

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 722

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/34 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A01N 43/90 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-582**
(22) Přihlášeno: **28.08.2015**
(40) Zveřejněno: **08.03.2017**
(Věstník č. 10/2017)
(47) Uděleno: **13.02.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **27.03.2019**
(Věstník č. 13/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
MIK. V. a kol. N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72, 2011, 821-831; SZŮČOVÁ, L., a kol. Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2009, 17, 1938-1947.; HASAN A., Studies in nucleosides: Part XIV - synthesis of 2-chloro/methoxy-6-N-substituted-9-(2-tetrahydrofuranyl)-9H-purines and their biological activity. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* (19861031), 25B(10), pp. 1070-1.
WO 2009086457 A2; CZ 300774 B6.

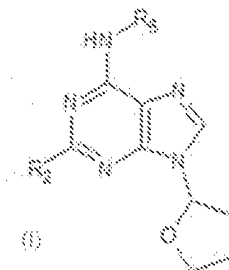
(73) Majitel patentu:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
Mgr. Martin Hönig, Červenka, CZ
Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D., Olomouc, CZ
Mgr. Karel Doležal, Dr.DSc., Hlubočky, CZ
Mgr. Jiří Voller, Ph.D., Brno - Bystrc, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, DrSc., Olomouc, CZ
doc. Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D., Olomouc, CZ
doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D., Kožušany - Tážaly, CZ
doc. Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D., Olomouc, CZ
prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc., Olomouc, CZ
Mgr. Alena Kadlecová, Tvrdonice, CZ
RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Adeninové deriváty a jejich použití

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje adeninové deriváty obecného vzorce I substituované v polohách C2, N9 a na aminoskupině, které mají antisenescenční a kombinované fotoprotektivní UVA/UVB účinky. Tyto látky jsou vhodné zejména jako antisenescenční a UV-fotoprotektivní složky v kosmetických přípravcích, v přípravcích pro ochranu rostlin a v přípravcích pro ošetření tkáňových kultur.



Adeninové deriváty a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká adeninových derivátů majících kombinované antisenescenční a UV–fotoprotektivní účinky proti záření UVA i UVB. Dále se týká jejich použití a přípravků je obsahujících.

Dosavadní stav techniky

6–Furfurylaminopurin (kinetin) je látka ze skupiny rostlinných hormonů cytokininů, jež jsou N⁶–substituovanými deriváty adeninu. Kinetin byl objeven v padesátých letech minulého století a byl považován za tzv. růstový faktor, protože pozitivně ovlivňoval dělení buněk tabákového kalusu. Exogenní aplikace kinetinu indukuje buněčné dělení a morfogenezi buněk rostlinného kalusu, anebo například oddaluje senescenci listů. Kromě vlivu na rostlinné buňky vykazuje kinetin také účinky na buňky živočišné. Má antioxidační vlastnosti a brání oxidačnímu poškození DNA, inhibuje oxidační a glykační poškození proteinů, dokáže ovlivňovat růst keratinocytů a oddaluje stárnutí lidských kožních fibroblastů *in vitro*, aniž by látka měla efekt na proliferaci těchto fibroblastů. Derivát kinetinu 6–furfurylamino–9–(2–tetrahydropyran–2–yl)purin (obchodní název Pyratine), který je v současné době komerčně využíván v kosmetických přípravcích, byl připraven spojením protektivní tetrahydropyranylové skupiny s molekulou kinetinu. Tato strukturní modifikace vedla ke zlepšení antisenescenčních a antioxidačních účinků na rostlinné i živočišné buňky, a to i při testech prováděných na lidské kůži nebo jejích modelech.

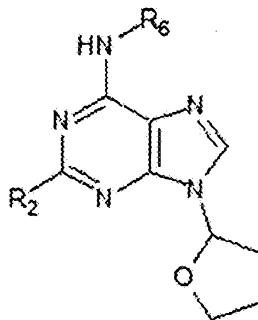
V posledních letech narůstá množství UV záření, zejména jeho středních (UVB) a dlouhých (UVA) vlnových délek, které dopadá na povrch Země, a tento nový fenomén přispívá u lidí k rozvoji řady kožních onemocnění a poruch. UVB záření představuje asi 4 až 5 % celkového objemu záření a proniká do kožní epidermis, kde způsobuje přímé i nepřímé nežádoucí biologické účinky. UVA záření tvoří 90 % celkového podílu záření a proniká hlouběji do papilární dermis a částečně i do hypodermis (10 %), kde způsobuje vznik tzv. reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Chronické vystavení kůže UVA záření může vést k tzv. předčasnému stárnutí kůže, které je spojeno s poškozením struktury dermis a jehož důsledkem je vznik vrásek, pigmentových skvrn, aj. Přirozenou endogenním fotoprotektivní látkou je melanin, ale v lidské kůži se ho netvoří dostatek, zejména v souvislosti se zvyšující se intenzitou UV záření dopadajícího na Zemi, vlivem úbytku ozonu v atmosféře, a změnou životního stylu (více outdoorových aktivit, oděv zakrývající menší část povrchu těla). Pokud je kůže ošetřena látkou, která zamezuje pronikání zejména UV paprsků, může ji chránit před předčasným stárnutím ale i krátkodobým nežádoucím účinkům UV záření.

Většina přípravků, které dnes využívají kosmetické přípravky k ochraně před slunečním zářením, tzv. sunscreens (UV filtry), byly vyvinuty, aby chránily především před "škodlivějším" UVB zářením, které může vyvolat vznik zhoubného melanokarcinomu. Sunscreens se dělí na fyzikální (anorganické minerální látky, které vytvářejí fyzikální překážku záření na kůži, jako například TiO₂ nebo ZnO) a chemické (organické látky schopné absorbovat radiaci změnou distribuce elektronů – například benzofenony, cinamáty, salicyláty). U některých stávajících sunscreens byly popsány nežádoucí účinky, spojené zejména s fotoalergickou nebo fotoiritující reakcí při používání těchto přípravků. Častým problémem těchto látek je také fotonestabilita.

Původci předkládaného vynálezu našli látky, které neočekávaně jeví kombinované antisenescenční účinky a UV–fotoprotektivní účinky (UVB i UVA). Tyto látky jsou velmi stabilní, a zároveň nejsou foto toxické a ani neiritují ošetřenou tkáň.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití adeninových derivátů obecného vzorce I



(I)

a jejich farmaceuticky přijatelných solí s alkalickými kovy, amoniakem, aminy, nebo adičních solí s kyselinami, kde

R2 je vodík nebo halogen;

R6 je vybrán ze skupiny zahrnující

– heteroaryl s 5– až 6–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heteroaryl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heteroarylalkyl s 5– až 6–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heterocyklyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heterocyklyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heterocyklylalkyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heterocyklylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– cykloalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– cykloalkylalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž cykloalkylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– isoalkyl obsahující 3 až 7 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl,

5

jako UV–fotoprotektivních složek v kosmetických přípravcích, v přípravcích pro ochranu rostlin a/nebo v přípravcích pro ošetření tkáňových kultur.

10

Heteroaryl s výhodou obsahuje 5–členný kruh, výhodněji obsahuje v 5–členném kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S. Nejvýhodněji je heteroaryl vybrán z furan–2–ylu a thiofen–2–ylu.

15

Heteroarylalkyl s výhodou obsahuje 5–členný kruh a C1–C2 alkyl, výhodněji obsahuje v 5–členném kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S. Nejvýhodněji je heteroarylalkyl vybrán z furan–2–ylmethylu (furfurylu) a thiofen–2–ylmethylu.

20

Heterocyklyl s výhodou obsahuje 5–členný kruh, výhodněji obsahuje v 5–členném kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S. Nejvýhodněji je heterocyklyl vybrán ze skupiny zahrnující tetrahydrofuran–2–yl a tetrahydrothiofen–2–yl.

25

Heterocyklylalkyl s výhodou obsahuje 5–členný kruh a C1–C2 alkyl, výhodněji obsahuje v 5–členném kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S. Nejvýhodněji je heterocyklylalkyl vybrán ze skupiny zahrnující tetrahydrofuran–2–ylmethyl (tetrahydrofurfuryl) a tetrahydrothiofen–2–ylmethyl.

Cykloalkylem je s výhodou cyklopentyl. Cykloalkylalkylem je s výhodou cyklopentylmethyl.

Isoalkylem je s výhodou isopropyl, isobutyl, isopentyl, isohexyl, isoheptyl.

30

Halogen je vybrán ze skupiny zahrnující fluor, chlor, brom, jod. S výhodou je halogenem chlor.

V jednom výhodném provedení jsou látky obecného vzorce I vybrány ze skupiny zahrnující:

35

6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–methylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–hydroxymethylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–formylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(1–furan–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

40

6–(cyklopentylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(3–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–chlorthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

45

6–(5–bromthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(1–thiofen–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–furfurylamino–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(5–methylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

50

2–chlor–6–(5–hydroxymethylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(5–formylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(1–furan–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

55

2–chlor–6–(thiofen–2–ylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2-chlor-6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-(3-methylthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-(5-methylthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-(5-chlorthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 5 2-chlor-6-(5-bromthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-(1-thiofen-2-ylethylamino)-9-(tetrahydro-2-chlor-6-(cyklopentylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin.

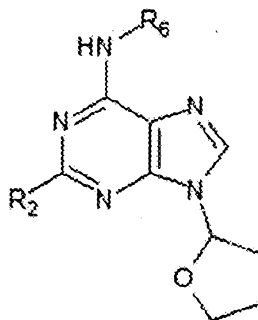
Výhodněji jsou látky obecného vzorce I vybrány ze skupiny zahrnující:

6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
 2-chlor-6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin.

Ve výhodném provedení se uvedené látky použijí jako složky s kombinovaným antisenescenčním a UV-fotoprotektivním účinkem.

Látky podle předkládaného vynálezu jeví kombinované antisenescenční a UV-fotoprotektivní účinek. UV-fotoprotektivní účinek byl pozorován pro záření UVA i UVB. Jsou tedy vhodné jako složky kosmetických přípravků, přípravků na ochranu rostlin a přípravků pro ošetření tkáňových kultur. Kosmetické přípravky s těmito složkami jsou zejména vhodné pro aplikaci na pokožku, srst či vlasy savců. Přípravky pro ošetření tkáňových kultur jsou vhodné zejména pro ošetření kultur buněk rostlin i savců, například keratinocytů a fibroblastů.

Předmětem vynálezu jsou dále adeninové deriváty obecného vzorce I *per se*



(I)

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem, aminy, nebo adiční soli s kyselinami, kde

R2 je vodík nebo halogen;

R6 je vybrán ze skupiny zahrnující

– heteroaryl s 5- až 6-členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heteroaryl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1-C4 alkyl, merkpto(C1-C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1-C4)alkylamino, amino(C1-C4)alkyl;

– heteroarylalkyl s 6-členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním

- substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- heteroarylalkyl s 5–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- heterocyklyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heterocyklyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- heterocyklylalkyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heterocyklylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- cykloalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- cykloalkylalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž cykloalkylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl.

Předmětem vynálezu jsou ve výhodném provedení adeninové deriváty obecného vzorce I *per se*, vybrané z:

- 6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(cyklopentylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(3–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(5–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(5–chlorthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(5–bromthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 6–(1–thiofen–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(thiofen–2–ylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(3–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(5–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(5–chlorthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(5–bromthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(1–thiofen–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
- 2–chlor–6–(cyklopentylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin.

Přípravky

- Vhodné podání pro kosmetickou aplikaci je lokální, topické. Přípravky zpravidla obsahují od 0,1 do 95 hmotn. % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 10 do 90 hmotn. % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně

od 1 do 10 hmotn. % aktivní látky. Formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Přípravky pro ochranu rostlin a pro ošetření tkáňových kultur jsou nejčastěji ve formě roztoku, spreje, disperze nebo suspenze. Přípravky jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

5

Roztoky aktivních látek, suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je například mannitol.

10

Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přídavkem antioxidantů, např. vitaminu E, β -karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako methanol, ethanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, "Labrafil M 2375" (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), "Labrafil M 1944 CS" (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), "Labrasol" (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), "Miglyol 812" (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a olej z podzemnice olejně.

15

20

25

30

35

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří uhlovodíky, např. vazelína, parafinový olej nebo tvrdé parafíny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spaný), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylen glykol, sorbitol a polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

40

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelínu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricinový olej nebo z podzemnice olejně, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- a distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

45

50

55

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou mastné alkoholy, např. isopropyl myristát, lanolin, včelí vosk, nebo uhlovodíky, s výhodou vazelína (petrolátum) a parafinový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery či kyselé estery polyglycerických mastných kyselin (Tween), dále polyoxyethylenové étery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např.

polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

- 5 Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

- 10 Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako chlor–fluor deriváty nižších alkanů, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

- 15 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně–ethanolickou bázi, ke které jsou přimíchány zvlhčovačla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolu, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže ethanolem, a pokud je to nutné i ostatní neutrální látky a aditiva.

- 20 Vynález je dále objasněn s pomocí příkladů, které ale jeho rozsah dále neomezuji.

Příklady uskutečnění vynálezu

- 25 Příklad 1: Příprava 6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purinu (1)

- 6–Chlor–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin (1 g; 4,46 mmol) byl umístěn do varné baňky spolu s n–propanolem (50 ml). Ke vzniklé suspenzi byl přidán tetrahydrofurfurylamin (554 µl; 5,36 mmol) spolu s triethylaminem (Et₃N) (3,2 ml; 22,3 mmol). Reakční směs byla pod zpětným chladičem zahřívána na teplotu 100 °C. Doba reakce byla 4 h. Po zahuštění byla reakční směs extrahována pomocí kontinuálního extraktoru (EtOAc:H₂O; 24 h). Ethylacetátová (EtOAc) frakce byla následně vysušena pomocí Na₂SO₄. Takto předčištěná reakční směs byla rozdělena pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází (EtOAc:MeOH:NH₃; 34:1:1; v:v). Výtěžek: 74,6 %. ¹H NMR (500 MHz, DMSO–d₆), ppm: 1,53 – 1,64 (m, 1 H); 1,69 – 1,89 (m, 3 H); 1,95 – 2,02 (m, 1 H); 2,11 – 2,23 (m, 1 H); 2,30 – 2,44 (m, 2 H); 3,37 – 3,48 (m, 1 H); 3,48 – 3,53 (m, 1 H); 3,53 – 3,60 (m, 1 H); 3,70 – 3,76 (m, 1 H); 3,81 – 3,90 (m, 1 H); 3,98 (q, J = 7,03 Hz, 1 H); 4,09 (q, J = 7,44 Hz, 1 H); 6,21 (dd, J = 6,88, 3,82 Hz, 1 H); 7,63 (br. s., 1 H); 8,17 (br. s., 1 H); 8,21 (s, 1 H).

Tabulka 1: Látky připravené způsobem podle příkladu 1

Č.	R ₆	R ₂	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES MS [M+H] ⁺
			%C	%H	%N	
1	tetrahydrofuran-2-ylmethyl	H	58,1/58,0	6,6/6,6	24,2/24,3	290,3
2	5-methylfuran-2-ylmethyl	H	60,2/60,1	5,7/5,7	23,4/23,5	300,3
3	5-hydroxymethylfuran-2-ylmethyl	H	57,1/57,2	5,4/5,4	22,2/22,5	316,3
4	5-formylfuran-2-ylmethyl	H	57,5/57,6	4,8/4,8	22,4/22,2	314,3
5	1-furan-2-ylethyl	H	60,2/60,1	5,7/5,8	23,4/23,5	300,3
6	5-methyltetrahydrofuran-2-ylmethyl	H	59,4/59,3	7,0/7,0	23,1/23,2	304,4

Č.	R ₆	R ₂	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES MS [M+H] ⁺
			%C	%H	%N	
7	1-tetrahydrofuran-2-ylethyl	H	59,4/59,2	7,0/7,1	23,1/23,2	304,4
8	cyklopentylmethyl	H	62,7/62,9	7,4/7,5	24,4/24,5	288,4

Příklad 2: Příprava 6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purinu (9)

- 5 6–Chlor–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin (0,5 g; 2,23 mmol) byl umístěn do varné baňky spolu s n–propanolem (25 ml). Ke vzniklé směsi byl přidán 2–thiofenmethylamin (275 µl; 2,68 mmol) spolu s Et₃N (1,6 ml; 11,15 mmol). Vzniklá směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 100 °C. Po 3 hodinách bylo přidáno (23 µl; 0,23 mmol) 2–thiofenmethylaminu. Reakce byla následně za 1,5 h ukončena. Reakční směs byla poté odpařena a přečištěna extrakcí kapalina–kapalina (EtOAc:H₂O). EtOAc frakce byla vysušena pomocí Na₂SO₄ a odpařena. Odparek byl přes noc krystalizován z diethyletheru při 4 °C.
- 10 Výtěžek: 61 %. ¹H NMR (500 MHz, DMSO–d₆) δ ppm 1,92 – 2,00 (m, 1 H); 2,12 – 2,22 (m, 1 H); 2,31 – 2,38 (m, 1 H); 2,38 – 2,43 (m, 1 H); 3,85 (td, *J* = 7,68, 6,34 Hz, 1 H); 4,08 (td, *J* = 7,68, 6,50 Hz, 1 H); 4,79 (br. s., 2 H); 6,21 (dd, *J* = 6,88, 3,82 Hz, 1 H); 6,88 (dd, *J* = 5,04, 3,44 Hz, 1 H); 6,97 (dd, *J* = 3,40, 1,03 Hz, 1 H); 7,27 (dd, *J* = 5,12, 1,22 Hz, 1 H); 8,23 (s, 2 H); 8,36 (br. s., 1 H).

Tabulka 2: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

Č.	R ₆	R ₂	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES MS [M+H] ⁺
			%C	%H	%N	
9	thiofen-2-ylmethyl	H	55,8/55,6	5,0/5,4	23,2/23,3	302,4
10	3-methylthiofen-2-ylmethyl	H	57,1/57,2	5,4/5,5	22,2/22,3	316,4
11	5-methylthiofen-2-ylmethyl	H	57,1/57,0	5,4/5,3	22,2/22,1	316,4
12	5-chlorothiofen-2-ylmethyl	H	50,0/50,1	4,2/4,3	20,9/20,8	336,8
13	5-bromothiofen-2-ylmethyl	H	44,2/44,1	3,7/3,8	18,4/18,5	381,3
14	1-thiofen-2-ylethyl	H	57,1/57,0	5,4/5,5	22,2/22,0	316,4

Příklad 3: Příprava 2–chloro–6–furfurylamino–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purinu (15)

- 25 2,6–Dichlor–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin (0,5 g; 1,93 mmol) byl umístěn do varné baňky spolu s n–propanolem (25 ml). Ke vzniklé suspenzi byl přidán furfurylamin (204 µl; 2,31 mmol) spolu s Et₃N (1,35 ml; 9,65 mmol). Reakční směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na teplotu 100 °C. Po 5 h byla reakce ukončena. Jestliže látka nevykrystalizovala z reakční směsi, byla reakční směs po zahuštění za horka rozpuštěna ve směsi (CHCl₃:EtOH; 1:8; v:v), nebo za pokojové teploty v směsi (CHCl₃:Ether; 1:7; v:v). Po ochlazení byla vzniklá suspenze přefiltrována přes fritu a filtrační koláč byl promyt destilovanou vodou. Po vysušení byl
- 30

filtrát za horka rozpuštěn v ethanolu (EtOH), petroletheru, karbofiltrován a krystalizován při 4 °C.

Tabulka 3: Látky připravené způsobem podle Příkladu 3

5

Č.	R ₆	R ₂	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES MS [M+H] ⁺
			%C	%H	%N	
15	furfuryl	Cl	52,6/52,5	4,4/4,3	21,9/21,7	320,7
16	5-methylfuran-2-ylmethyl	Cl	54,0/54,1	4,8/4,7	21,0/20,9	334,8
17	5-hydroxymethylfuran-2-ylmethyl	Cl	51,5/51,6	4,6/4,7	20,0/20,1	350,8
18	5-formylfuran-2-ylmethyl	Cl	51,8/51,9	4,1/4,2	20,1/20,3	348,8
19	1-furan-2-ylethyl	Cl	54,0/54,1	4,8/4,9	21,0/21,3	334,8
20	tetrahydrofuran-2-ylmethyl	Cl	51,9/51,8	5,6/5,7	21,6/21,5	233,8
21	5-methyltetrahydrofuran-2-ylmethyl	Cl	53,3/53,4	6,0/6,0	20,7/20,5	338,8
22	1-tetrahydrofuran-2-ylethyl	Cl	53,3/53,4	6,0/6,1	20,7/20,6	338,8
23	thiofen-2-ylmethyl	Cl	50,1/50,1	4,2/4,3	20,9/20,8	336,8
24	3-methylthiofen-2-ylmethyl	Cl	51,5/51,6	4,6/4,7	20,0/20,2	350,8
25	5-methylthiofen-2-ylmethyl	Cl	51,5/51,6	4,6/4,7	20,0/20,1	350,8
26	5-chlorthiofen-2-ylmethyl	Cl	45,4/45,6	3,5/3,7	18,9/18,8	371,3
27	5-bromthiofen-2-ylmethyl	Cl	40,6/40,5	3,2/3,1	16,9/16,8	415,7
28	1-thiofen-2-ylethyl	Cl	51,5/51,6	4,6/4,7	20,0/20,1	350,8
29	cyklopentylmethyl	Cl	56,0/56,1	6,3/6,4	21,8/21,9	322,8

Příklad 4: Cytotoxicita nových derivátů pro kožní buňky stanovená MTT in vitro testem

10

MTT test je standardní test toxicity založený na fotometrickém měření schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na formazan. V testu byl sledován vliv 72 hodinového působení několika koncentrací látek (šestinásobná ředící řada, maximální koncentrace = 50 µM) na viabilitu kožních fibroblastů BJ a keratinocytů HaCaT. 5000 buněk bylo vyseto do jednotlivých jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky 24 hodin před přidáním testovaných látek. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO vehikulum. Po 72 hodinovém působení bylo přidáno nové médium s MTT (Sigma, M2128) do konečné koncentrace 0,5 mg/ml. Po třech hodinách bylo médium odstraněno a formazan

15

obsažený v buňkách rozpuštěn v DMSO. Absorbance byla změřena při 570 nm (640 nm referenční vlnová délka). Hodnoty IC_{50} byly vypočteny z dávkových křivek. 6-Furfurylaminopurin ribosid byl použit jako pozitivní kontrola. Byly obdrženy následující výsledky:

5

Tabulka 4: Cytotoxicita stanovená MTT in vitro testem

Látka	IC_{50} (μM)
dimethylsulfoxid	>100
6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	>100
6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)aminopurin	>100
2-chlor - 6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	>100
6-furfurylamino-9-ribosylpurin (srovnávací látka)	≤ 3

- 10 Příklad 5: Zpomalení stárnutí listů pšenice a zpomalení degradace chlorofylu při testování nových derivátů v senescenčním biotestu

Nádoby se semeny ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv Hereward vyseté do vermikulitu nasyceného Knopovým živným roztokem byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita $50 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a teplotou 15°C . Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první praporcový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů vždy od 10 rostlin byly odebrány vrcholové sekce dlouhé přibližně 35 mm, které byly zkráceny tak, aby jejich váha byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto 10 listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrénových destiček obsahujících 150 ml roztoku testovaného derivátu. Destičky byly umístěny do plastického boxu vystlaného filtračním papírem, který byl nasycen vodou za účelem maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při 25°C byly listové sekce vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 ml 80% ethanolu zahřátím při 80°C po dobu 10 min. Objem vzorku byl poté doplněn na 5 ml přidáním 80% ethanolu. Absorbance extraktů byla měřena při 665 nm. Jako kontroly byly měřeny rovněž chlorofylové extrakty z listů a listových vrcholů inkubované v deionizované vodě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z 10 opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 3krát. Výsledky těchto experimentů byly vyneseny ve formě grafů závislosti obsahu chlorofylu v senescenčních listech na koncentraci aplikované látky. V každém experimentu byla použita jako pozitivní kontrolní látka 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na výslednou koncentraci 10^{-3} M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10^{-8} až 10^{-4} M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2 % a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. Ze získaných dat byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 5). 10^{-4} M koncentrace BAP byla postulována jako 100 % biologické aktivity. Jako další srovnávací látka byl použit kinetin. Nově připravené látky převyšují zpravidla účinnost BAP standardu v rozmezí o 10 %. Nově vyvinuté látky mají tedy výraznější antisenescenční účinky než známé látky.

- 40 Tabulka 5: Účinek nových cytokinů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Hodnoty v tabulce jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací.

Látka	maximální účinná koncentrace (mol.l ⁻¹)	účinnost (%) [10 ⁻⁴ mol.l ⁻¹ BAP = 100%]
BAP (srovnávací látka)	10 ⁻³	100±1
kinetin (srovnávací látka)	10 ⁻³	98±4
6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	10 ⁻⁴	114±3
6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	10 ⁻⁴	122±2
6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	10 ⁻⁴	125±9
6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	10 ⁻⁴	112±5
2-chlor - 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	10 ⁻⁴	127±5

Příklad 6: *In vitro* cytotoxická aktivita nových derivátů na nádorových buněčných liniích

- 5 Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analyzuje metabolická aktivita životaschopných buněk. Například mikrotitrační analýza, kde se používá Calcein AM, je dnes rozšířena jako metoda kvantifikace buněčné proliferace a cytotoxicity. Množství zredukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životaschopných buněk v kultuře.
- 10 Buněčné linie prsního karcinomu MCF-7, lidské erythroleukemie K562, lidské diploidní fibroblasty BJ a lidské keratinocyty HaCaT byly použity pro screening cytotoxicity sloučenin. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80 cm² plastových lahvích a pěstovány v médiu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný). Buněčné
- 15 suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk (10⁴ buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu), bylo pipetováno 80 µl buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře CO₂. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20 µl alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle byly sloučeniny
- 20 testovány v šesti koncentracích v čtyřnásobné ředící řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166,7 µM, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v dubletu. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100% vlhkosti a v atmosféře obohacené CO₂. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1
- 25 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluorskan Ascent (Microsystems). Přežití buněk (The cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu: $GI_{50} = (FD_{\text{jamka s derivátem}} / FD_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota GI₅₀, která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek.
- 30 Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 6, GI₅₀ koncentrace uváděny v µM). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie i pro nemaligní buněčné linie BJ a HaCaT bylo působení nových sloučenin netoxické. Účinné deriváty zabíjí nádorové buňky při koncentracích blízkých 0,1 až 50 µM.

35

Tabulka 6: Cytotoxicita látek podle vynálezu pro různé buněčné linie

Látka	MCF-7	K562	BJ	HaCaT
6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	>100	>100	>100	>100
6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	>100	>100	>100	>100
6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	>100	>100	>100	>100
2-chlor - 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin	>100	>100	>100	>100

5 Příklad 7: *In vitro* test fototoxických účinků na lidské kožní fibroblasty

Možné fototoxické účinky látek byly stanoveny podle modifikovaného *in vitro* testu validovaného pro stanovení fototoxicity látek (Spielmann a kol., 1998). Jako *in vitro* model byly použity normální lidské kožní fibroblasty (NHDF). Buňky byly izolovány z fragmentů kůže od
 10 zdravých dárců, kteří podstoupili chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc. Odběr tkáně a izolace buněk proběhla podle postupu a podmínek schválených Etickou komisí FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc a po podepsání informovaného souhlasu s odběrem tkáně jednotlivými dárci. Pro experimenty byly NHDF použity mezi 2. a 4.
 15 pasáží. NHDF byly vysety na 96-jamkové desky v koncentraci $0,8 \cdot 10^5$ buněk/ml kultivačního média (DMEM doplněné o fetální telecí sérum (10%), penicilin (100 mg/ml) a streptomycin (100 U/ml)) v množství 0,2 ml na jamku.

Testovanou látkou byl 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin 1. Látka byla rozpuštěna v DMSO a poté ředěna do média bez séra (DMEM s penicilinem
 20 (100 mg/ml) a streptomycinem (100 U/ml)). Výsledné aplikované koncentrace byly 3,9 až 500 $\mu\text{mol/l}$. Jako kontrola bylo použito médium bez séra s DMSO (0,5 % (v/v)), což odpovídá jeho výsledné koncentraci při experimentu s testovanými látkami. Pro srovnání s tetovanými látkami byl použit chlorpromazin (CPZ; 0,8 až 50 $\mu\text{mol/l}$) jako pozitivní fototoxická látka. Po 24
 25 hodinách od vysetí NHDF bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky nebo DMSO (rozpuštědlová kontrola). Roztoky testovaných látek byly paralelně aplikovány na dvě 96-jamkové desky s NHDF. Po 1 hodinové preinkubaci s látkami bylo médium odstraněno, buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a poté bylo aplikováno PBS s glukózou (1 mg/ml). Následně byla jedna deska ozářena netoxickou dávkou (5 J/cm²) UVA
 30 záření. Druhá deska byla po dobu ozařování inkubována v temnu. K ozaření byl použit solární simulátor SOL 500 vybavený H1 filtrem (Dr. Höenle Technology, Německo), který propouští záření v rozsahu vlnových délek 320 až 400 nm. Intenzita UVA záření byla při každém ozařování stanovena pomocí UVA-metru (Dr. Höenle Technology, Německo). Po UVA expozici bylo PBS s glukózou odstraněno a k buňkám bylo aplikováno médium bez séra. Po 24 hodinové inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) byla sledována životnost buněk (respektive buněčné poškození) stanovením
 35 inkorporace neutrální červeně (NČ) do buněk. Po odstranění média bez séra byl k buňkám aplikován roztok NČ (0,03 %; PBS). Po 1 hodinové inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) byl roztok s NČ odstraněn, buňky byly fixovány směsí formaldehydu (0,5 %, v/v) a CaCl₂ (1 %, m/v) v poměru 1:1 a barvivo bylo rozpuštěno extrakčním roztokem (methanol (50 %, v/v), CH₃COOH (1 %, v/v). Po 5 minutovém intenzivním třepání byla změřena absorbance při 540 nm. Experimenty
 40 byly provedeny ve 4 nezávislých opakováních s použitím buněk od 4 dárců kvůli minimalizaci individuálních rozdílů v citlivosti buněk. Fototoxický účinek látek byl hodnocen určením procent životnosti kontrolních buněk (% životnosti kontroly) z hodnot příslušných absorbancí podle následujícího vztahu:

$$\text{Životnost (\% kontroly)} = \left(\frac{(A_k - A_p)}{(A_k - A_p)} \right) \cdot 100$$

45

A_V ... absorbance vzorku (buňky pre-inkubované s testovanými látkami v médiu bez séra a následně ozářené)

A_K ... absorbance kontroly (buňky inkubované s DMSO v médiu bez séra a ozářené)

A_P ... absorbance pozadí (extrakční roztok)

5

Výsledek: Testovaná látka nejevila v použitém koncentračním rozmezí, tj. 3,9 až 500 $\mu\text{mol/l}$, fototoxické účinky (nedošlo ke snížení životnosti buněk ~ schopnosti inkorporovat NČ ve srovnání s kontrolními buňkami). Výsledky jsou znázorněny v tabulce (Tab. 7). Současně byl jako pozitivní kontrola použit CPZ, který je doporučován validovaným postupem (Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJ, Pechovitch G, de Silva O, Holzhütter HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast JM, Csato M, Sladowski D, Steiling W, Brantom P., Toxicol In Vitro. 1998 Jun 1;12(3):305–27) jako známá fototoxická sloučenina, viz Tab. 8. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaná látka je bezpečná při použití do kosmetických a dermatologických přípravků, i ve spojení s následnou expozicí jí ošetřené pokožky slunečnímu záření.

15

Tabulka 7: Účinky látky I na životnost NHDF stimulovaných UVA zářením (+UVA) ve srovnání s kontrolou inkubovanou v temnu (–UVA).

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	I	
	% kontroly	
	- UVA	+UVA
3,9	96,6 $\pm$ (7,4)	105,1 $\pm$ (10,3)
7,8	106,5 $\pm$ (9,2)	110,6 $\pm$ (10,7)
15,6	99,6 $\pm$ (3,7)	106,8 $\pm$ (13,4)
31,3	102,4 $\pm$ (2,1)	109,5 $\pm$ (10)
62,5	102,3 $\pm$ (5,8)	103,3 $\pm$ (8,9)
125	109,5 $\pm$ (10,5)	107,5 $\pm$ (8,9)
250	109,1 $\pm$ (6,7)	106,7 $\pm$ (7,8)
500	105,3 $\pm$ (11,1)	98,9 $\pm$ (4,2)

20

Tabulka 8: Pro srovnání: účinky fototoxického chlorpromazinu na životnost NHDF stimulovaných UVA zářením (+UVA) ve srovnání s kontrolou inkubovanou v temnu (–UVA).

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	CPZ	
	% kontroly	
	- UVA	+UVA
0,8	102,6 $\pm$ (5,8)	99,2 $\pm$ (7,1)
1,6	101,5 $\pm$ (1)	104,6 $\pm$ (7,7)
3,1	105,6 $\pm$ (6)	87,3 $\pm$ (8,6)
6,3	107,4 $\pm$ (4,6)	82,8 $\pm$ (15,4)
12,5	104 $\pm$ (3,8)	49,6 $\pm$ (17,6)
25	77 $\pm$ (7,8)	19,8 $\pm$ (14,2)
50	4,7 $\pm$ (4,2)	9,8 $\pm$ (7,8)

25

Příklad 8. *In vitro* test fotoprotektivních účinků na normální lidské kožní fibroblasty

Jako *in vitro* model byly použity normální lidské kožní fibroblasty (NHDF). Buňky byly izolovány z fragmentů kůže od zdravých dárců, kteří podstoupili chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc. Odběr tkáně a izolace buněk proběhla podle postupu a podmínek schválených Etickou komisí FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc a po podepsání informovaného souhlasu s odběrem tkáně jednotlivými dárci. Pro experimenty byly NHDF použity mezi 2. a 4. pasáží. NHDF byly vysety na 96-jamkové desky v koncentraci $0,8 \cdot 10^5$ buněk/ml kultivačního média (DMEM doplněné o fetální telecí sérum (10%), penicilin (100 mg/ml) a streptomycin (100 U/ml)) v množství 0,2 ml na jamku.

Testovanou látkou byl 6-tetrahydrofurfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin 1. Látka byla rozpuštěna v DMSO a poté ředěna do média bez séra (DMEM s penicilinem (100 mg/ml) a streptomycinem (100 U/ml)). Jako kontrola bylo použito médium bez séra s DMSO (0,5 % (v/v)), což odpovídá jeho výsledné koncentraci při experimentu s testovanými látkami. Po 24 hodinách od vysetí NHDF bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky nebo DMSO (rozpuštědlová kontrola). Testovaná látka byla paralelně aplikována na dvě 96-jamkové desky s NHDF. Po 60 min inkubaci bylo médium s látkami odstraněno, buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a bylo aplikováno PBS s glukózou (1 mg/ml). V případě sledování ochrany vůči UVA záření byla následně jedna deska ozářena cytotoxickou dávkou UVA záření ($7,5 \text{ J/cm}^2$) s využitím solárního simulátoru SOL 500 (Dr. Höenle Technology, Německo) vybaveným H1 filtrem, který propouští záření v rozsahu vlnových délek 320 až 400 nm. Při sledování ochrany vůči UVB záření byly buňky ozářeny cytotoxickou dávkou UVB záření (400 mJ/cm^2). K ozáření byl použit solární simulátor SOL 500 vybavený H2 filtrem, který propouští záření v rozsahu vlnových délek 295 až 320 nm. Intenzita UVA nebo UVB záření byla při každém ozařování stanovena pomocí UVA- nebo UVB-metru (Dr. Höenle Technology, Německo). Kontrolní buňky byly v obou případech po dobu ozařování inkubovány v temnu. Po UVA/UVB expozici bylo PBS s glukózou odstraněno a k buňkám bylo aplikováno médium bez séra. Po 24 hodinové inkubaci (37°C , 5 % CO_2) bylo sledováno buněčné poškození stanovením inkorporace neutrální červeně (NČ) do buněk. Po odstranění média bez séra byl k buňkám aplikován roztok NČ (0,03 %; PBS). Po 1 hodinové inkubaci (37°C , 5 % CO_2) byl roztok s NČ odsán, buňky byly fixovány směsí formaldehydu (0,5 %, v/v) a CaCl_2 (1 %, m/v) v poměru 1:1 a barvivo bylo rozpuštěno extrakčním roztokem (methanol (50 %, v/v), CH_3COOH (1 %, v/v)). Po 5 min intenzivního třepání byla změřena absorbance při 540 nm. Experimenty byly provedeny ve 4 nezávislých opakováních s použitím buněk od 4 dárců kvůli minimalizaci individuálních rozdílů v citlivosti buněk.

Ochranný účinek látky na poškození vyvolané UVA nebo UVB zářením byl vypočítán z experimentálních dat (absorbancí) testovaných látek s pozitivní a negativní kontrolou podle následujícího vztahu:

$$\% \text{ ochrany} = 100 - \left| \frac{Avz - Ank}{Apk - Ank} \right| \cdot 100$$

Avz ... absorbance vzorku (buňky pre-inkubované s testovanými látkami v médiu bez séra a následně ozářené)

Ank ... absorbance negativní kontroly (buňky inkubované s DMSO v médiu bez séra a neozářené = inkubované v temnu)

Apk ... absorbance pozitivní kontroly (buňky inkubované s DMSO v médiu bez séra a ozářené)

Výsledek: U buněk inkubovaných s testovanou látkou před UVA nebo UVB ozářením byla nalezena vyšší životnost buněk (schopnost inkorporace NČ) ve srovnání s buňkami inkubovanými s DMSO (kontrola) a ozářenými UVA nebo UVB ozářením (Tab. 9 a 10). Látka tedy vykazuje současně UVA i UVB fotoprotektivní efekt.

Tabulka 9: Stanovení ochranných účinků látky **1** vůči poškození UVA zářením. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SD ze 4 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.

5

UVA fotoprotekce	
Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	1
	% ochrany
3,9	27,7 $\pm$ (6,9)
7,8	57,4 $\pm$ (14,4)
15,6	43,2 $\pm$ (10,8)
31,3	47,5 $\pm$ (11,9)
62,5	41,3 $\pm$ (10,3)
125	49 $\pm$ (12,3)
250	45,3 $\pm$ (11,3)
500	18,5 $\pm$ (4,6)

Tabulka 10: Stanovení ochranných účinků látky **1** vůči poškození UVB zářením. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SD ze 4 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.

10

UVB fotoprotekce	
Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	1
	% ochrany
3,9	4,9 $\pm$ (1,2)
7,8	44,1 $\pm$ (11)
15,6	35 $\pm$ (8,7)
31,3	38,3 $\pm$ (9,6)
62,5	44,4 $\pm$ (11,1)
125	42,7 $\pm$ (10,7)
250	46,6 $\pm$ (11,6)
500	26,3 $\pm$ (6,6)

Příklad 9. *In vitro* test fototoxicity na normální lidské kožní keratinocyty

15

Jako *in vitro* model byly použity normální lidské kožní keratinocyty (NHEK). Buňky byly izolovány z fragmentů kůže od zdravých dárců, kteří podstoupili chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc. Odběr tkáně a izolace buněk proběhla podle postupu a podmínek schválených Etickou komisí FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc. Všichni dárči podepsali informovaný souhlas s odběrem tkáně. Pro experiment byly buňky použity ve 3. až 4. pasáži. NHEK byly vysety na 96-jamkové desky v koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/jamku v růstové médium pro keratinocyty (EpiLife®) doplněné o komerční sadu růstových faktorů (Human Keratinocyte Growth Supplement Kit) a antibiotika (penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 mg/l) a ampicilin (250 $\mu\text{g/ml}$).

25

Testovanou látkou byl 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin **1**. Látka **1** byla rozpuštěna v DMSO a poté naředěna do média bez séra (EpiLife® s penicilinem (100 mg/ml) a streptomycinem (100 U/ml) a ampicilinem (250 $\mu\text{g/ml}$)) na koncentrační rozmezí (3,9 až 500 $\mu\text{mol/l}$) tak, aby výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,5 % (v/v). Kontrolní médium obsahovalo příslušný objem DMSO v médiu bez séra. Po 24 hodinové inkubaci NHEK

30

bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky a DMSO (negativní kontrola). Jako pozitivní kontrola byla použita známá fototoxická sloučenina chlorpromazin (CPZ; 0,8 až 50 $\mu\text{mol/l}$). Roztoky testovaných látek byly paralelně aplikovány na dvě 96-jamkové desky s buňkami. Po 1 hodinové preinkubaci bylo médium odstraněno, buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a poté bylo aplikováno PBS s glukózou (1 mg/ml). Následně byla jedna deska ozářena netoxickou dávkou (5 J/cm^2) UVA záření. Druhá deska byla po dobu ozařování inkubována v temnu. K ozáření byl použit solární simulátor SOL 500 vybavený H1 filtrem (Dr. Höenle Technology, Německo), který propouští záření v rozsahu vlnových délek 320 až 400 nm. Intenzita UVA záření byla při každém ozařování stanovena pomocí UVA-metru (Dr. Höenle Technology, Německo). Po UVA expozici bylo PBS s glukózou odstraněno a k buňkám bylo aplikováno bezsérové médium. Po 24 hodinové inkubaci (37 °C, 5 % CO_2) bylo sledováno buněčné poškození stanovením inkorporace NČ do buněk. Po odstranění média bez séra byl k buňkám aplikován roztok NČ (0,03 %; PBS). Po 1 h inkubaci (37 °C, 5 % CO_2) byl roztok s NČ odstraněn, buňky byly fixovány směsí formaldehydu (0,5 %, v/v) a CaCl_2 (1 %, m/v) v poměru 1:1a barvivo bylo rozpuštěno extrakčním roztokem (methanol (50 %, v/v), CH_3COOH (1 %, v/v). Po 5 minutách intenzivního třepání byla změřena absorbance při 540 nm. Experimenty byly provedeny ve 4 nezávislých opakováních s použitím buněk od 4 dárců kvůli minimalizaci individuálních rozdílů v citlivosti buněk. Fototoxický účinek látek byl hodnocen určením procent životnosti kontrolních buněk (% životnosti kontroly) z hodnot příslušných absorbancí podle následujícího vztahu:

$$\text{Životnost (\% kontroly)} = \left(\frac{(A_F - A_P)}{(A_K - A_P)} \right) \cdot 100$$

A_V ... absorbance vzorku (buňky pre-inkubované s testovanými látkami v médiu bez séra a následně ozářené)

A_K ... absorbance kontroly (buňky inkubované s DMSO v médiu bez séra a ozářené)

A_P ... absorbance pozadí (extrakční roztok) naměřených hodnot absorbance byla pro každou koncentraci látky vypočtena viabilita buněk jako % kontroly.

Výsledek: Látka 1 nejevila v použitém koncentračním rozmezí 3,9 až 500 $\mu\text{mol/l}$ fototoxické účinky, (nedošlo ke snížení životnosti buněk ~ schopnosti inkorporovat NČ ve srovnání s kontrolními buňkami), viz Tab. 11. Současně s látkou 1 byl jako pozitivní kontrola použit CPZ, který je doporučován validovaným postupem (Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJ, Pechovitch G, de Silva O, Holzhütter HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast JM, Csato M, Sladowski D, Steiling W, Brantom P., Toxicol In Vitro. 1998 Jun 1;12(3):305–27) jako známá fototoxická sloučenina, viz Tab. 12. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaná látka je bezpečná při použití do kosmetických a dermatologických přípravků, i ve spojení s následnou expozicí jí ošetřené pokožky slunečnímu záření.

Tabulka 11: Účinky látky 1 na životnost NHEK stimulovaných UVA zářením (+UVA) ve srovnání s kontrolou inkubovanou po dobu ozařování v temnu (–UVA).

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	1 % kontroly	
	- UVA	+UVA
3,9	112,2 $\pm$ (11)	109,1 $\pm$ (2,3)
7,8	135,5 $\pm$ (8,2)	120,6 $\pm$ (1,6)
15,6	116,5 $\pm$ (2,8)	110 $\pm$ (2,9)
31,3	119,1 $\pm$ (8,7)	115,1 $\pm$ (2,8)
62,5	121 $\pm$ (8,7)	105,9 $\pm$ (8,7)
125	119 $\pm$ (2,8)	111,7 $\pm$ (6,8)
250	110,8 $\pm$ (12,4)	112,1 $\pm$ (3,7)
500	105,7 $\pm$ (7,1)	101,2 $\pm$ (3,3)

Tabulka 12: Pro srovnání: účinky fototoxického chlorpromazinu na životnost NHEK stimulovaných UVA zářením (+UVA) ve srovnání s kontrolou inkubovanou po dobu ozařování v temnu (–UVA).

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	CPZ % kontroly	
	- UVA	+UVA
0,8	103,8 $\pm$ (4,4)	121,7 $\pm$ (13)
1,6	102 $\pm$ (4,6)	77,6 $\pm$ (0,9)
3,1	97,6 $\pm$ (13,1)	70,4 $\pm$ (5,5)
6,3	99,9 $\pm$ (7)	47,1 $\pm$ (5,2)
12,5	45,4 $\pm$ (24,6)	34,7 $\pm$ (15,4)
25	29,1 $\pm$ (14,5)	26,3 $\pm$ (19)
50	17,3 $\pm$ (2,2)	21,7 $\pm$ (19)

Příklad 10. *In vitro* test fotoprotektivních účinků na normální lidské kožní keratinocyty (NHEK)

- 10 Jako *in vitro* model byly použity normální lidské kožní keratinocyty (NHEK). Buňky byly izolovány z fragmentů kůže od zdravých dárců, kteří podstoupili chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc. Odběr tkáně a izolace buněk proběhla podle postupu a podmínek schválených Etickou komisí FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc. Všichni dárce podepsali informovaný souhlas s odběrem tkáně. Pro experiment byly buňky použity ve 3. až 4. pasáži. NHEK byly vysety na 96-jamkové desky v koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/jamku v růstové médium pro keratinocyty (EpiLife®) doplněné o komerční sadu růstových faktorů (Human Keratinocyte Growth Supplement Kit) a antibiotika (penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 mg/l) a ampicilin (250 $\mu\text{g/ml}$)).
- 20 Testovanou látkou byl 6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin **1**. Látka **1** byla rozpuštěna v DMSO a poté naředěna do média bez séra (EpiLife® s penicilinem (100 mg/ml) a streptomycinem (100 U/ml) a ampicilinem (250 $\mu\text{g/ml}$)) na koncentrační rozmezí (3,9 až 500 $\mu\text{mol/l}$) tak, aby výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,5 % (v/v). Po 24 hodinové inkubaci NHEK bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky a DMSO (negativní kontrola). Kontrolní médium obsahovalo příslušný objem
- 25

DMSO v médiu bez séra. Jako kontrola bylo použito médium bez séra s DMSO (0,5 % (v/v)), což odpovídá jeho výsledné koncentraci při experimentu s testovanými látkami. Testovaná látka byla paralelně aplikována na dvě 96-jamkové desky s NHEK. Po 60 minutové inkubaci bylo médium s látkami odstraněno, buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a bylo aplikováno PBS s glukózou (1 mg/ml). V případě sledování ochrany vůči UVA záření byla následně jedna deska ozářena cytotoxickou dávkou UVA záření (7,5 J/cm²) s využitím solárního simulátoru SOL 500 (Dr. Hoenle Technology, Německo) vybaveným H1 filtrem, který propouští záření v rozsahu vlnových délek 320 až 400 nm. Při sledování ochrany vůči UVB záření byly buňky ozářeny cytotoxickou dávkou UVB záření (400 mJ/cm²). K ozáření byl použit solární simulátor SOL 500 vybavený H2 filtrem, který propouští záření v rozsahu vlnových délek 295 až 320 nm. Intenzita UVA nebo UVB záření byla při každém ozařování stanovena pomocí UVA- nebo UVB-metru (Dr. Hoenle Technology, Německo). Kontrolní buňky byly v obou případech po dobu ozařování inkubovány v temnu. Po UVA/UVB expozici bylo PBS s glukózou odstraněno a k buňkám bylo aplikováno médium bez séra. Po 24 hodinové inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) bylo sledováno buněčné poškození stanovením inkorporace neutrální červeně (NČ) do buněk. Po odstranění média bez séra byl k buňkám aplikován roztok NČ (0,03 %; PBS). Po 1 hodinové inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) byl roztok s NČ odsán, buňky byly fixovány směsí formaldehydu (0,5 %, v/v) a CaCl₂ (1 %, m/v) v poměru 1:1 a barvivo bylo rozpuštěno extrakčním roztokem methanol (50 %, v/v), CH₃COOH (1 %, v/v). Po 5 minutách intenzivního třepání byla změřena absorbance při 540 nm. Experimenty byly provedeny ve 4 nezávislých opakováních s použitím buněk od 4 dárců kvůli minimalizaci individuálních rozdílů v citlivosti buněk.

Ochranný účinek látek na poškození vyvolané UVA nebo UVB zářením byl vypočítán z experimentálních dat (absorbancí) testovaných látek s pozitivní a negativní kontrolou podle následujícího vztahu:

$$\% \text{ ochrany} = 100 - \left| \frac{Avz - Ank}{Apk - Ank} \right| \cdot 100$$

Avz ... absorbance vzorku (buňky pre-inkubované s testovanými látkami v médiu bez séra a následně ozářené)

Ank ... absorbance negativní kontroly (buňky inkubované s DMSO v médiu bez séra a neozářené = inkubované v temnu)

Apk ... absorbance pozitivní kontroly (buňky inkubované s DMSO v médiu bez séra a ozářené)

Výsledek: U buněk inkubovaných s látkou **1** před UVA nebo UVB ozářením byla nalezena vyšší životnost buněk (schopnost inkorporace NČ) ve srovnání s buňkami inkubovanými s DMSO (kontrola) a ozářenými UVA nebo UVB ozářením (Tab 13 a 14). Látka **1** tedy vykazuje současně UVA i UVB fotoprotektivní efekt.

Tabulka 13: Stanovení ochranných účinků látky 1 vůči poškození UVA zářením. Výsledky reprezentují průměr ± SD ze 4 experimentů provedených na NHEK izolovaných od různých pacientů

UVA fotoprotekce	
Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	1
	% ochrany
3,9	39,7 $\pm$ (12,9)
7,8	60,2 $\pm$ (16,1)
15,6	53,5 $\pm$ (12,4)
31,3	46,8 $\pm$ (11,8)
62,5	47,9 $\pm$ (8,9)
125	51,7 $\pm$ (4,8)
250	48 $\pm$ (3,2)
500	30 $\pm$ (13,5)

Tabulka 14: Stanovení ochranných účinků látky **1** vůči poškození UVB zářením. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SD ze 4 experimentů provedených na NHEK izolovaných od různých pacientů

UVB fotoprotekce	
Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	1
	% ochrany
3,9	53,5 $\pm$ (7,6)
7,8	72 $\pm$ (6)
15,6	69,8 $\pm$ (8,6)
31,3	65,9 $\pm$ (9)
62,5	65,9 $\pm$ (5)
125	72,9 $\pm$ (6,9)
250	65,7 $\pm$ (3,6)
500	28 $\pm$ (3,2)

Příklad 11: Vliv testovaných látek na délku života *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans se používá jako modelový organismus pro identifikaci látek schopných příznivě modulovat některé aspekty stárnutí savců včetně člověka. Rada látek prodlužujících život *C. elegans* má příznivý efekt na patologické projevy některých nemocí spojených se stářím. Příkladem takových látek může být resveratrol, kurkumin a řada dalších. Délku života *C. elegans* prodlužuje i řada látek používaných v kosmetice pro regeneraci pleti a zpomalení jejího stárnutí, jako je například výše zmíněný resveratrol, vitamin E, koenzym Q10, extrakty ze zeleného čaje nebo granátového jablka nebo cytokinin kinetin. V tomto experimentu byla použita standardní linie *Caenorhabditis elegans fem-1/HC17* nesoucí teplotou indukovatelnou mutaci, která způsobí, že se všichni jedinci při kultivaci ve 25 °C vyvinou v samice, což zabrání další reprodukci a potenciálnímu smíchání původní experimentální populace s potomstvem. Testované látky rozpuštěné v DMSO (100 mM zásobní roztoky) byly přidány do čerstvého NGM (nematode growth medium) do finální koncentrace 10 a 100 μM . Médium bylo následně rozpipetováno do Petriho misek. Jako negativní kontrola bylo použito čisté NGM a NGM s DMSO vehikulem. Po ztuhnutí média bylo na misky rozetřeno 100 μl suspenze bakterií *Escherichia coli* OP50 v LB médiu (suspenze kultivována přes noc ve 37 °C a 20krát zkoncentrována), které slouží jako zdroj potravy pro hádátka. Misky byly ponechány přes noc v 37 °C, aby se bakterie mohly rozrůst. Na takto připravené misky byla následně nasazena populace věkově synchronizovaných mladých dospělců *C. elegans*. Misky byly uchovávány v inkubátoru ve 25 °C a ve vybraných časových intervalech (každé 1 až 3 dny) skenovány na skeneru (Epson perfection V700 photo). Počet

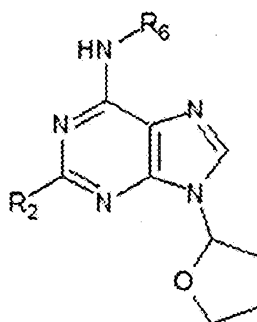
prežívajících jedinců byl určen pomocí analýzy obrazu v programu Fiji. Skript vycházející z identifikuje pohybující se objekty srovnáním série fotografií misky pořízených s malým časovým odstupem (přibližně 30 s). Byly srovnávány tři po sobě pořízené fotografie každé misky a napočtené hodnoty byly zprůměrovány, aby se snížila možnost chyby. Výsledky byly následně analyzovány pomocí programů OASIS a ED50v10. Statistická signifikance byla vyhodnocena pomocí Log-Rank testu a získané p-hodnoty byly korigovány podle Bonferroniho. Výsledky shrnuje tabulka 15. Látky 1, 15 a 20 statisticky významně prodlužovaly život *C. elegans*.

Tabulka 15: Vliv testovaných látek na délku života *C. elegans* (ve dnech)

	DMSO	15 10 µM	15 100 µM	20 10 µM	20 100 µM	1 10 µM	1 100 µM
medián	8,7	9,4	10,3	11,2	10,2	10,3	10,2
průměr	10,9	11,3	13,8	12,4	11,2	11,9	12,6

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití alespoň jednoho adeninového derivátu obecného vzorce I



(I)

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem, aminy, nebo adiční soli s kyselinami, kde

R2 je vodík nebo halogen;

R6 je vybrán ze skupiny zahrnující

- heteroaryl s 5– až 6–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heteroaryl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- heteroarylalkyl s 5– až 6–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl,

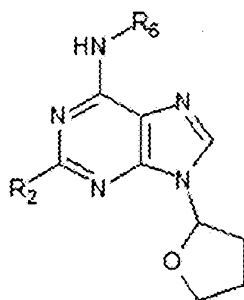
- merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- heterocyklyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heterocyklyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- heterocyklylalkyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heterocyklylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- cykloalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- cykloalkylalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž cykloalkylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;
- isoalkyl obsahující 3 až 7 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl,
- jako UV–fotoprotektivních složek v kosmetických přípravcích, v přípravcích pro ochranu rostlin a/nebo v přípravcích pro ošetření tkáňových kultur.
2. Použití podle nároku 1, kde v substituentu **R6** heteroaryl obsahuje 5–členný kruh, a v tomto 5–atomovém kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S, přičemž heteroaryl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl.
3. Použití podle nároku 1, kde v substituentu **R6** heteroarylalkyl obsahuje 5–členný kruh a C1–C2 alkyl, a v 5–atomovém kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl.
4. Použití podle nároku 1, kde v substituentu **R6** heterocyklyl obsahuje 5–členný kruh, a v 5–atomovém kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S, přičemž heterocyklyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl.
5. Použití podle nároku 1, kde v substituentu **R6** heterocyklylalkyl obsahuje 5–členný kruh a C1–C2 alkyl, a v 5–atomovém kruhu jeden heteroatom, kterým je O nebo S, přičemž heterocyklylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl.
6. Použití podle nároku 1, kde substituent **R6** je vybrán ze skupiny zahrnující cyklopentyl, cyklopentylmethyl, isopropyl, isobutyl, isopentyl, isohexyl, isoheptyl, přičemž každá z

uvedených skupin je nesubstituovaná nebo substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, merkapto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl.

- 5 7. Použití podle nároku 1, kde adeninové deriváty jsou vybrané ze skupiny zahrnující:
 6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–methylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–hydroxymethylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–formylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 10 6–(1–furan–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(cyklopentylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 15 6–(3–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–chlorthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(5–bromthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 6–(1–thiofen–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 20 2–chlor–6–(furfurylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–methylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–hydroxymethylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–formylfuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(1–furan–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 25 2–chlor–6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(thiofen–2–ylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 30 2–chlor–6–(3–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–chlorthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(5–bromthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 2–chlor–6–(1–thiofen–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin
 35 2–chlor–6–(cyklopentylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin.

8. Použití podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde se alespoň jeden adeninový derivát obecného vzorce I použije jako složka s kombinovaným antisenescenčním a UV–fotoprotektivním účinkem.

9. Adeninové deriváty obecného vzorce I



(I)

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem, aminy, nebo adiční soli s kyselinami, kde

R2 je vodík nebo halogen;

R6 je vybrán ze skupiny zahrnující

– heteroaryl s 5– až 6–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heteroaryl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heteroarylalkyl s 6–členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heteroarylalkyl s 5– členným aromatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heteroarylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heterocyklyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, přičemž heterocyklyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– heterocyklylalkyl s 5– až 6–členným alifatickým kruhem obsahujícím alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S a ostatní atomy kruhu jsou atomy uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž heterocyklylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– cykloalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

– cykloalkylalkyl s kruhem obsahujícím 5 až 6 atomů uhlíku, kde alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž cykloalkylalkyl je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující C1–C4 alkyl, merkpto(C1–C4)alkyl, formyl, acetyl, halogen, karboxyl, amino, di(C1–C4)alkylamino, amino(C1–C4)alkyl;

10. Adeninové deriváty podle nároku 9, vybrané ze skupiny zahrnující:

6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(cyklopentylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(thiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(3–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–methylthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–chlorthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(5–bromthiofen–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

6–(1–thiofen–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(tetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(5–methyltetrahydrofuran–2–ylmethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(1–tetrahydrofuran–2–ylethylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

2–chlor–6–(thiofen–2–ylamino)–9–(tetrahydrofuran–2–yl)purin

- 2-chlor-6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
2-chlor-6-(3-methylthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
2-chlor-6-(5-methylthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
2-chlor-6-(5-chlorthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
5 2-chlor-6-(5-bromthiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
2-chlor-6-(1-thiofen-2-ylethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
2-chlor-6-(cyklopentylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin.