



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 18 521 T2 2006.10.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 244 668 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 18 521.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP01/00150

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 907 418.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/049688

(86) PCT-Anmeldetag: 08.01.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.07.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 02.10.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 05.04.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.10.2006

(51) Int Cl.⁸: C07D 473/34 (2006.01)

C07D 473/40 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

00200070 07.01.2000 EP

(73) Patentinhaber:

Universitaire Instelling Antwerpen, Antwerp, BE;
Ustav Experimentalni Botaniky Akademie ved
Ceske Republiky, Prag/Praha, CZ

(74) Vertreter:

Arnold und Kollegen, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(72) Erfinder:

HAVLICEK,Libor, 142 20 Praha, CZ; KRYSTOF,
Vladimir, , 702 00 Ostrava 1, CZ; SIGLEROV, Vera,
, 120 00 Praha, CZ; LENOBEL, Rene, 785 01
Sternberk, CZ; VAN ONCKELEN, Henri, B-2100
Antwerp, BE; BERNEMAN, Nisan, Zwi, B-2018
Antwerp, BE; SLEGERS, Herman, B-2243
Pulle-Zandhoven, BE; ESMANS, Edgard, B-2000
Antwerp, BE; STRNAD, Miroslav, 779 00 Olomouc,
CZ; VERMEULEN, Katrien, B-9150 Kruibeke, BE

(54) Bezeichnung: PURIN DERIVATE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Purinderivate und auf ihre Verwendung in geeigneten Anwendungen, insbesondere in diagnostischen und therapeutischen Verfahren.

[0002] Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf Purinderivate mit einer Hemmwirkung bezüglich Cyclin-abhängigen Kinaseproteinen (cdks) und auch mit einer Hemmwirkung in Bezug auf Viren und einer Immunstimulierung.

[0003] Die Verwendung von 2,6,9-trisubstituierten Purinderivaten als cdk-Inhibitor ist zum Beispiel offenbart in WO 97/16452, WO 98/05335, WO/9720842, WO 97/16542, WO98/05335, WO 98/39007, WO 98/49146, WO 99/07705 und US 5,866,702.

[0004] Nucleotidanaloga, die Phosphatgruppen enthalten, sind zum Beispiel offenbart in den US-Patenten 4,659,825; 4,724,233; 5,124,051; 5,302,585; 5,208,221; 5,352,786; 5,356,886; 5,142,051; in den EP-Veröffentlichungsnummern 269,947; 481,214; 630,381; 369,409; 454,427; 618,214; 398,231; 454,427; 468,119; 481,119; 481,214; 434,450 und in WO 95/07920; WO 094/03467, WO 96/33200 und WO 94/03467. Die typische Purinbase ist Adenin, 2,6-Diaminopurin und Guanin. Die Purinbasen können die Aza- und Deaza-Analoga davon einschließen. 6,9-substituierte und 2,6,9-trisubstituierte Purine und verwandte Analoga sind in der WO 96/33200 offenbart. Die Selektivität und Wirksamkeit bei Verwendung zum Beispiel als Antikrebs- oder Antientzündungsmittel ist jedoch nicht zufriedenstellend gewesen.

[0005] Es ist die Aufgabe dieser Erfindung, Antikrebs-, Antientzündungs-, antivirale, antineurodegenerative, neurodepressive und immunsuppressive Verbindungen mit verbesserter Selektivität und verbessertem Wirkungsindex bereitzustellen, d.h. Verbindungen, die weniger toxisch sind, jedoch wirksamer als Derivate, die bisher bekannt sind.

[0006] Diese Aufgabe wird erreicht durch die vorliegende Erfindung durch Bereitstellung von trisubstituierten Purinderivaten gemäß Anspruch 1 sowie den pharmazeutisch akzeptablen Salzen davon. Die Purinderivate gemäß der vorliegenden Erfindung sind nützlich zum Beispiel zum Hemmen der cdk-Aktivität und auch zum Hemmen der Zellproliferation und/oder zum Induzieren der Apoptose.

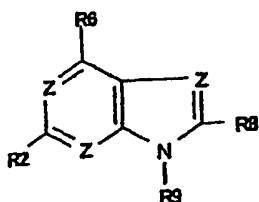
[0007] Die vorliegende Erfindung stellt ebenso Verfahren zum Herstellen der Purinderivate bereit.

[0008] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf die Verwendung der Purinderivate in Verfahren zur Behandlung des menschlichen und tierischen Körpers.

[0009] Zusätzlich stellt die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, umfassend als aktiven Bestandteil ein oder mehrere der Purinderivate, zusammen mit mindestens einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Streckmittel.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt trisubstituierte Purinderivate und verwandte Aza-Deaza-Analoga zur Verfügung, dargestellt durch die allgemeine Formel I:

**I**

sowie pharmazeutisch akzeptable Salze davon, worin: Z N ist;
 R6 R6' -X ist, worin X -NH ist; und R6' substituiertes Arylalkyl ist;
 R8 H ist,
 R2 R2'-X ist, worin

X -NH- ist;
und
R2' (substituiertes) Alkyl ist;
und
R9 (substituiertes) Alkyl ist.

[0011] Die Purinderivate der Erfindung werden vorzugsweise als Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinaseproteinen (cdks), als antivirales, antimitotisches, antiproliferatives, immunmodulierendes, immunsuppressives, antientzündliches und/oder Antitumormittel verwendet. Zusätzlich können die Purinderivate der Erfindung als Modulator von β -adrenergien und/oder purinergen Rezeptoren, als Inhibitor der Proliferation von hämatopoietischen Zellen und Krebszellen und/oder als Inducer der Apoptose in Krebszellen verwendet werden.

[0012] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung Purinderivate zur Verwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers zur Verfügung.

[0013] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung, umfassend ein oder mehrere Purinderivate(e) der Erfindung und einen (ein) pharmazeutisch akzeptabel(en) Träger oder Streckmittel.

[0014] Die Purinderivate gemäß der vorliegenden Erfindung werden weiter vorzugsweise für mehrere andere Anwendungen verwendet, etwa zur Herstellung von Affinitäts-Absorptionsmatrices.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Wenn im unmittelbaren Kontext nicht anders ist, wie hier verwendet:

"Halogen" bezieht sich auf Fluor-, Brom-, Chlor- und Jod-Atome.

"Hydroxyl" bezieht sich auf -OH.

"Mercapto" bezieht sich auf -SH.

"Alkyl" bezieht sich auf eine verzweigte oder nichtverzweigte C_1 - C_6 -Kette, die gesättigt oder ungesättigt sein kann, wie zum Beispiel Methyl, Propyl, Isopropyl, tert-Butyl, Allyl, Vinyl, Ethinyl, Propargyl oder Hexen-2-yl.

"Substituiertes Alkyl" bezieht sich auf ein Alkyl wie oben definiert, einschließlich ein oder mehrere Substituent(en), wie Hydroxyl, Mercapto, Alkylmercaptopo, Halogen, Alkoxy, Amino, Amido, Carboxyl, Sulfo, Acyl und dergleichen. Diese Gruppen können an irgendein Kohlenstoffatom in der Alkylgruppe angeheftet sein.

"Alkoxy" bezieht sich auf -OR, worin R (substituiertes) Alkyl, (substituiertes) Aryl, (substituiertes) Arylalkyl, (substituiertes) Cycloalkyl, (substituiertes) Cycloheteroalkyl wie definiert.

"Alkylmercaptopo" bezieht sich auf -SR, worin R wie für "Alkoxy" definiert ist.

"Sulfo" bezieht sich auf $-SO_3R$, worin R H, Alkyl oder substituiertes Alkyl ist.

"Sulfamido" bezieht sich auf die Gruppe $-NHSO_3R$, worin R H, Alkyl oder substituiertes Alkyl ist.

"Acyl" bezieht sich auf $-C(O)R$, worin R Wasserstoff, (substituiertes) Alkyl, (substituiertes) Aryl, (substituiertes) Arylalkyl, (substituiertes) Cycloalkyl wie hier definiert ist.

"Aryloxy" bezieht sich auf -OAr-Gruppen, worin Ar eine (substituierte) Aryl- oder (substituierte) Heteroaryl-Gruppe wie hier definiert ist.

"Alkylamino" bezieht sich auf die Gruppe $-NRR'$, worin R und R' unabhängig voneinander Wasserstoff, (substituiertes) Alkyl, (substituiertes) Aryl, oder (substituiertes) Heteroaryl wie hier definiert sein können.

"Amido" bezieht sich auf die Gruppe $-C(O)NRR'$, worin R und R' unabhängig voneinander Wasserstoff, (substituiertes) Alkyl, (substituiertes) Aryl oder (substituiertes) Heteroaryl wie hier definiert sein können.

"Carboxyl" bezieht sich auf die Gruppe $-C(O)OR$, worin R Wasserstoff, (substituiertes) Alkyl, (substituiertes) Aryl oder (substituiertes) Heteroaryl wie hier definiert ist.

"Carbamino" bezieht sich auf die Gruppe $-NHCOR$, worin R Wasserstoff, (substituiertes) Alkyl, ein Heterocycclus, (substituiertes) Aryl oder (substituiertes) Heteroaryl wie hier definiert ist.

"Aryl" oder "Ar" bezieht sich auf eine aromatische carbocyclische Gruppe mit mindestens einem aromatischen Ring (z.B. Phenyl oder Biphenyl) oder mehreren kondensierten Ringen, in denen mindestens ein Ring aromatisch ist (z.B., 1,2,3,4-Tetrahydronaphthyl, Naphthyl, Anthryl oder Phenanthryl).

"Substituiertes Aryl" bezieht sich auf wie oben definiertes Aryl, wahlweise substituiert mit einer oder mehreren funktionellen Gruppen, wie Halogen, Alkyl, Hydroxyl, Amino, Mercapto, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Nitro, Sulfo und dergleichen.

"Heterocyclus" bezieht sich auf eine ungesättigte oder aromatische carbocyclische Gruppe mit mindestens einem Heteroatom wie N, O oder S innerhalb des Rings; der Ring kann einfach kondensiert (z.B. Pyranyl, Pyridyl oder Furyl) oder mehrfach kondensiert (z.B. Chinazolinyl, Purinyl, Chinolinyl oder Benzofuranyl) sein, die wahlweise substituiert sein können mit z.B. Halogen, Alkyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Alkylamino, Amido, Carboxyl,

Hydroxyl, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen. "Heteroaryl" bezieht sich auf ein Heterocyclus, in dem mindestens ein heterocyclischer Ring aromatisch ist.

"Substituiertes Heteroaryl" bezieht sich auf einen Heterocyclus, der wahlweise monosubstituiert oder polysubstituiert ist mit einer oder mehreren Gruppen, z.B. Halogen, Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Hydroxyl, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen.

"(Substituiertes) Arylalkyl" bezieht sich auf die Gruppe -R-Ar, worin Ar eine Arylgruppe ist und R eine Alkyl- oder substituierte Alkylgruppe ist. Die Arylgruppen sind wahlweise substituiert mit z.B. Halogen, Alkyl, Hydroxyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Hydroxy, Aryl, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen.

"(Substituiertes) Heteroalkyl" bezieht sich auf die Gruppe -R-Het, worin Het eine heterocyclische Gruppe ist und R eine Alkylgruppe ist. Die Heteroalkyl-Gruppen sind wahlweise substituiert mit z.B. Halogen, Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Alkoxy carbonyl, Aryl, Aryloxy, Nitro, Thiol, Sulfonyl und dergleichen. "(Substituiertes) Heteroarylalkyl" bezieht sich auf die Gruppe -R-HetAr, worin HetAr eine Heteroarylgruppe ist und Alkyl oder substituiertes Alkyl ist. Die Heteroarylalkylgruppen sind wahlweise substituiert mit z.B. Halogen, Alkyl, substituiertes Alkyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Nitro, Thiol, Sulfo und dergleichen.

"Cycloalkyl" bezieht sich auf eine divalente cyclische oder polycyclische Alkylgruppe, die 3 bis 15 Kohlenstoffatome enthält.

"Substituiertes Cycloalkyl" bezieht sich auf eine Cycloalkylgruppe, die ein oder mehrere Substituenten aufweist, wie etwa z.B. Halogen, Alkyl, substituiertes Alkyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Aryl, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen.

"Cycloheteroalkyl" bezieht sich auf eine Cycloalkylgruppe, worin ein oder mehrere der Ring-Kohlenstoffatome durch ein Heteroatom (z.B. N, O, S oder P) ersetzt ist.

"Substituiertes Cycloheteroalkyl" bezieht sich auf eine Cycloheteroalkylgruppe wie oben definiert, die ein oder mehrere Substituenten enthält, wie etwa Halogen, Alkyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Hydroxy, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen.

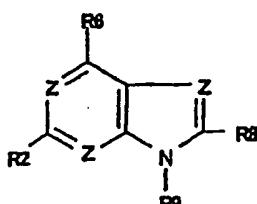
"(Substituiertes) Cycloalkylalkyl" bezieht sich auf die Gruppe -R-Cycloalkyl, worin Cycloalkyl eine Cycloalkylgruppe ist und R ein Alkyl oder ein substituiertes Alkyl ist. Die Cycloalkylgruppe kann wahlweise substituiert sein mit z.B. Halogen, Alkyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Hydroxy, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen.

"(Substituiertes) Cycloheteroalkylalkyl" bezieht sich auf -R-Cycloheteroalkyl, worin R Alkyl oder substituiertes Alkyl ist.

[0016] Die Cycloheteroalkylgruppe kann wahlweise mit z.B. Halogen, Alkyl, Alkoxy, Alkylmercaptopo, Alkylamino, Amido, Carboxyl, Hydroxy, Nitro, Mercapto, Sulfo und dergleichen substituiert sein.

[0017] "Ein mit einer Catecholgruppe oder einer verwandten Gruppe substituiertes Amin bezieht sich auf sekundäre und tertiäre Amine, die mindestens eine Dihydroxyaryl- oder Dihydroxyarylalkyl-Gruppe enthalten".

[0018] Die vorliegende Erfindung stellt Purinderivate zur Verfügung, die durch die allgemeine Formel I dargestellt sind:



I

sowie pharmazeutisch akzeptable Salze davon, worin: Z N ist;

R6 ein substituiertes -NH-Phenylalkyl ist, worin Alkyl ein verzweigtes oder lineares, gesättigtes oder ungesättigtes C₁-C₆-Niedrigalkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Vinyl, Propinyl oder Propenyl ist, wobei der Phenylring oder das Alkyl durch 1 bis 4 Substituenten substituiert ist, wobei die Substituenten für den Phenylring aus Hydroxylsubstituenten ausgewählt ist und für das Alkyl unabhängig davon aus Halogen wie Chlor oder Fluor, Hydroxyl, Amino, Carboxyl oder Amido ausgewählt ist;

R2 R2'-X ist, worin

X -NH- ist; und

R2' ein verzweigtes oder unverzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes C₃-C₆-Alkyl ist, wie Isopropyl, Butyl, Isobutyl, Vinyl, Allyl, Propenyl, Propargyl, Propinyl, Isopentenyl oder Isobutenyl, wahlweise substituiert durch

1 bis 3 Substituenten, die aus Amino oder Hydroxyl ausgewählt sind;

R8 H ist;

und

R9 eine verzweigte oder unverzweigte C₁-C₆-Kette ist, die gesättigt oder ungesättigt sein kann, wie zum Beispiel Methyl, Propyl, Isopropyl, tert-Butyl, Allyl, Vinyl, Ethinyl, Propargyl oder Hexen-2-yl.

[0019] Die folgenden Purinderivate sind besonders bevorzugt:

2-(1-Hydroxymethylpropylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Aminopropylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Hydroxypropylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)-amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Hydroxypropylamino)-6-[1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[1-(3,4-dihydroxybenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[(R)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[(R,S)-(1-phenyl,2-hydroxyethyl)amino]-isopropylpurin.

[0020] Die Erfindung bezieht sich ebenfalls auf optische Isomere und racemische Mischungen, und, falls anwendbar, auf geometrische Isomere der oben definierten Derivate, insbesondere den (R)- oder S-Isomeren von 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]-9-isopropylpurin, 2-(1S-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]-9-isopropylpurin.

[0021] Die Purinderivate der Erfindung als solche, oder in Form von Zwischenprodukten bei der Herstellung neuer Verbindungen, besitzen eine große Vielzahl von diagnostischen, therapeutischen und industriellen Nützlichkeiten.

[0022] Die Verbindungen dieser Erfindung sind zum Beispiel geeignet als Zwischenprodukte zur Verwendung bei der Herstellung von Affinitäts-Absorptionsmatrices, die die chemischen Eigenschaften der Substituentengruppen der Verbindungen nutzbar machen. Zum Beispiel sind die Phosphonatgruppen in Matrix-gebundener Form nützlich bei der chromatographischen Trennung von positiv geladenen Molekülen. Andere immobilisierte Formen der Purinderivate der Erfindung sind zum Beispiel nützlich beim Reinigen von Proteinen, z.B. Zellcyclusenzymen (wie cdks), oder Enzymen, die bei der Erkennung der Verbindungen dieser Erfindung eine Rolle spielen, z.B. Transportproteinen. Geeignete Methoden des Einschlusses der Verbindungen dieser Erfindung in Polymer werden dem Fachmann ohne weiteres klar sein. Die Verbindungen werden zum Beispiel durch Vernetzung der Hydroxylgruppen der Phosphonat- oder Hydroxymethyl-Substituenten unter Verwendung von bisher bekannten Vernetzungsmitteln eingeschlossen. Eine Überbrückung durch eine von der heterocyclischen Base verschiedenen Gruppe wird ein Harz bilden, welches zum Beispiel bei der hydrophoben Affinitätschromatographie nützlich ist.

[0023] Die Purinderivate gemäß der Erfindung können als Modulator von α und β-adrenergien und purinergen Rezeptoren verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform stellt diese Erfindung somit ein Verfahren zum Hemmen oder Stimulieren der Signalübertragung von adrenergischen und purinergen Rezeptoren in Säugern zur Verfügung, umfassend das Verabreichen eines Säugers mit einer therapeutisch wirksamen Menge der Zusammensetzung von Anspruch 1. Die hemmenden und stimulierenden Moleküle sind zum Beispiel nützlich zum Behandeln von Entzündungserkrankungen und Asthma, kardiovaskulären neurodegenerativen und Entzündungserkrankungen.

[0024] In einer anderen Ausführungsform stellt diese Erfindung Purinderivate zur Verfügung, die zur Behandlung von Pilzinfektionen im Menschen, beim Tier und in Pflanzen nützlich sind.

[0025] Die 2,6,9-trisubstituierten Purinderivate einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung mit einem Amin, das mit einer Catechol- oder der verwandten Gruppe (1,2-Dihydroxybenzol) substituiert ist, führen zum Erwerb einer extrem hohen Potenz gegenüber Viren, insbesondere DNA-Viren. Darüber hinaus ist überraschenderweise das chiral angereicherte oder reine (S)-Enantiomer antiviral wirksam aktiv. Bisher war lediglich das (R)-Enantiomer merklich antiviral wirksam, und dabei nur gegenüber Retroviren.

[0026] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt zum Hemmen von cdks und/oder der Zellproliferation und/oder zur Induktion der Apoptose in Säugern, umfassend das Verabreichen eines Säugers mit einer therapeutisch wirksamen Menge der Verbindung gemäß der Erfindung. Die cdk-hemmenden Moleküle sind nützlich zum Behandeln von Erkrankungen, von denen einige die

Zellproliferation einschließen, etwa Krebs, Restenose, rheumatoide Arthritis, Lupus, Typ I-Diabetis, Multiple Sklerose, Alzheimer-Krankheit, das Wachstum von Parasiten (tierische, Protisten), Abstoßung von Spenderorganen (Erkrankung des Wirts gegenüber dem Spenderorgan), Erkrankung des Spenderorgans gegenüber dem Wirt, und Gicht.

[0027] Die Purinderivate der Formel I und ihre pharmazeutisch akzeptablen Salze hemmen zum Beispiel selektiv cdk5, insbesondere das Enzym p34^{cdk2}/Cyclin B-Kinase und verwandten cdk5 (cdk2, cdk5, cdk7, cdk9, erk1, erk2). Zusätzlich zu anderen cdc2-verwandten Kinasen steuert diese Kinase bestimmte Schritte der Zellteilungscyclen, insbesondere den Übertritt von der G₁-Phase in die S-Phase und insbesondere den Übertritt von der G₂-Phase in die M-Phase. Die Verbindungen der Formel I und ihre pharmazeutisch akzeptablen Salze werden vorteilhafterweise als antimitotische Verbindungen, zum Beispiel zur Behandlung von proliferativen Erkrankungen wie Krebs und Restenose verwendet. In sehr niedrigen Konzentrationen (micromolar und niedriger) sind sie in der Lage, Zellzyklusübertritte (G₁/S, G₂/M, M-Phase/Metaphase) in unterschiedlichen tierischen Körpern und Embryonen zu hemmen.

[0028] Ferner sind diese Verbindungen nützlich bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, z.B. rheumatoider Arthritis, Lupus, Typ I-Diabetis, Multiple Sklerose, etc.; bei der Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, von kardiovaskulären Krankheiten wie der Restenosis, der Abstoßung von Spenderorganen (Erkrankung des Wirts gegenüber dem Spenderorgan), Erkrankung des Spenderorgans gegenüber dem Wirt, Gicht; sowie bei der Behandlung der polycystischen Nierenerkrankung, des Krebses oder anderer proliferativer Erkrankungen, deren Pathogenese eine abnormale Zellproliferation beinhaltet.

[0029] Die Purinderivate gemäß der Erfindung sind ferner potente und spezifische Inhibitoren der IκB-α-Kinase, die die Signalinduzierte NF-κB-Aktivierung und die Cytokin-Synthese in vitro und in vivo verhindert. Solche Inhibitoren hemmen die Synthese von Cytokinen und Adhäsionsproteinen, deren Synthese durch NF-κB transcriptional reguliert wird. Pro-entzündliche Cytokine wie IL-1, IL-6, TNF und Adhäsionsproteine (z.B. ICAM, VCAM und Selektionen) gehören zu dieser Klasse von Molekülen und sind mit der Pathogenese von Entzündungserkrankungen in Verbindung gebracht worden. Somit ist ein potenter Inhibitor der IκB-α-Kinase nützlich bei der klinischen Handhabung gegenüber Erkrankungen, wo eine NF-κB-Aktivierung zur Erkrankungsinduktion erforderlich ist.

[0030] Die Verbindungen der Erfindung beeinträchtigen ebenfalls die Aktivierung und/oder die Signalübertragung von α- und β-adrenergen Rezeptoren, z.B. jeweils dem Phosphatidylumsatz und der Synthese von cyclischem AMP. Die Aktivierung von β-adrenergen Rezeptoren besitzt eine antientzündliche Wirkung durch Verringerung der Cytokinproduktion von Macrophagen, Astrozyten, und durch Verhindern einer Erhöhung bei der vaskulären Durchgängigkeit. Eine verringerte Aktivierung des β-adrenergen Rezeptors andererseits ist nützlich bei Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose und der rheumatoiden Arthritis. Die neuen Verbindungen beeinträchtigen ferner eine Aktivierung des P2-purinergen Rezeptors, die mit dem Phosphatidyl-Umsatz verknüpft ist, und die Hemmung der Aktivierung der Synthese von cyclischem AMP oder der Aktivierung des P1-purinergen Rezeptors, die je nach Rezeptor-Subtyp positiv oder negativ mit der Aktivierung der Adenylat-Cyclase gekoppelt ist. Eine Modulation des Signalwegs des purinergen Rezeptors kann bei der zerebralen Ischaemie, beim Schlaganfall, bei Behandlungen von neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. der Parkinsonschen Krankheit), bei Nierenversagen, bei der Behandlung von Lungenfehlfunktion sowie bei der Inhibition des Krebswachstums nützlich sein.

[0031] Die Erfindung stellt ferner neue Verbindungen zur Aktivierung von p53 zur Verfügung, dem Säugerrzell-eigenen, natürlichen Hemm-Gen zum Bremsen von unkontrollierter Zellproliferation (Krebs), weshalb es in der Lage ist, Krebs auszuschalten. P53 sowie das Retinoblastoma (Rb) sind zwei gut charakterisierte Tumorsuppressoren, deren Inaktivierung zu unkontrollierter Zellproliferation und bösartigem Wachstum führen kann. Es ist bekannt, daß eine Phosphorylierung dieser beiden Proteine, was bei Zellzyklus-Regulationsmechanismen eine Rolle spielt, ihre Funktion moduliert. Ein potenter cdk-Inhibitor stellt somit ein gutes Mittel zur Behandlung von Krebs aufgrund der Induktion des p53-Wildtypproteins in Tumoren dar, die p53-Mutanten exprimieren.

[0032] Studien, die mit Derivaten der Erfindung durchgeführt wurden, haben ferner die starke Wirkung der Purinderivate auf die Apoptose vieler Krebs-Zelllinien demonstriert. Es wurde gezeigt, daß die Apoptose in den Stadien G₁ oder G₂ induziert werden kann, und als Folge der Beschädigung der DNA stoppen einige Zellen im Stadium G₁, und dann wird der p53-abhängige Apoptose-Weg induziert. In anderen Situationen stoppen Zellen im G₂/M-Stadium als Antwort auf den gegenüber der DNA bewirkten Schaden, und es wird eine Aktivierung eines p53-unabhängigen Apoptose-Wegs beobachtet. Dieser Weg hat sich bei der Therapie von Tumoren,

bei denen weniger aktives p53 beobachtet wurde, als besonders signifikant erwiesen. Durch Applikation der Purinderivate der Erfindung wird die p53-unabhängige Apoptose in Zellen stimuliert, die im Stadium G₂ arrelierten durch eine Schädigung der DNA unter Verwendung von Mitteln wie Mitoxantron oder cis-Platin. Die cdk-Inhibitoren der Erfindung können somit das therapeutische Potential von gegenwärtig verwendeten Antitumormitteln erhöhen.

[0033] Die Verbindungen dieser Erfindung können ferner endständig in Oligonucleotide eingeschlossen werden. Wenn sie eine freie Nicht-Phosphonylhydroxylgruppe enthalten, sind sie wahlweise in das Innere einer Oligonucleotid-Sequenz eingeschlossen. Terminal eingeschlossene Diphosphonyl-Verbindungen dieser Erfindung, die kein zur Teilnahme an einer Kettenverlängerung befähigtes, freies Hydroxyl enthalten, sind auch bei der DNA-Sequenzierung im wesentlichen auf die gleiche Weise nützlich, wie Deoxy-NTPs in der Vergangenheit verwendet worden sind (siehe Beispiel 8 des US-Patents 5,276,143). Die Nucleotid-Analoga der Erfindung (falls diphosphoryliert) sind als Kettenterminatoren für Dideoxynucleotid-DNA-Sequentierprotokolle nützlich, vorausgesetzt, daß dem Nucleotid-Analog eine freie Hydroxylgruppe fehlt, die zur Polymerase-vermittelten Kettenverlängerung geeignet wäre. Diese Verbindungen weisen kein R=Hydroxymethyl auf und besitzen keine, ein Phosphoratom einschließende zyklische Struktur (obgleich Verbindungen mit derart ausgeschlossenen Strukturen Zwischenprodukte sein können). Das Nucleotid-Analoge kann in einem Kit mit anderen, für die DNA-Sequenzierung erforderlichen Reagenzien (wie der Klenow-Polymerase oder der T4-Polymerase, dNTPs, etc.) eingeschlossen sein (Otvos et al., "Nucl. Acids Res." 1987: 15: 1763-1777).

[0034] Wenn die im Oligonucleotid eingeschlossene Verbindung dieser Erfindung bindungs-kompetent für die komplementäre Sequenz ist, d.h. wenn sie zur Basenpaarung in der Lage ist, wird dieses Nucleotidmonomer bei der Hybridisierung teilnehmen. Es ist jedoch nicht erforderlich, daß das eingeschlossene Nucleotid-Analoge dieser Erfindung bei der Hybridisierung teilnimmt. Wenn es am Ende des Oligonucleotids lokalisiert ist, wird es als eine immunologische Erkennungsstelle oder als Hapten-Erkennungsstelle nützlich sein, um die Detektion des Oligonucleotids durch einen Antikörper, der zur Bindung an die Verbindung der Erfindung in der Lage ist, zu ermöglichen.

[0035] Die Verbindungen dieser Erfindung sind ferner nützlich als Linker oder Spacer bei der Herstellung von Affinitäts-Absorptions-Matrizes (im Unterschied zur Funktion als Affinitätsgruppen als solche wie oben erwähnt), von immobilisierten Enzymen zur Prozeßkontrolle, oder von Immuntestverbindungen. Die Verbindungen enthalten dabei eine Vielzahl an funktionellen Gruppen, die als Stellen zur Quervernetzung mit gewünschten Substanzen in der Lage sind. Zum Beispiel ist es Stand der Technik, Affinitätsreagenzien wie Hormone, Peptide, Antikörper, Wirkstoffe und dergleichen an unlösliche Substrate zu knüpfen. Diese gebundenen, unlöslich gemachten Reagenzien werden auf bekannte Weise angewandt, um Bindungspartner der Affinitätsreagenzien aus hergestellten Präparationen, diagnostischen Proben und anderen unreinen Mischungen zu absorbieren. Auf ähnliche Weise werden immobilisierte Enzyme verwendet, um katalytische Umwandlungen mit einer leichten Wiedergewinnung des Enzyms auszuführen. Bifunktionelle Verbindungen werden gewöhnlich verwendet, um Analyte an detektierbare Gruppen bei Herstellung von diagnostischen Reagenzien zu knüpfen.

[0036] Viele funktionelle Gruppen, die in Verbindungen dieser Erfindung vorliegen, sind zur Verwendung bei der Quervernetzung geeignet. Die mit OH substituierten R-Gruppen oder das Vinyl sind beispielhafte, geeignete Stellen. Auf ähnliche Weise sind die Amino- und andere reaktive Stellen, die auf den R2-, R6- und R9-Gruppen gefunden werden, geeignet. Geeigneter Schutz von reaktiven Gruppen wird dort verwendet, wo es beim Zusammenbau des Vernetzungsmittels erforderlich ist. Im allgemeinen werden die Verbindungen verwendet durch Verknüpfung der Phosphonsäure oder der Aminogruppe mit den Hydroxyl- oder Aminogruppen des Verknüpfungspartners auf die gleiche gezeigte Weise, und durch kovalentes Binden an den anderen Bindungspartner durch die R-Gruppe. Zum Beispiel wird ein erster Bindepartner, wie ein Steroid-Hormon, verestert, und dann wird dieses Konjugat durch das Hydroxymethyl-R mit Cyanogenbromidaktivierter Sepharose vernetzt, wodurch ein immobilisiertes Steroid erhalten wird. Andere Synthesewege zur Konjugation sind gut bekannt. Siehe zum Beispiel Maggio, "Enzyme-Immunoassay" (CRC, 1988, S. 71-135) sowie darin zitierte Literaturstellen.

[0037] Die Oligonucleotide dieser Erfindung können zum Beispiel mit irgendeiner herkömmlich detektierbaren Markierung markiert sein, z.B. einem fluoreszierenden Strukturteil wie Fluorescein, Radioisotopen wie ¹⁴C oder ³H, stabilen freien Radikalen, Avidin, Biotin und dergleichen, von denen alle herkömmlich als Markierungen für Immunoassays oder diagnostischen Sonden verwendet wurden. Die Markierung kann auf dem Oligonucleotid oder auf dem Rest eines Analogs dieser Erfindung vorliegen. Geeignete Markierungsmethoden sind gut bekannt und sind ohne weiteres mit reaktiven Gruppen wie Hydroxyl, Allyl und dergleichen zu verwenden. Eine einfache Methode besteht darin, die Verbindung dieser Erfindung mit ³H durch Protonenaustausch zu markie-

ren. Die Verbindungen können ebenso unter Verwendung herkömmlicher Methoden biotinyliert sein. Siehe zum Beispiel US-Patent 5,276,143 für analoge Strukturen. Die Verbindungen dieser Erfindung sind jedoch ebenfalls direkt nutzbar in diagnostischen Sondenassays ohne von außen detektierbare Markierung. In einer Ausführungsform dieser Alternative werden Antikörper gegenüber den Verbindungen der Erfindung gezogen. Solche Antikörper (die ihrerseits markiert sind oder in einer Doppelantikörper-Konfiguration verwendet werden) binden an das Analoge dieser Erfindung und sind deshalb beim Detektieren seiner Gegenwart als Markierung für ein Protein oder eines Oligonucleotids nützlich.

[0038] Die Verbindungen der Erfindung sind verwendbar zur Behandlung von mikrobiellen Infektionen, zur Behandlung von Tumoren oder bei anderen, unten beschriebenen Indikationen. Durch die Verbindung dieser Erfindung behandelbare mikrobielle Infektionen schließen Viren, Parasiten, Pilz und Schimmel ein, jedoch wird angenommen, daß die Verbindungen am wirksamsten sind gegenüber Viren, was eine bevorzugte Nützlichkeit ausmacht. Beispielhafte virale Infektionen schließen Infektionen ein, die durch DNA- oder RNA-Viren verursacht werden, einschließlich Herpes-Viren (Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), HSV-2, Varicella Zoster-Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Humaner Herpes-Virus Typ 6 (HHV-6), HHV-7, HHV-8, Rinder-Herpes-Virus Typ 1, Pferde-Herpes-Virus Typ 1, Papilloma-Virus (HPV-Typen 1-55, einschließlich kanzinogenem HPV), Flavi-Viren (einschließlich Gelbfieber-Virus, Afrikanisches Schweinefieber-Virus und Japanischer Encephalitis-Virus), Toga-Viren (einschließlich Venezuelatisches Pferd-Encephalomyelitis-Virus), Influenza-Viren (Typen A-C), Retro-Viren (HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II, SIV, FeLV, FIV, MoMSV), Adeno-Viren (Typen 1-8), Pox-Viren (Vaccinia-Virus), Enteroviren (Polio-Virus Typen 1-3, Coxsackie, Hepatitis A-Virus und ECHO-Virus), Gastroenteritis-Viren (Norwalk-Viren, Rota-Viren), Hanta-Viren (Hantaan-Viren), Poliovirus, Papova-Viren, Rhino-Viren, Parainfluenza-Virus-Typen 1-4, Rabies-Virus, respiratorisches Syncytial-Virus (RSV), Hepatitis-Viren A, B, C und E und dergleichen.

[0039] Die antivirale Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen kann bestimmt werden durch einen Routine-Assay der antiviralen (oder anderen antimikrobiellen) Wirksamkeit unter Verwendung von Enzymhemmtests, Gewebekulturtests, Tiermodelltests und dergleichen, wie dem Fachmann klar sein wird.

[0040] Infektionen von Protozoan-Parasiten, die unter Verwendung der Verbindungen der Erfindung zu behandeln sind, schließen Infektionen ein, die verursacht werden zum Beispiel von Mitgliedern der Subphylum Sarcomastigophora und Sporozoa des Phylums Protozoa. Insbesondere schließt der hier verwendete Ausdruck Protozoa die Gattungen der parasitischen Protozoa ein, die bei Menschen wichtig sind, weil sie entweder beim Menschen oder bei seinen Haustieren Krankheiten verursachen. Diese Gattungen werden weitgehend klassifiziert in die Oberklassen Mastigophora des Subphylums Sarcomastigophora und die Klasse Telesporea des Subphylums Sporozoa in der Klassifizierung gemäß Baker (1969). Beispielhafte Gattungen dieser parasitären Protozoa schließen *Histomonas*, *Pneumocystis*, *Trypanosoma*, *Giardia*, *Trichomonas*, *Eimeria*, *Isopora*, *Leishmania*, *Entamoeba*, *Toxoplasma* und *Plasmodium* ein. Parasitäre Protozoan schließen *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Pneumocystis carinii*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* und dergleichen ein (de Vries, E. et al., "Mol. Biochem. Parasitol." 1991: 47:43-50) und Trypanosomen (Kaminsky et al. "J. Parasitol." 1994; 80(6):1026-1030).

[0041] Verbindungen der Erfindung werden ebenfalls verwendet, um Pilz- oder Schimmelinfektionen zu behandeln, die durch *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, und anderen *Candida*-Arten, *Cryptococcus*-Arten, einschließlich *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces*-Arten, einschließlich *Blastomyces dermatitidis*, *Torulopsis*-Arten, einschließlich *Torulopsis glabrata*, *Coccidioides*-Arten, einschließlich *Coccidioides immitis*, *Aspergillus*-Arten und dergleichen verursacht werden.

[0042] Die Verbindungen der Erfindung können ferner (1) angewandt werden auf Gewebekultur-Systeme, um virale(s) Ausbreiten oder Wachstum während der Produktion biopharmazeutischer oder andere Produkte (wie Proteinen oder Impfstoffe) zu beseitigen oder zu verringern, (2) verwendet werden, um virale(s) Ausbreiten oder Wachstum in klinischen Proben (wie Blut) zu beseitigen oder zu verringern, und (3) verwendet werden, um das Wachstum von Gewebekulturzellen zu stoppen, während die Zellen gehalten werden, mit der Proteinproduktion fortzufahren.

[0043] Es wurde ferner gefunden, daß die Verbindungen der Erfindung die Immunstimulierung unterdrücken. Folglich können sie metabolische Aktivitäten von T-Lymphozyten unterdrücken, die durch unterschiedliche Mittel, z.B. Concanavalin A, stimuliert werden. Die Purinderivate der Erfindung dürfen Anwendung finden bei der Behandlung von zum Beispiel Autoimmunerkrankungen, z.B. Arthritis, oder bei der Unterdrückung der Transplantationsabstoßung.

[0044] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung mit einem oder mehreren der Purinderivate der Erfindung in Mischung mit einem oder mehreren pharmazeutischen Trägerstoff(en) oder Streckmittel(n).

HERSTELLUNGSVERFAHREN

[0045] Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung der neuen Purinderivate gemäß der Erfindung zur Verfügung.

[0046] Die Ausgangsmaterialien für die Purinderivate der Formel I sind 6-Chlorpurin und 2,6-Dichlorpurin, hergestellt aus Hypoxanthin und Hypoxanthin-1-N-oxid mittels Chlorierung mit POCl_3 (Davoll und Blowy, J. Am. Chem. Soc. 1957, 73:2936). Dieses Ausgangsmaterial ist auch erhältlich von kommerziellen Quellen (Sigma, Aldrich, Fluka, etc.). Die Verbindungen der Formel I können auch aus 2,6,8- und 6,8-Dichlorpurin, das aus Harnsäure mittels Chlorierung mit POCl_3 hergestellt wurde, hergestellt werden (J. Am. Chem. Soc. 1958, 80:6671; J. Org. Chem. 1961, 26:447).

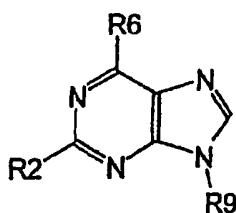
[0047] Bei einem Weg werden die 6-substituierten Purine der Formel I, worin R⁶-Substituenten wie oben definiert sind, hergestellt durch Reaktion von 6-Chlorpurin mit einem geeigneten Amin, wie Phenylglycinol, 2-, 3-, 4-Hydroxybenzylamin, Dihydroxybenzylamin, 4-Amino-resorcinol, oder 2-, 3-, 4-Hydroxyanilin. 6-Chlorpurin wird in n-Butanol aufgelöst, und das passende R⁶-Amin (1,5–5 Äquivalente) sowie ein mehrfacher Überschuß von Triethylamin wird verwendet. Nach Erhitzen für mehrere Stunden wird die Reaktionsmischung abgekühlt, und das 6-substituierte Purin wird erhalten.

[0048] Bei einem anderen Weg werden die 6,9-disubstituierten Purine der Formel I, worin R⁶- und R⁹-Substituenten wie oben definiert sind, hergestellt aus 6-substituierten Purinen (in DMSO oder DMF), zu denen pulvverförmiges Calciumcarbonat (ungefähr 3 Äquivalente) hinzugefügt wird, gefolgt von R⁹-Halogen. Nach mehreren Stunden oder Tagen heftigen Röhrens wird das Produkt mittels Flüssigkeits-Chromatographie isoliert.

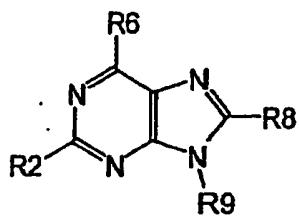
[0049] Bei einem noch anderen Weg werden die 2,6-disubstituierten Purinderivate der Formel I, worin R²- und R⁶-Substituenten wie oben definiert sind, hergestellt aus 2,6-Dichlorpurin, indem 2,6-Dichlorpurin mit einem geeigneten Nucleophil (Phenylglycinol, 2-, 3-, 4-Hydroxybenzylamin, Dihydroxybenzylamin, 4-Amino-resorcinol, 2-, 3-, 4-Hydroxyanilin, substituierte Amine, Mercaptoderivate mit 2 Äquivalenten von N-Methylpyrrolidon oder N-Ethyl-diisopropylamin, Alkoholaten) gemäß der wie oben für das 6-Chlorpurin beschriebene Verfahren umgesetzt wird. Die Substitution des C²-Cl wird dann erreicht durch Reaktion mit einem zweiten Nucleophil (5–30 Äquivalente an substituierten Aminen, Aminoalkoholen; Mercaptoderivaten in Gegenwart von N-Methylpyrrolidon oder N-Ethyl-diisopropylamin) bei einer Temperatur von 160–180°C. Das Produkt wird durch Flüssigkeits-Chromatographie isoliert oder aus n-BuOH oder Wasser kristallisiert.

[0050] Bei einem noch anderen Weg werden die 2,6,9-trisubstituierten Purinderivate der Formel I, worin R²- R⁶- und R⁹-Substituenten wie oben definiert sind, hergestellt durch Alkylierung (K_2CO_3 , DMSO, R⁹-Halogen) von 2-Chlor-6-substituierten Purinen und einer nachfolgenden Reaktion mit R²-SH oder R²-NH wie oben zur Herstellung der 2-Chlor-6-substituierten Purinderivate beschrieben.

[0051] In einem anderen Weg werden die 2,9-disubstituierten Purinderivate der Formel I, worin R²- und R⁹-Substituenten wie oben für eine Verbindung der Formel I definiert sind, aus 2,6-Dichlorpurin in DMSO (oder DMF) hergestellt, zu dem gepulvertes Calciumcarbonat (5 Äquivalente) hinzugefügt wird, gefolgt von R⁹-Halogen (ungefähr 4 Äquivalente). Nach einem oder zwei Tagen starken Röhrens wird 9-alkyliertes-2,6-Dichlorpurin (Nachweis auf der Grundlage des Hauptpunktes auf der Dünnschicht-Chromatographie) mittels Flüssigkeits-Chromatographie isoliert. Selektive Hydrolyse des C⁶-Cl liefert 2-Chlor-9-alkylpurin (10% Pd/BaSO₄, MeOH, Et₃N, 25°C, 2 h). Die letzte nucleophile Substitution des C²-Cl wird erreicht mittels Reaktion im Überschuß (2–30 Äquivalente) des gewünschten Nucleophils (substituierte Amine, Mercaptoderivate mit 2 Äquivalenten von N-Methylpyrrolidon oder N-Ethyl-diisopropylamin, Alkoholaten) bei einer Temperatur von 140–180°C (2–48 h). 2,9-disubstituierte Purine werden dann mittels Flüssigkeitschromatographie isoliert.



XI



XII

THERAPEUTISCHE VERABREICHUNG

[0052] Geeignete Wege zur Verabreichung der Purinderivate gemäß der Erfindung zur Verwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers schließen zum Beispiel orale, rektale, topische (einschließlich dermal, okkular, buccal und sublingual), vaginale und parenterale Wege (einschließlich subkutan, intramuskulär, intravitrös, intravenös, intradermal, intrathecal und epidural) ein. Der bevorzugte Verabreichungsweg hängt ab von dem Zustand des Patienten, der Toxizität des verwendeten, speziellen Derivates sowie der Infektionsstelle – neben anderen Überlegungen, die dem Kliniker bekannt sind.

[0053] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt die pharmazeutische Zusammensetzung etwa 1% bis etwa 95% eines oder mehrerer des (der) Purinderivats (Purinderivate) der Erfindung als aktivem Bestandteil sowie mindestens ein pharmazeutisch akzeptables Trägermaterial oder Streckmittel, wobei Einzeldosisformen der Verabreichung vorzugsweise etwa 20% bis etwa 90% des aktiven Bestandteils umfassen, und Verabreichungsformen, die nicht und in einer Einzeldosis vorliegen, vorzugsweise etwa 5% bis etwa 20% des aktiven Bestandteils umfassen. Einzeldosisformen sind zum Beispiel beschichtete Tabletten, Tabletten, Ampullen, Vials, Suppositorien oder Kapseln. Andere Verabreichungsformen schließen zum Beispiel Salben, Cremes, Pasten, Schäume, Tinkturen, Lippenstifte, Tropfen, Sprays, Dispersionen und dergleichen ein. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Purinderivate in Kapseln eingeschlossen, die etwa 0,05g bis etwa 1,0g des aktiven Bestandteils umfassen.

[0054] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung werden auf an sich bekannte Weise hergestellt, zum Beispiel mittels herkömmlichen Misch-, Granulier-, Beschichtungs-, Auflösungs- oder Lyophylisier-Prozessen.

[0055] Vorzugsweise werden Lösungen des aktiven Bestandteiles, wie auch ferner Suspensionen oder Dispersionen, insbesondere isotonische wäßrige Lösungen, Dispersionen oder Suspensionen verwendet, wobei es möglich ist, vor Gebrauch hergestellt zu werden, wie zum Beispiel im Fall von Lyophylisierten Zusammensetzungen, die die aktive Substanz selbst oder zusammen mit einem Träger, zum Beispiel Mannitol, umfassen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können sterilisiert werden und/oder Vehikel umfassen, zum Beispiel Konservierungsstoffe, Stabilisatoren, Benetzungsmittel und/oder Emulgatoren, Solubilisierungsmittel, Salze zum Einstellen des osmotischen Drucks und/oder Puffer, und sie können auf an sich bekannte Weise hergestellt werden, zum Beispiel mittels herkömmlicher Auflösungs- oder Lyophylisierprozesse. Die Lösungen oder Suspensionen können Viskosität-steigernde Substanzen umfassen, wie Natriumcarboxymethylcellulose, Carboxymethylcellulose, Dextran, Polyvinylpyrrolidon oder Gelatine.

[0056] In-Öl-Suspensionen umfassen als der öligen Komponente diejenigen pflanzlichen, synthetischen oder halb-synthetischen Öle, die für Injektionszwecke gebräuchlich sind. In der Erfindung zu verwendenden Öle schließen vorzugsweise flüssige Fettsäureester ein, die als der Säurekomponente eine langkettige Fettsäure mit 8–22, insbesondere 12–22 Kohlenstoffatome enthalten, zum Beispiel Laurinsäure, Tridecylsäure, Myristinsäure, Pentadecylsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Arachidonsäure, Behensäure oder entsprechend ungesättigte Säuren, zum Beispiel Ölsäure, Elaidinsäure, Eurinsäure, Brasidinsäure oder Linolsäure, falls passend mit der Zugabe von Antioxidantien, zum Beispiel Vitamin E, β-Karotin, oder 3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxytoluol. Die Alkoholkomponente dieser Fettsäureester besitzt vorzugsweise nicht mehr als 6 Kohlenstoffatome und ist mono- oder polyhydrosch, zum Beispiel mono-, di- oder trihydrosches Alkohol, zum Beispiel Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol oder Pentanol, oder Isomere davon, aber insbesondere Glykol und Glycerin. Geeignete Fettsäureester sind zum Beispiel: Ethyloleat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, "Labrafil M 2375" (Polyoxyethylenglycerin-trioleat von Gattefosse, Paris), "Labrafil M 1944 CS" (ungesättigte polyglykolierte Glyceride, hergestellt durch Alkoholyse von Aprikose-Kernöl und gefertigt aus Glyceriden und Polyethylenglykosten; von Gattefosse, Paris, "Labrasol" (gesättigte polyglykolierte Glyceride, hergestellt durch

Alkoholyse von TCM und gefertigt aus Glyceriden und Polyethylenglykolestern; von Gattefosse, Paris) und/oder "Miglyol 812" (Triglycerid von gesättigten Fettsäuren der Kettenlänge C₈ bis C₁₂ von Hüls AG, Deutschland), und insbesondere Pflanzenöle wie Baumwollsamenöl, Mandelöl, Olivenöl, Castoröl, Sesamöl, Sojabohnenöl und insbesondere Erdnußöl.

[0057] Die Herstellung der Injektionszusammensetzungen wird auf gewöhnliche Weise unter sterilen Bedingungen durchgeführt, was das Abfüllen, zum Beispiel in Ampullen oder Vials, und das Verschließen der Behälter betrifft.

[0058] Pharmazeutische Zusammensetzungen zum oralen Gebrauch können zum Beispiel erhalten werden durch Kombinieren des aktiven Bestandteils mit einem oder mehreren festen Trägern, falls passend unter Granulierung der resultierenden Mischung, und, falls gewünscht, Prozessieren der Mischung oder des Granulats zu Tabletten oder beschichteten Tablettkernen, falls passend durch Zugabe von zusätzlichen Vehikeln. Geeignete Träger sind insbesondere Hilfsstoffe wie Zucker, zum Beispiel Lactose, Sucrose, Mannitol oder Sorbitol, Cellulose-Präparationen und/oder Calciumphosphaten, zum Beispiel Tricalciumdisphosphat oder Calciumhydrogenphosphat, und ferner Bindemittel wie Stärkematerialien, zum Beispiel Mais-, Weizen-, Reise- oder Kartoffelstärke, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon und/oder, falls gewünscht, Desintegratoren wie die oben erwähnten Stärkematerialien, und ferner Carboxymethylstärke, vernetztes Polyvinylpyrrolidon, Algininsäure oder ein Salz davon wie Natriumalginat. Weitere Vehikel sind insbesondere Fließreguliermittel und Gleitmittel, zum Beispiel Salicylsäure, Talk, Stearinäure oder Salze davon wie Magnesiumstearat oder Calciumstearat und/oder Polyethylenglykol oder Derivate davon.

[0059] Beschichtete Tablettkerne können mit geeigneten Beschichtungen versehen werden, welche, falls passend, gegenüber dem Magensaft resistent sind, wobei die verwendeten Beschichtungen unter anderem konzentrierte Zuckerlösungen, die, falls passend, Gummi Arabicum, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol und/oder Titandioxid umfassen, Beschichtungslösungen in geeigneten organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelmischungen oder – zur Herstellung von Beschichtungen, die gegenüber dem Magensaft resistent sind – Lösungen von geeigneten Cellulose-Präparationen wie Acetylcellulosephthalat oder Hydroxypropylmethylcellulose-phthalat sind. Farbstoffe oder Pigmente können den Tabletten oder den Beschichtungen von beschichteten Tabletten zugefügt werden, zum Beispiel zur Identifikation oder Charakterisierung unterschiedlicher Dosen des aktiven Bestandteils.

[0060] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die oral verwendet werden können, sind ebenso Hartkapseln aus Gelatine sowie weiche, geschlossene Kapseln aus Gelatine und einem Weichmacher wie Glycerin oder Sorbitol. Die Hartkapseln können den aktiven Bestandteil in Form von Granulaten, gemischt zum Beispiel mit Füllstoffen wie Maisstärke, Bindemitteln und/oder Gleitmitteln wie Talk oder Magnesiumstearat, und falls passend Stabilisatoren enthalten. In weichen Kapseln ist der aktive Bestandteil vorzugsweise in geeigneten flüssigen Vehikeln wie Fettölen, Paraffinöl oder flüssigen Polyethylenglykolen oder Fettsäureestern von Ethylenglykol oder Propylenglykol aufgelöst oder suspendiert, wobei es gleichfalls möglich ist, Stabilisatoren und Detergentien, zum Beispiel vom Typ des Polyethylensorbitals-Fettsäureesters, hinzuzufügen.

[0061] Andere orale Formen zur Verabreichung sind zum Beispiel auf gewöhnliche Weise hergestellte Sirups, die den aktiven Bestandteil zum Beispiel in suspendierter Form und in einer Konzentration von etwa 5% bis 20%, vorzugsweise etwa 10% oder in einer ähnlichen Konzentration umfassen, was zu einer geeigneten einzelnen Dosis führt, zum Beispiel wenn 5 oder 10ml abgezweigt werden. Andere Formen sind zum Beispiel ferner pulverförmige oder flüssige Konzentrate zur Herstellung von Shakes, zum Beispiel in Milch. Solche Konzentrate können auch in Einheitdosenmengen abgepackt werden.

[0062] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die rektal verwendet werden können, sind zum Beispiel Suppositorien, die eine Kombination des aktiven Bestandteils mit einer Suppositorien-Basis umfassen. Geeignete Suppositorien-Basisstoffe sind zum Beispiel natürlich vorkommende oder synthetische Triglyceride, paraffinische Kohlenwasserstoffe, Polyethylenglykole oder höhere Alkanole.

[0063] Zusammensetzungen, die zur parenteralen Verabreichung geeignet sind, sind wässrige Lösungen eines aktiven Bestandteils in wasserlöslicher Form, zum Beispiel von wasserlöslichem Salz, oder wässrigen Injektionssuspensionen, die Viskositätserhöhende Substanzen, zum Beispiel Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbitol und/oder Dextran und, falls passend, Stabilisatoren umfassen können. Der aktive Bestandteil kann auch in Form eines Lyophylisats vorliegen, falls passend zusammen mit Vehikeln, und vor der parenteralen Verabreichung durch Zugabe von geeigneten Lösungsmitteln aufgelöst werden. Lösungen wie solche, die zum

Beispiel zur parenteralen Verabreichung verwendet werden, können auch als Infusionslösungen verwendet werden. Bevorzugte Konservierungsstoffe sind zum Beispiel Antioxidantien, wie Ascorbinsäure oder Mikrobiocide wie Sorbin- oder Benzoensäure.

[0064] Salben sind Öl-in-Wasser-Emulsionen, die nicht mehr als 70%, jedoch vorzugsweise 20. bis 50% Wasser oder eine wässrige Phase umfassen. Die Fettphase kann zum Beispiel aus Kohlenwasserstoffen, zum Beispiel Vaseline, Paraffinöl oder Hartparaffinen bestehen, die vorzugsweise geeignete Hydroxyverbindungen wie Fettalkohole oder Ester davon, zum Beispiel Cetylalkohol oder Wollwachsalkohole wie Wollwachs umfassen, um die Wasserbindekapazität zu verbessern. Emulgatoren sind entsprechende lipophile Substanzen wie Sorbitanfettsäureester (Spans), zum Beispiel Sorbitanoleat und/oder Sorbitanisostearat. Additive für die wässrige Phase sind zum Beispiel Feuchthaltemittel wie Polyalkohole, zum Beispiel Glycerin, Propylenglykol, Sorbitol und/oder Polyethylenglykol, oder Konservierungsstoffe und Duftstoffe.

[0065] Fettsalben sind wasserfrei und können als Basis insbesondere Kohlenwasserstoffe, zum Beispiel Paraffin, Vaseline oder Paraffinöl und ferner natürlich vorkommende oder halbsynthetische Fettstoffe, zum Beispiel hydrierte Kokusnuß-Fettsäure-Triglyceride oder vorzugsweise hydrierte Öle, zum Beispiel hydriertes Erdnuß- oder Castoröl, und ferner Fettsäure-Teilester des Glycerins, zum Beispiel Glycerin-Mono- und/oder Di-Stearat und zum Beispiel die Fettalkohole umfassen. Sie können auch Emulgatoren und/oder Additive, die in Verbindung mit den Salben erwähnt wurden, enthalten, was die Aufnahme von Wasser erhöht.

[0066] Cremes sind Öl-in-Wasser-Emulsionen, die mehr als 50% Wasser umfassen. Verwendete ölige Basisstoffe sind insbesondere Fettalkohole, zum Beispiel Lauryl-, Cetyl- oder Stearyl-Alkohole, Fettsäuren, zum Beispiel Palmitin- oder Stearinsäure, flüssig bis feste Wachse, zum Beispiel Isopropylmyristat, Wollwachs oder Bienenwachs, und/oder Kohlenwasserstoffe, zum Beispiel Vaseline (Petrolatum) oder Paraffinöl. Emulgatoren sind oberflächenaktive Substanzen mit hauptsächlich hydrophilen Eigenschaften, wie entsprechende nicht-ionische Emulgatoren, zum Beispiel Fettsäureester von Polyalkoholen oder Ethylenoxy-Addukte davon, wie Polyglyceräure-Fettsäureester oder Polyethylensorbitan-Fettester (Tweens) und ferner Polyoxyethylen-Fettalkoholester oder Polyoxyethylen-Fettsäureester, oder entsprechende ionische Emulgatoren wie Alkalimetallsalze von Fettalkoholsulfaten, zum Beispiel Natriumlaurylsulfat, Natriumcetylulfat oder Natriumstearylsulfat, die gewöhnlich in Gegenwart von Fettalkoholen verwendet werden, zum Beispiel Cetyl-Stearyl-Alkohol oder Stearyl-Alkohol. Additive für die wässrige Phase sind unter anderem Mittel zum Verhindern des Austrocknens von Cremes, zum Beispiel Polyalkohole wie Glycerin, Sorbitol, Propylenglykol und/oder Polyethylenglykolen, und ferner Konservierungsstoffe und Geruchsstoffe.

[0067] Pasten sind Cremes und Salben mit Sekretions-absorbierenden Pulverbestandteilen, wie Metalloxyden, zum Beispiel Titanoxid oder Zinkoxid und ferner Talk und/oder Aluminiumsilicaten, die die Aufgabe haben, vorhandene Feuchtigkeit oder Sekretbildung zu binden.

[0068] Schäume werden aus unter Druck gesetzten Behältern verabreicht und können in Aerosolschaum vorliegenden, flüssigen Öl-in-Wasser-Emulsionen sein. Als Treibgase werden halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie polyhalogenierte Alkane, zum Beispiel Dichlorfluormethan und Dichlortetrafluorethan oder vorzugsweise nicht-halogenierte gasförmige Kohlenwasserstoffe, Luft, N₂O oder Kohlendioxid verwendet. Verwendete ölige Phasen und Additive sind unter anderem jene, die oben für Salben und Cremes erwähnt wurden.

[0069] Tinkturen und Lösungen umfassen gewöhnlich eine wässrigethanolische Basis, zu der zum Beispiel Befeuchtungsmittel zum Verringern des Verdampfens, wie Polyalkohole, zum Beispiel Glycerin, Glykole und/oder Polyethylenglykol, und Substanzen zum Ölgemachen wie Fettsäureester mit niederen Polyethylenglykolen, d.h. lipophilen Substanzen, die in der wässrigen Mischung löslich sind zum Ersetzen der aus der Haut mit den Ethanol-entfernten, fettigen Substanzen, und falls erforderlich andere Vehikel und Additive zugemischt werden.

[0070] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der Erfindung können auch Veterinär-Zusammensetzungen umfassen, die mindestens einen wirksamen Bestandteil wie oben definiert zusammen mit einem Veterinärträger dafür umfassen. Veterinärträger sind Materialien zur Verabreichung der Zusammensetzung und können feste, flüssige oder gasförmige Materialien sein, die inert sind oder in der Veterinärtechnik akzeptabel sind und mit dem aktiven Bestandteil kompatibel sind. Diese Veterinärzusammensetzungen können oral, parenteral oder auf irgendeinem anderen Weg verabreicht werden.

[0071] Die Erfindung stellt ferner Verfahren zur Behandlung verschiedener Krankheiten zur Verfügung, wie jene Erkrankungszustände, die oben erwähnt wurden. Die Verbindungen können prophylaktisch oder thera-

peutisch als solche oder in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht werden, vorzugsweise in einer Menge, die gegen die erwähnten Krankheiten wirksam ist. Bei einem warmblütigen Tier, zum Beispiel einem Menschen, der eine solche Behandlung benötigt, werden die Verbindungen insbesondere in Form der pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet.

[0072] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiel und Figuren weiter veranschaulicht, die lediglich zur Veranschaulichung der Erfindung dienen, ohne deren Umfang zu begrenzen.

[0073] *Fig. 1* zeigt einen Vergleich zwischen normal PHA-stimulierten Lymphocyten und hämapoietischen Zelllinien, was zeigt, daß Lymphocyten gegenüber einigen der neuen Verbindungen sensitiver sind als Zelllinien, mit Ausnahme von P23, welches bei KG1 deutlich wirksamer war als bei normalen PBMC.

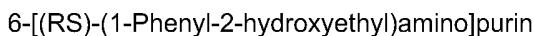
[0074] *Fig. 2* zeigt die Ergebnisse einer mikroskopischen Untersuchung von KG1-Zellen, die mit P23 inkubiert wurden. Lebende, apoptotische, nekrotische und sekundärnekrotische Zellen wurden nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden des Aussetzens gegenüber den Verbindungen der Erfindung gezählt.

[0075] *Fig. 3* ist eine Grafik, die den Prozentsatz an Zellen mit DNA-Fragmentierung (Apoptose) zeigt, detektiert durch die TUNEL-Technik in der Zelllinie KG1 nach Inkubation mit P23 über einen Zeitraum von 72 Stunden.

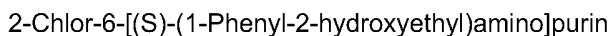
[0076] *Fig. 6* zeigt Grafiken, die den Prozentsatz von KG1-Zellen in der G₀-G₁-Phase zeigen, detektiert durch DNA-Färbung mit Ethidiumbromid (EB) bezüglich P23. TUNEL in Kombination mit EB zeigt den Prozentsatz an apoptotischen (apop Pop-) und nicht-apoptotischen (norm Pop-) Zellen in G₀-G₁.

BEISPIELE

BEISPIEL 1:



[0077] 6-Chlorpurin (3mMol, 0,47g), (RS)-2-Phenylglycinol (5mMol, 0,7g) und Triethylamin (2ml) wurden unter Röhren in 10ml 1-Butanol erhitzt (125°C, 3h). Nach dem Abkühlen wurden die flüchtigen Komponenten verdampft. Das Produkt wurde durch Kristallisation aus Essigsäure/Ethylacetat erhalten. Rekristallisation aus heißer Essigsäure ergab das gewünschte Produkt; Ausbeute 82%, Sp 130–138°C. MS (Waters/Micromas ZMD-Detektor, direkter Einsatz, MeOH + AcOH-Lösung, ESI 20 eV): 256,4 (100%), [M + H]⁺-FTIR (Nicolet 205, KBr, cm⁻¹): 1695, 1623, 1607, 1587, 1411, 1368, 1317, 1291.



[0078] 2,6-Dichlorpurin (1,66mMol, 0,318), (S)-2-Phenylglycinol (2Mmol, 0,27g) und Triethylamin (0,3ml) wurden in 5ml 1-Butanol erhitzt (120°C, 1h). Nach Verdampfen der flüchtigen Komponenten wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie isoliert (Silica Gel, CHCl₃/MeOH/AcOH; 60/2,8/1,2). Kristallisation aus MeOH-Et₂O ergab 0,33g des Produkts; Ausbeute 86%; Sp 205–210°C; [α]_D = +21,9 (MeOH, c = 0,22).

[0079] Andere Purinderivate, die durch das Verfahren von Anspruch 1 hergestellt wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Purinderivate, hergestellt durch das Verfahren von Anspruch 1

PURIN-SUBSTITUENT		
C2	N6	C8
	[N- (3,4-dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	
	3,4-Dihydroxybenzylamino	
	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	

Chlor	[N- (3,4-Dihydroxybenzyl-N-methy)]amino	
Chlor	3,4-Dihydroxybenzylamino	
	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl) amino]	
	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl) amino]	
Chlor	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl) amino]	

BEISPIEL 2:

2-Chlor-9-isopropyl-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl) amino]purin

[0080] 2-Chlor-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin (0,6Mmol, 0,178), pulverförmiges Kaliumcarbonat (1,4Mmol, 0,2g) und Isopropylbromid (4,2mMol, 0,4ml) wurden in trockenem DMF (2ml) für 24 Stunden stark gerührt. 2-Brompropan (0,4ml) wurden hinzugefügt und die Reaktion wurde für weitere 48 Stunden fortgesetzt. Nach Verdampfen der flüchtigen Komponenten wurde der Rückstand zwischen Wasser und Ethylacetat getrennt. Die organische Schicht wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde aus Diethylether (0,167g) kristallisiert. Ausbeute 84%, Sp 150–152°C, $[\alpha]_D = 19,2$ (c = 0,22; CHCl_3). MS EI(Jeol JMS-D100, 80 eV, 300vA, 200°C, direkter Einlaß): 331,1183 (M⁺; $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{OCl}$, theor. 331,1200; 0,3), 301(48), 300,1013 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{Cl}$, theor. 300,1016; 89), 258(100), 222(11), 195(6), 155(6), 153(9), 134(6), 119(18), 106(11), 91(9), 77(11).

2-(S)-(2-Hydroxypropyl)amino-9-isopropyl-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin

[0081] 2-Chlor-9-isopropyl-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin (0,28mMol, 94mg) und (S)-2-hydroxypropylamin (2,8mMol, 0,22ml) wurden in Diglyme (0,5ml) erhitzt (verschlossene Ampulle, 160°C, 3h). Nach Verdampfen des Lösungsmittels und eines Überschusses des Amins wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silica Gel, 3 % MeOH in CHCl_3). Kristallisation aus $\text{CHCl}_3\text{Et}_2\text{O}$ ergab 2-(S)-(2-hydroxyethyl)amino-9-isopropyl-6-[(RS)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin (75mg); Ausbeute 72%; Sp 110–112°C; $[\alpha]_D = 58,6$ (c = 0,2; CHCl_3). MS EI (Jeol JMS-D100, 80 eV, 300vA, 200°C, direkter Einlaß): 370,2129 (M⁺; $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$, theor. 370,2117; 15), 352(8), 240(49), 339(100), 325(8), 321(18), 297(19), 296(19), 296(23), 295(26), 282(11), 279(41), 205(40), 163(24), 134(17), 106(22), 91(15), 41(12), ¹H-NMR(200MHz, CDCl_3): 1,20 d(3H, J = 6,4, CH_3CHOH), 1,52 d(6H J=6,5, $(\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5,16 t(1H, CHPH), 5,3 bs (1H Aust.), 6,50 bs (1H, Aust.), 7,22–7,40 m(5H, phz), 7,50 s(1H, HC⁸).

2-(R)(2-hydroxypropyl)amino-9-isopropyl-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin

[0082] Dieses Purinderivat wurde auf die gleiche Weise wie das vorangehende Isomer hergestellt, außer daß anstelle des (S)-2-Hydroxypropylamins das (R)-2-Hydroxypropylamin verwendet wurde; Ausbeute 70%; Sp 109–112°C; $[\alpha]_D = 43,6$ (c = 0,15; CHCl_3). MS EI(Jeol JMS-D100, 80 eV, 300vA, 200°C, direkter Einlaß): 370,2129 (M⁺; $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$, theor. 370,2117; 15), 352(8), 340(49), 339(100), 325(8), 321(18), 297(19), 296 (23), 295(26), 282(11), 279(41), 205(40), 163(25), 134(17), 106(22), 91(15), 41(12), ¹H-NMR(200MHz, CDCl_3): 1,20 d (3H, J=6,4, CH_3CHOH), 1,53 d (6H J=6,5, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1,8 bs(1H Aust.), 3,32 m(2H, CH_2NH), 4,01 d (2H, J = 5,0, CH_2OH), 4,00 m(1H, CHOH), 4,50 sept (1H, J = 6,5, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5,16 t(1H, CHPH), 5,3 bs(1H, Aust.), 6,50 bs(1H, Aust.), 7,22–7,40 m (5H, ph), 7,50 s(1H, HC⁸).

2-Hexylamino-9-isopropyl-6-[(S)-1(phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin

[0083] 2-Chlor-9-isopropyl-6-[(S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]purin (0,3mMol, 100mg) wurde in n-Hexylamin (3ml) erhitzt (verschlossene Ampulle, 160°C, 3h). Überschuß des Amins wurde verdampft, und das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silica Gel, stufenweise 0, 1, 2, % MeOH in CHCl_3). Das Sirup-artige Produkt (110mg, 92%) kristallisierte spontan nach mehreren Wochen; Sp war zur Messung zu gering. MS EI(Jeol JMS-D100, 80 eV, 300vA, 200°C, direkter Einlaß): 396 (M⁺; 12), 378(17), 377(10), 366(56), 365(100), 323(41), 307(10), 301(7), 295(10), 251(8), 239(14), 205(12), 163(9), 134(16), 106(23) ; H-NMR(400MHz, CDCl_3): 0,907 t(3H, J=6,9, CH_3CH_2), 1,287–1,1420 m(4H, $(\text{CH}_2)_2$), 1,521–1,65 m (10H, $(\text{CH}_2)_2$ + $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 3,31–3,42 m(2H, CH_2N), 3,955–4,08 m(2H, CH_2OH), 4,635 sept (1H, J = 6,8, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,74 bs (1H, NHCH_2), 5,315 bs (1H, CHCH_2OH), 7,28–8,42 m (5H, Ph); 7,496 (1H, HC⁸). Die 2D-COSY-Spektren wurden zur strukturellen Zuordnung von Protonensignalen verwendet.

[0084] Tabelle 2 listet die Purinderivate gemäß der Erfindung auf, die durch das Verfahren von Beispiel 2 hergestellt wurden.

Tabelle 2: Purinderivate, hergestellt durch das verfahren von Beispiel 2

PURIN-SUBSTITUENT		
C2	N6	N9
	[(R,S)- (1-Phenyl-2-hydroxy-ethyl)amino]	Isopropyl
Chlor	[(R,S)- (1-Phenyl-2-hydroxy-ethyl)amino]	Isopropyl

2-Hydroxypropylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl
3-Hydroxypropylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl
(R)-1-(Hydroxymethyl)-propylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl
[bis(2-Hydroxyethyl)]amino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl
	[N-(3,4-Dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	Isopropyl
Chlor	[N-(3,4-Dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	Isopropyl
3-Hydroxypropylamino	[N-(3,4-Dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	Isopropyl
(R)-1-(Hydroxy-methyl)propylamino	[N-(3,4-Dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	Isopropyl
[bis-(2-Hydroxyethyl)]amino	[N-(3,4-Dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N-(3,4-Dihydroxybenzyl-N-methyl)]amino	Isopropyl
	3,4-Dihydroxybenzylamino	Isopropyl
Chlor	3,4-Dihydroxybenzylamino	Isopropyl
3-Hydroxypropylamino	3,4-Dihydroxybenzylamino	Isopropyl
(R)-1-(Hydroxyl-methyl)propylamino	3,4-Dihydroxybenzylamino	Isopropyl
[bis-(2-Hydroxyethyl)]amino	3,4-Dihydroxybenzylamino	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	3,4-Dihydroxybenzylamino	Isopropyl
	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Isopropyl
Chlor	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Isopropyl
2-Hydroxyethylamino	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Isopropyl
3-Hydroxypropylamino	[1-(3,4-Dihydroxy-	Isopropyl

	phenyl)ethyl]amino	
(R)-1-(Hydroxymethyl)	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Isopropyl
[bis-(2-Hydroxymethyl)]-amino	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Methyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	Ethyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl]amino	2-hydroxyethyl
	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl
Chlor	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl
3-Hydroxypropylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl
(R)-1-(Hydroxymethyl)propylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl
[bis-(2-Hydroxyethyl)]amino	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Methyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Ethyl
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	2-Hydroxyethyl

BEISPIEL 3

cdk-Hemmtests

[0085] Cyclin-abhängige Kinasen (p34^{cdc2}, p33^{cdc2}, p33^{cdc4}) und Cycline (Cyclin B, E und D1) werden in Sf9-Insektenzellen, die mit geeigneten baculoviralen Konstrukten co-infiziert wurden, produziert. Die Zellen werden 68–72 Stunden nach der Infektion in Lysepuffer 30 Minuten auf Eis geerntet, und die lösliche Fraktion wird durch Zentrifugieren bei 14.000g während 10 Min. wiedergewonnen. Das Proteinextrakt wird bei –80°C gelagert.

[0086] Rb-GST wird unter Verwendung eines E. coli-Expressionssystems hergestellt, welches eine den C-Terminus des Retinoblastoma-Proteins (Aminosäuren 773–928) kodierende Sequenz enthält, welches dafür bekannt ist, durch die p33^{cdc4}-Kinase phosphoryliert zu werden. Das Fusionsprotein wird über Glutathion-Agarosekügelchen gereinigt. Lysepuffer: 50mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 20mM NaF, 1% Tween, 1mM

DTT, 0,1mM PMSF, Leupeptin, Aprotinin.

Enzymhemmtests

[0087] Zur Durchführung von Experimenten über Kinetiken unter linearen Bedingungen wird das Endpunkt-Testsystem zur Kinase-Aktivitätsmessung verwendet. Die Kinase wird zu der Reaktionsmischung auf eine solche Weise hinzugefügt, daß eine lineare Aktivität in Bezug auf die Konzentration des Enzyms und in Bezug auf die Zeit erhalten wird.

[0088] Die p34^{cdk2} und p33^{cdk2}-Kinase-Hemmtests beinhalten die Verwendung von 1mg/ml Histon H1 (Sigma, Typ III-S) in Gegenwart von 15µM [γ -³²P]ATP (500–100 cpm/pmol) (Amersham) in einem Endvolumen von 20µl. Hemmung der p33^{cdk4}-Kinase wird mit Rb-GST (0,2mg/ml) als dem Substrat bestimmt. Die Kinase-Aktivität wird bei 30°C in Kinasepuffer bestimmt.

[0089] Getestete Verbindungen werden gewöhnlich auf 100mM-Lösungen in DMSO auflöst, wobei die Endkonzentration von DMSO in der Reaktionsmischung 1% niemals übersteigt. Die Kontrollen enthalten geeignete Verdünnungen von DMSO. Nach 10 Min. stoppt die Zugabe von 3 x SDS-Probenpuffer die Inkubationen. Phosphorylierte Proteine werden elektrophoretisch unter Verwendung von 12,5% SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt. Die Messung der Kinase-Aktivität erfolgt unter Verwendung einer Digitalbildanalyse. Die Kinase-Aktivität wird ausgedrückt als einem Prozentsatz der maximalen Aktivität, wobei die scheinbaren Hemmkonstanten durch grafische Analyse bestimmt werden. Kinasepuffer: 50mM Hepes pH 7,4, 10mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM 2-Glycerinphosphat, 1mM NaF, 1mM DTT.

[0090] Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Hemmwirkung der Purinderivate gemäß der Erfindung gegenüber CDC2 und I kB- α . Die 2,6,9-trisubstituierten Purinderivate zeigten deutliche Hemmwirkung bei den in vitro-Kinasetests. Veränderung der 2,6,9-trisubstituierten Purine durch Catechol-ähnliche Substuenten bei R6 führt zur Erhöhung der cdk-Hemmung der getesteten Verbindungen.

Tabelle 3: Kinase-Hemmung der 2,6,9-trisubstituierten Purinderivate gemäß der Erfindung

SUBSTITUENT			Cdc ["]	I kB- α
C2	N6	N9	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
(R)-1-(Hydroxy-methyl)propylamino	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	0,32	1,25
Hexylamino	[N-(2-(3,4-Hydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	2,6	
(R,S)-2-Hydroxy-propylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	0,6	

(R)-1-(Hydroxy-methyl)propylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	0,67	2,15
(R)-1-Hydroxy-methyl)propylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	0,95	3,20
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	250nM	320nM
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	540nM	670nM
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N-(2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	390nM	460nM

BEISPIEL 4

Modulierung der Aktivität oder Signalübertragung von β -adrenergen/purinergen Rezeptoren

[0091] C6-Glioma von Ratten (ATCC Nr. CCL107) wurden als Monolayer in Serum-freiem, chemisch definiertem Medium kultiviert, welches Ham's F10/minimal wesentliches Medium (1:1 Vol/Vol), 2mM L-Glutamin, 1% (Vol/Vol) Vitamine für minimal-wesentliches Medium (100 \times), 1% (Vol/Vol) nichtwesentliche Aminosäuren für minimalwesentliches Medium (100 \times), 100U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 30nM Natriumselenit. Inkubation erfolgte bei 37°C in feuchter Atmosphäre. Tests wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ -Zellen/cm² ausgeführt. Die intrazelluläre cAMP-Synthese wurde durch Zugabe von 5 μ M (–)-Isoproterenol induziert. Nach 30 Min-Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt, und die zelluläre Menge von cAMP wurde unter Verwendung des cAMP-Enzymimmunoassay-Kits von Amersham bestimmt. Aus einer Dosis/Antwort-Kurve in Duplikat wird das IC₅₀ bestimmt. Die Wirkung von sieben Purin-Analoga wurde gleichzeitiger Zugabe von Isoproterenol gemessen.

Tabelle 4: Modulierung der Aktivität von β -adrenergen Rezeptoren durch substituierte Purinderivate

Analog	C2	N6	N9	Wirkung	I ₅₀ (μ M)
P23	Hexylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	Hemmung	15 \pm 2
P19 (50 μ M)	(R)-(1-Hydroxy-methyl)propylamino	4-Hydroxybenzylamino	Isopropyl	1,8-fache Aktivierung	
P29 (50 μ M)	(R)-(1-Hydroxy-methyl)propylamino	3-Hydroxybenzylamino	Isopropyl	1,7-fache Aktivierung	
P38	(S)-(1-Hydroxy-methyl)propylamino	(R)-Hydroxy-1-phenylethylamino	Isopropyl	inaktiv	
P39	2-Hydroxy-propylamino	(R)-Hydroxy-1-phenylethylamino	Isopropyl	inaktiv	

[0092] Da P2Y₁-artige und A2-purinergene Rezeptoren, die jeweils negative bzw. positiv mit der Adenylatcyclase gekoppelt sind, auf den C6-Gliomazellen der Ratte vorliegen, kann die Modulierung der Synthese von cAMP begründet sein durch Hemmung der Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren durch Isoproterenol oder der Aktivierung von purinergen Rezeptoren.

BEISPIEL 5

Wirkung der neuen Verbindungen auf die Proliferation von hämatopoietischen Zellen

Zelltrennung und Zellkulturen:

[0093] Zelllinien: Humane leukämische Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) erhalten. Sie wurden in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (IMDM), welches Rockville durch 10% Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 200U/ml Penicillin, 200 μ g/ml Streptomycin und 1 μ g/ml Amphotericin supplementiert war. Zellen wurden in 5% CO_2 /95% Luft vollbefeuchtetem Inkubator kultiviert. Bezuglich Wirkungen auf eine Klonausbeute wurden 1.000 Zellen/Well als Duplikat in Methylcellulose (0,9%), welches mit 20% FCS supplementiert war, plattierte und für 14 Tage kultiviert.

Peripherblut-Mononuclearzellen (PBMC):

[0094] Humane Peripherblut-Mononuclearzellen wurden mittels Dichtegradient isoliert (Ficoll-Hypaque) (LSM, ICN Biomedicals Inc.). PBMC wurden mit 5 μ g/ml Phytohämagglutinin A (PHA) (Sigma) in 24–48 Stunden in IMDM, welches mit 10% FCS (IMDM/10% FCS) bei 37°C stimuliert. Nach Abwaschen des PHA wurden die PBMCs mit Interleukin-2 (IL-2) inkubiert (10U/ml) (Genzyme).

Adulte Knochenmarks(ABM)-Zellen:

[0095] Knochenmarkszellen wurden durch sternale Punktur aus hämatologisch normalen Spendern, die einer Herzoperation unterzogen wurden, nach Erhalt des Einverständnisses erhalten. Zellen wurden in IMDM, welches mit 10% FCS und 100 U/ml Heparin supplementiert war, gesammelt und mittels Dichtegradient wie be- züglich PBMC erwähnt getrennt. Nach Waschen wurden Zellen in IMDM/10% FCS resuspendiert und mit ei- nem FACStar (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien) sortiert.

CD34⁺-Zellsortierung:

[0096] ABM-Zellen (10^7 -Zellen/ml) wurden mit 43A1-Überstand in einer 1/10-iger Verdünnung bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Der Überstand des 43A1-Hybridomas (Immunglobulin (Ig)G3) wurde freundlicherweise durch Dr. H.J. Bühring (Universität Tübingen, Deutschland) gespendet und wurde als eine Quelle von Anti-CD34-Antikörpern verwendet. Dann wurden Zellen zweimal in IMDM gewaschen und mit FITC-konjugiertem Kaninchen/Anti-Maus-Ig (1/50-Verdünnung) bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Nach zweifachem Waschen in IMDM wurde CD34⁺ mit einem FACStarPlus-Zellsorter, der mit einem wassergekühlten Argonionlaser (IN-NO-VA Enterprise Ion Laser) mit UV (488nm) einschließenden, multiplen Wellenlängen ausgestattet war, ge- sorgt.

Tests bzgl. Myeloide Kolonien bildenden Einheit(CFU):

[0097] Die direkte myeloide Koloniebildung von CD34⁺-Zellen wurde in einem CFU-Test untersucht. Diese Tests wurden initiiert mit 500 Zellen pro Well und die im Duplikat in Methylcellulose (0,9%) plattierte, welches mit 20% FCS, 1% Rinderserumalbumin (BSA), 10⁻⁵ M Mercaptoethanol und 10Vol.-% konditioniertem Medium der 5637-Blasenkarzinomzelllinie (enthaltend G-CSF und GM-CSF), 2U/ml Erythropoietin und 30U/ml Interleu- kin 3 (IL-3) supplementiert war. Nach 14 Tagen der Kultur bei 37°C in 7,5% O_2 und 5% CO_2 in einem vollbe- feuchteten Inkubator wurden diese Kulturen unter dem Mikroskop in Bezug auf Kolonienbildung gezählt. Die folgenden Kolonientypen wurden gezählt: myeloide Kolonien: Macrophagen (CFU-M), Granulocyten (CFU-G), und Granulocyten-Macrophagen (CFU-GM); erythroide Kolonien (BFU-E (Burst bildende Einheiten, erythroid) und CFU-E); sowie gemischt erythroid-myeloide Kolonien (CFU-Mix).

CD34⁺CD38⁻-Zellsortierung:

[0098] ABM-Zellen (10^7 -Zellen/ml) wurden mit 43A1-Hybridomaüberstand bei einer 1/10-igen Verdünnung bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Nach zweifachem Waschen in IMDM wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem

Kaninchen/Anti-Maus-IgG (1/40-ige Verdünnung) bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Nach zweifachem Waschen wurden die Zellen für 10 Minuten mit 5µg Maus-Ig und für 15 Minuten mit Anti-CD38-PE (20µl/10⁶-Zellen) inkubiert. Nach zweifachem Waschen in IMDM wurden die Zellen auf einem FAC-StarPlus-Zellsorter sortiert, der mit einem wassergekühlten Argonionlaser (INNOVA Enterprise Ion Laser) mit UV (488nm) einschließenden, multiplen Wellenlängen-Outputs ausgestattet war. Mit einer niedrig bis mittleren Vorwärts- und einer niedrigen Seitwärtsstreuung, mit stark positiver grüner (CD34) Fluoreszenz und einem orangenen (CD38)-Fluoreszenzsignal, welches geringer war als die mittlere Fluoreszenz von Zellen, die mit einem irrelevanten, auf Isotyp abgestimmten Kontrollantikörper +2 Standardabweichungen markiert waren, wurden als CD34⁺CD38⁻-Zellen zurückgehalten und in Prä-CFU-Tests verwendet.

Prä-CFU:

[0099] Prä-CFU-Tests wurden initiiert durch Ausführen von Flüssigkulturen der CD34⁺CD38⁻-Zellen im Duplikat in flachbödigen Platten mit 96 Wells in IMDM/10%FCS, 1% Rinderserumalbumin (BSA), 100U/ml IL-1, 200U/ml IL-6, 30U/ml IL-3 und 100ng/ml Stammzellenfaktor (SCF). Prä-CFU-Kulturen wurden mit 500 CD34⁺CD38⁻-Zellen pro Well (200µl) initiiert. Nach 14 Tagen der Kultur bei 37°C in 7,5% O₂ und 5% CO₂ in einem vollbefeuchteten Inkubator wurde die Zahl an Zellen in jedem Well gezählt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, dreimal in IMDM/10% FCS gewaschen und im Duplikat bei 500 Zellen/Well (1.000µl) in sekundären Methylcellulose-CFU-Kulturen wie bezüglich der CFU-Tests beschrieben plattiert.

Wirkung der neuen Verbindungen auf die Zellproliferation

[0100] Zellen wurden bei 10.000 pro Well in 200µl IMDM-Medium plattiert und mit 0–50µM der Verbindungen der Erfindung inkubiert (Tabelle 5), indem die Wirkstoffe direkt zu dem Kulturmedium hinzugefügt wurden und bei 37°C für 96 Stunden inkubiert wurde. Die Absolut-Zellzahl wurde bestimmt durch Zugabe einer bekannten Konzentration an Fluoresbrite-Microkugelchen (FITC) (Polysciences, Inc.). Die Absolutzahl an Zellen pro Well wurde wie folgt berechnet: {(Gesamtzahl an pro Well hinzugefügten Kugelchen)/(Zahl der gemessenen Kugelchen)} × (Zahl der gemessenen Zellen in der interessierenden Kategorie). Alle Analysen wurden mit einem FACScan (BD) unter Verwendung der CELLQuest-Software (Becton Dickinson) ausgeführt.

[0101] Die Antwort per KG1-Myeloid-Leukämie- und Molt3-T-Lymphocyten Leukämie-Zelllinien auf die cyto-statische Wirkung der neuen Verbindungen wurde unter Verwendung der oben erwähnten, standardisierten Kugelchensuspension bestimmt, die zur Bestimmung der absoluten Zellzahl mittels Durchfluß-Cytometrie (FCM)-Messung verwendet wurde. Zellen wurden in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen der Verbindungen der Erfindung gemessen. Nach 96 Stunden der Kultur wurde die Konzentration, bei der das Zellwachstum um 50% – der 50%-Hemmkonzentration oder IC₅₀ – gehemmt war, aus den Dosis/Antwort-Kurven berechnet (Fig. 1; Tabelle 5).

[0102] Unterschiedliche Antwortmuster wurden für die getesteten neuen Verbindungen gesehen, mit IC₅₀ im Bereich von 7µM bis > 50µM für KG1 und von 9µM bis > 50µM für Molt 3.

[0103] Der Klonier-Output von KG1 wurde in Methylcellulose mit 25µM von einigen der neuen Verbindungen getestet. Der Kolonien-Output gegenüber den Kontrollkulturen ohne der neuen Verbindung betrug 47% bei P3, 16% bei P16, 19% bei P23, 8% bei P27 und 0% bei P28.

[0104] Die neuen Verbindungen wurden hinsichtlich Cytotoxizität auf PHA-stimulierten Lymphocyten (PBMC) als einer Art normaler Pendants zu den Zelllinien getestet. Die Zellen wurden 96 Stunden in Gegenwart von IL-2 und unterschiedlichen Konzentrationen der neuen Verbindungen wachsen gelassen, und die Zellzahl wurde mit dem Durchfluß-Cytometer gezählt. Die IC₅₀-Werte sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Getestete Purinderivate: Strukturnamen und IC_{50} -Werte bezüglich unterschiedlicher Zellkultursysteme (Lymphocyten, KG1, Molt3, CFU und Prä-CFU) und hinsichtlich der CDC2-Aktivität in Zell-freiem System.

Strukturname	Nr.	Lympo-cyten IC_{50} (μ M)	KG1 IC_{50} (μ M)	Molt3 IC_{50} (μ M)	CFU IC_{50} (μ M)	Pre-CFU IC_{50} (μ M)	CDC2 IC_{50} (μ M)
2 - (R) - (1-Hydroxy-methyl)pro-pyl(amino)-6 - (4-hydroxybenzylamino) - 9-isopropylpurin	P19	6	11±13	15±2			1
2 - (Hexylamino) - 6 - (1-phenyl-2-hydroxy-ethylamino) - 9 - isopropylpurin	P23	15±2	8±0,6	16±0,8	>50	>25	
	P29	9±6,6	16,5±1	9±1,2			

[0105] Ein Vergleich zwischen normalen PHA-stimulierten Lymphocyten und hämatopoietischen Zelllinien zeigt, daß Lymphocyten gegenüber einigen der neuen Verbindungen empfindlicher sind als Zelllinien, mit Ausnahme von P23, welches deutlich wirksamer war gegenüber KG1 als gegenüber normalen PBMC (Fig. 1). Zum Bestimmen der Reversibilität der Wirkungen der neuen Verbindungen wurden Zellen bei 10.000 pro Well plattiert und 0–50 μ M der Verbindung ausgesetzt, entweder kontinuierlich für 7 Tage (Kontrolle) oder nur für 6 Stunden. Im letzten Fall wurden Zellen nach 6 Stunden in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Life Technologies) gewaschen und in Wirkstoff-freiem Medium für 7 Tage erneut ausgesät. Nach 7 Tagen (168 Stunden) wurde die Zellzahl durch Durchfluß-Cytometrie bei beiden Kulturbedingungen getestet.

[0106] Hämatopoietische Vorläuferzellen (HPC) von CD34 $^{+}$ aus adultem Knochenmark wurden isoliert und in Bezug auf ihre Antwort gegenüber den neuen Verbindungen untersucht. CD34 $^{+}$ -Zellen wurden in einem Methylcellulosesystem in Gegenwart ansteigender Konzentrationen der Verbindungen wachsen gelassen. Nach 14 Tagen wurden Kolonien mikroskopisch gezählt, und IC_{50} -Konzentrationen wurden aus den Dosis/Antwort-Mustern des Gesamtkolonien-Outputs berechnet (Tabelle 5). P23 besitzt nur niedrige oder keine Hemmwirkung auf Vorläuferzellen mit $IC_{50} > 50 \mu$ M.

[0107] Der Klonier-Output von CD34 $^{+}$ -HPC wurde ebenfalls differentiell gezählt. Die Kultur mit P23 resultierte in einem deutlich niedrigeren Kolonien-Output bezüglich CFU-E, CFU-G und CFU-M. Bezuglich CFU-GM und CFU-MIX wurde bei den getesteten Verbindungen kein deutlicher Unterschied gesehen. Halbfeste Kontrollkulturen mit DMSO waren nicht signifikant verschieden von den Kontrollkulturen.

[0108] Prä-CFU wurden kultiviert, ausgehend von adulten CD34 $^{+}$ CD38 $^{-}$ -Knochenmarkszellen, die unter Verwendung des FCM-Zellsorters isoliert worden waren. Die neuen Verbindungen wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen zu der ersten, flüssigen 14 Tage-Kultur zugefügt. IC_{50} wurde aus den Dosis/Antwort-Kurven aus dem Gesamtklonier-Output nach der zweiten Methylcellulose-Kultur berechnet (Tabelle 5). Die Wirkungen lagen in einem Bereich ähnlich zu jenen bei CFU.

BEISPIEL 6

Antimitotische Wirkungen der cdk-Inhibitoren

[0109] Extrakte von Metaphase-angehaltenem *Xenopus*-Ei wurden wie kürzlich durch Blow "J. Cell Biol." 1993, 122:993 beschrieben hergestellt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Entmembranisierte *Xenopus*-Samenkerne wurden wie durch Blow & Laskey "Cell" 1986; 47:577 beschrieben hergestellt. Nach dem Auftauen wurden Extrakte mit 25mM Phosphokreatin, 5 μ g/ml Kreatinphosphokinase, 250 μ g/ml Cycloheximid, [α - 32 P]dATP (für DNA-Synthesetests) supplementiert. Entmembranisierte Samenkerne wurden zu einer End-

Samenkonzentration von 3ng/ μ l DNA-Extrakt hinzugefügt, und der getestete CDK-Inhibitor wurde dann bei unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Die Hemmung auf den M-Phasen-verstärkenden Faktor durch unterschiedliche CDK-Inhibitoren wurde 1,5h nach der Zugabe überwacht, indem die Menge an Samenkernen untersucht wurde, welche sich zu Interphasen-Kernen zusammengesetzt hatten, dabei eine komplette, phasendichte Kernhülle aufweisend. Die DNA-Synthese wurde durch Freisetzen von Extrakt in die Interphase durch die Zugabe von 0,3mM CaCl₂ und durch Messen der Gesamtmenge an (α -dATP-Einbau nach 3h mittels TCA-Co-Fällung untersucht.

[0110] Bei Konzentrationen des cdk-Inhibitors (siehe Tabelle 6), die von 0,1–2 μ M reichten, blieben die Chromosomen stark kondensiert, und es war keine Kernhülle sichtbar. Bei 4–6 μ M und höheren Konzentrationen traten Interphase-Kerne mit teilweise dekondensiertem Chromatin und intakter Kernhülle auf. Replikation war bei 1–5 μ M der getesteten CDK-Inhibitoren deutlich gehemmt. Damit die Hemmwirkung detektierbar wird, ist wahrscheinlich die erste 15-minütige Inkubation des Interphase-Extrakts ausreichend.

Tabelle 6: Antimitotische Wirkungen von 2,6,9-trisubstituierten Purinderivaten

SUBSTITUENT			Hemmung der MPF- Aktivität	Hemmung der DNA- Synthese
C2	N6	N9	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
Hydroxypropylamino	3, 4-Dihydroxybenzyl- amino	Isopropyl	3, 6	4, 2
Hydroxypropylamino	[(R, S) - (1-Phenyl-2- hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	1, 5	1, 4
Hydroxypropylamino	[N- (2- (3, 4- Dihydroxyphenyl)ethyl) N-methyl]amino	Isopropyl	5, 6	6, 7
(R) -1- (Hydroxy- ethyl) propylamino	3, 4-Dihydroxybenzyl- amino	Isopropyl	2, 8	3, 5
(R) -1- (Hydroxyl- ethyl) propylamino	[(R, S) - (1-Phenyl-2- hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	0, 9	1, 25
(R) -1- (Hydroxyl- ethyl) propylamino	[N- (2- (3, 4-Dihydroxy- phenyl)ethyl) N-methyl]amino	Isopropyl	1, 12	1, 3

BEISPIEL 7

In vitro-Cytotoxizitätswirkung der neuen Verbindungen der Erfindung

[0111] Einer der Parameter, der als Basis für colorimetrische Tests verwendet wurde, besteht in der metabolischen Aktivität von lebenden Zellen. Ein Microtiter-Test zum Beispiel, der das Tetrazolium-Salz MTT verwendet, wird heutzutage weit verbreitet verwendet zur Quantifizierung von Zellproliferation und Cytotoxizität. Dieser Test wird zum Beispiel in Wirkstoff-Screening-Programmen und beim Chemo-Sensitivitätstest verwendet. Da nur metabolisch aktive Zellen Tetrazoliumsalze spalten, detektieren diese Tests ausschließlich lebende Zellen. Im Fall des MTT-Tests wird gelbes lösliches Tetrazoliumsalz zu farbigen wasser-unlöslichem Formazansalz reduziert. Nachdem es solubilisiert wurde, kann das Formazan leicht und schnell in einem herkömmlichen ELISA-Plattenlesegerät bei 570nm (maximale Absorption) quantifiziert werden. Die Menge an reduziertem Formazan entspricht der Zahl an lebenden Zellen in der Kultur.

[0112] Zum Routine-Screening der Verbindungen gemäß der Erfindung wurden die humane T-Lymphoblasten-Leukämie-Zelllinie CEM; der promyelocytischen HL-60- und der monocytischen U937-Leukämien; Brust-Carcinoma-Zelllinien MCF-7, BT549, MDA-MB-231; Glioblastoma-U87MG-Zellen; Cervix-Karzinom-Zellen HEYA; Sarcoma-Zellen U2OS und Saos2; immortalisierte Knochenmarksmacrophagen der Maus B2.4 und B10A.4; P388D1- und L1210-Leukämien; B16-und B16F10-Melanomas verwendet. Die Zellen wurden in 80cm²-Plastik-Gewebekulturgefäßen von Nunc/Corning gehalten und in Zellkulturmedium (DMEM mit 5g/l Glukose, 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 10% fötalem Kälberserum und Natriumbicarbonat) kultiviert.

[0113] Die Zellsuspensionen, die hergestellt wurden und gemäß dem speziellen Zelltyp und der erwarteten Zielzelldichte (2.500-30.000 Zellen pro Well auf der Basis der Zellwachstumseigenschaften) verdünnt wurden, wurden mittels Pipette (80µl) in 96-Well-Microtiterplatten hineingegeben. Den Inoculaten wurde eine Prä-Inkubationsdauer von 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ zur Stabilisierung gewährt. Vierfache Verdünnungen der beabsichtigten Testkonzentration wurden zum Zeitpunkt Null in 20µl-Aliquots zu den Microtiterplatten-Wellen zugefügt. Gewöhnlicherweise wurde die Testverbindung bei sechs 4-fachen Verdünnungen untersucht. Bei der Routinetestung betrug die höchste Konzentration pro Well 266,7µM, konnte jedoch variieren je nach Mittel. Alle Wirkstoffkonzentrationen wurden in Duplikaten untersucht. Inkubationen der Zellen mit den Testverbindungen dauerten 72 Stunden bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit. Am Ende der Inkubationsdauer wurden die Zellen durch Verwendung des MTT getestet. 10 Mikroliter der MTT-Stammlösung wurden in jedes Well pipettiert und für weitere 1-4 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurde Formazan durch Zugabe von 100µl/Well an 10% SDS in Wasser (pH = 5,5) solubilisiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 37°C über Nacht. Die optische Dichte (OD) wurde bei 540nm mit dem Labesystem iEMS-Lesegerät MF (UK) gemessen. Die Tumorzell-Überlebensrate (TCS) wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet: $TCS = (OD_{Wirkstoff-ausgesetztes\ well}/Mittel\ OD_{Kontroll- wells}) \times 100\%$. Der TCS₅₀-Wert, d.h. die Wirkstoffkonzentration, die gegenüber 50% der Tumorzellen lethal ist, wurde aus den erhaltenen Dosis/Antwort-Kurven berechnet.

[0114] Die Cytotoxizität der neuen Verbindungen wurde auf einem Panel von Zelllinien unterschiedlichen histogenetischen und artenspezifischen Ursprungs getestet (Tabelle 7). Gleiche Aktivitäten wurden bei allen getesteten Tumorzelllinien gefunden. Beachtlicherweise wurde eine identische Wirksamkeit der Purinderivate auch in Zelllinien gefunden, die unterschiedliche Mutationen oder Deletionen in Zellzyklus-assoziierten Proteinen aufwiesen, z.B. HL-60, BT549, Hela, U2OS, MDA-MB231 und Saos2. Dies deutet an, daß diese Substanzen in Tumoren mit unterschiedlichen Veränderungen der Tumorsuppressorgene, nämlich p53, Rb, etc. gleich wirksam sind. Von Bedeutung ist, daß diese Beobachtung die Purinderivate der Erfindung von Flavopiridol und verwandten Verbindungen unterscheidet, da ihre biologische Aktivität vom p53-Status abhängig ist.

Tabelle 7: Cytotoxizität von Verbindungen der Erfindung gegenüber unterschiedlichen Krebszellen

SUBSTITUENTEN			CEM	B16
C2	C6	N9	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
(R)-2-Hydroxypropylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethylen)amino]	Isopropyl	7	74,6
(S)-2-Hydroxypropylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethylen)amino]	Isopropyl	8	5,6
Hexylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethylen)amino]	Isopropyl	34	36,8
(R)-1-(Hydroxymethyl)propylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethylen)amino]	Isopropyl	15	13,5
(S)-1-(Hydroxymethyl)propylamino	[(R,S)-(1-Phenyl-2-hydroxyethylen)amino]	Isopropyl	20	24
(R)-2-Hydroxypropylamino	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	35	41
(S)-2-Hydroxypropylamino	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	12	10
Hexylamino	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	22	21
(R)-1-(Hydroxymethyl)propylamino	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	8	9
(S)-1-(Hydroxyl-methyl)propylamino	3,4-Dihydroxy-benzylamino	Isopropyl	51	53
(R)-2-Hydroxypropylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	13	14
(S)-2-Hydroxypropylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	43	40
Hexylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	33	32
(R)-1-(Hydroxymethyl)propylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	6	6

(S)-1-(Hydroxymethyl)propylamino	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	36	34
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxymethylamino)	[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino	Isopropyl	8	9

BEISPIEL 8

Die neuen Verbindungen induzieren Apoptose in Tumorzellen

[0115] Zur Analyse des Mechanismus der induzierten Cytotoxizität durch die neuen Verbindungen ist es wichtig, die Apoptose von anderen Hauptformen von Zelltod, der Nekrose, zu unterscheiden. Zunächst produziert auf dem Gewebeniveau die Apoptose wenig oder keine Entzündung, da benachbarte Zellen, insbesondere Macrophagen geschrumpfte Abschnitte der Zelle eher einhüllen als daß sie in extrazelluläres Fluid freigegeben werden. Im Gegensatz dazu werden bei der Nekrose zelluläre Inhalte in das extrazelluläre Fluid freigesetzt und haben somit eine irritierende Wirkung auf die nahegelegenen Zellen, was Entzündung verursacht. Als zweites zeigen auf zellulärem Niveau apoptotische Zellen eine Schrumpfung und eine Blasenbildung des Cytoplasmas einen Erhalt der Struktur zellulärer Organellen, einschließlich der Mitochondrien, eine Kondensierung und Margination des Chromatins, eine Fragmentierung von Kernen sowie eine Bildung apoptotischer Körper, obgleich nicht alles davon in allen Zellkörpern gesehen wird. Als Drittes übernehmen auf molekularem Niveau eine Reihe biochemischer Prozesse eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose ein. Die meisten davon sind jedoch nicht gut verstanden, und sie führen zur Aktivierung von Proteasen und Nucleasen, die letztlich biologische Schlüsselmakromoleküle – Proteine und DNA – abbauen. Zur Detektion der apoptotischen gegenüber nekrotischen Form des Zelltodes werden zwei unabhängige Methoden angewandt: Untersuchung der Morphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie und Analyse der DNA-Fragmentierung durch Durchfluß-Cytometrie unter Verwendung der TUNEL-Technik.

Bestimmung der Apoptose und Zellzyklus-Aufteilung

Mikroskopie:

[0116] Die Kernmorphologie der Zellen wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 (λ_{Ex} max 346 nm; λ_{Em} max 460 nm) (Sigma), hergestellt in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS bei 0,1 mg/ml, hinzugefügt zum Kulturmedium bei einer Endkonzentration von 2 μ g/ml) sowie Ethidiumbromid (EB) (λ_{Ex} max 540nm; λ_{Em} max 625nm) (Sigma), hergestellt in PBS bei 100 μ g/ml und zum Kulturmedium bei einer Endkonzentration von 2 μ g/ml hinzugefügt, analysiert (Lizard, 1995). Hunderte Zellen wurden für jede Probe gezählt, und der Prozentsatz an Apoptose wurde bestimmt.

[0117] TdT-vermittelte dUTP-Nickenden-Markierung (TUNEL): Zellkulturen der Kontrolle und der Behandlungen mit den neuen Verbindungen wurden mit PS gewaschen und in 1%-gepuffertem Formaldehyd (pH 7,4) für 15 Minuten auf Eis fixiert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen in 70%-kaltem (-20°C) Ethanol permeabilisiert und auf 4°C für mindestens eine Stunde gebracht. Nach Rehydratisierung in PBS wurden die Zellen mit 50 μ l/Well der TUNEL-Reaktionsmischung (Boehringer Mannheim) markiert. Zellen wurden in dieser Lösung bei 37°C für 40 Minuten inkubiert, in PBS gewaschen und in 500 μ l PBS, welches 5 μ g/ml EB und 0,1% RNase enthielt, resuspendiert. Nach 30 Minuten der Inkubation bei 4°C wurden die grüne (FITC-dUTP) und rote (EB-DNA) Fluoreszenz der individuellen Zellen auf einem FACscan Durchfluß-Cytometer gemessen (Gorczyk, 1993). Bei jedem experimentellen Setup wurden eine negative Kontrolle (fixierte und permeabilisierte Zellen, die mit 50 μ l Markierungslösung pro Well ohne terminale Transferase anstelle der TUNEL-Reaktionsmischung inkubiert wurden) und der positiven Kontrolle (fixierte und permeabilisierte Zellen, inkubiert mit DNase IUI (100 μ g/ml), die DNA-Strangbrüche induziert, eingeschlossen).

[0118] Die Durchfluß-cytometrische Detektion der Apoptose kombiniert mit der DNA-Färbung kann apoptotische Zellen identifizieren und gleichzeitig ihre Position im Zellzyklus untersuchen. Diese Technik wurde verwendet, um Informationen über eine mögliche Zellzyklus-spezifische Initiierung der Apoptose durch die getesteten Verbindungen zu liefern. Wenn mehr als 2% an apoptotischen Zellen durch die TUNEL-Methode detektiert wurden und die Absolutzahl an erworbenen apoptotischen Vorkommnissen die Zahl 2.000 überstieg, wurde gleichzeitig der DNA-Gehalt gemessen. Innerhalb der apoptotischen Population wurde eine Analyse und Berechnung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen durch eine iterative Kurvenanpassungsprozedur durchgeführt (ModFit LT Zellzyklusanalyse-Software aus dem Verity-Software House, Inc.).

Pro-apoptotischer Effekt der neuen Verbindungen

Fluoreszenz-Mikroskopanalyse der Apoptose und der Nekrose:

[0119] Zellkulturen, die mit unterschiedlichen Dosen der neuen Verbindungen (die "P"-Zahl der Verbindungen entspricht der in Tabelle 5 im Beispiel 8) behandelt wurden, wurden mikroskopisch auf Apoptose untersucht.

Apoptotische Zellen zeigen eine sehr helle Hoechst 33342-Fluoreszenz, wohingegen lebende Zellen eine sehr schwache Fluoreszenz zeigen. Spät-apoptotische Zellen oder sekundär-nekrotische Zellen zeigen einen fragmentierten Kern mit hellroter Ethidiumbromid-Fluoreszenz. Primärnekrotische Zellen zeigen eine rote Fluoreszenz und besitzen keine fragmentierten Kerne.

[0120] **Fig. 2** zeigt das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung der mit P23 inkubierten KG1-Zellen. Lebende, apoptotische, nekrotische (= Primär-Nekrose, nicht einer Apoptose folgend) und sekundär-nekrotische Zellen (= späte Apoptose, zur Nekrose führend) wurden differentiell nach 6, 12, 24, 48 und 72 des Aussetzens gegenüber der neuen Verbindung gezählt. Für die Produkte konnte ein unterschiedliches Apoptose-Induzierungsmuster beobachtet werden. Nach Inkubation mit P23 tritt eine Apoptose-Induktion rasch auf.

Durchfluß-Cytometriedetektion der Apoptose und Zellzyklus-Analyse:

[0121] Die Induktion des Apoptosetods von KG1-Zellen durch die neuen Verbindungen wurde unter Verwendung der TUNEL-Reaktionstechnik bestätigt (**Fig. 5**). Bei P23 ist die Apoptose-Zellzahl in der G₀-G₁-Phase des Zellzyklus höher im Vergleich zu Kontrollzellen bei allen Zeitpunkten (unbehandelte Kultur), jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (**Fig. 6a**). Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen in G₀-G₁ steigt mit der Zeit an, während die Zahl an apoptotischen Zellen in den S + G₂/M-Phasen abnimmt. Diese Unterschiede zwischen Kontroll- und apoptotischen Zellen war nach 72 Stunden signifikant ($p = 0,035$). Bei der inkubierten Kultur nach Messung durch TUNEL wurde kein signifikanter Unterschied detektiert zwischen der Kontrolle (ohne Inkubation des Produkts) und der nicht-apoptotischen Population. Nach 6 und 12 Stunden der Inkubation scheint die apoptotische Population hauptsächlich aus der S-Phase zu kommen. Die apoptotischen Zellen in der G₀-G₁-Phase steigt mit der Zeit nach 24 Stunden an. Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen der Kontroll- und der nichtapoptotischen Population in der inkubierten Kultur detektiert.

BEISPIEL 9

Immunsuppressive Aktivität

[0122] Einer der wichtigsten Parameter der spezifischen zellulären Immunität ist die proliferative Antwort von Lymphocyten auf Antigene oder polyklonale Mitogene. Die Mehrheit der normalen peripheren Lymphocyten im Säuger umfassen ruhende Zellen. Antigene oder nicht-spezifische polyklonale Mitogene besitzen die Fähigkeit, lymphoide Zellen zu aktivieren, und dies wird durch dramatische Veränderungen des intrazellulären Metabolismus begleitet (mitochondriale Aktivität, Proteinsynthese, Nucleinsäuresynthese, Bildung von plasti-schen Zellen und zelluläre Proliferation). Verbindungen mit der Fähigkeit, die Lymphocyten-Proliferation selektiv zu hemmen, sind potente Immunsupresiva. Eine Reihe von in vitro-Tests wurden entwickelt, um die proliferative Antwort von Lymphocyten zu messen. Die am meisten verwendete ist die ³H-Thymidin-Einbaumethode.

[0123] Während der Zellproliferation muß DNA repliziert werden, bevor sich die Zelle in zwei Tochterzellen teilt. Diese enge Verbindung zwischen Zellverdopplung und DNA-Synthese ist sehr attraktiv zum Testen der Zellproliferation. Falls markierte DNA-Vorläufer zu der Zellkultur hinzugegeben werden, bauen Zellen, die am Teilen sind, das markierte Nucleotid in ihre DNA ein. Traditionell beinhalten diese Tests gewöhnlich die Verwendung radiomarkierter Nucleoside, insbesondere von Tritium-Thymidin ([³H]-TdR). Die Menge an in die zelluläre DNA eingebautem [³H]-TdR wird durch Flüssigkeits-Szintillationszählung quantifiziert.

[0124] Humanes heparinisiertes Peripherblut wurde von gesunden Probanden mittels kubitaner Venenpunktion erhalten. Das Blut wurde in PBS (1:3) verdünnt, und mononukleare Zellen wurden mittels Zentrifugieren im Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten (Pharmacia, 1,077 g/ml) bei 2.200UPM für 30 Minuten getrennt. Nach Zentrifugieren wurden die Lymphocyten in PBS gewaschen und in Zellkulturmedium (RMPI 1640, 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 10% fötales Kälberserum und Natriumbicarbonat) resuspendiert.

[0125] Die Zellen wurden auf die Zieldichte von 1.100.000 Zellen/ml verdünnt und wurden mittels Pipette (180µl) zu 96/Well-Mikrotiterplatten hinzugefügt. Vierfach-Verdünnungen der beabsichtigten Testkonzentration wurden zum Zeitpunkt Null in 20µl Aliquots zu den Mikrotiterplatten-Wellen hinzugegeben. Gewöhnlich wurde die Testverbindung bei sechs 4-fach-Verdünnungen untersucht. Beim Routinetesten betrug die höchste Konzentration pro Well 266,7µM. Alle Wirkstoffkonzentrationen wurden im Duplikat untersucht. Alle Wells mit Ausnahme der nicht stimulierten Kontrollen wurden mit 50µl Concanavalin A (25µg/ml) aktiviert. Inkubationen der Zellen mit den Testverbindungen dauerten 72 Stunden bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre und bei 100% Luft-

feuchtigkeit. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Verwendung des [³H]-TdR getestet: Zellkulturen wurden mit 0,5 μ Ci (20 μ l) der Stammlösung 500 μ Ci/ml) pro Well für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der automatische Zellsammler wurde zum Lysieren von Zellen in Wasser verwendet und absorbierte die DNA auf Glasfaserfilter im Format der Mikrotiterplatte. Die das [³H]-TdR einschließende DNA wurde auf dem Filter zurückgehalten, wohingegen uneingebautes Material durchlief. Die Filter wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet, in einem Probenbeutel mit 10–12ml Scintillationsmittel verschlossen. Die Menge an in jedem Filter vorliegendem [³H]-TdR (in cpm) wurde mittels Szintillationszählung in einem Betaplate-Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Die wirksame Dosis an Immunsuppressivum (ED) wurde berechnet unter Verwendung der folgenden Gleichung: ED = (cpm_{Wirkstoff-exponiertes Well}/Mittel cpm_{Kontroll-Wellen}) \times 100%. Der ED₅₀-Wert, d.h. die Wirkstoffkonzentration, die die Proliferation von 50% der Lymphocyten hemmt, wurde aus den erhaltenen Dosis/Antwort-Kurven berechnet.

[0126] Zur Untersuchung der Immunsuppressivum-Aktivität der substituierten Adenine wurde ihre Fähigkeit zum Hemmen der polyklonalen Mitogen induzierten Proliferation von normalen humanen Lymphocyten analysiert (Tabelle 8). Unsere Daten zeigen, daß die Verbindungen lediglich eine marginale Aktivität auf den ³H-Thymidin-Einbau besitzen, nichtsdestoweniger hemmen sie wirksam die Proliferation aktivierter Lymphocyten. Die wirksame immunsuppressive Dosis der neuen Derivate unter in vitro-Bedingungen war nah bei 1–20 μ M.

Tabelle 8: Immunsuppressive Aktivität der neuen Purinderivate

SUBSTITUENT			
C2	N6	N9	ED ₅₀ (μM)
(R) -2-Hydroxypropylamini	[(R,S) - (1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	23
(S) -2-Hydroxypropylamino	[(R,S) - (1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	27
Hexylamino	[(R,S) - (1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	56
2-Hydroxyethylamino	[(R,S) - (1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	38
(R) -1- (Hydroxy-methyl)propylamino	[(R,S) - (1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	12
(S) -1- (Hydroxy-methyl)propylamino	[(R,S) - (1-Phenyl-2-hydroxyethyl)amino]	Isopropyl	14
(R) -2-Hydroxypropylamino	[N- (2- (3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl-N-methyl)amino]	Isopropyl	7
(S) -2-Hydroxypropylamino	[N- (2- (3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl-N-methyl)amino]	Isopropyl	8
Hexylamino	[N- (2- (3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl-N-methyl)amino]	Isopropyl	15
(R) -1- (Hydroxymethyl)propylamino	[N- (2- (3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl-N-methyl)amino]	Isopropyl	1,5
(S) -1- (Hydroxymethyl)propylamino	[N- (2- (3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl-N-methyl)amino]	Isopropyl	1,8
2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)	[N- (2- (3,4-Dihydroxy-phenyl)ethyl-N-methyl)amino]	Isopropyl	0,54

BEISPIEL 10

Trockenkapseln

[0127] 5.000 Kapseln, von denen jede 0,25g eines der Purinderivate der wie oben definierten Formel I als aktivem Bestandteil enthält, werden wie folgt hergestellt:

Zusammensetzungen

Aktiver Bestandteil	1.250g
Talk	180g
Weizenstärke	120g
Magnesiumstearat	80g
Lactose	20g

Herstellungsverfahren

[0128] Die erwähnten gepulverten Substanzen werden durch ein Sieb der Maschenweite 0,6mm gepreßt. Teile von 0,33g der Mischung werden durch mit Hilfe einer Kapselfüllmaschine in Gelatine-Kapseln umgewandelt.

BEISPIEL 11

Weichkapseln

[0129] 5.000 Gelatine-Weichkapseln, von denen jede 0,05g eines der Purinderivate der wie oben definierten Formel I als aktiven Bestandteil enthält, werden wie folgt hergestellt:

Zusammensetzung

Aktiver Bestandteil	250g
Lauroglykol	2 Liter

Herstellungsverfahren

[0130] Der gepulverte aktive Bestandteil wird in Lauroglykol® (Propylenglykollaurat, Gattefosse S.A., Saint Priest, Frankreich) suspendiert und in einem Naßpulverisierer auf eine Teilchengröße von etwa 1 bis 3µg zerkleinert. Teile von in jedem Fall 0,419g der Mischung werden dann mittels einer Kapselfüllmaschine in weiche Gelatinekapseln umgewandelt.

BEISPIEL 12

Weichkapseln

[0131] 5.000 Gelatine-Weichkapseln, von denen jede 0,058 eines der Purinderivate der oben definierten Formel I als aktivem Bestandteil enthält, werden wie folgt hergestellt:

Zusammensetzung

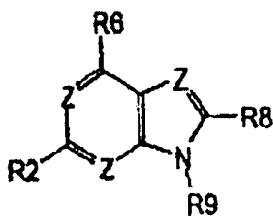
Aktiver Bestandteil	250g
PEG 400	1 Liter
Tween 80	1 Liter

Herstellungsverfahren

[0132] Der gepulverte aktive Bestandteil wird in PEG 400 (Polyethylenglykol von Mr zwischen 380 und etwa 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) und Tween® 80 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat, Atlas Chem. Inc., Inc., USA, geliefert durch Sigma, Fluka, Aldrich, USA) suspendiert und in einem Naßpulverisierer auf eine Teilchengröße von etwa 1 bis 3mm zerkleinert. Teile von in jedem Fall 0,438 der Mischung wird dann mittels einer Kapselfüllmaschine in weiche Gelatine-Kapseln umgewandelt.

Patentansprüche

1. Purinderivate und verwandte Aza-Deaza-Analoga, dargestellt durch die allgemeine Formel I:



I

sowie pharmazeutisch akzeptable Salze davon, worin: Z N ist;

R6 ein substituiertes -NH-Phenylalkyl ist, worin Alkyl ein verzweigtes oder lineares, gesättigtes oder ungesättigtes C₁-C₆-Niedrigalkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Vinyl, Propenyl oder Propenyl ist, wobei der Phenylring oder das Alkyl durch 1 bis 4 Substituenten substituiert ist, wobei die Substituenten für den Phenylring aus Hydroxylsubstituenten ausgewählt ist und für das Alkyl unabhängig davon aus Halogen wie Chloro oder Fluoro, Hydroxyl, Amino, Carboxyl oder Amido ausgewählt ist;

R8 H ist,

R2 R2'-X ist, worin

X -NH- ist; und

R2' eine verzweigte oder unverzweigte C₃-C₆-Kette ist, die gesättigt oder ungesättigt sein kann, wie Propyl, Isopropyl, tert-Butyl, Isobutyl, Allyl, Vinyl, Allyl, Propenyl, Propagyl, Propinyl, Isopentenyl oder Isobutenyl, wahlweise substituiert durch 1 bis 3 Substituenten, die aus Hydroxyl oder Amino ausgewählt sind;

und

R9 eine verzweigte oder unverzweigte C₁-C₆-Kette ist, die gesättigt oder ungesättigt sein kann, wie zum Beispiel Methyl, Propyl, Isopropyl, tert-Butyl, Allyl, Vinyl, Ethinyl, Propargyl oder Hexen-2-yl.

2. Purinderivate wie in Anspruch 1 beansprucht, wobei der Phenylring durch 1 bis 4 Hydroxylsubstituenten substituiert ist.

3. Purinderivate wie in den Ansprüchen 1–2 beansprucht, worin R6 ein mit einer Catecholgruppe substituiertes Amin ist.

4. Purinderivate wie in Anspruch 1 beansprucht, worin die C₁-C₆-Niedrigalkylgruppe durch 1 bis 4 unabhängige Substituenten substituiert ist, ausgewählt aus Halogen wie Chloro, Fluoro, Hydroxyl, Amino, Carboxyl oder Amido.

5. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–3 beansprucht, worin die Purinderivate ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus 6-(3,4-Dihydroxybenzyl)aminopurin, 6-(3,4-Dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(1-Hydroxymethylpropylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)-amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(2-Hydroxymethylpyrrolidin-1-yl)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Aminopropylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)(amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Hydroxypropylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-(3,4-dihydroxybenzyl)-amino-9-isopropylpurin, 6-[N-(3,4-Dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-9-isopropylpurin, 6-[N-(3,4-Dihydroxybenzyl)-N-methyl]aminopurin, 6-[N-(3,4-Dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-8-fluoropurin, 6-[N-(3,4-Dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Hydroxypropylamino)-6-[N-(3,4-dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[N-(3,4-dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-9-isopropylpurin, 6-[1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 6-[1-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl]aminopurin, 6-[1-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl]amino-8-fluoropurin, 6-[1-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(2-Hydroxypropylamino)-6-[1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]amino-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-[N-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino-9-isopropylpurin, 6-[N-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino-8-bromo-9-isopropylpurin, 6-[N-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]aminopurin, 6-(R,S)-Hydroxy-1-phenylethyl-amino-9-isopropylpurin, 6-[N-(3,4-Dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-9-(R)-(2-phosphonomethoxypropyl)purin, 2-Amino-6-[N-(3,4-dihydroxybenzyl)-N-methyl]amino-9-(R)-(2-phosphonomethoxypropyl)purin, 2-Amino-6-(3,4-dihydroxybenzyl)amino-9-(R)-(2-phosphonomethoxypropyl)purin, und 2-Amino-6-[N-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl)-N-methyl]amino-9-(R)-(2-phosphonomethoxypropyl)purin, 2-(1R)-Isopropyl-2-hydroxyethylamino-6-[(R)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]-9-isopropylpurin, 2-(R)-(1-Isopropyl-2-hydroxyethylamino-6)-[(R,S)-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)amino]isopropylpurin besteht.

6. Verfahren zur Herstellung von 2,6,9-trisubstituierten Purinderivaten der Formel I in Anspruch 1, worin

R2-, R6-, R9-Substituenten wie in Anspruch 1 definiert sind, wobei 2-Chloro-6-substituierte Purinderivate mit R6-Substitutionen wie in Anspruch 1 definiert, alkyliert werden und anschließend mit R2-NH umgesetzt werden.

7. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 beansprucht zur Verwendung als Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinaseproteinen.

8. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 beansprucht zur Verwendung als ein antivirales, antimitotisches, antiproliferatives, immunmodulierendes, immunsuppressives, antientzündliches, antimikrobielles Mittel und/oder Antitumormittel.

9. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 beansprucht zur Verwendung als einem Modulator von α -, β - adrenergen und/oder purinergen Rezeptoren.

10. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 beansprucht zur Verwendung als einen Inhibitor der Proliferation von hämatopoietischen Zellen oder Krebszellen.

11. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 beansprucht zur Verwendung als einen Inducer der Apoptose in Krebszellen.

12. Purinderivate wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 und 7–11 beansprucht zur Verwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung, mit einem oder mehreren Purinderivat(en) wie in irgendeinem der Ansprüche 1–5 und 7–12 beansprucht und einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Streckmittel.

14. Verwendung von Purinderivaten wie in den Ansprüchen 1–5 und 7–11 beansprucht zur Herstellung von Affinitätsabsorptionsmatrizes.

15. Verwendung einer wirksamen Menge von einem oder mehreren Purinderivat(en) wie in den Ansprüchen 1–5 und 7–12 beansprucht, zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Herstellung eines Medikaments zum Hemmen der Zellproliferation bei Säugern.

16. Verwendung einer wirksamen Menge von einem oder mehreren Purinderivat(en) wie in den Ansprüchen 1–5 und 7–12 beansprucht, mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von viralen Infektionen bei Säugern.

17. Verwendung einer wirksamen Menge von einem oder mehreren Purinderivat(en) wie in den Ansprüchen 1–5 und 7–12 beansprucht, zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, wahlweise in Kombination mit einem oder mehreren cytostatischen Mittel(n), zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei Säugern.

18. Verwendung einer wirksamen Menge von einem oder mehreren Purinderivat(en) wie in den Ansprüchen 1–5 und 7–12 beansprucht, zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Herstellung eines Medikaments zur Unterdrückung der Immunstimulation bei Säugern.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

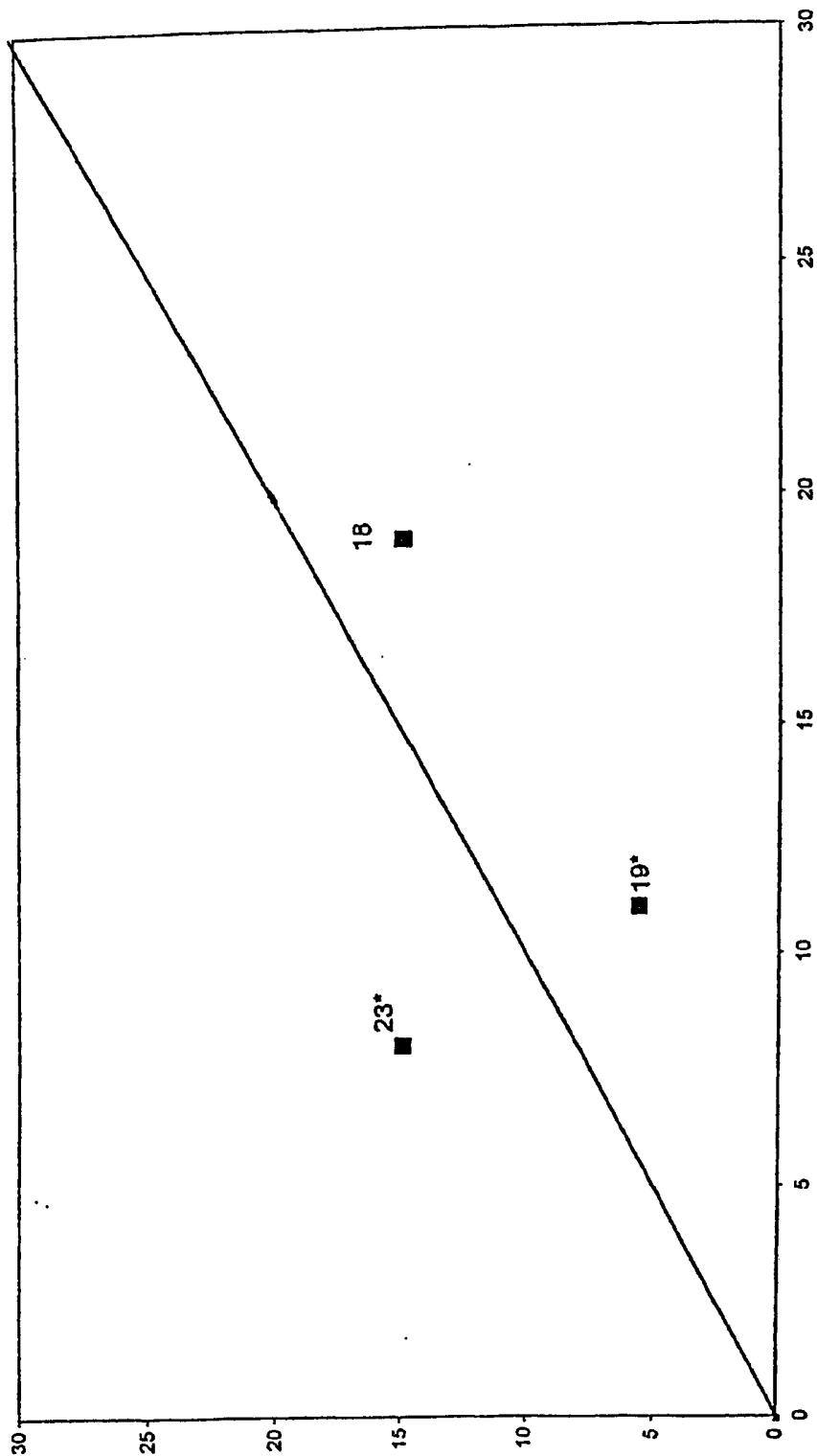


FIG. 1

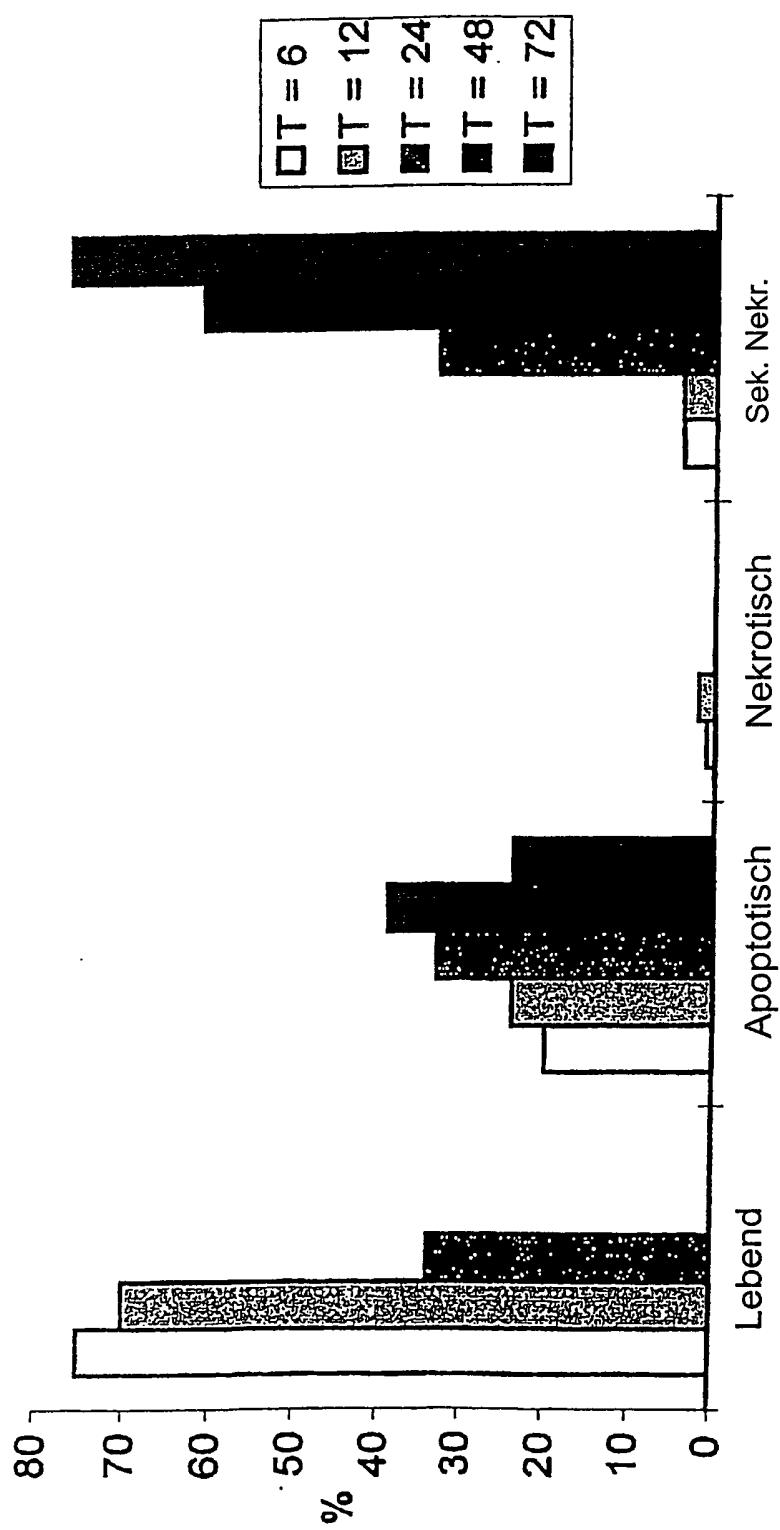


FIG. 2

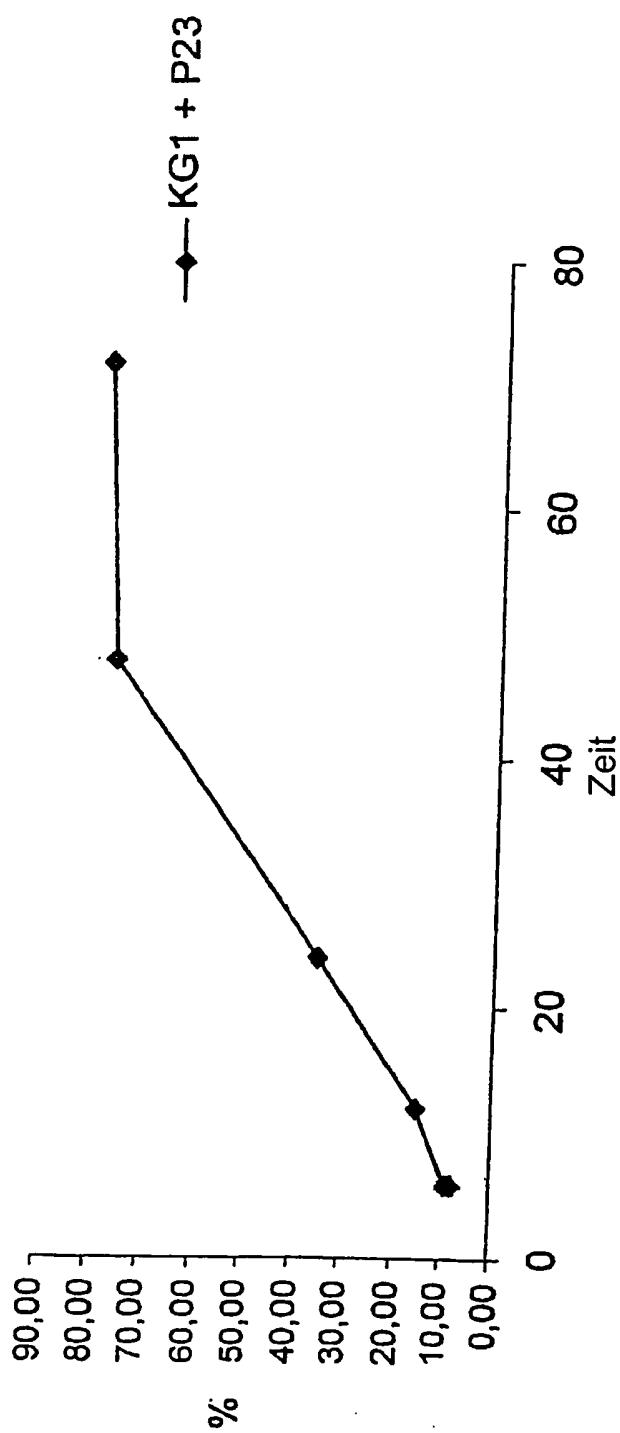


FIG. 3

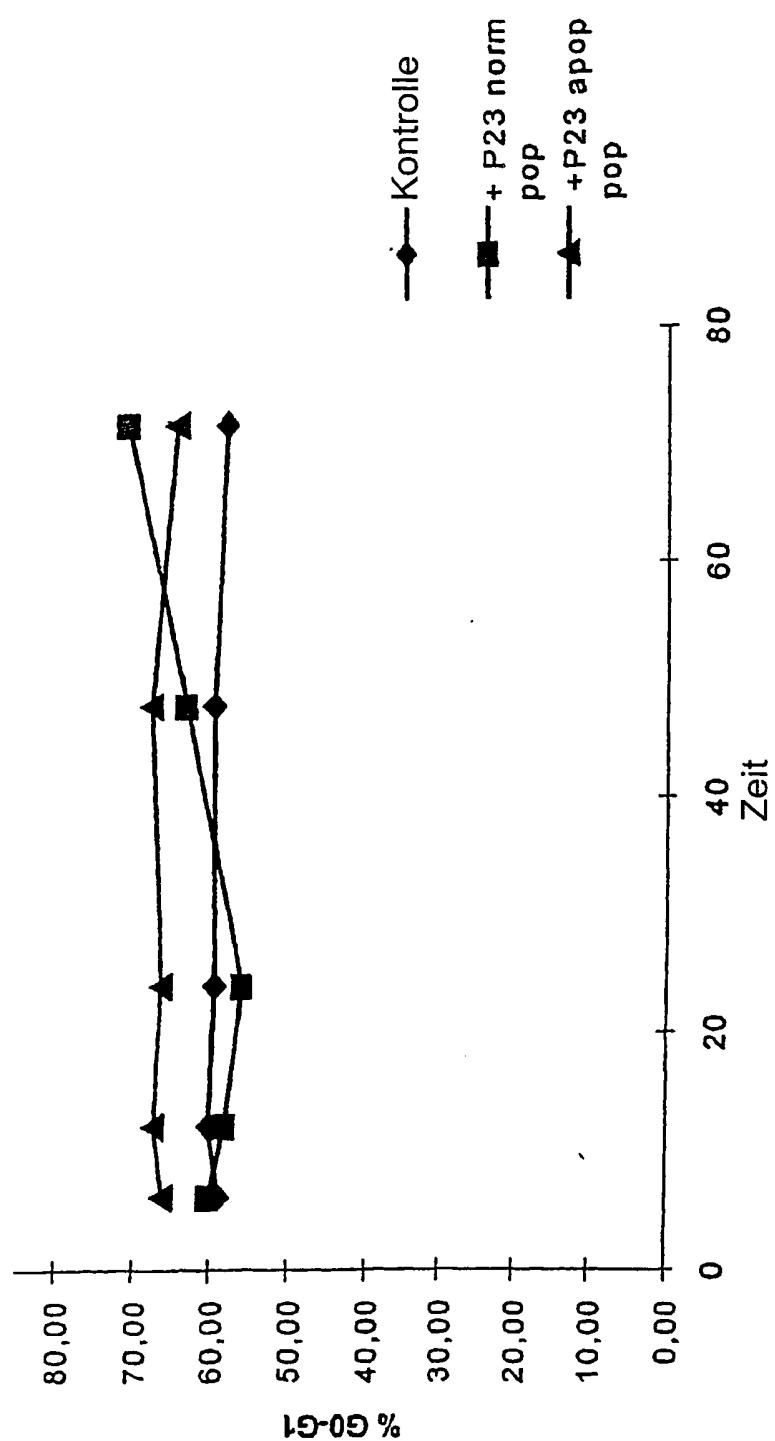


FIG. 6