

A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01)
A61P 25/20 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-757**
(22) Přihlášeno: **09.12.2019**
(40) Zveřejněno: **16.06.2021**
(Věstník č. 24/2021)
(47) Uděleno: **18.04.2024**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **29.05.2024**
(Věstník č. 22/2024)

(56) Relevantní dokumenty:
KADLECOVA, Alena, et al. The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. Ageing research reviews, 2019, 100958; ISSN 1568-1637; KADLECOVA, Alena, et al. The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. Ageing research reviews, 2019, 100958; ISSN 1568-1637.
IE 20150193 A1; IE 20150193 A1; CN 109833338 A.

(73) Majitel patentu:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ

(72) Původce:
Jiří Voller, Brno, Bystrc, CZ
Martin Sládek, Praha 4, Kunratice, CZ
Marián Hajdúch, Norberčany, CZ
Alena Sumová, Praha 5, Hlubočepy, CZ
Miroslav Strnad, Olomouc, Neředín, CZ

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

(54) Název vynálezu:
**N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin pro
modulaci cirkadiánních rytmů**

(57) Anotace:
Předmětem předkládaného řešení je N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin pro použití pro modulaci cirkadiánního rytmu savců, zejména člověka, což zahrnuje prevenci a/nebo léčbu chorob a dysfunkcí souvisejících s poruchami cirkadiánního rytmu, ale i prevenci důsledků nesouladu cirkadiánního rytmu jedince s vnějším prostředím. Řešení dále zahrnuje kombinaci N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin s chronoterapeutiky.

***N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin pro modulaci cirkadiálních rytmů**Oblast techniky

5

Vynález se týká využití *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu (kinetin, *N*⁶-furfuryladenin, 6-furfurylaminopurin) pro modulaci cirkadiálních rytmů savců včetně člověka a jejich buněk, tkání a orgánů. Taková modulace je užitečná pro léčbu jak akutních, tak chronických dysfunkcí a nemocí cirkadiálního rytmu v důsledku jak genetických, tak socio-environmentálních faktorů.

10

Dosavadní stav techniky

Cirkadiální hodiny se vyvinuly jako adaptace na 24-hodinový sluneční den, a ačkoli se jejich mechanismus u různých organismů liší, patří mezi univerzální vlastnosti života. Umožňují předvídat pravidelně se měnící vnější podmínky. Fungují však také v aperiodických podmínkách s vlastní geneticky určenou cirkadiální periodou. Jsou synchronizovatelné vnějším prostředím a řídí metabolické, fyziologické a behaviorální rytmy. U savců jsou cirkadiální rytmy řízeny centrálním oscilátorem umístěným v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, tzv. SCN, který je přímo synchronizován světlem a reguluje místní hodiny v periferních tkáních, jako je mozková kůra, hippocampus, sítnice, játra, ledviny, střeva nebo slinivka. Hlavní oscilátor v SCN, a také periferní oscilátory, jsou složeny ze vzájemně propojených transkripčních a (post)translačních zpětnovazebních smyček (TTFL) tvořených rodinami hodinových genů, jako jsou *Per*, *Bmal*, *Clock*, *Rev-Erb*, *Ror* a *Cry*. Hodinové geny pak rytmicky regulují velkou skupinu převážně tkáňově specifických hodinami řízených genů s různými funkcemi včetně regulace metabolismu, fotosyntézy nebo buněčného dělení.

Je zajímavé, že hodinové geny hrají roli v celé řadě dalších procesů. Například lidský *ARNTL/BMAL1* pozitivně reguluje myogenezi a negativně reguluje adipogenezi prostřednictvím transkripční kontroly genů signální dráhy Wnt. Rovněž přispívá k normální funkci pankreatických beta-buněk a reguluje glukózou stimulovanou sekreci inzulínu. Dále reguluje signální dráhu mTORC1 regulací exprese *MTOR* a *DEPTOR*. Expresi chemokinů v Ly6C monocytech je také regulována pomocí *ARNTL/BMAL1* (Nguyen *et al.* 2013). Dále reguluje expresi genů podílejících se na růstu vlasů (Watabe *et al.* 2013). Hraje také důležitou roli v dospělé hipokampální neurogenезi tím, že časuje vstup neuronálních kmenových buněk do buněčného cyklu. Lidský *PER2* hraje roli v metabolismu lipidů (tlumením proadipogenní aktivity PPARG) a v metabolismu glukózy (regulace hladin cirkulujícího inzulínu). *PER2* přispívá k udržení kardiovaskulárních funkcí prostřednictvím regulace produkce NO a vazodilatačních prostaglandinů v aortě. Reguluje také absorpci glutamátu v synaptických vezikulech, absorpci mastných kyselin v játrech a podílí se na regulaci zánětlivých procesů.

Hodinami regulované geny a proteiny mohou tvořit i více než 20 % celkového transkriptomu a proteomu v závislosti na tkáni. Jejich rytmická regulace umožňuje buňkám, tkáním a orgánům koordinovaně provádět fyziologické procesy, předvídat a připravovat se na změny prostředí. Synchronizace jednotlivých oscilátorů v periferních tkáních pomocí SCN prostřednictvím hormonálních a neuronálních signálů umožňuje přesnou koordinaci a integraci různých fyziologických funkcí.

Při absenci vnějších podnětů (například ve stálé tmě) je endogenní perioda cirkadiálního rytmu u lidí v průměru o něco delší než 24 hodin. U zcela slepých subjektů neschopných synchronizace světlem takováto perioda často chronicky přetrvává. Výsledkem jsou vzhledem k vnějšímu času volně běžící spánkové fáze těchto subjektů, což je u nich často spojené s negativními metabolickými, kognitivními a emocionálními důsledky.

Nesoulad cirkadiálních hodin s vnějším časem je také typickým rysem moderního života. Letecká doprava umožňuje rychlé cestování přes časová pásma, což má za následek pásmovou nemoc (jet lag). Umělé světlo umožňuje aktivitu nezávislé na přirozeném světle, které účinně synchronizuje centrální oscilátor v SCN. Osobní preference specifické spánkové fáze (tzv. chronotyp) a sociální faktory ovlivňují časování aktivity a tyto jsou spolu často v rozporu, což má za následek tzv. sociální jet lag (tj. chronický rozdíl mezi fází spánku ve volných dnech a pracovních dnech), který má negativní vliv na zdraví (Roenneberg a Mellow, 2008 [doi:0.1016/j.smr.2007.07.005]). Obzvláště důležitý faktor způsobující cirkadiální desynchronizaci je práce na směny kvůli její prevalenci (více než 17 % pracovní síly v EU jsou noční pracovníci). Důsledkem jsou časté problémy se spánkem, únava a snížená manuální a mentální výkonnost. Jet lag, sociální jet lag i práce na směny výrazně ovlivňují fyziologické funkce a zvyšují výskyt civilizačních chorob (Roenneberg 2012 [doi:10.1016/j.cub.2012.03.038]; Roenneberg a Mellow 2016 [doi:10.1016/j.cub.2016.04.011]). Jet lag a poruchy spánku spojené s prací na směny patří mezi spánkové poruchy podle mezinárodní klasifikace (G47.25 a G47.26, Thorpy, 2012 [doi:10.1007/s13311-012-0145-6]). Části směnoví pracovníci také vykazují zvýšené riziko deprese, metabolického syndromu (Costa et al. 2016 [doi:10.1080/07420520802114193]), rakoviny prsu, prostaty a konečníku (Sulli et al. 2019 [doi:10.1016/j.trecan.2019.07.002]). Z toho důvodu Mezinárodní agentura WHO pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila v roce 2007 cirkadiální narušení mezi pravděpodobné lidské karcinogeny (skupina 2A).

Oprava narušených cirkadiálních rytmů nebo korekce jejich nesouladu s vnějším časem by mohla sloužit k terapii nebo zmírnění symptomů v řadě dysfunkcí a chorob. Mezi ně patří ty, u kterých je dysfunkce nebo nesoulad cirkadiálních hodin primární příčinou (dědičný syndrom pokročilé spánkové fáze FASPS, ASPD). Zlepšení spánku by mohlo být důležitým důsledkem takové terapie, protože délka spánku a jeho kvalita samy o sobě ovlivňují incidenci metabolických chorob. Úprava zkrácené periody a časné fáze rytmů způsobené samotným fyziologickým procesem stárnutí by mohla být velmi účinným způsobem terapie a prevence spánkových problémů spojených se stářím, díky nimž každý pátý senior užívá léky na spaní. Taková terapie by také mohla pomoci v případě subklinických, ale subjektivně špatně snášených problémů spojených s jet lagem, jako je nedostatek spánku, únava a ztráta soustředění a výkonu. Tato cirkadiální terapie může být dokonce prospěšná u asymptomatických pacientů, u nichž jsou narušeny periferní rytmy například v důsledku nepravidelného stravování.

Cirkadiální dysfunkce může být hodnocena měřeními fyziologických (jako je tělesná teplota, srdeční aktivita, aktigrafie) nebo biochemických parametrů (melatonin, metabolity, RNA, hladiny proteinů v tělesných tekutinách). V případě dědičného onemocnění může být diagnostikováno pomocí DNA diagnostiky založené na PCR nebo sekvenování.

Modulátory cirkadiálního rytmu mohou být také použity preventivně k urychlení správného nastavení cirkadiálního systému po cestování přes časová pásma nebo při plánované změně aktivity (např. příprava na směnný provoz nebo jiné společenské aktivity).

Současným přístupům k léčbě poruch cirkadiálního rytmu dominují různé varianty terapie jasným světlem a použitím melatoninu nebo syntetických agonistů melatoninových receptorů. Tyto metody však mají také významné nevýhody. Terapie jasným světlem je pro mnoho uživatelů považována za velmi nepohodlnou, protože vyžaduje vystavení se velmi vysokým úrovním světla v přesných časových oknech každý den (Zee et al., 2013 [doi:10.1212/01.CON.0000427209.21177.aa.]). U nevidomých pacientů je vyloučená. Melatonin je účinný u jen některých pacientů s poruchami spánku. Nemá pravděpodobně významný efekt například na pacienty trpící FASPS, ASPD nebo jet lagem po cestování směrem na západ. Může vyvolat nežádoucí ospalost. Navíc existuje velká individuální variabilita v reakci na melatonin. Další nevýhoda světla nebo melatoninu je, že jejich účinek na fázi rytmů je přímo závislý na okamžité fázi centrálních hodin v SCN. Například světlo během subjektivního dne nijak nepůsobí

na fázi SCN (neresponzivní zóna fázově-responzní křivky), je proto nutné ho časovat do brzkých ranních nebo pozdních večerních hodin.

Novým účinným způsobem úpravy cirkadiánních rytmů by proto mohlo být přímé působení na molekulární cirkadiánní mechanismus. Například inhibitor CK1δ (PF670462, Pfizer) velmi účinně prodlužuje periodu *in vitro* a *in vivo* u myši. Využití zahrnují poruchy rytmů způsobené předbíváním fáze (jet lag, poruchy spojené se stárnutím nebo prací na směny) a/nebo zkrácením periody (FASPS, ASPD). Důležitým zjištěním je, že PF670462 je možné využít i pro obnovení fyziologických rytmů zásadně narušených v důsledku genetického vyřazení VIP receptorů v SCN (které zkracuje periodu a způsobuje ztrátu rytmu podobně jako některé neurodegenerativní choroby) nebo v důsledku působení stálého světla (které také nejprve ovlivní periodu a poté způsobí snížení amplitudy vedoucí k úplné ztrátě rytmů) u myši (Meng *et al.* 2010[doi:10.1073/pnas.1005101107]). Jiným příkladem látky působící přímo na molekulární mechanismus je nobiletin (He, Nohara a kol. 2016 [doi:10.1016/j.cmet.2016.03.007]), který zvyšuje amplitudu rytmů na molekulární úrovni působením na jaderné receptory ROR a byl nedávno využit k zamezení vzniku metabolického syndromu u diabetického modelu myši a obnovení fyziologických rytmů v játrech myši krmených vysoce tučnou dietou (He, Nohara a kol. 2016 [doi:10.1016/j.cmet.2016.03.007]), nebo ke snížení kognitivních defektů způsobených stálým světlem a midazolamem u myšičího modelu deliria (Gile, Scott a kol. 2018 [doi:10.1097/CCM.0000000000003077]). Podobná terapie cílicí přímo na molekulární mechanismus bude prospěšná u řady poruch spojených s nejrůznějšími typy cirkadiánních dysfunkcí vyžadujících správnou synchronizaci, úpravu délky periody, jednorázové nastavení nové fáze, nebo zvýšení celkové integrity rytmů (viz výše). Navíc na rozdíl od terapií pomocí světla nebo melatoninu, terapie za využití látek cílicích přímo molekulární mechanismus nevyžaduje SCN, je stejně efektivní ve dne i v noci a její časování pravděpodobně významně neovlivní její účinek, který může být snadno modulován pomocí změny dávky.

Je známo, že různé fyziologické procesy ovlivněné farmakologickými látkami vykazují cirkadiánní variabilitu. Patří mezi ně například metabolismus a buněčné dělení. Podobně mnoho proteinů interagujících s farmakologickými látkami vykazuje variabilní expresi během denního cyklu.

Účinnost farmakoterapie nebo její toxicita může potom záviset na časování. Například časování NSAID u osteoartritických pacientů pomáhá regulovat jejich toxicitu (Levi a Schibler 2007 [doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208]), v čase se mění také účinnost statinů (Muck a kol. 2000) a různých chemoterapeutik (Dakup a kol. 2018 [doi:10.18632/oncotarget.24539]). Známa je také časová závislost účinku a toxicity radioterapie (Chan *et al.* 2017 [doi:10.21037/apm.2016.09.07]). Při tom období vhodné k podání léčiva z hlediska maximální účinnosti nebo minimální toxicity může často kolidovat se spánkem pacienta nebo být mimo dobu vhodnou pro zdravotnického pracovníka provádějícího ošetření. Za těchto okolností by mohlo být užitečné posunout vnitřní cirkadiánní fázi pacienta tak, aby vnější čas vhodný pro léčbu lépe odpovídal cirkadiánní fázi kompatibilní s maximálním terapeutickým výsledkem. K tomuto účelu lze podat farmakologické činidlo modulující cirkadiánní rytmus. Přesné dávkování takového činidla umožní nejen ovlivnit periodu, ale také přesně načasovat výslednou fázi rytmů pacienta. Toto nebo jiné farmakologické činidlo může být také použito pro korekci cirkadiánní fáze po skončení léčby.

Podstata vynálezu

Vynález se týká *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu (kinetin, *N*⁶-furfuryladenin) pro použití pro modulaci cirkadiánních rytmů savců, zejména člověka.

Cirkadiánní rytmus je vnitřní cirkadiánní rytmus organismu nebo jeho buněk, tkání a orgánů. Modulace cirkadiánních rytmů zahrnuje modulaci amplitudy, periody a/nebo fáze cirkadiánního

cyklu. Všechny tyto parametry jsou důležité pro udržování homeostázy, včetně správného fungování metabolismu a kvality spánku.

Vynález je založen na zjištění, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin

5

1) moduluje aktivitu a koncentraci molekulárních komponent savčího buněčného cirkadiánního oscilátoru, a

10

2) moduluje periodu a amplitudu cirkadiánního rytmu. Modulací periody je navíc možné docílit posunu fáze cirkadiánního rytmu. Toto zjištění vede k celé řadě terapeutických aplikací.

15

Zásadní výhodou *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu i oproti řadě bioaktivních látek včetně jiných *N*⁶-substituovaných purinů a jejich biosterů je jeho nízká toxicita. Rattan et Clark (Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994, vol. 201(2), 665-672 [doi: [10.1006/bbrc.1994.1752](https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1752)]) prokázali, že lidské fibroblasty je možné pěstovat v přítomnosti vysokých koncentrací této látky po dobu jejich replikativního života bez negativních důsledků. Látka se pod názvem Kinerase používá v klinicky testované kosmetice a v orální formě se testuje v terapii onemocnění hereditární senzorké a autonomní neuropatie (Hereditary sensory and autonomic neuropathy, klinická zkouška NCT02274051).

20

Manipulace amplitudy, periody, a v případě jednorázového či krátkodobého podávání (<5 dní) i fáze, dosažitelná podáváním *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu je schopna korigovat onemocnění a dysfunkce cirkadiánních rytmů.

25

Dysfunkce cirkadiánního rytmu je jakákoliv odchylka od normálního rytmu centrálního nebo periferního cirkadiánního oscilátoru. Zahrnuje také narušení vzájemné fyziologické synchronizace jednotlivých oscilátorů v těle. Tato dysfunkce může být důsledkem abnormální funkce komponent buněčného oscilátoru v důsledku genetických nebo epigenetických poruch, stejně tak jako změn vnitřního prostředí například v důsledku nemoci nebo stárnutí.

30

Onemocnění cirkadiánního rytmu a onemocnění, kde je přítomna dysfunkce cirkadiánního rytmu, zahrnují syndrom předběhnuté spánkové fáze (ASPD), včetně jeho dědičné formy (FASPS), pásmovou nemoc, sociální jet lag, cirkadiánní dysfunkci spojenou s prací na směny. *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin lze podávat preventivně i terapeuticky.

35

Modulace abnormálních vzorců cirkadiánních rytmů podáváním *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu koriguje sníženou kvalitu spánku (zlepšuje kvalitu spánku). Toto snížení může být vnímáno pouze subjektivně a nemusí dosáhnout klinického stádia. Kvalitou spánku je spokojenost se spánkovou zkušeností integrující aspekty iniciace spánku, udržení spánku, množství spánku a osvěžující efekt spánku. Jejím snížením je pak subjektivní pocit, že některý z těchto parametrů je nedostatečný, nebo objektivní pozorování změn těchto parametrů. Kvalita spánku může být posuzována pomocí dotazníků např. dotazníku Pittsburghské university o kvalitě spánku (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI) nebo měřením (aktigrafie, polysomnografie). Cílová onemocnění spánku s narušenými cirkadiánními rytmy (kód [G47.2](#) podle klasifikace ICD-10-CM 2020 Coding Guide™) zahrnují FASPS a ASPD.

45

50

Prodloužení periody cirkadiánního cyklu pomocí *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu má terapeutický efekt zejména v případě onemocnění, kde je perioda cirkadiánního cyklu zkrácena a/nebo dochází k předbíhání fáze jako je FASPS a ASPD. Zde je výhodné dlouhodobé podávání (více než 5 dní). Aplikace *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu koriguje také abnormální spánkové vzorce spojené se stárnutím, kdy dochází ke zkracování periody, předbíhání fáze (ASPD spojený se stárnutím), změně amplitudy a desynchronizaci periferních rytmů.

55

Opakované podání látky prodlužující periodu lze také použít k obnovení nebo stabilizaci cirkadiánního rytmu narušeného abnormálními světelnými podmínkami, či postižením částí CNS

relevantních pro generování cirkadiálního rytmu geneticky (Meng *et al.* 2010 [doi:10.1073/pnas.1005101107]).

5 Modulace periody a/nebo fáze (posun fáze po jednorázovém nebo krátkodobém prodloužení periody) dovoluje předcházet nebo léčit onemocnění a stavy způsobené nesouladem vlastního cirkadiálního rytmu osoby nebo zvířete s vnějším prostředím. Pro preventivní a/nebo terapeutické účinky proti pásmové nemoci (jet-lag), sociálnímu jet-lagu, a/nebo poruchám spánku způsobeným prací na směny (shift-work disorder) je výhodné podávat *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin jednorázově nebo krátkodobě (jednorázově nebo opakovaně po dobu 1 až 5 dní).
10 Výhodou jednorázového a krátkodobého podávání je menší zatížení organismu včetně metabolických systémů léčivem.

Předmětem vynálezu je také *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin pro použití pro modulaci odpovědi savců, včetně člověka, a jejich buněk, tkání a orgánů (*in vitro* nebo *in vivo*) ke
15 stimulům ovlivňujícím cirkadiální rytmus. *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin a stimulus mohou být aplikovány zároveň, například ve formě kombinovaného přípravku, nebo následně (sekvenčně).

20 Stimulem může být světlo, včetně umělého světla a včetně různých modalit světelné terapie. Kombinace *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu a světla má příznivý efekt na poruchy spánku a nálady včetně syndromu předběhnuté spánkové fáze (ASPD) (včetně jeho formy spojené se stářím a jeho dědičné formy (FASPS)), jet-lagu, sociálního jet-lagu, cirkadiální dysfunkce spojené s prací na směny.

25 Stimulem může být další chronoterapeutikum. Chronoterapeutikum je látka, která moduluje cirkadiální rytmus, případně mění jeho citlivost ke změně působením dalších stimulů.

Ve výhodném provedení je předmětem vynálezu kombinace *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu a chronoterapeutika vybraného ze skupiny zahrnující: inhibitory CSNK1D, inhibitory
30 CSNK1A, inhibitory CSNK1E, inhibitory GSKbeta, inhibitory ALK5, aktivátory AMPK, aktivátory SIRT1, ligandy CRY, agonisty PPAR γ , regulátory exprese BMAL1, ligandy vasopresinového receptoru, REV-ERB agonisty, ROR α/γ agonisty. S výhodou je toto další chronoterapeutikum vybrané ze skupiny zahrnující agonisty melatoninového receptoru včetně melatoninu, ramelteonu, tasimelteonu a agomelatinu. Tyto kombinace mají obvykle aditivní nebo
35 synergický efekt na periodu a/nebo fázi, ale přídavek kinetinu může měnit i amplitudu. V některých případech, jako je kombinace s chronoterapeutikem harminem, přídavek kinetinu zkracuje periodu oproti stavu, kdy je použit samotný harmin. Kinetin lze tedy použít k jemnější modulaci účinku dalších chronoterapeutik.

40 *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin i další účinná látka (chronoterapeutikum) se v přípravcích mohou vyskytovat mimo jiné ve formě farmaceuticky akceptovatelných solí či solvátů. Farmaceuticky akceptovatelné soli *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu vznikají protonací jednoho z dusíků anorganickou nebo organickou kyselinou. Příklady solí s anorganickými kyselinami zahrnují hydrochloridy, hydrobromidy, hydrojodidy, sulfáty, nitráty, fosfáty,
45 hydrogenfosfáty, dihydrogenfosfáty, karbonáty, hydrogenkarbonáty, perchloráty. Příklady solí s organickými kyselinami zahrnují soli s jednosytnými či vícesytnými kyselinami s lineárním nebo větveným řetězcem s 2 až 20 uhlíky, jako jsou například laktát, maleát, oxalát, fumarát, tartarát, malát, maleát, citrát, sukcinát, glykolát, nikotinát, benzoát, salicylát, askorbát, pamoát; sulfonát, methansulfonát, ethansulfonát, 2-hydroxyethansulfonát, benzensulfonát, *p*-toluensulfonát, 2-naftalensulfonát, 3-fenylsulfonát a kafrsulfonát, aspartát nebo glutamát.
50

Kombinované farmaceutické přípravky pro současné podání obsahují účinné množství *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu a další účinné látky (chronoterapeutika), případně jejich farmaceuticky akceptovatelných solí nebo jiné jejich formy, samostatně nebo ve směsi s jednou
55 nebo více pomocnými látkami jako jsou nosiče, plniva, rozpouštědla, látky umožňující degradaci

5 tablet, lubrikanty, látky zvyšující integritu, pigmenty, stabilizátory, konzervanty, antioxidanty, látky zvyšující rozpustnost. Přípravek může obsahovat pomocné látky zvyšující penetraci přes biologické bariéry například přes kůži. Kromě současného podání lze ale podat účinné látky samostatně (sekvenčně), v časovém rozestupu. Pak je každá z těchto účinných látek obsažena v samostatné dávkové formě, obvykle spolu s jednou nebo více pomocnými látkami

10 V upřednostňovaném provedení jsou tyto přípravky lékové formy pro perorální aplikaci. Pouze u cytostatik, kde je standardní formou infuze, je upřednostňovanou formou infuze. V jiném důležitém provedení jde o lékové formy pro transdermální, inhalační nebo nasální aplikaci. V dalších provedeních jde o lékové formy pro jiné formy parenterální aplikace jako je například intravenózní, intramuskulární, subkutánní, nebo pro topické podání.

15 Lékové formy pro perorální aplikaci zahrnují potahované i nepotahované tablety, měkké a tvrdé želatinové tobolky, matricové tablety, roztoky, emulze, suspenze, sirupy, prachy a granule pro rekonstituci, žvýkácí a efervescentní tablety. Lékové formy pro parenterální aplikaci zahrnují roztoky, emulze, suspenze a disperze, prachy a granule pro rekonstituci. Další uvažované lékové formy zahrnují suppositoria, formy pro transdermální penetraci, implantáty, a formy pro insulaci a inhalaci. Topické formy zahrnují krémy, gely, masti a náplasti.

20

Objasnění výkresů

25 Obr. 1: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (látka 1) reguluje expresi genu BMAL1 a prodlužuje periodu cirkadiánního rytmu lidských buněk U2OS transdukovaných transkripčním cirkadiánním reportérem mBmal1-Luc (příklad 1).

30 Obr. 2: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (látka 1) prodlužuje periodu a moduluje amplitudu cirkadiánní exprese transkripčního hodinového reportéru Per2-Luc v myších NIH3T3 buňkách (příklad 2).

35 Obr. 3: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (látka 1) prodlužuje periodu a moduluje amplitudu v organotypických explantech hypotalamického suprachiasmatického jádra (SCN). Reprezentativní záznamy luminiscence přímo ukazují hladinu PER2 proteinu, černé šipky značí čas přidání látky do média (A). Cirkadiánní perioda (B) a amplituda (C) se změnila po podání látky v dané koncentraci (příklad 3).

Obr. 4: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (látka 1) moduluje expresi Bmal1-Luc reportéru během prvních 5 až 15 hodin po přidání do média (příklad 4).

40 Obr. 5: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (látka 1) moduluje expresi Per2-Luc reportéru během prvních 1 až 12 hodin po přidání do média (příklad 5).

45 Obr. 6: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (látka 1) moduluje efekt dalších chronoterapeutik na expresi Bmal1-Luc reportéru v U2OS buňkách. V médiu byla přítomna látka modulující cirkadiánní rytmy spolu s *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminem (50 μ M, černá linie) nebo spolu se stejným množstvím DMSO vehikula (šedá). Podle typu přidané látky lze pozorovat aditivní (A) nebo synergistický efekt na prodloužení periody (B,C,D,E); v případě harminu (F) došlo naopak ke zkrácení periody po přidání *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu. Mechanismus působení látek byl následující: PF670 (PF-670462) – neselektivní inhibitor CK1 δ / ϵ ; T0901317 – agonista ROR; KL001 – inhibitor CRY1 degradace; Rosiglitazon – agonista PPAR γ , SR9009 – agonista REV-ERB α /b; harmin – inhibitor DYRK1 a modulátor Bmal1 transkripce (příklad 6).

55 Obr. 7. Vliv kombinace *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu (+) nebo DMSO vehikula (-) s cytostatiky na viabilitu nádorové linie A549 (příklad 7).

Obr. 8. Vliv *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu na růst fibroblastů BJ. Počet buněk v jamkách 24-jamkové desky po 14 dnech (příklad 9).

5

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin prodlužuje periodu cirkadiálního rytmu lidských buněk

10

Buňky lidského osteosarkomu U2OS byly pěstovány ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem. Buňky U2OS byly transdukovány pomocí lentivirových částic obsahujících reportér pLV6-Bmal1-Luc (Steven Brown, Addgene plasmid # 68833) a selektovány pod Blasticidinem. Buněčná linie byla klonálně expandována a pro další experimenty byla použita jediná monoklonální buněčná linie. Buňky byly kultivovány v 384-jamkové destičce v růstovém médiu do 90+ % konfluence. Testovaná sloučenina nebo vehikulum (DMSO) byly aplikovány do záznamového média s 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 1x GlutaMAX (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10% fetální telecí sérum (Sigma) a 0,1 mM Luciferin-EF (Promega Madison, WI, USA). Záznam luminiscence proběhl každou hodinu během dalších 144 hodin v Luminoskanu Ascent (ThermoFisher) Analýza cirkadiálního rytmu byla provedena pomocí cosinorové analýzy. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 1.

15

20

Tento experiment demonstruje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin prodlužuje periodu cirkadiálního rytmu lidských buněk a může být použit k manipulaci s fází cirkadiálního rytmu například s cílem synchronizovat vnitřní cirkadiální hodiny se solárním časem. Celkový efekt na cirkadiální oscilace nepřímě, ale jednoznačně, prokazuje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin je možné použít i k časové modulaci koncentrace a aktivity dalších komponent oscilátoru včetně kritických komponent *BMAL1*, *PER2*, *CRY* and *CLOCK* v čase, protože tyto jsou nezbytnou součástí mechanismu generujícího rytmickou expresi použitého luminiscenčního reportéru. Nutně také dochází k ovlivnění koncentrace a hladiny dalších proteinů, jejichž rytmická exprese je řízena oscilátorem v mozku i periferních tkáních (tzv. hodinami kontrované geny). Vliv *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu na aktivitu komponent oscilátoru a podřízených genů také znamená ovlivnění fyziologických procesů buňky těmito geny a proteiny řízených.

25

30

35

Příklad 2: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin prodlužuje periodu cirkadiálního rytmu myších buněk

Myší embryonální fibroblasty NIH3T3 buňky byly pěstovány ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem. Buňky NIH3T3 byly transfekovány 1 µg Per2-Luc reportéru (Qing Jun Meng, 2009) pomocí GeneJuice (Novagen) a selektovány pod hygromycinem. Buněčná linie byla klonálně expandována a pro další experimenty byla použita jediná monoklonální buněčná linie. Buňky byly kultivovány v 96-jamkové destičce v růstovém médiu do 90+ % konfluence. Testovaná sloučenina nebo vehikulum (DMSO) byly aplikovány do záznamového média s 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 1x GlutaMAX (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10% fetální telecí sérum (Sigma) a 0,1 mM Luciferin-EF (Promega Madison, WI, USA). Záznam luminiscence proběhl každou hodinu během dalších 144 hodin v Luminoskanu Ascent (ThermoFisher) Analýza cirkadiálního rytmu byla provedena pomocí cosinorové analýzy. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 2.

40

45

50

55

50

55

Experiment demonstruje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin prodlužuje periodu cirkadiálního rytmu myších buněk a může být použit k manipulaci s fází cirkadiálního rytmu například s cílem synchronizovat vnitřní cirkadiální hodiny se solárním časem. Celkový efekt na cirkadiální oscilace nepřímě, ale jednoznačně, prokazuje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin je možné použít i k časové modulaci koncentrace a aktivity dalších komponent oscilátoru

50

55

včetně kritických komponent Bmal1, Per2, Cry and Clock, protože tyto jsou nezbytnou součástí mechanismu generujícího rytmickou expresi použitého luminiscenčního reportéru. Nutně také dochází k ovlivnění koncentrace a hladiny dalších proteinů, jejichž rytmická exprese je řízena oscilátorem v mozku i periferních tkáních (tzv. hodinami kontrolované geny). Vliv *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu na aktivitu komponent oscilátoru a podřízených genů také znamená ovlivnění fyziologických procesů buňky těmito geny a proteiny řízených.

Příklad 3: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin prodlužuje periodu a moduluje amplitudu cirkadiánní exprese hodinového reportéru PER2::Luc v explantovaných suprachiasmatických jádrech hypotalamu transgenní myší linie, centrálních hodinách savců.

Samci a samice myši mPer2Luc (kmen B6.129S6- Per2tm1Jt / J, JAX, USA) (Yoo et al., 2004) byly udržovány v cyklu světlo/tma s 12 hodinami světla a 12 hodinami tmy (LD12: 12), zabity mezi 12:00 a 15:00, tj. 6 až 9 hodin po rozsvícení světel, rychlou cervikální dislokací v anestezii isofluranem, jejich mozky byly vyjmuty a pomocí vibratomu (Leica, Wetzlar, Německo) připraveny plátky SCN o tloušťce 250 μ m v ledovém HBSS médiu (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). Byly připraveny dva explantáty obsahující SCN z každého mozku. Jednotlivé SCN explantáty byly poté umístěny na Millicell Culture Inserts (Merck, Darmstadt, Německo) uvnitř 35 mm Petriho misek s testovanou sloučeninou nebo DMSO vehikulem v 1 ml vzduchem pufrovaného záznamového média doplněného 100 U/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 1x GlutaMAX (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 5% fetálním telecím sérem (Sigma) a 0,1 mM Luciferinu-EF (Promega Madison, WI, USA). Misky byly utěsněny vakuovou vazelinou a skleněnými krycími sklíčky a umístěny uvnitř přístroje LumiCycle (Actimetrics) pro bioluminiscenční záznam. Analýza rytmu byla provedená v softwaru Lumicycle Analysis (Actimetrics).

Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 3.

Příklad demonstruje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin prodlužuje periodu cirkadiánního rytmu a moduluje periodu v komplexní tkáni centrálního pacemakeru a může být použit k manipulaci s fází cirkadiánního rytmu například s cílem synchronizovat vnitřní cirkadiánní hodiny se solárním časem. Celkový efekt na cirkadiánní oscilátor nepřímo, ale jednoznačně, prokazuje, že látku je možné použít i k modulaci koncentrace a aktivity dalších komponent oscilátoru včetně kritických komponent Bmal1, Per2, Cry and Clock v čase. Nutně také dochází k ovlivnění koncentrace a hladiny dalších proteinů, jejichž rytmická exprese je řízena oscilátorem v mozku i periferních tkáních (tzv. hodinami kontrolované geny). Vliv *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu na aktivitu komponent oscilátoru a podřízených genů také znamená ovlivnění fyziologických procesů buňky těmito geny a proteiny řízených.

Příklad 4: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin reguluje expresi of Bmal1 genu a proteinu

Buňky lidského osteosarkomu U2OS byly pěstovány ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem. Buňky U2OS byly transdukovány pomocí lentivirových částic obsahujících reportér pLV6-Bmal1-Luc (Steven Brown, Addgene plasmid # 68833) a selektovány pod Blastocidinem. Buněčná linie byla klonálně expandována a pro další experimenty byla použita jediná monoklonální buněčná linie. Buňky byly kultivovány v 384-jamkové destičce v růstovém médiu do 90+ % konfluence. Testovaná sloučenina nebo vehikulum (DMSO) byly aplikovány do záznamového média s 100 U/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 1x GlutaMAX (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10% fetální telecí sérum (Sigma) a 0,1 mM Luciferin-EF (Promega Madison, WI, USA). Záznam luminiscence proběhl každou hodinu během dalších 144 hodin v Luminoskanu Ascent (ThermoFisher). Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 4.

Příklad demonstruje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin reguluje expresi Bmal1 genu v lidských buňkách. Změna hladiny mRNA Bmal1 se projeví na hladině jeho proteinu. Protože tento protein řídí expresi dalších genů cirkadiánního oscilátoru a přímo aktivuje expresi řady

dalších genů obsahujících E-box v jejich regulační DNA oblasti a vykazujících cirkadiánní oscilace, *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin má vliv i na jejich expresi.

Příklad 5: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin reguluje expresi Per2 genu a proteinu

5

Myší embryonální fibroblasty NIH3T3 buňky byly pěstovány ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem. Buňky NIH3T3 byly transfekovány 1 µg Per2-Luc reportéru (Qing Jun Meng, 2009) pomocí GeneJuice (Novagen) a selektovány pod hygromycinem. Buněčná linie byla klonálně expandována a pro další experimenty byla použita jediná monoklonální buněčná linie. Buňky byly kultivovány v 96-jamkové destičce v růstovém médiu do 90+ % konfluence. Testovaná sloučenina nebo vehikulum (DMSO) byly aplikovány do záznamového média s 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 1x GlutaMAX (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10% fetální telecí sérum (Sigma) a 0,1 mM Luciferin-EF (Promega Madison, WI, USA). Záznam luminiscence proběhl každou hodinu během dalších 144 hodin v Luminoskanu Ascent (ThermoFisher). Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 4.

10

15

Příklad demonstruje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin reguluje expresi Per2 genu v myších buňkách. Změna hladiny mRNA se projeví i na hladině proteinu PER2. Protože tento protein řídí expresi dalších genů cirkadiánního oscilátoru a inhibuje expresi řady dalších genů vykazujících cirkadiánní oscilace, *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin má vliv i na jejich expresi.

20

Příklad 6: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin moduluje odpověď buněk k dalším stimulům ovlivňujícím cirkadiánní rytmus

25

Buňky lidského osteosarkomu U2OS byly pěstovány ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem. Buňky U2OS byly transdukovány pomocí lentivirových částic obsahujících reportér pLV6-Bmal1-Luc (Steven Brown, Addgene plasmid # 68833) a selektovány pod Blastocidinem. Buněčná linie byla klonálně expandována a pro další experimenty byla použita jediná monoklonální buněčná linie. Buňky byly kultivovány v 384-jamkové destičce v růstovém médiu do 90+ % konfluence. Testovaná sloučenina nebo vehikulum (DMSO) byly aplikovány do záznamového média s 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 1x GlutaMAX (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10% fetální telecí sérum (Sigma) a 0,1 mM Luciferin-EF (Promega Madison, WI, USA). Záznam luminiscence proběhl každou hodinu během dalších 144 hodin v Luminoskanu Ascent (ThermoFisher) Analýza cirkadiánního rytmu byla provedena pomocí cosinorové analýzy. Příklad demonstruje, že *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin v kombinaci s látkami prodlužujícími cirkadiánní periodu působícími různými mechanismy účinku má aditivní či dokonce synergistický efekt na délku cirkadiánní periody v lidských buňkách a může být využit pro zvýšení účinku těchto látek. Naopak, v závislosti na mechanismu působení, u některých látek (zde harmin) dojde po přidání *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu ke zkrácení periody, může být, proto využit k negativní modulaci účinku tohoto typu látek.

30

35

40

Příklad 7: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin sensitizuje nádorové buňky k cytostatikům

45

Resazurin je modrá slabě fluorescentní látka, která je metabolicky aktivními buňkami ireverzibilně redukována na červený vysoce fluorescentní resofurin a používá se proto k hodnocení viability. V testu byl sledován vliv působení cytostatik na viabilitu nádorové linie A549 po předchozí expozici *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu (finální koncentrace 100 mikromol).

50

Lidská nádorová linie A549 byla pěstována ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem.

55

1000 buněk bylo vyseto do jednotlivých jamek 384 jamkové mikrotitrační destičky ve 30 mikrolitrech média RPMI. Po 24 hodinách byl k buňkám přidán dexamethason (100 nmolární

finální koncentrace) s cílem synchronizovat cirkadiánní oscilátor a *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (100 mikromolární finální koncentrace) nebo DMSO vehikulum. Po 12 hodinách byla k buňkám přidána testovaná cytostatika (3,3 mikromolární finální koncentrace) nebo DMSO vehikulum. Všechny látky byly dávkovány systémem ECHO, DMSO roztoky byly 1000-krát koncentrované. Po 72 hodinovém působení byl přidán 1000x koncentrovaný roztok resazurinu v DMSO do konečné koncentrace 0,0125 mg/ml. Fluorescence byla měřena po 3 hodinové inkubaci. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 7.

Bylo ukázáno, že aplikace *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin před přidáním cytostatik zvyšuje jejich účinnost. Stejného cytotoxického efektu je pak možné dosáhnout aplikací nižší koncentrace cytostatika.

Příklad 8: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin je netoxický pro lidské nenádorové linie v resazurinovém testu

Resazurin je modrá slabě fluorescentní látka, která je mitochondriemi ireverzibilně redukována na červený vysoce fluorescentní resofurin. Používá se proto k hodnocení viability eukaryotických buněk. V testu byl sledován vliv 72-hodinového působení několika koncentrací látek (trojnásobná ředící řada, maximální koncentrace = 100 mikromM) na viabilitu lidských buněk - kožních fibroblastů BJ a buněk sítnice ARPE-19. Buňky byly pěstovány ve standardním médiu DMEM s 10% fetálním telecím sérem. 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 byl přidán roztok 1000x koncentrovaný roztok resazurin v DMSO do konečné koncentrace 0,0125 mg/ml. Fluorescence byla měřena po 1-hodinové (ARPE-19) případně 3-hodinové (BJ) inkubaci. Hodnoty IC₁₀ byly vypočteny z dávkových křivek pomocí programu v jazyce R využívajícího knihovnu drc.

Byly obdrženy následující výsledky: Resazurinový test po 3 dnech inkubace – ARPE19 IC₁₀ >100 μM, BJ IC₁₀ >100 μM.

N-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin má příznivý profil toxicity pro lidské nenádorové buňky. To je významný rozdíl oproti řadě jiných *N*⁶-substituovaných purinů a jejich biosterů z nichž mnohé jsou toxické, některé z nich kvůli tomu, že jsou to inhibitory cyklin dependentních kinas (Voller et al. 2010 [doi: 10.1016/j.phytochem.2010.04.018], Jorda et al. 2012 [doi: 10.2174/138161212800672804]).

Příklad 9: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin je netoxický pro normální lidské buňky během dlouhodobé kultivace

Lidské fibroblasty BJ byly pěstovány ve standardním DMEM s 10% fetálním telecím sérem.

Vlastní experiment byl proveden ve 24-jamkových kultivačních destičkách. Do jednotlivých jamek bylo vyseto přibližně 10 000 buněk v médiu DMEM s 10% telecím sérem. Testovaná sloučenina byla přidána po 24 hodinách do finální koncentrace pohybující se mezi 12,5 a 100 μM. Každá koncentrace byla testována ve 4 opakováních. DMSO vehikulum bylo testováno jako netoxická kontrola. Pro získání lepší představy o variabilitě bylo kontrolních jamek 8 (sloupce desky A a D). Kultivační médium s testovanou látkou nebo DMSO bylo vyměňováno dvakrát týdně. 12. den byly buňky ztrypsinizovány a spočteny na přístroji Coulter Z2. Testované sloučeniny v daném koncentračním rozmezí a době kultivace neovlivňují negativně růst buněk. Výsledky jsou znázorněny na obr. 8.

N-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin má příznivý profil toxicity pro lidské nenádorové buňky. To je významný rozdíl oproti řadě jiných *N*⁶-substituovaných purinů a jejich biosterů z nichž mnohé jsou toxické, některé z nich kvůli tomu, že jsou to inhibitory cyklin dependentních kinas

(Voller *et al.* 2010 [doi: 10.1016/j.phytochem.2010.04.018], Jorda *et al.* 2012 [doi: 10.2174/138161212800672804]).

Příklad 10: *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin má příznivé farmakokinetické parametry

5

Analytická chemie

Kvantifikace *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu ve vzorcích byla provedena pomocí systému RapidFire RF300 (Agilent Technologies) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, Concord, Canada) s ionizačním zdrojem typu electrosprej v MRM módu. Tento systém je dále označován jako RF-MS. Příprava lyofilizovaných vzorků pro analýzu je popsána níže v sekcích věnovaných jednotlivým metodám. Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi (95 % voda, 5 % acetonitril, 0,1 % kyselina mravenčí) obsahující příslušný vnitřní standard. Rozpuštěné vzorky byly aspirovány přímo z 96-jamkové desky do 10 µl kapiláry a z ní putovaly do C4 kartridže (Agilent Technologies) se solventem A (95% voda, 0,01% k mravenčí, 5% acetonitril) rychlostí of 1,5 mL/minuta po 3 vteřiny. Po odsolení byl analyt z kartridže eluován solventem B (95% acetonitril, 5%voda, 0,01% k mravenčí) do hmotnostního spekrometru rychlostí 0,4 ml/minuta po 7 s. Následovala hmotnostní spektrometrie s ionizací electrosprejem v negativním módu. Dceřinné ionty byly identifikovány pomocí MRM protokolu.

20

Hodnocení stability v lidské plazmě

Testovaná látka (finální koncentrace 2 µM) byla inkubována s lidskou plazmou 0, 15, 30, 60 a 120 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním směsi acetonitril–methanol (2:1). Vzorky byly umístěny přes noc do -80 °C a zcentrifugovány (2811x g, 6 min, 4 °C). Supernatanty byly lyofilizovány.

25

Hodnocení mikrosomální stability

30

Reakční směs byla tvořena testovanou látkou (2 µM), lidskými jaterními mikrosomy (ThermoFisher Scientific, 0.5 mg/ml) a systémem generujícím NADPH (NADP+, isocitrate dehydrogenasa, kyselina izocitronová a MgSO₄ v 0,1 mol/l K₃PO₄ pufru). Po 0, 15, 30 a 60-minutové inkubaci byla reakce zastavena přidáním směsi acetonitril–methanol (2:1). Vzorky byly umístěny přes noc do -80 °C a zcentrifugovány (2811x g, 6 min, 4 °C). Supernatanty byly lyophilizovány.

35

Výpočty: Vnitřní clearance byla vypočtena podle vztahu $CL_{int} = V \cdot (0,693/t_{1/2})$, kde V je objem směsi v µl vztažený na hmotnost mikrosomálních proteinů v mg na danou reakci. Poločas ($t_{1/2}$) byl vypočten podle vztahu $t_{1/2} = 0,693/k$, kde k je směrnice regresní přímky vztahu mezi přirozeným logaritmem procenta zbývajícího substrátu a času inkubace.

40

Hodnocení permeability pasivní difuzí – PAMPA

PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) byla provedena pomocí desek MultiScreen® Filter Plates for PAMPA (Merck Millipore) podle protokolu výrobce (PC040EN00). Před přidáním do donorových jamek byla testovaná látka byla naředěna PBS (pH 7,4) na finální koncentraci 20 µM. Membrána byla potažena 10% lecithinem (Sigma Aldrich) v dodekanu a akceptorové jamky byly naplněny PBS (pH 7,4). Akceptorová deska byla opatrně přenesena na donorovou desku. Inkubace probíhala 18 hodin při pokojové teplotě. Poté byly odebrány alikvoty roztoků z donorového a akceptorového roztoku a lyofilizovány.

50

Výpočty: Relativní permeabilita $\log P_e$ byla vypočtena podle vztahu: $\log P_e = \log \{C \times -\ln(1 - \text{drugA}/\text{drugE})\}$; kde $C = (VA \times VD) / \{(VD + VA) \times A \times T\}$. VD a VA jsou objemy donorového a akceptorového roztoku, A je velikost aktivního povrchu v cm², T je doba inkubace

55

ve vteřinách, drugA a drugE je množství látky v akceptorovém roztoku a v roztoku v teoretické rovnováze.

Hodnocení vazby na plazmatické proteiny

5

Hodnocení je založeno na rychlé rovnovážné dialýze (rapid equilibrium dialysis, RED). Inzerty do destiček (Thermo Scientific™, Rockford, USA) pro RED se skládají ze dvou komůrek (červená a bílá) oddělených semipermeabilní membránou. Roztok testované látky (10 μM) v 10% lidské plazmě byl přenesen do červených komůrek a bílé komůrky byly naplněny PBS pufrem, pH 7,4. Po 4-hodinové inkubaci za třepání při 250 rpm byly aliquoty z obou komůrek přeneseny do mikrozkušavek. Aby aliquoty z obou komůrek měly stenou matrici, byla přidána 10% plasma nebo PBS pufr (pH 7,4). Reakce byla zastavena přidáním směsi acetonitril-methanol (2:1). Vzorky byly zcentrifugovány (2811x g, 6 min, 4 °C) a supernatanty lyofilizovány.

Hodnocení transportu přes Caco-2 and MDR-MDCK bariéry

15

Caco-2 (American Tissue Type Collection) a MDR1-MDCK (Netherlands Cancer Institute) byly pěstovány v DMEM medium s 10% fetálním telecím séru. Pro přípravu monovrstvy pro studie transportu byly buňky ztrypsinizovány a vysety na polyesterové membrány (velikost filtru 0,4 μm pro Caco-2 a 1 μm pro MDR1-MDCK) v 96-jamkových destičkách Transwell® (Corning, NY, USA). Kultivační médium bylo přidáno do donorového i akceptorového kompartmentu. Buňky byly nechány růst, aby vytvořily monovrstvu. Kultivační médium bylo měněno každý druhý den.

Diferencované Caco-2 a MDR1-MDCK monovrstvy byly použity k testům jen pokud byly intaktní, což bylo otestováno pomocí hodnocení exkluze barviva Lucifer Yellow. Před vlastním testem permeability byly monovrstvy opláchnuty Hanksovým pufrem balanced buffer solution (Hanks balanced buffer solution – HBBS) (Gibco, Waltham, USA) a ekvilibrovány 1 h HBBS o pH 7,4. Následně byla k buňkám přidána testovaná látka (10 μM v HBSS pH 7,4) na 1h (MDR1-MDCK) nebo 2 h (Caco-2). Po ukončení inkubace byly odebrány aliquoty z donorového i akceptorového kompartmentu a lyofilizovány.

Výpočty: Koeficient permeability byl vypočten podle vztahu $P_{app} = (dQ/dt)/(C_0 \times A)$, kde dQ/dt je rychlost permeace látky přes monovrstvu, C_0 je koncentrace v donorovém kompartmentu v čase $t=0$ a A je plocha monovrstvy. Efluxový poměr je definován jako poměr P_{BA}/P_{AB} , kde P_{BA} a P_{AB} jsou zdánlivé permeability testované látky v apikálně-bazálním a bazálně-apikálním směru. Látky s efluxovým poměrem >2 jsou považovány za látky podléhající efluxu.

Tabulka 1. Výsledky panelu farmakokinetický testů *in vitro*. Hodnoty $P_{app} > 20 \times 10^{-6}$ pro Caco-2 a $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ pro MDR-MDCK indikují dobrou orální, respektive CNS, dostupnost.

40

MDR1-MDCK permeabilita ($P_{app} \times 10^{-6}$)	Caco-2 permeabilita ($P_{app} \times 10^{-6}$)	PAMPA permeabilita ($\log P_e$)	Mikrosomalní stabilita (60min) [% intaktní]	Stabilita v plasmě (120 min) [% intaktní]
315,31	76	-5,3	90	91

N-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin je vysoce stabilní v lidské plazmě a při vystavení lidské mikrosomalní frakci. Data z Caco-2 modelu střevní stěny predikují, že se bude orálně vstřebávat. Výjimečně vysoké hodnoty permeability v MDR1-MDCK modelu hematoencefalické bariéry predikují výbornou permeabilitu do CNS pravděpodobně pomocí transportéru. Penetrace do CNS je klíčová pro ovlivnění centrálního pacemakeru.

Příklad 11: Suché tobolky s *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminem a melatoninem

50

50 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 500 mg *N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-aminu a 5 mg melatoninu, se připraví následujícím postupem:

5 Složení

N-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin 25 g

Melatonin 250 mg

10 Talek 100 mg

Magnesium stearát 100 mg

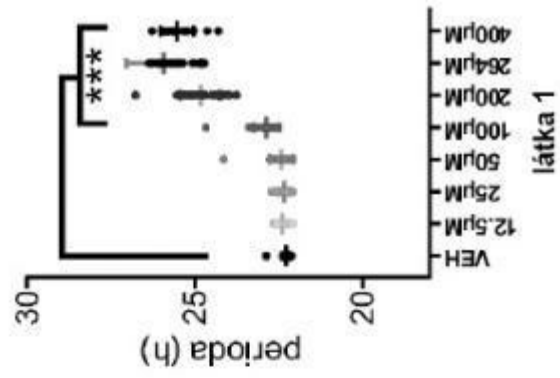
Postup přípravy: Homogenizované látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,51 g směsi je přeneseno do želatinové tobolky.

15

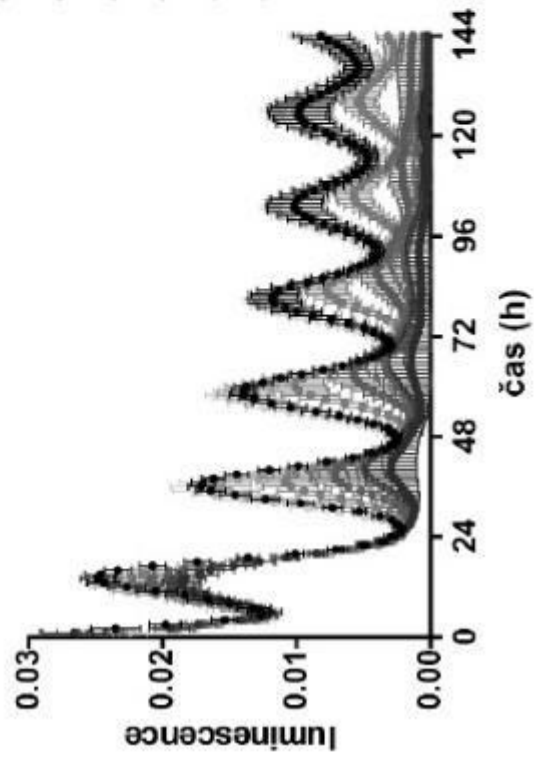
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin pro použití pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění cirkadiálního rytmu vybraných ze skupiny zahrnující syndrom předběhnuté spánkové fáze - ASPD a jeho dědičné formy - FASPD a FASPS.
2. N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin pro použití podle nároku 1 pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění cirkadiálního rytmu, vybraných ze skupiny zahrnující syndrom předběhnuté spánkové fáze - ASPD, a jeho dědičné formy – FASPD a FASPS, kde N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin je podáván po dobu více než 5 dnů.
- 10 3. N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin pro použití pro prevenci a/nebo léčbu dysfunkcí cirkadiálního rytmu vybraných ze skupiny zahrnující pásmovou nemoc, sociální jet lag, a cirkadiální dysfunkci spojenou s prací na směny.
- 15 4. N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-aminu pro použití podle nároku 3 pro prevenci a/nebo léčbu dysfunkcí cirkadiálního rytmu, vybraných ze skupiny zahrnující pásmovou nemoc, sociální jet lag, poruchu cirkadiálního rytmu spojenou s prací na směny, kde N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-amin je podáván jednorázově nebo po dobu méně než 5 dnů nebo po dobu nejvýše 5 dnů.
- 20 5. Kombinace N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-aminu a chronoterapeutika pro použití pro modulaci cirkadiálního rytmu, zejména při prevenci a/nebo léčbě onemocnění cirkadiálního rytmu vybraných ze skupiny zahrnující syndrom předběhnuté spánkové fáze - ASPD, a jeho dědičné formy - FASPD a FASPS.
6. Kombinace pro použití podle nároku 5, kde chronoterapeutikum je vybrané ze skupiny zahrnující melatonin, ramelteon, tasimelteon, agomelatin, harmin, resveratrol.
- 25 7. Kombinace N-(furan-2-ylmethyl)-7H-purin-6-aminu a chronoterapeutika pro použití pro prevenci a/nebo léčbu dysfunkcí cirkadiálního rytmu vybraných ze skupiny zahrnující pásmovou nemoc, sociální jet lag, a cirkadiální dysfunkci spojenou s prací na směny.
8. Kombinace pro použití podle nároku 7, kde chronoterapeutikum je vybrané ze skupiny zahrnující melatonin, ramelteon, tasimelteon, agomelatin, harmin, resveratrol.

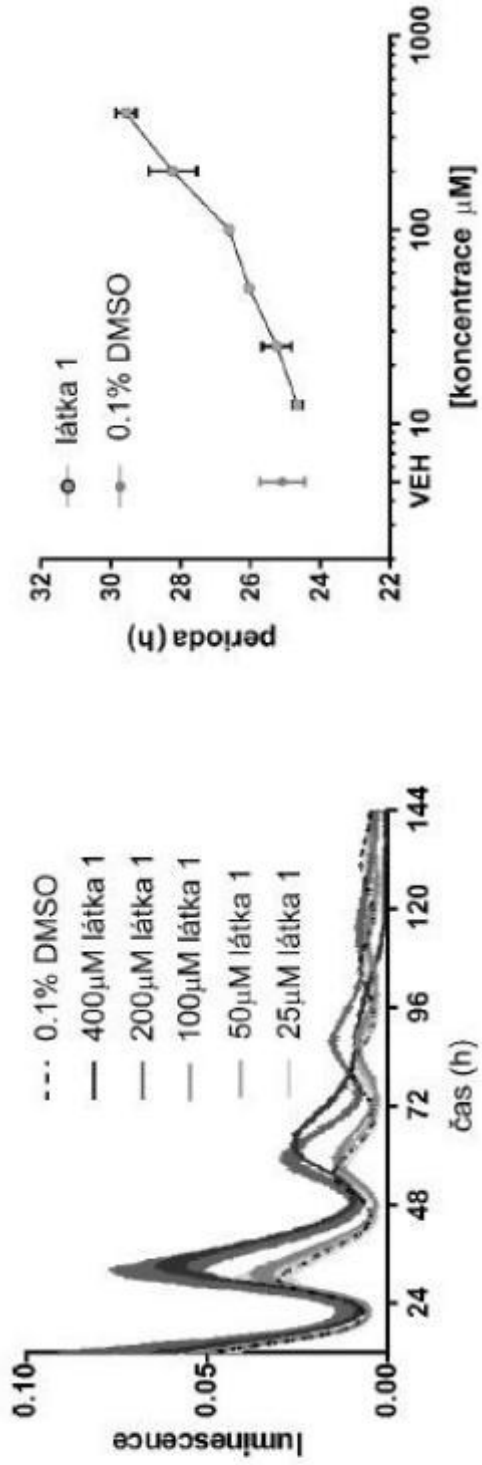
7 výkresů



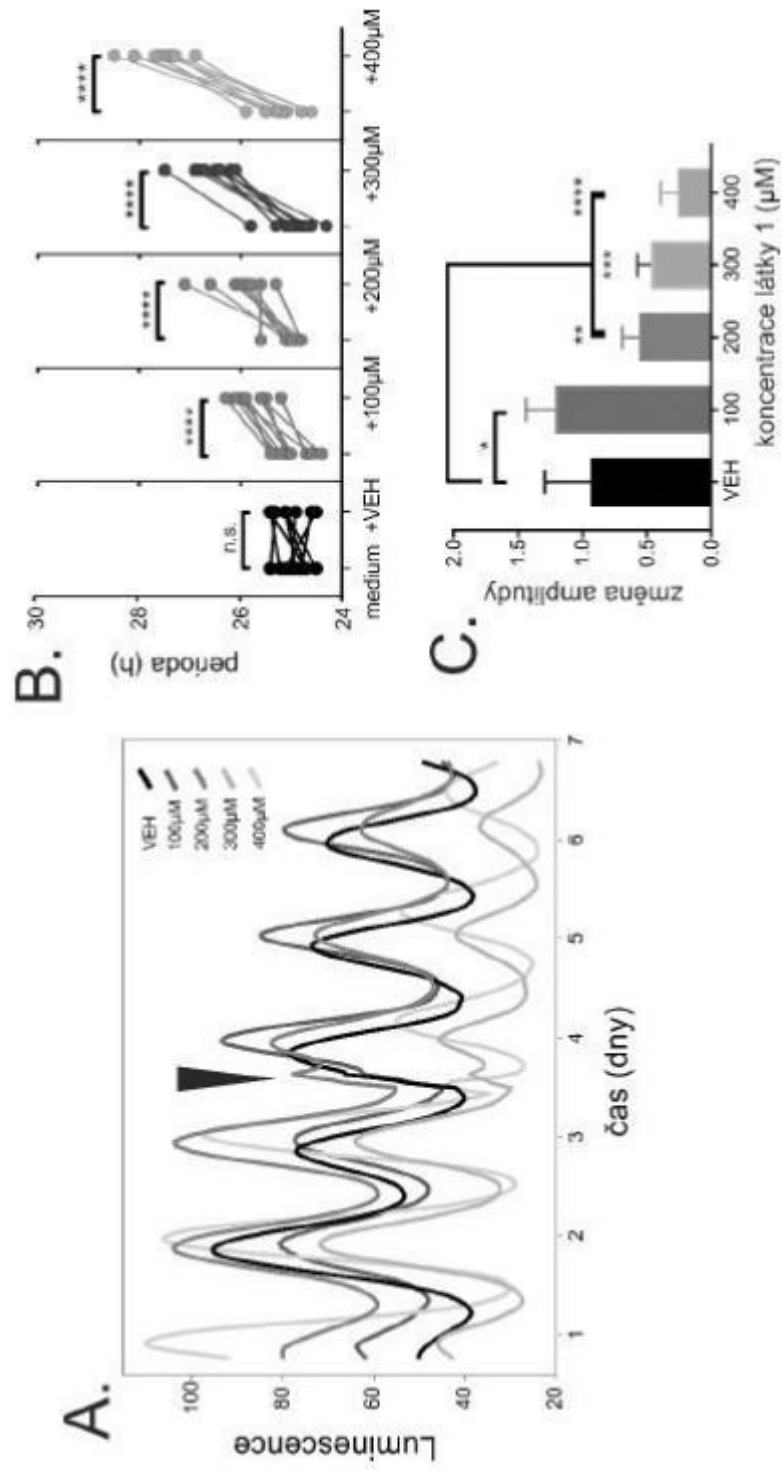
- 0.4% DMSO
- 400µM látka 1
- 264µM látka 1
- 200µM látka 1
- 100µM látka 1
- 50µM látka 1
- 25µM látka 1



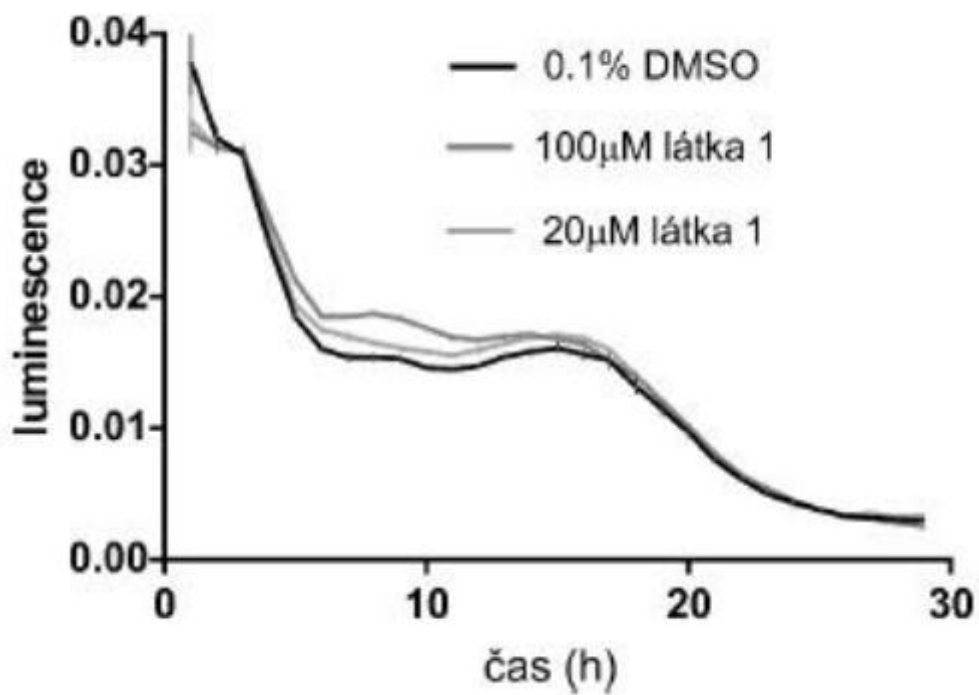
Obr. 1



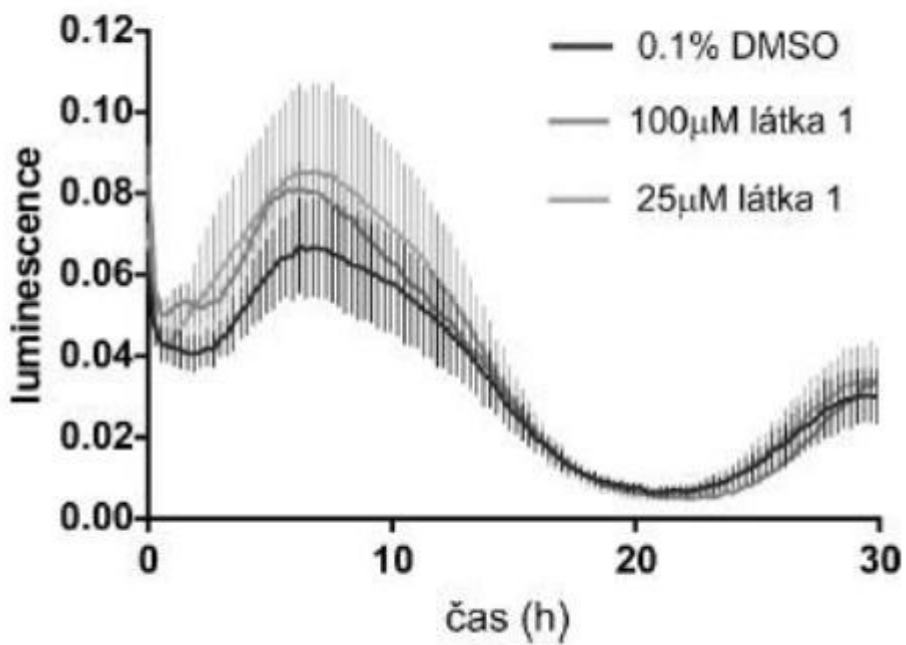
Obr. 2



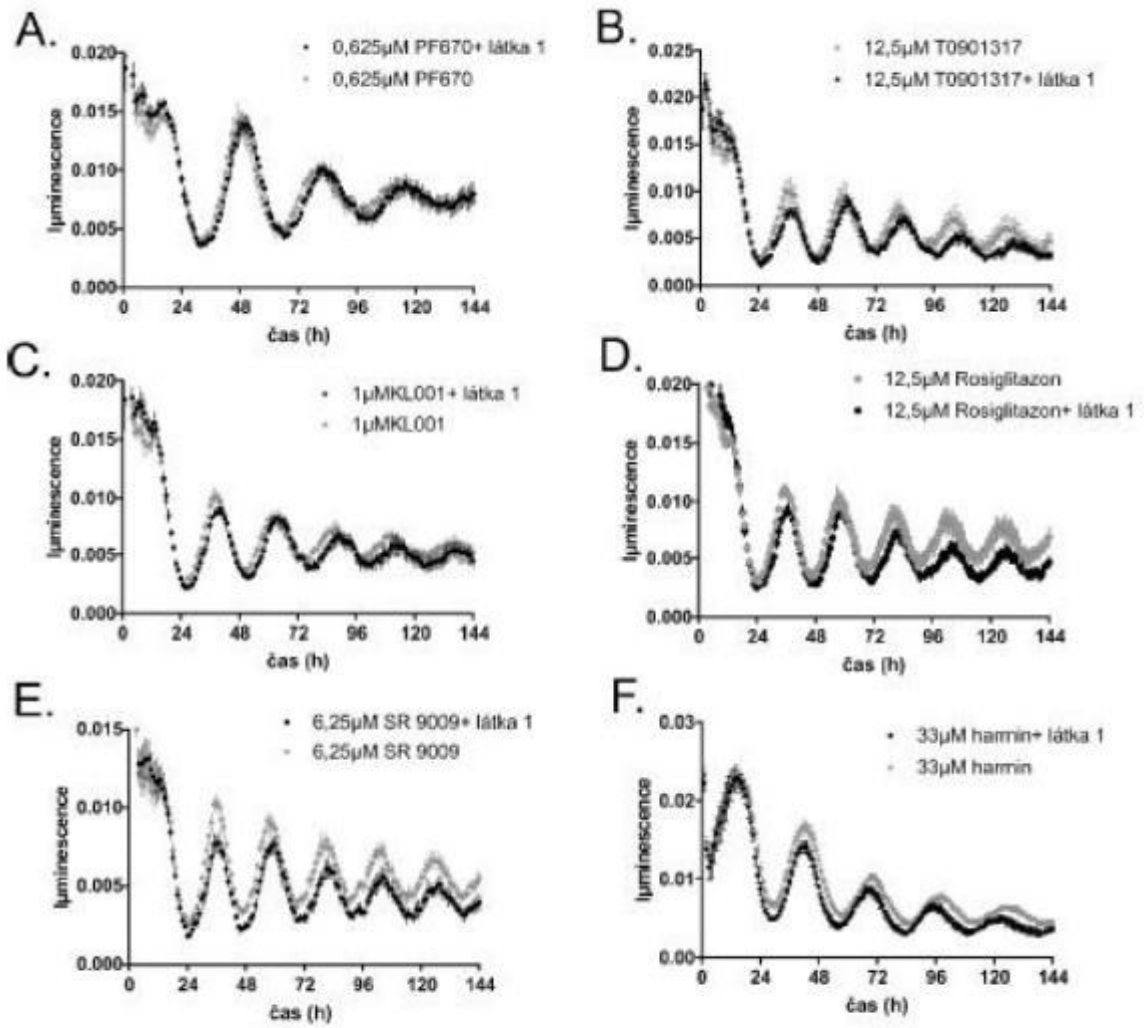
Obr. 3



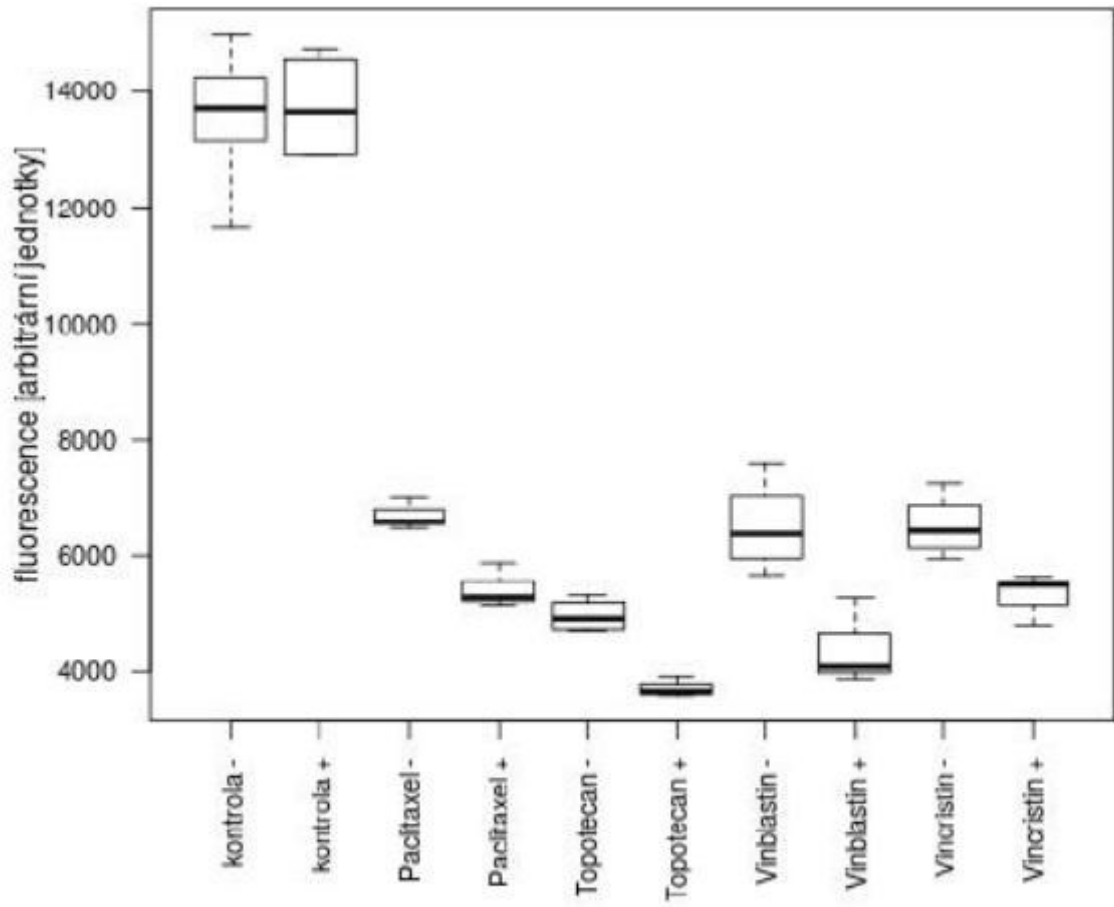
Obr. 4



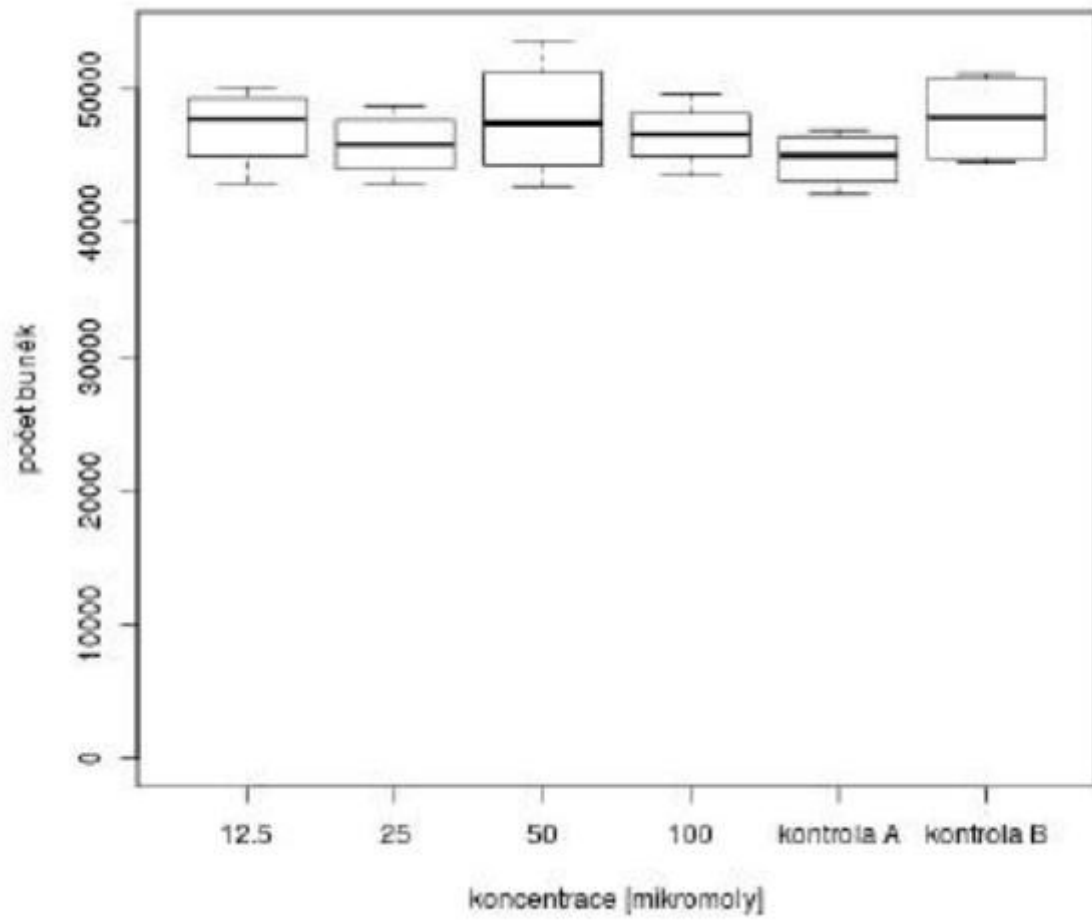
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8