou membránu však přechází do α -helikální konformace. V patologickém stavu má konformaci β -skládaného listu, kdy vytváří nerozpustná toxická vlákna a spolu s dalšími proteiny formují Lewyho tělíška

(Wakabayashi a kol., 2007), která se vyskytují i u idiopaticko-sporadické formy PN (Spillantini a kol., 1997). Toxický α -syn negativně ovlivňuje činnost řady buněčných organel včetně buněčného jádra (acetylace histonů) ER/Golgi aparátu, mitochondrií, lysozomů nebo procesů spojených s vezikulárním transportem (Wong a Krainc, 2017).

V současné době je léčba založená zejména na genové terapii, nicméně se zkoumá možnost i farmakologické léčby. V *in vivo/vitro* modelech byla testována široká paleta látek – antibiotika, glykosidy, quinonony, barviva, polyfenoly, dopamin a jeho analoga a další. Přehled látek a výsledky testování byly shrnuty v publikaci Xu a kol. (Xu a kol., 2020), kdy v současné době je nejdále látka NPT200-11, která se nachází v 1b fázi klinického testování (Price a kol., 2018). Z konkrétních skupin látek jsou ty neúčinnější zobrazeny v následujícím obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Strukturní vzorce vybraných látek inhibující agregaci α -syn.

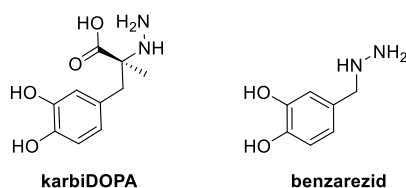
2.2.2. Dopaminové ztráty

Snížené hladiny dopaminu jsou pro PN charakteristické a cílem léčby je tyto hladiny zvýšit případně tyto ztráty kompenzovat. Možnou farmakologickou léčbu lze rozdělit na tři skupiny: látky působící na biosyntézu dopaminu, metabolismus dopaminu (periferní DOPA dekarboxyláza (DDC, EC 4.1.1.28), katechol-O-methyltransferáza (COMT, EC 2.1.1.6), monoaminoxidáza (MAO, EC 1.4.3.4) nebo na jeho signalizaci (agonisty a antagonisty dopaminových receptorů, *N*-methyl-D-aspartátový receptor (NMDAR) a receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazolpropionové kyseliny (AMPA).

Prvním objeveným lékem a doposud nejpoužívanější léčbou je používání prekurzoru dopaminu L-DOPA, kdy výhodou oproti substitučnímu podávání dopaminu je, že projde hematoencefalickou bariérou a až v mozkové tkáni je DOPA

dekarboxylázou metabolizován na dopamin (Hayes, 2019). Jedná se patrně o doposud nejúčinnější lék na mírnění motorických symptomů, nicméně je spojován s množstvím nežádoucích účinků (halucinace, dystonie, nevolnost) které se vyskytují až u 50 % pacientů v prvních 5 letech podávání. Obvykle s L-DOPA se podává inhibitor periferní DOPA dekarboxylázy a inhibitor katechol-O-methyltransferázy (COMT), aby se zamezilo vzniku dopaminu v periferních tkáních a krevním řečišti, respektive aby nedocházelo k jeho metabolizaci na 3-O-methyldopu (Rascol a kol., 2002). Dalším problémem tohoto léku je, že po 5 letech přestávají dávky účinkovat, objevuje se kolísání léčby a vrací se dyskineze.

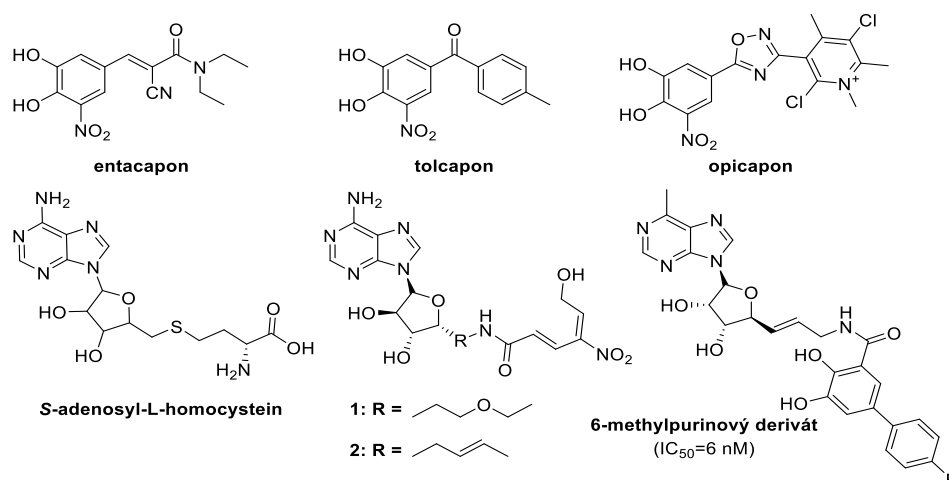
Aby se zvýšila účinnost léčby, podávají se pacientům spolu s L-DOPOU inhibitory periferní DOPA dekarboxylázy, které samy neprojdou hematoencefalickou bariérou a k inhibici enzymu dochází pouze mimo mozkovou tkáň (Burkhard a kol., 2001). V současnosti podávanými inhibitory jsou karbiDOPA (odvozená od L-DOPA) či benzarezid (Obr. 6).



Obr. 6: Strukturní vzorce látek karbiDOPA a benzarezid, které jsou inhibitory DOPA dekarboxylázy.

Katechol-O-methyltransferáza je enzym, který se podílí na metabolismu katecholaminů a přeměňuje hydroxylovou skupinu v pozici 3 na fenylovém kruhu na methoxyskupinu. Jako kosubstrát a donor methylové skupiny využívá S-adenosylmethionin (Finberg, 2019). V metabolismu dopaminu COMT inaktivuje dopamin převedením na 3-methoxytyramin, příp. L-DOPA převedením na 3-methoxy-L-DOPA, čímž je blokována následná produkce dopaminu a účinnost léčby je nižší. Entacapon a tolcapon (Obr. 7) jsou látky ze skupiny nitro-substituovaných katecholaminů, které jsou inhibitory COMT (Ma a kol., 2014). Inhibice spočívá v kompetitivní inhibici a ve strukturní podobnosti s katecholaminy, kdy přítomná nitroskupina si přitahuje vazebné elektrony a tím brání O-methylaci. U těchto dvou látek se ale vyskytují nežádoucí účinky – problémy s farmakokinetikou, účinností případně i toxicitou. V nedávné době FDA schválila další COMT inhibitor, kterým je opicapon (Obr. 7) (Mao a kol., 2020). Mimo zmíněné katecholové inhibitory mohou COMT inhibovat i látky s S-adenosyl-methioninovým strukturním motivem, látky přírodního původu, bifunkční a bisubstrátové a další – konkrétní skupiny látek jsou přehledně shrnuty

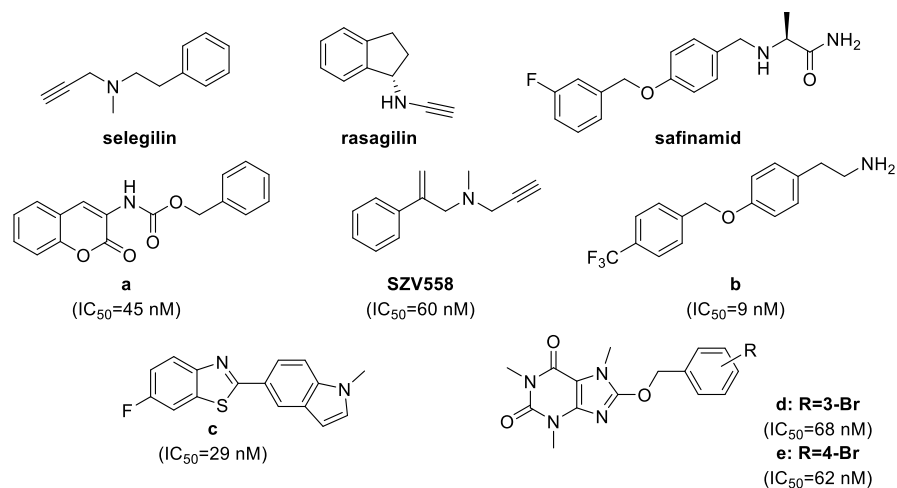
v publikaci Jatana a kol. (Jatana a kol., 2014). Vybrané strukturní motivy jsou zobrazeny v následujícím obrázku (Obr. 7).



Obr. 7: Strukturní vzorce látek fungujících jako inhibitory COMT.

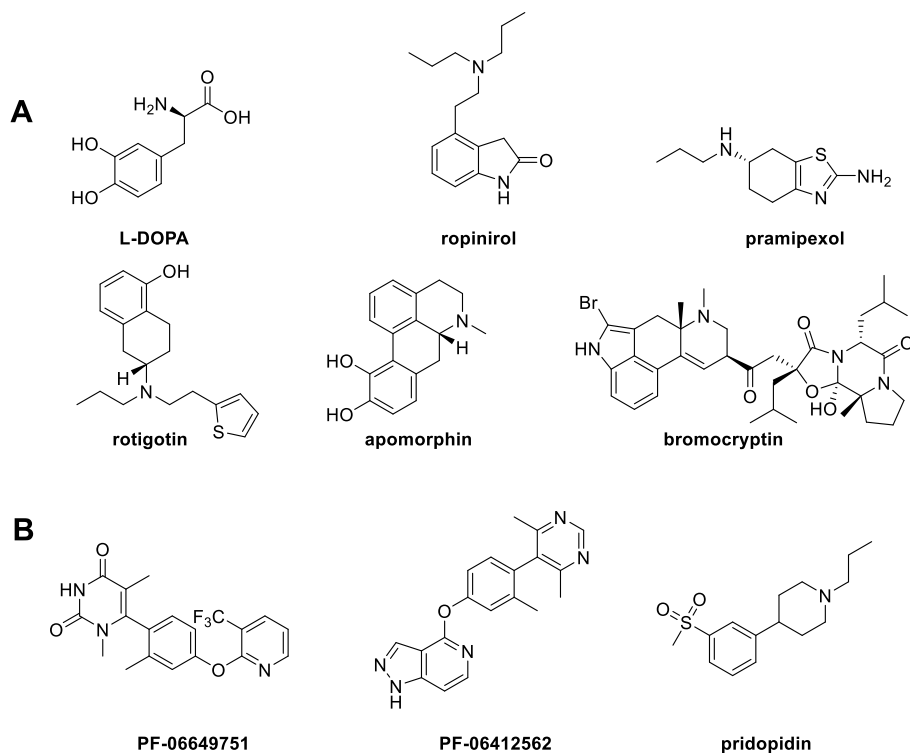
Dalším molekulárním cílem v metabolismu dopaminu jsou monoaminoxidázy (MAO) (EC 1.4.3.4.). Ty katalyzují oxidativní deaminaci katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu, serotoninu) a převádí dopamin na toxický 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd (DOPAL), který se hojně vyskytuje u pacientů s PN (Goldstein a kol., 2013). MAO se vyskytují ve dvou formách, a to MAO-A a MAO-B, které se liší svojí substrátovou specifitou a místem lokalizace (Carradori a Silvestri, 2015). Dopamin vykazuje stejnou afinitu k oběma izoformám, ale neselektivní inhibice MAO nebo selektivní inhibice MAO-A má řadu negativních účinků a může vést až k akutnímu hypertenznímu záchvatu způsobeným příjmem tyraminu z potravy a jeho konverzí na noradrenalin.

Izoforma MAO-B v mozku převládá a hojně se nachází v bazálních gangliích a u pacientů s PN byly pozorovány její zvýšené hladiny (Youdim a Bakhle, 2006). Vedlejším produktem MAO reakcí je peroxid vodíku, který vzniká při regeneraci FAD kofaktoru, a který může být zdrojem toxických hydroxylových radikálů (spolu s Fe²⁺ ionty podléhá Fentonově reakci). V současné době známe tři potencionální látky na inhibici MAO-B. Jsou jimi ireverzibilní inhibitory selegilin a rasagilin a reverzibilní safinamid (Obr. 8) (Mao a kol., 2020, Toulouse a Sullivan, 2008). V preklinické fázi testování se v současné době nachází další potencionální látky, které by mohly sloužit pro terapii PN – jejich přehled je uveden v obrázku (Obr. 8 – struktury a-c, SZV558) (Mao a kol., 2020). Přehled selektivních MAO-B inhibitorů rozdělených podle strukturních motivů je shrnut v publikaci Carradori a Silvestri (Carradori a Silvestri, 2015). K velmi silným inhibitorům MAO-B patří také deriváty s purinovým, resp. xanthinovým jádrem (Obr. 8 – struktury d a e).



Obr. 8: Strukturální vzorce látek používajících se jako inhibitory MAO-B. Používanými látkami jsou selegilin, rasagilin a safinamid, v testování se nacházejí látky a-c a SZV558. Vysoký inhibiční potenciál mají pak i látky puronového, resp. xanthinového charakteru – d a e.

Po L-DOPA je další velmi často používanou terapií užívání agonistů dopaminu, kteří stimulují dopaminergní receptory v CNS, a tím zmírňují motorické příznaky PN (Hayes, 2019). Jejich výhodou je delší poločas účinku a menší riziko, že si tělo pacienta na léčbu zvykne a riziko dyskineze je mnohem nižší – patrně proto, že jsou méně stimulovány D2 receptory. Jejich vedlejší účinky jsou ale mnohdy horší než u L-DOPY (halucinace, zmatek, psychóza), a z tohoto důvodu je starší pacienti odmítají (Fahn, 2003). V současné době je schváleno již několik léků, které se používají buď jako samostatná terapie u časně PN, nebo jako doplňková léčba spolu s L-DOPOU – jsou jimi ropinirol, pramipexol, rotigotin, apomorphin a bromocryptin (Obr. 9) (Antonini a kol., 2018, Hauser a kol., 2007, Mao a kol., 2020, Watts a kol., 2010). Mnoho dalších látek se nachází v různých fázích klinického testování, přehledně jsou zpracovány v publikaci Mao a kol., a vybrané z nich jsou uvedeny v obrázku níže (Obr. 9) (Mao a kol., 2020).

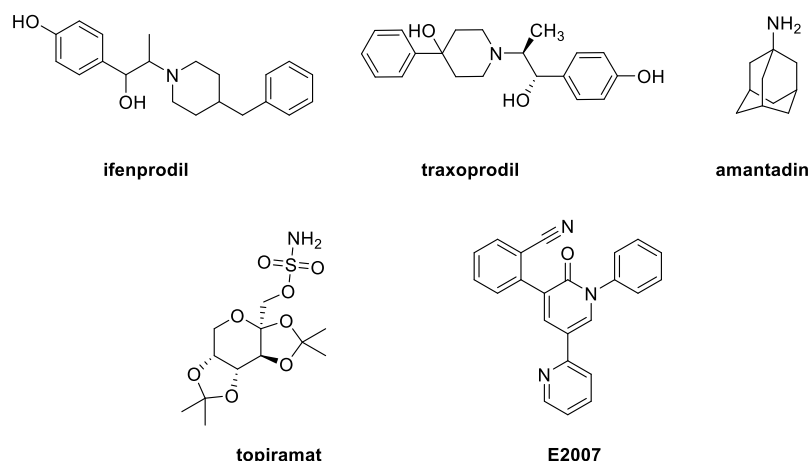


Obr. 9: Strukturní vzorce agonistů dopaminu: A) schválených pro léčbu PN, B) nacházejících se v klinickém testování. A) Agonisté D₂R/D₃R receptorů ropinirol a pramipexol, agonista D₁R/D₂R receptorů apomorphin, agonista D₂R receptoru bromocryptin. B) Agonista D₁R/D₅R receptorů PF-06649751, agonista D₁R/D₅R receptorů PF-06412562.

Svoji roli v patogenezi PN a regulaci vápenatých iontů hrají glutamátové kanály, konkrétně potom dva jejich receptory – *N*-methyl-D-aspartátový receptor (NMDAR) a α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionový receptor (AMPA) (Zhang a kol., 2019). NMDAR se nacházejí hojně v bazálních gangliích a podílí se na excitaci neuronů propouštěním vápenatých iontů. AMPAR jsou postsynaptické iontové kanály, které regulují téměř všechny excitační neurotransmiterní aminokyseliny v mozku. Nachází se u neuronů v mozkové kůře, bazálních gangliích, thalamu a v mozkovém kmeni a na rozdíl od NMDAR jsou jen slabě propustné pro vápenaté ionty (Martin a kol., 1993, Zhang a kol., 2019). Nadměrná stimulace NMDAR a AMPAR vede k vyšší propustnosti vápenatých iontů, což poškozuje neurony a vede k neurodegeneraci.

Antagonisté NMDAR byli testováni na několika zvířecích modelech a bylo prokázáno, že pozitivně mírní svalovou ztuhlost a rigiditu, zlepšují účinek L-DOPY a zabraňují zpětným motorickým odezvám spojovaných s tímto lékem (Zhang a kol., 2019). Jako potencionální se jeví látky ifenprodil, traxoprodil a amantidin (Obr. 10: Strukturní vzorce léků ifenprodilu, traxoprodilu, a amantadinu a dále látek topiramatu a E2007, které se nacházejí v klinickém testování. Obr. 10), které ve studiích na zvířecích modelech MPTP úspěšně zlepšovaly motorické symptomy (Igarashi a kol., 2015, Mao a kol., 2020). V současné době se čeká na výsledky dalších studií (Zhang a kol., 2019). V

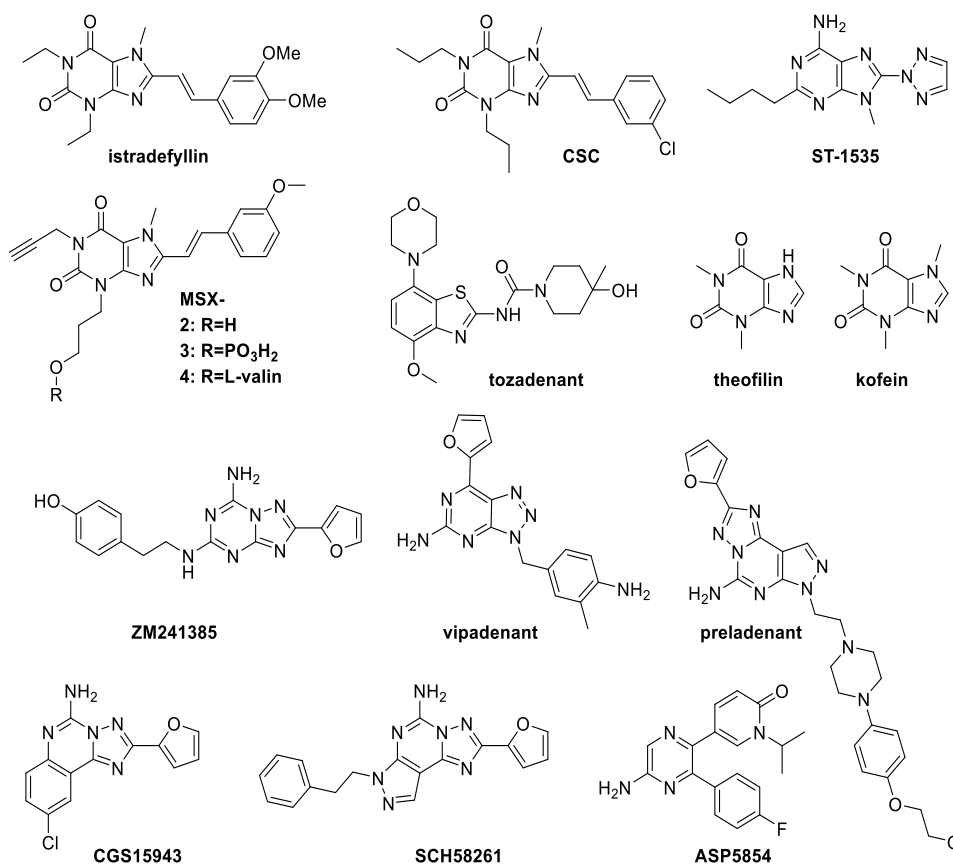
obrázku níže (Obr. 10) jsou uvedeny látky topiramát a E2007, které se nachází v klinickém testování.



Obr. 10: Strukturní vzorce léků ifenprodilu, traxoprodilu, a amantadinu a dále látek topiramátu a E2007, které se nacházejí v klinickém testování.

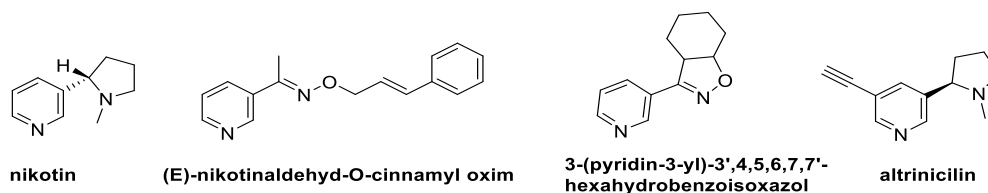
2.2.3. Další molekulární cíle

Možnou léčbou by mohly být i antagonisté adenosinových receptorů inhibičních (A_1 a A_3) nebo excitačních (A_2), které se nachází hlavně ve striatu. Adenosin je důležitý pro paměť a podílí se na náladách a motorických funkcích (Zheng a kol., 2019). Jeho receptory jsou úzce spojeny s receptory pro dopamin – působí jako tzv. negativní regulátory. Obecně jsou v lidském těle velmi rozšířené receptory A_2 , které se rozdělují na dva podtypy (A_{2A} a A_{2B}) v závislosti na afinitě k adenosinu (Aryati a kol., 2019). A_{2A} receptory hrají důležitou funkci z hlediska regulace dopaminergní neurotransmise ve striatu, která produkuje látky pozitivně ovlivňující neurodegenerativní poškození související s dopaminergní dysfunkcí. Protože léčba pomocí substituční dopaminergní terapie má často nežádoucí vedlejší účinky, hledá se alternativa nedopaminergní (Aryati a kol., 2019). Užíváním antagonistů receptorů A_{2A} docházelo u zvířecích modelů PN ke zlepšení motorických funkcí a ke snížení postsynaptických účinků způsobených vyčerpáním dopaminu (Schwarzschild a kol., 2006). Stejně účinky byly pozorovány i během klinických studií na pacientech s PN (Zheng a kol., 2019). Prvním používaným antagonistou je lék istradefyllin (Obr. 11), který se v současnosti podává jako doplňková léčba spolu s L-DOPOU pro zlepšení motorických symptomů (Zheng a kol., 2019). Další potencionální látky – agonisté adenosinových A_{2A} receptorů, se nachází v přehledu níže (Obr. 10 Obr. 11) (Aryati a kol., 2019).



Obr. 11: Strukturální vzorec léku istradefyllin a dalších potencionálních látek – agonistů A_{2A} receptorů.

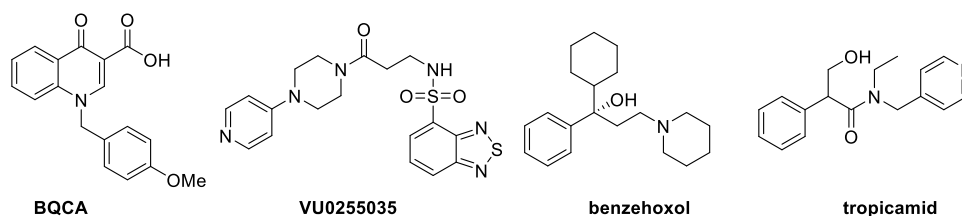
Dalšími možnými neuroprotektivními látkami mohou být substance obsažené v cigaretách a cigaretovém kouři, kdy největší pozornost je věnována nikotinu (Obr. 12) – hlavnímu alkaloidu tabáku (Toulouse a Sullivan, 2008). Již dlouhodobě jsou známe jeho účinky ovlivňující dopaminergní funkce ve striatu (Quik a kol., 2015). Nikotin se váže na acetylcholinové receptory, které jsou ve velké míře obsáhlé v bazálních gangliích, a svojí aktivitou dokáže zvýšit uvolňování dopaminu (Zhou a kol., 2002). Mimo nikotin byly provedeny i testy analog a agonistů nikotinu (Obr. 12), kdy cílem bylo vyvolat stejné pozitivní účinky nikotinu bez rizika vzniku závislosti (Becerra a kol., 2020). Nikotin i tyto látky měly neuroprotektivní účinky, které spočívaly ve snížení toxických a neurotoxických poškození navozených u zvířecích modelů PN (Quik a kol., 2015).



Obr. 12: Strukturální vzorec nikotinu a jeho analog (E)-nikotinaldehyd-O-cinnamylloximu, 3-(pyridin-3-yl)-3',4,5,6,7,7'-hexahydrobenzoisoxazolu a agonisty altrinicilinu.

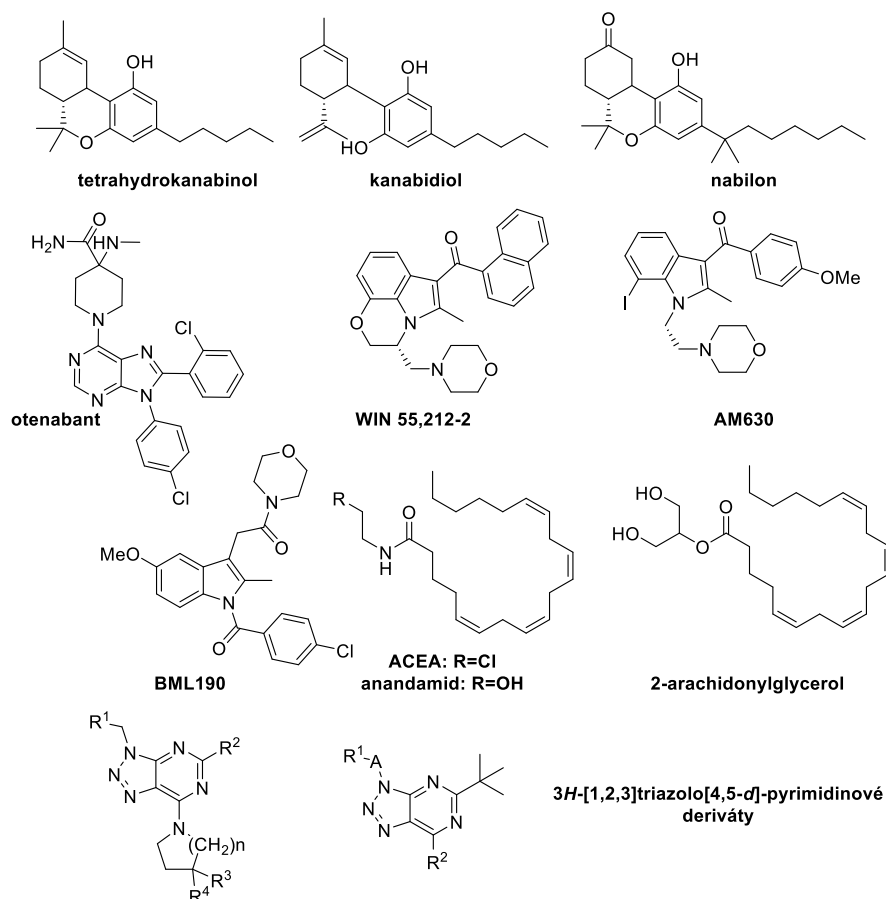
Muskarinové acetylcholinové receptory jsou G-spřážené receptory s pěti podtypy (M₁–M₅), které se podílejí na kontrole motoriky, pozornosti a paměti (Xiang a kol., 2012).

Hojně se vyskytují v bazálních gangliích a ve striatu a M_1 a M_4 receptory byly identifikovány jako molekulární cíle na L-DOPA indukovanou dyskinezi (Chambers a kol., 2019). Někteří antagonisté testovaní (benzehoxol a tropicamid) a používání v rámci PN (BQCA a VU0255035) jsou zobrazeny v obrázku níže (Obr. 13) (Xiang a kol., 2012).



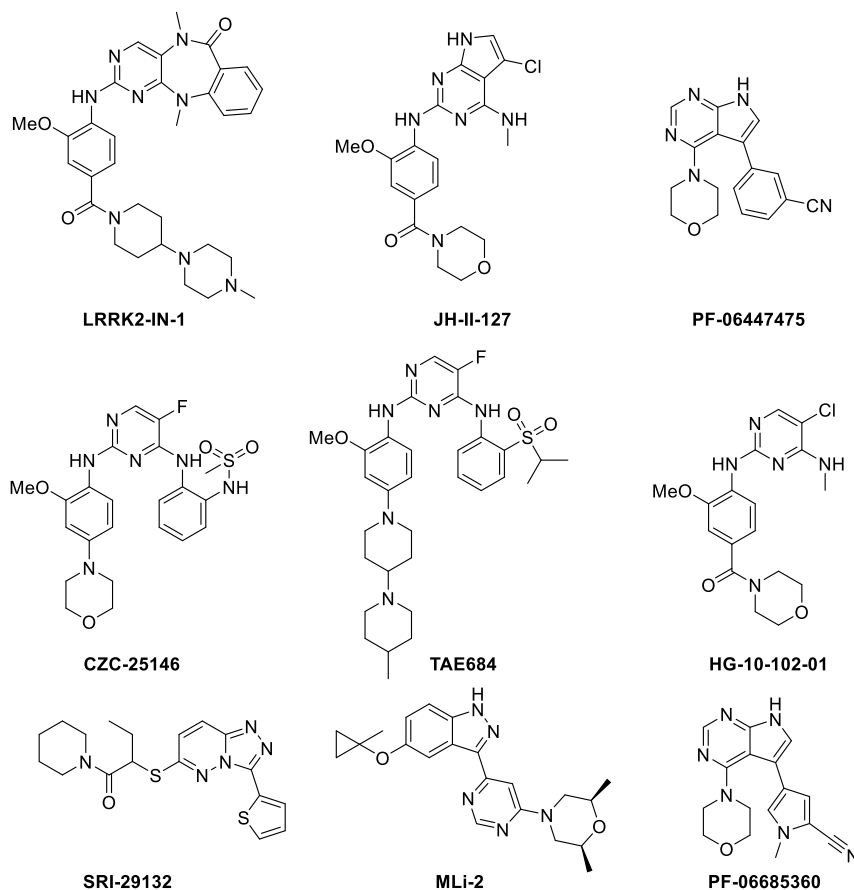
Obr. 13: Strukturální vzorce antagonistů muskarinových acetylcholinových receptorů.

Kanabinoidní receptory CB1 a CB2 se jeví jako další ideální molekulární cíl v PN. Jedná se o G-spřážené receptory a po jejich aktivaci dochází k inhibici adenylátcyklázy (EC 4.6.1.1) a k aktivaci mitogenem aktivované proteinkinázy (EC 2.7.12.2) (Baul a kol., 2019). Následkem dochází ke změnám v synaptickém přenosu, synaptické plasticitě a přežívání buněk. Receptory interagují s podobnými ligandy, liší se ale lokalizací – CB1 se nachází více v mozečku, bazálních gangliích a hippocampu, CB2 se pak nachází u mikroglíí, v lymfatických tkáních a v periferním nervovém systému (Buhmann a kol., 2019). CB1 a CB2 jsou zapojeny do patogeneze PN a některé z jejich testovaných agonistů či antagonistů, zobrazeny v obrázku níže (Obr. 14), měly potencionální výsledky z hlediska léčby PN (Han a kol., 2020). Dále jsou v obrázku zobrazeny 2 patentované struktury, jejichž základním strukturálním motivem je 8-azapurin, reps. [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin (Adam a kol., 2013, Reover a kol., 2015).



Obr. 14: Strukturní vzorce agonistů/antagonistů kanabinoidních receptorů CB1 a CB2.

S familiární a idiopaticko-sporadickou formou PN je spojován gen LRRK2, který kóduje stejnojmennou kinázu LRRK2 (z angl. leucine-rich repeat kinase 2; EC 2.7.11.1) (Atashrazm a Dzamko, 2016). Ta má GTPázovou a kinázovou aktivitu a podílí se na aktivaci NF-kappaB, signalizaci intracelulárního vápníku, autofágii, endocytóze a ovlivňuje funkce buněčných organel (Berwick a kol., 2019). Mutace G2019S v tomto genu způsobuje dvojnásobné až trojnásobné zvýšení kinázové aktivity, což může vést k aktivaci apoptózy a k neurodegeneraci (Hatcher a kol., 2015). Léčba PN by mohla být založená na inhibici LRRK2 a vybrané struktury testovaných inhibitorů jsou zobrazeny v obrázku níže (Obr. 15) (West, 2017).



Obr. 15: Strukturální vzorce látek testovaných jako inhibitory LRRK2.

Puriny jsou skupina látek s velkým biologickým významem, kdy tvoří základ nukleových kyselin, energetických molekul ATP a GTP, rostlinných hormonů cytokininů, alkaloidů rostlin, hub a některých mořských živočichů (Rosemeyer, 2004). Purin je také strukturálním základním motivem řady nízkomolekulárních inhibitorů a modulátorů klíčových biologických procesů spojených s lidským zdravím (Legraverend a Grierson, 2006). Z předchozích obrázků je patrné, že purin a jeho biostery jsou také základním stavebním prvkem mnoha látek cílících na Parkinsonovu nemoc.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Přístrojové vybavení

Mikrovlňný reaktor Discover SP (CEM Corporation)

Elementární analyzátor Flash EA 1112 Series (ThermoFisher)

NMR spektrometr Jeol ECA-500 (Jeol)

3.2. Použité chemikálie

Chemikálie použité pro syntézu byly zakoupeny od následujících firem: aceton, ethylacetát (EtOAc), chloroform, petrolether bp 40-65 °C, *n*-propanol (*n*-PrOH) a bezvodý síran sodný (Lach:ner), azetidin, diisopropyl-azodikarboxylát (DIAD), 4-hydroxybenzylalkohol, piperidin, thiomorfolin a trifenyfosfin (Sigma-Aldrich), azepan, benzylbromid, 3-hydroxybenzylalkohol, imidazol, 2-methoxybenzylalkohol a pyrrolidin (Fluka), diethylether, methanol (MeOH), deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6), benzylalkohol, *n*-heptan, *n*-hexan a trimethylamin (Et_3N) (VWR), morfolin (IE), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA) (Alfa-Aesar) a 2,6-dichlorpurin (Olchemim s.r.o.), uhlíčan draselný bezvodý (Penta). Chemikálie byly použity bez dalšího přečišťování.

Suchý tetrahydrofuran byl připraven destilací nad sodíkem s acetofenonem, zatímco *N,N*-dimethylformamid (DMF) byl sušen nad aktivovaným 3 Å molekulovým sítem po dobu 72 hodin (Williams a Lawton, 2010).

3.3. Metody

Pro kontrolu všech reakcí byla používána tenkovrstevná chromatografie (TLC). Byly použity hliníkové destičky potažené vrstvou silikagelu 60 ALUGRAM[®]SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). Separace probíhaly s mobilní fází směsi chloroform/methanol v poměru 9:1 (v/v) nebo 20:1; dále petrolether/ethylacetát v poměru 1:1, anebo směs petrolether/ethylacetát/methanol v poměru 4:1:0,1. Vizualizace byla prováděna pomocí UV lampy (Camag) při vlnové délce 254 nm. V případě některých látek byla destička vybarvována barvicím roztokem vanilinu (3,2 g vanilinu, 200 ml ethanolu, 1 ml koncentrované kyseliny octové a 2 ml koncentrované kyseliny sírové).

Pro purifikaci látek byla využita sloupcová kapalinová chromatografie, kdy skleněné kolony byly naplněny silikagelem 40-60 micron (VWR) a jako mobilní fáze byly použity směsi chloroform/methanol s gradientem methanolu a petrolether/ethylacetát s gradientem ethylacetátu. Některé z připravovaných látek byly purifikovány pomocí preparativního HPLC systému Infinity II 1260/1290 (Agilent Technologies, Inc.) na koloně s reverzní fází Agilent 5 Prep-C18 100 × 21,2 mm s mobilní fází voda a methanol.

Stanovení konverze látek při optimalizaci syntézy v mikrovlnném reaktoru byla použita HPLC Alliance 2695 (Waters) s DAD detektorem PDA 996 (Waters) a kolonou Symmetry C18 o rozměrech 150 × 2,1 × 3,5 mm s velikostí částic 5 μm (Waters). Vzorky byly naředěny methanolem na koncentraci 1 mg/ 1 ml a následně 100× naředěny do vody. Vzorek byl nastříknut na kolonu v objemu 10 μl a separován v gradientu viz níže.

Pro zjištění čistoty látek byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC: AQUITY UPLC® H-Class systém, Waters) s kolonou Waters Symmetry C18 o rozměrech 150 × 2,1 mm s velikostí částic 5 μm (Waters). Vzorky byly nejprve rozpuštěny v methanolu (1 mg vzorku/ 1 ml MeOH) a následně 100× naředěny do vody. Vzorek byl nastříknut na kolonu v objemu 10 μl (při teplotě kolony 40 °C) a následovala separace s gradientovou elucí (0' – 90% A; 25' – 10% A; 35' – 10% A; 45' – 90% A) s průtokem mobilní fáze 0,2 ml/min, kdy použitými mobilními fázemi byly mravenčan amonný (15 mM) o pH 4 (A) a methanol (B). Následná detekce analytů byla prováděna na PDA detektoru při vlnových délkách 210-400 nm.

Pro zjištění molekulové hmotnosti (MS) analytů byly eluenty z kolony vedeny do hmotnostního spektrometru QDa (Waters) vybaveného jednoduchým kvadrupólem a látky byly ionizovány pomocí elektrospreje v pozitivním ESI(+) módu. Detekce iontů byla prováděna ve FULLSCANU v rozsahu m/z 50-1000.

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla pořízena na spektrometru Jeol-ECA-500 (Jeol) při frekvenci 500 MHz (¹H), respektive 125 MHz (¹³C). Vzorky pro měření byly připraveny rozpuštěním pevných látek v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆). Chemické posuny (δ) vyjádřeny v ppm byly kalibrovány na signál rozpouštědla pro ¹H δ = 2,49 ppm a pro ¹³C δ = 39,5 ppm.

Pro elementární analýzu (CHN) bylo 2-3 mg testované látky váženo do cínových kelímků. Kelímky byly zabaleny a umístěny do elementárního analyzátoru Flash EA 11212 Series (ThermoFisher), kde proběhlo jejich spálení při následujících podmínkách: spalná teplota 950 °C, čas 480 s, nosný plyn helium, průtoky plynu (He, O₂ 130 l/min.), jako standard použit nikotinamid. Následné vyhodnocení experimentu bylo provedeno pomocí programu EagerSmart.

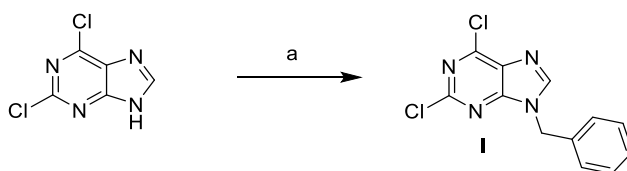
3.4. Syntéza

3.4.1. Substituce purinu v poloze N9

Substituenty do polohy N9 na 2,6-dichlorpurinu byly zavedeny dvěma způsoby, a to buď pomocí alkyhalogenidu v bazickém prostředí, nebo pomocí Mitsunobu alkylace.

a) Reakce 2,6-dichlorpurinu s benzylohalogenidem

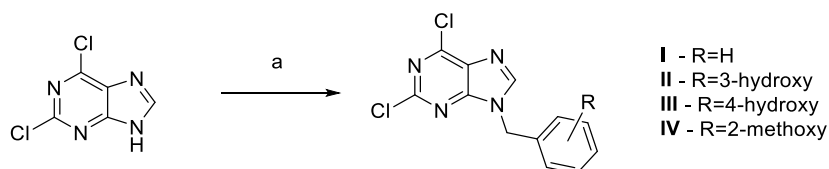
Do vysušené dvouhrdlé baňky s kulatým dnem s argonovou atmosférou byly dány postupně 2,6-dichlorpurin (500 mg, 2,65 mmol), uhličitan draselný (914 mg, 6,61 mmol) a DMF (10 ml). Po 20 min míchání za laboratorní teploty byl přikapán benzylbromid (385 μ l, 3,17 mmol) a výsledná suspenze byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Po nalití reakční směsi do ledové vody (80 ml) vznikla bílá pevná látka, která byla zfiltrována promyta vodou a vysušena při 50 °C. Filtrát byl dále extrahován ethylacetátem (3 \times 40 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (20 ml) a vysušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Produkt byl dále purifikován sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát/methanol s gradientem ethyl-acetátu, zakončeno mobilní fází s přidavkem methanolu (6:1:0 - 1:1:0,1). Schéma reakce je zobrazeno v obrázku níže (Obr. 16).



Obr. 16: Alkylace 2,6-dichlorpurinu v pozici N9 pomocí benzylbromidu. a – benzylbromid, uhličitan draselný, DMF, lt, 15 h.

b) Mitsunobu alkylace

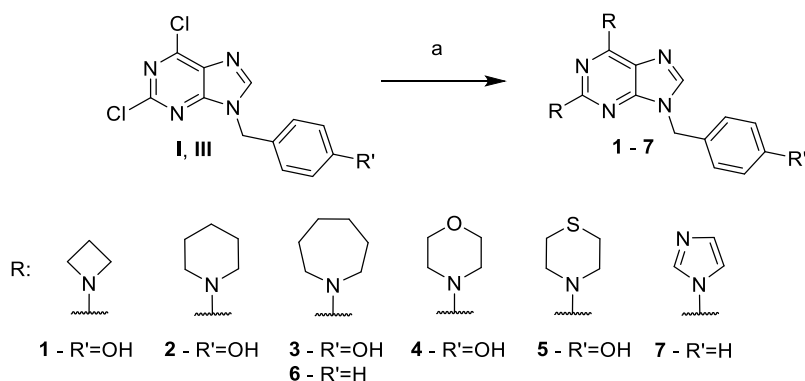
K suspensi 2,6-dichlorpurinu (500 mg, 2,65 mmol), trifenylofosfinu (1,39 g, 5,3 mmol) a příslušného benzylalkoholu (2 ekv, 5,3 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (26 ml) byl pod argonovou atmosférou za chlazení v ledové lázni přikapán diisopropylazodikarboxylát (1,147 ml, 5,3 mmol). Po jeho přidání se reakční směs nechala vytemperovat na laboratorní teplotu, za které byla míchána jednu hodinu. Po zahuštění na rotační vakuové odparce (žlutý gel) byl vzniklý vedlejší produkt reakce, trifenylofosfinoxid, zkrystalován za horka z toluenu a následně odfiltrován. Prekurzor byl po zahuštění filtrátu purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát/methanol s gradientem ethyl-acetátu a později s přidavkem methanolu (6:1:0 - 1:1:0,1). Produkty byly případně přečištěny rekrystalizací z MeOH. Schéma reakce je zobrazeno v následujícím obrázku (Obr. 17).



Obr. 17: Obecné schéma syntézy prekurzorů pomocí Mitsunobu alkylace. a – benzylalkohol/ 3-hydroxybenzylalkohol/ 4-hydroxybenzylalkohol/ 2-methoxybenzylalkohol, trifenylfosfin, DIAD, THF, lt, 1 h.

3.4.2. Finální látky se symetrickou substitucí v polohách C2 a C6

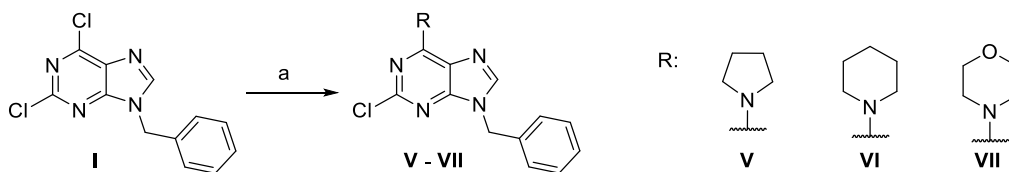
Ve skleněné tlakové ampuli promyté argonem byl 3 h na 165 °C zahříván prekurzor I nebo III (typicky 100 mg, I - 0,36 mmol, III - 0,33 mmol) s příslušným cyklickým aminem (15 ekv, I - 5,08 mmol, III - 5,37 mmol) a *N,N*-diisopropylethylenaminem (I - 312 μ l, 1,79 mmol, III - 295 μ l, 1,65 mmol). Reakční směs byla rozředěna vodou (10 ml) a extrahována chloroformem (4 \times 10 ml). Spojené organické frakce byly následně promyty solankou (15 ml) a vysušeny bezvodým síranem sodným. Po zahuštění na rotační vakuové odparce byl produkt purifikován pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu nebo chloroform/methanol s gradientem methanolu. Schéma reakce je zobrazeno v obrázku níže (Obr. 18).



Obr. 18: Obecné schéma syntézy derivátů purinu se symetrickými substituenty v pozicích C2 a C6. a – R-H, DIPEA, 165 °C, 3 h.

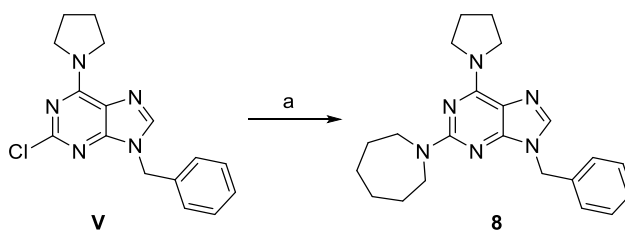
3.4.3. Syntéze látek s asymetrickými substituenty v polohách C2 a C6

Suspenze prekurzoru I (100 mg, 0,36 mmol), cyklického aminu (1,5 ekv., 0,54 mmol) a Et₃N (125 μ l, 0,90 mmol) v *n*-PrOH (2,4 ml) byla zahřívána 4 hodiny pod argonem na 90 °C. Po odpaření byl gelovitý odparek rozředěn vodou (10 ml) a extrahován EtOAc (4 \times 10 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (10 ml), vysušený síranem sodným a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/MeOH s gradientem methanolu. Produkty byly přečištěny rekrystalizací z MeOH, případně pomocí preparativní HPLC. Schéma reakce je zobrazeno v obrázku níže (Obr. 19)



Obr. 19: Substituce 9-benzyl-2,6-dichlor-9H-purinu v poloze C6. a) pyrrolidin/ piperidin/ morfolin, Et₃N, *n*-PrOH, 90 °C, 4 h.

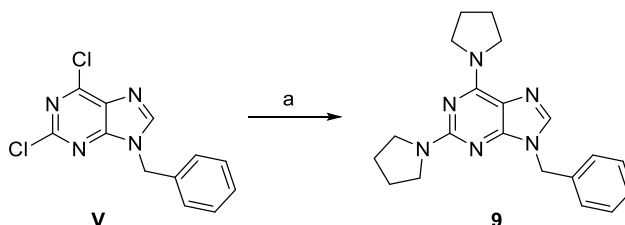
Ve skleněné tlakové ampuli promyté argonem byl 3 h na 165 °C zahříván prekurzor **V** (90 mg, 0,29 mmol) s azepanem (500 μ l, 4,30 mmol) a DIPEA (248 μ l, 1,43 mmol). Reakční směs byla následně rozředěna vodou (10 ml) a extrahována chloroformem (4 \times 10 ml). Spojené organické frakce byly následně promyty solankou a vysušeny bezvodým síranem sodným. Po zahuštění na rotační vakuové odparce byl produkt purifikován pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát s gradientem ethyl-acetátu. Schéma reakce je zobrazeno v následujícím obrázku (Obr. 20).



Obr. 20: Syntéza C2, C6 asymetricky substituovaného 9-benzylpurinu, substituce v poloze C2. a) azepan, DIPEA, 165 °C, 3 h.

3.4.4. Optimalizace syntézy C2, C6 symetricky substituovaných látek pomocí mikrovlnného záření.

Do skleněné kyvety byl navážen prekurzor **V** (50 mg, 0,18 mmol), pyrrolidin (224 μ l, 2,69 mmol/ 150 μ l, 1,8 mmol) a DIPEA (156 μ l, 0,90 mmol) a kyveta byla umístěna do mikrovlnného reaktoru. Schéma reakce zobrazeno v následujícím obrázku (Obr. 21).



Obr. 21: Syntéza C2, C6 symetricky substituovaných látek v mikrovlnném reaktoru. a) pyrrolidin, DIPEA, MW, 130/165 °C, 2,5; 5 a 10 minut.

Pro reakce byly použity různé podmínky, které jsou přehledně zobrazeny v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Podmínky reakce v mikrovlnném reaktoru a jejich průběžná optimalizace.

Látka	Ekv. pyrrolidinu	Teplota (°C)	Tlak	Výkon (W)	Reakční čas (min.)	Power on/off
9a	15	165	300	200	10	off
9b	15	130	300	300	5	on
9c	15	130	300	300	2,5	on
9d	10	130	300	300	2,5	on
9e	10	130	300	200	2,5	on

Konverze výchozí látky na produkt byla sledována pomocí TLC s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát/methanol (1:1:0,1) a následně pomocí HPLC-UV/VIS. Z reakční směsi bylo odebráno do jednoho miligramu směsi a naředěno methanolem na koncentraci 1 mg/ml.

3.4.5. Biologické testování

Neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y (ECACC 94030304) byla kultivována v DMEM/F12 médiu s 10% obsahem fetálního bovinního séra (FBS) a 1% přídavkem antibiotika penicilinu a streptomycinu. Pro účel experimentu byly buňky nasazeny do 96-jamkových destiček (Eppendorf) o počtu 7 000 buněk na jamku. Destička byla umístěna do inkubátoru se stálou atmosférou (37 °C, 5,5 % CO₂) na 24 hodin. Pro navození buněčné diference byly buňky inkubovány s *all-trans* kyselinou retinovou o koncentraci 10 μM v 1% FBS DMEM/F12 a destička byla ponechána v inkubátoru 48 hodin. V rámci *in vitro* modelu poškození mitochondrií a Huntingtonovy choroby pomocí 3-nitropropionové kyseliny bylo po dvou dnech diference staré médium vyměněno za nové 1% DMEM/F12 obsahující 20 mM 2-nitropropionové kyseliny spolu s testovanými látkami v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM a následovala inkubace po dobu 48 hodin. Pozitivní kontrolou byl antioxidant *N*-acetylcystein v koncentracích 10, 100 a 1000 μM a pro kontrolní buňky (pouze toxin a DMSO kontrola) bylo použito DMSO v koncentraci ≤0,1 % (v/v). Roztok Calcein AM (Invitrogen™) byl vyředěn v PBS, přidán do média ve finální koncentraci 0,75 μM a inkubován po dobu jedné hodiny. Biologická aktivita byla následně hodnocena měřením fluorescenčního signálu při 495/517 nm (excitace/emise) pomocí přístroje Infinite M200 Pro (Tecan, Austria). Výsledné intenzity fluorescence Calceinu byly přepočítány jako procenta živých buněk dle intenzity fluorescence DMSO kontrol (zdravé buňky).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Syntéza

V roce 2013 a 2015 byly vydány patenty zahrnující 3,5,7-trisubstituované-1,2,3-triazolo-[4,5-*d*]-pyrimidinové deriváty (Adam a kol., 2013, Reover a kol., 2015), které jsou agonisty CB2 receptorů. Ve své diplomové práci Mgr. Gabriel Gonzalez syntetizoval analogické látky, které byly testovány *in vitro* na 6-hydroxydopaminovém modelu PN a vykazovaly neuroprotektivní aktivitu (Gonzales, 2016). Obecně syntéza těchto látek probíhá v několika krocích, kdy je nutno pyrazolopyrimidinový skelet s jinými substituenty v pozici N3 pokaždé vystavět *de novo*. V návaznosti na výsledky Mgr. Gonzalese se uvažovalo o látkách s purinovým základem, které jsou jednodušší na syntézu, jelikož výchozí látkou je komerčně dostupný 2,6-dichlorpurin. V rámci série látek s purinovým skeletem byla připravena analoga s rozdílnými substituenty na benzylu v poloze N9, se symetrickou a asymetrickou substitucí v pozicích C2 a C6, kdy substituenty byly různě velkých kruhů, příp. byly o jednom/více heteroatomech. Jedna z nejvyšších biologických aktivit byla zaznamenána u 2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl) derivátu. Cílem bakalářské práce tedy byla primárně syntéza C2, C6 symetricky substituovaných derivátů se 4-hydroxybenzylem v pozici N9.

Při přípravě 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu bylo obecně prvním krokem syntézy připojení substituentu do pozice N9 purinového skeletu buď reakcí s benzylbromidem (I^a), nebo Mitsunobu alkylací (I^b, II, III a IV). Výsledky syntézy intermediátů jsou přehledně zobrazeny v následující tabulce (

Tabulka 2).

Tabulka 2: Přehled N9-derivátů 2,6-dichlorpurinu a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.
^a - připraveno reakcí 2,6-dichlorpurinu s benzylbromidem, ^b - připraveno Mitsunobu reakcí. * - nepozorován molekulový pík.

Látka	N9-substituent	Výtěžek (%)	HPLC (ret. čas, čistota) (min.; %)	m/z [M+H] ⁺
I ^a	benzyl	87	21,4; 85	279,4
I ^b	benzyl	53	21,57; 99+	279,4
II ^b	3-hydroxybenzyl	79	22,43; 95,5	295,4
III ^b	4-hydroxybenzyl	39	21,72; 99+	*
IV ^b	2-methoxybenzyl	49	22,75; 99+	309,4

Průběh reakcí byl kontrolován pomocí TLC a reakce probíhaly až do odreagování výchozí látky. Reakcí s benzylbromidem (I^a) bylo dosaženo vyššího výtěžku oproti Mitsunobu alkylaci. Problémem však byla čistota, kdy se látku nepodařilo dokonale purifikovat a vzniklá sloučenina měla čistotu pouze 85 %. Důvodem byl použitý

benzylbromid. Nevýhodou byl i čas reakce, kdy se látky nechávaly reagovat přes noc a také vznikalo více *N7* izomeru (na základě kontroly TLC). Vyšší čistoty produktu by teoreticky mohlo být dosaženo pomocí rekrystalizace, případně použitím jiné mobilní směsi. Mitsunobu alkylace vyžadovala kratší reakční čas a vznikalo i méně *N7* izomeru, nevýhodou byl naopak vznik velkého množství vedlejšího produktu trifenyfosfin oxidu (PPh₃O). Rekrystalizací z toluenu byla odstraněna převážná část PPh₃O a výsledná reakční směs byla dále purifikována pomocí sloupcové chromatografie. Látky **I^b** a **IV** byly dodatečně přečištěny rekrystalizací z MeOH od redukované formy DIADu. Rozdíly ve výtěžcích jednotlivých reakcí nebyly způsobeny neodreagováním výchozí látky, ale spíše izolací a purifikací výsledných intermediátů.

Následným krokem byla symetrická substituce v polohách C2 a C6, která probíhala ve skleněných ampulích pod argonovou atmosférou při 165 °C. Výchozími látkami byly intermediáty **I^b** a **II**, odpovídající cyklické aminy a DIPEA jako pomocná báze. Výsledky syntézy jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3: Přehled finálních produktů se symetrickou substitucí v polohách C2 a C6 a jejich fyzikálně-chemických vlastností.

Látka	Substituce		Výtěžek (%)	HPLC (ret. čas, čistota) (min., %)	m/z [M+H] ⁺
	<i>N9</i>	C2,C6			
1	4-hydroxybenzyl	azetidin-1-yl	14	19,76; 99+	337,3
2	4-hydroxybenzyl	piperidin-1-yl	87	27,24; 99+	393,4
3	4-hydroxybenzyl	azepan-1-yl	70	29,51; 99+	421,4
4	4-hydroxybenzyl	morfolino	94	19,99; 98	397,4
5	4-hydroxybenzyl	thiomorfolino	23	25,52; 99+	429,3
6	benzyl	azepan-1-yl	53	34,99; 99+	405,4
7	benzyl	1 <i>H</i> -imidazol-1-yl	82	25,98; 99+	343,3

Reakce probíhaly do úplného odreagování výchozího intermediátu. Následovalo rozdělení mezi voda/chloroform a purifikace sloupcovou chromatografií. Výtěžky jednotlivých produktů byly relativně vysoké, výjimkou byla reakce s azetidinem (**1**), kdy během reakce došlo k neočekávané polymerizaci a výtěžek reakce činil pouze 14 %. Pro substituci do polohy C2 je nutno použít z hlediska reaktivity teploty nad 120 °C, v našem případě byla teplota reakce 165 °C (standardní protokol). Takto vysoká teplota mohla způsobit nechtěnou polymerizaci a za účelem zvýšení výtěžku tohoto produktu by se do budoucna mohla použít teplota nižší. Nízký výtěžek měla i reakce s thiomorfolinem (**5**), kdy problémem byla purifikace – látka byla čištěna kolonou petrolether/ethyl-acetát, chloroform/MeOH a následně i pomocí preparativní HPLC.

Asymetrické deriváty byly připravovány z intermediátu **I^b** dvoukrokovou syntézou, kdy byly připraveny intermediáty se substitucí v poloze C6. V tlakové ampuli s argonovou atmosférou při 90 °C byly zahřívány intermediáty s příslušnými cyklickými

aminy, triethylaminem a *n*-propanolem. Ve druhém kroku, pro substituci do polohy C2 byly použity jako výchozí látky intermediát **V**, azepan a DIPEA, které reagovaly za podmínek zmíněných výše. Výsledky syntézy jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 4: Přehled finálních produktů s asymetrickou substitucí v polohách C2 a C6 a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.

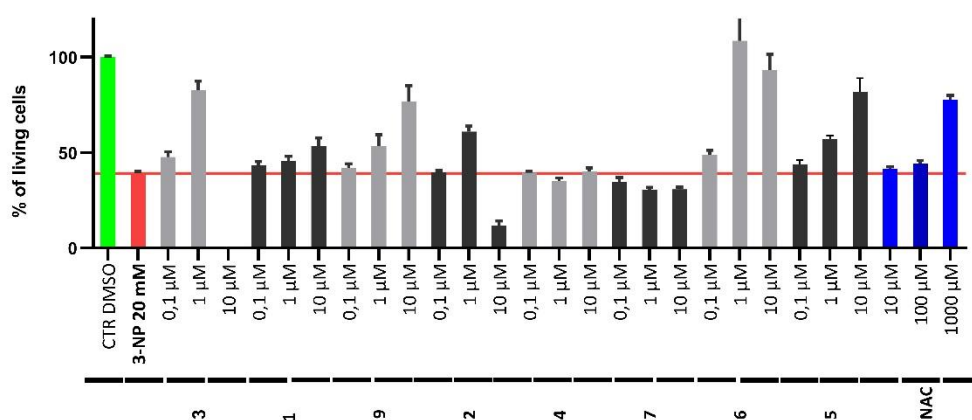
Látka	Substituce			Výtěžek (%)	HPLC (ret. čas, čistota) (min., %)	m/z [M+H] ⁺
	N9	C2	C6			
V	benzyl	Cl	pyrrolidin-1-yl	45	23,57; 99+	314,2
VI	benzyl	Cl	piperidin-1-yl	81	29,65; 99,4	328,6
VII	benzyl	Cl	morfolino	62	22,89; 99+	330,2
8	benzyl	azepan-1-yl	pyrrolidin-1-yl	53	31,07; 99+	377,4

Látka **VI** byla dodatečně přečištěna rekrystalizací z MeOH od redukované formy DIADu, látka **VII** byla přečištěna preparativní HPLC. Výtěžek látky **V** byl jen 45 % z důvodu opakované purifikace sloupcovou chromatografií. V případě jediného asymetricky substituovaného derivátu (**8**) byl výtěžek 53 %.

Při symetrické substituci finálních látek bylo nutné zahřívat reakční směs na 165 °C a reakční čas se pohyboval kolem tří hodin. V rámci urychlení celého procesu je možné využít mikrovlnnou syntézu a pomocí mikrovlnného záření výrazně zkrátit reakční čas (Kappe a kol., 2008). Výchozími látkami byly 9-benzyl-2,6-dichlorpurin (**I^b**), pyrrolidin a DIPEA a postupně se měnil poměr výchozího aminu, teplota reakce, reakční čas, výkon a zapínání funkce PowerMax (kontinuální chlazení během reakce). Stejně jako v ostatních případech byla pro posouzení průběhu reakce použita TLC s mobilní fází petrolether/ethyl-acetát/MeOH – 1:1:0,1 (v/v). Ve všech případech došlo k odreagování výchozí látky ($R_f=0,42$) a vzniku dominantní polárnější skvrny s retenčním faktorem 0,36. Z reakční směsi byly odebrány podíly a nastříknuty na HPLC. V případě použití podmínek u látky **9a** byl ve spektru pozorován pouze jeden pík s retenčním časem 20 minut, který odpovídal retenčnímu času cíleného produktu. U dalších reakcí (**9b**, **9c**, **9d** a **9e**) byl mimo majoritní pík pozorován ve spektru i pík s retenčním časem 17 minut, který odpovídal intermediátu **V**. S ohledem na získaná data z HPLC je patrné, že mikrovlnná syntéza má smysl – reakční doba se povedla výrazně zkrátit ze tří hodin na deset minut. Pro hledání vhodných reakčních podmínek má ale TLC s danou mobilní směsí nedostatečné rozlišení pro mono a disubstituované deriváty a do budoucna by bylo pro optimalizaci syntézy vhodnější zvolit metodu HPLC. Mimo kvalitativní analýzy provést také kvantifikaci pomocí kalibračních grafů a interního standard. Do budoucna by se v rámci optimalizace mikrovlnné syntézy mimo reakční čas dalo snížit množství cyklického aminu použitím rozpouštědla namísto prováděním reakce tzv. „neat“.

4.2. Biologické testování

Biologická aktivita byla testována na buněčné linii SH-SY5Y u níž byla neuronální diferenciaci navozena pomocí *all-trans* retinové kyseliny a byl využit model mitochondriálního poškození a Huntingtonovy choroby indukovaného 3-nitropropionovou kyselinou (Colle a kol., 2016). Viabilita buněk byla vyhodnocována Calcein AM viabilitním testem (Morzycki a kol., 2016). Živé buňky metabolizují nefluorescenční Calcein AM na fluorescenční Calcein a u vzorků se sledovala fluorescence při 495/517 nm (ex./em.). Testované látky byly měřeny ve třech koncentracích (0,1; 1 a 10 μM) a jako negativní kontrola byly použity buňky v DMSO, jako pozitivní kontrola buňky ošetřené *N*-acetylcysteinem (10, 100 a 1000 μM). Silné cytoprotektivní účinky vykazovaly látky **3** (83 %), **5** (82 %), **6** (109 %) a **9** (77 %), slabší efekt byl pozorován u **1** (53 %) a **2** (61 %) a žádné účinky u **4** (40 %) a **7** (35 %). U látek **1**, **5** a **9** rostla účinnost v závislosti na koncentraci testované látky, naopak u látek **2** a **3** byla v nejvyšší koncentraci 10 μM pozorována cytotoxicita. V porovnání s *N*-acetylcysteinem byly látky účinnější i v nižším koncentračním rozsahu, kdy např. látka **3** měla při koncentraci 1 μM hodnotu viability 83 %, zatímco *N*-acetylcystein při koncentraci 1000 μM měl hodnotu pouze 78 %.



Obr. 22: Výsledky Calcein AM viabilitního testu, kdy hodnoty fluorescence jsou přepočítány na procenta živých buněk odvozených od kontrolních živých buněk v DMSO. Jako negativní kontrola byly použity buňky v DMSO (zeleně zvýrazněny), červeně zvýrazněny jsou buňky inkubované pouze s toxickou 3-nitropropionovou kyselinou a modře zvýrazněny jsou buňky ošetřené *N*-acetylcysteinem. Silné cytoprotektivní účinky vykazovaly látky **3** (83 %), **5** (82 %), **6** (109 %) a **9** (77 %), slabší efekt byl pozorován u **1** (53 %) a **2** (61 %) a žádné účinky (hodnoty byly pod hodnotami buněk s cytotoxickou látkou) u **4** (40 %) a **7** (35 %). U látek **1**, **5** a **9** roste účinnost v závislosti na koncentraci testované látky. U látek **2** a **3** byla v nejvyšší koncentraci 10 μM pozorována cytotoxicita.

V rámci biologického testování byla testována pouze série symetricky substituovaných 9-(4-hydroxybenzyl) (**1**, **2**, **3**, **4** a **5**) a 9-benzyl derivátů (**6**, **7** a **9**). V případě 9-(4-hydroxybenzyl) derivátů cytoprotektivita do koncentrace 1 μM narůstá spolu se zvětšujícími se kruhy v řadě azetidin (46 %), piperidin (61 %), azepan (83 %).

V koncentraci 10 μM se ve stejné řadě naopak projevuje stejný cytotoxický efekt (53 %, 12 %, 0 %). U látek s morfolinem (**4**) a thiomorfolinem (**5**) byl pozorován výrazný rozdíl biologické aktivity (**4** – 40 %, **5** – 82 %) daný přítomností různých heteroatomů na kruhu. Vyšší aktivita thiomorfolinového derivátu mohla být daná schopností síry se oxidovat na sulfoxid či sulfon. Diazepanyl deriváty **3** a **6** obecně patřily k neúčinnějším látkám, avšak přítomnost hydroxyly v pozici 4 měla zásadní vliv na biologickou aktivitu v nejvyšší testované koncentraci. U 4-hydroxybenzylu byla viabilita rovna 0 %, u benzylu byl zaznamenán pouze nepatrný pokles. V tomto směru není hydroxy skupina na benzylu zcela optimální a do budoucna by bylo vhodné zvolit jinou funkční skupinu. Deriváty **7** a **9** se také odlišují svoji biologickou aktivitou, kdy látka **7** s imidazolem měla spíše cytotoxickou aktivitu (nejvyšší dosažená hodnota viability byla 35 %) a **9** s pyrrolidinem měla hodnoty viability vysoké (77 %). Rozdílem je odlišnost na kruhu, kdy pyrrolidin je prostorová struktura, která může zaujímat konformaci obálky, zatím co imidazol je planární aromatická struktura, což mohlo způsobit dané rozdíly.

Do budoucna by bylo vhodné otestovat připravené deriváty na jiném modelu Parkinsonovy nemoci s jinými typy stresorů. Dále otestovat, zda jsou látky skutečně neuroprotektivní nebo zda mají vliv pouze na mitochondriální poškození, případně zjistit konkrétní molekulární cíle, na které působí. Vzhledem ke strukturální podobnosti našich látek s látkami z patentů (Adam a kol., 2013, Rascol a kol., 2002) by jedním z molekulárních cílů mohly být CB1 a CB2 receptory. V současné době jsou látky testovány na inhibici acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Zajímavým a případným molekulárním cílem by též mohly být A_{2A} receptory.

5. ZÁVĚR

Cílem teoretické části byla literární rešerše na téma Parkinsonova nemoc se zaměřením na přehled molekulárních cílů spojených s patogenezí a jejich možnou farmakologickou léčbou. Experimentální část pak byla věnována syntéze 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu a testování jejich biologické aktivity v *in vitro* modelu Parkinsonovy nemoci.

Ve finále bylo připraveno osm C2,C6-symetricky a jeden C2,C6-asymetricky substituovaných produktů. V rámci syntézy C2,C6-symetricky substituovaných látek byla úspěšně aplikována mikrovlnná syntéza, kdy byl výrazně zkrácen reakční čas. Pro další optimalizaci postupu však bude nutné provést další experimenty a zejména najít vhodné podmínky pro monitorování průběhu reakce. Testování připravených látek na neuroblastomové buněčné linii s ohledem na jejich možný neuroprotektivní vliv v modelu mitochondriálního poškození a Huntingtonovy choroby ukázal, že některé deriváty v porovnání s *N*-acetylcysteinem vykazovaly silný cytoprotektivní účinek. Nejúčinnější látkou byl 2,6-di(azepan-1-yl) derivát **6**, který byl schopný zcela eliminovat přítomnost toxinu v kultivačním médiu. Další silný protektivní účinek měly i látky **3**, **5** a **9**. Vzhledem k dosaženým výsledkům bude zajímavé testování těchto látek na jiných modelech Parkinsonovy nemoci s jinými stresory. Dalším a patrně tím nejtěžším krokem bude v budoucnu určení mechanismu účinku a identifikace konkrétních molekulárních cílů.

6. POUŽITÁ LITERATURA

Adam J.-M., Bissantz C., Grether U., Kimbara A., Nettekoven M., Reover S., Rogers-Evans M. (2013) [1, 2, 3] Triazolo [4, 5 -D] pyrimidine derivatives as agonists of the cannabinoid receptor. WO 2013/068306 A1, 223.

Antonini A., Moro E., Godeiro C., Reichmann H. (2018) Medical and surgical management of advanced Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **33**, 900-908.

Aryati W. D., Salamah N. N., Syahdi R. R., Yanuar A. (2019) Neuroprotection, The role and development of the antagonist of adenosine A2A in Parkinson's Disease, Chang R. C.-C., Ho Y.-S., IntechOpen.

Atashrazm F., Dzamko N. (2016) LRRK2 inhibitors and their potential in the treatment of Parkinson's disease: current perspectives. *Clin. Pharmacol.* **8**, 177-189.

Baul H. S., Manikandan C., Sen D. (2019) Cannabinoid receptor as a potential therapeutic target for Parkinson's Disease. *Brain Res. Bull.* **146**, 244-252.

Beaulieu J.-M., Gainetdinov R. R. (2011) The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **63**, 182.

Becerra G. P., Rojas-Rodríguez F., Ramírez D., Loaiza A. E., Tobar-Tosse F., Mejía S. M., González J. (2020) Structural and functional computational analysis of nicotine analogs as potential neuroprotective compounds in Parkinson disease. *Comput. Biol. Chem.* **86**, 107266.

Berwick D. C., Heaton G. R., Azeggagh S., Harvey K. (2019) LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol. Neurodegener.* **14**, 49-49.

Blauwendraat C., Nalls M. A., Singleton A. B. (2020) The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **19**, 170-178.

Buhmann C., Mainka T., Ebersbach G., Gandor F. (2019) Evidence for the use of cannabinoids in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **126**, 913-924.

Burkhard P., Dominici P., Borri-Voltattorni C. (2001) Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 963-967.

Burré J., Sharma M., Südhof T. C. (2018) Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *CSH. Perspect. Med.* **8**,

Cacabelos R. (2017) Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* **18**,

Carradori S., Silvestri R. (2015) New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. *J. Med. Chem.* **58**, 6717-6732.

Colle D., Santos D. B., Hartwig J. M., Godoi M., Engel D. F., de Bem A. F., Braga A. L., Farina M. (2016) Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. *Mol. Neurobiol.* **53**, 1280-1295.

Dauer W., Przedborski S. (2003) Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889-909.

de Lau L. M. L., Breteler M. M. B. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525-535.

Dorsey E. R., Constantinescu R., Thompson J. P., Biglan K. M., Holloway R. G., Kieburtz K., Marshall F. J., Ravina B. M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C. M. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* **68**, 384.

Feigin V. L. (2017) Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2013;2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* **16**, 877-897.

Finberg J. P. M. (2019) Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **126**, 433-448.

German C. L., Baladi M. G., McFadden L. M., Hanson G. R., Fleckenstein A. E. (2015) Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol. Rev.* **67**, 1005.

Goldstein D. S., Sullivan P., Holmes C., Miller G. W., Alter S., Strong R., Mash D. C., Kopin I. J., Sharabi Y. (2013) Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **126**, 591-603.

Gonzales G. (2016) Synthesis of 3,5,7-trisubstituted-3*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidines with potential neuroprotective effect in *in vitro* model of Parkinson's disease. Katedra organické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 113, Master.

Han Q.-W., Yuan Y.-H., Chen N.-H. (2020) The therapeutic role of cannabinoid receptors and its agonists or antagonists in Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **96**, 109745.

Harikrishna Reddy D., Misra S., Medhi B. (2014) Advances in Drug Development for Parkinson's Disease: Present Status. *Pharmacology* **93**, 260-271.

Hatcher J. M., Zhang J., Choi H. G., Ito G., Alessi D. R., Gray N. S. (2015) Discovery of a Pyrrolopyrimidine (JH-II-127), a Highly Potent, Selective, and Brain Penetrant LRRK2 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 584-589.

Hauser R. A., Rascol O., Korczyn A. D., Jon Stoessl A., Watts R. L., Poewe W., De Deyn P. P., Lang A. E. (2007) Ten-year follow-up of Parkinson's disease patients randomized to initial therapy with ropinirole or levodopa. *Mov. Disord.* **22**, 2409-2417.

Hayes M. T. (2019) Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am. J. Med.* **132**, 802-807.

Chambers N. E., Meadows S. M., Taylor A., Sheena E., Lanza K., Conti M. M., Bishop C. (2019) Effects of Muscarinic Acetylcholine m1 and m4 Receptor Blockade on Dyskinesia in the Hemi-Parkinsonian Rat. *Neuroscience* **409**, 180-194.

Igarashi M., Habata T., Akita H., Noda K., Ogata M., Saji M. (2015) The NR2B antagonist, ifenprodil, corrects the I-DOPA-induced deficit of bilateral movement and reduces c-Fos expression in the subthalamic nucleus of hemiparkinsonian rats. *Neurosci. Res.* **96**, 45-53.

Jatana N., Apoorva N., Malik S., Sharma A., Narayanan L. (2014) Inhibitors of Catechol-O-Methyl Transferase in the Treatment of Neurological Disorders. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2013**,

Kalia L. V., Kalia S. K., McLean P. J., Lozano A. M., Lang A. E. (2013) α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **73**, 155-169.

Kalia L. V., Lang A. E. (2015) Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **386**, 896-912.

Kappe C. O., Dallinger D., Murphree S. S. (2008) Practical Microwave Synthesis for Organic chemists: Strategies, Instruments, and Protocols, 299, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Legraverend M., Grierson D. S. (2006) The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3987-4006.

Ma Z., Liu H., Wu B. (2014) Structure-based drug design of catechol-O-methyltransferase inhibitors for CNS disorders. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **77**, 410-420.

Mackie P., Lebowitz J., Saadatpour L., Nickoloff E., Gaskill P., Khoshbouei H. (2018) The dopamine transporter: An unrecognized nexus for dysfunctional peripheral immunity and signaling in Parkinson's Disease. *Brain Behav. Immun.* **70**, 21-35.

Maďa P. (2014) Funkce buněk a lidského těla, 627, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy.

Maiti P., Manna J., Dunbar G. L. (2017) Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl. Neurodegener.* **6**, 28.

Mao Q., Qin W. Z., Zhang A., Ye N. (2020) Recent advances in dopaminergic strategies for the treatment of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 471-482.

Martin L. J., Blackstone C. D., Levey A. I., Huganir R. L., Price D. L. (1993) AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* **53**, 327-358.

Meiser J., Weindl D., Hiller K. (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* **11**, 34.

Morzycki J. W., Rárová L., Grúz J., Sawczuk T., Kielczewska U., Siergiejszyk L., Wojtkielewicz A. (2016) Synthesis of Aromatic Retinoids and Curcuminoids and Evaluation of their Antiproliferative, Antiradical, and Anti-inflammatory Activities. *ChemistryOpen* **5**, 339-350.

Noyce A. J., Bestwick J. P., Silveira-Moriyama L., Hawkes C. H., Giovannoni G., Lees A. J., Schrag A. (2012) Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **72**, 893-901.

Pang S. Y.-Y., Ho P. W.-L., Liu H.-F., Leung C.-T., Li L., Chang E. E. S., Ramsden D. B., Ho S.-L. (2019) The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* **8**, 23-23.

Postuma R. B., Aarsland D., Barone P., Burn D. J., Hawkes C. H., Oertel W., Ziemssen T. (2012) Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-Motor disorders in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **27**, 617-626.

Price D. L., Koike M. A., Khan A., Wrasidlo W., Rockenstein E., Masliah E., Bonhaus D. (2018) The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. *Sci. Rep-UK* **8**, 16165.

Rascol O., Goetz C., Koller W., Poewe W., Sampaio C. (2002) Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet Neurol.* **359**, 1589-1598.

Reover S., Rogers-Evans M., Nettekoven M., Schmitt S., Grether U., Kimbara A. (2015) Novel triazolo [4, 5 -D] pyrimidine derivatives. WO 2015/032769 A1, 108.

Rosemeyer H. (2004) The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chem. Biodiversity* **1**, 361-401.

Runegaard A. H., Fitzpatrick C. M., Woldbye D. P. D., Andreasen J. T., Sørensen A. T., Gether U. (2019) Modulating Dopamine Signaling and Behavior with Chemogenetics: Concepts, Progress, and Challenges. *Pharmacol. Rev.* **71**, 123.

Schwarzschild M. A., Agnati L., Fuxe K., Chen J.-F., Morelli M. (2006) Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **29**, 647-654.

Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M. (1997) α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840.

Toulouse A., Sullivan A. M. (2008) Progress in Parkinson's disease—Where do we stand? *Prog. Neurobiol.* **85**, 376-392.

Wakabayashi K., Tanji K., Mori F., Takahashi H. (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology* **27**, 494-506.

Watts R. L., Lyons K. E., Pahwa R., Sethi K., Stern M., Hauser R. A., Olanow W., Gray A. M., Adams B., Earl N. L., On Behalf of the 228 Study I. (2010) Onset of dyskinesia with adjunct ropinirole prolonged-release or additional levodopa in early Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **25**, 858-866.

West A. B. (2017) Achieving neuroprotection with LRRK2 kinase inhibitors in Parkinson disease. *Exp. Neurol.* **298**, 236-245.

Williams D. B. G., Lawton M. (2010) Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.

Wong Y. C., Krainc D. (2017) α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **23**, 1-13.

Xiang Z., Thompson A. D., Jones C. K., Lindsley C. W., Conn P. J. (2012) Roles of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype in the Regulation of Basal Ganglia Function and Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**, 595.

Xu M. M., Ryan P., Rudrawar S., Quinn R. J., Zhang H. Y., Mellick G. D. (2020) Advances in the development of imaging probes and aggregation inhibitors for alpha-synuclein. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 483-498.

Yacoubian T. A., Standaert D. G. (2009) Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **1792**, 676-687.

Youdim M. B. H., Bakhle Y. S. (2006) Monoamine oxidase: Isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S287-S296.

Zhang Z., Zhang S., Fu P., Zhang Z., Lin K., Ko J. K.-S., Yung K. K.-L. (2019) Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4391.

Zheng J., Zhang X., Zhen X. (2019) Development of Adenosine A2A Receptor Antagonists for the Treatment of Parkinson's Disease: A Recent Update and Challenge. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 783-791.

Zhou F. M., Wilson C. J., Dani J. A. (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* **53**, 590-605.

Internetové zdroje:

Cell Signaling Technology -

<https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-neuroscience/dopamine-signaling-in-parkinson-s-disease/pathways-park> [10. 05. 2020]

Parkinson.org -

<https://www.parkinson.org/Understanding-Parkinsons/Statistics/Notable-Figures-with-Parkinsons?fbclid=IwAR2z2IkZjl8pr5ZOTyGbv8RQai7uvBPnZIC5SOpc5DNxCoPMLLfVBmfqFQE> [02. 08. 2020]

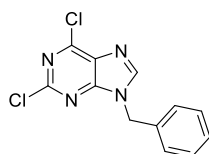
Wikipedie1 – Wikipedie.en. hledaný termín basal ganglia -

[https://en.wikipedia.org/wiki/Basal_ganglia#/media/File:Basal_ganglia_and_related_structures_\(2\).svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Basal_ganglia#/media/File:Basal_ganglia_and_related_structures_(2).svg) [09. 05. 2020]

Přílohy

Příloha 1. Přehled připravených látek

9-benzyl-2,6-dichlor-9*H*-purin (I)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₁₂H₈Cl₂N₄

Výtěžek (%): 53.

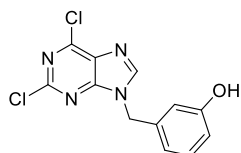
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min, %): 26,18, 98,0.

ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 279,4 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 281,4 (79, [³⁵Cl,³⁷Cl-M+H]⁺), 283,4 (³⁷Cl-M+H]⁺).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5,49 (s, 2H); 7,28-7,37 (m, 5H); 8,85 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 47,0; 127,5 (2× C); 128,0; 128,7 (2× C); 130,4; 135,5; 148,3; 149,7; 151,0; 153,3.

3-[(2,6-dichlor-9*H*-purin-9-yl)methyl]fenol (II)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₁₂H₈Cl₂N₄O

Výtěžek (%): 79.

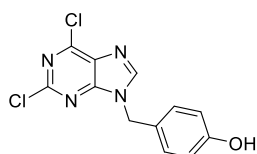
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min, %): 22,43; 95,5.

ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 295,4 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 297,4 (73, [³⁵Cl,³⁷Cl-M+H]⁺); 299,4 (16, [³⁷Cl-M+H]⁺).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5,40 (s, 2H); 6,65 (t, *J* = 1,8 Hz, 1H); 6,68 (dq, *J* = 7,9; 1,1 Hz, 1H); 6,72 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,13 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 8,83 (s, 1H); 9,52 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 47,0; 114,2; 115,0; 117,9; 129,9; 130,4; 137,0; 148,5; 149,8; 151,1; 153,3; 157,6.

4-[(2,6-dichlor-9*H*-purin-9-yl)methyl]fenol (III)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₁₂H₈Cl₂N₄O

Výtěžek (%): 39.

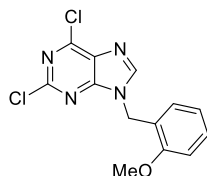
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min, %): 18,10; 99,0.

ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 107,1 (100, [C₇H₇O]⁺); 188,9 (16, [³⁵Cl-C₅H₂Cl₂N₄]⁺); 191,0 (10, [³⁷Cl-C₅H₂Cl₂N₄]⁺).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5,34 (s, 2H); 6,70-6,73 (m, 2H); 7,18-7,21 (m, 2H); 8,79 (s, 1H); 9,53 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 46,8; 115,4 (2 \times C); 125,7; 129,4 (2 \times C); 130,4; 148,2; 149,7; 151,0; 153,2; 157,3.

2,6-dichlor-9-(2-methoxybenzyl)-9H-purin (IV)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$

Výtěžek (%): 49.

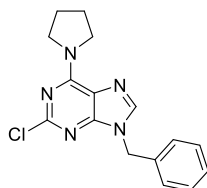
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min, %): 26,25; 98,9.

ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 309,4 (100, [^{35}Cl -M+H]⁺), 311,4 (78, [^{37}Cl -M+H]⁺).

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,80 (s, 3H); 5,40 (s, 2H); 6,91 (td, $J = 7,5$; 0,9 Hz, 1H); 7,03 (dd, $J = 8,3$; 0,6 Hz, 1H); 7,13 (dd, $J = 7,3$; 1,5 Hz, 1H); 7,32 (td, $J = 7,8$; 1,5 Hz, 1H); 8,71 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 43,3; 55,5; 111,0; 120,4; 122,9; 129,3; 129,9; 130,3; 148,8; 149,6; 150,9; 153,4; 156,9.

9-benzyl-2-chlor-6-(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin (V)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_5$

Výtěžek (%): 45.

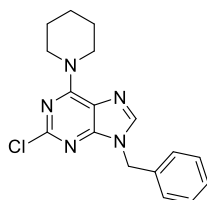
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min, %): 23,57; 99,9.

ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 314,2 (100, [^{35}Cl -M+H]⁺), 316,2 (34, [^{37}Cl -M+H]⁺).

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,85-1,91 (m, 2H); 1,95-2,00 (m, 2H); 3,57 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 4,03 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 5,34 (s, 2H); 7,23-7,24 (m, 2H); 7,26-7,29 (m, 1H); 7,32-7,35 (m, 2H); 8,24 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 23,6; 25,6; 46,1; 47,3; 48,6; 118,4; 127,2 (2 \times C); 127,7; 128,7 (2 \times C); 136,8; 140,8; 150,8; 152,8; 152,9.

9-benzyl-2-chlor-6-(piperidin-1-yl)-9H-purin (VI)



Bezbarvý gel

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_5$

Výtěžek (%): 81.

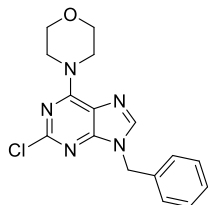
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min, %): 29,65; 99,4.

ESI+MS m/z (rel. int. %, ion): 328,6 (100, [^{35}Cl -M+H]⁺), 330,6 (52, [^{37}Cl -M+H]⁺).

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,55 (s, 4H); 1,61-1,64 (m, 2H); 3,83 (s, 2H); 4,43 (bs, 2H); 5,33 (s, 2H); 7,25-7,28 (m, 3H); 7,31-7,34 (m, 2H); 8,26 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,0; 25,6 (2 \times C); 44,5; 46,2; 46,8; 117,8; 127,3 (2 \times C); 127,8; 128,7 (2 \times C); 136,6; 140,1; 151,5; 152,8; 153,2.

9-benzyl-2-chlor-6-morfolino-9H-purin (VII)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}$

Výtěžek (%): 62.

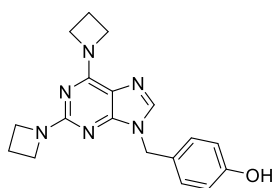
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 22,89; 99,9.

ESI+MS m/z (rel. int. %, ion): 330,2 (100, [^{35}Cl -M+H] $^+$), 332,1 (34, [^{37}Cl -M+H] $^+$).

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,70 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H); 3,90 (bs, 2H); 4,43 (bs, 2H); 5,35 (s, 2H); 7,25-7,30 (m, 3H); 7,33-7,36 (m, 2H); 8,32 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 44,0; 46,2 (2 \times C); 66,04 (2 \times C); 118,0; 127,3 (2 \times C); 127,8; 128,7 (2 \times C); 136,6; 140,7; 151,7; 152,7, 153,4.

2,6-di(azetidín-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-9H-purin (1)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}$

Výtěžek (%): 14.

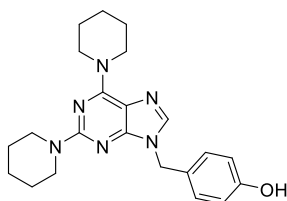
HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 19,76; 99,9.

ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 337,3 (100, [M+H] $^+$).

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,17-2,23 (m, 2H); 2,31-2,37 (m, 2H); 3,93 (t, $J = 7,5$ Hz, 4H); 4,23 (bs, 4H); 5,03 (s, 2H); 6,68 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,14 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,76 (s, 1H); 9,41 (s, 1H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 15,6; 17,2; 45,2; 50,3 (2 \times C); 50,6; 51,1; 113,6; 115,2 (2 \times C); 127,8; 129,3 (2 \times C); 137,9; 151,7; 155,0; 156,9; 160,6.

2,6-di(piperidín-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)purin (2)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}$

Výtěžek (%): 87.

HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 27,24; 99,9.

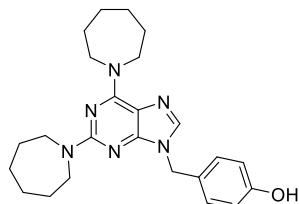
ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 393,4 (100, [M+H] $^+$).

EA (%C, %H, %N, teoretické/reálné): 67,32/ 68,13; 7,19/ 7,29; 21,41/20,53.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,49-1,50 (m, 8H); 1,57-1,58 (m, 2H); 1,60-1,62 (m, 2H); 3,67 (d, $J = 4,0$ Hz, 4H); 4,06 (bs, 4H); 5,05 (s, 2H); 6,68 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,18 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 7,80 (s, 1H); 9,41 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,4; 24,6; 25,2 (2× C); 25,6 (2× C); 44,9 (2× C); 45,3 (3× C); 112,9; 115,2 (2× C); 127,8; 129,4 (2× C); 136,5; 152,8; 153,2; 156,9; 158,0.

2,6-di(azepan-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-9H-purin (3)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₂₄H₃₂N₆O

Výtěžek (%): 70.

HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 29,51; 99,9.

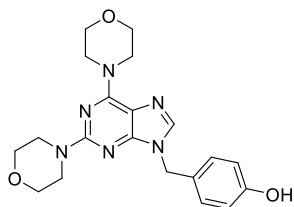
ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 421,4 (100, [M+H]⁺).

EA (%C, %H, %N, teoretické/reálné): 68,54/68,84; 7,67/7,92; 19,98/19,58.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,44-1,45 (m, 8H); 1,71 (bs, 8H); 3,69 (t, *J* = 5,8 Hz, 4H); 3,72 (bs, 2H); 4,23 (bs, 2H); 5,02 (s, 2H); 6,67 (dt, *J* = 9,1; 2,4 Hz, 2H); 7,23 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,76 (s, 1H); 9,40 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 26,1; 26,5; 26,6 (3× C); 27,8 (2× C); 29,1; 45,4; 47,0 (2× C); 47,6; 48,8; 112,4; 115,1 (2× C); 127,9; 129,7 (2× C); 136,2; 152,7; 153,4; 156,9; 157,6.

2,6-dimorfolino-9-(4-hydroxybenzyl)-9H-purin (4)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₂₀H₂₄N₆O₃

Výtěžek (%): 94.

HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 19,99; 98,06.

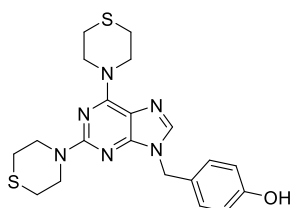
ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 397,4 (100, [M+H]⁺).

EA (%C, %H, %N, teoretické/reálné): 60,59/60,95; 6,10/6,24; 21,20/18,90.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,63 (s, 8H); 3,65-3,67 (m, 4H); 4,09 (bs, 4H); 5,08 (s, 2H); 6,67-6,69 (m, 2H); 7,16 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,89 (s, 1H); 9,42 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44,7 (2× C); 45,1 (2× C); 45,4; 66,1 (2× C); 66,2 (2× C); 113,5; 115,2 (2× C); 127,6; 129,4 (2× C); 137,4; 152,7; 153,2; 156,9; 158,0.

2,6-dithiomorfolino-9-(4-hydroxybenzyl)-9H-purin (5)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₂₀H₂₄N₆OS₂

Výtěžek (%): 37.

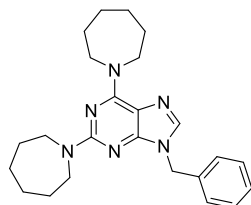
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 25,52; 99,9.

ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 429,3 (100, [M+H]⁺).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,56-2,58 (m, 4H, C2_{thiomorf} Ho), 2.62-2.64 (m, 4H, C6_{thiomorf} Ho), 4.01-4.04 (m, 4H, C2_{thiomorf} Hm), 4.38 (bs, 4H, C6_{thiomorf} Hm), 5.07 (s, 2H, CH₂Phe), 6.68 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Hm), 7.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ho), 7.89 (s, 1H, pur C8), 9.40 (s, 1H, Phe-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 25,5 (2 \times C); 26,2 (2 \times C); 45,5; 46,6 (2 \times C); 47,3 (2 \times C); 113,2; 115,2 (2 \times C); 127,5; 129,6 (2 \times C); 137,2; 152,8; 153,0; 156,9; 157,2.

2,6-di(azepan-1-yl)-9-benzyl-9H-purin (6)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₂₄H₃₂N₆

Výtěžek (%): 53.

HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 34,99; 99,9.

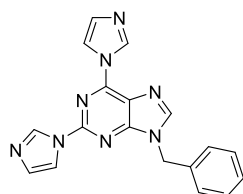
ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 405,4 (100, [M+H]⁺).

EA (%C, %H, %N, teoretické/reálné): 71,25/70,76; 7,97/8,38; 20,77/20,65.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,43 (bs, 4H); 1,46 (bs, 4H); 1,69 (bs, 8H); 3,67 (t, $J = 6,0$ Hz, 4H); 3,73 (bs, 2H); 4,24 (bs, 2H); 5,16 (s, 2H); 7,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,31 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,38 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 7,81 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 26,1; 26,4; 26,5 (2 \times C); 26,6; 27,7 (2 \times C); 29,0; 45,7 (2 \times C); 47,0; 47,5; 48,8; 112,3; 127,5; 128,1 (2 \times C); 128,5 (2 \times C); 136,3; 137,5; 152,7; 153,4; 157,6.

9-benzyl-2,6-di(1H-imidazol-1-yl)-9H-purin (7)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₁₈H₁₄N₈

Výtěžek (%): 82.

HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 25,98; 99,9.

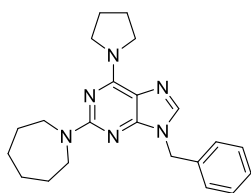
ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 343,3 (100, [M+H]⁺).

EA (%C, %H, %N, teoretické/reálné): 63,15/63,03; 4,12/4,22; 32,73/31,11.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5,54 (s, 2H); 7,16 (t, $J = 1,1$ Hz, 1H); 7,26 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H); 7,32-7,29 (m, 1H); 7,37 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,49 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 8,16 (t, $J = 1,4$ Hz, 1H); 8,58 (t, $J = 1,4$ Hz, 1H); 8,83 (s, 1H); 8,86 (s, 1H); 9,22 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 46,9; 117,3; 117,9; 120,1; 128,2; 128,2 (2 \times C); 128,8 (2 \times C); 130,3; 130,7; 136,0; 136,5; 137,4; 145,2; 146,9; 148,6; 154,6.

2-(azepan-1-yl)-9-benzyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin (8)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₂₂H₂₈N₆

Výtěžek (%): 51.

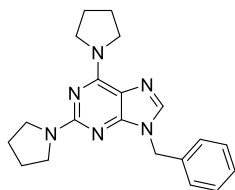
HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 31,07, 99,9.

ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 377,4 (100, [M+H]⁺).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,42-1,45 (m, 4H); 1,70 (bs, 4H); 1,88 (bs, 4H); 3,56 (bs, 2H); 3,68 (t, *J* = 6,0 Hz, 4H); 3,93 (bs, 2H); 5,17 (s, 2H); 7,23-7,26 (m, 1H); 7,28-7,39 (m, 2H); 7,33-7,35 (m, 2H); 7,78 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,6; 25,8; 26,5 (2× C); 27,6 (2× C); 45,6; 46,6; 47,0 (2× C); 47,8; 113,0; 127,5; 127,9 (2× C); 128,4 (2× C); 136,6; 137,6; 152,4; 152,5; 157,9.

9-benzyl-2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin (9)



Bílá pevná látka

Sumární vzorec: C₂₀H₂₄N₆

HPLC-UV/VIS retenční čas; čistota (min., %): 32,85; 99,8.

ESI+-MS m/z (rel. int. %, ion): 349,6 (100, [M+H]⁺).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,84-1,89 (m, 8H); 3,44-3,47 (m, 4H); 3,60 (bs, 2H); 3,94 (bs, 2H); 5,18 (s, 2H); 7,23-7,26 (m, 1H); 7,29-7,31 (m, 4H); 7,77 (s, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,7; 25,1 (2× C); 26,1; 45,5; 46,3 (3× C); 48,0; 113,2; 127,5; 127,7 (2× C); 128,5 (2× C); 136,6; 137,7; 152,3; 152,6; 157,3.