



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1556808 B

(45) 授权公告日 2010.04.28

(21) 申请号 02818552.8

A61K 31/52(2006.01)

(22) 申请日 2002.08.01

A01N 43/90(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(30) 优先权数据

PV2001-2818 2001.08.02 CZ

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004.03.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CZ2002/000045 2002.08.01

(87) PCT申请的公布数据

W02003/040144 EN 2003.05.15

(73) 专利权人 捷克共和国乌兹塔夫实验植物学
会

地址 捷克共和国布拉格

(72) 发明人 K·多莱扎尔 I·波帕 J·霍卢布

R·莱诺贝尔 S·韦布洛克

M·斯特尔纳德 M·扎特卢卡尔

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司
11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

C07D 473/00(2006.01)

A61K 8/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1068033 A, 1993.01.20, 说明书第12页
第3-12行, 第15页第10行-第27行, 权利要求
1-8.

WO 0149688 A1, 2001.07.12, 说明书第30页
第1-16行, 第42页第34行-第44页第7行,
实施例1, 权利要求1、6、15-25.

EP 0540854 A2, 1992.09.09, 说明书8-12
页, 权利要求1、2.

郭春, 方林, 李文. 6-苄氨基嘌呤的合成. 精
细化工 15 1. 1998, 15(1), 31-33.

审查员 杨轶

权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 9 页

(54) 发明名称

含有基于 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物的化
妆品

(57) 摘要

基于 N⁶-取代腺嘌呤的新杂环衍生物及其制
备方法, 该衍生物具有对于植物、动物和人类细胞
的抗癌、有丝分裂、免疫抑制和抗衰老性能。也包
括药物组合物、化妆品制剂和生长调节剂, 它们包
含这些衍生物作为活性化合物, 以及在生物技术
过程、化妆品和农业中将这衍生物用于制备药
物、化妆品制剂的用途。

1. 一种化妆品,其含有 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物,其中所述化合物选自 6-(2-羟基苄基氨基)嘌呤、6-(3-羟基苄基氨基)嘌呤、6-(4-羟基苄基氨基)嘌呤、6-(2-羟基-4-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(2-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(3-羟基-4-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(4-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(2-羟基-3-甲基苄基氨基)嘌呤、6-(2-羟基-3-氯苄基氨基)嘌呤、6-(2,6-二羟基-4-氯基苄基氨基)嘌呤、6-(2,3-二羟基-4-氯基苄基氨基)嘌呤、6-(2,5-二羟基-4-氯基苄基氨基)嘌呤、6-(2,3-二羟基-4-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(2,5-二羟基-4-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(2,6-二羟基-4-甲氧基苄基氨基)嘌呤、6-(2-氨基-6-氯苄基氨基)嘌呤、6-(3-氨基-4-氯苄基氨基)嘌呤、6-(2,3-二氨基-4-氯苄基氨基)嘌呤、6-(3-氯-5-氨基苯胺基)嘌呤、6-(3-氨基-4-氯苯胺基)嘌呤、6-(3-氯-4-氨基苯胺基)嘌呤、2-氨基-6-(3-羟基苄基氨基)嘌呤、2-氯-6-(3-羟基苄基氨基)嘌呤、2-甲基硫代-6-(3-羟基苄基氨基)嘌呤、6-(3-氯-5-氨基苯胺基)嘌呤或其酸盐,所述化妆品含有药学上的载体。

2. 用于抑制哺乳动物表皮细胞老化或衰老的化妆品,其含有根据权利要求 1 所述的化合物。

3. 根据权利要求 2 所述的化妆品,用于抑制角质化细胞或成纤维细胞的老化或衰老。

含有基于 N⁶- 取代腺嘌呤的杂环化合物的化妆品

发明领域

[0001] 本发明涉及基于 N⁶- 取代腺嘌呤的新杂环衍生物及其制备方法, 该衍生物具有对于植物、动物和人类细胞的抗癌、有丝分裂、免疫抑制和抗衰老性能, 及其作为药物、药物组合物的用途, 这些药品、医药组合物包含这些衍生物作为活性化合物, 以及将这些衍生物用于药品的制备、化妆品的制备、生物技术方法、用于化妆品中和用于农业中。

背景技术

[0002] 现已充分证实的植物调节化合物是植物激素。在这些植物激素中占有重要位置的是细胞分裂素。在结构上, 所有的天然形成的细胞分裂素属于 N⁶- 取代腺嘌呤衍生物的同系组, 它们在许多不同的发育过程中起着重要作用, 这些发育过程包括细胞分裂、生长和分化, 以及花和果实的发育。它们可以中断种子休眠, 抑制顶端优势和刺激侧枝的生长, 延迟细胞老化, 增加耐应力性, 影响细胞膜渗透性和引起各种代谢物在其应用位置上的积累 (Letham a Palni 1983-Ann. Rev. Plant. Physiol. 34 :163-197, 1983, Mok, D. W. S. , Mok, M. C. :细胞分裂素 :化学, 活性和功能。CRC Press, Boca Raton, 伦敦, 东京 1994)。

[0003] 在植物组织培养物中, 它们与植物生长素的相互作用在细胞分裂的刺激和细胞分化的调节中是特别重要的 (Skoog, Miller 1957)。细胞分裂素作为一组植物生长调节剂的一般定义也是基于这个效果 (Skoog, F. , Armstrong, D. J. :Cytokinins. -Ann. Rev. Plant Physiol. 21 :359-384, 1970)。6- 苄基氨基嘌呤 (BAP), 与激动素一起, 通常用作植物体外培养物的活性细胞分裂素。此化合物长时间以来被认为是纯合成的, 然而, 近来证实它天然存在于植物中。通常也将具有有限或不具有生物活性的化合物称为细胞分裂素 (7- 和 9- 葡萄糖苷, 氨基酸共轭物, tRNA 中的一些高改性细胞分裂素)。由此原因, 结构上衍生自 N⁶- 取代腺嘌呤的化合物也在本申请中称为细胞分裂素。

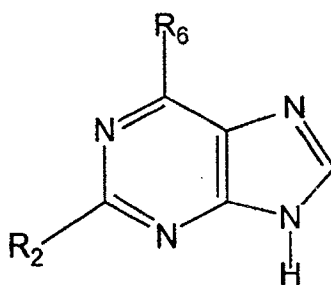
[0004] 由于地球上所有的生物已经在一起进化发育数百万年, 可以假定植物化合物的相互调节作用如细胞分裂素存在于动物和人类中。细胞分裂素衍生的化合物可能影响动物和人体细胞中的许多不同分子机理。我们近来发现, 新一代的抗炎、抗癌、免疫抑制、抗病毒和其它药物可以基于 N⁶- 取代腺嘌呤和它们的衍生物。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供抗癌、免疫抑制、生长调节、形态形成活性和抗衰老杂环化合物, 该化合物具有改进选择性和效率指数, 即与迄今为止已知的类似物相比, 毒性较低而更加有效。

[0006] 本发明的目的是一种用于药物、化妆品和生长调节剂的如通式 I 的基于 N⁶- 取代腺嘌呤的杂环化合物及其药用盐,

[0007]



I

[0008] 其中

[0009] R₂ 是氢、卤素、羟基、烷氧基、氨基、1,2-亚肼基、巯基、羧基、氰基、硝基、酰氨基、磺基、磺酰氨基、酰基氨基、酰氧基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基巯基、环烷基和氨基甲酰基，

[0010] R₆ 是 R₆'-X，

[0011] 其中 X 是 -NH-；

[0012] R₆' 是取代苯基或取代苄基；

[0013] 然而类属取代基具有与在此方面中定义的相应基团定义相同的意义，其中

[0014] “取代苯基”表示被 1-5 个官能团取代的苯基，所述官能团选自包含在此定义的卤素、烷基、羟基、氨基、酰氨基、氨基甲酰基氨基、1,2-亚肼基、巯基、烷氧基、氨基巯基、烷基氨基、酰基氨基、羧基、硝基、磺基的群组；

[0015] “取代苄基”表示苯甲基基团，其中该苯基被 1-5 个官能团取代，此处所述的官能团选自包含在此定义的卤素、氨基、酰氨基、氨基甲酰基氨基、1,2-亚肼基、酰氧基、烷基、烷氧基、烷基巯基、烷基氨基、酰基氨基、羧基、芳基、硝基、巯基、磺基或羟基的群组；

[0016] 然而类属取代基具有与在此方面中定义的相应基团定义相同的意义，其中

[0017] “卤素”表示氟、溴、氯和碘原子；

[0018] “羟基”表示基团 -OH；

[0019] “巯基”表示基团 -SH；

[0020] “烷基”表示支化或未支化 C₁-C₆ 链，该 C₁-C₆ 链是饱和或不饱和的，选自包含甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基、烯丙基、乙烯基、乙炔基、炔丙基、己-2-基的群组；

[0021] “取代烷基”表示包括 1-5 个取代基的刚刚所述烷基，此处所述取代基选自包含羟基、巯基、烷基巯基、卤素、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、1,2-亚肼基、氨基甲酰基、酰基氨基、羧基、磺基、胍基的群组，因此这些基团可以连接到烷基部分的任何碳原子上；

[0022] “烷氧基”表示基团 -OR，其中 R 是在此定义的烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、环烷基、取代环烷基、环杂烷基或取代环杂烷基；

[0023] “烷基巯基”表示基团 -SR，其中 R 如对于“烷氧基”中所定义；

[0024] “磺基”表示基团 -SO₃R，其中 R 是 H、在此定义的烷基或取代烷基；

[0025] “磺酰氨基”表示基团 -SO₂NRR'，其中 R 和 R' 是 H、烷基或取代烷基；

[0026] “酰基”表示 -C(=O)R，其中 R 是氢、在此定义的烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、环烷基、取代环烷基；

[0027] “烷基氨基”表示基团 -NRR'，其中 R 和 R' 可以独立地是氢、在此定义的烷基、取代

烷基、芳基、取代芳基、杂芳基或取代杂芳基；

[0028] “酰氨基”表示基团 $-C(O)NRR'$ ，其中 R 和 R' 可以独立地是氢、在此定义的烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂芳基或取代杂芳基；

[0029] “羧基”表示基团 $-C(O)OR$ ，其中 R 是氢、在此定义的烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂芳基或取代杂芳基；

[0030] “酰基氨基”表示基团 $-NHCOR$ ，其中 R 是在此定义的烷基、取代烷基、杂环烷基、芳基、取代芳基、杂芳基和取代杂芳基；

[0031] “氨基甲酰基氨基”表示基团 $NHCOOR$ ，其中 R 是烷基或芳基；

[0032] “芳基”或“ar”表示含有至少一个芳族环的芳族碳环基团，如苯基或联苯或多个稠环，其中至少一个环是芳族的如 1,2,3,4- 四氢萘基、萘基、蒽基、或菲基；

[0033] “取代芳基”表示可选择地由 1-5 个官能团取代的刚刚所述的芳基，该官能团选自包含在此定义的卤素、烷基、羟基、氨基、酰基氨基、氨基甲酰基氨基、1,2- 亚肼基、巯基、烷氧基、烷基巯基、烷基氨基、酰氨基、羧基、硝基、磺基的群组；

[0034] “杂环”表示在环中含有至少一个杂原子不饱和或芳族碳环基团，所述杂原子选自包含 N、O 或 S 的群组；所述环是单环并选自包含吡喃基、吡啶基或呋喃基或多个稠环的群组，其中所述稠环选自包含喹啉基、嘌呤基、喹啉基或苯并呋喃基的群组，它们可选择是未取代的或由如下基团取代：在此定义的卤素、氨基、羟基、氰基、硝基、巯基、烷氧基、烷基氨基、酰基氨基、氨基甲酰基氨基、酰氧基、烷基巯基、羧基、酰氨基、磺基、磺酰氨基；

[0035] “杂芳基”是其中至少一个杂环是芳族的杂环基团；

[0036] “取代杂芳基”表示可选择地由 1-5 个官能团单或多取代的杂环，该官能团是选自包含在此定义的卤素、氨基、羟基、氰基、硝基、巯基、烷氧基、烷基氨基、酰基氨基、氨基甲酰基氨基、酰氧基、烷基巯基、羧基、酰氨基、磺基、磺酰氨基的群组；

[0037] “芳烷基”表示基团 $-R-Ar$ ，其中 Ar 是芳基和 R 是烷基或取代烷基，其中芳基可选择为未取代的或由选自包含以下基团的群组的基团取代：在此定义的卤素、氨基、酰基氨基、氨基甲酰基氨基、1,2- 亚肼基、酰氧基、烷基、羟基、烷氧基、烷基巯基、烷基氨基、酰氨基、羧基、芳基、硝基、巯基、磺基；

[0038] “环烷基”表示包含 3-15 个碳原子的二价环状或多环烷基；

[0039] “取代环烷基”表示包括 1-5 个取代基的环烷基，该取代基选自包含之前在此定义的卤素、氨基、羟基、氰基、硝基、巯基、烷氧基、烷基氨基、酰基氨基、氨基甲酰基氨基、酰氧基、烷基巯基、羧基、酰氨基、磺基、磺酰氨基的群组；

[0040] “环杂烷基”表示在此定义的环境基，其中至少一个环亚甲基由选自以下的基团替代：NH、OH、SH；

[0041] “取代环杂烷基”指的是在此定义的环境基，其包含 1-5 个取代基，该取代基选自包含之前在此定义的卤素、氨基、羟基、氰基、硝基、巯基、烷氧基、烷基氨基、酰基氨基、氨基甲酰基氨基、酰氧基、二烷基氨基、烷基巯基、羧基、酰氨基、磺基、磺酰氨基的群组；

[0042] 条件是 R6' 不是二羟基苄基或二羟基苯基。

[0043] 如下的衍生物是特别优选的，即：6-(2- 氟苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 氟苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 氟苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 溴苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 溴苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 溴苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 碘苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 氯苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 氯苄基氨基)

基) 嘌呤、6-(4- 氯苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 硝基苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 碘苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 硝基苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 硝基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 甲基苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 甲基苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 甲基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 羟基苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 羟基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,3- 二羟基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,4- 二羟基苄基氨基) 嘌呤、6-(3,4- 二羟基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 羟基-4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 羟基-3- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 羟基-4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(4- 羟基-3- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 羟基-3- 甲基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 羟基-3- 氯苄基氨基) 嘌呤、6-(2,6- 二羟基-4- 氯基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,3- 二羟基-4- 氯基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,5- 二羟基-4- 氯基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,3- 二羟基-4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,5- 二羟基-4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,6- 二羟基-4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤、6-(3,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤、6-(2,3,4- 三氟苄基氨基) 嘌呤、6-(2,4- 二氟苄基氨基) 嘌呤、6-(3,5- 二氟苄基氨基) 嘌呤、6-(3-(三氟甲基) 苄基氨基) 嘌呤、6-(2-(三氟甲基) 苄基氨基) 嘌呤、6-(4-(三氟甲基) 苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 氯-4- 氟苄基氨基) 嘌呤、6-(3,4- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(3,5- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,3- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,4- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2,4,6- 三甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(3,4,5- 三甲氧基苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 氨基-6- 氯苄基氨基) 嘌呤、6-(3- 氨基-4- 氯苄基氨基) 嘌呤、6-(2,3- 二氨基-4- 氯苄基氨基) 嘌呤、6-(2- 溴苯胺基) 嘌呤、6-(3- 溴苯胺基) 嘌呤、6-(4- 溴苯胺基) 嘌呤、6-(2- 氯苯胺基) 嘌呤、6-(3- 氯苯胺基) 嘌呤、6-(4- 氯苯胺基) 嘌呤、6-(2- 氟苯胺基) 嘌呤、6-(3- 氟苯胺基) 嘌呤、6-(4- 氟苯胺基) 嘌呤、6-(2- 碘苯胺基) 嘌呤、6-(2- 甲氧基苯胺基) 嘌呤、6-(3- 甲氧基苯胺基) 嘌呤、6-(4- 甲氧基苯胺基) 嘌呤、6-(2- 甲基苯胺基) 嘌呤、6-(4- 甲基苯胺基) 嘌呤、6-(3- 甲基苯胺基) 嘌呤、6-(3- 氯-5- 氨基苯胺基) 嘌呤、6-(3- 羧基-4- 氯苯胺基) 嘌呤、6-(3- 氨基-4- 氯苯胺基) 嘌呤、6-(3- 氯-4- 氨基苯胺基) 嘌呤、6-(3- 氯-4- 羧基苯胺基) 嘌呤、6-(3- 羧基-4- 羟基苯胺基) 嘌呤、2- 氨基-6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤、2- 氯-6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤、2- 甲基硫代-6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤。

[0044] 用于通式 I 化合物制备的开始材料是 6- 氯嘌呤,从次黄嘌呤(hypoxantin)使用 POCl_3 根据文献(Davoll and Blowy, J. Am. Chem. Soc. 73 :2936(1957)) 合成 6- 氯嘌呤或市购 6- 氯嘌呤(Sigma, Aldrich, Fluka)。

[0045] 用于通式 I 化合物制备的另一种开始材料是 6- 溴嘌呤,从次黄嘌呤使用亚硝酸正戊酯在三溴甲烷中合成 6- 溴嘌呤,或市购 6- 溴嘌呤。

[0046] 本发明也涉及一种具有通式 I 的基于 N^6 - 取代腺嘌呤的杂环化合物及其医药上可接受的盐,其用于药物。

[0047] 本发明进一步涉及一种具有通式 I 的基于 N^6 - 取代腺嘌呤的杂环化合物,其用于植物、哺乳动物、微生物、酵母和真菌细胞生长调节剂。

[0048] 本发明也涉及一种具有通式 I 的基于 N^6 - 取代腺嘌呤的杂环化合物,其用于化妆品。

[0049] 本发明的目的也是一种药物、化妆品或生长调节剂,它们包含具有通式 I 的化合

物或其药学上可接受的盐,包括药物载体。

[0050] 本发明的进一步目的是将根据权利要求 1 基于具有通式 I 的 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物用来制备如下物质的用途:亲合力吸收基质、用于工艺控制的固定化酶、免疫测定试剂、诊断样品、以及由 ¹⁴C、³H、抗生素蛋白或生物素标记的化合物和寡核苷酸。

[0051] 本发明也涉及一种药物,其包括具有通式 I 的化合物或其医药上可接受的盐,并包括药物载体,其预定用作有丝分裂或抗有丝分裂化合物,特别是用于治疗癌症、牛皮癣、类风湿性关节炎、狼疮、I 型糖尿病、多发性硬化症、再狭窄、多囊性肾病、移植物排斥、移植物抗宿主反应病和痛风、寄生虫病如由真菌或原生生物引起的那些、或阿尔茨海默氏病、或作为抗神经产生性药物、或用于抑制免疫刺激或用于增生性皮肤病的治疗。

[0052] 本发明的目的进一步是将根据权利要求 1 基于具有通式 I 的 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物用于农业中作为生长调节剂,特别用于增加农产品产量和质量。

[0053] 本发明也涉及具有通式 I 的基于 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物,用作抑制哺乳动物表皮细胞(如角化细胞或成纤维细胞)老化或衰老的化妆品。

[0054] 本发明的进一步目的是使用具有通式 I 的基于 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物在细胞培养中作为生长调节剂以刺激增殖和形态发生。

[0055] 本发明也涉及基于具有通式 I 的 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物,该化合物用于制备组合物及其用于植物和哺乳动物胚胎细胞和胚胎(特别是卵母细胞)的克隆的用途。

[0056] 本发明也涉及根据权利要求 1 基于具有通式 I 的 N⁶-取代腺嘌呤的杂环化合物,用于制备组合物及其在哺乳动物中用于抑制免疫刺激,如关节炎或用于移植排斥的抑制。

[0057] 治疗给药

[0058] 用于给药的合适途径包括口服、直肠、局部(包括皮肤、眼睛、口腔和舌下)、阴道和胃肠外(包括皮下、肌肉、玻璃体内、静脉内、真皮内、膜内和硬膜外)。在临床医师已知的其它考虑因素中,优选的给药途径依赖于患者的病况、化合物的毒性和感染位置。

[0059] 治疗组合物包括约 1% - 约 95% 活性成分,单一的给药剂型优选包括约 20% - 约 90% 活性成分以及不是单一剂量的给药剂型优选包括约 5% - 约 20% 的活性成分。单位剂型为,例如,糖衣片剂、片剂、安瓿剂、管形瓶、栓剂或胶囊。其它给药剂型是,例如,软膏、乳膏、糊剂、泡沫、酊剂、唇膏、滴剂、喷雾剂、分散体等。例子是包含约 0.05g - 约 1.0g 活性成分的胶囊。

[0060] 本发明的药物组合物以自身已知的方式制备,例如通过常规混合,成粒,涂敷,溶解或冷冻干燥。

[0061] 优选,使用活性成分的溶液,和此外也使用悬浮液或分散体,特别是等渗水溶液、分散体或悬浮液,对于这些物质可以在使用之前制备,例如在冷冻干燥组合物的情况下,该组合物包括活性成分自身或与载体如甘露糖醇一起。药物组合物可以是灭菌的和/或包括赋形剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂和/或乳化剂、加溶剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂,它们以其已知的方式制备,例如通过常规溶解或冷冻干燥工艺。所述的溶液或悬浮液可包括粘度增加物质,如羧甲基纤维素钠、葡聚糖、聚乙烯基吡咯烷酮或明胶。

[0062] 油中悬浮液的油性组分包括植物、通常用于注射目的的合成或半合成油。值得提及的油,特别地,是液体脂肪酸酯,该脂肪酸酯包含作为酸组分的含有 8-22 个特别是含有 12-22 个碳原子的长链脂肪酸,例如月桂酸、十三烷酸、十四烷酸、十五烷酸、十六烷酸、十七

烷酸、硬脂酸、酸、花生四烯酸、二十二烷酸或相应的不饱和酸,例如油酸、反油酸、euryc acid、brassic acid 或亚油酸,若合适可加入抗氧化剂,例如维生素 E、 β -胡萝卜素或 3,5-二叔丁基-4-羟基甲苯。这些脂肪酸酯的醇组分含有不大于 6 个碳原子并且是一元或多元羟基的,例如一元醇、二元醇或三元醇,例如,甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、或戊醇、或其异构体,但特别是甘醇和甘油。脂肪酸酯因此,例如是:油酸乙酯、十四酸异丙酯、十六酸异丙酯、“Labrafil M 2375”(购自 Gattefosee,巴黎的聚氧乙烯甘油三油酸酯)、“Labrafil M 1944 CS”(由杏仁油醇解制备并由甘油酯和聚乙二醇酯组成的不饱和聚乙醇化的甘油酯 (poly-glycolated glycerides),购自 Gattefosee,巴黎)、“Labrasol”(由 TCM 醇解并由甘油酯和聚乙二醇酯组成的饱和聚乙醇化的甘油酯 (poly-glycolated glycerides),购自 Gattefosee,巴黎)和 / 或“Miglyol 812”(链长度 C_8 - C_{12} 饱和脂肪酸的三甘油酯,购自 Huls AG,德国),并且特别是植物油,如棉籽油、杏仁油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、大豆油和,特别地花生油。

[0063] 以通常的方式在无菌条件下进行注射组合物的制备,正如装瓶然后再封闭容器那样,所用的装瓶容器例如在安瓿或小瓶中。

[0064] 例如,用于口腔的医药组合物可以通过将活性成分与一种或多种固体载体结合得到,若合适可将获得的混合物粒化,并且,若可取,可将混合物或颗粒加工成片剂或糖衣片剂的内核,若合适可加入另外的赋形剂。

[0065] 合适的载体是,特别是,填料如糖,例如乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇、纤维素制剂和 / 或磷酸钙,例如二磷酸三钙、或磷酸氢钙,以及进一步的粘结剂,如淀粉,例如玉米、小麦、稻米或马铃薯淀粉、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯基吡咯烷酮、和 / 或,若需要,崩解剂,如上述淀粉、和另外羧甲基淀粉、交联聚乙烯基吡咯烷酮、藻酸或其盐,如藻酸钠。另外的赋形剂是,特别地,流动调节剂和润滑剂,例如水杨酸、滑石、硬脂酸或其盐,如硬脂酸镁或硬脂酸钙、和 / 或聚乙二醇、或其衍生物。

[0066] 糖衣片剂的核可以具有合适的糖衣,该糖衣在适当的情况下耐胃液,采用的糖衣特别是浓糖溶液,若恰当该浓糖溶液包括阿拉伯胶、滑石、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙二醇和 / 或二氧化钛,在合适有机溶剂或溶剂混合物中的包衣溶液或,对于制备耐胃液糖衣的包衣溶液的合适纤维素制剂溶液,如邻苯二甲酸乙酰基纤维素或邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素的溶液。可以将染料或颜料混合到片剂或糖衣片剂包衣中,例如用来识别或标志活性成分的不同剂量。

[0067] 口服使用的药物组合物也是明胶的硬胶囊和明胶与增塑剂的软且密闭的胶囊,该增塑剂如甘油或山梨醇。硬胶囊可包含形式为颗粒的活性成分,并混合有填料,如玉米淀粉,粘结剂和 / 或润滑剂,如滑石或硬脂酸镁,以及稳定剂(若适当)。在软胶囊中,将活性成分优选溶于或悬浮于合适的液体赋形剂中,如含脂油、石蜡油或液体聚乙二醇或乙二醇或丙二醇的脂肪酸酯,同样可能加入稳定剂和清洁剂,例如聚乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯类型。

[0068] 其它的口服给药形式是,例如,以通常方式制备的糖浆,该糖浆包括活性成分,活性成分例如以悬浮形式,并以约 5% -20%,优选约 10% 的浓度或引起适当独立剂量的相似浓度,例如,当测量 5 或 10ml 的独立剂量时。其它形式还有,例如,用于例如在奶中制备的粉状或液体浓缩物的振荡物(shakes)。这种浓缩物也可采用单位剂量数量装填。

[0069] 可以直肠使用的药物组合物是,例如,包括活性成分与栓剂基质结合物的栓剂。合适的栓剂基质是,例如,天然或合成三甘油酯、石蜡烃、聚乙二醇或高级链烷醇。

[0070] 适用于胃肠外给药的组合物是水溶形式的活性成分的水溶液,例如水溶性盐的水溶液,或含注射水悬浮液,该悬浮液包括粘度增加物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和 / 或葡聚糖,和在若适当的情况下采用的稳定剂。活性成分在此也可以冷冻干燥物的形式存在,若恰当与赋形剂一起,并在胃肠外给药之前通过加入合适的溶剂而溶解。例如用于胃肠外给药的溶液也可用作浸渍剂。优选的防腐剂是,例如,抗氧化剂,如抗坏血酸、或杀微生物剂,如山梨酸或苯甲酸。

[0071] 软膏是水包油乳液,它包括不大于 70%,但优选 20-50% 水或水相。脂肪相特别地由烃,例如凡士林、石蜡油或硬石蜡组成,它优选包括合适的羟基化合物,如脂肪醇或其酯,例如十六烷醇或羊毛蜡醇,如羊毛蜡以改进与水的结合能力。乳化剂是相应的亲脂性物质,如脱水山梨醇脂肪酸酯 (Spans),例如油酸脱水山梨醇酯和 / 或异硬脂酸脱水山梨醇酯。水相的添加剂是,例如,湿润剂,如多元醇,例如甘油、丙二醇、山梨醇和 / 或聚乙二醇、或防腐剂和有气味物质。

[0072] 脂肪软膏是无水的,且包括,特别作为基质的烃,例如石蜡、凡士林或石蜡油,和此外天然形成或半合成的脂肪,例如氢化椰子油脂肪酸三甘油酯或优选氢化油,例如氢化花生油或蓖麻油,和此外甘油的脂肪酸部分酯,例如单和 / 或双硬脂酸甘油酯,和例如脂肪醇。它们也可包含提及的有关软膏的乳化剂和 / 或添加剂,它们增加水的吸收。

[0073] 乳膏是水包油乳液,它包括大于 50% 的水。使用的油性基质,特别地是脂肪醇,例如月桂醇、鲸蜡醇或硬脂醇,脂肪酸,例如棕榈酸或硬脂酸、液体蜡到固体蜡,例如肉豆蔻酸异丙酯、羊毛蜡或蜂蜡、和 / 或烃,例如凡士林 (矿脂) 或石蜡油。乳化剂是具有主要亲水性能的表面活性物质,如相应的非离子乳化剂,例如多元醇的脂肪酸酯或其乙烯氧基加合产物,如聚甘油酸脂肪酸酯或聚乙烯脱水山梨醇脂肪酯 (Tween),和此外聚氧乙烯脂肪醇醚或聚氧乙烯脂肪酸酯,或相应的离子乳化剂,如脂肪醇硫酸的碱金属盐,例如十二烷基硫酸钠、鲸蜡基硫酸钠或硬脂基硫酸钠,它们通常在脂肪醇如鲸蜡基硬脂醇 (cetylstearyl alcohol) 或硬脂醇存在下使用。水相的添加剂,尤其是,防止乳膏干燥的试剂,例如多元醇,如甘油、山梨醇、丙二醇和 / 或聚乙二醇,和此外的防腐剂和有气味的物质。

[0074] 糊剂是含有分泌物 - 吸收粉末组分的乳膏和软膏,这些粉末组分如金属氧化物,如氧化钛或氧化锌,和此外滑石和 / 或硅酸铝,它的任务是结合存在的水分或分泌物。

[0075] 从加压容器中施加泡沫,并且它们是以气溶胶泡沫存在的水包油乳液。作为泡沫推进剂气体,使用卤代烃,如多卤代烷烃,例如二氯氟甲烷和二氯四氟乙烷,或优选,非卤代气体烃、空气、N₂O、或二氧化碳。使用的油性相,尤其指,以上对于软膏和乳膏提及的那些,还同样使用了那里提及的添加剂。

[0076] 酊剂和溶液通常包括含水 - 乙醇类基质,该基质中共混有助于降低蒸发的湿润剂,如多元醇,例如甘油、二醇和 / 或聚乙二醇,和再加脂物质 (re-oiling substances),如带有低级聚乙二醇的脂肪酸酯,即可溶于含水混合物中以用乙醇取代从皮肤除去的脂肪物质的亲脂物质,以及如果需要,其它赋形剂和添加剂。

[0077] 本发明进一步提供兽医组合物,该组合物包括至少一种以上定义的活性成分及其兽医载体。兽医载体是用来施用组合物的材料,并且可以是固体、液体或气体材料,它们在

兽医领域中是惰性或可接受的并与活性成分相容。这些兽医组合物可以口服、胃肠外使用或由任何其它可取的途径使用。

[0078] 本发明也涉及上述疾病病况治疗的过程和方法。可以将化合物自身或以药物组合物的形式用于预防或治疗用途,优选以有效抵抗上述疾病的数量使用。对于要求这种治疗的温血动物,例如人类特别地以药物组合物的形式使用这种化合物。在此对于约 70kg 的体重,在此使用约 0.1- 约 5g 日剂量的本发明化合物,优选 0.5g- 约 2g 的日剂量。

附图说明

[0079] 在图 1 中,显示由测试化合物对 K562(A) 和 CEM(B) 肿瘤细胞系生长的抑制。在钙黄绿素 AM 存在下确定细胞毒性。活性表示为最大活性的百分比(在抑制剂不存在的情况下)。iP:异戊烯腺嘌呤;2F BAP:6-(2- 氟苄基氨基)嘌呤;2Cl BAP:6-(2- 氯苄基氨基)嘌呤;2OH-3OCH₃BAP:6-(2- 羟基-3- 甲氧基苄基氨基)嘌呤。

[0080] 在图 2 中,显示由于 β -半乳糖苷酶对底物 X-gal(5- 溴-4- 氯-3- 吲哚基- β -D- 吡喃半乳糖苷)(1mg/ml) 的作用,染成蓝色的人体成纤维细胞(B)(其它细胞(A)) 培养过程中的衰老细胞。

[0081] 在图 3 中,显示在使用细胞分裂素 6-(2- 羟基-3- 甲氧基苄基氨基)嘌呤之后,在肿瘤细胞 MCF-7 细胞系中引入的凋亡。A MCF-7,凋亡细胞:6h,12,20 μ M,B MCF-7,次级坏死细胞(即跟随凋亡细胞之后的坏死细胞):12h,12,40 μ M;C MCF-7,坏死细胞:24h,12,40 μ M。Anexin FITC V(分子探针)和碘丙锭染色:anexin- 绿色,PI- 红色。

[0082] 图 4 显示使用 Anexin(绿色荧光)和 Hoechst 33285(蓝色荧光)染色的凋亡细胞检测。在用 6-(2- 羟基-3- 甲氧基苄基氨基)嘌呤处理过 MCF-7 肿瘤细胞之后,使用“Olympus 图象分析”分析。A,B- 没有处理的对照细胞;C,D- 凋亡细胞(染色质的凝聚);A,C- 荧光显微术;B,D- 荧光图象分析。

[0083] 图 5 显示测试化合物在切断小麦叶尖端中保留叶绿素的效果。数值表达为在培育之前新鲜叶初始叶绿素含量的%。误差棒显示对于 5 次重复测定平均值的标准偏差。虚线指示没有任何细胞分裂素的对照培育,它是 31.7 ± 0.9 。

[0084] 图 6 显示测试化合物对烟草愈伤组织培养物新鲜重量收率的影响。误差棒显示对于 5 次重复测定平均值的标准偏差。虚线表示[没有任何细胞分裂素的对照处理数值, $2.2 \pm 0.4g$ 。

[0085] 图 7 测试化合物对尾穗苋子叶/下胚轴外植体中 β -花青苷合成的黑暗诱导的影响。误差棒显示对于 5 次重复测定平均值的标准偏差。虚线表示没有任何细胞分裂素的对照处理数值, 0.043 ± 0.009 。数值表示在 537 和 620nm 吸收之间 O.D. 单位的差异。

[0086] 图 8 显示作为培养时间函数的带有至少一个棕色叶子的外植体的相对数目(■:BA,●:mT,▲:mMeOBAP)。

[0087] 图 9 显示相对于培养时间的死亡外植体的相对数目(■:BA,●:mT,▲:mMeOBAP)。

[0088] 图 10 左边显示:在含 BA 的介质上的死玫瑰外植体;右边:在含 mMeOBAP 的介质上 121 天培育之后的旺盛玫瑰外植体。

[0089] 以下实施例用于说明本发明而不限制其范围。

具体实施方式

[0090] 实施例

[0091] 实施例 1

[0092] 6-(3-氯苄基氨基)嘌呤

[0093] 将 3mmol 的 6-氯嘌呤溶于 15ml 丁醇。随后,加入 4mmol 的 3-氯苄胺和 5mmol 的三乙胺并将混合物在 90℃下加热 4 小时。在冷却之后,将沉淀的产物滤出,采用冷水和正丁醇洗涤并从乙醇或二甲基甲酰胺结晶。M. p. = 252℃, TLC(CHCl₃ : MeOH : conc. NH₄OH(8 : 2 : 0.2, v/v/v)) :单一点 ;HPLC :纯度> 98%。产率 95%。

[0094] 表 1

[0095] 由实施例 1 方法制备的化合物

[0096]

R6 取代基	CHN 分析 计算的/发现的			ESI-MS [M+H ⁺]
	%C	%H	%N	
2-氟苄基氨基	59,3/59,05	4,1/3,8	28,8/27,8	244
3-氟苄基氨基	59,3/59,1	4,1/3,9	28,8/27,7	244
4-氟苄基氨基	59,3/59,2	4,1/3,9	28,8/27,9	244
2-氯苄基氨基	55,5/55,7	3,8/4,2	27,0/26,0	260
3-氯苄基氨基	55,5/55,2	3,8/3,9	27,0/26,2	260
4-氯苄基氨基	55,5/55,3	3,8/3,8	27,0/26,6	260
2-溴苄基氨基	47,4/47,6	3,3/3,5	23,0/22,5	304
2-溴苄基氨基	47,4/47,1	3,3/3,4	23,0/23,1	304
2-溴苄基氨基	47,4/47,8	3,3/3,4	23,0/22,3	304
3-碘苄基氨基	41,0/41,4	2,8/2,8	20,0/19,5	352
2-甲基苄基氨基	65,2/64,9	5,5/5,8	29,3/29,8	240

[0097]

3-甲基苄基氨基	65,2/64,7	5,5/6,0	29,3/29,9	240
4-甲基苄基氨基	65,2/65,7	5,5/5,4	29,3/27,5	240
2-甲氧基苄基氨基	61,2/61,0	5,1/5,5	27,4/26,6	256
3-甲氧基苄基氨基	61,2/61,0	5,1/5,3	27,4/27,5	256
4-甲氧基苄基氨基	61,2/60,7	5,1/5,3	27,4/26,7	256
3-硝基苄基氨基	53,3/53,1	3,7/3,6	31,1/30,8	271
4-硝基苄基氨基	53,3/53,0	3,7/3,5	31,1/30,8	271
2,4-二氯苄基氨基	49,0/49,4	3,1/3,1	23,8/23,1	295
3,4-二氯苄基氨基	49,0/49,1	3,1/3,2	23,8/23,0	295
2,3-二羟基苄基氨基	56,2/55,7	3,5/3,2	27,2/27,9	258
2,4-二羟基苄基氨基	56,2/55,4	3,5/3,4	27,2/27,7	258
3,4-二羟基苄基氨基	56,2/55,5	3,5/3,4	27,2/27,7	258
2-羟基-3-甲氧基苄基氨基	57,5/57,2	4,8/4,6	25,8/26,4	272
2-羟基-4-甲氧基苄基氨基	57,5/57,1	4,8/4,5	25,8/26,6	272
4-羟基-3-甲氧基苄基氨基	57,5/57,3	4,8/4,7	25,8/26,2	272
3-羟基-4-甲氧基苄基氨基	57,5/57,0	4,8/4,5	25,8/26,7	272
2,3-二甲氧基苄基氨基	58,9/59,3	5,3/5,48	24,5/24,5	286
2,4-二甲氧基苄基氨基	58,9/59,3	5,3/4,9	24,5/25,5	286
3,4-二甲氧基苄基氨基	58,9/59,7	5,3/5,6	24,5/24,8	286
3,5-甲氧基苄基氨基	58,9/59,7	5,3/5,32	24,5/24,4	286
2,4,6-三甲氧基苄基氨基	57,1/57,3	5,4/5,3	22,2/22,8	316
3,4,5-三甲氧基苄基氨基	57,1/57,1	5,4/5,2	22,2/22,5	316
2,4-二氟苄基氨基	55,2/54,5	3,5/3,1	26,8/27,2	262
3,5-二氟苄基氨基	55,2/54,8	3,5/3,3	26,8/27,3	262
2,3,4-三氟苄基氨基	51,6/51,1	2,9/2,7	25,1/25,5	280
3-氯-4-氟苄基氨基	51,9/50,9	3,3/3,4	25,2/25,7	278
2-(三氟甲基)苄基氨基	53,2/52,9	3,4/3,1	23,9/24,5	294
3-(三氟甲基)苄基氨基	53,2/52,9	3,4/3,2	23,9/24,6	294
4-(三氟甲基)苄基氨基	53,2/52,7	3,4/3,1	23,9/24,8	294
苯胺基	62,5/62,2	3,3/3,1	33,1/33,8	212

[0098]

2-氟苯胺基	57,6/57,0	3,5/3,4	30,6/31,1	230
3-氟苯胺基	57,6/57,1	3,5/3,3	30,6/31,5	230
4-氟苯胺基	57,6/57,0	3,5/3,3	30,6/31,5	230
2-氯苯胺基	53,8/53,2	3,3/3,2	28,5/29,3	246
3-氯苯胺基	53,8/53,1	3,3/3,3	28,5/28,9	246
4-氯苯胺基	53,8/53,4	3,3/3,2	28,5/29,3	246
2-溴苯胺基	45,5/45,0	2,8/2,7	24,1/24,7	291
3-溴苯胺基	45,5/25,0	2,8/2,7	24,1/24,9	291
4-溴苯胺基	45,5/44,7	2,8/2,4	24,1/25,1	291
2-碘苯胺基	39,2/38,5	2,4/2,1	20,8/21,3	338
2-甲氧基苯胺基	59,7/59,4	4,6/4,6	29,0/29,4	242
3-甲氧基苯胺基	59,7/59,1	4,6/4,5	29,0/29,7	242
4-甲氧基苯胺基	59,7/59,2	4,6/4,5	29,0/29,6	242
2-甲基苯胺基	64,0/63,7	4,9/4,7	31,1/31,8	226
3-甲基苯胺基	64,0/63,7	4,9/4,8	31,1/31,9	226
4-甲基苯胺基	64,0/63,5	4,9/4,7	31,1/32,0	226

[0099] 实施例 2

[0100] 将 10mmol 腺嘌呤, 12mmol 的 2-甲氧基苯甲醛和 5ml 的 98-100% 甲酸回流 3 天。在甲酸蒸发之后, 将获得的材料冷却并随后采用 40ml 乙醚洗涤。将固体残余物采用 60ml 水沸腾, 滤出粗产物, 并且粗产品从乙醇结晶。收率 45%。

[0101] 表 2

[0102] 由实施例 2 方法制备的化合物

[0103]

R6 取代基	CHN 分析			ESI-MS [M+H ⁺]
	计算的/发现的			
	%C	%H	%N	
2-氯苄基氨基	55,5/54,7	3,8/4,1	27,0/27,6	206
3-氯苄基氨基	55,5/54,8	3,8/3,9	27,0/27,2	260

[0104]

4-氯苄基氨基	55,5/54,5	3,8/4,0	27,0/27,6	260
2-溴苄基氨基	47,4/46,7	3,3/3,5	23,0/23,4	304
2-溴苄基氨基	47,4/46,5	3,3/3,4	23,0/23,3	304
2-甲基苄基氨基	65,2/64,8	5,5/5,9	29,3/29,8	240
3-甲基苄基氨基	65,2/64,8	5,5/5,7	29,3/30,1	240
4-甲基苄基氨基	65,2/64,7	5,5/5,8	29,3/29,9	240
2-甲氧基苄基氨基	61,2/60,3	5,1/5,3	27,4/27,9	256
3-甲氧基苄基氨基	61,2/61,00	5,1/5,3	27,4/27,9	256
4-甲氧基苄基氨基	61,2/60,4	5,1/5,2	27,4/28,3	256
2,4-二氯苄基氨基	49,0/48,4	3,1/3,0	23,8/24,4	295
3,4-二氯苄基氨基	49,0/48,6	3,1/3,1	23,8/24,4	295
2,4-二甲氧基苄基氨基	58,9/58,8	5,3/5,4	24,5/24,7	286
2,4-二甲氧基苄基氨基	58,9/58,4	5,3/5,8	24,5/25,5	286
3,4-二甲氧基苄基氨基	58,9/58,5	5,3/5,6	24,5/25,2	286
3,5-二甲氧基苄基氨基	58,9/58,7	5,3/5,4	24,5/25,0	286
2,4,6-三甲氧基苄基氨基	57,1/57,2	5,4/5,4	22,2/22,5	316
3,4,5-三甲氧基苄基氨基	57,1/57,4	5,4/5,5	22,2/22,5	316

[0105] 实施例 3

[0106] 新颖化合物的体外细胞毒素活性

[0107] 用作细胞毒性测定基础的一个参数是有活力细胞的代谢活动。例如,微量滴定法测定,这种方法使用钙黄绿素 AM,现在广泛用于量化细胞增殖和细胞毒性。例如,此测定用于药物筛选程序和化学敏感性测试。由于仅代谢活性的细胞分裂钙黄绿素 AM,这些测定仅检测有活力的细胞。降低的钙黄绿素 AM 数量相应于培养物中活细胞的数目。

[0108] 人类 T- 原始淋巴细胞白血球过多症细胞系 CEM、前髓细胞 HL-60 和单核细胞 U937 白血球过多症、乳腺癌细胞系 MCF-7、BT549、MDA-MB-231、胶质胚细胞瘤 U87MG 细胞、子宫颈癌细胞 HELA、肉瘤细胞 U20S 和 Saos2、肝细胞瘤 HepG2、鼠成纤维细胞 NIH3T3、鼠永生化骨髓巨噬细胞 B2.4 和 B10A.4、P388D1 和 L1210 白血球过多症、B16 和 B16F10 黑素瘤用于化合物的常规筛选。将细胞保持在 Nunc/Corning 80cm² 塑料组织培养烧瓶中,并且在细胞培养基(含有 5g/l 葡萄糖,2mM 谷酰胺,100U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素,10%胎牛血清和碳酸氢钠的 DMEM)中培养。

[0109] 将细胞悬浮液由吸液管(80 μl)加入 96/ 池微量滴定板中,根据特定的细胞类型和希望的目标细胞密度(2.500-30.000 个细胞每池,基于细胞生长特性)制备和稀释该细胞悬浮液。允许移植细胞在 37℃和 5% CO₂ 下预培育 24 小时用于稳定。在零时间以

20 μ l 等分试样将所需测试浓度的四倍稀释液加入到微量滴定板池中。通常地,以 6 个 4 倍稀释液评价测试化合物。在通常测试中,最高的池浓度是 266.7 μ M,但它可依赖于试剂而变化。检查所有的药物浓度两次。用测试化合物对细胞进行的培育在 37°C 下,5% CO₂ 气氛和 100% 湿度中持续 72 小时。在培育时间结束时,通过使用钙黄绿素 AM 测定细胞。将十微升母液移入每个池并进一步培育 1 小时。采用 Labsystem FIA Reader Fluoroscanner Ascent (UK) 测量荧光 (FD)。使用如下公式计算肿瘤细胞存活率 (GI₅₀): $TCS = (FD_{\text{药物暴露池}} / \text{平均 } FD_{\text{对照池}}) \times 100\%$ 。从获得的剂量响应曲线计算 GI₅₀ 数值,肿瘤细胞的半数致死浓度 (图 1)。

[0110] 在不同组织发生和种类源的细胞系的板上测试新颖化合物的细胞毒性 (表 3)。我们在这里显示在测试的所有肿瘤细胞系中发现相等的活性,然而,良性细胞,如 NIH3T3 成纤维细胞和正常人类淋巴细胞,对合成抑制剂诱导的细胞毒性具有抵抗力。如表 3 所示,NIH3T3 成纤维细胞和正常人类淋巴细胞的 GI₅₀ 总是高于 250 μ M。有效的新颖衍生物在接近 10-50 μ M 的浓度杀死肿瘤细胞。

[0111] 表 3

[0112] 对于不同癌细胞系的新颖化合物的细胞毒性

[0113]

	测试的细胞系/IC50(μ mol/L)								
化合物	HOS	K-562	MCF7	B16-F0	NIH-3T3	G-361	CEM	HELA	HL60
激动素	>166,7	>166,7	>166,7				155,1		
		164,1							
IP	>166,7	146,9	>166,7				92,2		>166,7
		162,2							

[0114]

BAP	>166,7	138,9	166,1				>166,7		>166,7
		>166,7							
顺式 Z	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7							
乙酰基 Z	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7							
MT	>166,7	128,4	>166,7	90,6		>166,7	90,1		79,2
		140,2							
OT	>166,7	>166,7	>166,7	150		103,4	69,2		78
		67							
2F BAP	>166,7	136,1	>166,7	27,7		106,4	98		
	>166,7	70,7					99,5		126,5
2Cl BAP	84,9	101	164,1	16,9	>166,7	56,6	58,4		109,6
	100,4	90,4	128,4						
3Cl BAP	>166,7	>166,7	>166,7			148,6	>166,7		>166,7
3F BAP	>166,7	105,2	163,2			>166,7	>166,7		>166,7
4F BAP	>166,7	>166,7	>166,7			>166,7	66,4		59,2
3MeO BAP	>166,7	>166,7	>166,7	41,5	>166,7	124,7	>166,7		>166,7
		76,7	149,5						
4MeO BAP	>166,7	>166,7	>166,7	84,7	>166,7	166,7	>166,7		>166,7
	>166,7	118	>166,7						
2M BAP	>166,7	156,6	>166,7			>166,7	>166,7		>166,7
3I BAP	>166,7	94,7	129,9			>166,7	124,6		133,3
4M BAP	>166,7	72,8	82,8			160,4	72,1		88
4Cl BAP	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
2MeO BAP	>166,7	115,8	153				63,4		>166,7
							98,2		
3,5 - MeO BAP		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7

[0115]

2,4,6 三 MeO BAP		>166,7	>166,7	>166,7			63,6		153,4
							105,3		
4OH3 MeO BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
3NO ₂ BAP		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
4 NO ₂ BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
2OH3 MeO BAP		>166,7	26,6	69			41,6		64,3
							51		67,8
3OH4 MeO BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
3,4 二 OH BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
2F BAP	>166,7	136,1	108,7	130,6		106,4	135,7		>166,7
		70,7	128,5	>166,7			98,9		
3Me BAP		>166,7	102,5	164,1			>166,7		>166,7
3Cl4F BAP		>166,7	>166,7	>166,7			135		>166,7
		>166,7	>166,7				95,8		>166,7
2,3,4 三 F BAP		>166,7	>166,7				32		>166,7
		>166,7	>166,7				67		>166,7
2,4 二 FBAP		>166,7	>166,7				139,7		>166,7
		>166,7	>166,7				145,8		>166,7
玉米素		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
腺嘌呤		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7

[0116] 实施例 4

[0117] 新颖化合物诱导肿瘤细胞中的凋亡

[0118] 为分析由新颖化合物引起的细胞毒性的机理,将凋亡与细胞死亡、坏死的其它主要形式区别出来很重要。首先,在组织水平上,凋亡产生较少的炎症或不产生炎症,这是由于相邻细胞,特别是巨噬细胞,会吞食细胞的萎缩部分,而不是被释放入细胞外液。相反,在坏死中,细胞内容物被释放入细胞外液,病因此对附近的细胞产生刺激效果,引起炎症。其次,在细胞水平上,凋亡细胞表现出细胞质的收缩和起泡、包括线粒体在内的细胞器结构的保存、染色质凝结和蚀边、细胞核碎裂、和凋亡体的形成,尽管不是在所有的细胞类型中都可以看到全部上述状况。第三,在分子水平上,许多生物化学过程在凋亡诱导中起重要的作用。然而,它们中的大多数不能被充分理解,并且它们会引起蛋白酶和核酸酶的活化,这最终破坏关键生物大分子—蛋白质和 DNA。

[0119] 为了检测细胞死亡的凋亡形式对坏死形式,采用两种独立的方法:由电子显微镜的形态评定和通过流式细胞计量方法的 DNA 断裂分析。

[0120] 将 HL-60 细胞系在 6- 池培养板中,采用或不采用 $70\ \mu\text{M}$ 浓度的新颖化合物,在 37°C 和 $5\%\ \text{CO}_2$ 下培养 3-24 小时。在培育之后,将细胞制粒,在 Hank 缓冲盐溶液中洗涤并如下所述加工。

[0121] 将细胞悬浮在 2% 戊二醛 /PBS 中,在 4°C 下固定过夜,制粒并在其后嵌入 1% 琼脂 (Agar Noble, Difco) 中。对包含固定细胞的琼脂块进行环氧化物聚合,超薄切片,四氧化锇后固定,乙酸铀对比并在电子显微镜下检查。

[0122] 初始阶段对比显微镜检查指示处理的 HL-60 系表现出凋亡细胞的典型形态特征,并且这一点随后由电子显微镜确认 (图 2 和 3)。在所有采用测试新颖衍生物处理过的细胞中都识别出了凋亡的典型形态特征:细胞质凝结、核碎裂、细胞质起泡、和凋亡体的形成。

[0123] 实施例 5

[0124] 免疫抑制活性

[0125] 特异性细胞免疫的重要参数之一是淋巴细胞对抗原或多克隆分裂素的增殖反应。大多数正常哺乳动物的末梢淋巴细胞包含静止细胞。抗原或非特异性多克隆分裂素具有活化淋巴细胞的能力并且这伴随着细胞内代谢 (线粒体活性、蛋白质合成、核酸合成、胚细胞形成和细胞增生) 的急剧变化。能够选择性地抑制淋巴细胞增殖的化合物是潜在的免疫抑制剂。已经建立了各种体外分析以测量淋巴细胞的增殖反应。

[0126] 最常用的是 3H - 胸苷引入方法。

[0127] 在细胞增殖期间,必须在细胞分裂成两个子细胞之前复制 DNA。在细胞增值和 DNA 合成两者之间的这种紧密联系对于评定细胞增殖是非常有吸引力的。如果将标记的 DNA 前体加入到细胞培养物中,要分裂的细胞会在它们的 DNA 中合并标记的核苷酸。传统上,这些测定通常涉及使用放射标记的核苷,特别地氚化胸苷 (^3H -TdR)。用液体闪烁计数量化引入细胞 DNA 的 ^3H -TdR 数量。

[0128] 从健康的志愿者由肘脉穿刺获得人类肝素化末梢血。将血液在 PBS (1 : 3) 中稀释,并且在 Ficoll-Hypaque 密度梯度 (Pharmacia, 1.077g/ml) 中在 2200rpm 下离心分离单核细胞 30 分钟。在离心之后,将淋巴细胞在 PBS 中洗涤,并在细胞培养基 (RMPI 1640, 2mM 谷酰胺, 100U/ml 青霉素, 100g/ml 链霉素, 10% 胎牛血清和碳酸氢钠) 中再悬浮。

[0129] 将细胞稀释到 $1.100.000$ 细胞 /ml 的目标密度,由吸液管 ($180\ \mu\text{l}$) 加入 96/ 池微量滴定板中。将目标稀释浓度的四倍稀释液在时间零以 $20\ \mu\text{l}$ 等分试样加入到微量滴定

板池中。通常地,在 6 个 4 倍稀释液下评价测试化合物。在通常测试中,最高的池浓度是 266.7 μM 。检查所有的药物浓度两次。采用 50 μl 伴刀豆球蛋白 A (25 $\mu\text{g/ml}$) 活化所有的池,除未刺激对照物以外。采用测试化合物的细胞培育在 37°C 下,在 5% CO_2 气氛和 100% 湿度中持续 72 小时。在培育周期结束时,通过使用 [^3H]-TdR 测定细胞:

[0130] 将细胞培养物采用 0.5 μCi (20 μl 母液 500 $\mu\text{Ci/ml}$) 每池在 37°C 和 5% CO_2 下培育 6 小时。自动化的细胞收集器用于在水中溶解细胞并将 DNA 吸附到微量滴定板构造中的玻璃-纤维过滤器上。将引入有 [^3H]-TdR 的 DNA 保留在过滤器中,同时未引入的材料通过过滤器。将过滤器在室温下干燥过夜,并采用 10-12ml 的闪烁体密封入样品袋。由 Betaplate 液体闪烁计数器中的闪烁计数确定每个过滤器中存在的 [^3H]-TdR 数量 (以 cpm 计)。使用如下公式计算免疫抑制剂的有效剂量 (ED): $\text{ED} = (\text{CCPM}_{\text{药物暴露池}} / \text{平均 CCPM}_{\text{对照池}}) \times 100\%$ 。从获得的剂量响应曲线计算 ED50 数值,即抑制 50% 淋巴细胞增殖的药物浓度。

[0131] 为评价取代腺嘌呤的免疫抑制活性,分析它们抑制多克隆分裂素诱导正常人类淋巴细胞增殖的能力 (表 13)。我们的数据显示这些化合物仅对 ^3H -胸苷引入具有边缘活性,但是,它们有效抑制活化淋巴细胞的增殖。在体外条件下新衍生物的有效免疫抑制剂量接近 1-20 μM 。

[0132] 表 4

[0133] 新颖衍生物的免疫抑制活性

[0134]

R6 取代基	人类淋巴细胞 ED ₅₀ (μM)
3- 氯苯胺基	4.7
3- 氯 -5- 氨基苯胺基	12.4
2- 羟基苄基氨基	0.5
3- 羧基 -4- 氯苯胺基	2.1
3- 羟基苄基氨基	5.6
4- 溴苯胺基	4.7
4- 氯苯胺基	6.2
3- 氨基 -4- 氯苯胺基	8.3
3- 氯 -4- 氨基苯胺基	12
2- 羟基苄基氨基	11.5

R6 取代基	人类淋巴细胞 ED ₅₀ (μ M)
3- 羟基苄基氨基	8.4
3- 氟苄基氨基	18.2
3- 羧基 -4- 氯苯胺基	0.5
2- 羟基 -4- 甲氧基苄基氨基	1.8
3- 氯苯胺基	7.2
2- 氟苄基氨基	2.5
2,3- 二氟苄基氨基	10.7

[0135] 实施例 6

[0136] 由新颖化合物的衰老抑制

[0137] 在此实施例中,将人类二倍体成纤维细胞(各种传代水平的 HCA 细胞:传代 25- 称为 HCA25;传代 45- 称为 HCA45;传代 80- 称为 HCA80) 染色用于 β- 半乳糖苷酶活性。将用于细胞培育的培养基除去,将细胞在 PNS 中洗涤两次,并在 2-3ml 固定液中固定,该固定液由 PBS 中的 2% 甲醛和 0.2% 戊二醛组成。将细胞在室温下孵育 5 分钟,然后采用 PBS 洗涤两次。随后将细胞在 37℃ (没有 CO₂) 下在 2-3ml 溶液中孵育 1-16 小时,该溶液包括铁氰化钾 (5mM),亚铁氰化钾 (5mM),MgCl₂ (2mM),X-gal (5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基 - β -D- 半乳糖苷) (1mg/ml),在柠檬 / 磷酸盐缓冲液中,pH 6.0)。在此培育周期之后,观察细胞样品以检测蓝色细胞的存在,表明 X-gal 已经分裂(正性衰老细胞)。在此试验中,由于 β- 半乳糖苷酶对底物的作用,衰老细胞,而非其它细胞被染成蓝色(图 4)。

[0138] 表 5

[0139] 新颖化合物对人类成纤维细胞培养物中衰老细胞数量的影响

[0140]

取代基	衰老细胞(%)		
	HCA25	HCA45	HCA80
R6			
对照	3	5	38
3-氯苯胺基	4	5	25
3,4-二羟基苄基氨基	5	4	29
苯胺基	3	4	27
3-氯-5-氨基苯胺基	3	6	24
3-氯-4-羧基苯胺基	5	2	25
3-羧基-4-氯苯胺基	3	5	20
3-羧基-4-羟基苯胺基	4	2	26
4-溴苯胺基	5	3	25
4-氯苯胺基	5	5	26
3-氨基-4-氯苯胺基	4	6	22
3-氯-4-氨基苯胺基	5	5	24
2-氟苄基氨基	4	3	16

[0141]

3-氟苄基氨基	3	3	15
2-羟基苄基氨基	3	4	17
3-羟基苄基氨基	5	3	22
2-乙酰氧基苄基氨基	6	5	32
3-乙酰氧基苄基氨基	4	6	27
2-乙酰基苄基氨基	3	4	25
3-乙酰基苄基氨基	5	5	28
2-羟基-3-甲氧基苄基氨基	4	3	20
2-羟基-3-甲基苄基氨基	5	2	18
2-羟基-3-氯苄基氨基	4	3	14
2,6-二羟基-4-氯苄基氨基	3	3	16
2,3-二羟基-4-甲氧基苄基氨基	3	4	17
2,5-二羟基-4-甲氧基苄基氨基	5	3	22
2,6-二羟基-4-甲氧基苄基氨基	4	3	13
2,3-二羟基-4-氯苄基氨基	3	3	14
2,5-二羟基-4-氯苄基氨基	5	4	23
2-氨基-6-氯苄基氨基	3	4	16
3-氨基-4-氯苄基氨基	5	5	22
2,3-二氨基-4-氯苄基氨基	4	3	17

[0142] 如表 5 所示,随着传代数目的增加,染色变得更深。对于最老的细胞,仅存在从淡蓝色到几乎不透明颜色的蓝色细胞。在 80 次传代之后,N6- 取代腺嘌呤衍生物在保持更低水平的衰老细胞中非常有效。在长期培育的情况下,处理的细胞能够比对照细胞多活 30% 的时间。

[0143] 实施例 7

[0144] 新颖化合物对冬小麦叶节测试的衰老抑制效果

[0145] 将冬小麦,小麦 cv(triticum aestivum cv.) 的种子在流动水下洗涤 24 小时和然后播种在由克诺卜溶液浸湿的蛭石上。将它们放入在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下、采用 16/8h 光周期、25℃ 的生长室中。在 7 天之后,第一片叶子完全发育并且第二片叶子开始生长。将第一片叶子的尖端部分,大约 35mm 长,从 5 个秧苗上取下来并稍微修剪到加起来 100mg 的重量。将五个叶尖端的基部端放入微滴定器的聚苯乙烯板的池中,每个池包含 $150 \mu\text{l}$ 细胞分裂素溶液。将整个板插入由面巾纸衬里的塑料箱中,面巾纸由蒸馏水浸湿以防止叶片段出现干燥。在黑暗中以 25℃ 下培育 96h 之后,取出叶子并在 80℃ 下、在 5ml 的 80% 乙醇 (v/v) 中加热 10min 而萃取叶绿素。通过加入 80% 乙醇 (v/v) 将样品体积恢复到 5ml。在 665nm

下记录萃取物的吸光度。此外,测量了新鲜叶子和在去离子水中孵育的叶尖端的叶绿素萃取物。从获得的数据,对于每种测试的化合物选择具有最高活性的浓度。计算在此浓度下化合物的相对活性(表6)。将对于 10^{-4}M 6-苄基氨基嘌呤(BAP)获得的活性假定为100%。显示的数值是五次重复试验的平均值,并且将整个试验重复两次。将要测试的细胞分裂素溶于二甲亚砜(DMSO),并采用蒸馏水将溶液达到 10^{-3}M 。将此原料在蒸馏水中进一步稀释到 $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-4}\text{M}$ 的浓度。DMSO的最终浓度不超过0.2%,因此不影响使用的测定体系中的生物活性。

[0146] 表6

[0147] 在切断小麦叶尖端中新细胞分裂素衍生物对叶绿素保留的影响。

[0148] 标准偏差是对于10次重复测定的平均值。

[0149]

	测试的化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{BAP} = 100\%$]
1.	6-(2-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	169 (± 20)
2.	6-(3-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	200 (± 25)
3.	6-(4-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	95, 5 ($\pm 3, 5$)
4.	6-(2-氯苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	116, 5 ($\pm 6, 5$)
5.	6-(3-氯苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	82 (± 2)
6.	6-(4-氯苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	64, 5 ($\pm 13, 5$)
7.	6-(2-溴苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	52 (± 14)
8.	6-(3-溴苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	48 (± 6)
9.	6-(4-溴苄基氨基)嘌呤	10^{-5}	30 (± 15)
10.	6-(3-碘苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	83, 5 (± 23)
11.	6-(2-甲基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	158 (± 29)
12.	6-(3-甲基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	111 (± 16)
13.	6-(4-甲基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	35 (± 23)

	测试的化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{BAP} = 100\%$]
14.	6-(2- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	269 (± 12)
15.	6-(3- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	178 (± 16)
16.	6-(4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	79 (± 6)
17.	6-(3- 硝基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	60 (± 15)
18.	6-(4- 硝基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	83 (± 8)
19.	6-(2,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	0
20.	6-(3,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	117 (± 22)
21.	6-(2,3- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	109 (± 5)
22.	6-(2,4- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-7}	26 (± 11)
23.	6-(3,4- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	43 (± 17)
24.	6-(3,5- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	16 (± 1)
25.	2- 氨基 -6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	121 (± 7)
26.	2- 氯 -6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	140 (± 13)
27.	2- 甲硫基 -6-(3- 羟基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	50, 5 ($\pm 23, 5$)
28.	6-(2,4,6- 三甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	6 (± 4)
29.	6-(3,4,5- 三甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	25 (± 2)
30.	6-(2,4- 二氟苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	139 (± 2)
31.	6-(3,5- 二氟苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	156 (± 4)
32.	6-(2,3,4- 三氟苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	131 (± 22)

	测试的化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{BAP} = 100\%$]
33.	6-(3-氯-4-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-5}	141(± 20)
33.	6-(2-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-5}	34(± 5)

[0150] 实施例 8

[0151] 新化合物对植物细胞分裂的刺激效果

[0152] 将细胞分裂素依赖性烟草愈伤组织烟草 L. cv. (Nicotiana tabacum L. cv.) Wisconsin 38 在黑暗中、 25°C 下, 在改性 Murashige-Skoog 培养基上保持, 该培养基每 1 升包含: $4 \mu\text{mol}$ 烟酸, $2.4 \mu\text{mol}$ 维生素 B6 盐酸盐, $1.2 \mu\text{mol}$ 硫胺素, $26.6 \mu\text{mol}$ 甘氨酸, $1.37 \mu\text{mol}$ 谷氨酰胺, $1.8 \mu\text{mol}$ 肌醇, 30g 蔗糖, 8g 琼脂, $5.37 \mu\text{mol}$ α -萘基乙酸 (NAA) 和 $0.5 \mu\text{mol}$ 苄基氨基嘌呤 (BAP)。每三周进行一次转种。在进行生物测定前的十四天, 将愈伤组织转移到没有 6-苄基氨基嘌呤 (BAP) 的培养基中。从四周培育之后新鲜愈伤组织重量的增加确定生物活性。对于每个细胞分裂素浓度制备五次重复样品并重复整个测试两次。从获得的数据, 对于每种测试的化合物选择具有最高活性的浓度。计算在此浓度下化合物的相对活性 (表 6)。将 10^{-4}M 的 6-苄基氨基嘌呤 (BAP) 的活性假定为 100%。将要测试的细胞分裂素溶于二甲亚砜 (DMSO), 并采用蒸馏水使溶液浓度达到 10^{-3}M 。将此原料在用于生物测试的各自培养基中进一步稀释到 $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-4}\text{M}$ 的浓度。DMSO 的最终浓度不超过 0.2% 并因此不影响测定体系中使用的生物活性。

[0153] 表 7

[0154] 新细胞分裂素衍生物对细胞分裂素依赖性烟草愈伤组织烟草 L. cv. (Nicotiana tabacum) Wisconsin 38 生长的影响

[0155]

	测试的化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{BAP} = 100\%$]
1.	6-(2-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-6}	111(± 21)
2.	6-(3-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-5}	135(± 8)
3.	6-(4-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-6}	122(± 12)
4.	6-(2-氯苄基氨基)嘌呤	10^{-6}	93(± 4)
5.	6-(3-氯苄基氨基)嘌呤	10^{-5}	94(± 6)

	测试的化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{BAP} = 100\%$]
6.	6-(4- 氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	64 (± 8)
7.	6-(2- 溴苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	102 (± 5)
8.	6-(3- 溴苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	85 (± 11)
9.	6-(4- 溴苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	15 (± 9)
10.	6-(3- 碘苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	76 (± 8)
11.	6-(2- 甲基苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	118 (± 3)
12.	6-(3- 甲基苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	79 (± 5)
13.	6-(4- 甲基苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	52 (± 8)
14.	6-(2- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	79 (± 5)
15.	6-(3- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	76 (± 20)
16.	6-(4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-6}	39 (± 17)
17.	6-(2,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	11 (± 3)
18.	6-(3,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	45 (± 7)
19.	6-(2,3- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	8, 5 (± 2)
20.	6-(2,4- 二甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	21 (± 5)
21.	6-(2,4,6- 三甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	13 (± 6)
22.	6-(3,4,5- 三甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	19 (± 3)
23.	6-(3,4- 二羟基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	4 (± 1)
24.	6-(2,4- 二氟苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	95 (± 1)

	测试的化合物	具有最高活性的浓度 (mol. l ⁻¹)	活性 (%) [10 ⁻⁵ mol. l ⁻¹ BAP = 100%]
25.	6-(3,5- 二氟苄基氨基) 嘌呤	10 ⁻⁵	97(±3)
26.	6-(2,3,4- 三氟苄基氨基) 嘌呤	10 ⁻⁵	76(±4)
27.	6-(3- 氯 -4- 氟苄基氨基) 嘌呤	10 ⁻⁵	90(±1)

[0156] 实施例 9

[0157] 在苋属生物中对新颖化合物的测试

[0158] 采用几项改进进行标准苋属生物测定。将尾穗苋 (*Amaranthuscaudatus*) var. *atropurpurea* 在 10% 的 N- 氯苯磺酰胺 (w/v) 中表面消毒 10min, 然后在去离子水中洗涤 5 次。将它们放入包含由去离子水饱和的面巾纸的培养皿 (petri dishes) 中。在 25℃ 下、黑暗中培育 72h 之后, 切割秧苗的根部。将由两个子叶和下胚轴组成的外植体放入 5cm 培养皿中位于两层滤纸上, 该滤纸在 1ml 包含下列物质的培育介质中浸湿: 10 μmol Na₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 6.8, 5 μmol 酪氨酸和要测试的细胞分裂素。每个盘有 20 个外植体。在绿色安全光下在黑暗中进行整个步骤。在 25℃ 下在黑暗中培育 48h 之后, 通过在 4ml 3.33 μM 乙酸中冷冻外植体萃取 β- 花青苷。通过比较在 537nm 和 620nm 的吸光度确定 β- 花青的浓度如下: $\Delta A = A_{537nm} - A_{620nm}$ 。从获得的数据, 对于每种测试的化合物选择具有最高活性的浓度。计算在此浓度下的化合物相对活性 (表 6)。将 10⁻⁴M 的 6- 苄基氨基嘌呤 (BAP) 获得的活性假定为 100%。表 8 中显示的数值是五次重复试验的平均值, 并且重复整个测试两次。

[0159] 将要测试的细胞分裂素溶于二甲亚砜 (DMSO) 并采用蒸馏水使溶液达到 10⁻³M。将此原料在用于生物测试的各自培养基中进一步稀释到 10⁻⁸M ~ 10⁻⁴M 的浓度。DMSO 的最终浓度不超过 0.2% 并因此不影响使用的测定体系中的生物活性。

[0160] 表 8

[0161] 新细胞分裂素衍生物对尾穗苋 (*Amaranthus caudatus*) 子叶 / 下胚轴外植体中 β- 花青含量的影响

[0162]

	化合物	具有最高活性的浓度 (mol. l ⁻¹)	活性 (%) [10 ⁻⁵ mol. l ⁻¹ BAP = 100%]
1.	6-(2- 氟苄基氨基) 嘌呤	10 ⁻⁴	116(±3)
2.	6-(3- 氟苄基氨基) 嘌呤	10 ⁻⁴	140(±5)

	化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{BAP} = 100\%$]
3.	6-(4- 氟苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	44 (± 4)
4.	6-(2- 氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	109 (± 8)
5.	6-(3- 氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	96 (± 5)
6.	6-(4- 氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	35 (± 7)
7.	6-(2- 溴苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	94 (± 6)
8.	6-(3- 溴苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	71 (± 5)
9.	6-(4- 溴苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	17 (± 7)
10.	6-(3- 碘苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	79 (± 3)
11.	6-(2- 甲基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	98 (± 22)
12.	6-(3- 甲基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	84 (± 14)
13.	6-(4- 甲基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	26 (± 10)
14.	6-(2- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-5}	77 (± 5)
15.	6-(3- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	90 (± 16)
16.	6-(4- 甲氧基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	23 (± 2)
17.	6-(3- 硝基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	66 (± 7)
18.	6-(4- 硝基苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	25 (± 2)
19.	6-(2,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	19 (± 8)
20.	6-(3,4- 二氯苄基氨基) 嘌呤	10^{-4}	63 (± 10)

	化合物	具有最高活性的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	活性 (%) [$10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{BAP} = 100\%$]
21.	6-(2,3-二甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	22(± 3)
22.	6-(2,4-二甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-5}	12(± 2)
23.	6-(3,4-二甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	27(± 6)
24.	6-(3,5-二甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	1,5(± 1)
25.	6-(2,4,6-三甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	3(± 3)
26.	6-(3,4,5-三甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	2(± 2)
27.	6-(3,4-二羟基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	8(± 3)
28.	6-(2,4-二氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	88(± 7)
29.	6-(3,5-二氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	108(± 2)
30.	6-(2,3,4-三氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	94(± 3)
31.	6-(3-氯-4-氟苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	91(± 7)
32.	6-(2-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	19(± 3)
33.	6-(3-羟基-4-甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	24(± 1)
34.	6-(4-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤	10^{-4}	10(± 2)

[0163] 实施例 10

[0164] 新衍生物对玫瑰（多花蔷薇 *Rosa multiflora*）体外和体外后培养（post vitro）增殖和生根的影响。

[0165] 此试验的目的是测试新化合物是否在组织培养实施中具有实际用途。调查了繁殖率并检验了根部的体外后培养效果。杂交玫瑰（盆玫瑰栽培变种）在 350ml 容器中培养，容器的聚碳酸酯盖上有螺纹。每个培养容器包含 100ml 高压灭菌的培养基（ 120°C ，20min）。将培养物在 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、16h 光周期、 $40 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR 下维持。基底培养基（BMR）包含 Murashige 和 Skoog (1962) 常量元素、微量元素和维生素、 $95 \mu\text{M}$ NaFeEDTA、 $555 \mu\text{M}$ 肌醇、 111mM 蔗糖、 1.332mM 甘氨酸、 $684 \mu\text{M}$ L-谷氨酰胺和 7g/l 琼脂。向此培养基补充 $10 \mu\text{M}$ BA、mT、oMeOBAP

或 mMeOBAP (分别为化合物 no. 14 和 15)。对照培养不包含任何细胞分裂素。在 8 周的培养周期之后,确定每个外植体产生的枝条的数目,还确定根数目 / 外植体和总根长度 / 外植体。除去根并将外植体 (枝条簇) 种植在未施肥的泥炭中。在雾单元中水土适应四周之后,确定根数目和根长度。

[0166] 如期望的那样,无细胞分裂素的培养基几乎不产生新苗。原始枝条外植体长出了良好质量的单枝条,并且生根很好。BAP 得到高枝条增殖率,但枝条生根差。当与 BAP 本身比较时,测试的新 BAP 衍生物,产生了新枝条的生成并且生根显著较好 (表 9)。

[0167] 表 9

[0168] 细胞分裂素对 *Rosa multiflora* 中体外和体外后培养的枝条增殖和生根的影响

[0169]

细胞分裂素	体外				体外培养前	
	每个外植体的新枝条数目	每个外植体的花数目	每个外植体的根数目	每个外植体的总根长度(cm)	每个外植体的根数目	每个外植体的总根长度(cm)
0	0.2	0.03	0.8	1.2	4.6	17.1
BA*	3.8	0.00	0.0	0.0	0.6	1.1
MOHBAP	2.1	0.16	0.0	0.0	1.4	3.8
OmeOBAP	1.0	0.29	0.0	0.0	2.5	8.5
MmeOBAP	4.3	0.03	0.0	0.0	1.7	4.1

[0170] *BA = 苄基氨基

[0171] 实施例 11

[0172] 组织培养玫瑰 (杂交玫瑰) 的早期枝条衰老抑制

[0173] 组织培养玫瑰出现衰老症状。叶子开始变棕色并在几周之后,在容器中的所有外植体死掉。当换气受到限制时症状开始得更早,例如由塑料箔的容器的。这表明涉及乙烯我们的其它气体组分。施加到培养基的细胞分裂素产生乙烯,因此在此体系上测试有希望的新细胞分裂素似乎是有价值的。

[0174] 将杂交玫瑰 'Pailin' (切割玫瑰) 在 350ml 容器中培养,容器在聚碳酸酯盖上有螺纹。每个培养容器包含 100ml 高压灭菌的培养基 (120℃, 20min)。将培养物在 23±2℃、16h 光周期、40 μM⁻²s⁻¹PAR 下维持。基底培养基 (BMR) 包含 Murashige 和 Skoog (1962) 常量元素、微量元素和维生素、36.7mg/l NaFeEDTA、50mg/l NaFeEDDHA、100mg/l μM 肌醇, 30g/l 蔗糖, 100mg/l 甘氨酸, 50mg/l 泛酸钙, 100mg/l L-谷氨酰胺和 7g/l 琼脂-琼脂 (agar-agar)。向此培养基补充 10 μM BA、mT、和 mMeOBAP。将最后 2 种细胞分裂素过滤器消毒,并在高压灭菌容器中的培养基之后加入。对照培养基不包含任何细胞分裂素。在 6 周的培养周期之后,划痕衰老症状开始出现。对于每种植物记录第一片棕色叶子出现的日

子（图 8），以及整个外植体完全死亡的日子（图 9,10）。

[0175] 在含有 BA 的培养基上，死植物的相对数目看来象 S 形曲线，表明了自催化衰老的效果，可能由乙烯引起。测量顶部空间的乙烯浓度可能是件有趣的工作。对 mT 和 mMeOBAP，情况有所改进。mMeOBAP 确定是最好的化合物。甚至在 121 天之后，几乎所有的植物仍然活着。尽管在含有 mMeOBAP 的培养基上不可避免的产生一些棕色叶，但这些植物可轻易地用于下一次的培养。mMeOBAP 的使用是玫瑰（杂交玫瑰）微组织繁殖中的一项显著改进。

[0176] 实施例 12

[0177] 干燥胶囊

[0178] 5000 个胶囊，每个胶囊包含 0.25g 在先前或以下实施例中提及的具有通式 I、II 和 III 的一种化合物作为活性成分，其制备方法如下：

[0179] 组合物

[0180] 活性成分 1250g

[0181] 滑石 180g

[0182] 小麦淀粉 120g

[0183] 硬脂酸镁 80g

[0184] 乳糖 20g

[0185] 制备工艺：将提及的粉状物质通过目宽度 0.6mm 的筛网压挤。借助于胶囊填充机，将混合物的 0.33g 的小部分转移到明胶胶囊。

[0186] 实施例 13

[0187] 软胶囊

[0188] 5000 个软明胶胶囊，每个胶囊包含 0.05g 在先前或以下实施例中提及的具有通式 I、II 和 III 的一种化合物作为活性成分，其制备方法如下：

[0189] 组合物

[0190] 活性成分 250g

[0191] Lauroglycol 2 升

[0192] 制备工艺：将粉状活性成分悬浮于 Lauroglycol[®]（月桂酸丙二醇酯，Gattefossé S. A., Saint Priest, 法国）中，并在湿粉碎机中研磨到约 1-3 μm 的粒度。然后通过胶囊填充机，在每种情况下将混合物的 0.419g 的小部分转移到软明胶胶囊。

[0193] 实施例 14

[0194] 软胶囊

[0195] 5000 个明胶胶囊，每个胶囊包含 0.05g 在先前或以下实施例中提及的具有通式 I、II 和 III 的一种化合物作为活性成分，制备如下：

[0196] 组合物

[0197] 活性成分 250g

[0198] PEG400 1 升

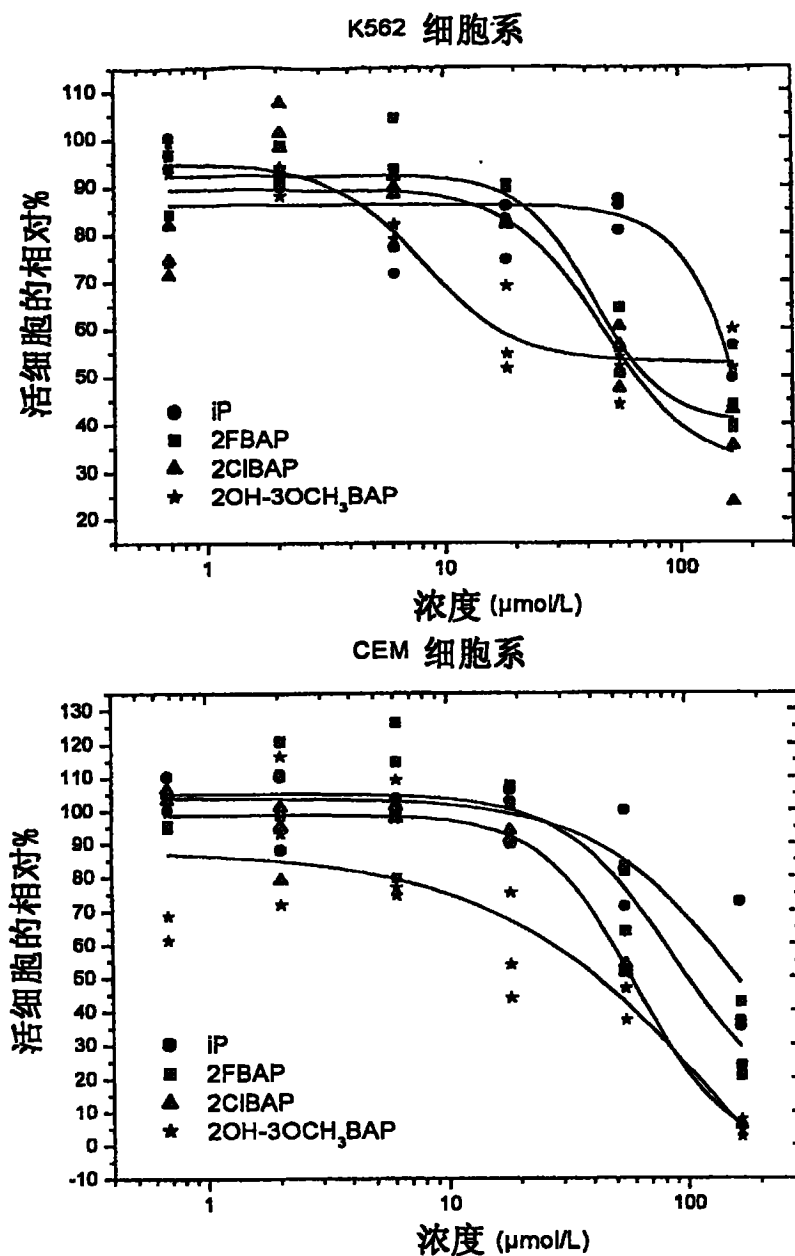
[0199] Tween 1 升

[0200] 制备工艺：将粉状活性成分悬浮于 PEG 400 (Mw 为 380-约 420 的聚乙二醇, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) 和 Tweens[®] 80 (聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯, Atlas Chem. Inc., Inc., USA, 由 Sigma, Fluka, Aldrich, USA 提供) 并在湿粉碎机中研磨到约 1-3mm 的

粒度。然后通过胶囊填充机,在每种情况下将混合物的 0.43g 的小部分转移到软明胶胶囊。

[0201] 工业实用性

[0202] 根据本发明基于 N⁶-取代腺嘌呤的新杂环化合物适用于诊断和治疗方法,特别是药物工业、化妆品、生物技术和农业等领域。



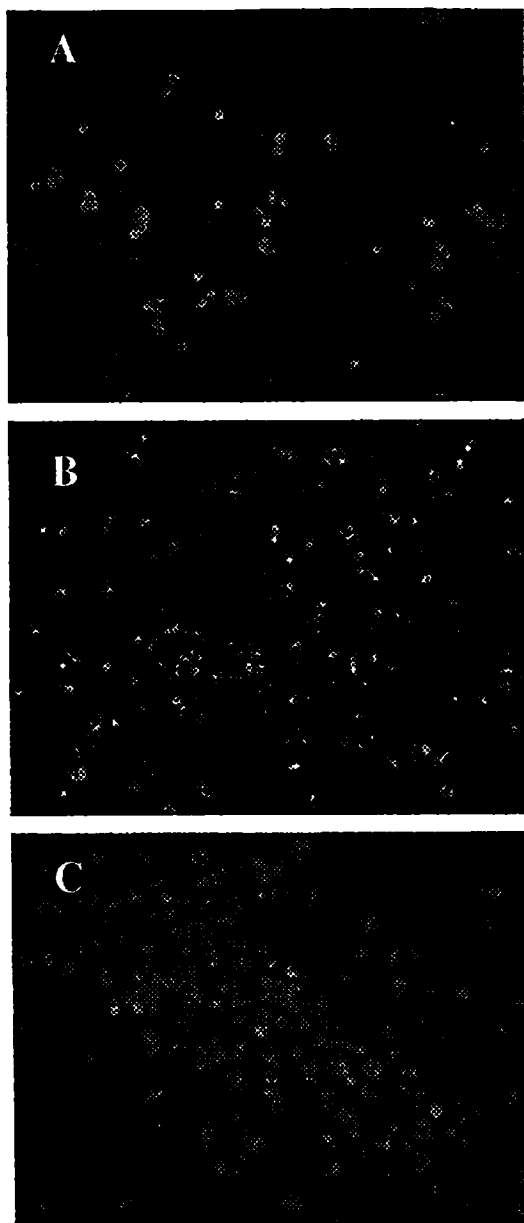
测试化合物对K562(A)和CEM(B)肿瘤细胞系生长的抑制。在钙黄绿素AM存在下确定细胞毒性。活性表示为最大活性的百分比(在抑制剂不存在下)。iP: 异戊烯腺嘌呤; 2F BAP: 6-(2-氟苄基氨基)嘌呤; 2Cl BAP: 6-(2-氯苄基氨基)嘌呤; 2OH-3OCH₃ BAP: 6-(2-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤。

图 1



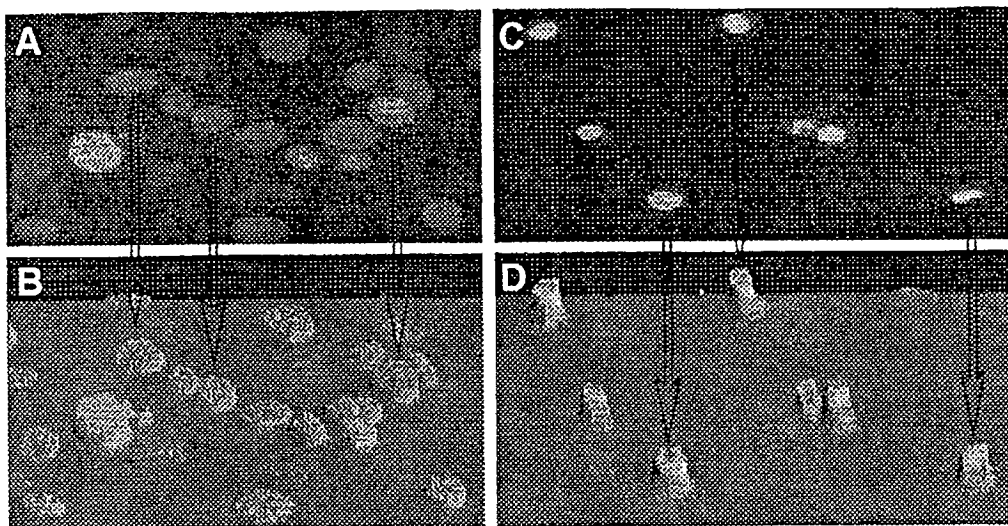
由于 β -半乳糖苷酶对底物X-gal(5-溴-4-氯-吲哚基- β -D-吡喃半乳糖苷)(1mg/ml)的作用,人体成纤维细胞(B)(其它细胞(A))培养物中衰老细胞被染成蓝色。

图 2



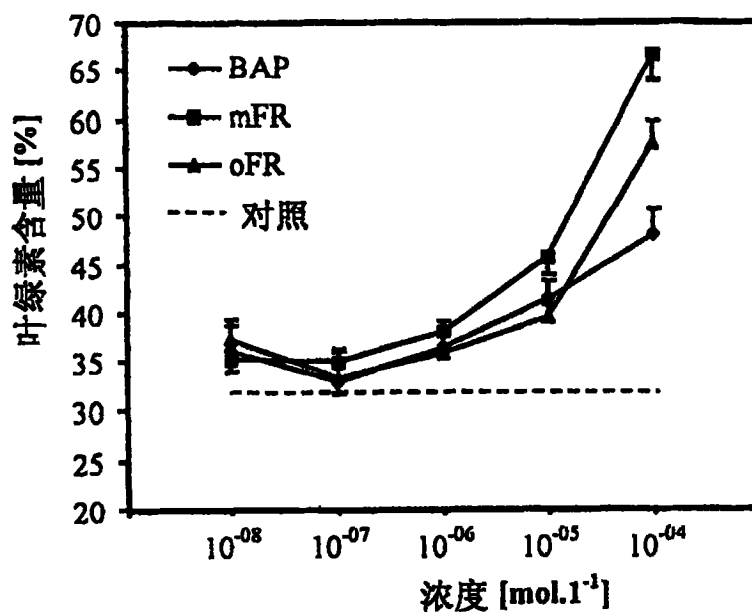
在使用细胞分裂素6-(2-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤之后，
在肿瘤细胞MCF-7细胞系中的诱导凋亡。A MCF-7，凋亡细胞：6h，
12，20mM，B MCF-7，次级坏死细胞(即凋亡之后产生的坏死)：
12h，12，40mM；C MCF-7，坏死细胞：24h，12，40mM。
Anexin FITC V(分子探针)和碘丙锭染色：anexin-绿色，PI-红色。

图 3



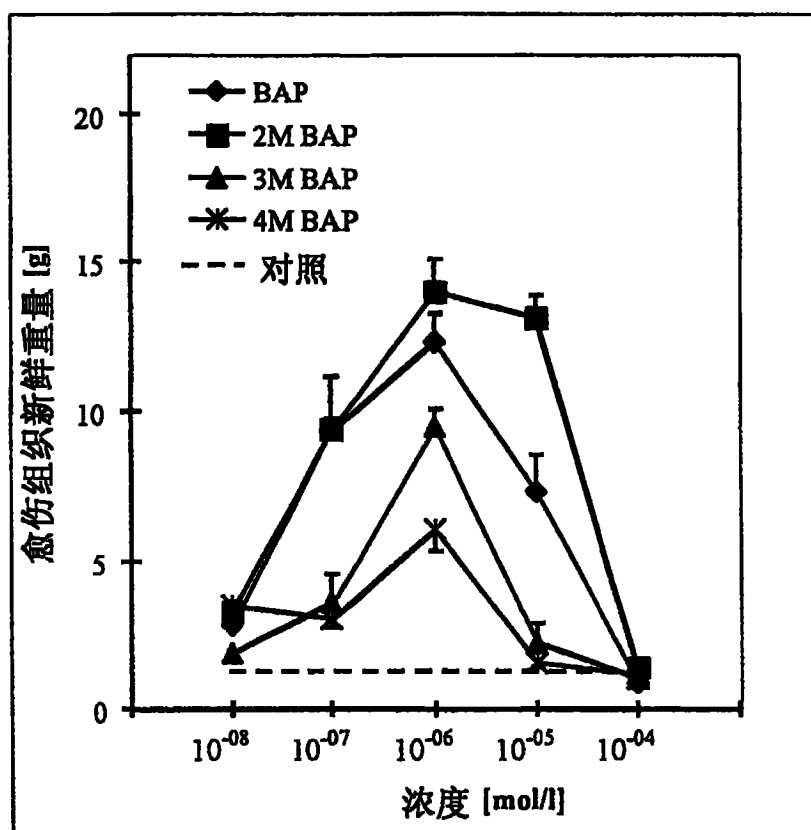
使用Anexin(绿色荧光)和Hoechst 3285(蓝色荧光)染色的凋亡细胞检测。在用6-(2-羟基-3-甲氧基苄基氨基)嘌呤处理过MCF-7肿瘤细胞之后，使用“Olympus图象分析”分析。A, B-没有处理的对照细胞；C, D-凋亡细胞(染色质的凝聚)；A, C-荧光显微术；B, D-荧光图象分析。

图 4



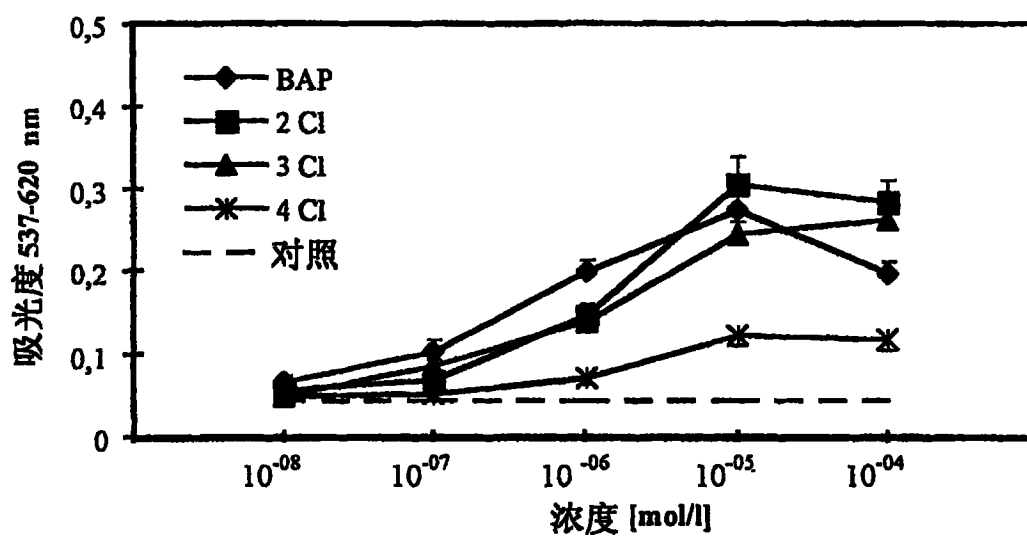
测试化合物对切断小麦叶尖端中叶绿素保留的影响。
数值表达为在孵育之前新鲜叶初始叶绿素含量的%。
误差棒显示对于5次重复测定平均值的标准偏差。
虚线指示没有任何细胞分裂素的对照培育，其值为31,7±0.9。

图 5



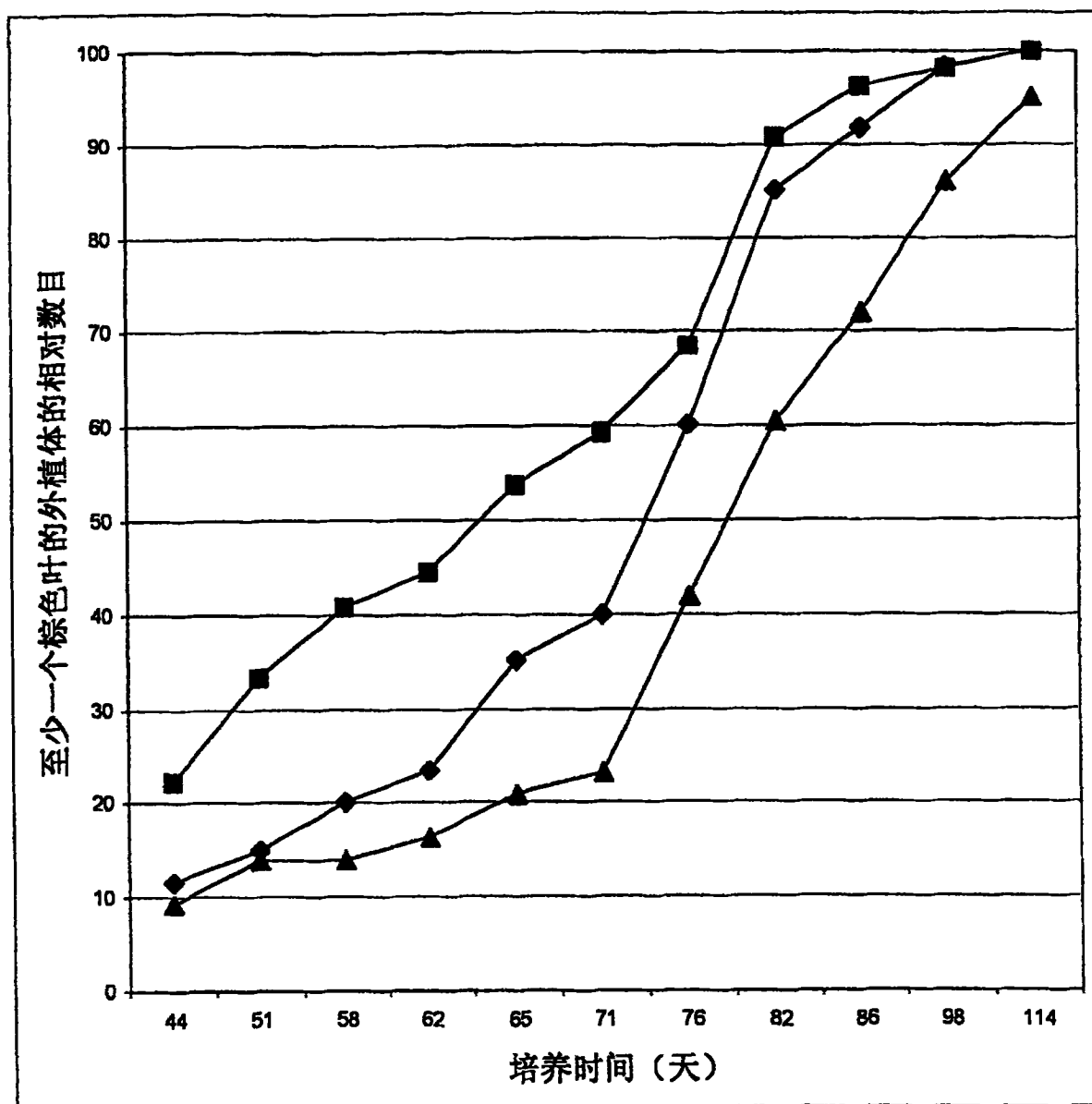
测试化合物对烟草愈伤组织培养物新鲜重量收率的影响。误差棒显示对于5次重复测定平均值的标准偏差。虚线指示没有任何细胞分裂素的对照处理数值， $2.2 \pm 0.4\text{g}$ 。

图 6



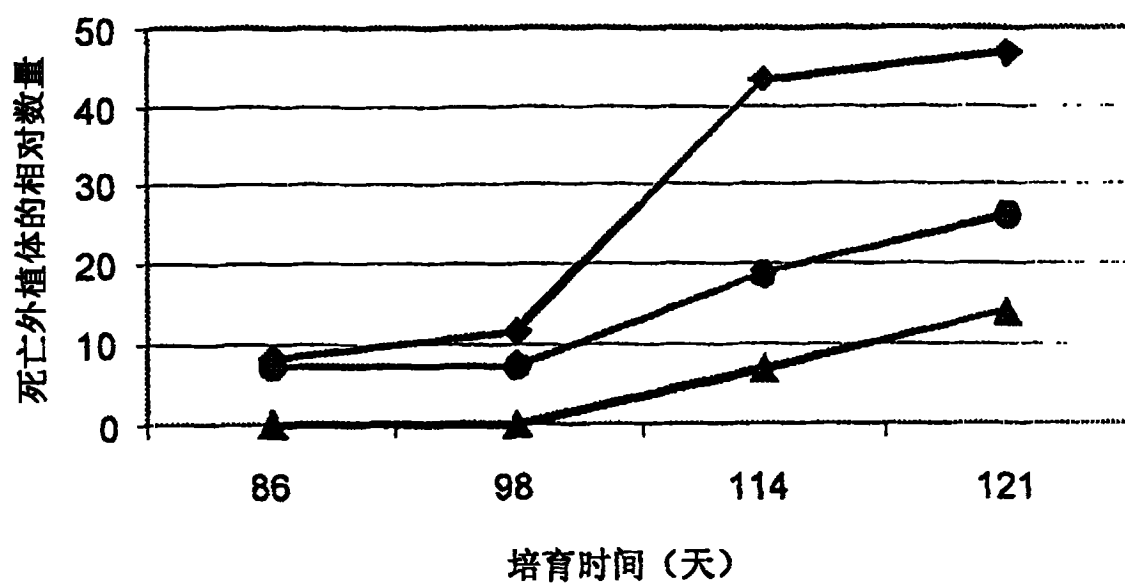
测试化合物对尾状菹子叶/下胚轴外植体中b-花青合成
黑暗诱导的影响。误差棒显示对于5次重复测定平均值的标准偏差。
虚线指示没有任何细胞分裂素的对照处理数值， 0.043 ± 0.009 。
数值表示在537和620nm吸收之间O. D. 单位的差异。

图 7



作为培养时间的函数的具有至少一个棕色叶的外植体的相对数目
(■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP)

图 8



与培养时间相关联的死亡外植体的相对数目 (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP).

图 9



左边：在含BA的介质上的死玫瑰外植体；
右边：在含mMeOBAP的介质上121天培育之后的旺盛玫瑰外植体

图 10