

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 926**

51 Int. Cl.:

**C07D 473/16** (2006.01)

**C07D 473/34** (2006.01)

**A01N 43/713** (2006.01)

**A61K 31/52** (2006.01)

**A01N 43/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2008 E 08773244 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2173173**

54 Título: **Derivados de 6-anilino purina sustituidos como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa y preparaciones que contienen estos derivados**

30 Prioridad:

**04.07.2007 CZ 20070453**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.11.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI (100.0%)  
Křížkovského 8  
771 47 Olomouc , CZ**

72 Inventor/es:

**SPICHAL, LUKAS;  
GEMROTOVA, MARKETA;  
ZATLOUKAL, MAREK;  
FREBORTOVA, JITKA;  
GALUSZKA, PETR;  
WERNER, TOMAS;  
SCHMULLING, THOMAS;  
DOLEZAL, KAREL y  
STRNAD, MIROSLAV**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

ES 2 431 926 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

5 Derivados de 6-anilinpurina sustituidos como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa y preparaciones que contienen estos derivados.

**Campo técnico**

10 La invención se refiere a derivados de 6-anilinpurina sustituidos, a su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa y a preparaciones que contienen estos derivados.

**Antecedentes de la técnica**

15 En los últimos años, las aminopurinas sustituidas en la posición 6 han adquirido una considerable significación bioquímica. Algunos compuestos de este tipo promueven el crecimiento vegetal y pertenecen al grupo de reguladores del crecimiento denominados citocininas (Letam, Ann. Rev. Plant. Physiol. 18, 349, 1967). La cinetina (N<sup>6</sup>-furfuriladenina) fue la primera molécula en descubrirse con actividad de citocinina. Originalmente, se aisló a partir de ADN de esperma de arenque esterilizado en autoclave (Miller *et al.* 1955, J. Am. Chem. Soc. 77:1392). También se producen citocininas estrechamente relacionadas con cinetina como bases modificadas en ARN soluble (Skoog *et al.*, Science 154:1354, 1966). En los ARNt de serina y tirosina de levaduras, vegetales y animales, la citocinina es adyacente al anticodón. El crecimiento de cultivos de células de mamíferos se inhibe por determinadas adenosinas sustituidas en N<sup>6</sup> con actividad de citocinina (Grace *et al.*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8:23, 1967).

25 Las citocininas son hormonas vegetales importantes que regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Estudios recientes sobre plantas transgénicas con señalización o metabolismo de citocininas alterados revelaron consecuencias interesantes de la deficiencia de citocininas o la alteración de la percepción de citocininas (Werner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:10487, 2001, Werner *et al.*, Plant Cell 15:2532, 2003; Rieffer *et al.*, Plant Cell 18:40, 2006). La modulación de los niveles de citocininas mediante la aplicación exógena o la regulación de sus niveles endógenos genéticamente a través de citocinina oxidasa/deshidrogenasa (CKX, EC 1.5.99.12), una enzima clave implicada en la degradación de citocininas, ya ha mostrado posibles aplicaciones en agricultura. Por ejemplo, la aplicación exógena de citocininas condujo a un acortamiento del tiempo hasta la antesis en el tomate (Sawhney y Shukla, Am J Bot 81: 1640, 1994) o a la reversión de la esterilidad masculina en la cebada (Ahokas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7605, 1992). Se mostró que la expresión específica de anteras y polen de CKX en maíz es una posible herramienta para generar esterilidad masculina para la producción de variedades híbridas de cultivos tradicionalmente no híbridos (Huang *et al.*, 2003). Un trabajo reciente notificó la implicación de CKX en la regulación de la producción de granos de arroz (Ashikari *et al.*, Science 309:741, 2005).

40 Recientemente se ha descubierto que generaciones novedosas de inhibidores de CKX podrían basarse en 6-anilinpurinas sustituidas en la posición 2. Los sustituyentes más prometedores son los grupos 2-cloro, 2-fluoro y 2-amino en relación a la preparación de inhibidores de CKX específicos.

45 Un objeto de esta invención es proporcionar análogos de citocinina que tienen selectividad e índice de eficacia mejorados en la inhibición de citocinina oxidasa/deshidrogenasa, es decir, son menos tóxicos y aún más eficaces que los análogos conocidos hasta ahora.

**Descripción de la invención**

El objeto de esta invención son derivados de 6-anilinpurina sustituidos de fórmula general I



I

50 y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos, en la que

R indica de uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que comprende hidrógeno, grupo halógeno, hidroxilo, amino, alquilo y alquilo,

5 R2 se selecciona del grupo que comprende grupo amino, halógeno, nitro, tio, alquilo y alquilo, para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa.

10 La actividad de los derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula I como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa incluye el retraso de la senescencia de células cutáneas de mamíferos, la supresión de la inmunoestimulación y/o la supresión del rechazo de trasplantes en mamíferos.

15 La actividad de los derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula I como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa incluye el retraso de la senescencia de células vegetales, de mamíferos, microorganismos, levaduras y fúngicas, la estimulación de la proliferación y la morfogénesis en cultivos tisulares, el aumento del rendimiento y la calidad de productos agrícolas y/o la producción de cosechas.

Los grupos de sustituyentes genéricos tienen significados idénticos a las definiciones de los grupos correspondientes tal como se definen en esta leyenda, en la que

20 amino indica el grupo -NH<sub>2</sub>,

halógeno indica un átomo seleccionado del grupo que comprende átomo de flúor, bromo, cloro y yodo,

nitro indica el grupo -NO<sub>2</sub>,

25 tio indica el grupo -SH,

alquilo indica grupo alquilo ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, hidroxilo indica el grupo -OH, alquilo indica el grupo -OR, en el que R es alquilo y dichos grupos de sustituyentes genéricos tienen significados idénticos a las definiciones de los grupos correspondientes tal como se definen en esta leyenda,

30 alquilo indica el grupo -SR, en el que R es alquilo y dichos grupos de sustituyentes genéricos tienen significados idénticos a las definiciones de los grupos correspondientes tal como se definen en esta leyenda.

35 Según la invención, derivados de 6-anilino purina sustituidos preferidos de fórmula general I son: 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-anilino purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-fluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-fluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-fluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-bromoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-bromoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-etoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-etoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-etoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-aminoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-aminoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-aminoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-difluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-difluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3,4-trifluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,5-trifluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dicloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dicloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4,5-trimetoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,6-trimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dihidroxianilino)purina, 2-

(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, hidroxio, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-4-metoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-5-metoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-3-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-4-cloroanilino)purina,

y las sales de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos,

para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa.

Se prefieren particularmente los siguientes derivados de 6-anilino purina sustituidos, concretamente:

2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina,

y las sales de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos,

para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa.

Un aspecto adicional de la invención son preparaciones farmacéuticas, cosméticas y reguladoras del crecimiento que contienen al menos un compuesto de fórmula general I o la sal del mismo con metal alcalino, amoniaco o amina en forma de racemato o isómero ópticamente activo, así como sus sales de adición con ácidos, incluyendo excipientes.

Otro aspecto de la invención es el uso de derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I o las sales de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos, para la preparación de una composición usada para la inhibición de citocinina oxidasa/deshidrogenasa destinada al tratamiento seleccionado del grupo que comprende el retraso de la senescencia de células cutáneas de mamíferos, la supresión de la inmunostimulación y la supresión del rechazo de trasplantes en mamíferos.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa, especialmente para aumentar el rendimiento y la calidad de productos agrícolas, para la estimulación de la proliferación y la morfogénesis en cultivos tisulares, para retrasar la senescencia de células vegetales, de mamíferos, microorganismos, levaduras y fúngicas o en la producción de cosechas.

Un aspecto adicional de la invención son los derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa para retrasar la senescencia de células cutáneas de mamíferos, por ejemplo fibroblastos y queratinocitos, para suprimir la inmunostimulación (por ejemplo artritis) o en la supresión del rechazo de trasplantes en mamíferos.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I, para clonar embriones y células embrionarias vegetales y de mamíferos, excepto de seres humanos, preferiblemente para clonar ovocitos.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa en la producción de cosechas, en particular cereales (trigo, cebada, arroz, maíz, centeno, avena, sorgo y especies relacionadas), remolacha (remolacha azucarera y remolacha forrajera); pomos, drupas y frutos blandos (manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas, fresas y moras); plantas leguminosas (judías, lentejas, guisantes, soja); plantas oleaginosas (colza, mostaza, amapola, aceitunas, girasoles, coco, *Ricinus*, granos de cacao, cacahuetes); plantas cucurbitáceas (calabazas, pepinos, melones); plantas fibrosas (algodón, lino, cáñamo, yute); frutas cítricas (naranjas, limones, pomelo, mandarinas); vegetales (espinaca, *Cinnamomum*, alcanfor) o plantas tales como tabaco, nueces, berenjenas, caña de azúcar, té, uvas de parra, lúpulos, plátanos y caucho natural y plantas medicinales, así como ornamentales. Las cosechas

incluyen las que se han vuelto tolerantes hacia clases de factores de crecimiento mediante métodos de producción convencionales o métodos de ingeniería genética. Las malas hierbas que van a controlarse pueden ser malas hierbas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, por ejemplo *Stellaria*, *Nasturtium*, *Agrostis*, *Digitaria*, *Avena*, *Setaria*, *Sinapis*, *Lolium*, *Solanum*, *Echinochloa*, *Scirpus*, *Monochoria*, *Sagittaria*, *Bromus*, *Alopecurus*, *Sorghum halepense*, *Rottboellia*, *Cyperus*, *Abutilon*, *Sida*, *Xanthium*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Ipomoea*, *Chrysanthemum*, *Galium*, *Viola* y *Veronica*.

Los compuestos de fórmula general I se usan en forma no modificada o, preferiblemente, junto con los excipientes empleados convencionalmente en la técnica de preparaciones. Para este fin, se formulan convenientemente como concentrados de compuestos activos así como suspensiones y dispersiones, preferentemente dispersiones, suspensiones y disoluciones acuosas isotónicas, emulsiones diluidas, polvos solubles, polvos finos, granulados, cremas, geles, suspensiones oleosas y también encapsulaciones, por ejemplo sustancias poliméricas. Al igual que con el tipo de la preparación, los métodos de aplicación, tal como pulverización, atomización, formación de polvo, dispersión, recubrimiento o vertido, se eligen según los objetivos previstos y las circunstancias imperantes. Las preparaciones pueden esterilizarse y/o contener excipientes adicionales de naturaleza neutra tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes o emulgentes, agentes solubilizantes, así como fertilizantes, donadores de micronutrientes u otras formulaciones para obtener efectos especiales.

Los compuestos de fórmula I pueden mezclarse con otros reguladores del crecimiento, dando como resultado actividades sinérgicas.

#### Preparaciones

Las preparaciones que comprenden los compuestos de general fórmula I (principios activos) y, cuando sea apropiado, uno o más excipientes sólidos o líquidos, se preparan de manera conocida *per se*, por ejemplo mezclando y/o triturando los principios activos con excipientes, por ejemplo disolventes o vehículos sólidos. Además, también pueden usarse compuestos activos de superficie (tensioactivos) en las preparaciones.

Dependiendo de la naturaleza del compuesto de general fórmula I que va a formularse, compuestos activos de superficie adecuados son tensioactivos no iónicos, catiónicos y/o aniónicos y mezclas de tensioactivos que tienen buenas propiedades emulsionantes, dispersantes y humectantes.

Se enumeran ejemplos de tensioactivos aniónicos, no iónicos y catiónicos adecuados, por ejemplo, en el documento WO 97/34485.

También son adecuados en la preparación de las composiciones que contienen inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa derivados de derivados de 6-anilino purina sustituidos según la invención los tensioactivos usados convencionalmente en tecnología de formulaciones, que se describen, entre otros, en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" MC Publishing Corp., Ridgewood Nueva Jersey, 1981; Stache, H., "Tensid-Taschenbuch", Carl Hanser Verlag, Munich, 1981; y M. y J. Ash, "Encyclopedia of Surfactants", vol. 1-3, Chemical Publishing Co., Nueva York, 1980-81.

La formulación de la preparación que contiene inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa contiene habitualmente desde el 0,1 hasta el 95% de principio activo en peso, desde el 5 hasta el 99,9% en peso de vehículos farmacéuticos o adyuvantes sólidos o líquidos, dependiendo del método de aplicación, y desde el 0,1 hasta el 25% en peso de un tensioactivo.

Aunque los productos comerciales se formulan habitualmente como concentrados, el usuario final empleará normalmente formulaciones diluidas. Las composiciones también pueden comprender componentes adicionales, tales como estabilizadores, por ejemplo aceites vegetales o aceites vegetales epoxidados (coco epoxidado 0;1, aceite de colza o aceite de soja), antiespumantes, por ejemplo aceite de silicona, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes o emulsionantes, factores de viscosidad, aglutinantes, agentes de adhesividad, y también fertilizantes u otros principios activos. Las formulaciones preferidas tienen especialmente las siguientes composiciones: (% = por ciento en peso)

#### Concentrados emulsionables:

mezcla de principios activos:	del 1 al 90%, preferiblemente del 5 al 20%
tensioactivo:	del 1 al 30%, preferiblemente del 10 al 20%
vehículo líquido:	del 5 al 94%, preferiblemente del 70 al 85%

#### Polvos finos:

mezcla de principios activos:	del 0,1 al 10%, preferiblemente del 0,1 al 5%
vehículo sólido:	del 99,9 al 90%, preferiblemente del 99,9 al 95%

Concentrados en suspensión:

mezcla de principios activos:	del 5 al 75%, preferiblemente del 10 al 50%
agua:	del 94 al 24%, preferiblemente del 88 al 30%
tensioactivo:	del 1 al 40%, preferiblemente del 2 al 30%

Polvos humectables:

5	mezcla de principios activos:	del 0,5 al 90%, preferiblemente del 1 al 80%
	tensioactivo:	del 0,5 al 20%, preferiblemente del 1 al 15%
	vehículo sólido:	del 5 al 95%, preferiblemente del 15 al 90%

Gránulos:

mezcla de principios activos:	del 0,1 al 30%, preferiblemente del 0,1 al 15%
vehículo sólido:	del 99,9 al 70%, preferiblemente del 99,9 al 85%

10 Las composiciones también pueden comprender componentes adicionales, tales como estabilizadores, por ejemplo aceites vegetales o aceites vegetales epoxidados (aceite de coco epoxidado, aceite de colza o aceite de soja), antiespumantes, por ejemplo aceite de silicona, conservantes, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, agentes de adhesividad, y también fertilizantes u otros principios activos. Para el uso de los compuestos de general fórmula I, o de composiciones que los comprenden, en la protección de plantas de cosecha frente a los efectos perjudiciales de reguladores del crecimiento, se consideran diversos métodos y técnicas, tales como, por ejemplo, los siguientes:

15 i) Recubrimiento de semillas

20 a) Recubrimiento de las semillas con una formulación de polvo humectable de un compuesto de fórmula general I agitando en un recipiente hasta distribuirse uniformemente sobre la superficie de las semillas (recubrimiento en seco). En este procedimiento se usan aproximadamente de desde 1 hasta 500 g del compuesto de fórmula general I (de 4 g a 2 kg de polvo humectable) por 100 kg de semilla.

25 b) Recubrimiento de las semillas con un concentrado emulsionable de un compuesto de fórmula I según el método a) (recubrimiento en húmedo).

c) Recubrimiento mediante inmersión de las semillas durante desde 1 hasta 72 horas en una solución madre que comprende desde 100 hasta 1000 ppm de un compuesto de general fórmula I y preferiblemente secar las semillas posteriormente (recubrimiento por inmersión).

30 El recubrimiento de las semillas o el tratamiento de las plántulas germinadas son de manera natural los métodos de aplicación preferidos, porque el tratamiento con los principios activos está dirigido en su totalidad a la cosecha diana. Generalmente se usan de desde 1 hasta 1000 g de antídoto, preferiblemente desde 5 hasta 250 g de antídoto, por 100 kg de semilla, pero dependiendo de la metodología, lo que también permite la adición de otros principios activos o micronutrientes; los límites de concentración indicados pueden variar hacia arriba o hacia abajo (repetición del recubrimiento).

35 ii) Aplicación como una mezcla en tanque

40 Se usa una formulación líquida de una mezcla de antídoto y regulador del crecimiento (razón en peso del uno con respecto al otro de desde 10:1 hasta 1:100), siendo la razón de aplicación de regulador del crecimiento de desde 0,005 hasta 5,0 kg por hectárea. Tales mezclas en tanque se aplican antes o después de la siembra.

iii) Aplicación al surco de la semilla

45 Los compuestos de fórmula I se introducen en el surco de la semilla abierto, sembrado en forma de un concentrado emulsionable, polvo humectable o gránulos. Una vez que se ha cubierto el surco de la semilla, se aplica el regulador del crecimiento de la manera habitual en el procedimiento antes de la emergencia.

50 iv) Liberación controlada de principio activo

Los compuestos de fórmula I se aplican en disolución a vehículos de gránulos minerales o gránulos polimerizados (urea/formaldehído) y se secan. Si se desea, también es posible aplicar un recubrimiento que permite que se libere el principio activo en cantidades dosificadas a lo largo de un periodo de tiempo específico (gránulos recubiertos).

55 Las composiciones cosméticas comprenden desde aproximadamente el 0,05% (p/p) hasta aproximadamente el 10% (p/p) del principio activo, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% (p/p) hasta aproximadamente el 2% (p/p). Las composiciones cosméticas están en forma de una crema, un aerosol, una loción lechosa, una loción, un emplasto, una cataplasma, un champú, una barra de labios, una pasta, una pomada, una pasta, una tintura, una

pulverización, etc.

Las pomadas son emulsiones de aceite en agua, que comprenden no más del 70%, pero preferiblemente el 20 - 50% de agua o fase acuosa. La fase grasa consiste, en particular, en hidrocarburos, por ejemplo vaselina, aceite de parafina o parafinas duras, que comprenden preferiblemente compuestos de hidroxilo adecuados, tales como alcoholes grasos o ésteres de los mismos, por ejemplo alcohol cetílico o alcoholes de cera de lana, tal como cera de lana, para mejorar la capacidad de unión a agua. Los emulsionantes son sustancias lipófilas, tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitano (Span), preferiblemente oleato de sorbitano o isostearato de sorbitano. Aditivos para la fase acuosa son, por ejemplo, humectantes, tales como polialcoholes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol y polietilenglicol, o conservantes y sustancias olorosas.

Las pomadas grasas son anhidras y comprenden, como base, en particular, hidrocarburos, por ejemplo parafina, vaselina o aceite de parafina, y además grasas semisintéticas o que se producen de manera natural, por ejemplo triglicéridos de ácidos grasos de coco hidrogenados, o aceites hidrogenados, por ejemplo aceite de cacahuete o ricino hidrogenado, y además ésteres parciales de ácidos grasos de glicerol, por ejemplo mono y diestearato de glicerol. También contienen por ejemplo alcoholes grasos, emulsionantes y aditivos mencionados en relación con pomadas que aumentan la captación de agua.

Las cremas son emulsiones de aceite en agua, que comprenden más del 50% de agua. Bases oleosas usadas son, en particular, alcoholes grasos, por ejemplo miristato de isopropilo, cera de lana, cera de abejas o hidrocarburos, por ejemplo vaselina (petrolato) o aceite de parafina. Las emulsionantes son sustancias activas de superficie con propiedades predominantemente hidrófilas, tales como emulsionantes no iónicos correspondientes, por ejemplo ésteres de ácidos grasos de polialcoholes o aductos de etileno de los mismos, tales como ésteres de ácidos grasos poliglicéricos o ésteres de ácidos grasos de polietilensorbitano o ésteres de ácidos grasos poliglicéricos (Tween), y además ésteres de alcoholes grasos de polioxietileno o ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, o emulsionantes iónicos, tales como sales de metales alcalinos de sulfatos de alcoholes grasos, preferiblemente laurilsulfato de sodio, cetilsulfato de sodio o estearilsulfato de sodio, que se usan habitualmente en presencia de alcoholes grasos, por ejemplo alcohol cetilestearílico o alcohol estearílico. Aditivos para la fase acuosa son, entre otros, agentes que impiden que se sequen las cremas, por ejemplo polialcoholes, tales como glicerol, sorbitol, propilenglicol y polietilenglicoles, y además conservantes y sustancias olorosas.

Las pastas son cremas o pomadas que contienen constituyentes de polvo que absorben secreciones, tales como óxidos de metales, por ejemplo óxido de titanio u óxido de zinc, y además talco o silicatos de aluminio, que tienen la tarea de unirse a la humedad o secreciones presentes.

Las suspensiones en aceite comprenden, como componente oleoso, los aceites vegetales, sintéticos o semisintéticos, usados comúnmente para fines de inyección. Aceites que pueden mencionarse son, en particular, ésteres de ácidos grasos líquidos que contienen, como componente de ácido, un ácido graso de cadena larga que tiene 8 - 22, en particular 12 - 22, átomos de carbono, por ejemplo ácido láurico, ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido behénico o ácidos insaturados correspondientes, por ejemplo ácido oleico, ácido elaídico, ácido eúrico, ácido brasídico y ácido linoleico, si es apropiado con la adición de antioxidantes, por ejemplo vitamina E,  $\beta$ -caroteno o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno. El componente de alcohol de estos ésteres de ácidos grasos no tiene más de 6 átomos de carbono y está mono o polihidroxilado, por ejemplo alcohol mono, di o trihidroxilado, por ejemplo metanol, etanol, propanol, butanol o pentanol, o isómeros de los mismos, pero en particular glicol y glicerol. Ésteres de ácidos grasos son, por tanto, por ejemplo: oleato de etilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, "Labrafil M 2375" (trioleato de polioxietilenglicerol de Gattefosé, Paris), "Labrafil M 1944 CS" (glicéridos poliglicolados insaturados preparados mediante una alcoholisis de aceite de pepita de albaricoque y constituidos por glicéridos y ésteres de polietilenglicol; de Gattefosé, Paris), "Labrasol" (glicéridos poliglicolados saturados preparados mediante una alcoholisis de TCM y constituidos por glicéridos y ésteres de polietilenglicol; de Gattefosé, Paris), "Miglyol 812" (triglicérido de ácidos grasos saturados de longitud de cadena de C<sub>8</sub> a C<sub>12</sub> de Hüls AG, Alemania), y en particular aceites vegetales, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de almendras, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, aceite de soja y aceite de cacahuete.

Se administran espumas a partir de recipientes presurizados y son emulsiones líquidas de aceite en agua presentes en espuma de aerosol. Como gases propelentes, se usan hidrocarburos halogenados, tales como alcanos polihalogenados, por ejemplo diclorofluorometano y diclorotetrafluoroetano o, preferiblemente, hidrocarburos gaseosos no halogenados, aire, N<sub>2</sub>O o dióxido de carbono. Las fases oleosas usadas son, entre otras, las mencionadas anteriormente para pomadas, y los aditivos mencionados que se usan del mismo modo.

Las tinturas y disoluciones comprenden habitualmente una base acuosa-etanólica con la que se mezclan humectantes para reducir la evaporación, tales como polialcoholes, por ejemplo glicerol, glicoles y polietilenglicol, y sustancias relubricantes, tales como ésteres de ácidos grasos con polietilenglicoles inferiores, es decir, sustancias lipófilas solubles en la mezcla acuosa para sustituir las sustancias grasas eliminadas de la piel con el etanol y, si es necesario, otros excipientes y aditivos.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la complementación del fenotipo de tipo natural tras el tratamiento sistemático de plantas que sobreproducen CKX mediante el compuesto 12. + significa tratada, - significa no tratada.

La figura 2 documenta el efecto de la aplicación foliar del compuesto 12 sobre la potenciación de raíces de plantas de tabaco que sobreproducen CKX. - significa no tratadas, + significa tratadas.

La figura 3 muestra la comparación del efecto de la aplicación de inhibidor de CKX y citocinina sobre la complementación del fenotipo de tipo natural de plántulas de *Arabidopsis AtCKX1*. (A) *AtCKX1*, (B) *AtCKX1* cultivadas en compuesto 12 0,1  $\mu$ M, (C) *AtCKX1* cultivadas en BAP 0,1  $\mu$ M, (D) planta control con fenotipo de tipo natural.

La figura 4 ilustra el efecto del compuesto 12 sobre la floración de plantas de *Arabidopsis*.

La figura 5 muestra el efecto de 2-cloro-6-anilino purina sobre la frecuencia de unión de fibroblastos humanos. Se muestran valores con respecto al control.

La figura 6 ilustra el efecto de 2-cloro-6-anilino purina sobre la viabilidad de células tras 3 días. Se muestran valores con respecto al control.

La figura 7 muestra la curva de crecimiento de fibroblastos diploides humanos BJ tratados con 2-cloro-6-anilino purina.

La figura 8 muestra el número de células tras el tratamiento con 2-cloro-6-anilino purina tras 7 y 14 días. Se muestran valores con respecto al control.

La figura 9 muestra la fórmula general I.

**Ejemplos para llevar a cabo la invención**

El material de partida para los compuestos de fórmula I es 2,6-dicloropurina. Otro material de partida puede ser 2-amino-6-cloropurina o 2-fluoro-6-cloropurina, sintetizada a partir de 2-amino-6-cloropurina mediante reacción con ácido tetrafluorobórico en presencia de una disolución acuosa de nitrato de sodio (Beach *et al.*, 1992). Otro compuesto de partida, 2-bromo-6-cloropurina, puede prepararse a partir de 2-amino-6-cloropurina mediante diazotación con nitrito de t-butilo y bromación posterior en presencia de un donador de bromo adecuado (Kim Hak Sung *et al.*; J. Med. Chem. 46; 23; 2003; 4974-4987). Aún otro material de partida puede ser 2-metil-6-cloropurina, que puede prepararse a partir de 6-cloro-2-yodopurina mediante acoplamiento cruzado de Stille (Kim *et al.*, 2003). Aún otro material de partida puede ser 2-nitro-6-cloro-9-boc-purina, que puede prepararse a partir de 6-cloropurina (Rodenko *et al.*; J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 5957-5963).

Se prepararon fenilaminas sustituidas de partida, no disponibles comercialmente (otras obtenidas de Sigma Aldrich o Fluorochem), a partir de los aldehídos correspondientes en presencia de un catalizador adecuado. Estos, que tienen más grupos hidroxilo, también pueden prepararse mediante desmetilación de derivados de metoxilo apropiados usando HBr al 48% en atmósfera de  $N_2$ .

Se realizaron análisis elementales (C, H y N) en un analizador CHN EA1108 (Fissons Instruments). Se determinaron los puntos de fusión en un aparato B-540 de punto de fusión de BÜCHI. Se llevó a cabo cromatografía en capa fina (CCF) analítica usando placas WF<sub>254</sub> de gel de sílice 60 (Merck), fase móvil  $CHCl_3:MeOH:NH_4OH$  conc. (8:2:0,2, v/v/v). Se registraron los espectros de masas ES+ usando sonda directa en un espectrómetro de masas ZMD 2000 de Waters. El intervalo de monitorización de masas fue de 10 - 1500 uma. Se recogieron los espectros usando exploraciones cíclicas de 3,0 segundos y aplicando el mismo voltaje de cono de 25 V a una temperatura de bloque de fuente de 150°C, temperatura de desolvatación de 80°C y velocidad de flujo de gas de desolvatación de 200 l/hora. Se acopló directamente el espectrómetro de masas a un sistema de datos MassLynx. Se midieron los espectros de RMN en un espectrómetro Bruker Avance AV 300 que funcionaba a una temperatura de 300 K y una frecuencia de 300,13 MHz ( $^1H$ ) y 75,48 MHz ( $^{13}C$ ), respectivamente. Se prepararon las muestras disolviendo los compuestos en DMSO-d<sub>6</sub>. Se usó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

**Ejemplo 1****2-Cloro-6-anilino purina**

Se añadió anilina (4,66 g; 0,05 mol) a una suspensión de 2,6-dicloropurina (5,67 g; 0,03 mol) en n-propanol (60 ml) y se añadió N,N-etildisopropilamina (6,44 g; 0,05 mol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 4 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se separó mediante filtración el precipitado, se lavó con n-propanol (2x10 ml) y agua (3x10 ml) y se secó en el horno de secado a 60°C hasta peso constante. Rendimiento: 6,26 g de una sustancia

amarillenta (84,9%). CCF (cloroformo-metanol; 85:15): una única mancha; libre del material de partida, pureza mediante HPLC: 98+%

Ejemplo 2

2-Cloro-6-(3-cloroanilino)purina

Se hizo reaccionar 2,6-dicloropurina (3,78 g; 0,02 mol) con 3-cloroanilina (3,83 g; 0,03 mol) en n-butanol (40 ml) en presencia de trietilamina (7 ml; 0,05 mol) a 110°C durante 3 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 2 horas. Se separó mediante filtración el precipitado de color amarillo, se lavó con n-butanol frío (2x10 ml), agua (3x10 ml) y se secó en el horno de secado a 60°C hasta peso constante. Rendimiento: 3,69 g de un polvo cristalino de color amarillo (65,8%). Se cristalizó el producto bruto en isopropanol dando 2,85 g de sustancia pura. CCF (cloroformo-metanol; 85:15): una única mancha; libre de material de partida. Pureza mediante HPLC: 98+%

Ejemplo 3

2-Cloro-6-(3-fluoroanilino)purina

Se preparó este compuesto de una manera similar a la descrita en el ejemplo 2, mediante reacción de 2,6-dicloropurina con 3-fluoroanilina. Entonces se evaporó la mezcla de reacción en un evaporador a vacío rotatorio y se repartió el residuo entre acetato de etilo y HCl 0,5 M. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó dando un sólido de color amarillo (3,72 g). Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida. Rendimiento: 2,20 g de un polvo cristalino de color amarillo. CCF (cloroformo-metanol; 85:15): homogénea. Pureza mediante HPLC: 98+%

Ejemplo 4

2-Cloro-6-(3-hidroxianilino)purina

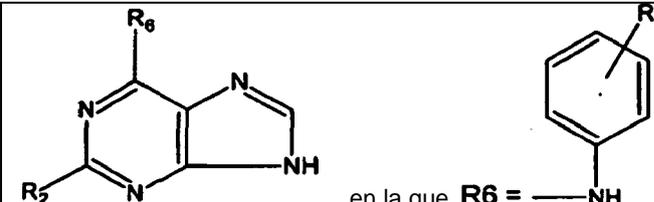
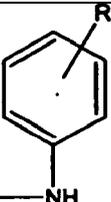
Se preparó este compuesto mediante la reacción de 2,6-dicloropurina (3,78 g; 0,02 mol), 3-aminofenol (3,27 g; 0,03 mol) y N,N-etildisopropilamina (6,44 g; 0,05 mol) en n-butanol (40 ml) a 90°C durante 4 horas. Entonces se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó. Se recogió el precipitado cristalino formado, se enjuagó con n-butanol frío (3x10 ml), agua (3x10 ml) y se secó en el horno hasta peso constante. CCF (cloroformo-metanol; 85:15): homogénea. Pureza mediante HPLC: 98+%

Ejemplo 5

2-Cloro-6-(3-metoxianilino)purina

A una suspensión de 2,6-dicloropurina (3,78 g; 0,02 mol) y m-anisidina (3,69 g; 0,03 mol) en n-pentanol (40 ml), se le añadió trietilamina (7 ml; 0,05 mol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 4 horas y entonces se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Se recogió el precipitado de color blanco, se lavó con isopropanol (2x10 ml) y agua (3x10 ml). Se purificó el producto bruto mediante la cristalización en metanol en presencia de carbón activado dando cristales de color blanco. Rendimiento: 4,36 g (77,8%). CCF (cloroformo-metanol; 85:15): una única mancha, libre de material de partida, pureza mediante HPLC: 98+%

Tabla 1: Compuestos preparados mediante los métodos de los ejemplos 1-5

		en la que R6 = 			
SUSTITUYENTE DE PURINA		ANÁLISIS DE CHN		ANÁLISIS DE EM-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] <sup>-</sup> <sub>a</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>b</sub>
1	anilino	cloro	C=53,5; H=3,3; N=28,6	244	246
2	2-cloroanilino	cloro	C=46,8; H=2,9; N=24,7	278	280
3	3-cloroanilino	cloro	C=46,8; H=2,9; N=24,6	278	280
4	4-cloroanilino	cloro	C=46,9; H=3,0; N=24,7	278	280
5	2-fluoroanilino	cloro	C=49,7; H=3,0; N=26,5	262	264
6	3-fluoroanilino	cloro	C=49,7; H=3,0; N=26,7	262	264
7	4-fluoroanilino	cloro	C=49,8; H=3,1; N=26,4	262	264

8	2-hidroxianilino	cloro	C=49,7; H=3,1; N=26,7	260	262
9	3-hidroxianilino	cloro	C=49,9; H=3,2; N=26,7	260	262
10	4-hidroxianilino	cloro	C=50,5; H=3,1; N=26,8	260	262
11	2-metoxianilino	cloro	C=51,4; H=3,8; N=25,5	274	276
12	3-metoxianilino	cloro	C=51,8; H=3,8; N=25,2	274	276
13	4-metoxianilino	cloro	C=52,0; H=3,7; N=25,2	274	276
14	2-aminoanilino	cloro	C=50,5; H=3,2; N=32,8	259	261
15	3-aminoanilino	cloro	C=50,6; H=3,2; N=32,5	259	261
16	4-aminoanilino	cloro	C=50,4; H=3,3; N=32,3	259	261
17	3,4-dimetoxianilino	cloro	C=51,3; H=3,9; N=23,3	304	306
18	2,3-dimetiloxianilino	cloro	C=51,3; H=4,0; N=23,2	304	306
19	3,4,5-trimetoxianilino	cloro	C=49,9; H=4,2; N=21,0	334	336
20	3,4-dihidroxianilino	cloro	C=47,2; H=2,8; N=25,5	276	278
21	2,3-dihidroxianilino	cloro	C=47,3; H=2,8; N=25,6	276	278
22	2-cloro-5-metoxianilino	cloro	C=46,3; H=2,9; N=22,7	308	310
13	2-cloro-3-metoxianilino	cloro	C=46,4; H=2,9; N=22,7	308	310
24	2-bromo-3-metoxianilino	cloro	C=40,8; H=2,5; N=19,4	353	355
25	2-metoxi-3-cloroanilino	cloro	C=46,4; H=3,0; N=22,6	308	310
26	3-etoxianilino	cloro	C=53,8; H=4,1; N=24,3	288	290
27	2-hidroxi-3-metilanolino	cloro	C=51,9; H=3,6; N=25,7	274	276
28	3-hidroxi-4-metilanolino	cloro	C=52,1; H=3,7; N=25,5	274	276
19	3-hidroxi-2-metilanolino	cloro	C=52,1; H=3,8; N=25,4	274	276
30	3,4-dimetilanolino	cloro	C=56,8; H=4,1; N=25,7	272	274
31	2-hidroxi-3-metoxianilino	cloro	C=49,3 H=3,6; N=24,3	290	292
32	2-hidroxi-4-metoxianilino	cloro	C=49,2; H=3,7; N=24,7	290	292
33	4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	cloro	C=48,2; H=3,6; N=21,9	320	322
34	2,3-difluoroanilino	cloro	C=46,6; H=2,0; N=25,1	280	282
35	2,4-difluoroanilino	cloro	C=46,7; H=2,0; N=25,1	280	282
36	2,3,4-trifluoroanilino	cloro	C=43,6; H=1,6; N=23,7	280	282
37	2,4,5-trifluoroanilino	cloro	C=43,8; H=1,6; N=23,6	280	282
38	2,3-dicloroanilino	cloro	C=42,3; H=2,0; N=22,0	312	314
39	2,4-dicloroanilino	cloro	C=42,0; H=2,0; N=22,2	312	314

## Ejemplo 6

## 2-Amino-6-(3-metoxianilino)purina

5 A una suspensión de 2-amino-6-cloropurina (1,69 g; 0,01 mol) y m-anisidina (1,23 g; 0,01 mol) en n-butanol (20 ml), se le añadió trietilamina (3,5 ml; 0,025 mol). Se agitó la suspensión espesa resultante a 110°C durante 3 horas. La CCF mostró la ausencia del material de partida y la presencia del producto deseado. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Se separó mediante filtración el precipitado de color blanco, se enjuagó con n-butanol (3x10 ml) y agua (3x10 ml) y se secó en el horno de secado hasta peso constante. Rendimiento: 2,19 g (85%). Se purificó el producto bruto como sal de clorhidrato mediante cristalización en cloruro de hidrógeno metanólico 2,5 M dando 2,17 g de cristales de color casi blanco (como clorhidrato). CCF (cloroformo-metanol-NH<sub>4</sub>OH; 4:1:0,05): una única mancha, libre de material de partida. Pureza mediante HPLC: 99+%.  
10

15 Tabla 2: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 6

SUSTITUYENTE DE PURINA		ANÁLISIS DE CHN		ANÁLISIS DE EM-ZMD	
R6	R2	[%]		[M-H] <sup>-</sup> <sub>a</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>b</sub>
anilino	fluoro	C=57,6; H=3,5; N=30,7	228	230	
2-cloroanilino	fluoro	C=49,7; H=2,7; N=26,8	262	264	
3-cloroanilino	fluoro	C=49,9; H=2,7; N=26,7	262	264	
4-cloroanilino	fluoro	C=50,0; H=2,7; N=26,7	262	264	
2-fluoroanilino	fluoro	C=53,4; H=2,7; N=28,5	246	248	
3-fluoroanilino	fluoro	C=53,3; H=2,7; N=28,5	246	248	

46	4-fluoroanilino	fluoro	C=53,4; H=2,8; N=28,4	246	248
47	2-hidroxianilino	fluoro	C=53,0; H=3,4; N=28,3	244	246
48	3-hidroxianilino	fluoro	C=53,4; H=3,4; N=28,2	244	246
49	4-hidroxianilino	fluoro	C=53,9; H=3,3; N=28,5	244	246
50	2-metoxianilino	fluoro	C=54,7; H=4,1; N=27,0	258	260
51	3-metoxianilino	fluoro	C=55,1; H=4,0; N=26,9	258	260
52	4-metoxianilino	fluoro	C=55,0; H=4,0; N=27,4	258	260
53	3,4-dimetoxianilino	fluoro	C=53,7; H=3,9; N=24,8	288	290
54	2,5-dimetoxianilino	fluoro	C=53,6; H=4,0; N=24,5	288	290
55	3,4-dihidroxianilino	fluoro	C=50,2; H=3,0; N=27,3	260	262
56	2,5-dihidroxianilino	fluoro	C=50,2; H=3,0; N=27,2	260	262
57	2-cloro-5-metoxianilino	fluoro	C=49,0; H=3,1; N=24,0	292	294
58	2-metoxi-3-cloroanilino	fluoro	C=48,0; H=3,0; N=24,0	292	294
59	3-etoxianilino	fluoro	C=56,8; H=4,2; N=26,0	272	274
60	2-hidroxi-5-metilnilino	fluoro	C=55,2; H=3,8; N=27,2	258	260
61	3-hidroxi-4-metilnilino	fluoro	C=55,3; H=3,8; N=27,2	258	260
62	3-hidroxi-2-metilnilino	fluoro	C=55,3; H=3,9; N=27,0	258	260
63	3,4-dimetilnilino	fluoro	C=60,4; H=4,6; N=27,4	256	258

## Ejemplo 7

## 2-Fluoro-6-(3-metoxianilino)purina

5 Se preparó este compuesto mediante la reacción de 2-fluoro-6-cloropurina (1,7 g; 0,01 mol), m-anisidina (1,23 g; 0,01 mol) y trietilamina (3,5 ml; 0,025 mol) en n-butanol (20 ml) a 90°C durante 4 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente. Se separó mediante filtración el precipitado de color blanco, se enjuagó con n-butanol (3x10 ml) y agua (3x10 ml) y se secó en el horno de secado hasta peso constante. Rendimiento: 10 5,55 g (61%) de polvo cristalino amarillento. CCF (cloroformo-metanol; 85:15): una única mancha. Pureza mediante HPLC: 99+%.

Tabla 3: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 7

SUSTITUYENTE DE PURINA		ANÁLISIS DE CHN		ANÁLISIS DE EM-ZMD	
R6	R2	[%]		[M-H] <sup>-</sup> a)	[M+H] <sup>+</sup> b)
64	anilino	amino	C=58,2; H=4,4; N=37,5	225	227
65	2-cloroanilino	amino	C=50,2; H=3,3; N=32,9	259	261
66	3-cloroanilino	amino	C=50,5; H=3,4; N=32,6	259	261
67	4-cloroanilino	amino	C=50,5; H=3,4; N=32,5	259	261
68	2-fluoroanilino	amino	C=53,8; H=3,7; N=34,7	243	245
69	3-fluoroanilino	amino	C=53,9; H=3,6; N=34,8	243	245
70	4-fluoroanilino	amino	C=54,0; H=3,7; N=34,5	243	245
71	2-hidroxianilino	amino	C=54,0; H=4,1; N=34,9	241	243
72	3-hidroxianilino	amino	C=54,1; H=4,2; N=34,8	241	243
73	4-hidroxianilino	amino	C=54,4; H=4,2; N=34,7	241	243
74	2-metoxianilino	amino	C=55,9; H=4,7; N=33,0	255	257
75	3-metoxianilino	amino	C=56,0; H=4,8; N=32,9	255	257
76	4-metoxianilino	amino	C=56,3; H=4,7; N=32,9	255	257
77	3,4-dimetilnilino	amino	C=51,0; H=5,5; N=33,4	253	255

15

## Ejemplo 8

## 2-Tioxantina

20 Se sometió a reflujo 4,5-diamino-6-hidroxi-2-tiopirimidina (PM 158, Aldrich al 95%, 100 g) con ácido fórmico al 90% (500 ml) durante 2 h con agitación mecánica. Se solidifica inicialmente la mezcla y se añaden 100 ml adicionales de ácido fórmico. Se enfrió la mezcla hasta 1°C en hielo y entonces se filtró obteniendo 4-amino-5-formamido-6-hidroxi-

2-tiopirimidina bruta que se seca a vacío durante 30 min. Se resuspendió la torta de filtro en formamida (225 ml) y se calentó hasta 175-185°C en un baño de parafina líquida con agitación manual ocasional durante 2 h. Posteriormente, se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se filtró. Se disolvió en aproximadamente 2 l de NaOH 1 M, se filtró y se secó a vacío a 95°C durante 2 h. Rendimiento 103 g (97%).

5

## Ejemplo 9

*2-Benciltio-6-purinol*

10 Se suspendieron 5,28 g de 8-tioxantina en 78,5 ml de NaOH 1 M y se diluyeron hasta aproximadamente 400 ml con agua. (El material de partida no se disuelve completamente incluso con el exceso de 2,5 veces de la base.) Entonces se añadieron 3,7 ml de cloruro de bencilo en una única porción y se agitó vigorosamente la mezcla durante aproximadamente 3 h a la temperatura ambiente, entonces se ajustó el pH a 5 con AcOH glacial produciendo un precipitado de color rojo, que se filtró, se lavó meticulosamente con agua y se secó durante la noche a vacío a 80°C dando 7,33 g de un sólido de color rosa salmón que se usó sin purificación adicional.

15

## Ejemplo 10

*2-Benciltio-6-cloropurina*

20

Se cubrió 2-benciltioxantina (27,6 g, 0,107 mmol) con POCl<sub>3</sub> (506 ml) y se añadió N,N-dietilnilina (40 ml). Se sometió a reflujo la mezcla durante 1,5 h. Se eliminó el oxiclورو en exceso a vacío dando un jarabe que se vertió sobre hielo (2 kg). Se añadió hidróxido de sodio, con enfriamiento, para disolver el sólido formado. Se acidificó la mezcla hasta pH 1 con HCl concentrado dando un sólido que se separó mediante filtración, se lavó con agua y se secó a vacío a 70°C durante varias horas. Se mezcló el producto bruto, en polvo, con una cantidad pequeña de metanol y se secó el sólido de color amarillo a vacío a 70°C durante varias horas. Rendimiento de 17,5 g (59%). Se disuelven fácilmente 2-benciltio-6-cloropurina y 2-benciltioxantina brutas en DMSO. CCF (cloroformo/MeOH; v/v): sin material de partida. Se empaqueta producto bruto purificado cromatográficamente sobre 125 g de sílice y se eluye con MeOH al 2,5%/cloroformo. Se secaron los eluatos de producto 7 a 36 dando un sólido de color amarillo y se recristalizó el producto purificado mediante cromatografía en MeOH acuoso al 50%. El rendimiento era un sólido de color blanco y se secó hasta peso constante sobre cloruro de calcio seguido por pentóxido de fósforo a 45°C durante la noche. Rendimiento: 3 g. P.f. 176-178°C, definido, sin descomposición. CCF (sílice-MeOH al 5%/cloroformo). Una única mancha principal definida (0,53). Pureza mediante HPLC: 95+%

25

30

## Ejemplo 11

*2-Benciltio-6-anilinopurina*

Se sometieron a reflujo 2-benciltio-6-cloropurina (3,9 g) y anilina (3,42 g) en n-BuOH (100 ml) en presencia de trietilamina (7,5 ml) durante 2 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se secó en un evaporador a vacío rotatorio, se enfrió con hielo y se añadieron 400 ml de agua con agitación vigorosa. Al dejar reposar durante la noche a -16°C, se formó un sólido de color marrón oscuro bruto, que se secó hasta peso constante y se purificó cromatográficamente sobre 100 g de sílice empaquetada en cloroformo. Se eluyó la columna con 500 ml de cloroformo al 100% seguido por 500 ml de MeOH al 1,25%/cloroformo y luego 1,5 l de MeOH al 2,5%/cloroformo; se recogieron fracciones de 100 ml y se secaron las fracciones 12 a 15 produciendo un sólido de color marrón claro que se recristalizó en MeOH en presencia de carbono activo. Rendimiento de 1,18 g de un sólido de color blanco, amorfo. La CCF (MeOH al 2,5%/cloroformo) sólo muestra una única mancha sin contaminantes. Pureza mediante HPLC: 98+%

40

45

## Ejemplo 12

*2-Tio-6-anilinopurina*

Se disolvió 2-benciltio-6-anilinopurina (1,18 g) en amoniaco líquido (125 ml). Se añadió sodio en porciones pequeñas hasta una coloración azul persistente. Se añadió cuidadosamente una cantidad pequeña de cloruro de amonio sólido para eliminar el Na en exceso. Se evaporó el amoniaco hasta un volumen pequeño sobre una placa caliente y se añadió éter (125 ml). Se extrajo la mayor parte del amoniaco restante con agua (2 x 65 ml). Se ajustó el pH del extracto acuoso a 5 con AcOH seguido por enfriamiento hasta por debajo de -10°C sobre hielo seco. Precipitó un sólido cremoso. Se filtró el sólido, se lavó meticulosamente con agua y se secó durante la noche sobre cloruro de calcio produciendo un polvo de color prácticamente blanco. Rendimiento de 760 mg. CCF: sin contaminantes. Pureza mediante HPLC: 95%.

60

Tabla 4: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 12

SUSTITUYENTE DE PURINA		ANÁLISIS DE CHN	ANÁLISIS DE EM-ZMD	
R6	R2	[%]	[M-H] <sup>-</sup> a)	[M+H] <sup>+</sup> b)
78	Tio	C=54,0; H=3,5; N=29,0	242	244
79	Tio	C=47,2; H=2,7; N=25,4	276	278
80	Tio	C=47,4; H=2,8; N=25,1	276	278
81	Tio	C=47,4; H=2,8; N=25,2	276	278
82	Tio	C=50,5; H=3,0; N=27,0	260	262
83	Tio	C=50,5; H=2,8; N=27,0	260	262
84	Tio	C=50,4; H=3,0; N=27,2	260	262
85	Tio	C=50,6; H=3,4; N=27,2	258	260
86	Tio	C=50,2; H=3,2; N=27,7	258	260
87	Tio	C=52,5; H=4,0; N=26,0	272	274
88	Tio	C=52,6; H=4,1; N=25,7	272	274
89	Tio	C=52,5; H=4,0; N=25,9	272	274
90	Tio	C=51,7; H=4,1; N=23,5	302	304
91	Tio	C=51,1; H=4,3; N=23,3	302	304
92	Tio	C=46,3; H=3,1; N=22,9	306	308
93	Tio	C=46,4; H=3,2; N=22,9	306	308

## Ejemplo 13

*2-Metiltioxantina*

A una disolución recién preparada de 2-tioxantina (103 g, 0,613 mol) disuelta en NaOH 2 M (613 ml) y agua (245 ml), se le añadió gota a gota sulfato de dimetilo (77 g, 58 ml), manteniendo la temperatura entre 25 y 40°C. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h y se le dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. Entonces se filtró el líquido de color rojo oscuro y se precipitó el producto con ácido acético glacial. Tras la filtración, se recristalizó el sólido en agua en ebullición (1500 ml). El producto cristalizó a -10°C, se filtró y se secó a vacío a 95°C durante 3 h, luego hasta peso constante sobre pentóxido de fósforo. Rendimiento: 48 g. Pureza mediante HPLC: 80%.

## Ejemplo 14

*2-Metiltio-6-cloropurina*

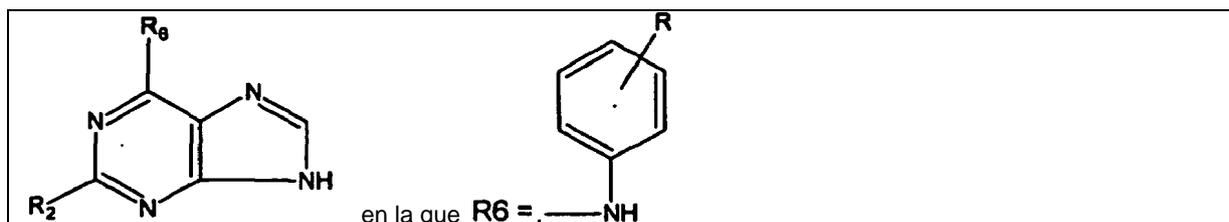
Se mezcló 2-metiltioxantina (65 g) con POCl<sub>3</sub> (975 ml) y N,N-dietilanilina (97,5 ml). Se sometió a reflujo la mezcla con agitación mecánica durante 90 min. Se eliminó el POCl<sub>3</sub> en exceso a vacío con un evaporador a vacío rotatorio a 55-60°C y se vertió el residuo sobre hielo (0°C, 1,75 kg). Se agitó la mezcla durante 10 min. para completar la hidrólisis del POCl<sub>3</sub> y se extrajo con acetato de etilo (4 x 2,5 l). Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados con agua y se secaron dando un sólido oscuro. Se recristalizó el sólido bruto con decoloración mediante carbono activo en etanol y se secó hasta peso constante sobre pentóxido de fósforo. Rendimiento 23,6 g (33%). Pureza mediante HPLC: 99%. CCF (cloroformo/metanol, 9/1) sin impurezas.

## Ejemplo 15

*2-Metiltio-6-anilinpurina*

Se sometieron a reflujo 2-metiltio-6-cloropurina (10 g, 50 mmol), anilina (7,7 g, 63 mmol) y trietilamina (35 ml, 250 mmol) en butanol (400 ml) durante 2 h. Se eliminó el butanol a vacío y se añadió agua (290 ml) al residuo enfriado. Se ajustó el pH a 8,0, se dejó la mezcla a -16°C durante la noche. La filtración y el secado sobre pentóxido de fósforo a vacío dieron 10 g de producto de color verde amarillento bruto. Se purificó cromatográficamente el producto (250 g de sílice, Fisons, cloroformo); se eluyó con cloroformo/metanol (97/3, v/v). Se secaron las fracciones apropiadas a vacío, se recristalizaron en etanol con decoloración mediante carbono activo. Tras secar hasta peso constante sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se producen 5,76 g, (46%), pureza mediante HPLC >98%. CCF: cloroformo/metanol (9/1, v/v), sin contaminantes.

Tabla 5: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 15



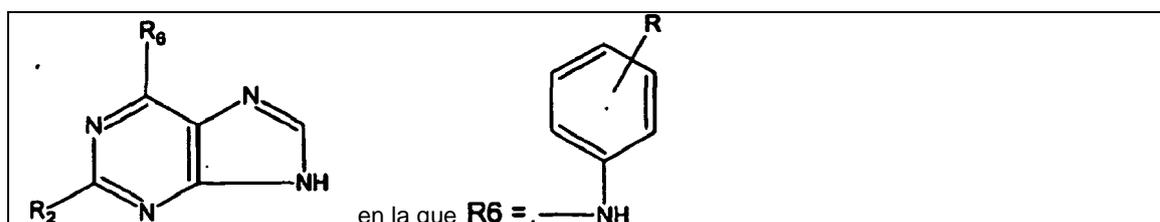
SUSTITUYENTE DE PURINA			ANÁLISIS DE CHN	ANÁLISIS DE EM-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] <sup>-</sup> a)	[M+H] <sup>+</sup> b)
94	anilino	metiltio	C=55,9; H=4,2; N=27,3	256	258
95	2-cloroanilino	metiltio	C=49,1; H=3,3; N=24,3	290	292
96	3-cloroanilino	metiltio	C=49,1; H=3,1; N=24,1	290	292
97	2-fluoroanilino	metiltio	C=52,2; H=3,7; N=25,3	274	276
98	3-fluoroanilino	metiltio	C=52,4; H=3,6; N=25,4	274	276
99	4-fluoroanilino	metiltio	C=51,9; H=3,4; N=25,6	274	276
100	2-hidroxianilino	metiltio	C=52,5; H=4,0; N=25,8	272	274
101	3-hidroxianilino	metiltio	C=52,5; H=4,0; N=25,7	272	274
102	2-metoxianilino	metiltio	C=54,3; H=4,4; N=24,6	286	288
103	3-metoxianilino	metiltio	C=54,0; H=4,4; N=24,9	286	288
104	4-metoxianilino	metiltio	C=53,8; H=4,3; N=24,7	286	288
105	3,4-dimetoxianilino	metiltio	C=52,6; H=4,7; N=22,2	316	318
106	2,5-dimetoxianilino	metiltio	C=52,9; H=4,8; N=22,2	316	318
107	2-cloro-5-metoxianilino	metiltio	C=48,8; H=4,7; N=22,0	320	322
108	2-metoxi-3-cloroanilino	metiltio	C=48,1; H=5,3; N=21,3	320	322

Ejemplo 16

## 5 2-Metil-6-(3-metoxianilino)purina

A una suspensión de 2-metil-6-cloropurina (1,69 g; 0,01 mol) y m-anisidina (1,23 g; 0,01 mol) en n-butanol (20 ml), se le añadió trietilamina (3,5 ml; 0,025 mol). Se agitó la suspensión espesa resultante a 110°C durante 3 horas, cuando la CCF mostró la ausencia de material de partida y la presencia del producto deseado. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Se separó mediante filtración el precipitado de color blanco, se enjuagó con n-butanol (2x10 ml) y agua (3x10 ml) y se secó hasta peso constante. Rendimiento: 1,92 g (75%). Se purificó el producto bruto como sal de clorhidrato mediante la cristalización en ácido clorhídrico metanólico 2,5 M. CCF (cloroformo-metanol-NH<sub>4</sub>OH; 4:1:0,05): una única mancha, libre de material de partida. Pureza mediante HPLC: 99+%.  
10  
15

Tabla 6: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 16



SUSTITUYENTE DE PURINA			ANÁLISIS DE CHN	ANÁLISIS DE EM-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] <sup>-</sup> a)	[M+H] <sup>+</sup> b)
109	anilino	metilo	C=63,8; H=4,9; N=31,2	224	226
110	2-cloroanilino	metilo	C=55,3; H=3,7; N=27,3	258	260
111	3-cloroanilino	metilo	C=55,3; H=3,8; N=27,3	258	260
112	2-fluoroanilino	metilo	C=59,0; H=4,1; N=29,0	242	244
113	3-fluoroanilino	metilo	C=59,2; H=4,2; N=29,1	242	244
114	4-fluoroanilino	metilo	C=59,1; H=4,1; N=29,0	242	244
115	2-hidroxianilino	metilo	C=60,0; H=4,6; N=29,2	240	242
116	3-hidroxianilino	metilo	C=59,9; H=4,6; N=29,1	240	242
117	2-metoxianilino	metilo	C=61,1; H=5,2; N=27,9	254	256
118	3-metoxianilino	metilo	C=60,8; H=5,1; N=27,5	254	256
119	4-metoxianilino	metilo	C=61,0; H=5,1; N=27,5	254	256
120	3,4-dimetoxianilino	metilo	C=58,5; H=5,1; N=24,9	284	286

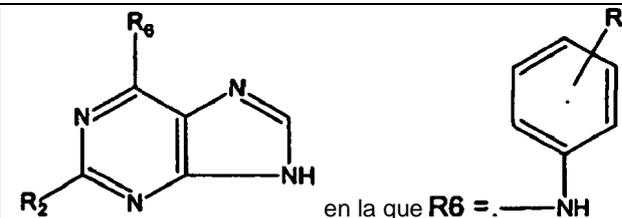
121	2,5-dimetoxianilino	metilo	C=58,8; H=5,1; N=24,6	284	286
122	2-cloro-5-metoxianilino	metilo	C=53,7; H=4,1; N=24,3	288	290
123	2-metoxi-3-cloroanilino	metilo	C=53,8; H=4,2; N=24,6	288	290

## Ejemplo 17

## 2-Bromo-6-(metoxianilino)purina

5 Se preparó 2-bromo-6-(metoxianilino)purina de una manera similar al ejemplo 5 mediante la reacción de 2-bromo-6-cloropurina y m-anisidina (razón molar 1:1) en presencia de trietilamina (2,5 eq.) en n-propanol a 100°C durante 4 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se separó mediante filtración el precipitado de color blanco resultante, se lavó con n-propanol frío y agua y se secó en desecador hasta peso constante. Rendimiento: 69%  
 10 (como bromhidrato). Se purificó el producto bruto mediante cristalización en metanol y se obtuvo la base libre mediante tratamiento de bromhidrato con amoníaco acuoso al 10%. Pureza mediante HPLC: 98%+.

Tabla 7: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 17

		<p>en la que R6 = </p>			
SUSTITUYENTE DE PURINA		ANÁLISIS DE CHN		ANÁLISIS DE EM-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] <sup>-</sup> a)	[M+H] <sup>+</sup> b)
124	Anilino	bromo	C=45,4; H=2,7; N=24,3	289	291
125	2-cloroanilino	bromo	C=40,5; H=2,1; N=21,7	323	325
126	3-cloroanilino	bromo	C=40,5; H=2,1; N=21,6	323	325
127	2-fluoroanilino	bromo	C=44,5; H=2,1; N=23,0	307	309
128	3-fluoroanilino	bromo	C=44,7; H=2,1; N=22,9	307	309
129	3-metoxianilino	bromo	C=44,6; H=3,2; N=21,6	319	321
130	2-hidroxianilino	bromo	C=42,9; H=2,6; N=23,1	305	307
131	3-hidroxianilino	bromo	C=43,2; H=4,6; N=22,9	305	307

15

## Ejemplo 18

## 2-Nitro-6-(3-metoxifenil)amino-9-boc-purina

20 A una disolución de 2-nitro-6-cloro-9-tetrahidropiraniipurina (3,00 g; 0,01 mol) en metanol (40 ml) a 0°C, se le añadió lentamente gota a gota una disolución de m-anisidina (1,48 g; 0,012 mol) y trietilamina (3,0 g = 4,2 ml; 0,03 mol) en metanol (10 ml) de modo que la temperatura de la mezcla de reacción no excede +5°C. Tras la adición de m-anisidina se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente mientras se agitaba. Se monitorizó el transcurso de la reacción mediante CCF, la ausencia de la mancha de 2-nitro-6-cloro-9-tetrahidropiraniipurina de partida muestra el final de la reacción. Se evaporó el metanol en un evaporador a vacío rotatorio y se repartió el residuo semisólido entre agua (50 ml) y acetato de etilo (50 ml). Se extrajo la fase acuosa  
 25 con más acetato de etilo (50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (20 ml), se secaron con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporaron hasta sequedad. Se cristalizó el producto bruto en éter:ciclohexano (1:1, v/v). Rendimiento: 3,1 g (80%) de un producto cristalino de color casi blanco; pureza (HPLC): 98%+.

30

## Ejemplo 19

## 2-Nitro-6-(3-metoxifenil)aminopurina

35 Se disolvió 2-nitro-6-(3-metoxifenil)amino-9-boc-purina (3,86 g; 0,01 mol) en ácido trifluoroacético al 50% (50 ml) a 0°C. Se almacenó la disolución en un refrigerador durante la noche. Se evaporaron el ácido trifluoroacético y el agua en un evaporador a vacío rotatorio y se trató el residuo cristalino con amoníaco acuoso al 5% frío (100 ml). Se recogió el producto bruto mediante filtración y se recrystalizó en metanol al 50%. Rendimiento: 1,97 g (69%) de producto cristalino amarillento; pureza (HPLC): 98%+.

40

Tabla 8: Compuestos preparados mediante el método de los ejemplos 18-19

SUSTITUYENTE DE PURINA		ANÁLISIS DE CHN	ANÁLISIS DE EM-ZMD		
	R6	R2	[%]	[M-H] <sup>-</sup> a)	[M+H] <sup>+</sup> b)
124	anilino	nitro	C=55,1; H=3,4; N=35,1	239	241
125	2-cloroanilino	nitro	C=47,9; H=2,6; N=30,9	273	275
126	3-cloroanilino	nitro	C=48,0; H=2,6; N=30,7	273	275
127	2-fluoroanilino	nitro	C=51,0; H=2,6; N=32,8	257	259
128	3-fluoroanilino	nitro	C=51,1; H=2,7; N=32,8	257	259
129	3-metoxianilino	nitro	C=53,1; H=3,6; N=31,5	269	271
130	2-hidroxianilino	nitro	C=51,5; H=3,1; N=33,0	255	257
131	3-hidroxianilino	nitro	C=51,3; H=2,9; N=32,9	255	257

## Ejemplo 20

*Inhibición de la actividad citocinina oxidasa/deshidrogenasa*

- 5 Se hicieron determinaciones de  $CI_{50}$  usando el ensayo en placa de microtitulación. Cada pocillo contenía 100  $\mu$ l de mezcla de reacción de PMS/MTT [metosulfato de fenazina/bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (concentraciones finales:  $KH_2PO_4$  0,1 M, pH 7,4, MTT 1 mM, PMS 0,2 mM) que contenía el compuesto sometido a prueba ( $3 \times 10^{-7}$  M -  $3 \times 10^{-4}$  M) y  $N^6$ -isopenteniladenina (iP) 30  $\mu$ M como sustrato. Se usaron directamente 100  $\mu$ l de
- 10 medio de crecimiento libre de células de la cepa 23344c ura- de *S. cerevisiae* que alberga el plásmido pYES2-AtCKX2 como fuente de AtCKX2. Se incubaron placas en la oscuridad durante 30 min. a 37°C y se detuvo la reacción enzimática mediante 25  $\mu$ l de ácido acético al 35%. Se midió la absorbancia a 578 nm usando el espectrofotómetro Tecan. Se restó la absorbancia de la muestra sin iP.
- 15 Se calculó el valor de  $CI_{50}$ , la concentración del compuesto que inhibe la actividad enzimática hasta el 50%, a partir de las curvas de respuesta a la dosis obtenidas. Los valores mostrados en la tabla 9 son las medias de tres duplicados y se repitió toda la prueba al menos dos veces. Compuestos más potentes que tidiazurón tienen valores de  $CI_{50}$  inferiores que tidiazurón.

20 Tabla 9: El efecto de compuestos novedosos sobre la inhibición de AtCKX2 recombinante

N.º	Compuesto sometido a prueba		$CI_{50}$ ( $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> )
	R6	R2	
	tidiazurón		30
1	anilino	cloro	22,6
3	3-cloroanilino	cloro	6,3
4	4-cloroanilino	cloro	24,1
6	3-fluoroanilino	cloro	12,2
9	3-hidroxianilino	cloro	3,5
12	3-metoxianilino	cloro	0,8
42	3-cloroanilino	fluoro	15,3
43	4-cloroanilino	fluoro	27
45	3-fluoroanilino	fluoro	22,1
48	3-hidroxianilino	fluoro	11,8
51	3-metoxianilino	fluoro	0,4
66	3-cloroanilino	amino	25,6
69	3-fluoroanilino	amino	29,4
75	3-metoxianilino	amino	24,7

80	3-cloroanilino	tio	28,4
83	3-fluoroanilino	tio	22,6
88	3-metoxianilino	tio	28,3
111	3-cloroanilino	metilo	15,7
113	3-fluoroanilino	metilo	21,8
118	3-metoxianilino	metilo	9,4
126	3-cloroanilino	nitro	5,8
128	3-fluoroanilino	nitro	11,0
129	3-metoxianilino	nitro	0,6

Ejemplo 21

Efecto *in vivo* de 2-cloro-6-(3-metoxianilino)aminopurina (compuesto 12)

5 Se trataron sistemáticamente plántulas de tabaco 35S:AtCKX1 y 35S:AtCKX2 y *Arabidopsis* 35S:AtCKX1 transgénicas que se hicieron crecer en suelo en el invernadero con 10  $\mu$ M del compuesto 12. Se pulverizaron las partes aéreas de las plántulas de tipo natural y transgénicas cada dos días durante 1 mes con una disolución acuosa del compuesto 12 que contenía agente humectante Silwet L-77 al 0,01%. La figura 1 muestra claramente que la aplicación del inhibidor de CKX 2-cloro-6-(3-metoxianilino)aminopurina (compuesto 12) liberó a las plantas de la inhibición del crecimiento provocada por la disminución del nivel de citocinina y condujo a la restauración del fenotipo de tipo natural. De manera interesante, la aplicación foliar del compuesto 12 condujo a la potenciación del sistema radicular de las plantas de tabaco transgénicas (figura 2). Para comprobar que el efecto de complementación del fenotipo no es un efecto general de citocinina aplicada exógenamente, sino un efecto específico del inhibidor de CKX, se hicieron crecer plántulas de *Arabidopsis* que sobreproducen CKX1 *in vitro* en medio MS que contenía citocinina BAP 0,1  $\mu$ M (figura 3C) o la misma concentración del compuesto 12 (figura 3B). La reversión del fenotipo WT (de tipo natural, "wild type") sólo aparecía cuando el compuesto 12 estaba presente en el medio.

El tratamiento prolongado de plantas de *Arabidopsis* WT condujo al desarrollo alterado de flores y a la inhibición de la fertilización (figura 4). Las flores habían abortado las anteras y eran estériles.

Ejemplo 22

Activación de receptores de citocinina

25 Se hicieron crecer cepas KMI001 de *Escherichia coli* que albergaban el plásmido pIN-III-AHK4 o pSTV28-AHK3 durante la noche a 25°C en medio M9 enriquecido con casaminoácidos al 0,1% hasta DO<sub>600</sub>~1. Se diluyó el precultivo 1:600 en 1 ml de medio M9 que contenía casaminoácidos al 0,1% y se añadió 1  $\mu$ l de disolución madre de o bien el compuesto sometido a prueba ( $10^{-7}$  M -  $5 \times 10^{-5}$  M) o bien control de disolvente (DMSO, etanol, metanol). Se hicieron crecer adicionalmente los cultivos a 25°C en placa de microtitulación, 200  $\mu$ l por pocillo. Se encontró que tiempos de incubación de 17 h y 28 h eran óptimos para CRE1/AHK4 y AHK3, respectivamente. Se centrifugaron los cultivos y se transfirieron alícuotas de 50  $\mu$ l del sobrenadante a la placa de microtitulación que contenía 2  $\mu$ l de galactósido de 4-metil-umbeliferilo 50 mM que se incubó posteriormente durante 1 h a 37°C. Se detuvo la reacción añadiendo 100  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M. Se midió la fluorescencia usando un aparato Fluoroscanner Ascent (Labsystems, Finlandia) a las longitudes de onda de excitación y emisión de 365 y 460 nm, respectivamente. Se determinó la DO<sub>600</sub> del cultivo restante y se calculó la actividad  $\beta$ -galactosidasa como nmol de 4-metilumbeliferona x DO<sub>600</sub><sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>.

Se calculó el valor de CE<sub>50</sub>, la concentración del compuesto que activa el receptor hasta el 50%, a partir de las curvas de respuesta a la dosis obtenidas. Los valores mostrados en la tabla 10 son las medias de tres duplicados y se repitió toda la prueba al menos dos veces. Los compuestos que activan receptores de citocinina en un grado muy inferior que trans-zeatina son útiles como inhibidores de CKX. Nuevas 6-anilino purinas sustituidas tienen una afinidad muy inferior por receptores de citocinina de *A. thaliana* que trans-zeatina.

Tabla 10: El efecto de compuestos novedosos sobre la activación de receptores de citocinina de *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 y AHK3.

N.º	Compuesto sometido a prueba		CE <sub>50</sub> ( $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> )	
	R6	R2	CRE1/AHK4	AHK3
	trans-zeatina		0,9	2,1

	bencilamino		19,7	18,2
1	anilino	cloro	s.a.	>50
3	3-cloroanilino	cloro	7,5	20
7	4-fluoroanilino	cloro	s.a.	50
8	2-hidroxianilino	cloro	>50	31,7
9	3-hidroxianilino	cloro	37,1	2,8
12	3-metoxianilino	cloro	31,3	9,5
13	4-metoxianilino	cloro	s.a.	33,1
30	3,4-dimetilanilino	cloro	33,3	>50
40	anilino	fluoro	46,2	19
42	3-cloroanilino	fluoro	21	31,6
43	4-cloroanilino	fluoro	39,8	27
45	3-fluoroanilino	fluoro	>50	42,1
46	4-fluoroanilino	fluoro	s.a.	22,5
47	2-hidroxianilino	fluoro	>50	45,8
48	3-hidroxianilino	fluoro	49,6	15
49	4-hidroxianilino	fluoro	37,1	>50
50	2-metoxianilino	fluoro	>50	17,4
51	3-metoxianilino	fluoro	43	22,7
52	4-metoxianilino	fluoro	s.a.	18,9
64	anilino	amino	s.a.	25,3
66	3-cloroanilino	amino	s.a.	43
67	4-cloroanilino	amino	s.a.	8,1
69	3-fluoroanilino	amino	s.a.	>50
70	4-fluoroanilino	amino	s.a.	19,5
71	2-hidroxianilino	amino	>50	>50
72	3-hidroxianilino	amino	>50	7,7
73	4-hidroxianilino	amino	>50	>50
74	2-metoxianilino	amino	s.a.	29
75	3-metoxianilino	amino	s.a.	20,4
76	4-metoxianilino	amino	s.a.	26,3
80	3-cloroanilino	tio	s.a.	42
81	4-cloroanilino	tio	s.a.	10,2
83	3-fluoroanilino	tio	s.a.	>50
88	3-metoxianilino	tio	s.a.	31,7
96	3-cloroanilino	metiltio	41	29
98	3-fluoroanilino	metiltio	49	32
111	3-cloroanilino	metilo	s.a.	>50
113	3-fluoroanilino	metilo	s.a.	s.a.
118	3-metoxianilino	metilo	s.a.	>50

s.a. significa sin activación

#### Ejemplo 23

##### *Efecto estimulador de compuestos novedosos sobre la división de células vegetales*

5 Se sometió a prueba el efecto estimulador de los derivados recientemente preparados en la prueba biológica de callos usando callos de tabaco dependientes de citocinina. Se mantuvo callo de tabaco dependiente de citocinina de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 a 25°C en la oscuridad en medio de Murashige-Skoog modificado, que  
10 contenía por 1 litro: 4 µmol de ácido nicotínico, 2,4 µmol de clorhidrato de piridoxina, 1,2 µmol de tiamina, 26,6 µmol de glicina, 1,37 µmol de glutamina, 1,8 µmol de mio-inositol, 30 g de sacarosa, 8 g de agar, 5,37 µmol de NAA y 0,5 µmol de 6-bencilaminopurina. Se llevó a cabo el subcultivo cada tres semanas. Catorce días antes del bioensayo, se transfirió el tejido calloso al medio sin 6-bencilaminopurina. Se determinó la actividad biológica a partir del aumento del peso de callo nuevo tras cuatro semanas de cultivo. Se prepararon cinco duplicados para cada concentración del compuesto sometido a prueba y se repitió toda la prueba dos veces. Se usó cinetina, que se sabe  
15 que es una citocinina altamente activa, en cada experimento como control. Se disolvieron los compuestos que iban a someterse a prueba en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó la disolución hasta 10<sup>-3</sup> M con agua destilada. Se diluyó adicionalmente esta solución madre con el medio respectivo usado para la prueba biológica hasta una concentración que oscilaba entre 10<sup>-8</sup> M y 10<sup>-4</sup> M. La concentración final de DMSO no excedió del 0,2% y por tanto no afectó a la actividad biológica en el sistema de ensayo usado.

20 A partir de los datos obtenidos, se seleccionó la concentración con la actividad más alta para cada compuesto sometido a prueba. Se calculó la actividad relativa del compuesto a esta concentración (tabla 11). Se presupone que la actividad obtenida para 10<sup>-5</sup> M de la sustancia de control cinetina (K) es el 100%.

Los resultados en la tabla 11 muestran que la sustitución en las posiciones 2 y 6 del anillo de purina condujo a un aumento de la actividad de citocinina en el bioensayo de callos en comparación con la citocinina clásica cinetina (K).

5 Tabla 11: El efecto de compuestos novedosos sobre el crecimiento de callo de tabaco dependiente de citocinina de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38

N.º	Compuesto sometido a prueba		concentración con la actividad más alta (mol.l <sup>-1</sup> )	actividad (%) [10 <sup>-5</sup> mol.l <sup>-1</sup> K = 100%]
	R6	R2		
C	furfurilamino	H	10 <sup>-5</sup>	100
3	3-cloroanilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	110 (±6)
4	4-cloroanilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	102 (±8)
6	3-fluoroanilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	119,7 (±8)
7	4-fluoroanilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	112 (±12)
9	3-hidroxianilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	116,2 (± 13)
11	2-metoxianilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	109 (± 5)
12	3-metoxianilino	Cloro	10 <sup>-5</sup>	122 (± 3)
40	anilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	108,1(±4)
42	3-cloroanilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	121 (±8)
43	4-cloroanilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	130 (±6)
45	3-fluoroanilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	127,9 (±8)
46	4-fluoroanilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	110,7 (± 5)
48	3-hidroxianilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	104,2 (± 3)
49	4-hidroxianilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	106 (± 3)
50	2-metoxianilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	117,6 (± 9)
51	3-metoxianilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	120,5 (± 13)
52	4-metoxianilino	Fluoro	10 <sup>-5</sup>	105 (±7)
80	3-cloroanilino	Tio	10 <sup>-5</sup>	126 (±5)
81	4-cloroanilino	Tio	10 <sup>-5</sup>	115,7 (±4)
83	3-fluoroanilino	Tio	10 <sup>-5</sup>	102,5 (±10)
88	3-metoxianilino	Tio	10 <sup>-5</sup>	103,4 (± 12)
96	3-cloroanilino	Metiltio	10 <sup>-5</sup>	121,2 (± 18)
98	3-fluoroanilino	Metiltio	10 <sup>-5</sup>	130,3 (± 17)
103	3-metoxianilino	Metiltio	10 <sup>-5</sup>	142,8 (± 21)
111	3-cloroanilino	Metilo	10 <sup>-5</sup>	128,3 (±6)
113	3-fluoroanilino	Metilo	10 <sup>-5</sup>	125,3 (±7)
118	3-metoxianilino	Metilo	10 <sup>-5</sup>	105,7 (±5)

Ejemplo 24

10 Pruebas de citocininas novedosas en Bioensayo de *Amaranthus*

Se realizó el bioensayo de *Amaranthus* convencional con las siguientes modificaciones. Se esterilizaron en la superficie las semillas de *Amaranthus caudatus* var. *atropurpurea* en N-clorobencenosulfonamida al 10% (p/v) durante 10 min. y se lavaron 5 veces con agua desionizada. Se colocaron en placas de Petri de 15 cm que contenían tejidos de papel saturados con agua desionizada. Tras 72 h de cultivo a 25°C en la oscuridad, se cortaron las raíces de las plántulas. Los explantes, que consistían en dos cotiledones e hipocotilos, se colocaron en placas de Petri de 5 cm sobre dos capas de papel de filtración empapado con 1 ml del medio de incubación que contenía 10 µmol de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8, 5 µmol de tirosina y el compuesto que va a someterse a prueba. Había 20 explantes por placa. Se llevó a cabo el procedimiento bajo luz segura de color verde en una sala oscura. Tras 48 h de incubación a 25°C en la oscuridad, se extrajo betacianina congelando los explantes en 4 ml de ácido acético 3,33 µM. Se determinó la concentración de betacianina a partir de las absorbancias a 537 nm y 620 nm tal como sigue: ΔA = A<sub>537nm</sub> - A<sub>620nm</sub>. Se representaron gráficamente los valores de ΔA frente a la concentración sometida a

prueba, como medias de cinco duplicados y se repitió toda la prueba al menos dos veces. Se usó cinetina, que se sabe que es una citocinina altamente activa, en cada experimento como control. Se disolvieron los compuestos que iban a someterse a prueba en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó la disolución hasta  $10^{-3}$  M con agua destilada. Se diluyó adicionalmente esta solución madre con el medio respectivo usado para la prueba biológica hasta una concentración que oscilaba entre  $10^{-8}$  M y  $10^{-4}$  M. La concentración final de DMSO no excedió del 0,2% y por tanto no afectó a la actividad biológica en el sistema de ensayo usado.

A partir de los datos obtenidos, se seleccionó la concentración con la actividad más alta para cada compuesto sometido a prueba. Se calculó la actividad relativa del compuesto a esta concentración (tabla 12). Se presupone que la actividad obtenida para cinetina (K)  $10^{-5}$  M es el 100%.

Los resultados muestran que la sustitución en las posiciones 2 y 6 del esqueleto de purina condujo a un aumento de contenido en betacianina (color púrpura) en explantes de cotiledón/hipocotilo de *Amaranthus caudatus* en comparación con cinetina (K).

Tabla 12: El efecto de compuestos novedosos sobre el contenido en betacianina en explantes de cotiledón/hipocotilo de *Amaranthus caudatus*

N.º	Compuesto sometido a prueba		Concentración con la actividad más alta ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Actividad (%) [ $10^{-5}\text{mol.l}^{-1}$ K= 100%]
	R6	R2		
C	furfurilamino	H	$10^{-5}$	100
3	3-cloroanilino	cloro	$10^{-5}$	166 ( $\pm 4$ )
4	4-cloroanilino	cloro	$10^{-5}$	107 ( $\pm 8$ )
6	3-fluoroanilino	cloro	$10^{-5}$	120 ( $\pm 15$ )
7	4-fluoroanilino	cloro	$10^{-5}$	104 ( $\pm 4$ )
9	3-hidroxianilino	cloro	$10^{-5}$	115,4 ( $\pm 18$ )
11	2-metoxianilino	cloro	$10^{-5}$	110,3 ( $\pm 15$ )
12	3-metoxianilino	cloro	$10^{-5}$	132,3 ( $\pm 14$ )
40	anilino	fluoro	$10^{-5}$	107 ( $\pm 5$ )
42	3-cloroanilino	fluoro	$10^{-5}$	121 ( $\pm 6$ )
43	4-cloroanilino	fluoro	$10^{-5}$	102,6 ( $\pm 1$ )
45	3-fluoroanilino	fluoro	$10^{-5}$	105,1 ( $\pm 13$ )
46	4-fluoroanilino	fluoro	$10^{-5}$	109 ( $\pm 8$ )
48	3-hidroxianilino	fluoro	$10^{-5}$	100,3 ( $\pm 10$ )
50	2-metoxianilino	fluoro	$10^{-5}$	105,2 ( $\pm 9$ )
51	3-metoxianilino	fluoro	$10^{-5}$	117,2 ( $\pm 11$ )
64	anilino	amino	$10^{-5}$	125,2 ( $\pm 14$ )
66	3-cloroanilino	amino	$10^{-5}$	122 ( $\pm 5$ )
67	4-cloroanilino	amino	$10^{-5}$	141,7 ( $\pm 6$ )
69	3-fluoroanilino	amino	$10^{-5}$	113,2 ( $\pm 10$ )
70	4-fluoroanilino	amino	$10^{-5}$	136 ( $\pm 7$ )
72	3-hidroxianilino	amino	$10^{-5}$	119,8 ( $\pm 15$ )
74	2-metoxianilino	amino	$10^{-5}$	108 ( $\pm 13$ )
75	3-metoxianilino	amino	$10^{-5}$	123,6 ( $\pm 19$ )
80	3-cloroanilino	tio	$10^{-5}$	106 ( $\pm 4$ )
81	4-cloroanilino	tio	$10^{-5}$	122,9 ( $\pm 5$ )
83	3-fluoroanilino	tio	$10^{-5}$	133,5 ( $\pm 11$ )
88	3-metoxianilino	tio	$10^{-5}$	113,4 ( $\pm 15$ )
96	3-cloroanilino	metiltio	$10^{-5}$	145,8 ( $\pm 23$ )
98	3-fluoroanilino	metiltio	$10^{-5}$	142,5 ( $\pm 15$ )
103	3-metoxianilino	metiltio	$10^{-5}$	156,4 ( $\pm 18$ )
11	3-cloroanilino	metilo	$10^{-5}$	121,7 ( $\pm 5$ )
113	3-fluoroanilino	metilo	$10^{-5}$	120,2 ( $\pm 6$ )
118	3-metoxianilino	metilo	$10^{-5}$	144,2 ( $\pm 8$ )

Ejemplo 25

Actividad citotóxica in vitro de compuestos novedosos

5 La ausencia de efectos tóxicos frente a líneas celulares de mamíferos (especialmente seres humanos) en un amplio intervalo de concentración es uno de los requisitos de los compuestos previstos para su uso en agricultura y medicina. Debido a que los compuestos tóxicos influyen de manera negativa en procesos metabólicos en las células, muchos ensayos de citotoxicidad convencionales se basan en la medición de la tasa de metabolización de diversos sustratos artificiales. Entonces se cuantifica el producto resultante por ejemplo por medio de espectrometría. Los ensayos pueden modificarse fácilmente para su uso en placas de 96 pocillos. Para evaluación del efecto citotóxico de compuestos de esta invención, se usó un ensayo de microtitulación basándose en la cuantificación de la metabolización de calceína AM. El ensayo se usa ampliamente en programas de selección de fármacos y en pruebas de quimiosensibilidad. En células vivas, se hidroliza enzimáticamente calceína AM y la acumulación de calceína resultante se manifiesta mediante fluorescencia de color verde.

15 Se usaron las siguientes líneas celulares humanas para la selección rutinaria de los compuestos: Línea celular de leucemia linfoblástica T CEM, línea celular de leucemia promielocítica HL-60, línea celular de leucemia eritroide K-562, línea celular de carcinoma de mama MCF-7, línea celular de osteosarcoma HOS y línea celular de melanoma G-361. Se usaron también líneas celulares de ratón B16-F10 (melanoma) y NIH-3T3 (fibroblastos). Se mantuvieron las células en matraces de cultivo tisular de plástico de 80 cm<sup>2</sup> de Nunc/Corning y se cultivaron en medio de cultivo celular (DMEM con glucosa 5 g/l, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, suero de ternero fetal al 10% y bicarbonato de sodio).

25 Se prepararon las suspensiones celulares y se diluyeron según el tipo de célula particular y la densidad celular objetivo esperada (2.500-30.000 células por pocillo basándose en características de crecimiento celular) y se pipetearon (80 µl) en placas de 96 pocillos. Se permitió a los inoculados un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> para la estabilización. Se añadió compuesto sometido a prueba en un volumen total de 20 µl de agua a tiempo cero. Habitualmente, se evaluó el compuesto de prueba a 6 diluciones de 3 veces. En pruebas rutinarias, la concentración más alta sometida a prueba fue de 166,6 µM. Se sometieron a prueba todas las concentraciones de fármaco por triplicado. Las incubaciones de células con los compuestos de prueba duraron durante 72 horas a 37°C, en una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub> y un 100% de humedad. Al final del periodo de incubación, se añadió calceína AM en PBS hasta una concentración final de 1 µg/ml. Tras 1 hora de incubación, se midió la fluorescencia (FD) con el aparato Labsystem FIA Reader Fluoroscan Ascent (RU). Se estimó la inhibición del crecimiento (GI, "growth inhibition") usando la siguiente ecuación:  $GI = (FD_{\text{pocillos expuestos a fármaco media}} - FD_{\text{blanco media}}) / (FD_{\text{pocillos control media}} - FD_{\text{blanco media}}) \times 100\%$ . Se calculó el valor de GI<sub>50</sub>, la concentración de fármaco que provoca una reducción del 50% de la conversión de calceína AM, a partir de las curvas de respuesta a la dosis obtenidas.

40 Se sometió a prueba la citotoxicidad de los compuestos novedosos sobre un panel de líneas celulares de mamíferos de diferente origen histogénético y de especie (tabla 14). Se muestra en el presente documento que los compuestos de esta invención no tienen un efecto tóxico significativo sobre las líneas celulares de mamíferos usadas. De manera interesante, las "citocininas clásicas" representadas por purinas sustituidas en la posición 6 cinetina, isopenteniladenina, benciloadenina, meta-topolina y orto-topolina (que se conocen en la técnica anterior) son en varios casos más tóxicas que los compuestos novedosos de esta invención. Por tanto, los compuestos novedosos pueden ser más adecuados para aplicaciones agrícolas y medicinales que las "citocininas clásicas".

Tabla 14: Citotoxicidad de compuestos novedosos para diferentes líneas celulares de mamíferos

Línea celular sometida a prueba / GI <sub>50</sub> (µmol/l)								
Compuesto	HOS	K-562	MCF7	B16-F0	NIH-3T3	G-361	CEM	HL60
Cinetina	>166,7	164,1	>166,7		>166,7		155,1	
Isopenteniladenina	>166,7	146,9	>166,7		>166,7		92,2	>166,7
Benciladenina	>166,7	138,9	166,1		>166,7		>166,7	>166,7
trans-zeatina			>166,7		>166,7		>166,7	>166,7
meta-topolina	>166,7	128,4	>166,7	90,6	>166,7	>166,7	90,1	79,2
orto-topolina	>166,7	>166,7	>166,7	150	>166,7	103,4	69,2	78
adenina		>166,7	>166,7		>166,7		>166,7	>166,7
1	>166,7		>166,7		>166,7		>166,7	
3	>166,7		>166,7		>166,7		>166,7	
4	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7		>166,7	
6	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7			
9	>166,7		>166,7		>166,7			
12	>166,7		>166,7		>166,7			
40	>166,7		>166,7		>166,7		>166,7	
42	>166,7		>166,7		>166,7		>166,7	

48	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		
51	>166,7		>166,7		>166,7		
64	>166,7		>166,7		>166,7		
66	>166,7		>166,7		>166,7		
72	>166,7		>166,7		>166,7		
73	>166,7		>166,7		>166,7		
78	>166,7		>166,7		>166,7		
83	>166,7		>166,7		>166,7		
87	>166,7		>166,7		>166,7		
94	>166,7		>166,7		>166,7		
101	>166,7		>166,7		>166,7		
103	>166,7		>166,7		>166,7		
116	>166,7		>166,7		>166,7		
131	>166,7		>166,7		>166,7		

## Ejemplo 26

*Actividad antienviejimiento en fibroblastos humanos*

5 En este ejemplo, se estudiaron los efectos de los compuestos de esta invención sobre la actividad de un biomarcador de senescencia,  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia. Se usaron fibroblastos diploides humanos HCA de diversos pases para este fin. Se añadieron los compuestos sometidos a prueba al medio en cada pase. Tras el periodo de incubación, se lavaron células con PBS y se fijaron con formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% en PBS. Tras otro lavado con PBS, se incubaron con la disolución de tinción que comprendía ferricianuro de potasio (5 mM), ferrocianuro de potasio (5 mM),  $MgCl_2$  (2 mM), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) (1 mg/ml), en tampón cítrico/fosfato (pH 6,0) a 37°C (sin  $CO_2$ ) durante al menos 1 hora. Tras el periodo de incubación, se contaron los números de células que expresaban  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (células de color azul) usando microscopio óptico.

15 Tabla 15: El efecto de los nuevos compuestos sobre el número de células senescentes en cultivo celular de fibroblastos humanos

Compuesto	Células senescentes (%)		
	25 pases de HCA	50 pases de HCA	80 pases de HCA
Cinetina	3	5	38
2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina	4	6	22
2-cloro-6-(3-metoxianilino)purina	5	5	24
2-cloro-6-(4-metoxianilino)purina	4	3	26
2-cloro-6-(3-metoxi-4-hidroxianilino)purina	4	6	25
2-amino-(4-hidroanilino)purina	3	4	21
2-metiltio-6-(4-hidroxianilino)purina	4	6	34
2-fluoro-6-(4-hidroxianilino)purina	3	4	18
2-fluoro-6-(3-metoxianilino)purina	3	5	29
2-amino-6-(3-metoxianilino)purina	4	4	22
2-cloro-6-(3-metoxi-4-hidroxianilino)purina	4	6	31
2-amino-(4-hidroxianilino)purina	4	4	18

20 Los derivados de 6-anilino purina sustituidos fueron generalmente más eficaces que la cinetina en la conservación de números inferiores de células senescentes tras 80 pases.

## Ejemplo 27

*Actividad antiinflamatoria de nuevas 6-anilino purinas sustituidas*

25 Se determinó la actividad antiinflamatoria de varios de los derivados de 6-anilino purina sustituidos de esta invención; también se evaluó cinetina como control. Se cultivó glioma C6 de rata (n.º de la ATCC CCL107) en monocapa en medio químicamente definido libre de suero que contenía medio esencial mínimo/F10 de Ham (1:1 v/v), L-glutamina 2 mM, vitaminas de medio esencial mínimo al 1% (v/v) (100x), aminoácidos no esenciales de medio esencial mínimo al 1% (v/v) (100x), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y selenito de sodio 30 nM. Se realizó la incubación a 37°C en una atmósfera humidificada al 100%. Se realizaron los ensayos en la fase de crecimiento logarítmico a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Se indujo la síntesis de AMPc intracelular mediante la adición de (-)-isoproterenol 5 mM; se añadieron diversas cantidades de compuestos de prueba al mismo tiempo que el (-)-isoproterenol. Tras 30 min. de incubación, se determinó la cantidad celular de AMPc usando ELISA (kit de inmunoensayo enzimático de AMPc de Amersham). Se determinaron los valores de  $I_{50}$  a partir de la curva de respuesta a la dosis por duplicado. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	Actividad antiinflamatoria	
	I <sub>50</sub> (μM)	Efecto
Cinetina (6-furfurilaminopurina)	0	No activa
2-cloro-6-(2-hidroxianilino)purina	25	Inhibición
2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina	13	Inhibición
2-cloro-6-(3-metoxibencilamino)purina	7	Inhibición
2-cloro-6-(3,5-dimetoxibencilamino)purina	11	Inhibición

Los derivados de 6-anilino purina sustituidos demostraron actividad antiinflamatoria. La cinetina era inactiva en el protocolo de prueba.

5

## Ejemplo 28

*Efecto de los compuestos novedosos sobre la adherencia de fibroblastos*

La prueba de frecuencia de unión es uno de los métodos para la evaluación de la toxicidad aguda de compuestos frente a células adherentes. Se añade el compuesto sometido a prueba en el medio con un número definido de células tripsinizadas y tras un determinado tiempo se cuenta el número de células unidas. Se usaron fibroblastos diploides humanos BJ (pase 19) y medio de cultivo convencional (DMEM con glucosa 5 g/l, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μg/ml y suero de ternero fetal al 10%). Se contaron las células unidas tras 6 horas. Se realizó el experimento en tres repeticiones. Los resultados se muestran en la figura 5. El porcentaje de unión no se vio influido significativamente por 2-cloro-6-anilino purina en un intervalo de concentración de 0-25 μM. Por tanto, el compuesto no muestra toxicidad aguda frente a fibroblastos.

15

## Ejemplo 29

20

*Evaluación de la viabilidad de fibroblasto diploide humano in vitro mediante ensayo de MTT*

MTT es un ensayo calorimétrico convencional para la medición de la proliferación y supervivencia de las células. Se reduce MTT de color amarillo para dar formazán de color violeta en células metabólicamente activas. Se mide la cantidad del formazán resultante mediante espectrofotometría. Se sembraron fibroblastos diploides humanos BJ (pase 19) en una placa de 96 pocillos (5.000 células por pocillo). Tras 6 horas, se eliminó el medio de cultivo (DMEM que contenía glucosa 5 g/l, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μg/ml y suero de ternero fetal al 10%) y se añadió medio nuevo que contenía un compuesto de prueba en concentraciones de 0-25 μM. Se sometió a prueba cada concentración en 5 duplicados. Se añadió MTT a las células tras 72 horas a una concentración final de 0,5 mg/ml. El tiempo de incubación fue de 3 horas. La figura 6 muestra los resultados para 2-cloro-6-anilino purina. A partir de los resultados se deduce que este compuesto no es tóxico para fibroblastos diploides humanos.

25

30

## Ejemplo 30

35

*Toxicidad in vitro en fibroblastos diploides humanos mediante evaluación de la curva de crecimiento*

Se sembraron fibroblastos diploides humanos SNF25 (pase 27) en placas de 24 pocillos (10.000 células/pocillo). Se eliminó el medio de cultivo (DMEM que contenía glucosa 5 g/l, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μg/ml y suero de ternero fetal al 10%) y se reemplazó con el medio de cultivo que contenía el compuesto sometido a prueba en un intervalo de concentración de 0 - 12,5 μM. Se sometió a prueba cada concentración por triplicado. Se contó el número de células durante los siguientes 12 días. La figura 7 muestra que el compuesto sometido a prueba 2-cloro-6-anilino purina no era tóxico frente a fibroblastos diploides humanos en el intervalo de concentración y el intervalo de tiempo sometidos a prueba.

45

## Ejemplo 31

*Efecto sobre fibroblastos diploides humanos senescentes*

Se sembraron fibroblastos diploides humanos senescentes SNF25 (pase 53) en placa de 24 pocillos (10.000 células/pocillo). Se eliminó el medio de cultivo (DMEM que contenía glucosa 5 g/l, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μg/ml y suero de ternero fetal al 10%) y sustituyó con el medio de cultivo que contenía compuesto de prueba en un intervalo de concentración de 0 - 12,5 μM. Se sometió a prueba cada concentración por triplicado. Se determinaron los números de células en los días 7 y 14. La figura 8 muestra que 2-cloro-6-anilino purina en las concentraciones sometidas a prueba no ejerce ningún efecto negativo significativo sobre la supervivencia de las células en el intervalo de tiempo sometido a prueba.

55

Ejemplo 32

Prueba de ames

5 Se usó la prueba de Ames con el fin de excluir un efecto mutagénico de 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina. Se usaron auxotrofos de histidina de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 como cepas indicadoras y se llevó a cabo la prueba según protocolos convencionales (Ames *et al.*, Mutation Research, 31, 347-364 (1975); Maron *et al.*, Mutation Research, 113, 173-215 (1983)). Las concentraciones sometidas a pruebas fueron las siguientes: 2,5, 5,0, 10 15, 50, 500, 1500, 5000 µg / placa. El compuesto no era mutagénico incluso en las concentraciones que excedían su límite de solubilidad en el medio de cultivo.

Ejemplo 33

15 Preparaciones

Las preparaciones reguladoras del crecimiento contienen habitualmente desde el 0,1 hasta el 99% (p/p), preferiblemente del 0,1 al 95% (p/p), de mezcla de principios activos que comprende un compuesto de fórmula I, desde el 1 hasta el 99,9% (p/p) de un adyuvante sólido o líquido y desde el 0,1 hasta el 25% (p/p) de un tensioactivo. Aunque se formulan productos comerciales habitualmente como concentrados, el usuario final empleará normalmente formulaciones diluidas. Las preparaciones también pueden comprender componentes adicionales, tales como estabilizadores, por ejemplo aceites vegetales o aceites vegetales epoxidados (aceite de coco epoxidado 0;1, aceite de colza o aceite de soja), antiespumantes, por ejemplo aceite de silicona, conservantes, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, agentes de adhesividad, y también fertilizantes u otros principios activos. 20 Las preparaciones preferidas tienen especialmente las siguientes composiciones: (% = por ciento en peso)

<u>A1. Concentrados emulsionables</u>	a)	b)	c)	d)
mezcla de principios activos	5%	10%	25%	50%
dodecibencenosulfonato de calcio	6%	8%	6%	8%
poliglicol éter de aceite de ricino (36 mol de óxido de etileno)	4%		4%	4%
poliglicol éter de octilfenol (7-8 mol de óxido de etileno)	-	4%	-	2%
ciclohexanona	-		10%	20%
mezcla de hidrocarburos arom. C <sub>9</sub> -C <sub>12</sub>	85%	78%	55%	16%

Pueden obtenerse emulsiones de cualquier concentración deseada a partir de tales concentrados mediante dilución con agua.

30

<u>A2. disoluciones</u>	a)	b)	c)	d)
mezcla de principios activos	5%	10%	50%	90%
1-metoxi-3-(3-metoxi-propoxi)-propano	-	20%	20%	-
polietilenglicol PM 400	20%	10%	-	-
N-metil-2-pirrolidona	-	-	30%	10%
mezcla de hidrocarburos arom. C <sub>9</sub> -C <sub>12</sub>	75%	60%	-	-

Las disoluciones son adecuadas para su uso en forma de microgotas.

<u>A3. Polvos humectables</u>	a)	b)	c)	d)
mezcla de principios activos	5%	25%	50%	80%
lignosulfonato de sodio	4%	-	3%	-
laurilsulfato de sodio	2%	3%	-	4%
diisobutilnaftaleno-sulfonato de sodio	-	6%	5%	6%
poliglicol éter de octilfenol (7-8 mol de óxido de etileno)	-	1%	2%	-
ácido salicílico altamente dispersado	1%	3%	5%	10%
caolín	88%	62%	35%	-

35 Se mezcla meticulosamente el principio activo con los adyuvantes y se tritura meticulosamente la mezcla en un molino adecuado, proporcionando polvos humectables que pueden diluirse con agua para dar suspensiones de cualquier concentración deseada.

<u>A4. Gránulos recubiertos</u>	a)	b)	c)
mezcla de principios activos	0,1%	5%	15%
ácido salicílico altamente dispersado	0,9%	2%	2%
vehículo inorgánico (0,1 - 1 mm)	99,0%	93%	83%
por ejemplo CaCO <sub>3</sub> o SiO <sub>2</sub>			

40 Se disuelve el principio activo en cloruro de metileno y se aplicó al vehículo mediante pulverización, y entonces se

elimina el disolvente mediante evaporación a vacío.

<u>A5. Gránulos recubiertos</u>	a)	b)	c)
mezcla de principios activos	0,1%	5%	15%
polietilenglicol PM 200	1,0%	2%	3%
ácido salicílico altamente dispersado	0,9	% 1	% 2
vehículo inorgánico (AE 0,1 - 1 mm) por ejemplo CaCO <sub>3</sub> o SiO <sub>2</sub>	98,0%	92%	80%

5 Se aplica uniformemente el principio activo finamente triturado al vehículo humedecido con polietilenglicol. Se obtienen gránulos recubiertos no pulverulentos de esta manera.

<u>A6. Gránulos de prensa extrusora</u>	a)	b)	c)	d)
mezcla de principios activos	0,1%	3%	5%	15%
lignosulfonato de sodio	1,5%	2%	3%	4%
carboximetilcelulosa	1,4%	2%	2%	2%
caolín	97,0%	93%	90%	79%

10 Se mezcla el principio activo y se tritura con los adyuvantes, y se humedece la mezcla con agua. Se extruye la mezcla y entonces se seca en una corriente de aire.

<u>A7. Polvos finos</u>	a)	b)	c)
mezcla de principios activos	0,1%	1%	5%
talco	39,9%	49%	35%
caolín	60,0%	50%	60%

Se obtienen polvos finos listos para usar mezclando el principio activo con los vehículos y triturando la mezcla en un molino adecuado.

<u>A8. Concentrados en suspensión</u>	a)	b)	c)	d)
mezcla de principios activos	3%	10%	25%	50%
etilenglicol	5%	5%	5%	5%
poliglicol éter de nonilfenol (15 mol de óxido de etileno)	-	1%	2%	-
lignosulfonato de sodio	3%	3%	4%	5%
carboximetilcelulosa	1%	1%	1%	1%
disolución acuosa de formaldehído al 37%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
emulsión de aceite de silicona	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%
agua	87%	79%	62%	38%

15 Se mezcla íntimamente el principio activo finamente triturado con los adyuvantes, dando un concentrado en suspensión a partir del que pueden obtenerse suspensiones de cualquier concentración deseada mediante dilución con agua.

20 Ejemplo 34

*Formulaciones en gel*

25 Los nombres de los componentes de la formulación se facilitan según la terminología de las autoridades de registro y su cantidad está en gramos por 100 g.

Gel		/100 g
Compuesto activo 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina	(2Cl <sub>4</sub> OHAP)	1,0 g
butilhidroxitolueno	(Nipanox BHT)	0,2 g
butilparabeno	(NipabutyI)	0,2 g
monoetil éter de dietilenglicol	(Transcutol P)	10,0 g
sílice anhídrica coloidal	(Zeophann 177)	5,0 g
laurato de propilenglicol	(Lauroglycol FCC)	83,6 g

30 Puede modificarse adicionalmente la consistencia del gel mediante la adición de sílice anhídrica coloidal. Se espera de nuevo que el sistema de Transcutol P/Lauroglycol FCC transdérmico aumentará la eficacia del compuesto activo. La sílice anhídrica coloidal ralentizará probablemente la penetración de la sustancia activa.

Ejemplo 35

*Procedimiento de preparación de una forma de aplicación cutánea (pomada)*

35

Los nombres de los componentes de la formulación se facilitan según la terminología de las autoridades de registro y su cantidad está en gramos por 200 g.

		/200 g
Compuesto activo 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina	(2Cl4OHAP)	2,0 g
butilhidroxitolueno	(Nipanox BHT)	0,4 g
200018035611NP		
butilparabeno	(Nipabutyl)	0,4 g
monoetil éter de dietilenglicol	(Transcutol P)	20,0 g
3260/02		
dibehenato de glicerol	(Compritol 888 ATO)	44,0 g
3123/04		
laurato de propilenglicol	(Lauroglycol FCC)	133,2 g
3219/00		

5 Procedimiento recomendado

Fase A

10 Se disolvieron 2 gramos del principio activo en 20 g de Transcutol P mientras se agitaba continuamente a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio o acero inoxidable separado. Puede acelerarse el proceso de disolución calentando la disolución hasta una temperatura máxima de 40°C.

Fase B

15 Se disolvieron 0,4 gramos de Nipanox BHT y 0,4 g. de Nipabutyl mientras se agitaba continuamente en 133,2 g de Lauroglycol FCC a una temperatura de aproximadamente 70°C en otro recipiente de vidrio o acero inoxidable separado. Se calienta la disolución oleosa transparente hasta una temperatura de aproximadamente 80°C y se funden 44 g de Compritol 888 ATO en la misma mientras se agita continuamente. Se enfría la disolución oleosa transparente hasta aproximadamente 60°C y durante la agitación continua y el enfriamiento se mezcla con la fase A.  
20 Se divide la sustancia similar a pomada blanquecina resultante en porciones de aproximadamente 15 gramos y se llenan depósitos de plásticos dispuestos de antemano.

Ejemplo 36

25 *Formulación de una composición para aplicación tópica a la piel*

Una composición para aplicación tópica a la piel contiene los siguientes componentes en % en peso:

30 Compuesto activo 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina (2Cl<sub>4</sub>OHAP), 0,1%

Fase oleosa	
Alcohol cetílico	5,0%
Monoestearato de glicerilo	15,0%
Monooleato de sorbitano	0,3%
Polisorbato 80 USP	0,3%
Fase acuosa	
Metilcelulosa 100 cps	1,0%
Metilparabeno	0,25%
Propilparabeno	0,15%
Agua purificada	c.s. hasta el 100%

35 Se dispersó metilcelulosa en el agua caliente que contenía metilparabeno y propilparabeno. Entonces se calentó la mezcla hasta 72°C y se añadió a la fase oleosa que se calentó hasta 70°C mientras se agitaba continuamente. Se añadió el compuesto activo tras enfriar la mezcla hasta la temperatura de 35°C y se agitó continuamente la mezcla resultante hasta enfriarse.

Se aplicó esta composición a la piel en una base al menos diaria hasta alcanzarse el efecto de mejora cutánea deseado (antienvjecimiento).

40 **Bibliografía adicional:**

- Huang *et al.*, "Tetrahedron", 63(24), 2007, páginas 5323-5327;
- Bupea *et al.*, "Eur. J. Org. Chem.", 10, 2006, páginas 2403-2409;

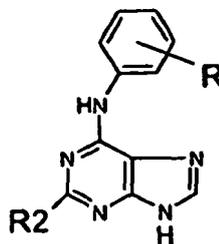
45

## ES 2 431 926 T3

- Erka *et al.*, "J. Chem. Soc. Pertin Trans, 1(20), 1997, páginas 3021-3024;
- Yakout *et al.*, "Acta Chemica, Scandinavica, Series B, B42 (4), 1988, páginas 257-258;
- 5 - Andersen *et al.*, "Acta chemica Scandinavica", Series B, B41 (6), 1987, páginas 473-475;
- Andersen *et al.*, "Liebig's Ann. Chem.", 5, 1985, páginas 921-928;
- 10 - Documento WO92/20341;
- Documento WO97/16452.

## REIVINDICACIONES

1. Derivados de 6-anilinpurina sustituidos de fórmula general I



I

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos, en la que

R indica de uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que comprende hidrógeno, grupo halógeno, hidroxilo, amino, alquiloilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

R2 indica grupo amino, halógeno, nitro, -SH, alquiltio que contiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa en un tratamiento que se selecciona del grupo que comprende el retraso de la senescencia de células cutáneas de mamíferos, la supresión de la inmunoestimulación y la supresión del rechazo de trasplantes en mamíferos.

2. Derivados de 6-anilinpurina sustituidos según la reivindicación 1 de fórmula general I seleccionados del grupo que consiste en 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-anilinpurina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-fluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-fluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-fluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-bromoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-bromoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-etoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-etoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-etoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-aminoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-aminoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-aminoanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metilanolino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metilanolino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metilanolino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-difluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-difluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3,4-trifluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,5-trifluoroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dicloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dicloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4,5-trimetoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,6-trimetoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dihidroxianilino)purina,

2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro; tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-metil-anilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino; nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, hidroxilo, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-4-metoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-5-metoxianilino) purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-3-cloroanilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio; metil)-6-(2-metoxi-4-cloroanilino)purina,

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos,

para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa en un tratamiento que se selecciona del grupo que comprende el retraso de la senescencia de células cutáneas de mamíferos, la supresión de la inmunestimulación y la supresión del rechazo de trasplantes en mamíferos.

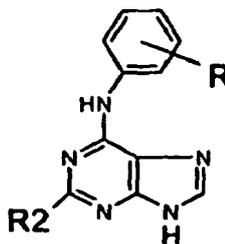
3. Derivados de 6-anilino purina sustituidos según la reivindicación 2 de fórmula general I, seleccionados del grupo que comprende preferiblemente 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina,

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos,

para su uso como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa en un tratamiento que se selecciona del grupo que comprende el retraso de la senescencia de células cutáneas de mamíferos, la supresión de la inmunestimulación y la supresión del rechazo de trasplantes en mamíferos.

4. Uso de los derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I según la reivindicación 1, para clonar embriones y células embrionarias vegetales y de mamíferos, excepto de seres humanos, preferiblemente ovocitos.

5. Uso de derivados de 6-anilino purina sustituidos de fórmula general I



I

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos, en la que

R indica de uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que comprende hidrógeno, grupo halógeno, hidroxilo, amino, alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

R2 indica grupo amino, halógeno, nitro, -SH, alquiltio que contiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa para retrasar la senescencia de células vegetales, de mamíferos, microorganismos, levaduras y fúngicas, la estimulación de la proliferación y morfogénesis en

cultivos tisulares, aumentar el rendimiento y la calidad de productos agrícolas, o la producción de cosechas.

6. Uso de los derivados de 6-anilino purina sustituidos según la reivindicación 5 de fórmula general I seleccionados del grupo que consiste en 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-anilino purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-cloroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-cloroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-fluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-fluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-fluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromoanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-bromoanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-bromoanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-etoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-etoxianilino) purina, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-aminoanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-aminoanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-aminoanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metilanolino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metilanolino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metilanolino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-difluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-difluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3,4-trifluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,5-trifluoroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dicloroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dicloroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-dimetoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dimetoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4,5-trimetoxianilino) purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,6-trimetoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetilanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dimetilanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-dimetilanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dimetilanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dihidroxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dihidroxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dihidroxianilino) purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dihidroxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metilanolino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metilanolino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-metilanolino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino) purina, 2-(amino, cloro, fluoro, hidroxio, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-4-metoxianilino) purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-5-metoxianilino) purina, 2-(amino, cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-3-cloroanilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-4-cloroanilino) purina,

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos,

como inhibidores de citocinina oxidasa/deshidrogenasa para retrasar la senescencia de células vegetales, de mamíferos, microorganismos, levaduras y fúngicas, la estimulación de la proliferación y la morfogénesis en cultivos tisulares, aumentar el rendimiento y la calidad de productos agrícolas, o la producción de cosechas.

7. Uso de los derivados de 6-anilino purina sustituidos según la reivindicación 6 de fórmula general I, seleccionados del grupo que comprende preferiblemente 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro, bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino) purina, 2-(cloro, fluoro,

bromo, amino, nitro, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina,

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, así como sus sales de adición con ácidos,

5 para retrasar la senescencia de células vegetales, de mamíferos, microorganismos, levaduras y fúngicas, la estimulación de la proliferación y la morfogénesis en cultivos tisulares, aumentar el rendimiento y la calidad de productos agrícolas, o la producción de cosechas.

10 8. Preparaciones cosméticas, farmacéuticas y reguladoras del crecimiento que comprenden al menos un derivado de 6-anilino purina sustituido de fórmula general I o las sales del mismo con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, o sus sales de adición con ácidos, y adyuvantes.

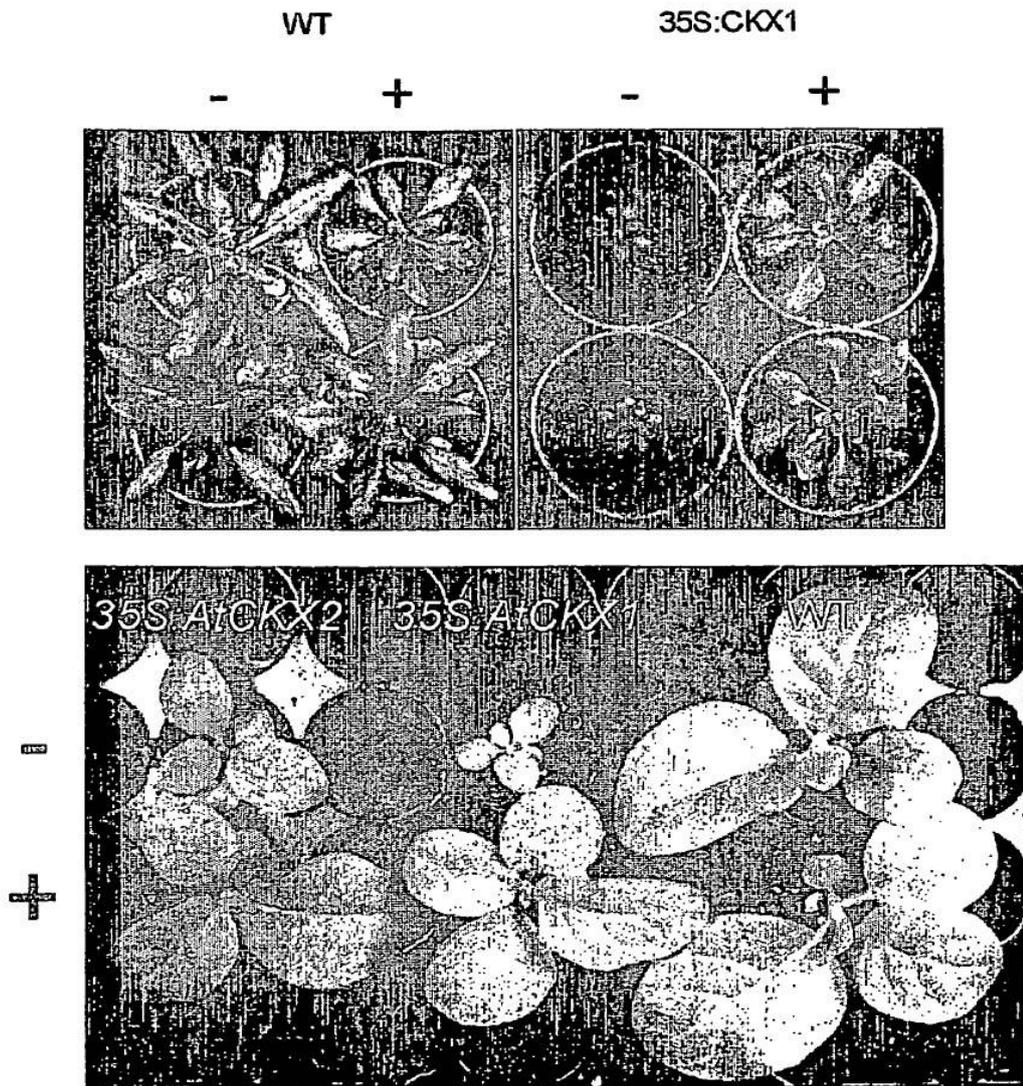


Figura 1

WT -                      35S:CKX1 -                      35S:CKX1 +



Figura 2

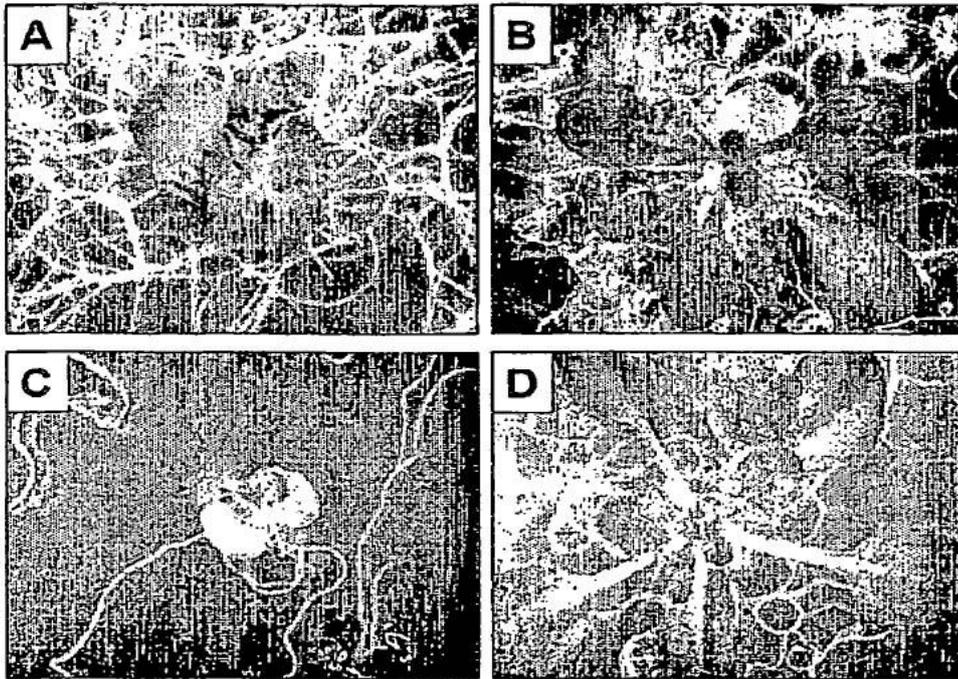


Figura 3



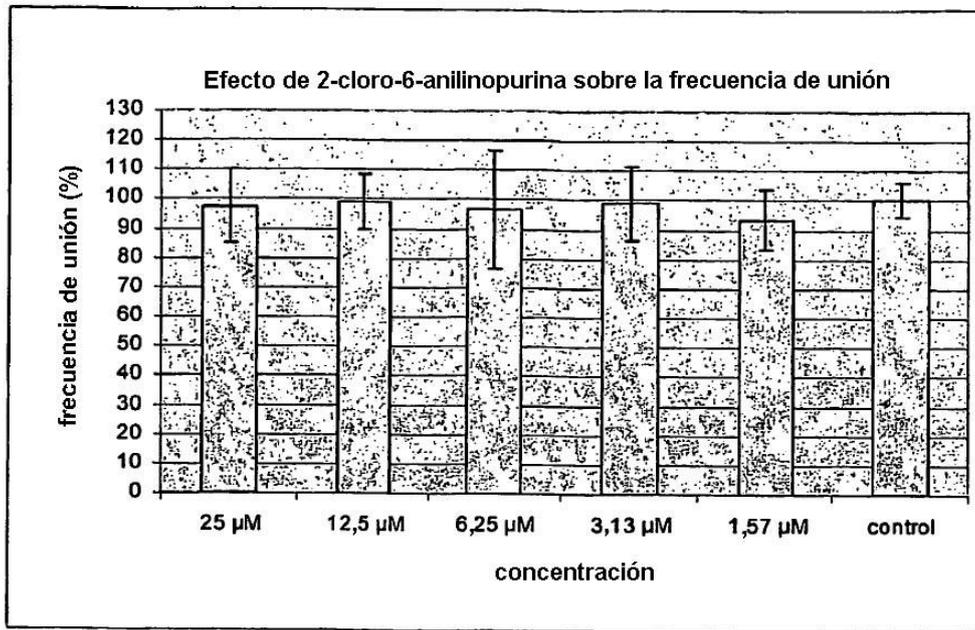


Figura 5

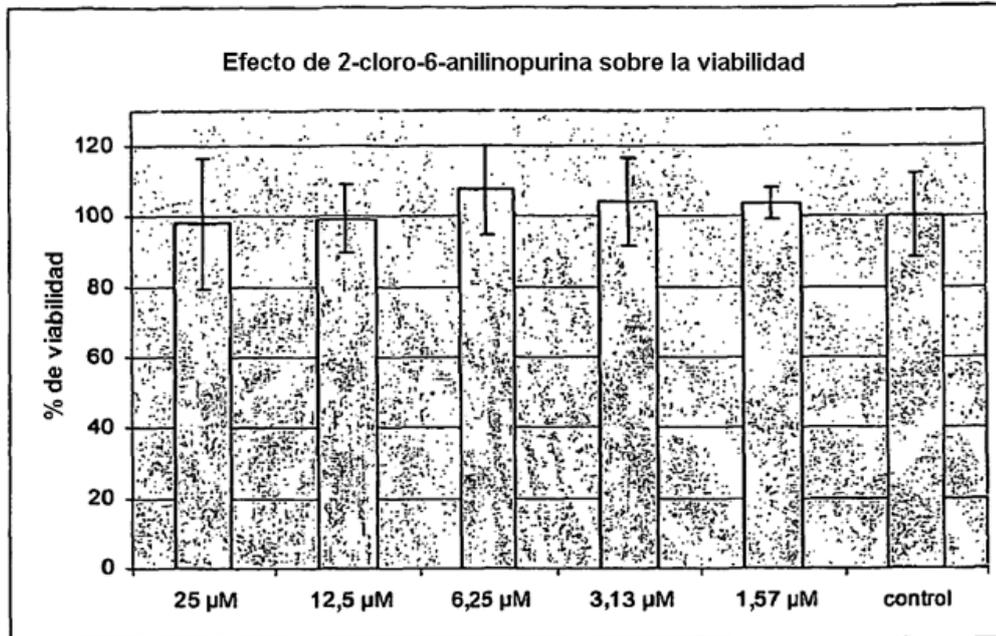


Figura 6

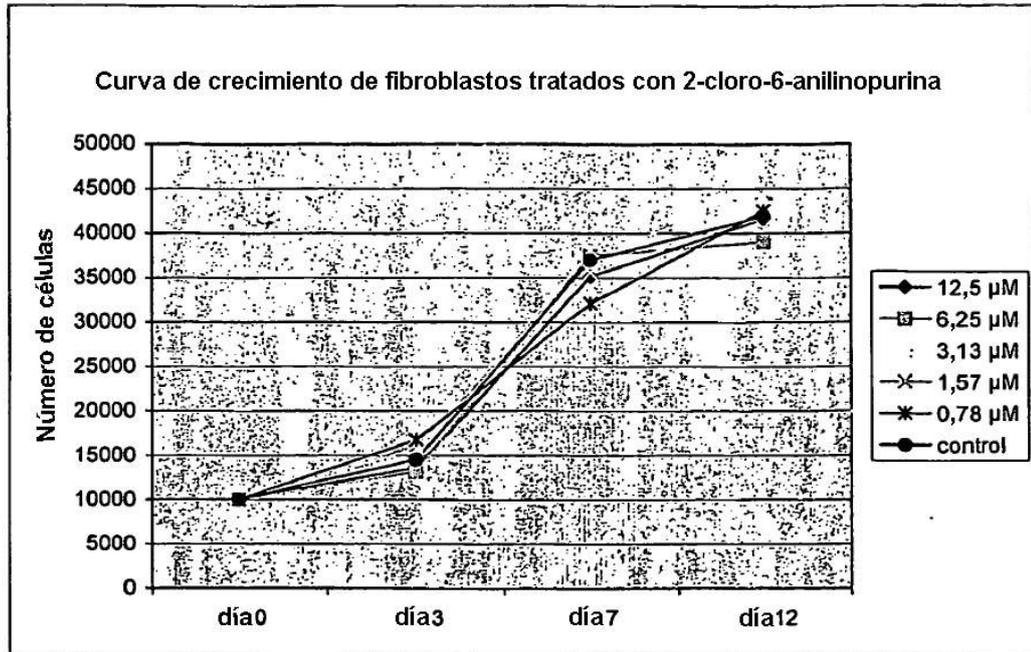


Figura 7

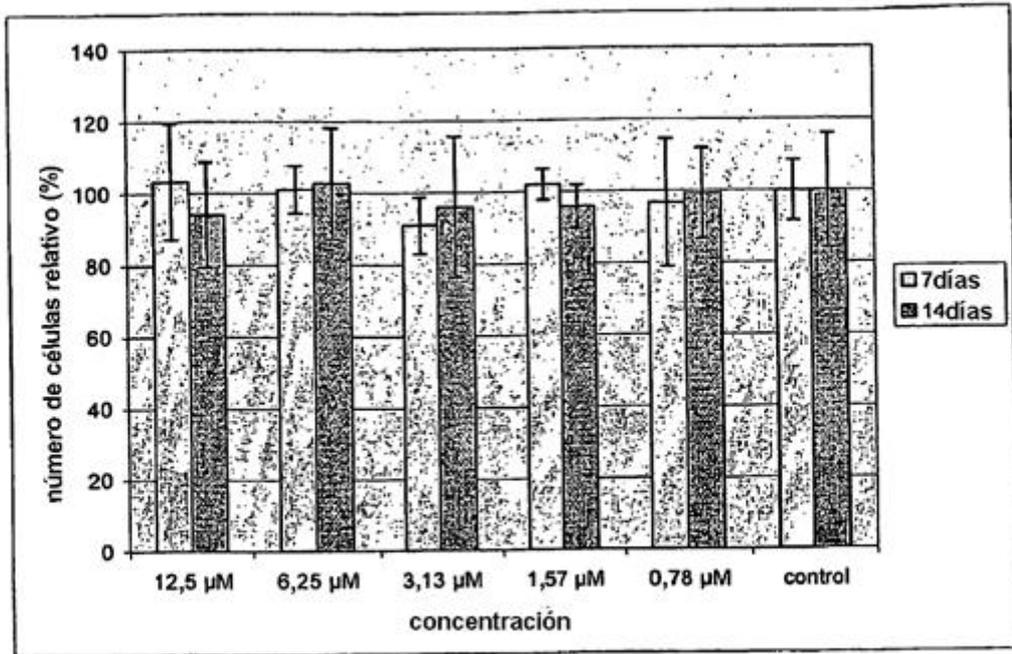


Figura 8

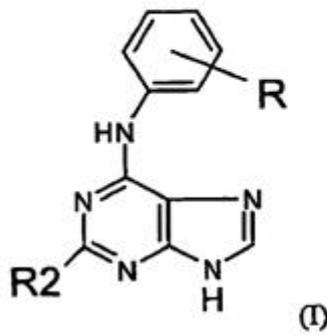


Figura 9