

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2007-453

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/02 (2006.01)

A01N 43/48 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno **04.07.2007**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu **11.02.2009**
(Věstník č. 6/2009)

(71) Přihlašovatel:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, DE

(72) Původce:

Spichal Lukáš, Olomouc, CZ
Gemrotová Markéta, Petrovice u Karvinné, CZ
Zatloukal Marek, Šumperk, CZ
Frébortová Jitka, Olomouc, CZ
Galuzska Petr, Olomouc, CZ
Werner Tomas, 10829 Berlin, DE
Schmülling Thomas, 14052 Berlin, DE
Doležal Karel, Olomouc, CZ
Strnad Miroslav, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

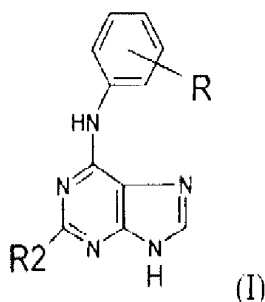
Inventia s.r.o., Ing. Marta Gabrielová, patentový
zástupce, Politických vězňů 7, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu

**Substituované 6-anilinopurinové deriváty
jako inhibitory cytokinin oxidasy a přípravky
obsahující tyto sloučeniny**

(57) Anotace:

Vynález se týká substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I pro použití jako inhibitoru cytokinin oxidasy, ve kterých R znamená 1 až 5 substituentů nezávisle vybraných ze skupiny zahrnující vodík, halogen, hydroxyl, amino, alkylosy a alkylovou skupinu a R2 znamená amino, halogen, nitro, thio, alkylthio nebo alkylovou skupinu. Vynález se týká rovněž přípravku obsahujícího tyto sloučeniny.



CZ 2007 - 453 A3

Substituované 6-anilinopurinové deriváty jako inhibitory cytokinin oxidasy a přípravky
obsahující tyto sloučeniny

Oblast techniky

Vynález se týká substituovaných 6-anilinopurinových derivátů, jejich použití jako inhibitorů cytokinin oxidasy a přípravků obsahujících tyto sloučeniny.

Dosavadní stav techniky

V posledních letech jsou 6-substituované aminopuriny považovány za látky se značným biochemickým významem. Některé látky tohoto typu stimulují růst rostlin a jsou řazeny do skupiny růstových regulátorů označovaných cytokininy (Letham, Ann. Rev. Plant. Physiol. 18, 349, 1967). První objevenou molekulou s cytokininovou aktivitou je kinetin (N^6 -furfuryladenin), který byl původně izolován z autoklávané DNA spermatu sledě (Miller et al. 1955, J. Am. Chem. Soc. 77:1392). Cytokininy blízce příbuzné kinetinu také tvoří modifikované báze RNA (Skoog et al., Science 154:1354, 1966). V tRNA pro serin a tyrosin kvasinek, rostlin a živočichů sousedí cytokininy přímo s antikodonem. Některé N^6 -substituované adenosiny s cytokinovou aktivitou inhibují růst savčích buněčných kultur (Grace et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8:23, 1967).

Cytokininy jsou významné rostlinné hormony regulující mnoho aspektů vývoje rostlin. Současné studie na transgenních rostlinách s pozměněným cytokininovým metabolismem nebo signalingem odhalily zajímavé důsledky cytokininové deficeience, či narušení percepce cytokininů (Werner et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:10487, 2001, Werner et al, Plant Cell 15:2532, 2003; Riefler et al., Plant Cell 18:40, 2006). Modulace hladiny cytokininů jejich exogenní aplikací nebo genetickou regulací endogenních hladin pomocí cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (CKX, EC 1.5.99.12), klíčového enzymu degradace cytokininů, již ukázaly své potenciální využití v zemědělství. Exogenní aplikace cytokininů vedla například ke zkrácení období předcházejícímu době kvetení u rajčete (Sawhney and Shukla, Am J Bot 81:1640, 1994), nebo k reverzi samčí sterility u ječmene (Ahokas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7605, 1992). Specifická exprese CKX v prašníku a pylu kukuřice byla prezentována jako účinný nástroj k navození samčí sterility pro produkci hybridů u tradičně nesnadno hybridizovatelných plodin (Huang et al., 2003). Současná práce

Výše uvedené dosud nevymezené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě, přičemž

amino znamená skupinu $-NH_2$,

halogen znamená atom halogenu vybraný ze skupiny zahrnující atom fluoru, atom bromu, atom chloru a atom jodu,

nitro znamená skupinu $-\text{NO}_2$,

thio znamená skupinu $-\text{SH}$,

alkyl znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

hydroxy znamená skupinu $-\text{OH}$,

alkyloxy znamená skupinu $-\text{OR}$, ve které R je alkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

alkylthio znamená skupinu $-\text{SR}$, ve které R je alkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I ze skupiny zahrnující: 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-anilinopurin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-fluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-fluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-fluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-bromoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-bromoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-bromoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-ethoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-ethoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-ethoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-aminoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,

methylthio, methyl)-6-(3-aminoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(4-aminoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(2-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(3-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(4-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(2-hydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(3-hydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(4-hydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(2,3-difluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(2,4-difluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(2,3,4-trifluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro,
thio, methylthio, methyl)-6-(2,4,5-trifluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino,
nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2,3-dichloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo,
amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2,4-dichloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo,
amino, nitro, thio, methylthio, methyl, ethyl)-6-(2,4-dimethoxyanilino)purin, 2-(chloro,
fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2,3-dimethoxyanilino)purin, 2-
(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl, ethyl)-6-(3,4-
dimethoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-
(2,5-dimethoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl,
ethyl)-6-(3,4,5-trimethoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl, ethyl)-6-(2,4,6-trimethoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino,
nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2,3-dimethylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo,
amino, nitro, thio, methylthio, methyl, ethyl)-6-(2,4-dimethylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro,
bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3,4-dimethylanilino)purin, 2-(chloro,
fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl, ethyl)-6-(3,5-dimethylanilino)purin, 2-
(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl, ethyl)-6-(2,3-
dihydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-
(2,4-dihydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio,
methyl)-6-(2,5-dihydroxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio,
methylthio, methyl)-6-(3,5-dihydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro,
thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-2-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo,
amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-4-methylanilino)purin, 2-(chloro,
fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-5-methylanilino)purin,

2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-2-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-4-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-5-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, hydroxy, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-4-methoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, bromo, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-5-methoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-bromo-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-methoxy-3-chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-methoxy-4-chloroanilino)purin,

a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy
ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami,
pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituované 6-anilinopurinové deriváty zahrnující:

2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-bromo-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-hydroxyanilino)purin,

a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy
ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami,
pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy.

Vynález rovněž zahrnuje farmaceutické, kosmetické a růstově-regulační přípravky obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I či sůl takovéto sloučeniny s alkalickým kovem, amoniakem či aminem ve formě racemátu nebo opticky aktivního isomeru, nebo jeho adiční soli s kyselinou, včetně pomocných látek.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaného 6-anilinopurinového derivátu obecného vzorce I nebo jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami pro přípravu přípravku pro použití pro inhibici cytokinin oxidasy.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I jako inhibitorů cytokinin oxidasy, zejména pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I jako inhibitorů cytokinin oxidasy v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I jako inhibitorů cytokinin oxidasy pro zpomalení senescence buněk rostlin, živočichů, mikroorganismů, kvasinek a hub.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I jako inhibitorů cytokinin oxidasy pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, například fibroblastů a keratinocytů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

Předmětem vynálezu je konečně použití substituovaných 6-anilinopurinových derivátů obecného vzorce I jako inhibitorů cytokinin oxidasy na potlačení imunostimulace například arthritis nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.

Předmětem vynálezu je konečně použití substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I jako inhibitorů cytokinin oxidasy při produkci užitkových rostlin, s výhodou u obilovin (pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, žito, oves, čirok a další druhy), řep (cukrová a krmná řepa); malvic, peckovic a bobulovin (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, jahody, maliny a ostružiny); vikvovitých rostlin (bob, čočka, hrách, soja); olejnin (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokos, *Ricinus*, kakaový bob, podzemnice olejná); lilkovitých rostlin (dýně, okurky, melouny); přadných rostlin (bavlna, len, konopí, juta); citrusů (pomeranče, citrony, grapefruity, mandarinky); zeleniny (špenát, skořice, kafr) nebo rostlin jakými jsou tabák, ořešák, baklažán, cukrová třtina, čajovník, réva vinná, chmel, banány a přírodní kaučukovníkové a léčivé rostliny stejně tak jako okrasné rostliny. Plodiny zahrnují ty, které poskytují toleranci vůči třídám růstových faktorů konvenčním křížením nebo metodami genetického inženýrství. Plevely, jejichž růst může být kontrolován zahrnují jak jednoděložné tak dvouděložné druhy, například *Stellaria*, *Nasturtium*, *Agrostis*, *Digitaria*, *Avena*, *Setaria*, *Sinapis*, *Lolium*, *Solanum*, *Echinochloa*, *Scirpus*, *Monochoria*, *Sagittaria*, *Bromus*, *Alopecurus*, *Sorghum halepense*, *Rottboellia*, *Cyperus*, *Abutilon*, *Sida*, *Xanthium*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Ipomoena*, *Chrysanthemum*, *Galium*, *Viola* and *Veronica*.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou používány v nemodifikované formě, nebo s výhodou společně s pomocnými látkami běžně využívanými v přípravcích. Jsou přednostně používány koncentráty aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, ředěné emulze, rozpustné prášky, prach, granuláty, krémy, gely, olejové suspenze a rovněž enkapsulované produkty, např. polymerní substance. Ve vztahu k typu přípravku je určena i metoda aplikace, například spejování, atomizace, poprach, rozptýl, nátěr a polévání, která je zvolena ve vztahu k předurčenému použití a převažujících okolnostech. Přípravky mohou být sterilizovány anebo obsahují další přídavné látky neutrální povahy, například konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla anebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, hnojiva, či donory mikrohnojiv nebo další přípravky za účelem získání speciálních účinků.

Sloučenina obecného vzorce I může být smíchána s dalšími růstovými regulátory za účelem dosažení synergického účinku.

Přípravky

Přípravky obsahující sloučeniny obecného vzorce I (aktivní látky), a pokud je třeba, jednu nebo více pevných nebo kapalných pomocných látek, jsou připraveny známými způsoby, například smísením nebo mletím účinné látky s pomocnými látkami, jako jsou např. rozpouštědla nebo pevné nosiče. Do přípravků mohou být přidávány povrchově aktivní látky (surfaktanty).

V závislosti na povaze sloučeniny obecného vzorce I, která má být formulována, vhodné povrchově aktivní látky jsou neiontové, kationtové a/nebo aniontové povrchově aktivní látky a jejich směsi mající dobré emulzifikační, dispergační a zvlhčovací vlastnosti.

Příklady vhodných aniontových, neiontových a kationtových smáčedel jsou shrnuty například ve WO 97/34485.

Pro přípravu formulací obsahujících inhibitory cytokinin oxidasy na bázi substituovaných 6-anilinopurinových derivátů jsou podle toho vynálezu používána smáčedla konvenčně používaná při přípravě technologií přípravků, která jsou popsána, např. v "McCUTCHEON'S Detergents and Emulsifiers Annual" MC Publishing Corp., Ridgewood New Jersey, 1981, Stache, H., "Tensid- Taschenbuch", Carl Hanser Verlag, MunichNienna, 1981 and M. and J. Ash, "Encyclopedia of Surfactants", Voll-III, Chemical Publishing Co., New York, 1980-81.

Formulace přípravku s inhibitorem cytokinin oxidasy obsahuje váhově od 0,1 do 95% aktivní látky, přičemž obsahují od 5 do 99,9% směsi přísad či farmaceutických nosičů a to v závislosti na způsobech aplikace a obsahují váhově i od 0,1 do 25% smáčedla.

Ačkoliv jsou komerční produkty obvyklé připravovány ve formě koncentrátů, konečný uživatel upotřebí naředěný přípravek. Kompozice může proto obsahovat i další přísady, jakými jsou stabilizátory, např. rostlinné oleje nebo epoxidizované rostlinné oleje (epoxidizovaný palmový olej 0;1, řepkový nebo olivový olej), odpěňovače, např. silikonový

a) Obalování osiva smáčivou práškovou formulací sloučeniny obecného vzorce I, a to mícháním v nádobě až do stejnorodé distribuce na povrchu semen (suché obalování). Při takové proceduře je přibližně 1 až 500 g sloučeniny obecného vzorce I (4 g až 2 kg smáčivého prášku) používáno na 100 kg osiva.

b) Obalování osiva emulzifikovaným koncentrátem sloučeniny obecného vzorce I v souladu s metodou a) (mokré obalování).

c) Obalování osiva cestou máčení semen po dobu 1 až 72 h v tekutině obsahující od 100 do 1000 ppm sloučeniny obecného vzorce I, a s výhodou následného usušení semen (imerzní obalování).

Obalování semen nebo ošetření klíčících semen jsou upřednostňovanou metodou aplikace, protože ošetření aktivní látkou je určeno cílovou plodinou. Obecně jsou antidota používána od 1 do 1000 g, s výhodou od 5 do 250 g, na 100 kg semen, avšak v závislosti na metodice, která rovněž umožňuje přidání dalších aktivních látek nebo mikroživin; určené koncentrační limity se mohou pohybovat nahoru nebo dolů (opakované obalování).

ii) Aplikace cisternové směsi

Kapalná formulace směsi růstového regulátoru a antidota je používána ve váhovém poměru jednoho k druhému od 10:1 do 1 :100, rychlost aplikace růstového regulátoru od 0,005 do 5,0 kg na hektar. Taková cisternová aplikace směsi se provádí před anebo po seti.

iii) Aplikace do semenné brázdy

Sloučenina obecného vzorce I je zavedena do otevřené brázdy oseté semenem ve formě emulzifikovaného koncentrátu, smáčivého prášku nebo granulí. Jakmile je semenná brázda zaklopena, je růstový regulátor aplikován cestou obvykle používanou při preemergentním procesu.

iv) Kontrolované uvolňování aktivních látek

Sloučeniny obecného vzorce I jsou aplikovány v roztoku k minerálním granulovaným nosičům nebo polymerizovaným granulím (močovina, formaldehyd) a jsou vysušeny. V případě, že je to žádoucí, tak se provádí obalování, které umožňuje postupné uvolňování látky v měřitelných množstvích po určitou specifickou periodu (obalované granule).

Kosmetické kompozice obsahují od přibližně 0,05 % (w/w) do 10 % (w/w) aktivní látky, s výhodou od 0,1 % (w/w) do 2 % (w/w). Kosmetické kompozice jsou ve formě krému,

aerosolu, pleťové vody, roztoků, náplasti, obkladu, šampónu, rtěnky, pasty, krému, tinktury, spreje, atd.

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

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

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

Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, například glycerol, glykoly a polyethylenglykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylenglykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné, i ostatní neutrální látky a aditiva.

Seznam vyobrazení

Obr. 1 ukazuje obnovení přirozeného fenotypu po systematické aplikaci látky **12** na CKX nadprodukující rostliny. + znamená ošetřeno, - neošetřeno.

Obr. 2 ukazuje srovnání účinku cytokininu a CKX inhibitoru na obnovení přirozeného fenotypu AtCKX1 semenáčků Arabidopsis. (A) AtCKX1, (B) AtCKX1 kultivované na 0,1 μ M látky **12**, (C) AtCKX1 kultivované na 0,1 μ M BAP, (D) kontrolní rostlina s přirozeným fenotypem.

Obr. 3 znázorňuje účinek látky **12** na kvetení rostlin Arabidopsis.

Obr. 4 znázorňuje vliv 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino) purinu na adherenci buněk. Hodnoty uvedeny relativně vzhledem ke kontrole.

Obr. 5 znázorňuje vliv 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purinu na viabilitu buněk po 3 dnech. Hodnoty uvedeny relativně vzhledem ke kontrole.

Obr. 6 znázorňuje růstovou křivku lidských diploidních fibroblastů BJ ovlivněných 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purinem

Obr. 7 ukazuje počet buněk po 7 a 14 denním působení 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purinu. Hodnoty uvedeny relativně vzhledem ke kontrole.

Příklady provedení vynálezu

Výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I je 2,6-chlorpurin. Dalším výchozím materiálem je 2-amino-6-chlorpurin nebo 2-fluor-6-chlorpurin, který je možné buď připravit z 2-amino-6-chlorpurinu reakcí s kyselinou tetrafluoroboritou v přítomnosti vodného roztoku dusičnanu sodného (Beach et al., 1992). Další výchozí materiál, 2-brom-6-chlorpurin, je možné připravit z 2-amino-6-chlorpurinu diazotací s t-butyl nitritem a následnou bromací za přítomnosti vhodného donoru bromu (Kim Ilak Sung et al.; J.Med.Chem.46; 23; 2003; 4974-4987). Další výchozí materiál může být ještě 2-methyl-6-chlorpurin, který je možné připravit z 6-chlor-2-jodpurinu Stillovým cross couplingem (Kim et al., 2003). Dalším výchozím materiálem může být ještě 2-nitro-6-chlor-9-Boc-purin, který je možné připravit z 6-chlorpurinu (Rodenko et al.; J .Am. Chem .Soc. 2005, 127, 5957-5963).

Výchozí substituované fenylaminy, které nebyly komerčně dostupné (ostatní získány od Sigma Aldrich nebo Fluorochem), byly připraveny z odpovídajících aldehydů v přítomnosti katalyzátoru. Ty, které mají více hydroxy skupin, mohou být s výhodou připraveny demetylací odpovídajících methoxyderivátů 48% HBr v N₂ atmosféře.

Elementární analýzy (C, H a N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Fissons Instruments). Na zjišťování bodu tání byl použit přístroj BÜCHI Melting Point B-540. Analytická tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na destičkách silikagelu 60 WF₂₅₄ (Merck), v mobilní fázi CHCl₃:MeOH:konc. NH₄OH (8:2:0,2, v/v/v). ES+ hmotová spektra byla naměřena za použití přímého nástriku na Waters ZMD 2000 hmotovém spektrometru. Hmotnostní interval při měření byl 10 - 1500 amu. Spektra byla měřena za použití cyklických skenů o délce 3,0 sekundy, při napětí na vstupní šterbině 25 V a teplotě vypařovacího bloku 150 °C, desolvatační teplotě 80 °C a průtoku desolvatačního plynu 200 l/hodinu. Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynx data system. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance AV 300 při teplotě 300 K a frekvenci 300,3 MHz (¹H) respektive 75,48 MHz (¹³C). Vzorky byly připraveny rozpuštěním daných látek v DMSO-d₆. Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako interní standard.

Příklad 1

2-Chlor-6-anilinopurin

Anilin (4,66 g; 0,05 mol) byl přidán do suspenze 2,6-dichlorpurinu (5,67 g; 0,03 mol) v n-propanolu (60 ml) a N,N-ethyl-diisopropylaminu (6,44 g; 0,05 mol). Reakční směs byla míchána při 100 °C po 4 hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl vzniklý precipitát zfiltrován, promyt n-propanolem (2x10 ml) a vodou (3x10 ml) a vysušen při 60 °C do konstantní váhy. Výtěžek: 6,26 g nažloutlé pevné látky (84,9 %). TLC (chloroform-metanol; 85:15): žádné nečistoty; bez výchozích látek, HPLC čistota: 98+ %

Příklad 2

2-Chlor-6-(3-chloranilino)purin

2,6-Dichlorpurin (3,78 g; 0,02 mol) byl smíchán s 3-chloranilinem (3,83 g; 0,03 mol) v n-butanolu (40 ml) v přítomnosti triethylaminu (7 ml; 0,05 mol) při 110 °C 3 hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla reakční směs míchána při 0 °C 2 hodiny. Žlutý precipitát byl zfiltrován, promyt chladným n-butanolem (2x10 ml), vodou (3x10 ml) a vysušen při 60 °C do konstantní váhy. Výtěžek: 3,69 g žlutý krystalický prášek (65.8 %). Surový produkt

byl rekrystalizován v isopropanolu a poskytl 2,85 g čisté látky. TLC (chloroform-metanol; 85:15): žádné nečistoty; bez výchozích látek. HPLC čistota: 98+ %

Příklad 3

2-Chlor-6-(3-fluoranilino)purin

Látka byla připravena, jak je popsáno v příkladu 2, reakcí 2,6-dichlorpurinu s 3-fluoroanilinem. Reakční směs byla následně odpařena na rotační vakuové odparce, zbytek byl rozdělen mezi ethylacetát a 0,5 M HCl. Organická vrstva byla promyta vodou, vysušena MgSO_4 , a odpařena v výtěžkem žluté pevné látky (3,72 g). Surový produkt byl přečištěn flash chromatografií. Výtěžek: 2,20 g žlutého krystalického prášku. TLC (chloroform-metanol; 85:15): homogenní. HPLC čistota: 98+ %

Příklad 4

2-Chlor-6-(3-hydroxyanilino)purin

Tato látka byla připravena reakcí 2,6-dichlorpurinu (3,78 g; 0,02 mol), 3-aminofenolu (3,27 g; 0,03 mol), a N,N-ethyl-diisopropylaminu (6,44 g; 0,05 mol) v n-butanolu (40 ml) při 90 °C 4 hodiny. Reakční směs pak byla míchána při pokojové teplotě a vzniklá krystalická sraženina, promytá chladným n-butanolem (3x10 ml), vodou (3x10 ml), byla následně vysušena do konstantní váhy.

TLC (chloroform-metanol; 85:15): homogenní. HPLC čistota: 98+ %

Příklad 5

2-Chlor-6-(3-methoxyanilino)purin

Do suspenze 2,6-dichlorpurinu (3,78 g; 0,02 mol) a m-anisidinu (3,69 g; 0,03 mol) v n-pentanolu (40 ml), byl přidán triethylamin (7 ml; 0,05 mol). Reakční směs byla míchána při 100 °C 4 hodiny a následně ochlazena na pokojovou teplotu. Bílá sraženina byla po odsátí promyta isopropanolem (2x10 ml) a vodou (3x10 ml). Surový produkt byl rekrystalován z metanolu s aktivním uhlím za vzniku bílých krystalů. Výtěžek: 4,36 g (77,8 %). TLC (chloroform-metanol; 85:15): žádné nečistoty, neobsahuje výchozí látky, HPLC čistota: 98+ %

16
Tabulka 1

Látky připravené způsobem podle příkladu 1-5

SUBSTITUENT PURINU			CHN ANALÝZY	MS ANALÝZA-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
1	anilino	chlor	C=53,5; H=3,3; N=28,6	244	246
2	2-chloroanilino	chlor	C=46,8; H=2,9; N=24,7	278	280
3	3-chloroanilino	chlor	C=46,8; H=2,9; N=24,6	278	280
4	4-chloroanilino	chlor	C=46,9; H=3,0; N=24,7	278	280
5	2-fluoroanilino	chlor	C=49,9; H=3,0; N=26,5	262	264
6	3-fluoroanilino	chlor	C=49,7; H=3,0; N=26,7	262	264
7	4-fluoroanilino	chlor	C=49,8; H=3,1; N=26,4	262	264
8	2-hydroxyanilino	chlor	C=49,7; H=3,1; N=26,7	260	262
9	3-hydroxyanilino	chlor	C=49,9; H=3,2; N=26,7	260	262
10	4-hydroxyanilino	chlor	C=50,5; H=3,1; N=26,8	260	262
11	2-methoxyanilino	chlor	C=51,4; H=3,8; N=25,5	274	276
12	3-methoxyanilino	chlor	C=51,8; H=3,8; N=25,2	274	276
13	4-methoxyanilino	chlor	C=52,0; H=3,7; N=25,2	274	276
14	2-aminoanilino	chlor	C=50,5; H=3,2; N=32,8	259	261
15	3-aminoanilino	chlor	C=50,6; H=3,2; N=32,5	259	261
16	4-aminoanilino	chlor	C=50,4; H=3,3; N=32,3	259	261
17	3,4-dimethoxyanilino	chlor	C=51,3; H=3,9; N=23,3	304	306
18	2,5-dimethoxyanilino	chlor	C=51,3; H=4,0; N=23,2	304	306
19	3,4,5-trimethoxyanilino	chlor	C=49,9; H=4,2; N=21,0	334	336
20	3,4-dihydroxyanilino	chlor	C=47,2; H=2,8; N=25,5	276	278
21	2,5-dihydroxyanilino	chlor	C=47,3; H=2,8; N=25,6	276	278
22	2-chloro-5-methoxyanilino	chlor	C=46,3; H=2,9; N=22,7	308	310
23	2-chloro-3-methoxyanilino	chlor	C=46,4; H=2,9; N=22,7	308	310
24	2-bromo-3-methoxyanilino	chlor	C=40,8; H=2,5; N=19,4	353	355
25	2-methoxy-3-chloroanilino	chlor	C=46,4; H=3,0; N=22,6	308	310
26	3-ethoxyanilino	chlor	C=53,8; H=4,1; N=24,3	288	290
27	2-hydroxy-5-methylanilino	chlor	C=51,9; H=3,6; N=25,7	274	276
28	3-hydroxy-4-methylanilino	chlor	C=52,1; H=3,7; N=25,5	274	276
29	3-hydroxy-2-methylanilino	chlor	C=52,1; H=3,8; N=25,4	274	276
30	3,4-dimethylanilino	chlor	C=56,8; H=4,1; N=25,7	272	274
31	2-hydroxy-3-methoxyanilino	chlor	C=49,3; H=3,6; N=24,3	290	292
32	2-hydroxy-4-methoxyanilino	chlor	C=49,2; H=3,7; N=24,7	290	292

50	2-methoxyanilino	fluor	C=54,7; H=4,1; N=27,0	258	260
51	3-methoxyanilino	fluor	C=55,1; H=4,0; N=26,9	258	260
52	4-methoxyanilino	fluor	C=55,0; H=4,0; N=27,4	258	260
53	3,4-dimethoxyanilino	fluor	C=53,7; H=3,9; N=24,8	288	290
54	2,5-dimethoxyanilino	fluor	C=53,6; H=4,0; N=24,5	288	290
55	3,4-dihydroxyanilino	fluor	C=50,2; H=3,0; N=27,3	260	262
56	2,5-dihydroxyanilino	fluor	C=50,2; H=3,0; N=27,2	260	262
57	2-chloro-5-methoxyanilino	fluor	C=49,0; H=3,1; N=24,0	292	294
58	2-methoxy-3-chloroanilino	fluor	C=48,0; H=3,0; N=24,0	292	294
59	3-ethoxyanilino	fluor	C=56,8; H=4,2; N=26,0	272	274
60	2-hydroxy-5-methylanilino	fluor	C=55,2; H=3,8; N=27,2	258	260
61	3-hydroxy-4-methylanilino	fluor	C=55,3; H=3,8; N=27,2	258	260
62	3-hydroxy-2-methylanilino	fluor	C=55,3; H=3,9; N=27,0	258	260
63	3,4-dimethylanilino	fluor	C=60,4; H=4,6; N=27,4	256	258

Příklad 7

2-Fluor-6-(3-methoxyanilino)purin

Látka byla připravena reakcí 2-fluor-6-chlorpurinu (1,7 g; 0,01 mol), m-anisidinu (1,23 g; 0,01 mol) a triethylaminu (3,5 ml; 0,025 mol) v n-butanolu (20 ml) při 90 °C po dobu 4 hodin. Reakční směs byla následně ochlazená na pokojovou teplotu a vzniklá bílá sraženina byla odsáta, promyta n-butanolem (3x10 ml), vodou (3x10 ml) a vysušena do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 5,55 g (61 %) nažloutlého krystalického prášku. TLC (chloroform-metanol; 85:15): žádné nečistoty. HPLC čistota: 99+ %.

Tabulka 3

Látky připravené způsobem podle příkladu 17

SUBSTITUENT PURINU			CHN ANALÝZY	MS ANALÝZA-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
64	anilino	amino	C=58,2; H=4,4; N=37,5	225	227
65	2-chloroanilino	amino	C=50,2; H=3,3; N=32,9	259	261
66	3-chloroanilino	amino	C=50,5; H=3,4; N=32,6	259	261
67	4-chloroanilino	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-hydroxyanilino	amino	C=54,0; H=4,1; N=34,9	241	243
72	3-hydroxyanilino	amino	C=54,1; H=4,2; N=34,8	241	243
73	4-hydroxyanilino	amino	C=54,4; H=4,2; N=34,7	241	243
74	2-methoxyanilino	amino	C=55,9; H=4,7; N=33,0	255	257
75	3-methoxyanilino	amino	C=56,0; H=4,8; N=32,9	255	257
76	4-methoxyanilino	amino	C=56,3; H=4,7; N=32,9	255	257
77	3,4-dimethylanilino	amino	C=51,0; H=5,5; N=33,4	253	255

Příklad 8

2-Thioxanthin

4,5-Diamino-6-hydroxy-2-thiopyrimidin (100 g) byl refluxován s 90% kyselinou mravenčí (500 ml) dvě hodiny za mechanického míchání. Po ztuhnutí směsi bylo přidáno dalších 100 ml kyseliny mravenčí. Směs ochlazena na 1 °C a surový 4-amino-5-formamido-6-hydroxy-2-thiopyrimidin byl následně odfiltrován a vysušen pod vakuem. Filtrační koláč byl resuspendován ve formamidu (225 ml) a zahříván na teplotu 175-185 °C v parafinové lázni po dvě hodiny za občasného míchání. Směs byla následně ochlazena na pokojovou teplotu, znovu zfiltrována, promyta dvěma litry 1 M NaOH a vysušena dvě hodiny při teplotě 95 °C. Výtěžek 103 g (97 %).

Příklad 9

2-Benzylthio-6-purinol

5,28 gramů 8-thioxanthinu bylo resuspendováno v 78,5 ml 1 M NaOH, naředěno vodou na celkový objem 400 ml. (Výchozí látka se zcela nerozpustí ani po přidání 2,5-násobku báze). Následně bylo přidáno 3,7 ml benzyl chloridu a směs byla silně míchána po dobu 3 hodin při pokojové teplotě, pak upraveno pH na 5 pomocí ledové kys. octové. Vznikla červená sraženina, která byla odsáta, promyta důkladně vodou a vysušena přes noc ve vakuu 80 °C. Takto bylo získáno 7,33 g růžové pevné látky, která byla použita do následující reakce bez dalšího přečištění.

Příklad 10

2-Benzylthio-6-chlorpurin

K 2-benzylthioxanthinu (27,6 g, 0,107 mmol) byl přidán POCl₃ (506 ml) a N,N-diethylanilin (40 ml). Směs byla refluxována 1,5 hodiny a přebytek POCl₃ byl odstraněn odpařením ve vakuu. Výsledný sirup byl smíchán s ledem (2 kg) a za přidání hydroxidu

sodného a chlazení vznikla pevná látka. Směs byla následně okyselena pomocí koncentrované HCl na pH 1 a vzniklá pevná látka byla odsáta, promyta vodou a vysušena několik hodin při teplotě 70 °C. Surový produkt, na prášek rozmělněný, byl smíchán s malým množstvím metanolu a žlutá pevná látka byla vysušena ve vakuu při 70 °C. Výtěžek 17,5 g (59 %). Surový 2-benzylthio-6-chlorpurin, stejně jako 2-benzylthioxanthin, je dobře rozpustný v DMSO. TLC (chloroform-methanol; 95:5): bez výchozích látek. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií (125 g silica) a eluován 2,5 % MeOH/chloroform. Z frakcí (100ml) 7-36 byla odpařením získána žlutá pevná látka, která byla následně rekrystalována z 50% metanolu. Získána bílá krystalická látka a vysušena do konstantní váhy při 45°C (chloridem vápenatým a následně oxidem fosforečným přes noc). Výtěžek: 3 g. Bod tání 176-178 °C, bez rozkladu. TLC (SILICA-5% MeOH/chloroform). HPLC čistota: 95+ %

Příklad 11

2-Benzylthio-6-anilinopurin

2-Benzylthio-6-chlorpurin (3,9 g) a anilin (3,42 g) byl refluxován v n-BuOH (100 ml) za přítomnosti triethylaminu (7,5 ml) 2 h. Reakční směs byla následně ochlazená na pokojovou teplotu, odpařena do sucha na rotační vakuové odparce, znovu ochlazená ledem a přidáno 400 ml vody za silného třepání. Při stání přes noc při -16°C vznikl tmavohnědý surový produkt, který byl následně vysušen do konstantní váhy a přečištěn preparativní kolonovou chromatografií (100 g silica). Kolona byla promyta chloroformem a 500 ml x 1,25% MeOH/chloroform, následně eluována 1,5 l x 2,5% MeOH/chloroform. Frakce (100 ml) 12-15 byly odpařeny do sucha za vzniku světle hnědého produktu, který byl rekrystalizován z metanolu za přítomnosti aktivního uhlí. Výtěžek: 1,18 g bílé amorfni látky. TLC (2,5% MeOH/chloroform) žádné nečistoty. HPLC čistota: 98+ %.

Příklad 12

2-Thio-6-anilinopurin

2-Benzylthio-6-anilinopurin (1,18 g) byl rozpuštěn v tekutém amoniaku (125 ml). Do vzniklého roztoku byl následně přidáván sodík po malých částech do vzniku stabilního modrého zabarvení. V dalším kroku bylo pak přidáno malé množství chloridu amonného a tak odstraněn přebytek sodíku. Po zredukování objemu byl přidán ether (125 ml) (k odstranění vedlejších produktů). Po odstranění zbytku amoniaku byla reakční směs extrahována vodou (2 x 65 ml). pH vodné frakce bylo následně upraveno pomocí kys.

Do čerstvě připraveného roztoku 2-thioxanthinu (103g, 0,613 molu) ve 2 M NaOH (613 ml) a vodě (245 ml) byl po kapkách přidán dimethyl sulfát (77 g, 58 ml), teplota byla udržována mezi 25 a 40 °C. Reakční směs byla další hodinu míchána a pak ponechána přes noc při pokojové teplotě. Poté byla tmavě červená kapalina zfiltrována a produkt vysrážen ledovou kyselinou octovou, zfiltrován a rekrystalizován z horké vody (1500 ml) s přídavkem

SUBSTITUENT PURINU			CHN ANALYZY	MS ANALYZA-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
94	anilino	methylthio	C=55,9; H=4,2; N=27,3	256	258
95	2-chloroanilino	methylthio	C=49,1; H=3,3; N=24,3	290	292

96	3-chloroanilino	methylthio	C=49,1; H=3,1; N=24,1	290	292
97	2-fluoroanilino	methylthio	C=52,2; H=3,7; N=25,3	274	276
98	3-fluoroanilino	methylthio	C=52,4; H=3,6; N=25,4	274	276
99	4-fluoroanilino	methylthio	C=51,9; H=3,4; N=25,6	274	276
100	2-hydroxyanilino	methylthio	C=52,5; H=4,0; N=25,8	272	274
101	3-hydroxyanilino	methylthio	C=52,5; H=4,0; N=25,7	272	274
102	2-methoxyanilino	methylthio	C=54,3; H=4,4; N=24,6	286	288
103	3-methoxyanilino	methylthio	C=54,0; H=4,4; N=24,9	286	288
104	4-methoxyanilino	methylthio	C=53,8; H=4,3; N=24,7	286	288
105	3,4-dimethoxyanilino	methylthio	C=52,6; H=4,7; N=22,2	316	318
106	2,5-dimethoxyanilino	methylthio	C=52,9; H=4,8; N=22,2	316	318
107	2-chloro-5-methoxyanilino	methylthio	C=48,8; H=4,7; N=22,0	320	322
108	2-methoxy-3-chloroanilino	methylthio	C=48,1; H=5,3; N=21,3	320	322

Příklad 16

2-Methyl-6-(3-methoxyanilino)purin

Do suspenze 2-methyl-6-chlorpurinu (1,69 g; 0,01 mol) a m-anisidinu (1,23 g; 0,01 mol) v n-butanolu (20 ml) byl přidán triethylamin (3,5 ml; 0,025 mol). Vzniklá hustá směs byla míchána při 110 °C po 3 hodiny, kdy TLC ukázalo nepřítomnost výchozích látek v reakční směsi. Ta byla následně ochlazená na pokojovou teplotu. Bílá sraženina byla zfiltrována, promyta n-butanolem (2x10 ml), vodou (3x10 ml) a vysušena do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 1,92 g (75 %). Surový produkt byl přečištěn jako hydrochlorid krystalizací z 2,5 M roztoku kyseliny chlorovodíkové v metanolu. TLC (chloroform-metanol-NH₄OH; 4:1:0,05): bez nečistot a výchozích látek. HPLC čistota: 99+ %.

Tabulka 6

Látky připravené způsobem podle příkladu 16

PURIN SUBSTITUENT			CHN ANALYSES	MS ANALYSES-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
109	anilino	methyl	C=63,8; H=4,9; N=31,2	224	226
110	2-chloroanilino	methyl	C=55,3; H=3,7; N=27,3	258	260
111	3-chloroanilino	methyl	C=55,3; H=3,8; N=27,3	258	260
112	2-fluoroanilino	methyl	C=59,0; H=4,1; N=29,0	242	244

113	3-fluoroanilino	methyl	C=59,2; H=4,2; N=29,1	242	244
114	4-fluoroanilino	methyl	C=59,1; H=4,1; N=29,0	242	244
115	2-hydroxyanilino	methyl	C=60,0; H=4,6; N=29,2	240	242
116	3-hydroxyanilino	methyl	C=59,9; H=4,6; N=29,1	240	242
117	2-methoxyanilino	methyl	C=61,1; H=5,2; N=27,9	254	256
118	3-methoxyanilino	methyl	C=60,8; H=5,1; N=27,5	254	256
119	4-methoxyanilino	methyl	C=61,0; H=5,1; N=27,5	254	256
120	3,4-dimethoxyanilino	methyl	C=58,5; H=5,1; N=24,9	284	286
121	2,5-dimethoxyanilino	methyl	C=58,8; H=5,1; N=24,6	284	286
122	2-chloro-5-methoxyanilino	methyl	C=53,7; H=4,1; N=24,3	288	290
123	2-methoxy-3-chloroanilino	methyl	C=53,8; H=4,2; N=24,6	288	290

Příklad 17

2-Brom-6-(methoxyanilino)purin

2-Brom-6-(methoxyanilino)purin byl připraven podobně jako látka v příkladu 5, zde reakcí 2-brom-6-chlorpurinu a m-anisidinu (v molárním poměru 1:1) v přítomnosti triethylaminu (2,5 eq.) v n-propanolu při 100 °C 4 hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla vzniklá bílá sraženina zfiltrována, promyta chladným n-propanolem, vodou a vysušena v exikátoru do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 69% (jako hydrobromid). Surový produkt byl rekrystalován z metanolu a volná báze byla získána reakcí hydrobromidu s 10% vodným roztokem amoniaku. HPLC čistota: 98+%.

Tabulka 7

Látky připravené způsobem podle příkladu 17

SUBSTITUENT PURINU			CHN ANALÝZY	MS ANALÝZA-ZMD	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
124	anilino	brom	C=45,4; H=2,7; N=24,3	289	291
125	2-chloroanilino	brom	C=40,5; H=2,1; N=21,7	323	325
126	3-chloroanilino	brom	C=40,5; H=2,1; N=21,6	323	325
127	2-fluoroanilino	brom	C=44,5; H=2,1; N=23,0	307	309
128	3-fluoroanilino	brom	C=44,7; H=2,1; N=22,9	307	309
129	3-methoxyanilino	brom	C=44,6; H=3,2; N=21,6	319	321
130	2-hydroxyanilino	brom	C=42,9; H=2,6; N=23,1	305	307
131	3-hydroxyanilino	brom	C=43,2; H=4,6; N=22,9	305	307

25

40	anilino	fluoro	14.9
42	3-chloroanilino	fluoro	15.3
43	4-chloroanilino	fluoro	27
45	3-fluoroanilino	fluoro	22.1
48	3-hydroxyanilino	fluoro	11.8
51	3-methoxyanilino	fluoro	0.4
66	3-chloroanilino	amino	25.6
69	3-fluoroanilino	amino	29.4
75	3-methoxyanilino	amino	24.7
80	3-chloroanilino	thio	28.4
83	3-fluoroanilino	thio	22.6
88	3-methoxyanilino	thio	28.3
111	3-chloroanilino	methyl	15.7
113	3-fluoroanilino	methyl	21.8
118	3-methoxyanilino	methyl	9.4

Příklad 21

In vivo účinek 2-chlor-6-(3-methoxyanilino)aminopurinu (látka 12)

Transgenní rostliny *Arabidopsis* 35S:AtCKX1 a tabáku 35S:AtCKX2 pěstované v půdě ve skleníku byly systematicky ošetřovány 10 μ M látky **12**. Nadzemní části kontrolních transgenních rostlin byly sprejovány každý druhý den po dobu jednoho měsíce vodným roztokem látky **12** obsahujícím 0,01% smáčedla Silwet L-77. Z obrázku 1 je jasné patrné, že aplikace CKX inhibitoru 2-chlor-6-(3-methoxyanilino)aminopurinu (látka **12**) uvolnila rostliny z růstové inhibice způsobené poklesem cytokininů a vedla k obnovení přirozeného fenotypu. Abychom potvrdili, že tento účinek není obecným účinkem exogenně aplikovaného cytokininu, ale specifickým účinkem CKX inhibitoru, byly CKX1 nadprodukující semenáčky *Arabidopsis* pěstovány in vitro na MS mediu obsahujícím 0,1 μ M cytokinin BAP (obrázek 2C) nebo stejnou koncentraci látky **12** (obrázek 2B). K obnovení přirozeného fenotypu došlo pouze pokud byla v médiu přítomná látka **12**.

Dlouhodobá aplikace látky **12** na přirozené rostliny *Arabidopsis* vedla k pozměněnému vývoji květů a inhibici oplodnění (obrázek 3). Květy měly špatně vyvinuté prašníky a byly sterilní.

Příklad 22

Aktivace cytokininových receptorů

Escherichia coli kmeny KMI001 nesoucí plasmid pIN-III-AHK4 nebo pSTV28-AHK3 byly pěstovány přes noc při 25 °C v M9 médiu obohaceném 0,1% kasaminovými kyselinami do OD₆₀₀~1. Prekultura byla naředěna 1:600 v 1 ml M9 média obsahujícího 0,1% kasaminovými kyselinami a k ní byl přidán 1 µl zásobního roztoku testované látky (10⁻⁷ M – 5 x 10⁻⁵ M) nebo rozpouštědla (DMSO, ethanol, methanol). Kultury byly dále kultivovány při 25 °C v mikrotitrační destičce, 200 µl na jamku, po dobu 17 h v případě CRE1/AHK4 kultury a 28 h v případě AHK3 kultury. Poté byly kultury zcentrifugovány a 50 µl alikvoty supernatantu byly přeneseny do mikrotitrační destičky obsahující 2 µl 50 mM 4-methyl umbelliferyl galaktosidu v každé jamce a následně inkubovány 1 h při 37 °C. Reakce byla zastavena přidávkem 100 µl 0,2 M Na₂CO₃. Fluorescence vzorků byla změřena spektrofotometrem Fluoroscanner Ascent (Labsystems, Finsko) při vlnových délkách 365 nm (excitace) a 460 nm (emisní). Bylo stanoveno OD₆₀₀ zbylé kultury a aktivita β-galaktosidasy byla vyjádřena jako nmol 4- methylumbelliferonu x OD₆₀₀⁻¹ x h⁻¹.

Hodnoty EC₅₀, tedy koncentrace látky aktivující receptor z 50 %, byla spočtena ze získaných křivek odezvy. V tabulce 10 jsou uvedené průměry ze tří opakování, celý test byl proveden nejméně dvakrát. Látky aktivující receptory méně než *trans*-zeatin (referenční látka) jsou zajímavé jako CKX inhibitory. Nové substituované 6-anilinopuriny vykazovaly mnohem menší afinitu k cytokininovým receptorům než *trans*-zeatin.

Tabulka 10

Účinek nových látek na aktivaci cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 and AHK3.

No.	Testované látky		EC ₅₀ (µmol.L ⁻¹)	
	R6	R2	CRE1/AHK4	AHK3
	<i>trans</i> -zeatin		0.9	2.1
	benzylamino		19.7	18.2
1	anilino	chloro	35.4	10
3	3-chloroanilino	chloro	7.5	20
4	4-chloroanilino	chloro	27.8	2.5
6	3-fluoroanilino	chloro	>50	33.3

7	4-fluoroanilino	chloro	n.i.	8.3
8	2-hydroxyanilino	chloro	50	31.7
9	3-hydroxyanilino	chloro	37.1	2.8
10	4-hydroxyanilino	chloro	26.7	44.4
11	2-methoxyanilino	chloro	>50	6.1
12	3-methoxyanilino	chloro	31.3	9.5
13	4-methoxyanilino	chloro	n.i.	6
30	3,4-dimethylanilino	chloro	33.3	>50
40	anilino	fluoro	46.2	19
42	3-chloroanilino	fluoro	21	31.6
43	4-chloroanilino	fluoro	39.8	27
45	3-fluoroanilino	fluoro	>50	42.1
46	4-fluoroanilino	fluoro	n.i.	22.5
47	2-hydroxyanilino	fluoro	>50	45.8
48	3-hydroxyanilino	fluoro	49.6	15
49	4-hydroxyanilino	fluoro	37.1	>50
50	2-methoxyanilino	fluoro	>50	17.4
51	3-methoxyanilino	fluoro	43	22.7
52	4-methoxyanilino	fluoro	n.i.	18.9
64	anilino	amino	n.i.	25.3
66	3-chloroanilino	amino	n.i.	43
67	4-chloroanilino	amino	n.i.	8.1
69	3-fluoroanilino	amino	n.i.	>50
70	4-fluoroanilino	amino	n.i.	19.5
71	2-hydroxyanilino	amino	>50	>50
72	3-hydroxyanilino	amino	>50	7.7
73	4-hydroxyanilino	amino	>50	>50
74	2-methoxyanilino	amino	n.i.	29
75	3-methoxyanilino	amino	n.i.	20.4
76	4-methoxyanilino	amino	n.i.	26.3
80	3-chloroanilino	thio	n.i.	42
81	4-chloroanilino	thio	n.i.	10.2
83	3-fluoroanilino	thio	n.i.	>50
88	3-methoxyanilino	thio	n.i.	31.7
96	3-chloroanilino	methylthio	41	29
98	3-fluoroanilino	methylthio	49	32
103	3-methoxyanilino	methylthio	>50	27.5
111	3-chloroanilino	methyl	n.i.	>50
113	3-fluoroanilino	methyl	n.i.	n.i.
118	3-methoxyanilino	methyl	n.i.	>50

n.i. znamená bez interakce

Příklad 23

Stimulační vliv nových látek na buněčné dělení rostlinných buněk

Stimulační vliv nově připravených derivátů byl testován v kalusovém biotestu za použití cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Tento cytokinin-dependentní tabákový kalus *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 byl udržován při 25 °C na modifikovaném mediu Murashige-Skoog obsahujícím na 1 litr: 4 μmol kys. nikotinové, 2,4 μmol pyridoxin hydrochloridu, 1,2 μmol thiaminu, 26,6 μmol glycinu, 1,37 μmol glutaminu, 1,8 μmol myo-inositolu, 30 g sacharosy, 8 g agaru, 5,37 μmol α-naftylactové kyseliny a 0,5 μmol 6-benzylaminopurinu. Subkultivace probíhala každé 3 týdny. Čtrnáct dní před započítáním biotestu byl kalus přenesen na médium bez 6-benzylaminopurinu. Stimulační růstová aktivita byla stanovena na základě nárůstu čerstvé hmoty kalusu po 4 týdnech kultivace. Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látka kinetin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10⁻³ M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10⁻⁸ až 10⁻⁴ M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat byla opět vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 11). 10⁻⁵ M koncentrace kontrolní látky kinetinu byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Výsledky v tabulce 11 naznačují, že substituce v poloze 2 a 6 purinového kruhu vedla k nárůstu cytokininové aktivity v kalusovém biotestu ve srovnání s klasickým cytokininem kinetinem (K).

Tabulka 11

Vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního tabákového kalusu *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38

č.	Testovaná sloučenina		maximální účinná koncentrace (mol.l ⁻¹)	aktivita (%) [10 ⁻⁵ mol.l ⁻¹ K = 100%]
	R6	R2		

C	furfurylamino	H	10^{-5}	100
3	3-chloroanilino	chloro	10^{-5}	110 (± 6)
4	4-chloroanilino	chloro	10^{-5}	102 (± 8)
6	3-fluoroanilino	chloro	10^{-5}	119.7 (± 8)
7	4-fluoroanilino	chloro	10^{-5}	112 (± 12)
9	3-hydroxyanilino	chloro	10^{-5}	116.2 (± 13)
11	2-methoxyanilino	chloro	10^{-5}	109 (± 5)
12	3-methoxyanilino	chloro	10^{-5}	102 (± 3)
40	anilino	fluoro	10^{-5}	108.1 (± 4)
42	3-chloroanilino	fluoro	10^{-5}	121 (± 8)
43	4-chloroanilino	fluoro	10^{-5}	130 (± 6)
45	3-fluoroanilino	fluoro	10^{-5}	127.9 (± 8)
46	4-fluoroanilino	fluoro	10^{-5}	110.7 (± 5)
48	3-hydroxyanilino	fluoro	10^{-5}	104.2 (± 3)
49	4-hydroxyanilino	fluoro	10^{-5}	106 (± 3)
50	2-methoxyanilino	fluoro	10^{-5}	117.6 (± 9)
51	3-methoxyanilino	fluoro	10^{-5}	120.5 (± 13)
52	4-methoxyanilino	fluoro	10^{-5}	105 (± 7)
80	3-chloroanilino	thio	10^{-5}	126 (± 5)
81	4-chloroanilino	thio	10^{-5}	115.7 (± 4)
83	3-fluoroanilino	thio	10^{-5}	102.5 (± 10)
88	3-methoxyanilino	thio	10^{-5}	103.4 (± 12)
96	3-chloroanilino	methylthio	10^{-5}	121.2 (± 18)
98	3-fluoroanilino	methylthio	10^{-5}	130.3 (± 17)
103	3-methoxyanilino	methylthio	10^{-5}	142.8 (± 21)
111	3-chloroanilino	methyl	10^{-5}	128.3 (± 6)
113	3-fluoroanilino	methyl	10^{-5}	125.3 (± 7)
118	3-methoxyanilino	methyl	10^{-5}	105.7 (± 5)

Příklad 24

Testování nových cytokininů v amarantovém biotestu

Pro studium cytokininové aktivity byl rovněž použit "amarantový" biotest v následující modifikaci. Semena *Amaranthus caudatus* var. Atropurpurea byla povrchově sterilizována 10% N-chlorbenzensulfonamidem (w/v) po dobu 10 min a poté promyta 5-krát deionizovanou vodou. Semena byla rozmístěna v 15 cm Petriho miskách s filtračním papírem saturovaným destilovanou vodou. Po 72 hodinách kultivace při 25 °C ve tmě byly ze semenáčků odstraněny kořeny. Tyto explantáty obsahující 2 kotyledony a hypokotyl byly umístěny do 5 cm Petriho misek na 2 vrstvy filtračního papíru nasyceného 1 ml inkubačního

média obsahujícího 10 μmol $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8, 5 μmol tyrosinu a testovaný cytokinin. Na miskou bylo umístěno 20 explantátů. Veškeré manipulace byly prováděny pod zeleným světlem v temné komoře. Po 48 hodinách inkubace při 25 °C ve tmě byl betacyanin extrahován cestou zmrazení explantátů v 3,33 μM kyselině octové. Koncentrace betacyaninu byla stanovena porovnáním absorbancí při 537 a 620 nm a vypočtena pomocí vzorce $\Delta A = A_{537\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. Hodnoty byly vyneseny do grafů závislosti ΔA na koncentraci. Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byl použit jako kontrolní látka kinetin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10^{-3} M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10^{-8} až 10^{-4} M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 8). 10^{-4} M koncentrace K byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Výsledky naznačují, že substituce v poloze 2 a 6 purinového kruhu vedla k nárůstu obsahu betacyaninu (purpurová barva) v explantátech kotyledonů/hypokotylů *Amaranthus caudatus* ve srovnání s klasickým cytokininem kinetinem (K).

Tabulka 12

Vliv nových cytokininů na obsah betacyaninu v explantátech kotyledonů/hypokotylů
Amaranthus caudatus.

č.	Testovaná sloučenina		maximální účinná koncentrace (mol.l^{-1})	Účinnost (%) [10^{-5}mol.l^{-1} K = 100%]
	R6	R2		
C	furfurylamino	H	10^{-5}	100
3	3-chloroanilino	chloro	10^{-5}	166 (± 4)
4	4-chloroanilino	chloro	10^{-5}	107 (± 8)
6	3-fluoroanilino	chloro	10^{-5}	120 (± 15)
7	4-fluoroanilino	chloro	10^{-5}	104 (± 4)
9	3-hydroxyanilino	chloro	10^{-5}	115.4 (± 18)
11	2-methoxyanilino	chloro	10^{-5}	110.3 (± 15)
12	3-methoxyanilino	chloro	10^{-5}	132.3 (± 14)

40	anilino	fluoro	10^{-5}	107 (± 5)
42	3-chloroanilino	fluoro	10^{-5}	121 (± 6)
43	4-chloroanilino	fluoro	10^{-5}	102.6 (± 1)
45	3-fluoroanilino	fluoro	10^{-5}	105.1 (± 13)
46	4-fluoroanilino	fluoro	10^{-5}	109 (± 8)
48	3-hydroxyanilino	fluoro	10^{-5}	100.3 (± 10)
50	2-methoxyanilino	fluoro	10^{-5}	105.2 (± 9)
51	3-methoxyanilino	fluoro	10^{-5}	117.2 (± 11)
64	anilino	amino	10^{-5}	125.2 (± 14)
66	3-chloroanilino	amino	10^{-5}	122 (± 5)
67	4-chloroanilino	amino	10^{-5}	141.7 (± 6)
69	3-fluoroanilino	amino	10^{-5}	113.2 (± 10)
70	4-fluoroanilino	amino	10^{-5}	136 (± 7)
72	3-hydroxyanilino	amino	10^{-5}	119.8 (± 15)
74	2-methoxyanilino	amino	10^{-5}	108 (± 13)
75	3-methoxyanilino	amino	10^{-5}	123.6 (± 19)
80	3-chloroanilino	thio	10^{-5}	106 (± 4)
81	4-chloroanilino	thio	10^{-5}	122.9 (± 5)
83	3-fluoroanilino	thio	10^{-5}	133.5 (± 11)
88	3-methoxyanilino	thio	10^{-5}	113.4 (± 15)
96	3-chloroanilino	methylthio	10^{-5}	145.8 (± 23)
98	3-fluoroanilino	methylthio	10^{-5}	142.5 (± 15)
103	3-methoxyanilino	methylthio	10^{-5}	156.4 (± 18)
11	3-chloroanilino	methyl	10^{-5}	121.7 (± 5)
113	3-fluoroanilino	methyl	10^{-5}	120.2 (± 6)
118	3-methoxyanilino	methyl	10^{-5}	144.2 (± 8)

Příklad 25

In vitro cytotoxická aktivita nových derivátů

Nízká cytotoxicita je nezbytná pro použití těchto látek v kosmetice. Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analýzu je metabolická aktivita životascopných buněk. Například mikrotitrační analýza, kde se používá Calcein AM, je dnes rozšířena jako metoda kvantifikace buněčné proliferace a cytotoxicity. Tento test je využíván v programech pro screening léků a pro testy chemosensitivity. Testem se rozpoznají pouze životascopné buňky. Množství zredukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životascopných buněk v kultuře.

Nulová cytotoxicita je základním předpokladem pro použití těchto látek v zemědělských aplikacích. Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 14). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie bylo působení nových sloučenin srovnatelné, kdežto nemaligní buněčné linie, tzn. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Sloučeniny uvedené v tab. 14 je možné rozdělit do 2 skupin. První skupina obsahuje "klasické cytokininy" reprezentované 6-substituovanými puriny (jejich působení je již známé). Druhá skupiny zahrnuje nové substituované 6-anilinopurinové deriváty. Tyto výsledky naznačují, že

Zpomalení vzniku, případně reverze senescentního fenotypu normálních lidských fibroblastů

V tomto příkladu byly pro studium β -galaktosidázové aktivity použity lidské diploidní fibroblasty (HCA buňky s rozdílnou úrovní pasažování: pasáž 25 - označení HCA25; pasáž 45 - označení HCA45; pasáž 80 - označení HCA80). Medium použité pro kultivaci buněk bylo odstraněno, buňky byly promyty 2-krát PBS a fixovány ve 2-3 ml fixačního činidla skládajícího se ze 2% formaldehydu a 0,2% glutaraldehydu v PBS. Buňky byly inkubovány při teplotě místnosti po dobu 5 min. a poté 2-krát promyty PBS. Buňky byly pak inkubovány při 37 °C (bez CO₂) po dobu 1 až 16 hodin ve 2-3 ml roztoku obsahujícího ferrikyanid draselný (5 mM), ferrokyanid draselný (5 mM), MgCl₂ (2 mM), X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) (1 mg/ml), v citrát/fosfátovém pufru, pH 6.0) Po této inkubační periodě byly buňky pozorovány mikroskopicky za účelem zjištění senescentních buněk anebo pro měření intenzity zabarvení při 415 nm spektrofotometricky pomocí readeru Multiscam MCC (Labsystems) (pozitivně senescentní buňky). V těchto experimentech byly označeny pouze senescentní buňky a to díky účinku β -galaktosidasy na substrát.

Tabulka 15

Vliv nových sloučenin na počet senescentních buněk v kultuře lidských fibroblastů

Sloučenina	Senescentní buňky (%)		
	HCA25	HCA50	HCA80
Kinetin	3	5	38
2-chloro-6-(4-hydroxyanilino)purin	4	6	22
2-chloro-6-(3-methoxyanilino)purin	5	5	24
2-chloro-6-(4-methoxyanilino)purin	4	3	26
2-chloro-6-(3-methoxy-4-hydroxyanilino)purin	4	6	25
2-amino-(4-hydroxyanilino)purin	3	4	21
2-methylthio-6-(4-hydroxyanilino)purin	4	6	34
2-fluoro-6-(4-hydroxyanilino)purin	3	4	18
2-fluoro-6-(3-methoxyanilino)purin	3	5	29
2-amino-6-(3-methoxyanilino)purin	4	4	22
2-chloro-6-(3-methoxy-4-hydroxyanilino)purin	4	6	31
2-amino-(4-hydroxyanilino)purin	4	4	18

Se zvyšujícím se počtem pasáží docházelo k zintenzivnění zabarvení. U nejstarších buněk byly pozorovány pouze buňky od jasně modré až po tmavě matnou barvu. Substituované 6-anilinopurinové deriváty byly obecně mnohem efektivnější než kinetin při udržování nižší hladiny senescentních buněk po 80 pasáží.

Příklad 27

Protizánětlivá aktivita nových substituovaných 6-anilinopurinů

Protizánětlivá aktivita několika substituovaných 6-anilinopurinů byla stanovena na buněčné línii krysího gliomu C6 (ATCC No. CCL107). Jako kontrola byl použit kinetin. Buňky byly pěstovány v jedné vrstvě v chemicky definovaném médiu bez přídavku séra. Kultivační médium mělo následující složení: Hamovo médium F10 / minimální esenciální médium (1:1 v/v), 2 mM L-glutamin, 1 % (v/v) minimální esenciální vitamíny (100x), 1 % (v/v) minimální neesenciální aminokyseliny (100x), 100 U/ml penicilin, 100 mg/ml streptomycin a 30 nM seleničitan sodný. Inkubace probíhala při 37 °C a 100 % vzdušné vlhkosti. Experimenty byly prováděny v logaritmické růstové fázi při hustotě buněk $2,5 \times 10^5$ buněk/cm².

Syntéza cAMP byla indukována přidávkem 5 mM (-)-isoproterenolu, který byl k buněčným kulturám přidáván zároveň s testovanou látkou. Inkubace probíhala 30 minut. cAMP bylo stanoveno pomocí ELISA (cAMP-enzyme immunoassay kit firmy Amersham). Hodnoty I_{50} byly odečteny z kalibrační křivky. Stanovení bylo provedeno v duplikátu. Výsledky byly následující:

Sloučenina	Protizánětlivá aktivita	
	I_{50} (μ M)	Účinek
Kinetin (6-furfurylaminopurin)	0	neaktivní
2-chloro-6-(2-hydroxyanilino)purin	25	Inhibice
2-chloro-6-(4-hydroxyanilino)purin	13	Inhibice
2-chloro-6-(3-methoxybenzylamino)purin	7	Inhibice
2-chloro-6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin	11	Inhibice

Substituované 6-anilinopuriny vykazaly protizánětlivou aktivitu. Kinetin byl neúčinný.

Příklad 28

Vliv látek na adheenci fibroblastů

Test adheční schopnosti buněk je jednou z metod hodnocení akutní toxicity látek vůči adherentním buňkám. Testovaná látka se přidá do média s definovaným počtem ztrypsinizovaných buněk a po stanovené době se spočítá počet buněk přisedlých ke dnu kultivační nádoby. V experimentu jsme použili lidské diploidní fibroblasty BJ (19. pasáž) ve standardním kultivačním médiu (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu a 10% fetálního telecího séra). Počty přisedlých buněk byly stanoveny po 6 hodinách. Experiment byl proveden v triplicátu. Výsledky ukazuje Obr.4.

Procento buněk adheroovaných k povrchu nebylo významně ovlivněno 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purinem v koncentračním rozmezí od 40 do 200 μ M, látka tedy nevykazuje vůči fibroblastům akutní toxicitu.

Příklad 29

Sledování in vitro viability lidských diploidních fibroblastů pomocí MTT

MTT test je standardní kolorimetrickou metodou pro měření proliferace a přežívání buněk. Žluté MTT je v metabolicky aktivních buňkách redukováno na fialový formazan a ten je stanoven spektrofotometricky. Diploidní lidské fibroblasty BJ (19. pasáž) byly vysety do 96 jamkové mikrotitrační desky v počtu 5 000 na jamku, po 6 hodinách bylo médium (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 10% fetálního telecího séra) odsáto a nahrazeno médiem obsahujícím testovanou látku v koncentračním rozmezí 0-200 µM. Každá koncentrace byla testována v pentaplikátu. MTT bylo k buňkám přidáno po 72 hodinách (finální koncentrace 0,5 mg/ml) a inkubace probíhala 3 hodiny. Obr. 5 ukazuje výsledky pro 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purin. Z výsledků vyplývá, že látka není pro lidské diploidní fibroblasty toxická.

Příklad 30

Sledování in vitro toxicity na lidských diploidních fibroblastech vyhodnocením růstové křivky

Diploidní lidské fibroblasty BJ (19. pasáž) byly vysety do 24 jamkového panelu po 10 000 buňkách na jamku. Po 6 hodinách bylo médium (DMEM obsahující 5g/l glukózy, 2mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 10% fetálního telecího séra) odsáto a nahrazeno médiem obsahujícím testovanou látku v koncentračním rozmezí 12,5-400 µM. Každá koncentrace byla testována v triplicátu. Počty buněk byly sledovány 12 dní. Z obrázku 6 je patrné, že sledovaná látka nevykazuje ve sledovaném časovém období toxicitu vůči lidským diploidním fibroblastům.

Příklad 31

Účinek na senescentní lidské diploidní fibroblasty

Přežití buněk: Senescentní diploidní lidské fibroblasty SNF20 (38. pasáž) byly vysety do 24 jamkového panelu po 10 000 buňkách na jamku. Po 6 hodinách bylo médium (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 10% fetálního telecího séra) odsáto a nahrazeno médiem obsahujícím testovanou látku v koncentračním rozmezí 12,5-400 µM. Každá koncentrace byla testována v triplicátu. Počty buněk byly odečteny 7. a 14. den.

Z obr. 7 je patrné, že 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purin v koncentracích do 200 µM nemá výrazný negativní vliv na přežití senescentních buněk ve sledovaném časovém intervalu.

Morfologie senescentních buněk:

Fibroblasty SNF20 (38. pasáž) byly kultivovány po dobu 14 a 30 dní v přítomnosti

<u>A1. Emulgovatelné koncentráty</u>	a)	b)	c)	d)
Směs aktivních složek	5%	10%	25%	50%
dodecylbenzensulfonát vápenatý	6%	8%	6%	8%
polyoxyethylovaný ricinový olej (polyglykol ether ricinového oleje) (36 mol ethylen oxid)	4%	-	4%	4%
oktylfenol polyglykol ether -	4 %	-	2 %	

(7-8 mol ethylen oxid)

cyklohexanon	-	-	10 %	20 %
směs aromatických uhlovodíků	85 %	78 %	55 %	16 %

C₉-C₁₂

Emulze o vyžadované finální koncentraci mohou být získány z takového koncentráту zředěním vodou.

<u>A2. Roztoky</u>	a)	b)	c)	d)
Směs aktivních složek	5 %	10 %	50%	90%
1-methoxy-3-(3-methoxy-propoxy)-propan	-	20 %	20%	-
polyethylenglykol MW 400	20%	10 %	-	-
N-methyl-2-pyrrolidon	-	-	30%	10%
směs aromatických uhlovodíků	75 %	60 %	-	-

C₉-C₁₂

Roztoky jsou vhodné k aplikaci ve formě mikrokapelek.

<u>A3. Smáčivé prášky</u>	a)	b)	c)	d)
Směs aktivních složek	5 %	25 %	50 %	80 %
lignosulfonát sodný	4 %	-	3 %	-
laurylsulfát sodný	2 %	3 %	-	4 %
diisobutylnaftalensulfonát sodný	-	6 %	5 %	6 %
oktylfenol polyglykol ether - (7-8 mol ethylen oxid)	1 %	2 %	-	-
vysoce disperzní kyselina křemičitá	1 %	3 %	5 %	10 %
kaolin	88 %	62 %	35 %	-

Aktivní složka je důkladně promísena s pomocnými látkami a směs je důkladně rozemleta ve vhodném mlýnu. Suspenzi libovolné koncentrace je možné získat smísením vzniklého prachu s vodou.

<u>A4. Potahované granule</u>	a)	b)	c)
Směs aktivních složek	0.1 %	5%	15%
vysoce disperzní kyselina křemičitá	0.9 %	2 %	2 %
anorganický nosič	99.0 %	93 %	83 %

(0,1 -1 mm)

např. CaCO₃ nebo SiO₂

Aktivní složka je rozpuštěna v methylenchloridu a nasprejována na nosič. Rozpouštědlo je odpařeno ve vakuu.

<u>A5. Potahované granule</u>	a)	b)	c)
Směs aktivních složek	0.1 %	5 %	15 %
polyethylenglykol MW 200	1.0 %	2 %	3 %
vysoce disperzní kyselina křemičitá	0.9 %	1 %	2 %
anorganický nosič	98.0 %	92 %	80 %
(AE 0,1 -1 mm)			
např. CaCO ₃ nebo SiO ₂			

Jemně rozemletá aktivní složka je v mixéru stejnoměrně nanесena na nosič zvlhčený polyethylenglykolem. Takto jsou získány neprašné granule.

<u>A6. Extrudované granule</u>	a)	b)	c)	d)
Směs aktivních složek	0.1 %	3 %	5 %	15 %
lignosulfonát sodný	1.5 %	2 %	3 %	4 %
karboxymethylcelulosa	1.4 %	2 %	2 %	2 %
kaolin	97.0 %	93 %	90 %	79 %

Aktivní složka je smíšena a rozemleta s pomocnými látkami a složka je zvlhčena vodou. Směs je extrudována a usušena v proudu vzduchu.

<u>A7. Prachy</u>	a)	b)	c)
Směs aktivních složek	0.1 %	1 %	5 %
talek	39.9 %	49 %	35 %
kaolin	60.0 %	50 %	60 %

Prachy k přímému použití jsou získány rozemletím aktivní složky s nosičem ve vhodném mlýnu.

<u>A8. Suspenzní koncentrát</u>	a)	b)	c)	d)
Směs aktivních složek	3%	10%	25%	50%
ethylen glykol	5 %	5 %	5 %	5%
nonylfenol polyglykol ether- (15 mol ethylen oxid)	1 %	2 %	-	
lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
karboxymethylcelulosa	1 %	1 %	1 %	1%
37 % vodný roztok formaldehydu	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2%
emulze silikonového oleje	0.8 %	0.8 %	0.8 %	0.8%

voda 87 % 79 % 62 % 38%

Jemně rozemletá aktivní složka je smíchána s pomocnými látkami. Vzniklý suspenzní koncentrát umožňuje přípravu suspenze o požadované koncentraci zředěním vodou.

Příklad 34

Gel

Názvy složek jsou uváděna v souladu s terminologií registračních úřadů. Složky jsou uváděny v gramech na 100 g.

Gel		/100 g
Aktivní látka 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purin	(2Cl4OHAP)	1,0 g
butylhydroxytoluen	(Nipanox BHT)	0,2 g
butylparaben	(Nipabutyl)	0,2 g
diethylenglykol monoethyl ether	(Transcutol P)	10,0 g
bezvodá koloidní silika	(Zeopharm 177)	5,0 g
propylenglykol laurát	(Lauroglycol FCC)	83,6 g

Konzistence gelu může být dále modifikována přidáním bezvodé koloidní siliky.

Účinek aktivní látky může být zvýšen pomocí transdermálního systému Transcutol P/Lauroglycol FCC. Bezvodá koloidní silika pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky, což povede k protražovanému účinku.

Příklad 35

Příprava přípravku určeného k aplikaci na kůži (mast)

Názvy složek jsou uváděna v souladu s terminologií registračních úřadů. Složky jsou uváděny v gramech na 200 g

		/200 g
aktivní látka 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purin	(2Cl4OHAP)	2,0 g
butylhydroxytoluen	(Nipanox BHT)	0,4 g
200018035611NP		
butylparaben	(Nipabutyl)	0,4 g
diethylenglykol monoethyl ether	(Transcutol P)	20,0 g

44

glycerol dibehenát	(Compritol 888 ATO)	44,0 g
3123/04		
propylenglykol laurát	(Lauroglycol FCC)	133,2 g
3219/00		

Doporučený postup

Fáze A

2 gramy účinné látky byly rozpuštěny ve 20 g Transcutolu P stálým mícháním v oddělené skleněné nebo nerezové ocelové nádobě při laboratorní teplotě. Rozpouštění může být urychleno zahříváním na maximálně 40 °C.

Fáze B

0,4 gramu Nipanox BIIT a 0,4 g Nipabutylu byly rozpuštěny za stálého míchání při teplotě přibližně 70°C v 133,2 g Lauroglycol FCC. Operace byla provedena v oddělené skleněné nebo nerezové ocelové nádobě. Čirý olejovitý roztok byl zahřát na přibližně 80 °C a v něm bylo za míchání roztaveno 44 g Compritolu 888 ATO. Vzniklý roztok byl ochlazen na přibližně 60 °C a během stálého míchání chladnoucího roztoku smíchán s fází A. Vzniklá bělavá masťovitá hmota byla rozdělena po 15 gramech do plastových nádobek

Příklad 36

Příprava přípravku pro topickou aplikaci na kůži

Složení topického přípravku určeného k aplikaci na kůži (hmotnostní procenta):

Aktivní látka 2-chlor-6-(4-hydroxyanilino)purin (2Cl4OHAP) 0,1 %

Olejová fáze

Cetyl alkohol	5,0 %
Glyceryl monostearát	15,0 %
Sorbitan monooleát	0,3 %
Polysorbát 80 USP	0,3 %

Vodná fáze

Methylcelulosa 100 cps	1,0 %
Methyl paraben	0,25 %

45

Propyl paraben

0,15 %

Destilovaná voda

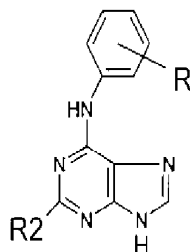
kvantitativně do 100 %

Methylcelulosa byla rozpuštěna ve vodě obsahující methyl a propyl paraben. Směs pak byla zahřata na 72 °C a přimíchána k olejové fázi o teplotě 70 °C. Účinná látka 2Cl4OHAP byla přidána po ochlazení směsi na 35°C a míchána do vychlazení.

Tento přípravek je určen k aplikaci na kůži na přinejmenším denní bázi dokud se nedostaví požadovaný příznivý efekt (omlazovací účinek).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I



I

a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy
ve formě racematů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami,
ve kterých

R znamená 1 až 5 substituentů nezávisle vybraných ze skupiny zahrnující vodík, halogen,
hydroxyl, amino, alkyloxy a alkylovou skupinu,

R2 znamená amino, halogen, nitro, thio, alkylthio nebo alkylovou skupinu
pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy.

2. Substituované 6-anilinopurinové deriváty podle nároku 1 obecného vzorce I ze
skupiny zahrnující 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-
anilinopurin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-
chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-
chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-
chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-
fluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-
fluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-
fluoroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio)-6-(2-
bromoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-
bromoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-
bromoanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-
methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-
methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-
methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-

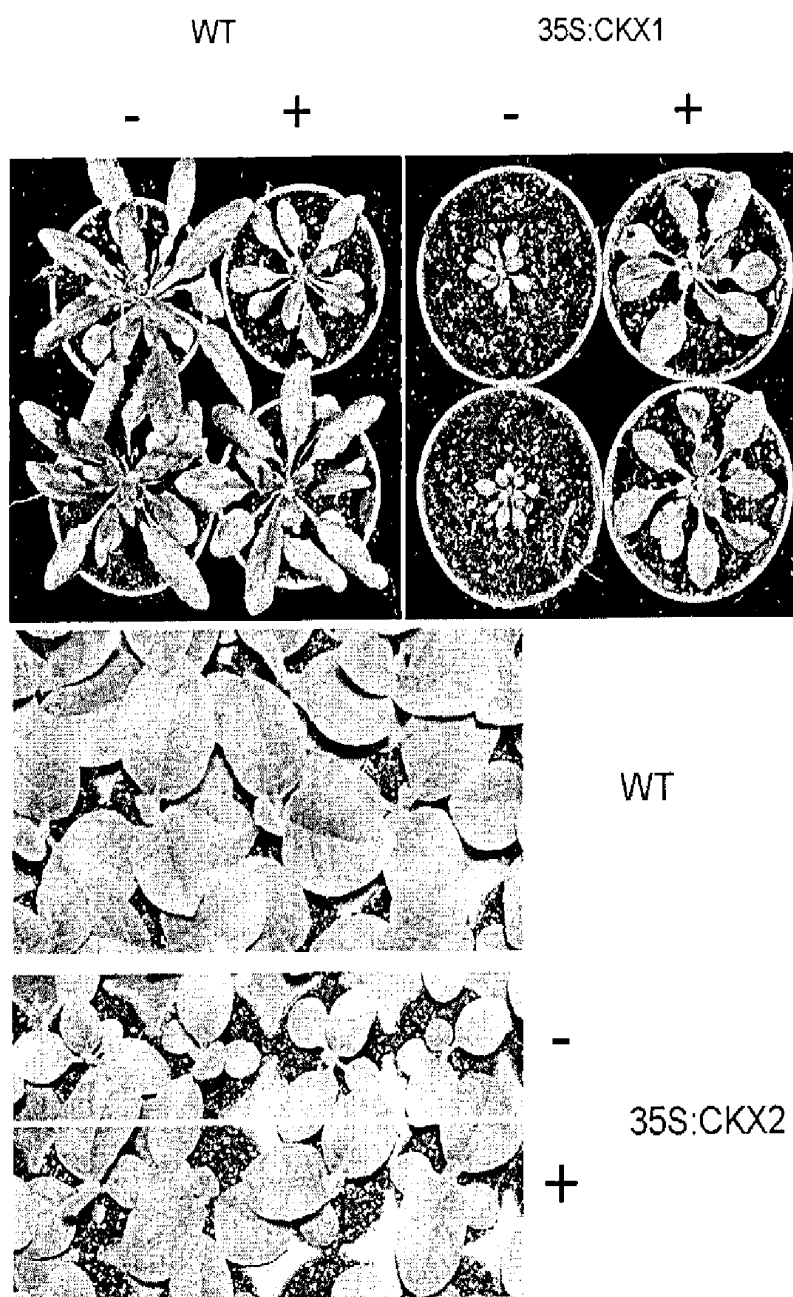
methylthio, methyl)-6-(3,5-dihydroxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-2-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-4-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-5-methylanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-2-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-hydroxy-4-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-5-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, hydroxy, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-4-methoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, bromo, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-5-methoxyanilino)purin, 2-(amino, chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-bromo-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-methoxy-3-chloroanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-methoxy-4-chloroanilino)purin, a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racematů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy.

3. Substituované 6-anilinopurinové deriváty podle nároku 2 obecného vzorce I ze skupiny zahrnující s výhodou 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-hydroxy-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-chloro-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(2-bromo-3-methoxyanilino)purin, 2-(chloro, fluoro, bromo, amino, nitro, thio, methylthio, methyl)-6-(4-hydroxyanilino)purin, a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racematů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy.

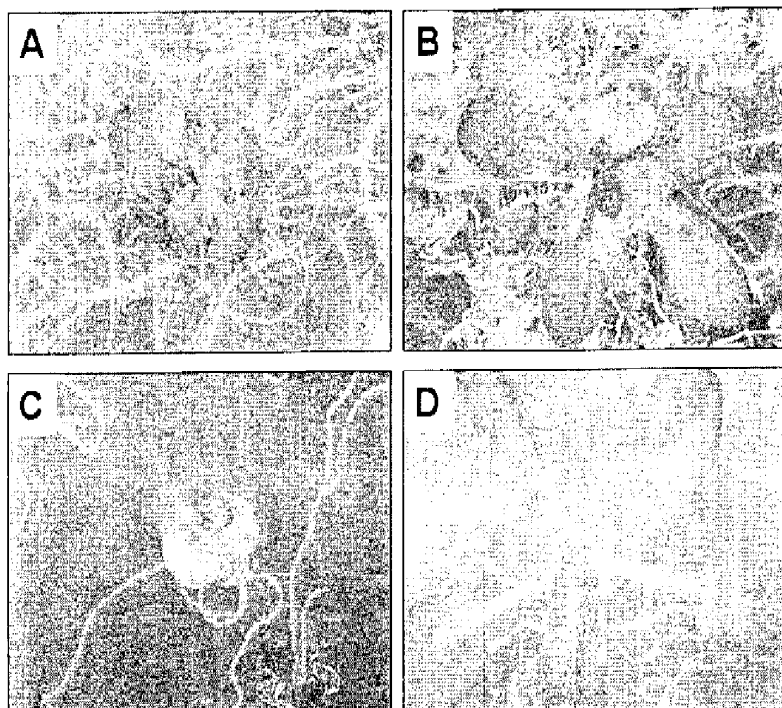
4. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití jako inhibitorů cytokinin oxidasy, zejména pro zpomalení senescence buněk rostlin, živočichů, mikroorganismů, kvasinek a hub.
5. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako inhibitoru cytokinin oxidasy pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, zejména keratinocytů a fibroblastů.
6. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy ve tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.
7. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.
8. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.
9. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy na potlačení imunostimulace nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.
10. Substituované 6-anilinopurinové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití jako inhibitory cytokinin oxidasy při produkci užitkových rostlin
11. Kosmetické, farmaceutické a růstově-regulační přípravky, vyznačující se tím, že obsahují alespoň jeden substituovaný 6-anilinopurinový derivát obecného vzorce I nebo jeho sůl s alkalickým kovem, amoniakem či aminem ve formě racemátu nebo opticky aktivního isomeru, nebo jeho adiční soli s kyselinou, včetně pomocných látek.

12. Použití substituovaného 6-anilinopurinového derivátu obecného vzorce I nebo jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami pro přípravu přípravku pro použití pro inhibici cytokinin oxidasy.

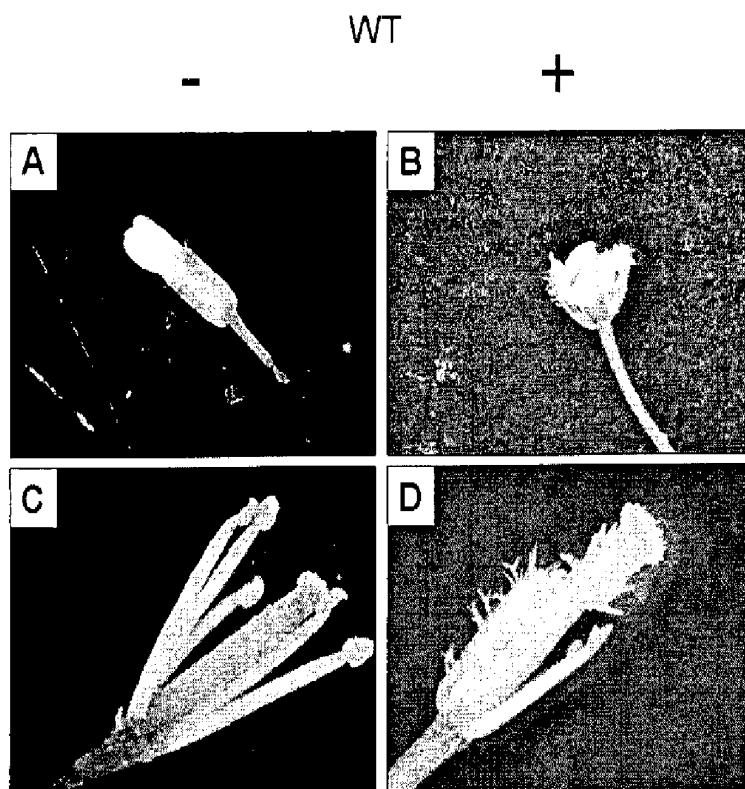
Obr. 1: Obnovení přirozeného fenotypu po systematické aplikaci látky 12 na CKX nadprodukující rostliny. + znamená ošetřeno, - neošetřeno.



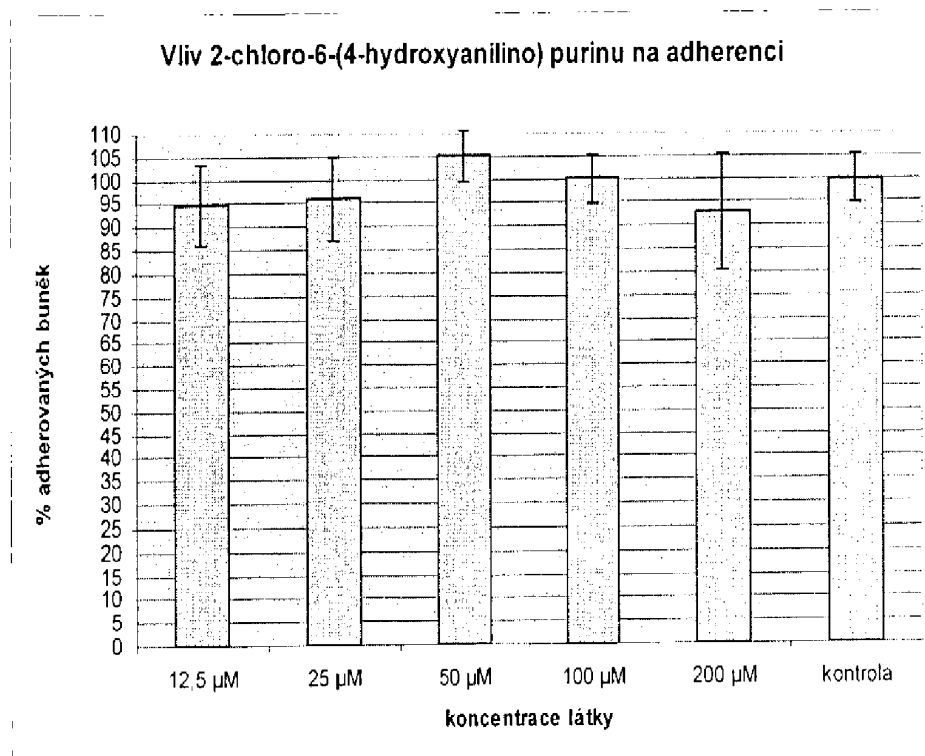
Obr. 2: Srovnání účinku cytokininu a CKX inhibitoru na obnovení přirozeného fenotypu AtCKX1 semenáčků Arabidopsis. (A) AtCKX1, (B) AtCKX1 kultivované na 0,1 μ M látky **12**, (C) AtCKX1 kultivované na 0,1 μ M BAP, (D) kontrolní rostlina s přirozeným fenotypem.



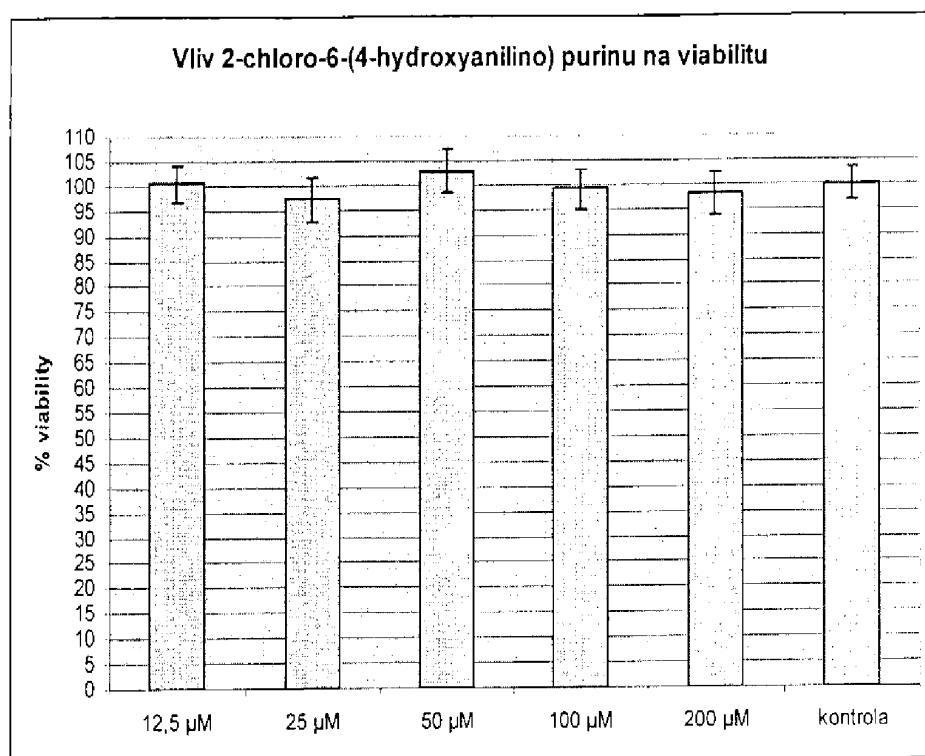
Obr. 3: Účinek látky 12 na kvetení rostlin *Arabidopsis*.



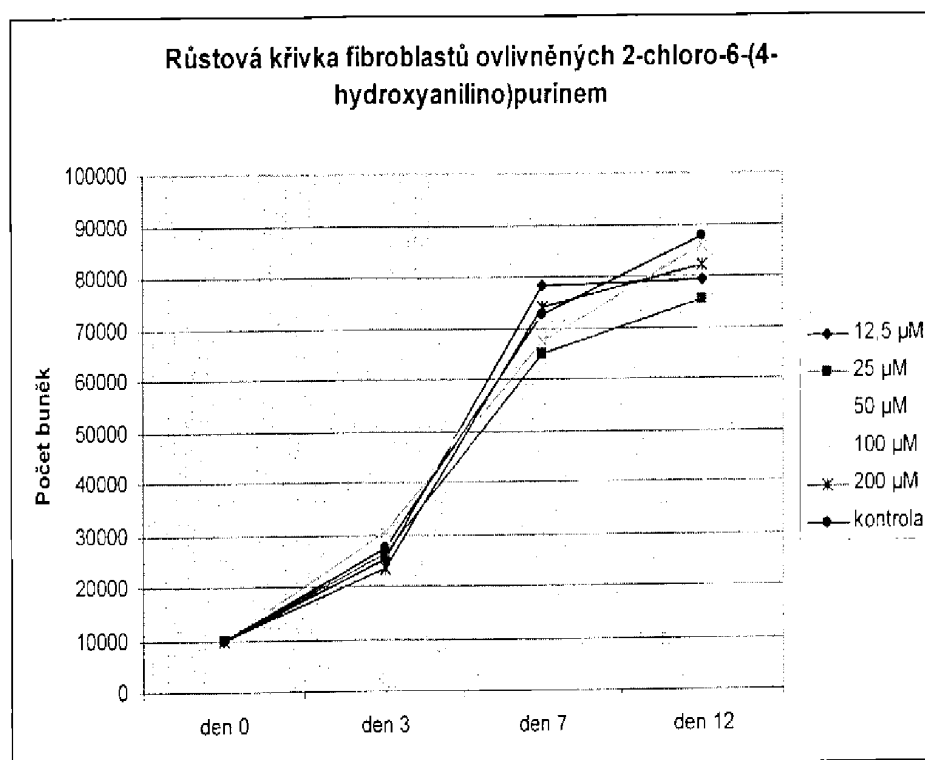
Obr. 4: Vliv 2-chloro-6-(4-hydroxyanilino) purinu na adherenci buněk *Hodnoty uvedeny relativně vzhledem ke kontrole.*



Obr. 5: Vliv 2-chloro-6-(4-hydroxyanilino)purinu na viabilitu buněk po 3 dnech. Hodnoty uvedeny relativně vzhledem ke kontrole.



Obr. 6: Růstová křivka lidských diploidních fibroblastů BJ ovlivněných 2-chloro-6-(4-hydroxyanilino)purinem



Obr. 7: Počet buněk po 7 a 14 denním působení 2-chloro-6-(4-hydroxyanilino)purinu. Hodnoty uvedeny relativně vzhledem ke kontrole.

