

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 294 535

(13) Druh dokumentu:

**B6**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-2818**  
(22) Přihlášeno: **02.08.2001**  
(40) Zveřejněno: **12.03.2003**  
(**Věstník č. 03/2003**)  
(47) Uděleno: **25.11.04**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.01.2005**  
(**Věstník č. 1/2005**)

(51) Int. Cl. :<sup>7</sup>

**C 07 D 473/34**

**C 07 H 19/16**

**A 61 K 31/52**

**A 01 N 43/48**

**A 61 P 35/00**

**A 61 P 37/06**

(73) Majitel patentu:

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AVČR,  
Praha, CZ

(72) Původce:

Doležal Karel Mgr. Dr., Vidče, CZ  
Popa Igor Dr., Olomouc, CZ  
Holub Jan Mgr., Olomouc, CZ  
Lenobel René Mgr., Štamberk, CZ  
Werbrouck Stefaan Dr., Harelbeke, BE  
Strnad Miroslav Prof. Ing. CSc., Olomouc, CZ  
Zatloukal Marek RNDr., Šumperk, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Marta Gabrielová, Třída Politických vězňů 7, Praha  
1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-  
substituovaného adeninu, způsoby jejich  
přípravy, jejich použití pro přípravu léčiv,  
kosmetických přípravků a růstových regulátorů,  
farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky  
a růstové regulátory tyto sloučeniny obsahující**

(57) Anotace:

Nové dusíkaté heterocyklické deriváty na bázi N<sup>6</sup>-  
substituovaného adeninu, které mají protinádorové, mitotické,  
imunosupresivní a antisenescenční účinky pro rostlinné,  
živočišné i lidské buňky a způsoby přípravy těchto derivátů.  
Farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové  
regulátory obsahující tyto deriváty jako účinnou látku a  
použití těchto derivátů pro výrobu léčiv, v biotechnologiích, v  
kosmetickém průmyslu a v zemědělství.

**CZ 294535 B6**

**Heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu, způsoby jejich přípravy, jejich použití pro přípravu léčiv, kosmetických přípravků a růstových regulátorů, farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory tyto sloučeniny obsahující**

5

### Oblast techniky

Vynález se týká nových dusíkatých heterocyklických derivátů na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu, které mají protinádorové, mitotické, imunosupresivní a antisenescenční účinky pro rostlinné, živočišné i lidské buňky, způsobů jejich přípravy a použití jako léčiva, farmaceutické kompozice, které tyto deriváty obsahující jako účinnou látku a použití těchto derivátů pro výrobu léčiv, v biotechnologiích, v kosmetickém průmyslu a v zemědělství.

15

### Dosavadní stav techniky

Mezi osvědčené látky regulační povahy u rostlin patří fytohormony. Významnou pozici mezi nimi zaujímají cytokininy. Po chemické stránce tvoří přirozeně se vyskytující cytokininy homogenní skupiny derivátů N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu, které plní v rostlinách velmi rozmanité funkce, a to od buněčného dělení, prodlužování a diferenciaci, až k tvorbě květů a plodů. Ruší dormanci semen, potlačují apikální dominanci a stimulují růst postranních pupenů, zpomalují stárnutí buněk, zvyšují odolnost proti stresům, ovlivňují permeabilitu buněčných membrán a vyvolávají akumulaci metabolitů v místě jejich aplikace (Letham a Palni 1983 – Ann. Rev. Plant. Physiol. 34: 163–197, 1983, Mok, D.W.S., Mok, M.C.: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994).

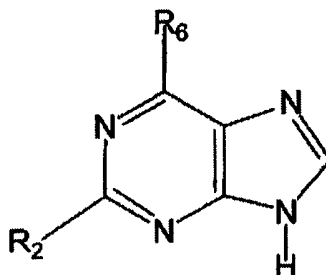
Rozhodující je zejména jejich interakce a autxiny při stimulaci buněčného dělení a regulaci diferenciaci buněk v rostlinných explantátových kulturách (Skoog, Miller 1957). Těto regulační funkce v *in vitro* kulturách bylo použito i k obecné definici cytokininů jako skupiny rostlinných růstových regulátorů (Skoog, F., Armstrong, D.J.: Cytokinins. – Ann. Rev. Plant Physiol. 21: 359–384, 1970). V kulturách *in vitro* je jako cytokinin nejčastěji používán spolu s kinetinem 6-benzylaminopurin (BAP). Tato látka byla dlouhou dobu považována za syntetickou, avšak nedávno byl prokázán její výskyt rovněž v rostlinách. Mezi cytokininy jsou běžně zařazovány i některé přirozeně se vyskytující metabolity 6-alkylaminopurinů, které vykazují minimální nebo žádnou biologickou aktivitu (7- a 9-glukosidy, konjugáty s aminokyselinami, některé modifikované cytokininy a rRNA). Z těchto důvodů jsou v předloženém vynálezu za cytokininy považovány látky, jejichž chemickým základem jsou N<sup>6</sup>-substituované adeniny.

Vzhledem k tomu že se veškeré organismy na Zemi evolučně vyvíjely společně po mnoho desítek miliónů let, je předpokladatelné, že pro látky rostlinného původu, jakými jsou cytokininy zaručeně jsou, si příroda našla mnoho regulačních vazeb k živočichům, a tedy i k člověku. Látky cytokininové povahy proto zřejmě ovlivňují značné množství molekulárních mechanismů v živočišných i lidských buňkách. Nedávno bylo zjištěno, že N<sup>6</sup>-substituované puriny a jejich deriváty mohou být základem pro vývoj nových generací léčiv s antiinflamatorními, protinádorovými, imunosupresivními, antivirálními a dalšími, medicínsky významnými účinky.

Cílem tohoto vynálezu je proto poskytnout protinádorové, imunosupresivní, růstově regulační, morfogeneticky aktivní a antisenescenční dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu s vysokou selektivitou a terapeutickým indexem účinnosti, tj. sloučeniny, které jsou málo toxické a přitom vysoce účinné.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I



(I),

5

ve kterých

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, methylmerkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acyl-  
10 amino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl nebo karbamo-  
ylovou skupinu,

R<sub>6</sub> znamená atom vodíku, halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný  
15 alkenyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloalkyl-(R)-,  
aryl-(R)-, hetero-(R)-, heteroaryl-(R)-, heterocykloalkyl-(R)- nebo R<sub>6</sub>'-X, ve které

X znamená NH-, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl)-, skupinu -O- nebo skupinu -S- a

R<sub>6</sub>' znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl,  
20 substituovaný alkynyl, acyl, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, cykloalkyl, substituovaný  
cykloalkyl, aryl, substituovaný aryl, heterocyklus, heteroaryl, substituovaný heteroaryl,  
aryl-(R)-, heterocykloalkyl, substituovaný heterocykloalkyl, heteroaryl-(R)-, hetero-(R)-,  
cykloalkyl-(R)- a heterocykloalkyl-(R)-.

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

halogen znamená

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

alkyl znamená

35 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

alkenyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

alkynyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

5 substituovaný alkyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

15 substituovaný alkenyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydroxy, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

25 substituovaný alkynyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedených v této legendě,

35 (R)-oxy znamená

.skupinu  $-OR_a$ , ve které  $R_a$  znamená alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, aryl-(R)-, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, heterocykloalkyl nebo substituovaný heterocykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

(R)-merkpto znamená

45 .skupinu  $-SR_b$ , ve které  $R_b$  znamená alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, aryl-(R)-, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, heterocykloalkyl nebo substituovaný heterocykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

50

(R)-sulfo znamená  $-SO_2R_c$ , ve které  $R_c$  znamená

hydroxy skupinu,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
55 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

5 . přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 . přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny  
 zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydroxy, merkpto, (R)–oxykarbonyl, kyano, nitro,  
 substituovaný karbamoyl (R)–sulfo, (R)–sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)–amino,  
 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)–oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené  
 generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovída-  
 jících skupin uvedených v této legendě,

10 (R)–sulfonamido znamená  $\text{-NHSO}_2\text{R}_d$ , kde  $\text{R}_d$  znamená

hydroxy skupinu,

15 . přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 . přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 . přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 . přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny  
 zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)–oxokarbonyl, kyano, nitro,  
 substituovaný karbamoyl, (R)–sulfo, (R)–sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)–amino,  
 20 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)–oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené  
 generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovída-  
 jících skupin uvedenými v této legendě,

acyl znamená

25 .skupinu  $\text{-C(O)R}_e$ , ve které  $\text{R}_e$  znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný  
 alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, aryl–(R)–,  
 substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, přičemž uvedené generické  
 substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících  
 30 skupin uvedenými v této legendě,

aryloxy znamená

35 .skupinu  $\text{-OAr}$ , ve které Ar znamená aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný  
 heteroaryl, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou  
 identické s definicemi odpovídajících skupin uvedených v této legendě,

(R)–amino znamená

40 .skupinu  $\text{NR}_f\text{R}'_g$  ve které  $\text{R}_f$  a  $\text{R}'_g$  nezávisle jeden na druhém znamená atom vodíku, alkyl,  
 alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl,  
 substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické  
 substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících  
 skupin uvedenými v této legendě,

45

substituovaný karbamoyl znamená

50 .skupinu  $\text{-C(O)NR}_h\text{R}'_i$ , ve které  $\text{R}_h$  a  $\text{R}'_i$  nezávisle jeden na druhém znamená atom vodíku,  
 alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl,  
 aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené  
 generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovída-  
 jících skupin uvedenými v této legendě,

(R)–oxykarbonyl znamená

5 .skupinu  $-C(O)OR_j$ , ve které  $R_j$  znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

acylamino znamená

10 .skupinu  $-NHCOR_k$ , ve které  $R_k$  znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

15 aryl znamená

20 .aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem, například fenyl nebo bifenyl, nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, například 1,2,3,4–tetrahydrafnyl, naftyl, antryl nebo fenantryl,

substituovaný aryl znamená

25 aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů s tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem například fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický například 1,2,3,4–tetrahydrafnyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)–oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)–sulfo, (R)–sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)–amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)–oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heterocyklus znamená

35 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku,

heteroaryl znamená

40 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický,

45 substituovaný heteroaryl znamená

50 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)–oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)–sulfo, (R)–sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)–amino, dialkylamino, alkylmerkpto (R)–oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

55

## aryl-(R)-znamená

.skupinu  $-R_1-Ar$ , kde  $Ar$  znamená arylovou skupinu a  $R_1$  znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 5 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů.  
 .aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou  
 alespoň jedním aromatickým kruhem, například fenylyl nebo bifenylyl, nebo násobně  
 kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, například 1,2,3,4-tetra-  
 10 hydronafylyl, naftylyl, antrylyl nebo fenantrylyl a substituovanou jedním až pěti substituenty  
 vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxy-  
 karbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino,  
 acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl  
 skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou  
 15 identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

## hetero-(R)-znamená

.skupinu  $-R_m-L$ , ve které  $R_m$  znamená  
 20 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty zvolenými ze skupiny  
 25 zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro,  
 substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino,  
 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené  
 generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovída-  
 jících skupin uvedenými v této legendě,

30

## a L znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze  
 skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku a případně substituovanou jedním  
 35 až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo,  
 merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfon-  
 amido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl  
 a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy,  
 které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

40

## heteroaryl-(R)-znamená

.skupinu  $-R_n-G$ , ve které  $R_n$  znamená  
 45 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny  
 50 zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro,  
 substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino,  
 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu přičemž uvedené  
 generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovída-  
 jících skupin uvedenými v této legendě,

a G znamená

5 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku přičemž alespoň jeden hetero-  
cyklický kruh této skupiny je aromatickým kruhem, která může být případně substituována  
jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino,  
10 hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl,  
(R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto,  
(R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituované  
skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými  
v této legendě,

cykloalkyl znamená

15 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových  
atomů,

substituovaný cykloalkyl znamená

20 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových  
atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující  
hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný  
karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino,  
25 alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické  
substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících  
skupin uvedenými v této legendě,

heterocykloalkyl znamená

30 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atom,  
v jejich cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny  
zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu,

substituovaný heterocykloalkyl znamená

35 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových ato-  
mů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze  
skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu, a substituovanou  
jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino,  
40 hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo,  
(R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkptom, (R)-oxy,  
cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají  
významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

45 cykloalkyl-(R)-znamená

.skupinu -R<sub>0</sub>-J, ve které R<sub>0</sub> znamená  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímo nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
50 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny  
zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro,  
substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino,  
55 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu přičemž uvedené



generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a J znamená

5

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů nebo.

10

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě, a

15

a heterocykloalkyl-(R)-znamená

.skupinu -R<sub>p</sub>V, ve které R<sub>p</sub> znamená

20

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

25

30

a V znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu,

35

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

40

a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy

45

ve formě racematů nebo opticky aktivních izomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituované heterocyklické sloučeniny ze skupiny zahrnující: 6-(2-hydroxy-3-chloroxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-brombenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-brombenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-brombenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-brombenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-fluorbenzyl-

55

amino)purin, 6-(2-hydroxy-6-fluorbenzylamino)purin, 6-(2,4-dihydroxy-4-methoxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3-methoxy-  
 benzylamino)purin, 6-(2,3-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxy-3-  
 methoxybenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-di-  
 5 hydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,5-di-  
 hydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-di-  
 hydroxy-4-bromoxybenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-4-jodbenzylamino)purin, 6-(2,6-di-  
 hydroxy-3-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3-brombenzylamino)purin, 6-(2,6-di-  
 hydroxy-3-jodbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3-fluorbenzylamino)purin, 6-(2,6-di-  
 10 hydroxy-3,5-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dibrombenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dijodbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorbenzylamino)-  
 purin, 6-(2-fluorbenzylamino)purin, 6-(3-fluorbenzylamino)purin, 6-(4-flourbenzylamino)-  
 purin, 6-(2-brombenzylamino)purin, 6-(3-brombenzylamino)purin, 6-(4-brombenzylamino)-  
 purin, 6-(2-jodbenzylamino)purin, 6-(3-jodbenzylamino)purin, 6-(4-jodbenzylamino)purin,  
 15 6-(2-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-chlorbenzylamino)purin, 6-(3-chlorbenzylamino)purin,  
 6-(4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-acetylbenzylamino)purin, 6-(3-acetylbenzylamino)purin  
 6-(4-acetylbenzylamino)purin, 6-(3-karboxybenzylamino)purin, 6-(4-karboxybenzylamino)-  
 purin, 6-(2-acetoxybenzylamino)purin, 6-(3-acetoxybenzylamino)purin, 6-(4-acetoxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(2-nitrobenzylamino)purin, 6-(3-nitrobenzylamino)purin, 6-(4-nitrobenzyl-  
 20 amino)purin, 6-(2-sulfobenzylamino)purin, 6-(3-sulfobenzylamino)purin, 6-(4-sulfobenzyl-  
 amino)purin, 6-(2-kyanobenzylamino)purin, 6-(3-kyanobenzylamino)purin, 6-(4-kyanobenzyl-  
 amino)purin, 6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin, 6-(2-methylbenzylamino)purin, 6-(3-  
 methylbenzylamino)purin, 6-(4-methylbenzylamino)purin, 6-(4-methylmanobenzylamino)-  
 purin, 6-(2-methoxybenzylamino)purin, 6-(3-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-methoxy-  
 25 benzylamino)purin, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin, 6-(4-  
 hydroxybenzylamino)purin, 6-(4-hexylbenzylamino)purin, 6-(4-hexylbenzylamino)purin, 6-(2-  
 formylbenzylamino)purin, 6-(3-formylbenzylamino)purin, 6-(4-formylbenzylamino)purin,  
 6-(2-ethoxybenzylamino)purin, 6-(3-ethoxybenzylamino)purin, 6-(4-ethoxybenzylamino)-  
 purin, 6-(4-ethylbenzylamino)purin, 6-(4-pentylbenzylamino)purin, 6-(4-penthyloxybenzyl-  
 30 amino)purin, 6-(4-fenoxybenzylamino)purin, 6-(4-fenylbenzylamino)purin, 6-(4-propylbenzyl-  
 amino)purin, 6-(4-propyloxybenzylamino)purin, 6-(4-oktylbenzylamino)purin, 6-(4-propyl-  
 benzylamino)purin, 6-(4-propyloxybenzylamino)purin, 6-(4-oktylbenzylamino)purin, 6-(4-  
 oktyloxybenzylamino)purin, 6-(4-ethoxybenzylamino)purin, 6-(3,4-diacetoxybenzylamino)-  
 purin, 6-(3,5-diacetoxybenzylamino)purin, 6-(2,6-diaminobenzylamino)purin, 6-(3,5-dibrom-  
 35 benzylamino)purin, 6-(3,5-dibrom-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-dichlorbenzylamino)-  
 purin, 6-(2,4-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,5-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dichlorbenz-  
 ylamino)purin, 6-(3,4-dichlorbenzylamino)purin, 6-(3,5-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,3,4,5-  
 tetrafluorbenzylamino)purin, 6-(2chlor-3,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(5-chlor-2-fluorbenz-  
 ylamino)purin, 6-(2,3,4-trifluorbenzylamino)purin, 6-(2,3,5-trifluorbenzylamino)purin, 6-(2,4,-  
 40 5-trifluorbenzylamino)purin, 6-(3,4,5-trifluorbenzylamino)purin, 6-(2,3,6-trifluorbenz-  
 ylamino)purin, 6-(3-chlor-2,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-6-fluorbenzylamino)-  
 purin, 6-(2,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(2,4-difluorbenzylamino)purin, 6-(3,4-difluorbenz-  
 ylamino)purin, 6-(2,5-difluorbenzylamino)purin, 6-(3,5-difluorbenzylamino)purin, 6-(5-fluor-  
 2-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-fluor-2-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-  
 45 chlor-5-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-(difluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(3-(di-  
 fluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(4-(difluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(2-fluor-5-(tri-  
 fluormethyl)benzylamino)purin, 6-(3-fluor-4-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-fluor-4-  
 (trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-(trifluormethylthio)benzylamino)purin, 6-(2-fluor-3-  
 (trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-chlor-6-fluor-3-methylbenzylamino)purin, 6-(6-  
 50 chlor-2-fluor-3-methylbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-2-fluor-5-(trifluormethyl)benzyl-  
 amino)purin, 6-(3-chlor-2-fluor-6-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2,3-difluor-4-  
 methylbenzylamino)purin, 6-(2,6-difluor-3-methylbenhylamino)purin, 6-(2-fluor-6-(trifluor-  
 methyl)benzylamino)purin, 6-(3-chlor-2,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(3-(trifluormethyl-  
 thio)benzylamino)purin, 6-(3-fluor-4-methylbenzylamino)purin, 6-(4-fluor-3-methoxyl-  
 55 benzylamino)purin, 6-(5-fluor-2-methylbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-3,6-difluorbenzyl-

amino)purin, 6-(4-(trifluormethylthio)benzylamino)purin, 6-(3-fluor-5-(trifluormethyl)benzyl-  
 amino)purin, 6-(2-chlor-4-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-(trifluormethoxy)benzylamino)purin,  
 6-(3-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-(tri-  
 5 fluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-chlor-3-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-fluor-  
 3-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(3,5-bis(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(3-(tri-  
 fluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(4-(trifluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(4-(trifluor-  
 methyl)benzylamino)purin, 6-(4-diethylaminobenzylamino)purin, 6-(3,4-dihydroxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,3-  
 ethylenedioxybenzylamino)purin, 6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxy-  
 10 benzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin,  
 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-dimethoxy-  
 benzylamino)purin, 6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-  
 hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-  
 15 hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-  
 hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin, 6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-  
 hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin, 6-(3-  
 hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin, 6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin, 6-(3,4-  
 dimethylbenzylamino)purin, 6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2,4-dimethylbenzylamino)-  
 20 purin, 6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin,  
 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(2-fluor-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-  
 fluor-4-methylbenzylamino)purin, 6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin, 6-(3,5-dinitrobenzyl-  
 amino)purin, 6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin, 6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin,  
 6-(3,4-dijod-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(2-chlor-3,4-dimethoxybenzylamino)purin,  
 25 6-(4-chlor-3,5-dinitrobenzylamino)purin, 6-(2-chlor-4-fluorbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-  
 4-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-6-methylbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-2-methyl-  
 benzylamino)purin, 6-(3-chlor-4-methylbenzylamino)purin, 6-(5-chlor-2-methoxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(2-chlor-4-fluorbenzylamino)purin, 6-(4-chlormethylbenzylamino)purin, 6-(2-  
 chlor-5-nitrobenzylamino)purin, 6-(2-chlor-6-nitrobenzylamino)purin, 6-(4-chlor-3-nitro-  
 30 benzylamino)purin, 6-(3,5-dibrom-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-brom-4-methoxy-  
 benzylamino)purin, 6-(4-brommethylbenzylamino)purin, 6-(4-butoxybenzylamino)purin, 6-(4-  
 butoxybenzylamino)purin, 6-(4-t-butyl/benzylamino)purin, 6-(4-t-butyl-2,6-dimethyl-  
 benzylamino)purin, 6-(2-aminobenzylamino)purin, 6-(3-aminobenzylamino)purin, 6-(4-amino-  
 benzylamino)purin, 6-(2-amino-6-chlorbenzylamino)purin, 6-(3-amino-4-chlorbenzylamino)-  
 35 purin, 6-(2-amino-3-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-amino-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-  
 amino-6-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-diamino-3-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-diamino-  
 4-chlorbenzylamino)purin, 6-(4-amino-3-chlorbenzylamino)purin, 6-(4-amino-5-  
 dichlorbenzylamino)purin, 6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-nitro-  
 benzylamino)purin, 6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin, 6-(4-benzyloxybenzylamino)purin,  
 40 6-(3-acetylbenzylamino)purin, 6-(2-acetylbenzylamino)purin, 6-(2,3,4-trimethoxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(2,4,5-trimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin,  
 6-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,3,4-tri-  
 hydroxybenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,3,4-trihydroxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(3,4,5-trihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin,  
 45 6-(2,4,5-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,4,5-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trichlor-  
 benzylamino)purin, 6-(2,3,4-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,3,5-trichlorbenzylamino)purin,  
 6-(2,3,6-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,5,6-trichlorbenzylamino)purin 6-anilinopurin 6-(2,4-  
 bis(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,5-bis(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,4-bis(trifluor-  
 methyl)anilino)purin, 6-(3,5-bis(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2-bromanilino)purin, 6-(3-  
 50 bromanilino)purin, 6-(4-bromanilino)purin, 6-(4-brom-2-chloranilino)purin, 6-(4-brom-3-  
 chloranilino)purin, 6-(2-brom-6-chlor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(4-brom-5,6-difluor-  
 anilino)purin, 6-(2-brom-4,6-difluoranilino)purin, 6-(4-brom-2,6-difluoranilino)purin, 6-(4-  
 brom-2-fluoranilino)purin, 6-(2-brom-4-fluoranilino)purin, 6-(2-brom-4-methylanilino)purin,  
 6-(3-brom-2-methylanilino)purin, 6-(4-brom-3-methylanilino)purin, 6-(2-brom-4-(trifluor-  
 55 methoxy)anilino)purin, 6-(3-brom-4-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(4-brom-2-(trifluor-

methoxy)anilino)purin, 6-(2-brom-4,5,6-trifluoranilino)purin, 6-(2,4-dibromanilino)purin, 6-(2,5-dibromanilino)purin, 6-(2,4-dibrom-3,6-dichloranilino)purin, 6-(2,6-dibrom-4-fluoranilino)purin, 6-(2,6-dibrom-4-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2,4-dibrom-6-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,6-dibrom-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,6-dichloroanilino)purin, 6-(3,4-dichloranilino)purin, 6-(3,5-dichloranilino)purin, 6-(2,6-dichlor-4-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2,4-dichlor-6-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,6-dichlor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,3-difluoranilino)purin, 6-(2,4-difluoranilino)purin, 6-(2,5-difluoranilino)purin, 6-(2,6-difluoranilino)purin, 6-(3,4-difluoranilino)purin, 6-(3,5-difluoranilino)purin, 6-(2-difluormethoxyanilino)purin, 6-(2-difluormethoxy-5-nitroanilino)purin, 6-(2,3-difluor-6-nitroanilino)purin, 6-(2,4-difluor-6-nitroanilino)purin, 6-(2,4-dijodanilino)purin, 6-(2,3-dimethylamino)purin, 6-(2,4-dimethylamino)purin, 6-(2,3-dimethyl-6-nitroanilino)purin, 6-(2,4-dimethoxyanilino)purin, 6-(2,3-dimethoxyanilino)purin, 6-(2,3-dinitro-6-methylanilino)purin, 6-(4-hydroxy-2-methylanilino)purin, 6-(2-chloranilino)purin, 6-(3-chloranilino)purin, 6-(4-chloranilino)purin, (3-chlor-2,6-dibrom-4-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-4-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-5-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-6-fluoranilino)purin, 6-(3-chlor-2-fluoranilino)purin, 6-(3-chlor-4-fluoranilino)purin, 6-(4-chlor-2-fluoranilino)purin, 6-(5-chlor-2-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-4-fluor-5-methylanilino)purin, 6-(5-chlor-4-fluor-2-nitroanilino)purin, 6-(5-chlor-2-hydroxyanilino)purin, 6-(4-chlor-2-jodanilino)purin, 6-(2-chlor-4-jodanilino)purin, 6-(2-chlor-6-methylanilino)purin, 6-(3-chlor-2-methylanilino)purin, 6-(3-chlor-4-(trimethoxy)anilino)purin, 6-(4-chlor-2-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-fluoranilino)purin, 6-(3-fluoranilino)purin, 6-(4-fluoranilino)purin, 6-(2-fluor-4-jodanilino)purin, 6-(2-fluor-5-nitroanilino)purin, 6-(2-fluor-4-methylanilino)purin, 6-(3-fluor-2-methylanilino)purin, 6-(3-fluor-4-methylanilino)purin, 6-(3-fluor-4-methylanilino)purin, 6-(5-fluor-2-methylanilino)purin, 6-(4-fluor-2-nitroanilino)purin, 6-(4-fluor-3-nitroanilino)purin, 6-(2-jodanilino)purin, 6-(2-fluor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(4-jod-2-methylanilino)purin, 6-(2-methoxyanilino)purin, 6-(3-methoxyanilino)purin, 6-(4-methoxyanilino)purin, 6-(2-methoxy-5-methylanilino)purin, 6-(2-methoxy-6-methylanilino)purin, 6-(4-methoxy-2-methylanilino)purin, 6-(5-methoxy-2-methylanilino)purin, 6-(4-methoxy-3-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2-methylanilino)purin, 6-(4-methylanilino)purin, 6-(3-methylanilino)purin, 6-(2-methyl-3-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-methyl-4-(trifluomethoxy)anilino)purin, 6-(2-methylthio)anilino)purin, 6-(4-(methylthio)anilino)purin, 6-(2-nitroanilino)purin, 6-(3-nitroanilino)purin, 6-(4-nitroanilino)purin, 6-(2-nitro-4,5,6-trifluoranilino)purin, 6-(2-nitro-4-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-nitrotetrafluoranilino)purin, 6-(2,3,4,5,6-pentabromanilino)purin, 6-(2,3,4,5,6-pentafluoranilino)purin, 6-(2,3,4,5-tetrachloranilino)purin, 6-(2,3,5,6-tetrachloanilino)purin, 6-(4-(1,1,2,2-tetrafluorethoxy)anilino)purin, 6-(2,3,4,5-tetrafluoranilino)purin, 6-(2,3,4,6-tetrafluoranilino)purin, 6-(2,3,5,6-tetrafluoranilino)purin, 6-(2,3,5,6-tetrafluor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,4,6-tribromanilino)purin, 6-(2,4,6-tribrom-3,5-dijodanilino)purin, 6-(2,3,4-trichloranilino)purin, 6-(2,4,5-trichloranilino)purin, 6-(2,4,6-trichloranilino)purin, 6-(2,4,5-trifluoranilino)purin, 6-(2,3,5-trifluoranilino)purin, 6-(2,3,6-trifluoranilino)purin, 6-(2,3,4-trifluoranilino)purin, 6-(2-trifluormethoxyanilino)purin, 6-(3-trifluormethoxyanilino)purin, 6-(4-trifluormethoxyanilino)purin, 6-(2,3,4-trifluor-6-nitroanilino)purin, 6-(2,4,5-trimethylanilino)purin, 6-(2,4,6-trimethylanilino)purin, 6-(3-chlor-5-aminoanilino)purin, 6-(3-chlor-4-karboxyanilino)purin, 6-(3-amino-4-chloranilino)purin, 6-(3-chlor-4-aminoanilino)purin, 6-(3-karboxy-4-hydroxyanilino)purin.

Výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 6-chlorpurin připravený z hypoxanthinu chlorací pomocí  $\text{POCl}_3$  (Davoll and Blowy, J. Am. Chem. Soc. 73:2936 (1957)) anebo je komerčně dostupný (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.).

Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 6-brompurin, který je možné buď připravit z adeninu, nebo hypoxanthinu reakcí s n-pentyl nitritem v tribrommetanu, nebo je komerčně dostupný.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob příprav dusíkatých heterocyklických sloučenin na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I, ve kterém R<sub>6</sub> mají výše uvedené významy a jehož podstata spočívá v tom že se v jednom přístupu dusíkatý heterocyklický derivát obecného vzorce I, ve kterém R<sub>6</sub> znamená atom chloru nebo bromu nebo skupinu methylthio a ve kterém R<sub>2</sub> má výše uvedený význam, nukleofilně substituují v poloze 6 za účelem převedení atomu chloru nebo bromu v poloze 6 za některý jiný z významů obecně substituentu R<sub>6</sub> uvedených výše za vzniku derivátu obecného vzorce I.

Další způsob přípravy podle předloženého vynálezu spočívá v tom, že se dusíkatý heterocyklický derivát obecného vzorce I, ve kterém R<sub>2</sub> znamená atom vodíku a R<sub>6</sub> znamená aminoskupinu, substituují v poloze 6 reakcí s aldehydem obecného vzorce R'<sub>6</sub>-CHO, ve kterém R'<sub>6</sub> má některý z významů uvedených výše, za účelem převedení aminoskupiny v poloze 6 na některý jiný z významů obecně substituentu R<sub>6</sub> uvedených výše za vzniku derivátu obecného vzorce I.

Předmětem vynálezu jsou rovněž dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Předmětem vynálezu jsou rovněž dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.

Předmětem vynálezu jsou rovněž dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I pro použití jako kosmetické přípravky.

Vynález rovněž zahrnuje farmaceutické, kosmetické a tkáňové přípravky obsahující sloučeninu obecného vzorce I či farmaceuticky přijatelnou sůl takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I při příprava afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagensů pro imunodetekci, diagnostických vzorků, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I nebo farmaceuticky přijatelných solí takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče pro přípravu farmaceutické kompozice použitelné jako mitotikum či antimitotikum, zejména při léčení nádorových onemocnění, při psoriáze, revmatické artritidě, lupusu, diabetu I. typu, roztroušené skleróze, restenóze, polycystickém onemocnění ledvin, host graft disease a dny, parazitózách způsobených houbami anebo prvoky, Alzheimerově chorobě, anebo jako antineurogenerativního léčiva, anebo k supresi imunostimulace anebo k léčení proliferčních onemocnění kůže.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle obecného vzorce I pro použití jako růstového regulátoru v zemědělství, zejména pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I jako kosmetického přípravku pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, například keratinocytů či fibroblastů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I jako růstového regulátoru v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

- 5 Předmětem vynálezu je konečně použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I pro výrobu léčiva na potlačení imunostimulace například arthritis nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.

#### Terapeutická aplikace

10 Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukální a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální, intrathekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

15 Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou například potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou například masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

20 Farmaceutické přípravky podle tohoto vynálezu jsou připravovány známým způsobem, například běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

25 Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, které mohou být připraveny před použitím, například v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je manitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují látky neutrální povahy, například konzervační přípravky, stabilizátor, zvlhčovač a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku anebo pufru. Jsou připravovány známým způsobem, například běžných rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako například sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatina.

35 Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8–22, s výhodou pak 12–22 uhlíkových atomů, například kyselinu laurovou, tri-  
40 dekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, například kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přísadkou antioxidantů, například vitamínu E, β-karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, například  
45 mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich izomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou například ethyl oleát, izopropyl myristát, izopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefosse, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholovou oleje z meruňkových jader a složený z glyceridů a esterů polyethylen-  
50 glykolu; Gattefosse, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolové glyceridy připravené alkoholovou TCM a složený z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefosse, Paříž), „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C<sub>8</sub> až C<sub>12</sub> od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a olej z podzemnice olejně.

55

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem například plněním do ampulí nebo lahvíček a uzavíráním obalů.

5 Například farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přidavkem dalších neutrálních látek.

10 Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, například laktóza, sacharóza, manitol nebo sorbitol, celulózo-  
vých preparátů anebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a polyvinylpyrrolidin a pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina selicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý nebo vápenatý, polyethylenglykol nebo jeho deriváty.

20 Jádra potahovaných tablet mohou být vybavena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulózo-  
vých preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávána do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo  
25 charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé  
30 tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou například s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální potahy jako mazací tuk, parafínový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselina ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat  
35 stabilizátory a detergenty například typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

Ostatní formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když  
40 je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou například práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, například v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

45 Farmaceutické přípravy, které mohou být používány rektálně, jsou například čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou například přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafínové uhlovodíky, polyethylenglykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, například ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, například sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s neutrálními látkami kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.  
55

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 parafiny, 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 izostearát. Aditiva k vodné fázi jsou například smáčedla jako polyalkoholy, například glycerol, propylal 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 z podzemnice olejná, 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 izopropyl 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.

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

Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako chlor-fluor nižší alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynové uhlovodíky, vzduch, N<sub>2</sub>O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinktury a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchány zvlhčovačla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, například glycerol, glykoly a polyethylenglykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižší polyethylen glykolů, 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.

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceu-



tických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, například člověka, vyžadujícího takovéto ošetření je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 50 g, s výhodou 0,5 až 10 g.

5

V dalším jsou nové dusíkaté heterocyklické sloučeniny obecného vzorce I a způsoby jejich přípravy a použití osvětleny na příkladech, aniž se tím jakkoliv omezují.

#### 10 Přehled obrázků

Na obr. 1 je znázorněna inhibice růstu nádorových buněčných linií K562 (A) and CEM (B) novými cytokininy. Cytotoxicita byla provedena pomocí testu Calcei AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální aktivity (v nepřítomnosti inhibitoru). iP: izopentenyladenin; 2F BAP: 6-(2fluorbenzylamino)purin; 2Cl BAP: 6-(2-chlorbenzylamino)purin; 2OH-3OCH<sub>3</sub>BAP: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin.

15

Na obr. 2 jsou znázorněny senescentní buňky lidských fibroblastů (B) (ne ostatní buňky (A)) značené modře vzhledem k působení β-galaktózydasy na substrát X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) (1 mg/ml).

20

Na obr. 3 je znázorněna indukce apoptosy v nádorových buňkách linie MCF-7 po aplikaci cytokininu 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purinu. A MCF-7, apoptoické buňky: 6 h, 12, 20 μM, B MCF-7, sekundárně nekrotické buňky (tj. nekrosa následující apoptosu), 12 h, 12, 40 μM; C MCF-7, nekrotické buňky, 24h, 12, 40μM. Anexin FITC V (Mol. Probes) a propidium jodid značení: anexin – zelená, PI – červená.

25

Obr. 4 znázorňuje detekci apoptózy pomocí Anexinu (zelená fluorescence) a značení Hoechstem 33258 (modrá fluorescence). Analyzováno pomocí „Olympus image analysis“ u nádorových buněk linie MCF-7 po ošetření 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purinem.

30

A,B-kontrolní buňky bez ošetření; C,D-apoptoické buňky (kondenzace chromatinu); A,C-fluorexcenční mikroskopie; B,D-image analýza fluorescence.

Obr. 5 ukazují vliv nových cytokininů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací s cytokininy. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokinů tj. 31,7±0,9.

35

Obr. 6 znázorňuje vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj. 2,2±0,4 g.

40

Obr. 7 znázorňuje vliv nových cytokininů na syntézu betacyaninu v kotyledonárních/hypokotylárních explantátech *Amaranthus caudatus*. Prezentované hodnoty představují rozdíly v jednotkách O.D. mezi absorbancí při 537 až 620 nm.

45

Obr. 8 ukazuje relativní počet explantátů s alespoň jedním hnědým listem v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP).

Obr. 9 ukazuje relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP).

50

Na obr. 10 je znázorněn vlevo: uhynulý explantát *Rosa hybrida* na médiu obsahujícím BAP; vpravo: zdravý explantát *Rosa hybrida* na médiu s mMeOBAP po 121 dnech kultivace.

## Příklady provedení vynálezu

## 5 Příklad 1

## 6-(3-chlorbenzylamino)purin

10 3 mmol 6-chlorpurinu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmol 3-chlorbenzylaminu a 5 mmol triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. T.t. 252 °C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:1). Výtěžek 92 %.

## 15 Tabulka 1

Látky připravené způsobem podle příkladu 1

Substituent	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES-MS [M+H <sup>+</sup> ]
	%C	%H	%N	
2-fluorbenzylamino	59,3/59,05	4,1/3,8	28,8/27,8	244
3-fluorbenzylamino	59,3/59,1	4,1/3,9	28,8/27,7	244
4-fluorbenzylamino	59,3/59,2	4,1/3,9	28,8/27,9	244
2-chlorbenzylamino	55,5/55,7	3,8/4,2	27,0/26,0	260
3-chlorbenzylamino	55,5/55,2	3,8/3,9	27,0/26,2	260
4-chlorbenzylamino	55,5/55,3	3,8/3,8	27,0/26,6	260
2-brombenzylamino	47,4/47,6	3,3/3,5	23,0/22,5	304
2-brombenzylamino	47,4/47,1	3,3/3,4	23,0/23,1	304
2-brombenzylamino	47,4/47,8	3,3/3,4	23,0/22,3	304
3-jodbenzylamino	41,0/41,4	2,8/2,8	20,0/19,5	352
2-methylbenzylamino	65,2/64,9	5,5/5,8	29,3/29,8	240
3-methylbenzylamino	65,2/64,7	5,5/6,0	29,3/29,9	240
4-methylbenzylamino	65,2/65,7	5,5/5,4	29,3/27,5	240
2-methoxybenzylamino	61,2/61,0	5,1/5,5	27,4/26,6	256
3-methoxybenzylamino	61,2/61,0	5,1/5,3	27,4/27,5	256
4-methoxybenzylamino	61,2/60,7	5,1/5,3	27,4/26,7	256
3-nitrobenzylamino	53,3/53,1	3,7/3,6	31,1/30,8	271
4-nitrobenzylamino	53,3/53,0	3,7/3,5	31,1/30,8	271
2,4-dichlorbenzylamino	49,0/49,4	3,1/3,1	23,8/23,1	295
3,4-dichlorbenzylamino	49,0/49,1	3,1/3,2	23,8/23,0	295
2,3-dihydroxybenzylamino	56,2/55,7	3,5/3,2	27,2/27,9	258
2,4-dihydroxybenzylamino	56,2/55,4	3,5/3,4	27,2/27,7	258
3,4-dihydroxybenzylamino	56,2/55,5	3,5/3,4	27,2/27,7	258
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	57,5/57,2	4,8/4,6	25,8/26,4	272

2-hydroxy-4-methoxybenzylamino	57,5/57,1	4,8/4,5	25,8/26,6	272
4-hydroxy-3-methoxybenzylamino	57,5/57,3	4,8/4,7	25,8/26,2	272
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	57,5/57,0	4,8/4,5	25,8/26,7	272
2,3-dimethoxybenzylamino	58,9/59,3	5,3/5,48	24,5/24,5	286
2,4-dimethoxybenzylamino	58,9/59,3	5,3/4,9	24,5/25,5	286
3,4-dimethoxybenzylamino	58,9/59,7	5,3/5,6	24,5/24,8	286
3,5-methoxybenzylamino	58,9/59,7	5,3/5,32	24,5/24,4	286
2,4,6-trimethoxybenzylamino	57,1/57,3	5,4/5,3	22,2/22,8	316
3,4,5-trimethoxybenzylamino	57,1/57,1	5,4/5,2	22,2/22,5	316
2,4-difluorbenzylamino	55,2/54,5	3,5/3,1	26,8/27,2	262
3,5-difluorbenzylamino	55,2/ 54,8	3,5/3,3	26,8/27,3	262
2,3,4-trifluorbenzylamino	51,6/51,1	2,9/2,7	25,1/25,5	280
3-chlor-4-fluorbenzylamino	51,9/50,9	3,3/3,4	25,2/25,7	278
2-(trifluormethyl)benzylamino	53,2/52,9	3,4/3,1	23,9/24,5	294
3-(trifluormethyl)benzylamino	53,2/52,9	3,4/3,2	23,9/24,6	294
4-(trifluormethyl)benzylamino	53,2/52,7	3,4/3,1	23,9/24,8	294
Anilino	62,5/62,2	3,3/3,1	33,1/33,8	212
2-fluoranilino	57,6/57,0	3,5/3,4	30,6/31,1	230
3-fluoranilino	57,6/57,1	3,5/3,3	30,6/31,5	230
4-fluoranilino	57,6/57,0	3,5/3,3	30,6/31,5	230
2-chloranilino	53,8/53,2	3,3/3,2	28,5/29,3	246
3-chloranilino	53,8/53,1	3,3/3,3	28,5/28,9	246
4-chloranilino	53,8/53,4	3,3/3,2	28,5/29,3	246
2-bromanilino	45,5/45,0	2,8/2,7	24,1/24,7	291
3-bromanilino	45,5/25,0	2,8/2,7	24,1/24,9	291
4-bromanilino	45,5/44,7	2,8/2,4	24,1/25,1	291
2-jodanilino	39,2/38,5	2,4/2,1	20,8/21,3	338
2-methoxyanilino	59,7/59,4	4,6/4,6	29,0/29,4	242
3-methoxyanilino	59,7/59,1	4,6/4,5	29,0/29,7	242
4-methoxyanilino	59,7/59,2	4,6/4,5	29,0/29,6	242
2-methylanilino	64,0/63,7	4,9/4,7	31,1/31,8	226
3-methylanilino	64,0/63,7	4,9/4,8	31,1/31,9	226
4-methylanilino	64,0/63,5	4,9/4,7	31,1/32,0	226

## Příklad 2

- 5 Směs 10 mmol adeninu, 12 mmol 2-methoxybenzaldehydu a 5 ml 98 až 100 % kyseliny mravenčí byla zahřívána pod zpětným chladičem 3 dny. Po odpaření kyseliny mravenčí za sníženého tlaku byl zbylý materiál ochlazen a poté promyt 40 ml etheru. Pevný zbytek byl přenesen do kádinky s 60 ml vody, směs povařena po dobu 1 hodiny, zfiltrována a surový produkt krystalizován z absolutního etanolu. Výtěžek 45 %.

10

Tabulka 2

Látky připravené metodou podle příkladu 2

Substituent	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES-MS [M+H <sup>+</sup> ]
	%C	%H	%N	
2-chlorbenzylamino	55,5/54,7	3,8/4,1	27,0/27,6	260
3-chlorbenzylamino	55,5/54,8	3,8/3,9	27,0/27,2	260
4-chlorbenzylamino	55,5/54,5	3,8/4,0	27,0/27,6	260
2-brombenzylamino	47,4/46,7	3,3/3,5	23,0/23,4	304
2-brombenzylamino	47,4/46,5	3,3/3,4	23,0/23,3	304
2-methylbenzylamino	65,2/64,8	5,5/5,9	29,3/29,8	240
3-methylbenzylamino	65,2/64,8	5,5/5,7	29,3/30,1	240
4-methylbenzylamino	65,2/64,7	5,5/5,8	29,3/29,9	240
2-methoxybenzylamino	61,2/60,3	5,1/5,3	27,4/27,9	256
3-methoxybenzylamino	61,2/61,00	5,1/5,3	27,4/27,9	256
4-methoxybenzylamino	61,2/60,4	5,1/5,2	27,4/28,3	256
2,4-dichlorbenzylamino	49,0/48,4	3,1/3,0	23,8/24,4	295
3,4-dichlorbenzylamino	49,0/48,6	3,1/3,1	23,8/24,4	295
2,3-dimethoxybenzylamino	58,9/58,8	5,3/5,4	24,5/24,7	286
2,4-dimethoxybenzylamino	58,9/58,4	5,3/5,8	24,5/25,5	286
3,4-dimethoxybenzylamino	58,9/58,5	5,3/5,6	24,5/25,2	286
3,5-dimethoxybenzylamino	58,9/58,7	5,3/5,4	24,5/25,0	286
2,4,6-trimethoxybenzylamino	57,1/57,2	5,4/5,4	22,2/22,5	316
3,4,5-trimethoxybenzylamino	57,1/57,4	5,4/5,5	22,2/22,5	316

5

## Příklad 3

*In vitro* cytotoxická aktivita nových derivátů

- 10 Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analýzu je metabolická aktivita životaschopných 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 rozpoznávají pouze životaschopné buňky. Množství zresukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životaschopných
- 15 buněk v kultuře.

- Lidská T-lymfoblastická leukemická buněčná linie CEM, promyelocytární HL-60 a monocytární U937 leukemie, buněčné linie prsního karcinomu MCF-7, buňky cervikálního karcinomu HELA, myšší fibroblasty NIH3T3, lidská erythroleukemie K562, buňky G361 lidského maligního
- 20 melanomu byly použity pro rutinní screening sloučenin. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80 cm<sup>2</sup> plastických lahvích a pěstování v médiu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5g/l glukózy, 2mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný), sloučeniny byly připraveny podle postupu podle předloženého vynálezu.

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk ( $10^4$  buněk na jamku na základě charakteristiky buněčného růstu), piperovalo se 80  $\mu$ l buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodin preinkubací při 37 °C v atmosféře CO<sub>2</sub>. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20  $\mu$ l alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle se sloučeniny ředily do šesti koncentrací v čtyřnásobné řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166.7  $\mu$ M, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v dubletu. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100 % vlhkosti a v atmosféře CO<sub>2</sub>. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluorskam Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (the tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujících vztahu:  $GI_{50} = (FD_{\text{jamka s derivátem}}/FD_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$ . Hodnota  $GI_{50}$ , která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek (obr. 1).

Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 3). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie bylo působení nových sloučenin, zatímco nemaligní buněčné linie, tzn. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Účinné deriváty zabily nádorové buňky při koncentracích blízkých 1–50  $\mu$ M.

### 25 Tabulka 3

Cytotoxicita nových sloučenin pro různá nádorové buňky

Identifikace látky	Použitá buněčná linie / IC 50 ( $\mu$ mol/L)								
	HOS	K-562	MCF7	B16-F0	NIH-3T3	G-361	CEM	HELA	HL60
Kinetin	>166,7	>166,7	>166,7				155,1		
		164,1							

IP	>166,7	146,9	>166,7				92,2		>166,7
		162,2							
BAP	>166,7	138,9	166,1				>166,7		>166,7
		>166,7							
cis Z	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7							
acetyl 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						
2Me 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
4Me 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		
3,5diMeO BAP		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
2,4,6triMeO BAP		>166,7	>166,7	>166,7			63,6		153,4
							105,3		
4OH3MeO BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
3NO <sub>2</sub> BAP		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
4NO <sub>2</sub> BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
2OH3MeO BAP		>166,7	26,6	69			41,6		64,3
							51		67,8
3OH4MeO BAP		>166,7	>166,7	>166,7			>166,7		>166,7
3,4diOH 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
2,3,4triF BAP		>166,7	>166,7				32		>166,7
		>166,7	>166,7				67		>166,7
2,4diF BAP		>166,7	>166,7				139,7		>166,7
		>166,7	>166,7				145,8		>166,7
zeatin		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
adenin		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7
		>166,7	>166,7				>166,7		>166,7

## Příklad 4

## 5 Nové sloučeniny indukují apoptózu nádorových buněk

Pro analýzu mechanismu indukované cytotoxicity nových sloučenin je důležité odlišit apoptózu od druhé hlavní formy buněčné smrti, nekrózy. Za prvé, na úrovni tkáně apoptóza produkuje malý nebo žádný zánět, protože okolní buňky, zvláště makrofágy, spíše než že jsou uvolněny do extracelulární tekutiny, pohltnou jednotlivé části buněk. Naproti tomu při nekróze je buněčný obsah uvolněn do extracelulární tekutiny, což způsobuje zánět. Za druhé, na buněčné úrovni vykazují apoptoické buňky smršťování a blebbing (puchýřkování) cytoplasmy, zachování struktury buněčných organel včetně mitochondrií, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jádra a tvorbu apoptoických tělísek, ačkoli ne všechny jsou vidět u všech typů buněk. Za třetí, na molekulární úrovni hraje významnou roli v indukci apoptózy řada biochemických procesů. Většina z nich však není dobře pochopena a mají za následek aktivaci proteáz a nukleáz, které nakonec ničí klíčové biologické makromolekuly – protein a DNA.

Pro detekci apoptotického versus nekrotického módu buněčné smrti se používají dvě nezávislé metody: zhodnocení morfologie pomocí elektronové mikroskopie a analýzy fragmentace DNA průtokovou cytometrií.

Buněčné linie HL-60 byly kultivovány v 6-jamkových kultivačních destičkách s nebo bez 70 µm koncentrace nových derivátů při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 3 až 24 hodin. Po inkubaci byly buňky peletizovány, promyty Hankovým pufovaným solným roztokem a zpracovány jak je popsáno níže.

Buňky byly suspendovány ve 2 % glutaraldehydu/PBS, fixovány přes noc při 4 °C, peletizovány a poté zality do 1 % agaru (Agar Noble, Difco). Agarové bloky obsahující fixované buňky byly polymerizovány epoxidem, ultratence nařezány, postfixovány oxidem osmičelým, kontrastovány octanem uraničitým a zkoumány pod elektronovým mikroskopem.

Počáteční zkoumání mikroskopii fázového kontrastu ukazovaly že ošetřené linie HL-60 vykazují typické morfologické znaky apoptotických buněk, což bylo později prokázáno fluorescenční mikroskopii (obr. 2 a 3). Typická morfologická kritéria apoptózy – kondenzace chromatinu, fragmentace jádra, cytoplasmatický blebbing a vznik apoptoických tělísek byla identifikována v buňkách ošetřených všemi nově vyvinutými deriváty.

## Příklad 5

## Imunosupresivní aktivita

5 Jedním z důležitých parametrů specifické buněčné imunity je odezva lymfocytů na antigeny nebo polyklonální mitogeny. Většina normálních savčích periferních lymfocytů je v klidové fázi buněčného cyklu. Antigeny i nespecifické polyklonální mitogeny mají schopnost aktivovat lymfatické buňky, což je doprovázeno dramatickými změnami ve vnitrobuněčném metabolismu (mitochondriální aktivita, proteinová syntéza, syntéza nukleových kyselin, formování blastů a buněčná proliferace). Sloučeniny, které jsou schopné selektivně inhibovat proliferaci lymfo-

10 cytů, jsou potenciálními imunosupresivy. Pro měření proliferací odpovědi lymfocytů bylo vyvinuto množství *in vitro* analýz. Nejběžněji používanou metodou je inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu.

Během buněčné proliferace dochází nejprve k replikaci DNA, poté je buňka rozdělena na dvě dceřinné buňky. Tento úzký vztah mezi buněčným zdvojením a DNA syntézou poskytuje

15 možnost pro vyhodnocení intenzity buněčné proliferace. Jestliže jsou značené DNA prekurzory přidány do buněčné kultury, dělicí se buňky inkorporují značené nukleotidy do své DNA. Tyto testy obvykle vyžadují použití radioaktivně značených nukleotidů, konkrétně tritiový thymidin (<sup>3</sup>H]-TdR). Množství [<sup>3</sup>H]-TdR inkorporované do buněčné DNA je kvantifikováno pomocí scintilačního počítáče.

20

Lidskou heparinovanou periferní krev jsme získali od zdravých dobrovolníků punkcí z kubitální žíly. Krev byla naředěna v PBS (1:3) a mononukleární buňky byly odseparovány centrifugací ve Ficoll-Hypaque hustotním gradientu (Pharmacie, 1.077 g/ml) při 2200 g po dobu 30 minut.

25 Při následující centrifugaci byly lymfocyty promývány v PBS, poté resuspendovány v buněčném kultivačním médiu (RPMI 1640, 2mM glutamin, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 10 % fetální telecí sérum a hydrogenuhličitan sodný).

Buňky byly naředěny na cílovou hustotu, 1.100.000 buněk/ml a byly pipetovány (180 µl) do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček. Testované látky byly přidány k buněčným suspenzím ve čtyřkovém ředění v 20 µl alikvótech/jamku v čase nula. Obvykle byly testované sloučeniny vyhodnocovány v šesti koncentracích s nejvyšší testovanou koncentrací 266.7 µM. Jednotlivé koncentrace derivátů byly testovány v dubletu. Lymfocyty ve všech jamkách s výjimkou nestimulovaných kontrol byly aktivovány přidáním 50 µl konkanavalinu A (25 µg/ml). Buněčné

30 suspenze byly dále inkubovány 72 hodin při 37 °C a při 100% vlhkosti v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Na konci inkubace byly buňky analyzovány pomocí [<sup>3</sup>H]-TdR:

35

Buňky byly inkubovány s 0,5 µCi (20 µl zásobního roztoku 500 µCi/ml) na jamku po dobu 6 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. V dalším kroku byl použit automatizovaný buněčný harvester pro lýzi buněk ve vodě a adsorpci DNA na filtr ze skleněných vláken o velikosti mikrotitračního panelu. DNA s inkorporovaných [<sup>3</sup>H]-TdR je zadržena na filtru, přičemž neinkorporovaný materiál filtrem prochází. Filtry byly usušeny při teplotě místnosti přes noc, uzavřeny v plastických sáčkách s 10 až 12 ml scintilační tekutiny. Množství [<sup>3</sup>H]-TdR přítomné na každém filtru bylo stanoveno scintilačním počítáči. Efektivní imunosupresivní dávka (ED) byly spočítány podle

40 následujícího vzorce:  $ED = \frac{CCPM_{\text{jamka s terc. derivátem}}}{\text{průměrná CCMP}_{\text{kontrolní jamka}}} \times 100 \%$ . Hodnota ED<sub>50</sub>, což je koncentrace látky inhibující proliferaci 50 % lymfocytů, byla spočítána z dávkových křivek.

45

Pro vyhodnocení imunosupresivní aktivity nových sloučenin byla analyzována jejich schopnost inhibovat polyklonálním mitogenem stimulovanou proliferaci normálních lidských lymfocytů (Tab. 4). Naše výsledky ukazují, že tyto sloučeniny mají minimální vliv na inkorporaci <sup>3</sup>H-thymidinu v klidových (nestimulovaných) lymfocytech, nicméně účinně inhibují proliferaci mitogenem aktivovaných lymfocytů. Efektivní imunosupresivní dávka tetrasubstituovaných derivátů za *in vitro* podmínek byla v rozmezí 10 až 40 µM.

50



Tabulka 4

## Imunosuprasivní aktivita nových sloučenin

5

SUBSTITUENT R6	Lidské lymphocyty ED <sub>50</sub> (μM)
3-chloranilino	4,7
3-chlor-5-aminoanilino	12,4
2-hydroxybenzylamino	0,5
3-karboxy-4-chloranilino	2,1
3-hydroxybenzylamino	5,6
4-bromanilino	4,7
4-chloranilino	6,2
3-amino-4-chloranilino	8,3
3-chlor-4-aminoanilino	12
2-hydroxybenzylamino	11,5
3-hydroxybenzylamino	8,4
3-fluorbenzylamino	18,2
3-karboxy-4-chloranilino	0,5
2-hydroxy-4-methoxybenzylamino	1,8
3-chloranilino	7,2
2-fluorbenzylamino	2,5
2,3-difluorbenzylamino	10,7

## Příklad 6

## 10 Inhibice senescence živočišných buněk

V tomto případě, lidské diploidní fibroblasty (HCA buňky s rozdílnou úrovní pasážování: pasáž 25 – označení HCA25; pasáž 45 – označení HCA45; pasáž 80 – označení HCA80) byly použity pro stadium β-galaktózidázové aktivity. Médium 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 CO<sub>2</sub>) po dobu 1 až 16 hodin ve 2 až 3 ml roztoku obsahujícího ferrikyanid draselný (5 mM), ferrokyanid draselný (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (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 senescenčních buněk anebo měření intenzity zabarvení při 415 nm spektrofotometricky pomocí readeru Multiscam MCC (Labsystems) (positivně senescentní buňky). V těchto experimentech byly označeny pouze senescenční buňky, a to díky účinku β-galaktózidasy na substrát (obr. 4).

25

Tabulka 5

Vliv nových sloučenin na počet senescenčních buněk v kultuře lidských fibroblastů

SUBSTITUENT R6	SENESCENTNÍ BUŇKY (%)		
	HCA25	HCA45	HCA80
KONTROLA	3	5	38
3-chloranilino	4	5	25
3,4-dihydroxybenzylamino	5	4	29
anilino	3	4	27
3-chlor-5-aminoanilino	3	6	24
3-chlor-4-karboxyanilino	5	2	25
3-karboxy-4-chloranilino	3	5	20
3-karboxy-4-hydroxyanilino	4	2	26
4-bromanilino	5	3	25
4-chloranilino	5	5	26
3-amino-4-chloranilino	4	6	22
3-chlor-4-aminoanilino	5	5	24
2-fluorbenzylamino	4	3	16
3-fluorbenzylamino	3	3	15
2-hydroxybenzylamino	3	4	17
3-hydroxybenzylamino	5	3	22
2-acetoxybenzylamino	6	5	32
3-acetoxybenzylamino	4	6	27
2-acetylbenzylamino	3	4	25
3-acetylbenzylamino	5	5	28
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	4	3	20
2-hydroxy-3-methylbenzylamino	5	2	18
2-hydroxy-3-chlorbenzylamino	4	3	14
2,6-dihydroxy-4-chlorbenzylamino	3	3	16
2,3-dihydroxy-4-methoxybenzylamino	3	4	17
2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino	5	3	22
2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino	4	3	13
2,3-dihydroxy-4-chlorbenzylamino	3	3	14
2,5-dihydroxy-4-chlorbenzylamino	5	4	23
2-amino-6-chlorbenzylamino	3	4	16
3-amino-4-chlorbenzylamino	5	5	22
2,3-diamino-4-chlorbenzylamino	4	3	17

5

Jak je ukázáno v tabulce 5, se vzrůstajícím počtem pasáží vrůstala hladina zabarvení po přidání substrátu pro  $\beta$ -glukosidasu. Nejstarší buňky byly charakterizovány tmavě modrou až téměř tmavou barvou. N<sup>6</sup>-substituované deriváty adeninu byly velmi účinné při zpomalování senescence buněk po 80 pasáží. V případě dlouhodobější kultivace byly schopny přežít až o 30 % delší dobu oproti buňkám kontrolním.

10

## Příklad 7

15

Antisenescenční aktivity nových látek při testování v senescenčním biotestu na segmentech listů pšenice.

Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byly promyty pod tekoucí vodou po 24 h a poté vysety do vermikulity nasyceného Knopovým živým roztokem.

Nádoby se semeny byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita  $50 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a teplotou  $15^\circ\text{C}$ . Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první praporcový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů však od 5 rostlin byly odebrány vrcholové sekce druhé přibližně 35 mm, které byly zkráceny tak, aby jejich váha byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto 5 listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrenových destiček obsahujících 150 ml roztoku testovaného derivátu. Destičky byly umístěny do plastického boxu vystlaného filtračním papírem, který byl nasycen vodou za účelem maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při  $25^\circ\text{C}$  byly listové sekce vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 ml 80% ethanolu zahřátím při  $80^\circ\text{C}$  po dobu 10 minut. Objem vzorku byl poté doplněn na 5 ml přidáním 80% ethanolu. Absorbance extraktů byla měřena při 665 nm. Jako kontroly byly měřeny rovněž chlorofylové extrakty z listů a listových vrcholů inkubované v deionizované vodě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z 5 opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 2-krát. Výsledky těchto experimentů byly vyneseny ve formě grafů závislosti obsahu chlorofylu v senescenčních listech v závislosti na koncentraci (viz obr. 5). V každém experimentu byla použita jako kontrolní látka 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokiny 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 (obr. 5) byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 6)  $10^{-4}$  M koncentrace BAP byla postulována jako 100 % biologické aktivity.

Tabulka 6

Účinek nových cytokinů na retenci a chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Hodnoty v tabulce jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací.

	Testovaná sloučenina	maximální účinná koncentrace ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	účinnost (%) [ $10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP = 100%]
1.	6-(2-fluorbenzylamino)purin	$10^{-4}$	169 ( $\pm 20$ )
2.	6-(3-fluorbenzylamino)purin	$10^{-4}$	200 ( $\pm 25$ )
3.	6-(4-fluorbenzylamino)purin	$10^{-4}$	95,5 ( $\pm 3,5$ )
4.	6-(2-chlorbenzylamino)purin	$10^{-4}$	116,5 ( $\pm 6,5$ )
5.	6-(3-chlorbenzylamino)purin	$10^{-4}$	82 ( $\pm 2$ )
6.	6-(4-chlorbenzylamino)purin	$10^{-4}$	64,5 ( $\pm 13,5$ )
7.	6-(2-brombenzylamino)purin	$10^{-4}$	52 ( $\pm 14$ )
8.	6-(3-brombenzylamino)purin	$10^{-4}$	48 ( $\pm 6$ )
9.	6-(4-brombenzylamino)purin	$10^{-5}$	30 ( $\pm 15$ )
10.	6-(3-jodbenzylamino)purin	$10^{-4}$	83,5 ( $\pm 23$ )
11.	6-(2-methylbenzylamino)purin	$10^{-4}$	158 ( $\pm 29$ )
12.	6-(3-methylbenzylamino)purin	$10^{-4}$	111 ( $\pm 16$ )
13.	6-(4-methylbenzylamino)purin	$10^{-4}$	35 ( $\pm 23$ )
14.	6-(2-methoxybenzylamino)purin	$10^{-4}$	269 ( $\pm 12$ )
15.	6-(3-methoxybenzylamino)purin	$10^{-4}$	178 ( $\pm 16$ )
16.	6-(4-methoxybenzylamino)purin	$10^{-4}$	79 ( $\pm 6$ )
17.	6-(3-nitrobenzylamino)purin	$10^{-4}$	60 ( $\pm 15$ )

Tabulka 6 - pokračování

	Testovaná sloučenina	maximální účinná koncentrace (mol.l <sup>-1</sup> )	účinnost (%) [10 <sup>-4</sup> mol.l <sup>-1</sup> BAP = 100%]
18.	6-(4-nitrobenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	83 (±8)
19.	6-(2,4-dichlorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	0
20.	6-(3,4-dichlorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	117 (±22)
21.	6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	109 (±5)
22.	6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-7</sup>	26 (±11)
23.	6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	43 (±17)
24.	6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	16 (±1)
25.	2-amino-6-(3-hydroxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	121 (±7)
26.	2-chlor-6-(3-hydroxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	140 (±13)
27.	2-methylthio-6-(3-hydroxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	50,5 (±23,5)
28.	6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	6 (±4)
29.	6-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	25 (±2)
30.	6-(2,4-difluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	139 (±2)
31.	6-(3,5-difluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	156 (±4)
32.	6-(2,3,4-trifluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	131 (±22)
33.	6-(3-chlor-4-fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	141 (±20)
34.	6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	34 (±5)

- 5 Vyvinuté látky mají velmi silné antisenescenční účinky. Některé z nich vyvolávají až 200% nárůst obsahu chlorofylu v extirpovaných listech pšenice oproti kontrole.

## Příklad 8

- 10 Stimulační vliv nových látek na buněčné dělení rostlinných buněk

15 Stimulační vliv nově připravených derivátů byl testován v kalusovaném 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 médiu 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 myoinositolu, 30 g sacharózy, 8 g agaru, 5,37 μmol α-naftylctové kyseliny a 0,5 μmol 6-benzylaminopurinu. Subkultivace probíhala každé 3 týdny. Čtrnáct dní před započítáním biotestu byl kalus přenesen na médium bez 20 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 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10<sup>-3</sup> M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10<sup>-8</sup> až 10<sup>-4</sup> M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2 % a v této 25 koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. Stimulační aktivita byla vypočtena z růstových křivek závislosti čerstvé hmoty kalusu na koncentraci, jejichž příklady jsou znázorněny na obr. 6.

- 30 Ze získaných dat (obr. 6) byla opět vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 7). 10<sup>-5</sup> M koncentrace BAP byla postulována jako 100 % biologické aktivity.

Tabulka 7

5 Vliv nových cytokininů na růst cytokinin–dependentního tabákového kalusu *Nicotiana tabacum*  
L. sv. Wisconsin 38

	Testovaná sloučenina	maximální účinná koncentrace (mol.l <sup>-1</sup> )	účinnost (%) [10 <sup>-5</sup> mol.l <sup>-1</sup> BAP = 100%]
1.	6–(2–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	111 (±21)
2.	6–(3–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	135 (±8)
3.	6–(4–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	122 (±12)
4.	6–(2–chlorbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	93 (±4)
5.	6–(3–chlorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	94 (±6)
6.	6–(4–chlorbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	64 (±8)
7.	6–(2–brombenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	102 (±5)
8.	6–(3–brombenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	85 (±11)
9.	6–(4–brombenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	15 (±9)
10.	6–(3–jodbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	76 (±8)
11.	6–(2–methylbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	118 (±3)
12.	6–(3–methylbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	79 (±5)
13.	6–(4–methylbenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	52 (±8)
14.	6–(2–methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	79 (±5)
15.	6–(3–methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	76 (±20)
16.	6–(4–methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-6</sup>	39 (±17)
17.	6–(2,4–dichlorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	11 (±3)
18.	6–(3,4–dichlorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	45 (±7)
19.	6–(2,3–dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	8,5 (±2)
20.	6–(2,4–dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	21 (±5)
21.	6–(2,4,6–trimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	13 (±6)
22.	6–(3,4,5–trimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	19 (±3)
23.	6–(3,4–dihydroxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	4 (±1)
24.	6–(2,4–difluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	95 (±1)
25.	6–(3,5–difluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	97 (±3)
26.	6–(2,3,4–trifluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	76 (±4)
27.	6–(3–chlor–4–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	90 (±1)

## Příklad 9

10

## Testování nových cytokininů v amarantovém biotestu

Pro studium cytokininové aktivity byl rovněž použit „amarantový“ biotest (Biddington a Thomas, *Planta* 11:183–186, 1993) v následující modifikaci. Semena *Amaranthus caudatus* var. *Atropurpurea* byla povrchově sterilizována 10% N–chlorbensulfamidem (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 kotyledové a hypokotyl byly umístěny do 5 cm Petriho misek na 2 vrstvy filtračního papíru nasyceného 1 ml inkubačního média obsahujícího 10 μmol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8 5 μmol tyrodinu a testovaný cytokinin. Na misku bylo umístěno 20 explantátů. Veškeré manipulace byly prováděny pod

20

zeleným světlem v temné komoře. Po 48 hodinách inkubace při 25 °C ve tmě byl betacyanin extrahován cestou zmražení 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  $\Delta A$  na koncentraci (obr. 7). Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2–krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látka 6–benzylaminopurin, 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 testováním médiem v koncentračním roztoku  $10^{-8}$  až  $10^{-4}$  M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2 % a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat (obr. 7) byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 8).  $10^{-5}$  M koncentrace BAP byla postulována jako 100 % biologické aktivity.

Tabulka 8

Vliv nových cytokininů na obsah betacyaninu v explantátech kotyledonů/hypokotylů

*Amaranthus caudatus*.

	ZKRATKA	maximální účinná koncentrace (mol.l <sup>-1</sup> )	účinnost (%) [10 <sup>-5</sup> mol.l <sup>-1</sup> BAP = 100%]
1.	6–(2–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	116 (±3)
2.	6–(3–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	140 (±5)
3.	6–(4–fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	44 (±4)
4.	6–(2–chlorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	109 (±8)
5.	6–(3–chlorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	96 (±5)
6.	6–(4–chlorbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	35 (±7)
7.	6–(2–brombenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	94 (±6)
8.	6–(3–brombenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	71 (±5)
9.	6–(4–brombenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	17 (±7)
10.	6–(3–jodbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	79 (±3)
11.	6–(2–methylbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	98 (±22)
12.	6–(3–methylbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	84 (±14)
13.	6–(4–methylbenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	26 (±10)
14.	6–(2–methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	77 (±5)
15.	6–(3–methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	90 (±16)
16.	6–(4–methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	23 (±2)
17.	6–(3–nitrobenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	66 (±7)
18.	6–(4–nitrobenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	25 (±2)
19.	6–(2,4–dichlorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	19 (±8)
20.	6–(3,4–dichlorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	63 (±10)
21.	6–(2,3–dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	22 (±3)
22.	6–(2,4–dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-5</sup>	12 (±2)
23.	6–(3,4–dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	27 (±6)
24.	6–(3,5–dimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	1,5 (±1)
25.	6–(2,4,6–trimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	3 (±3)
26.	6–(3,4,5–trimethoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	2 (±2)

Tabulka 8 - pokračování

	ZKRATKA	maximální účinná koncentrace (mol.l <sup>-1</sup> )	účinnost (%) [10 <sup>-5</sup> mol.l <sup>-1</sup> BAP = 100%]
27.	6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	8 (±3)
28.	6-(2,4-difluorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	88 (±7)
29.	6-(3,5-difluorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	108 (±2)
30.	6-(2,3,4-trifluorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	94 (±3)
31.	6-(3-chlor-4-fluorbenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	91 (±7)
32.	6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	19 (±3)
33.	6-(3-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	24 (±1)
34.	6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin	10 <sup>-4</sup>	10 (±2)

## 5 Příklad 10

Účinky testovaných látek na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořeňování růže (*Rosa multiflora*).

10 Úlohou tohoto experimentu bylo testovat zda nové látky jsou prakticky využitelné v tkáňových kulturách. Byl studován index množení a *post vitro* účinku. Růže (*Rosa hybrida*) byla pěstována v 350 ml nádobách se šroubovacím polykarbonátovým uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100ml autoklávového kultivačního média (120 °C, 20 min.). Rostliny byly kultivovány při teplotě 23 ± 2 °C a světelné periodě 16 hodin při 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR. Základní médium (MBR) obsahovala makro- mikro- prvky a vitamíny podle Murashigeho a Skooga (1962), 95 μM NaFeEDTA, 555 μM myo-inositolu, 111 mM sacharózy, 1.332 mM glycinu, 684 μM L-glutaminu and 7 g/l agaru. Toto médium bylo doplňováno 10 μM testované látky. 6-Benzylaminopurin (BAP) byl používán jako standard, kontrolní médium neobsahovalo žádný cytokini. Po uplynutí 8 týdnů byl stanoven přírůstek nových prýtů na jeden explantát. Po odstranění kořenů byly explantáty (skupiny prýtů) přeneseny do rašeliny. Po čtyřech týdnech aklimatizace byl 20 znovu stanoven počet kořenů a jejich celková délka na jeden explantát.

Podle předpokladu, rostliny pěstované na médium neobsahujícím cytokininy neměly téměř žádné nové prýty. Původní explantáty vyrostly v kvalitní jednotlivé výhody, velmi dobře zakořeňující (Tab. 9). Explantáty rostoucí na BAP se vyznačovaly vysokým indexem množení (velkým množstvím nových prýtů) a velmi špatným zakořeňováním (Tab. 9). Všechny testované nové 25 látky, deriváty BAP, indukovaly tvorbu nových výhonů a zakořeňovaly výrazně lépe než BAP (Tab. 9).

Tabulka 9

Účinek testovaných látek, cytokininů, na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořeňování růže (*Rosa multiflora*).

Substituent	In vitro				Ex vitro	
	Počet nových prýtů na jeden explantát	Počet květů na jeden explantát	Počet kořenů na jeden explantát	Celková délka kořene na jeden explantát (cm)	Počet kořenů na jeden explantát	Celková délka kořene na jeden explantát (cm)
Kontrola	0.2	0.03	0.8	1.2	4.6	17.1
benzylamino*	3.8	0.00	0.0	0.0	0.6	1.1
3-hydroxyBA	2.1	0.16	0.0	0.0	1.4	3.8
2-methoxyBA	1.0	0.29	0.0	0.0	2.5	8.5
3-methoxyBA	4.3	0.03	0.0	0.0	1.7	4.1

5 \*benzylamino = BA

## Příklad 11

Inhibice senescence *in vitro* pěstovaných explantátů *Rosa hybrida*.

10 Problémem tkáňových kultur růží jsou časté příznaky senescence explantátů. Listy začínají hnědnout a po několika týdnech všechny explantáty v nádobě hynou. Symptomy nastupují dříve, jestliže je nádoba vzduchotěsně uzavřena, například plastickou fólií. To ukazuje na důležitou úlohu ethylenu v tomto procesu. Cytokininové aplikované do kultivačního média indukují tvorbu ethylenu, je proto užitečné testovat nové látky cytokininové povahy také v tomto systému.

15 Růže *Rosa hybrida* „Pailin“ byla pěstována v 350ml nádobě se šroubovacím polykarbonátovým uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100 ml autoklávového kultivačního média (120 °C, 20 min). Rostliny byly kultivovány při teplotě  $23 \pm 2$  °C a světelné periodě 16 hodin při  $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. Základní médium (MBR) obsahovalo makro-, mikro-prvky a vitamíny podle Murashigeho a Skooga (1962), 36,7 mg/l NaFeEDTA, 50 mg/ml NaFeEDDHA, 100 mg/l  $\mu\text{M}$  myo-inositolu, 30 g/l sacharózy, 100 mg/l glycinu, 50 mg/l caciium pantothenanu, 100 mg/l L-glutaminu a 7 g/l agaru. Toto médium bylo doplňováno 10  $\mu\text{M}$  testované látky. 6-benzylaminopurin (BAP) byl používán jako standard, kontrolní médium neobsahovalo žádný cytokinin. Příznaky stárnutí explantátů byly studovány po šesti týdnech kultivace. Bylo zaznamenáváno  
25 objevení prvního hnědého listu a den úhynu celého explantátu.

Výsledky jsou ukázány na obr. 8 a 9. Relativní počet uhynulých explantátů na médium s BAP odpovídá sigmoidní křivce, což naznačuje, že jeho vliv na senescenci je zesílen autokatalýzou, pravděpodobně ethylenem. Při použití médií s 6-(3-hydroxybenzylamino)purinem a 6-(3-methoxybenzylamino)purinem (3MeOBAP) byla situace výrazně lepší (obr. 8). Nejlepší testovanou látkou byl bezesporu 3MeOBAP; ještě 121. den kultivace byly živé téměř všechny explantáty. I když ani na médium s 3MeOBAP nebylo možné zabránit zhnědnutí některých listů, tyto rostliny mohou být přesto bez problémů použity pro další subkultivaci. Užití 3MeOBAP je statisticky významným vylepšením při mikropropagaci *Rosa hybrida*.

35

## Příklad 12

Suché tobolky

40

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin vzorce I z tab. 1 nebo 2, zmíněných v předcházejících nebo následujících příkladech, se připravují následujícím postupem:



## Složení

	Aktivní složka	1250 g
5	Talek	180 g
	Pšeničný škrob	120 g
	Magnesium stearát	80 g
	Laktóza	20 g

- 10 Preparační postup: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

## Příklad 13

15

## Měkké tobolky

- 20 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek o vzorci I, tab. 1 a 2, zmíněných v předcházejících nebo následujících příkladech, se připraví následujícím postupem:

## Složení

	Aktivní složka	1250 g
25	Lauroglykol	2 litry

- 30 Preparační postup: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu<sup>R</sup> (propylenglykol laurát, Gattefoscé S.A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

## Příklad 14

## 35 Měkké tobolky

- 40 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin o vzorci I, tab. 1 a 2, zmíněných v předcházejících nebo následujících příkladech, se připraví následujícím postupem:

## Složení

	Aktivní složka	250 g
	PEG 400	1 litr
45	Tween 80	1 litr

- 50 Preparační postup: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o MR mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween<sup>R</sup> 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

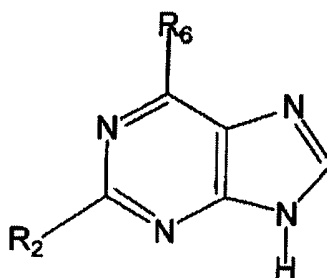
Průmyslová využitelnost

Nové dusíkaté heterocyklické deriváty na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle vynálezu jsou  
 5 použitelné v diagnostických a terapeutických metodách zejména ve farmaceutickém průmyslu,  
 v kosmetickém průmyslu, v biotechnologiích a v zemědělství.

10

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I



(I),

15 ve kterém

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, methylmerkpto,  
 (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acyl-  
 20 amino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl nebo karbamoylo-  
 vou skupinu,

R<sub>6</sub> znamená atom vodíku, halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný  
 alkenyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloalkyl-(R)-,  
 aryl-(R)-, hetero-(R)-, heteroaryl-(R)-, heterocykloalkyl-(R)-nebo R<sub>6</sub>'-X, ve které

25

X znamená NH-, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl)-, skupinu -O- nebo skupinu -S- a

R<sub>6</sub>' znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkyl,  
 substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, acyl, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo,  
 30 cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, substituovaný aryl, heterocyklus, heteroaryl,  
 substituovaný eteroaryl, aryl-(R)-, heterocykloalkyl, substituovaný heterocykloalkyl,  
 heteroaryl-(R)-, hetero-(R)-, cykloalkyl-(R)- a heterocykloalkyl-(R)-,

35

příčemž

halogen znamená

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

alkyl znamená

5

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

alkenyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

10

alkynyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

substituovaný alkyl znamená

15

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

20

substituovaný alkenyl znamená

25

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydroxy, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

30

substituovaný alkynyl znamená

35

.přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedených v této legendě,

40

(R)-oxy znamená

45

.skupinu  $-OR_a$ , ve které  $R_a$  znamená alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, aryl-(R)-, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, heterocykloalkyl nebo substituovaný heterocykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

50

(R)-merkpto znamená

55

.skupinu  $-SR_b$ , ve které  $R_b$  znamená alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, aryl-(R)-, substituovaný aryl-

alkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, heterocykloalkyl nebo substituovaný heterocykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

5 (R)–sulfo znamená  $-\text{SO}_2\text{R}_c$ , ve které  $\text{R}_c$  znamená

hydroxy skupinu,

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

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

10 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující

1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny

zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)–oxykarbonyl, kyano, nitro,

substituovaný karbamoyl (R)–sulfo, (R)–sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)–amino,

15 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)–oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené

generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedených v této legendě,

(R)–sulfonamido znamená  $-\text{NHSO}_2\text{R}_d$ , kde  $\text{R}_d$  znamená

20

hydroxy skupinu,

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

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

25 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující

1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny

zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)–oxykarbonyl, kyano, nitro,

substituovaný karbamoyl, (R)–sulfo, (R)–sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)–amino,

dialkylamino, alkylmerkpto, (R)–oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené

30 generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi

odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

acyl znamená

35 .skupinu  $-\text{C}(\text{O})\text{R}_e$ , ve které  $\text{R}_e$  znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný

alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, aryl–(R)–,

substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, přičemž uvedené generické

substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících

skupin uvedenými v této legendě,

40

aryloxy znamená

.skupinu  $-\text{OAr}$ , ve které Ar znamená aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný

heteroaryl, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou

45

identické s definicemi odpovídajících skupin uvedených v této legendě,

(R)–amino znamená

.skupinu  $\text{NR}_f\text{R}'_g$  ve které  $\text{R}_f$  a  $\text{R}'_g$  nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl,

50

alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl,

substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické

substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících

skupin uvedenými v této legendě,

substituovaný karbamoyl znamená

5 .skupinu  $-C(O)NR_hR'_i$ , ve které  $R_h$  a  $R'_i$  nezávisle jeden na druhém znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

10 (R)-oxykarbonyl znamená

.skupinu  $-C(O)OR_j$ , ve které  $R_j$  znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

15

acylamino znamená

20 .skupinu  $-NHCOR_k$ , ve které  $R_k$  znamená atom vodíku, alkyl, alkenyl, alkynyl, substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

aryl znamená

25 .aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem, například fenyl nebo bifenyl, nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, například 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl,

30 substituovaný aryl znamená

35 aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem například fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický příklad 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkapto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

40

heterocyklus znamená

45 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku,

heteroaryl znamená

50 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický,

10

substituovaný heteroaryl znamená

5 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

10 aryl-(R)-znamená

.skupinu -R<sub>1</sub>-Ar, kde Ar znamená arylovou skupinu a R<sub>1</sub> znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 15 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů.  
 .aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem, například fenyl nebo bifenyl, nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, například 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty  
 20 vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

25 hetero-(R)-znamená

.skupinu -R<sub>m</sub>-L, ve které R<sub>m</sub> znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 30 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty zvolenými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro,  
 35 substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

40 a L znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku a případně substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo,  
 45 merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

50 heteroaryl-(R)-znamená

.skupinu -R<sub>n</sub>-G, ve které R<sub>n</sub> znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 55 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

5 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

10 a G znamená

15 .heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku přičemž alespoň jeden heteroacyklický kruh této skupiny je aromatickým kruhem, která může být případně substituována jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituované skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

20 cykloalkyl znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů,

25 substituovaný cykloalkyl znamená

30 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

35 heterocykloalkyl znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejich cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu,

40 substituovaný heterocykloalkyl znamená

45 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkptom, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cykloalkyl-(R)-znamená

55 .skupinu -R<sub>0</sub>-J, ve které R<sub>0</sub> znamená  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny  
 5 zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro,  
 substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino,  
 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu přičemž uvedené  
 generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídá-  
 jících skupin uvedenými v této legendě,

10

a J znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových  
 atomů nebo.

15 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů  
 a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy,  
 alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karba-  
 moyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkyl-  
 merkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické  
 20 substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících  
 skupin uvedenými v této legendě, a

a heterocykloalkyl-(R)-znamená

25 .skupinu -R<sub>p</sub>V, ve které R<sub>p</sub> znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkynylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkynylovou skupinu obsahující  
 30 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny  
 zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro,  
 substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfonamido, acylamino, acyloxy, (R)-amino,  
 dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené  
 generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi  
 35 odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a V znamená

40 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových  
 atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze  
 skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu,  
 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů,  
 v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny  
 zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu, a substituovanou jedním až  
 45 pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxy, alkoxy, amino, hydrazo,  
 merkpto, (R)-oxykarbonyl, kyano, nitro, substituovaný karbamoyl, (R)-sulfo, (R)-sulfon-  
 amido, acylamino, acyloxy, (R)-amino, dialkylamino, alkylmerkpto, (R)-oxy, cykloalkyl  
 a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy,  
 které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

50

a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě  
 racemátů nebo opticky aktivních izomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

55 2. Substituované heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle  
 nároku 1 vybrané ze skupiny zahrnující



6-(2-hydroxy-3-chloroxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-  
 hydroxy-5-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-  
 3-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-jodbenzyl-  
 5 amino)purin, 6-(2-hydroxy-6-jodbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-brombenzylamino)purin,  
 6-(2-hydroxy-4-brombenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-brombenzylamino)purin, 6-(2-  
 hydroxy-6-brombenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-  
 4-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-fluor-  
 10 benzylamino)purin, 6-(2,4-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxy-4-  
 methoxybenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-di-  
 hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorbenzylamino)purin,  
 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxy-4-chlorbenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dihydroxy-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-4-bromoxybenzylamino)purin,  
 15 6-(2,6-dihydroxy-4-jodbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3-chlorbenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dihydroxy-3-brombenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3-jodbenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dihydroxy-3-fluorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dichlorbenzylamino)purin,  
 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dibrombenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dijodbenzylamino)-  
 20 purin, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorbenzylamino)purin, 6-(2-fluorbenzylamino)purin, 6-(3-  
 fluorbenzylamino)purin, 6-(4-flourbenzylamino)purin, 6-(2-brombenzylamino)purin, 6-(3-  
 brombenzylamino)purin, 6-(4-brombenzylamino)purin, 6-(2-jodbenzylamino)purin, 6-(3-jod-  
 benzylamino)purin, 6-(4-jodbenzylamino)purin, 6-(2-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-  
 benzylamino)purin, 6-(3-chlorbenzylamino)purin, 6-(4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-acetyl-  
 25 benzylamino)purin, 6-(3-acetylbenzylamino)purin 6-(4-acetylbenzylamino)purin, 6-(3-  
 karboxybenzylamino)purin, 6-(4-karboxybenzylamino)purin, 6-(2-acetoxibenzylamino)purin,  
 6-(3-acetoxibenzylamino)purin, 6-(4-acetoxibenzylamino)purin, 6-(2-nitrobenzylamino)-  
 purin, 6-(3-nitrobenzylamino)purin, 6-(4-nitrobenzylamino)purin, 6-(2-sulfobenzylamino)-  
 purin, 6-(3-sulfobenzylamino)purin, 6-(4-sulfobenzylamino)purin, 6-(2-kyanobenzylamino)-  
 purin, 6-(3-kyanobenzylamino)purin, 6-(4-kyanobenzylamino)purin, 6-(5-nitro-2-methyl-  
 30 benzylamino)purin, 6-(2-methylbenzylamino)purin, 6-(3-methylbenzylamino)purin, 6-(4-  
 methylbenzylamino)purin, 6-(4-methylaminobenzylamino)purin, 6-(2-methoxybenzylamino)-  
 purin, 6-(3-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin, 6-(4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(4-hexyl-  
 benzylamino)purin, 6-(4-hexylbenzylamino)purin, 6-(2-formylbenzylamino)purin, 6-(3-  
 35 formylbenzylamino)purin, 6-(4-formylbenzylamino)purin, 6-(2-ethoxybenzylamino)purin,  
 6-(3-ethoxybenzylamino)purin, 6-(4-ethoxybenzylamino)purin, 6-(4-ethylbenzylamino)purin,  
 6-(4-pentylbenzylamino)purin, 6-(4-penthyloxybenzylamino)purin, 6-(4-fenoxybenzyl-  
 amino)purin, 6-(4-fenylbenzylamino)purin, 6-(4-propylbenzylamino)purin 6-(4-propyloxy-  
 40 benzylamino)purin, 6-(4-oktylbenzylamino)purin, 6-(4-propylbenzylamino)purin, 6-(4-propyl-  
 oxybenzylamino)purin, 6-(4-oktylbenzylamino)purin, 6-(4-oktyloxybenzylamino)purin, 6-(4-  
 ethoxybenzylamino)purin, 6-(3,4-diacetoxibenzylamino)purin, 6-(3,5-diacetoxibenzylamino)-  
 purin, 6-(2,6-diaminobenzylamino)purin, 6-(3,5-dibrombenzylamino)purin, 6-(3,5-dibrom-4-  
 methoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,4-dichlorbenzylamino)-  
 purin, 6-(2,5-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-dichlorbenzylamino)purin, 6-(3,4-dichlor-  
 45 benzylamino)purin, 6-(3,5-dichlorbenzylamino)purin, 6-(2,3,4,5-tetrafluorbenzylamino)purin,  
 6-(2-chlor-3,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(5-chlor-2-fluorbenzylamino)purin, 6-(2,3,4-tri-  
 fluorbenzylamino)purin, 6-(2,3,5-trifluorbenzylamino)purin, 6-(2,4,5-trifluorbenzylamino)-  
 purin, 6-(3,4,5-trifluorbenzylamino)purin, 6-(2,3,6-trifluorbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-2,6-  
 difluorbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-6-fluorbenzylamino)purin, 6-(2,6-difluorbenzylamino)-  
 50 purin, 6-(2,4-difluorbenzylamino)purin, 6-(3,4-difluorbenzylamino)purin, 6-(2,5-difluor-  
 benzylamino)purin, 6-(3,5-difluorbenzylamino)purin, 6-(5-fluor-2-(trifluormethyl)benzyl-  
 amino)purin, 6-(4-fluor-2-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-chlor-5-(trifluormethyl)-  
 benzylamino)purin, 6-(2-(difluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(3-(difluormethoxy)benzyl-  
 amino)purin, 6-(4-(difluormethoxy)benzylamino)purin, 6-(2-fluor-5-(trifluormethyl)benzyl-  
 55 amino)purin, 6-(3-fluor-4-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-fluor-4-(trifluormethyl)-

benzylamino)purin, 6-(2-(trifluormethylthio)benzylamino)purin, 6-(2-fluor-3-(trifluormethyl)-  
benzylamino)purin, 6-(2-chlor-6-fluor-3-methylbenzylamino)purin, 6-(6-chlor-2-fluor-3-  
methylbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-2-fluor-5-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(3-  
chlor-2-fluor-6-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2,3-difluor-4-methylbenzylamino)-  
5 purin, 6-(2,6-difluor-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-fluor-6-(trifluormethyl)benzylamino)-  
purin, 6-(3-chlor-2,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(3-(trifluormethylthio)benzylamino)purin,  
6-(3-fluor-4-methylbenzylamino)purin, 6-(4-fluor-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(5-  
fluor-2-methylbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-3,6-difluorbenzylamino)purin, 6-(4-(trifluor-  
methylthio)benzylamino)purin, 6-(3-fluor-5-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(2-chlor-4-  
10 fluorbenzylamino)purin, 6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin, 6-(3-(trifluormethyl)benzyl-  
amino)purin, 6-(2-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-(trifluormethyl)benzylamino)purin,  
6-(4-chlor-3-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-fluor-3-(trifluormethyl)benzylamino)-  
purin, 6-(3,5-bis(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin,  
6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin, 6-(4-(trifluormethyl)benzylamino)purin, 6-(4-di-  
15 ethylaminobenzylamino)purin, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(3,5-dihydroxybenzyl-  
amino)purin, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purin,  
6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,6-dihydroxy-  
benzylamino)purin, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin,  
6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,4-dimethoxy-  
20 benzylamino)purin, 6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin,  
6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin,  
6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin,  
6-(4-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin,  
6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin,  
25 6-(2-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin, 6-(3-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin,  
6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin, 6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2,3-di-  
methylbenzylamino)purin, 6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2,6-dimethylbenzylamino)-  
purin, 6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl-  
amino)purin, 6-(2-fluor-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-fluor-4-methylbenzylamino)purin,  
30 6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin, 6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin, 6-(2-methyl-5-nitro-  
benzylamino)purin, 6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin, 6-(3,4-dijod-4-hydroxybenzyl-  
amino)purin, 6-(2-chlor-3,4-dimethoxybenzylamino)purin, 6-(4-chlor-3,5-dinitrobenzyl-  
amino)purin, 6-(2-chlor-4-fluorbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-4-fluorbenzylamino)purin,  
6-(2-chlor-6-methylbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-2-methylbenzylamino)purin, 6-(3-chlor-  
35 4-methylbenzylamino)purin, 6-(5-chlor-2-methoxybenzylamino)purin, 6-(2-chlor-4-fluor-  
benzylamino)purin, 6-(4-chlormethylbenzylamino)purin, 6-(2-chlor-5-nitrobenzylamino)purin,  
6-(2-chlor-6-nitrobenzylamino)purin, 6-(4-chlor-3-nitrobenzylamino)purin, 6-(3,5-dibrom-  
4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-brom-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-brommethyl-  
benzylamino)purin, 6-(4-butoxybenzylamino)purin, 6-(4-butoxybenzylamino)purin, 6-(4-t-  
40 butyl/benzylamino)purin, 6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-aminobenzyl-  
amino)purin, 6-(3-aminobenzylamino)purin, 6-(4-aminobenzylamino)purin, 6-(2-amino-6-  
chlorbenzylamino)purin, 6-(3-amino-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-chlorbenzyl-  
amino)purin, 6-(2-amino-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(2-amino-6-chlorbenzylamino)purin,  
6-(2,6-diamino-3-chlorbenzylamino)purin, 6-(2,6-diamino-4-chlorbenzylamino)purin, 6-(4-  
45 amino-3-chlorbenzylamino)purin, 6-(4-amino-5-dichlorbenzylamino)purin, 6-(5-amino-2-  
methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purin, 6-(4-amino-3-nitrobenzyl-  
amino)purin, 6-(4-benzyloxybenzylamino)purin, 6-(3-acetylbenzylamino)purin, 6-(2-acetyl-  
benzylamino)purin, 6-(2,3,4-trimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,4,5-trimethoxybenzylamino)-  
purin, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin, 6-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,4,6-  
50 trimethoxybenzylamino)purin, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trihydroxy-  
benzylamino)purin, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin, 6-(3,4,5-trihydroxybenzylamino)-  
purin, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,4,5-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,4,5-tri-  
chlorbenzylamino)purin, 6-(2,4,6-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,3,4-trichlorbenzylamino)-  
purin, 6-(2,3,5-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,3,6-trichlorbenzylamino)purin, 6-(2,5,6-tri-  
55 chlorbenzylamino)purin 6-anilinopurin 6-(2,4-bis(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,5-bis(tri-

fluormethyl)anilino)purin, 6-(2,4-bis(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(3,5-bis(trifluormethyl)-  
 anilino)purin, 6-(2-bromanilino)purin, 6-(3-bromanilino)purin, 6-(4-bromanilino)purin, 6-(4-  
 brom-2-chloranilino)purin, 6-(4-brom-3-chloranilino)purin, 6-(2-brom-6-chlor-4-(trifluor-  
 methyl)anilino)purin, 6-(4-brom-5,6-difluoranilino)purin, 6-(2-brom-4,6-difluoranilino)purin,  
 5 6-(4-brom-2,6-difluoranilino)purin, 6-(4-brom-2-fluoranilino)purin, 6-(2-brom-4-fluor-  
 anilino)purin, 6-(2-brom-4-methylanilino)purin, 6-(3-brom-2-methylanilino)purin, 6-(4-  
 brom-3-methylanilino)purin, 6-(2-brom-4-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(3-brom-4-(tri-  
 fluormethoxy)anilino)purin, 6-(4-brom-2-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-brom-4,5,6-tri-  
 fluoranilino)purin, 6-(2,4-dibromanilino)purin, 6-(2,5-dibromanilino)purin, 6-(2,4-dibrom-  
 10 3,6-dichloranilino)purin, 6-(2,6-dibrom-4-fluoranilino)purin, 6-(2,6-dibrom-4-(trifluor-  
 methoxy)anilino)purin, 6-(2,4-dibrom-6-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,6-dibrom-4-(tri-  
 fluormethyl)anilino)purin, 6-(2,6-dichloroanilino)purin, 6-(3,4-dichloranilino)purin, 6-(3,5-di-  
 chloranilino)purin, 6-(2,6-dichlor-4-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2,4-dichlor-6-(trifluor-  
 methyl)anilino)purin, 6-(2,6-dichlor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,3-difluoranilino)-  
 15 purin, 6-(2,4-difluoranilino)purin, 6-(2,5-difluoranilino)purin, 6-(2,6-difluoranilino)purin,  
 6-(3,4-difluoranilino)purin, 6-(3,5-difluoranilino)purin, 6-(2-difluormethoxyanilino)purin,  
 6-(2-difluormethoxy-5-nitroanilino)purin, 6-(2,3-difluor-6-nitroanilino)purin, 6-(2,4-difluor-  
 6-nitroanilino)purin, 6-(2,4-dijodanilino)purin, 6-(2,3-dimethylamino)purin, 6-(2,4-dimethyl-  
 20 amilino)purin, 6-(2,3-dimethyl-6-nitroanilino)purin, 6-(2,4-dimethoxyanilino)purin, 6-(2,3-di-  
 methoxyanilino)purin, 6-(2,3-dinitro-6-methylanilino)purin, 6-(4-hydroxy-2-methylanilino)-  
 purin, 6-(2-chloranilino)purin, 6-(3-chloranilino)purin, 6-(4-chloranilino)purin, (3-chlor-2,6-  
 dibrom-4-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-4-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-5-fluoranilino)purin,  
 6-(2-chlor-6-fluoranilino)purin, 6-(3-chlor-2-fluoranilino)purin, 6-(3-chlor-4-fluoranilino)-  
 25 purin, 6-(4-chlor-2-fluoranilino)purin, 6-(5-chlor-2-fluoranilino)purin, 6-(2-chlor-4-fluor-5-  
 methylanilino)purin, 6-(5-chlor-4-fluor-2-nitroanilino)purin, 6-(5-chlor-2-hydroxyanilino)-  
 purin, 6-(4-chlor-2-jodanilino)purin, 6-(2-chlor-4-jodanilino)purin, 6-(2-chlor-6-methyl-  
 anilino)purin, 6-(3-chlor-2-methylanilino)purin, 6-(3-chlor-4-(trimethoxy)anilino)purin, 6-(4-  
 chlor-2-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-fluoranilino)purin, 6-(3-fluoranilino)purin, 6-(4-  
 30 fluoranilino)purin, 6-(2-fluor-4-jodanilino)purin, 6-(2-fluor-5-nitroanilino)purin, 6-(2-fluor-  
 4-methylanilino)purin, 6-(3-fluor-2-methylanilino)purin, 6-(3fluor-4-methylanilino)purin,  
 6-(4-fluor-2-methylanilino)purin, 6-(3-fluor-4-methylanilino)purin, 6-(5-fluor-2-methyl-  
 anilino)purin, 6-(4-fluor-2-nitroanilino)purin, 6-(4-fluor-3-nitroanilino)purin, 6-(2-jod-  
 anilino)purin, 6-(2-fluor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(4-jod-2-methylanilino)purin,  
 6-(2-methoxyanilino)purin, 6-(3-methoxyanilino)purin, 6-(4-methoxyanilino)purin, 6-(2-  
 35 methoxy-5-methylanilino)purin, 6-(2-methoxy-6-methylanilino)purin, 6-(4-methoxy-2-  
 methylanilino)purin, 6-(5-methoxy-2-methylanilino)purin, 6-(4-methoxy-3-(trifluormethyl)-  
 anilino)purin, 6-(2-methylanilino)purin, 6-(4-methylanilino)purin, 6-(3-methylanilino)purin,  
 6-(2-methyl-3-(trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-methyl-4-(trifluomethoxy)anilino)purin,  
 6-(2-methylthio)anilino)purin, 6-(4-(methylthio)anilino)purin, 6-(2-nitroanilino)purin, 6-(3-  
 40 nitroanilino)purin, 6-(4-nitroanilino)purin, 6-(2-nitro-4,5,6-trifluoranilino)purin, 6-(2-nitro-4-  
 (trifluormethoxy)anilino)purin, 6-(2-nitrotetrafluoranilino)purin, 6-(2,3,4,5,6-pentabrom-  
 anilino)purin, 6-(2,3,4,5,6-pentafluoranilino)purin, 6-(2,3,4,5-tetrachloranilino)purin,  
 6-(2,3,5,6-tetrachloanilino)purin, 6-(4-(1,1,2,2-tetrafluorethoxy)anilino)purin, 6-(2,3,4,5-tetra-  
 45 fluoranilino)purin, 6-(2,3,4,6-tetrafluoranilino)purin, 6-(2,3,5,6-tetrafluoranilino)purin,  
 6-(2,3,5,6-tetrafluor-4-(trifluormethyl)anilino)purin, 6-(2,4,6-tribromanilino)purin, 6-(2,4,6-  
 tribrom-3,5-dijodanilino)purin, 6-(2,3,4-trichloranilino)purin, 6-(2,4,5-trichloranilino)purin,  
 6-(2,4,6-trichloranilino)purin, 6-(2,4,5-trifluoranilino)purin, 6-(2,3,5-triofluoranilino)purin,  
 6-(2,3,6-trifluoranilino)purin, 6-(2,3,4-trifluoranilino)purin, 6-(2-trifluormethoxyanilino)purin,  
 6-(3-trifluormethoxyanilino)purin, 6-(4-trifluormethoxyanilino)purin, 6-(2,3,4-trifluor-6-  
 50 nitroanilino)purin, 6-(2,4,5-trimethylanilino)purin, 6-(2,4,6-trimethylanilino)purin, 6-(3-chlor-  
 5-aminoanilino)purin, 6-(3-chlor-4-karboxyanilino)purin, 6-(3-amino-4-chloranilino)purin,  
 6-(3-chlor-4-aminoanilino)purin, 6-(3-karboxy-4-hydroxyanilino)purin.

3. Způsob přípravy substituované heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, ve kterém R<sub>2</sub> a R<sub>6</sub> mají stejné významy jako v nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se 6-chlor, brom nebo methylthio derivát obecného vzorce I nukleofilně substituuje v poloze 6 za účelem převedení atomu chloru nebo bromu v poloze 6 za některý jiný z významů obecného substituentu R<sub>6</sub> uvedených výše za vzniku derivátu obecného vzorce I, ve kterém R<sub>2</sub> a R<sub>6</sub> mají významy uvedené v nároku 1.
4. Způsob přípravy substituované heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, ve kterém R<sub>2</sub> a R<sub>6</sub> mají významy jako v nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se 6-amino derivát obecného vzorce I substituuje v poloze 6 reakcí s aldehydem obecného vzorce R'<sub>6</sub>-CHO, ve kterém R'<sub>6</sub> má některý z významů podle nároku 1 obecného vzorce I, za účelem převedení aminoskupiny v poloze 6 za substituent podle nároku 1 obecného vzorce I.
5. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako léčiva.
6. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.
7. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako kosmetické přípravky.
8. Farmaceutické, kosmetické a tkáňové přípravky, **v y z n a ě n ý t í m**, že obsahují dusíkatou heterocyklickou sloučeninu na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 či farmaceuticky přijatelnou sůl takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče.
9. Použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I při přípravě afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagentů pro imunodetekci, diagnostických vzorků, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.
10. Použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I nebo farmaceuticky přijatelných solí takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče pro přípravu farmaceutické kompozice použitelné jako mitotikum či antimitotikum, zejména při léčení nádorových onemocnění, při psoriáze, revmatické artritidy, lupusu, diabetu I typu, roztroušené skleróze, restenóze, polycystickému onemocnění ledvin, host graft disease a dny, parazitózách způsobených houbami anebo prvoky, Alzheimerově chorobě, anebo jako antineurogenerativního léčiva, anebo k supresi imunostimulace, anebo k léčení proliferčních onemocnění kůže.
11. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory v zemědělství, zejména pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.
12. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako kosmetického přípravku pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, například keratinocytů či fibroblastů.
13. Dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro použití jako růstového regulátoru v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

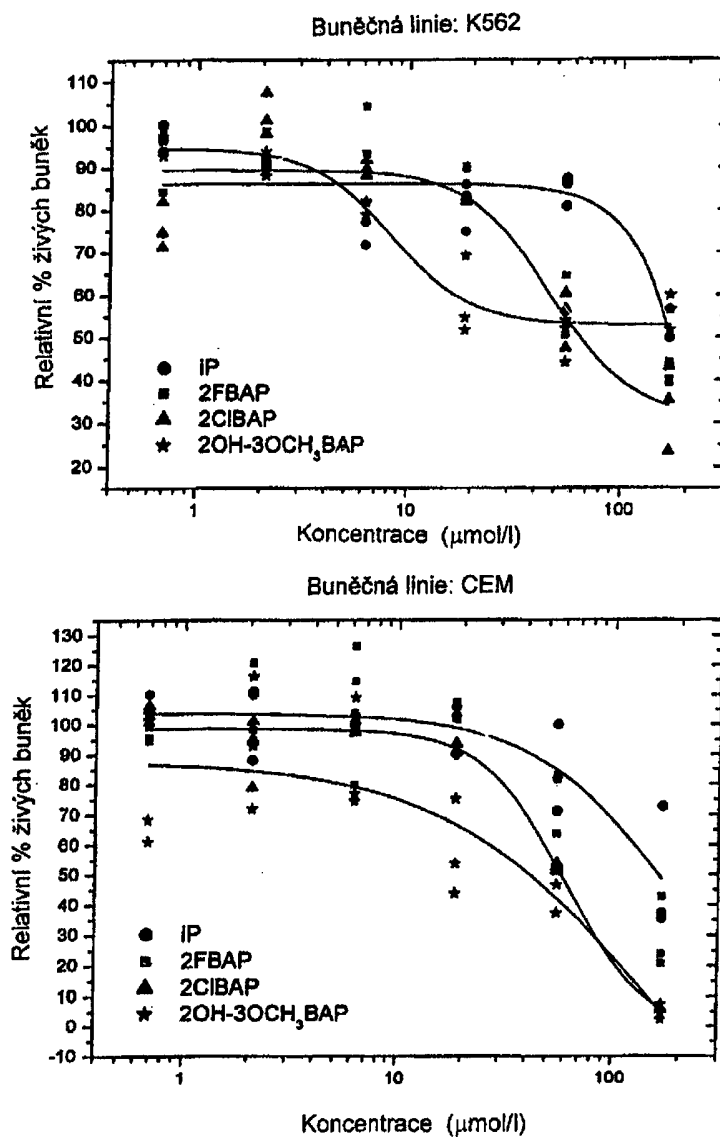
14. Použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

5

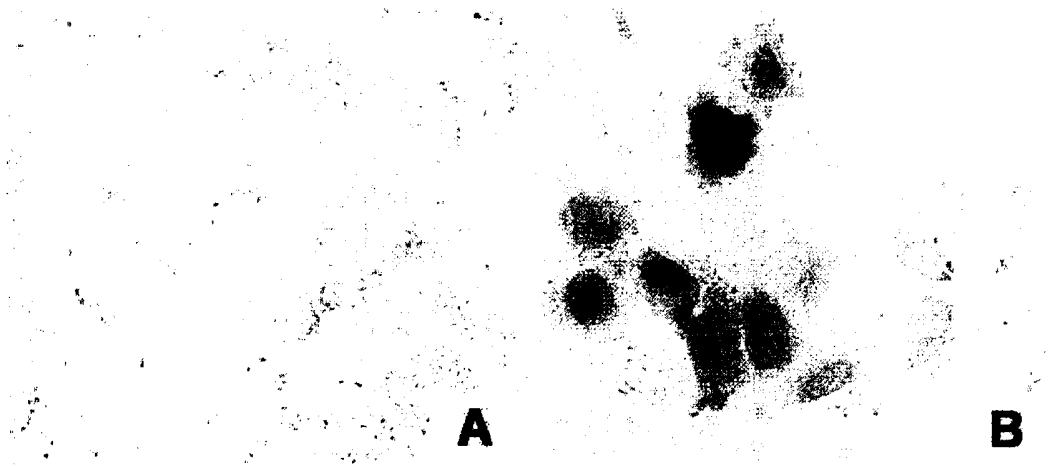
15. Použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I pro výrobu léčiva na potlačení imunostimulace například arthritis nebo při potlačení odmítnutí transplantovaných orgánů u savců.

10

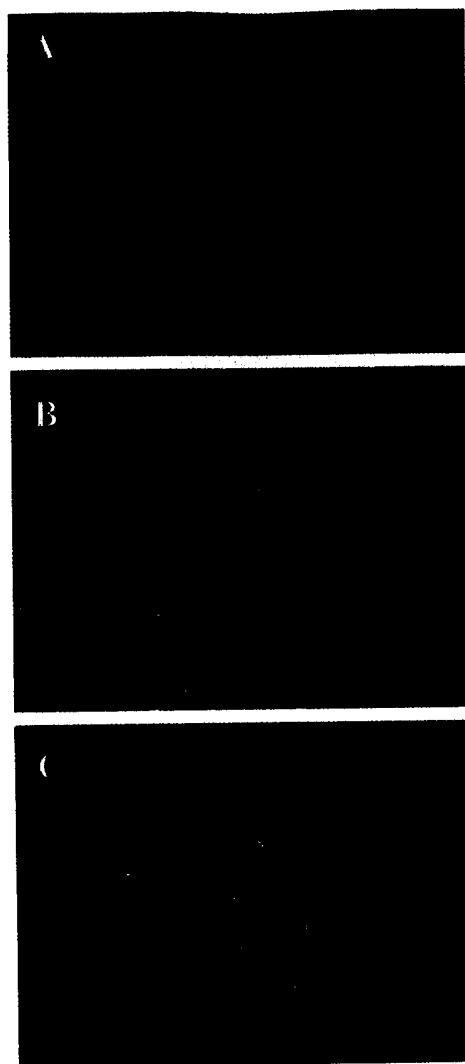
10 výkresů



**Obr. 1:** Inhibice růstu nádorových buněčných linií K562 (A) and CEM (B) novými cytokininy. Cytotoxicita byla stanovena pomocí testu Calcein AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální aktivity (v nepřítomnosti inhibitoru). iP: isopentenyladenin; 2F BAP: 6-(2-fluorobenzylamino)purin; 2Cl BAP: 6-(2-chlorobenzylamino)purin; 2OH-3OCH<sub>3</sub> BAP: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin.

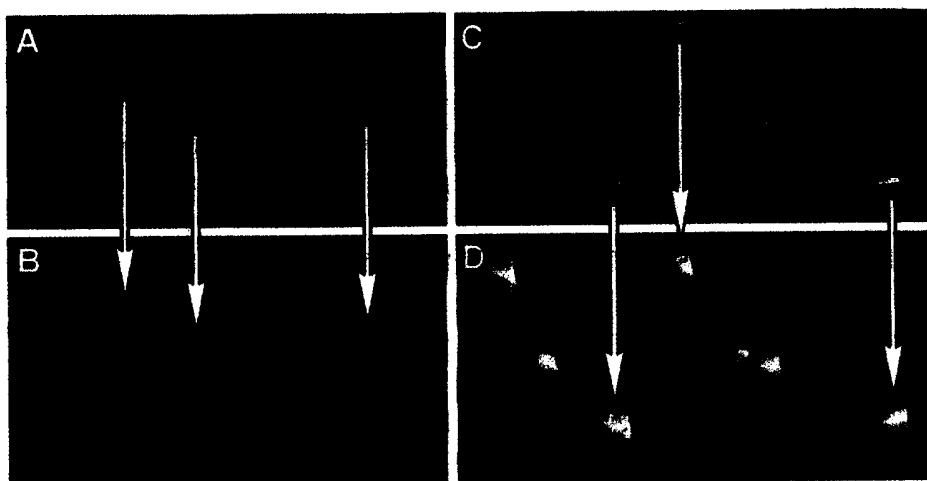


**Obr. 2:** Senescentní buňky lidských fibroblastů (B) (ne ostatní buňky (A)) značené modře vzhledem k působení  $\beta$ -galaktosidasy na substrát X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranosid) (1 mg/ml).

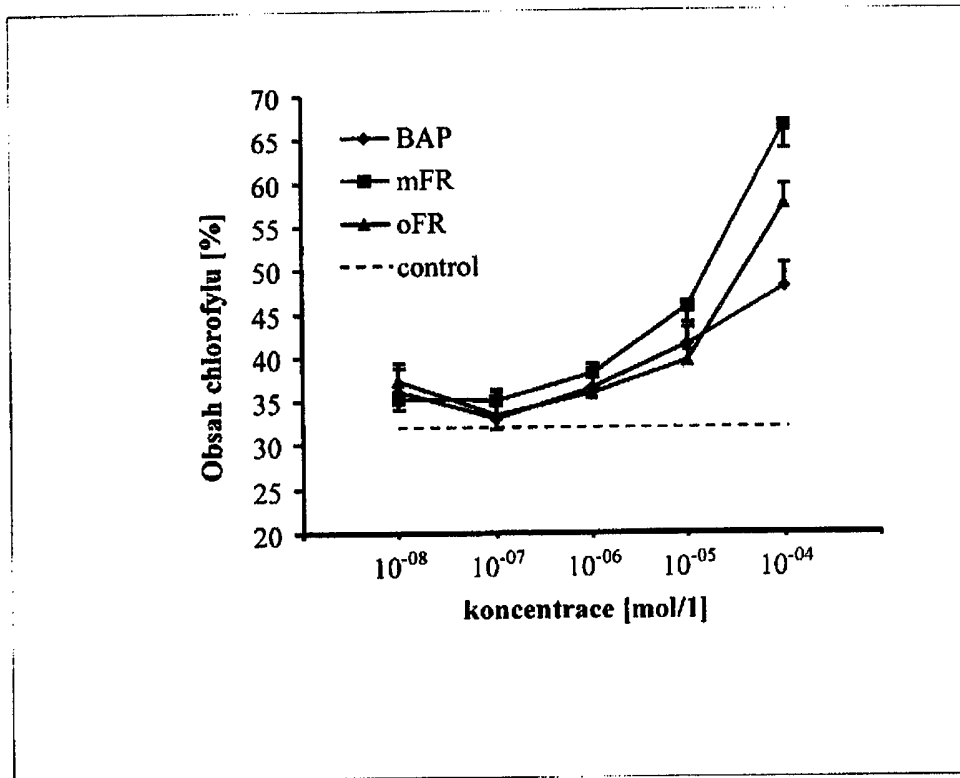


**Obr. 3:** Indukce apoptosy v nádorových buňkách linie MCF-7 cells po aplikaci cytokininu 6-(2-hydro-3-methoxybenzylamino)purinem. **A** MCF-7, apoptoické buňky: 6 h, 12, 20 $\mu$ M, **B** MCF-7, sekundárně nekrotické buňky (i.e. nekrosa následující apoptosu), 12 h, 12, 40  $\mu$ M; **C** MCF-7, necrotické buňky, 24h, 12, 40 $\mu$ M. Anexin FITC V (Mol. Probes) a propidium iodid značení: anexin – zelená, PI – červená.

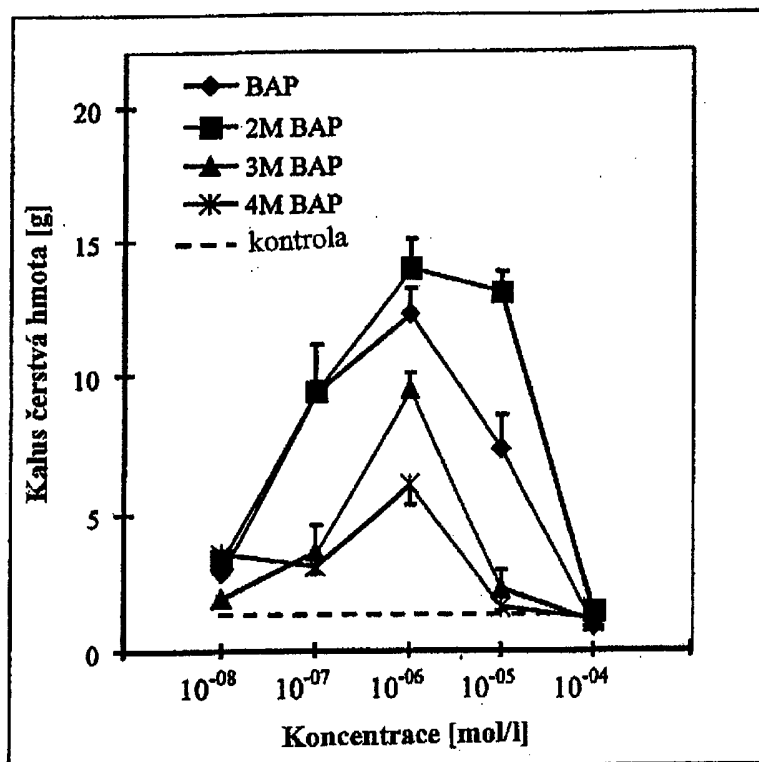




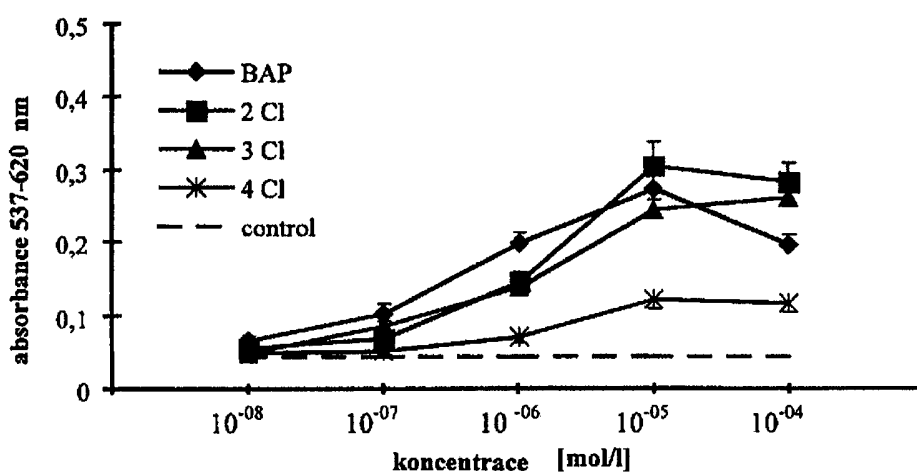
**Obr. 4:** Detekce apoptózy pomocí Anexinu (zelená fluorescence) a značení Hoechstem 33258 (modrá fluorescence). Analyzováno pomocí "Olympus image analysis" u nádorových buněk linie MCF-7 po ošetření 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purinem. A,B – kontrolní buňky bez ošetření; C,D – apoptoické buňky (kondenzace chromatinu); A,C – fluorescenční mikroskopie; B,D – image analýza fluorescence.



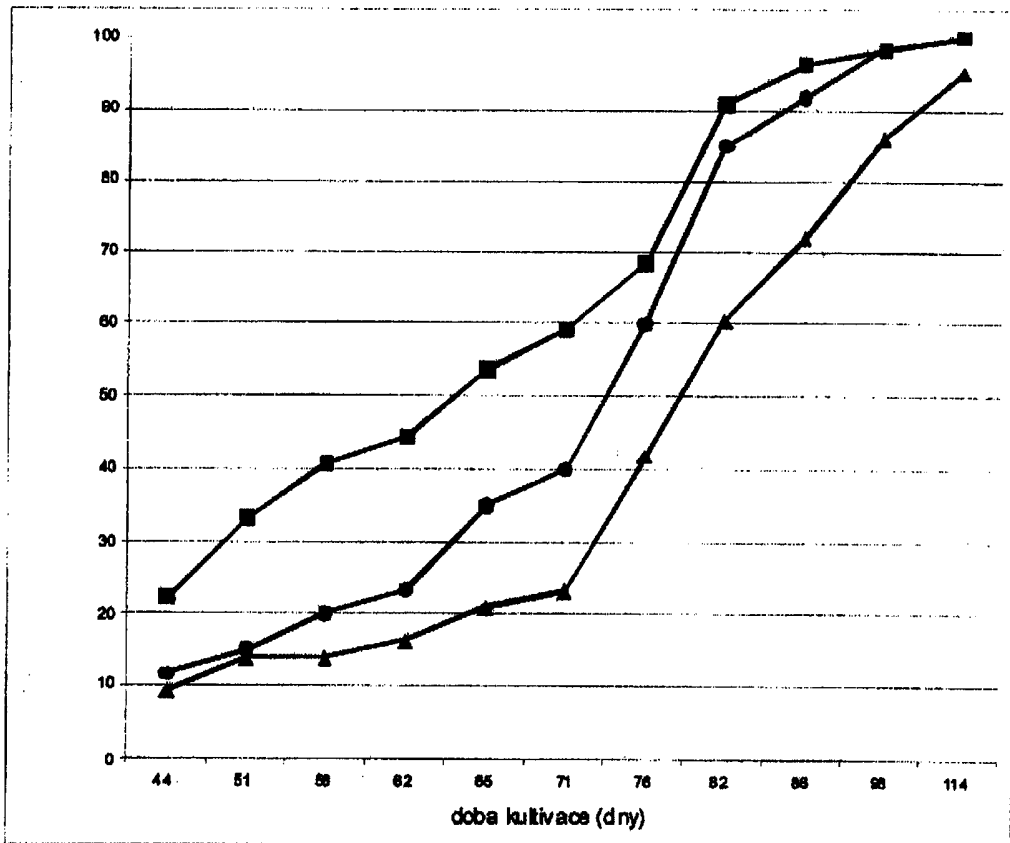
**Obr. 5:** Vliv nových cytokininů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Presentované hodnoty jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací s cytokininy. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj.  $31,7 \pm 0,9$ .



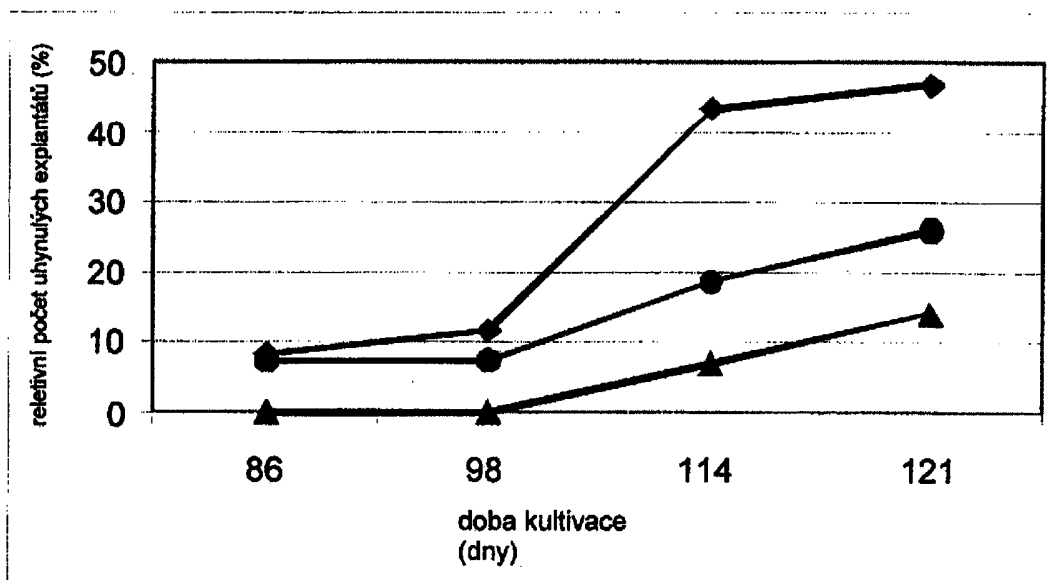
Obr. 6: Vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj.  $2,2 \pm 0,4$  g.



Obr. 7: Vliv nových cytokininů na syntézu betacyaninu v kotyledonárních/hypokotylárních explantátech *Amaranthus caudatus*. Prezentované hodnoty představují rozdíly v jednotkách O.D. mezi absorbcancí při 537 a 620 nm.



Obr. 8. Relativní počet explantátů s alespoň jedním hnědým listem v závislosti na čase  
(■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP)



Obr. 9. Relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP)



**Obr 10.** Vlevo: uhynulý explantát *Rosa hybrida* na mediu obsahujícím BAP; vpravo: zdravý explantát *Rosa hybrida* na mediu s mMeOBAP po 121 dnech kultivace

---

Konec dokumentu

---