

30 -11- 2010 EJ 761
h

Inventia s.r.o.
Na Belidle 3
CZ-150 00 Praha 5
Den Tsjekkiske Republikk

Lorentz Selmer ♦♦
Per A. Martinsen ♦♦
Trond Gustad ♦♦
Henrik Juel Pettersen ♦♦
Rita Sondnes
Øyvind Smedseng ♦♦
Kristino Edén Johnsen ♦♦
Tone Dahl ♦♦
Truls Chr. Vold ♦♦
Helge Stavsæth ♦♦
Svein Stenbek
Morgrethe Lunde ♦
Geir Langli

REGISTERED MAIL

Your ref:
INV 32/01

Our ref:
157286 - TG/PA

Oslo,
23 November 2010

♦ Member of the Association
of Norwegian Patent Agents
and FICPI

♦ European Patent Attorney

♦ Member of the Norwegian
Bar Association

Trond Gustad
MSc, Patent Attorney

Direct dial: +47 2100 9010
Mobile: +47 9937 6062

Patent No. 329434 in Norway
(Application No. 20040469)
Ustav Experimentální Botaniky Akademie ved České Republiky

Dear Sirs,

Enclosed please find the Letters Patent in the above-mentioned case, together with an overview of the patent's bibliographical data and due dates.

We especially draw your attention to the fact that our in-house attorneys can guide and assist you in all matters relating to this patent, e.g. licensing, assignment or conflicts.

Yours faithfully
Oslo Patentkontor AS

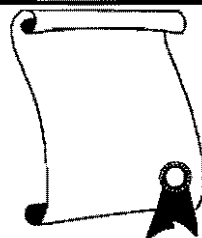
Trond Gustad

Trond Gustad

Encl.:
Overview of bibliographical data
Letters Patent



LETTERS PATENT



Country: NORWAY

Applicant: Ustav Experimentální Botaniky
Akademie ved České Republiky

Application No.: 20040469

Filed: 2 February 2004

Patent No.: 329434

Issued: 18 October 2010

Opposition period: 9 months from the issue date

Duration: 1 August 2022

Working due: within 3 years from the issue date

Annuities are due: 1 August each year



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Registreringsbrev


Certificate of Registration

Patent nr.: **329434**

Patent No.

I henhold til patentloven av 15 desember 1967 er Deres patent meddelt med opplysninger som angitt i vedheftet patentskrift.

This is to certify that the Norwegian Patent Office, in accordance with the Patents Act No. 9 of 15 December 1967, has granted a patent for the enclosed invention



Jørgen Smith

direktor



(12) PATENT

(19) NO

(11) 329434

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040469	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.08.01 PCT/CZ2002/00045
(22)	Inng.dag	2004.02.02	(85)	Videreføringssdag	2004.02.02
(24)	Løpedag	2002.08.01	(30)	Prioritet	2001.08.02, CZ, PV20012818
(41)	Alm.tilgj	2004.04.30			
(45)	Meddelt	2010.10.18			
(73)	Innehaver	Ustav experimentální botaniky Akademie ved České republiky, Rozvojová 135, CZ-16502 PRAHA 6, Den tsjekkiske republikk			
(72)	Oppfinner	René Lenobel, Hlavní nám 12, CZ-78501 STERNBERK, Den tsjekkiske republikk Miroslav Strnad, Západní 25, CZ-77900 OLOMOUC, Den tsjekkiske republikk Karel Dolezal, Videc 401, CZ-75653 VIDCE, Den tsjekkiske republikk Igor Popa, Dr. V. Nespora 11, CZ-77200 OLOMOUC, Den tsjekkiske republikk Jan Holub, Foerstrova 45, CZ-77900 OLOMOUC, Den tsjekkiske republikk Stefaan Werbrouck, Beeklaan 34, BE-8530 HARELBEKE, Belgia Marek Zatloukal, Revolucni 18A, CZ-78701 SUMPERK, Den tsjekkiske republikk			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Anvendelse av 6-(4-hydroksybenzylamino)purin til kosmetiske formål
(56)	Anførte publikasjoner	EP 540854 A2, JP 07-233037, WO 92/20341 A1
(57)	Sammendrag	

Heterocykliske derivater basert på N⁶-substituert adenin som har antikreft, mitotiske, immunosuppressive og antisenescence egenskaper for plante, animalske og humane celler samt fremgangsmåter for deres fremstilling. Det er også beskrevet farmasøytiske sammensetninger, kosmetiske preparater og vekstregulatorer som inneholder disse derivater som aktive bestanddeler samt bruken av disse derivater for fremstilling av medikamenter, kosmetiske preparater i bioteknologiske prosesser i kosmetika og i agrikultur.

Teknisk område

Oppfinnelsen angår anvendelse av 6-(4-hydroksybenzylamino)purin til kosmetiske formål, og spesielt til inhibering av aldring og aldringstegn i epidermalceller hos pattedyr så som keratinocytter eller fibroblaster. Oppfinnelsen angår også et kosmetikum omfattende 6-(4-hydroksybenzylamino)purin eller farmasøytiske akseptable salter derav med en farmasøytisk bærer.

Bakgrunnsteknikk

Siden alle levende organismer på jorden har utviklet seg sammen over millioner år, kan tilstedeværelsen av regulatoriske interaksjoner av planteforbindelser slik som cytokininer, bli antatt i dyr og mennesker. Cytokininavlede forbindelser påvirker sannsynligvis mange forskjellige molekylære mekanismer i animalske og humane celler. Søker har nylig oppdaget at nye generasjoner av antiinflammatoriske, antikreft, immunosuppressive, antivirale og andre medikamenter kan være basert på N⁶-substituerte puriner og deres derivater.

Målet for foreliggende oppfinnelse er å fremskaffe antisenescence forbindelser som har forbedret selektivitets- og effektivitetsindeks, det vil si som er mindre toksiske og likevel mer effektive enn tidligere kjente analoger.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Mål for foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av 6-(4-hydroksybenzylamino)purin til kosmetiske formål samt kosmetika omfattende denne forbindelsen sammen med en farmasøytisk bærer.

De kosmetiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse, fremstilles på en i og for seg kjent måte, for eksempel ved hjelp av konvensjonell blanding, granulering, belegging, oppløsning eller frysetørkingsprosesser.

Foretrukket blir oppløsninger av den aktive bestanddel, og i tillegg også suspensjoner eller dispersjoner, spesielt isotone, vandige oppløsninger, dispersjoner eller suspensjoner brukt, idet det er mulig for disse å bli fremstilt for bruk, for eksempel i tilfelle med frysetørkede sammensetninger som omfatter den aktive substans i seg selv eller sammen med et bæremateriale, for eksempel mannitol. De kosmetiske sammensetninger kan bli sterilisert og/eller omfatte eksipienter, for eksempel pre-

servativer, stabilisatorer, fuktemidler og/eller emulgatorer, stabiliseringsmidler, og de fremstilles på i og for seg kjent måte, for eksempel ved hjelp av konvensjonell oppløsning eller frysetørkingsprosesser. Oppløsningene eller suspensjonene som er nevnt kan omfatte viskositetsøkende substanser, så som natrium, karboksymetylcellulose, dekstran, polyvinylpyrrolidon eller gelatin.

Suspensjoner i olje omfatter som oljekomponenten, vegetabiliske, syntetiske eller semi-syntetiske oljer. Oljer som kan bli nevnt er spesielt flytende fettsyrestere som inneholder som syrekomponent, en langkjedet fettsyre som har 8-22, spesielt 12-22 karbonatomer, for eksempel laurinsyre, tridecylsyre, myristinsyre, pentadecylinsyre, palmitinsyre, margarinsyre, stearinsyre, syre, arakidonsyre, beheninsyre eller tilsvarende umettede syrer, for eksempel oleinsyre, elaidinsyre, eurinsyre, brasidinsyre eller linoleinsyre, om passende med tilsetningen av antioksidanter, for eksempel vitamin E, β -karoten eller 3,5-di-tert-butyl-4-hydroksytoluen. Alkoholkomponenten av disse fettsyrestere har ikke mer enn 6 karbonatomer og er mono- eller polyhydrisk, for eksempel mono-, di- eller trihydrisk alkohol, for eksempel metanol, etanol, propanol, butanol eller pentanol, eller isomerer derav, men spesielt blykol og glycerol. Fettsyrestere er følgelig, for eksempel etyloleat, isopropylmyristat, isopropylpalmitat, "Labrafil M 2375" (polyoksyetylenglykol trioleat fra Gattefoseé, Paris), "Labrafil M 1944 CS" (umettede polyglykolerte glycerider fremstilt ved en alkoholyse av aprikoskjerneolje og bestående av glycerider og polyetylenglykolestere fra Gattefoseé, Paris), "Labrasol" (mettede polyglykolerte glycerider fremstilt ved en alkoholyse av TCM og dannet av glycerider og polyetylenglykolestere, fra Gattefoseé, Paris) og/eller "Miglyol 812" (triglycerid av mettede fettsyrer av kjedelengde C_8 til C_{12} fra Hüls AG, Tyskland) og særskilt vegetabiliske oljer, så som bomullsfrøolje, mandelolje, olivenolje, lakserolje, sesamolje, soya-bønneolje og spesielt jordnøttolje.

Passende bærematerialer er spesielt fyllmaterialer, så som sukkere, for eksempel laktose, sukrose, mannitol eller sorbitol, cellulosepreparater og/eller kalsiumfosfater, for eksempel trikalsiumdifosfat, eller kalsiumhydrogenfosfat og ytterligere bindemidler, så som stivelser, for eksempel mais, hvete, ris eller potetstivelse, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, natriumkarboksymetylcellulose og/eller polyvinylpyrrolidon og/eller, om ønsket, desintegratorer, så som de ovennevnte stivelser og videre, karboksymetylstivelse, fornett polyvinylpyrrolidon, algininsyre eller et salt derav, så som natriumalginat. Ytterligere eksipienter er spesielt strømningsregulatorer og smøremidler, for eksempel salisylsyre, stivelse, stearinsyre

eller salter derav, så som magnesiumstearat eller kalsiumstearat, og/eller polyety-
lenglykol eller derivater derav.

Salver er olje-i-vann emulsjoner, hvilke omfatter ikke mer enn 70 %, men fore-
trukket 20-50 % vann eller vandig fase. Fettfasen består spesielt av hydrokarbo-
5 ner, for eksempel vaselin, parafinolje eller harde parafiner, som fortrinnsvis omfat-
ter egnede hydroksyforbindelser, så som fettsyrealkoholer eller estere derav, for
eksempel cetylalkohol eller ullvoksolje, så som ullvoks for å forbedre den vann-
bindende kapasitet. Emulgatorer er tilsvarende lipofile substanser, så som sorbitan,
fettsyreestere (Spans), for eksempel sorbitanoleat og/eller sorbitanisostearat. Addi-
10 tiver til den vandige fase er for eksempel humektanter, så som polyalkoholer, for
eksempel glycerol, propylenglykol, sorbitol og/eller polyetylenglykol eller preserva-
tiver og luktfremmende substanser.

Fettkremer er vannfrie og omfatter som base spesielt hydrokarboner, for eksempel
parafin, vaselin eller parafinolje og videre, naturlig forekommende eller semi-synte-
15 tiske fettsorter, for eksempel hydrogenerte kokosnøttfettsyretriglyserider eller fore-
trukket hydrogenerte oljer, for eksempel hydrogenert jordnøtt- eller lakserolje og
videre, partielle fettsyreestere av glycerol, for eksempel glycerol mono- og/eller
distearat, for eksempel fettalkoholene. De inneholder også emulgatorer og/eller
additiver nevnt i forbindelse med salvene som øker opptak av vann.

20 Kremer er olje-i-vann emulsjoner som omfatter mer enn 50 % vann. Oljebaser som
blir brukt er spesielt fettalkoholer, for eksempel lauryl, cetyl eller stearylalkoholer,
fettsyrer, for eksempel palmitin- eller stearinsyre, flytende til faste vokstyper, for
eksempel isopropylmyristat, ullvoks eller bivoks, og/eller hydrokarboner, for ek-
sempel vaselin (petrolatum) eller parafinolje. Emulgatorer er overflateaktive subs-
25 tanser med i hovedsak hydrofile egenskap så som tilsvarende ikke-joniske emulga-
torer, for eksempel fettsyreestere av polyalkoholer eller etylenoksyaddukter derav,
så som polyglyserinsyre fettsyreestere eller polyetylensorbitan fettstere (Tweens)
og videre polyoksyetylen fettalkoholetere eller polyoksyetylen fettsyreestere, eller
tilsvarende joniske emulgatorer, så som alkalimetallsalter av fettalkoholsulfater, for
30 eksempel natrium laurylsulfat, natrium cetylsulfat eller natrium stearylsulfat, som
vanligvis blir brukt i nærvær av fettalkoholer, for eksempel cetylstearylalkohol eller
stearylalkohol. Additiver til den vandige fase er bl.a. midler som forhindrer kremene
fra å tørke ut, for eksempel polyalkoholer så som glycerol, sorbitol, propylenglykol
og/eller polyetylenglykoler og ytterligere preservativer og luktfremmende substan-
35 ser.

Pastaer er kremer og salver som har sekresjonsabsorberende pulverbestanddeler så som metalloksider, for eksempel titanoksid eller zinkoksyd og videre talkum og/eller aluminiumsilikater, som har oppgaven å binde fuktigheten eller sekresjonene som er til stede.

- 5 Skum blir administrert fra trykksatte beholdere og der er flytende olje-i-vann emulsjoner som er til stede i aerosolskum. Som drivgasser blir halogenerte hydrokarboner så som polyhalogenerte alkaner, for eksempel diklorfluormetan og diklor-tetrafluoretan, eller fortrinnsvis ikke-halogenerte, gassformige hydrokarboner, luft, N₂O eller karbondioksid brukt. Oljefasene som benyttes er bl.a. dem nevnt ovenfor
10 for salver og kremer og additivene som er nevnt der blir likeledes benyttet.

Figurer

I figur 2 er det vist senescente celler i kultur av humane fibroblaster (B) (de andre celler (A)) farget blå grunnet virkningen av β -galaktosidase på substratet X-gal (5-brom-4-klor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) (1 mg/ml).

- 15 De følgende eksempler virker til å illustrere oppfinnelsen uten å begrense omfanget derav.

Eksempler

Referanse Eksempel 1

6-(3-klorbenzylamino)purin

- 20 3 mmol av 6-klorpurin ble oppløst i 15 ml butanol. Derpå ble 4 mmol 3-klorbenzylamin og 5 mmol trietylamin tilsatt og blandingen ble oppvarmet til 90 °C i 4 timer. Etter avkjøling ble det utfelte produkt filtrert fra, vasket med kaldt vann og n-butanol og krystallisert fra etanol eller dimetylformamid. Smeltepunkt = 252 °C, TLC (CHCl₃:MeOH: kons. NH₄OH (8:2:0.2, v/v/v)): enkel spot; HPLC: renhet > 98
25 %. Utbytte 95 %.

Referanse Eksempel 2

Blanding av 10 mmol adenin, 12 mmol 2-metoksybenzaldehyd og 5 ml 98-100 % maursyre ble kokt under tilbakeløp i 3 dager. Etter inndampning av maursyre ble det resulterende materialet avkjølt og deretter vasket med 40 ml dietyleter. Fast

residium ble kokt med 60 ml vann, filtrert og grovproduktet krystallisert fra etanol. Utbytte 45 %.

Eksempel 3

Inhibering av senescens med utvalgte forbindelser

- 5 I dette eksempel ble humane, diploide fibroblaster (HCA-celler av forskjellige passasjenivåer: passasje 25 - betegnet HCA25; passasje 45 - betegnet HCA45; passasje 80 - betegnet HCA80) farget for β -galaktosidaseaktivitet. Mediet som ble brukt for celledyrking ble fjernet, cellene ble vasket to ganger i PNS og fiksert i 2-3 ml av fikseringsoppløsning bestående av 2 % formaldehyde og 0,2 % glutaraldehyd i
- 10 PBS. Cellene ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter, derpå vasket to ganger med PBS. Cellene ble derpå inkubert ved 37 °C (uten CO₂) i 1 til 16 timer i 2-3 ml av en oppløsning omfattende kalium ferricyanid (5 mM), kalium ferrocyanid (5 mM), MgCl₂ (2 mM), X-gal (5-brom-4-klor-3-indol- β -D-galaktopyranosid) (1 mg/ml), i sitronsyre/fosfatbuffer, pH 6,0). Etter denne inkuberingsperioden ble cel-
- 15 leprøvene observert for å påvise tilstedeværelsen av blå celler, noe som indikerer at X-gal hadde blitt spaltet (positivt senescente celler). I dette forsøk ble senescente celler, men ikke andre celler, farget blå grunnet virkningen av β -galaktosidase på substratet.

Tabell 5

20 Effekten av utvalgte forbindelser på antall senescente celler i kultur av humane fibroblaster

SUBSTITUENT	SENESCENTE CELLER (%)		
	HCA25	HCA45	HCA80
R6			
KONTROLL	3	5	38
3-kloranilin	4	5	25
3,4-dihydroksybenzylamino	5	4	29
Anilin	3	4	27
3-klor-5-aminoanilin	3	6	24
3-klor-4-karboksyanilin	5	2	25
3-karboksy-4-kloranilin	3	5	20
3-karboksy-4-hydroksyanilin	4	2	26
4-bromanilin	5	3	25
4-kloranilin	5	5	26

SUBSTITUENT	SENESCENTE CELLER (%)		
	HCA25	HCA45	HCA80
R6			
3-amino-4-kloranilin	4	6	22
3-klor-4-aminoanilin	5	5	24
2-fluorobenzylamino	4	3	16
3-fluorobenzylamino	3	3	15
2-hydroksybenzylamino	3	4	17
3-hydroksybenzylamino	5	3	22
2-acetoksybenzylamino	6	5	32
3-acetoksybenzylamino	4	6	27
2-acetylbenzylamino	3	4	25
3-acetylbenzylamino	5	5	28
2-hydroksy-3-metoksybenzylamino	4	3	20
2-hydroksy-3-metylbenzylamino	5	2	18
2-hydroksy-3-klorbenzylamino	4	3	14
2,6-dihydroksy-4-klorbenzylamino	3	3	16
2,3-dihydroksy-4-metoksybenzylamino	3	4	17
2,5-dihydroksy-4-metoksybenzylamino	5	3	22
2,6-dihydroksy-4-metoksybenzylamino	4	3	13
2,3-dihydroksy-4-klorbenzylamino	3	3	14
2,5-dihydroksy-4-klorbenzylamino	5	4	23
2-amino-6-klorbenzylamin	3	4	16
3-amino-4-klorbenzylamin	5	5	22
2,3-diamino-4-klorbenzylamin	4	3	17

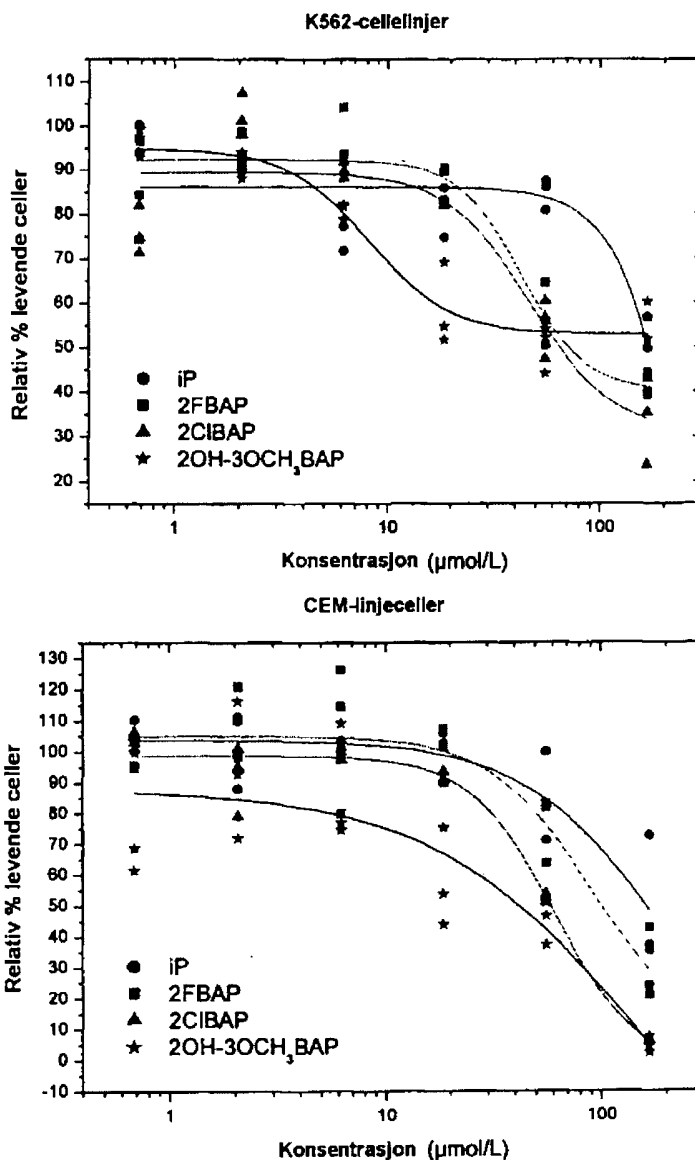
Som vist i tabell 5 ble, med økende antall passasjer, fargingen mørkere. For de eldste celler var det kun blå celler i området fra klart blått til en nesten gjennomsiktig farge. N⁶-substituerte adeninderivater var meget effektive i å oppnå et meget lavere nivå av senescente celler etter 80 passasjer. I tilfellet med langvarende dyrking var de dyrkede celler i stand til å leve en 30 % lenger periode enn kontrollcellene.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av 6-(4-hydroksybenzylamino)purin til kosmetiske formål.

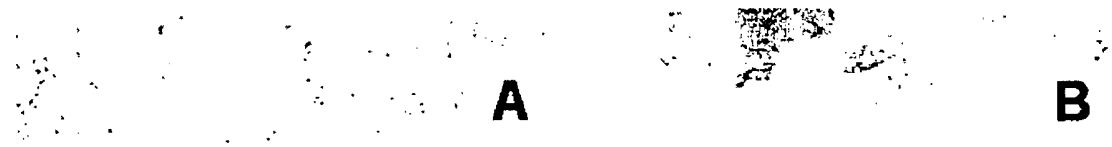
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor det kosmetiske formål er inhibering av aldring og aldringstegn i epidermalceller hos pattedyr så som keratinocytter eller fibro-
5 blaster.

3. Kosmetikum omfattende 6-(4-hydroksybenzylamino)purin eller dets farma-
søytisk akseptable salt innbefattende en farmasøytisk bærer.

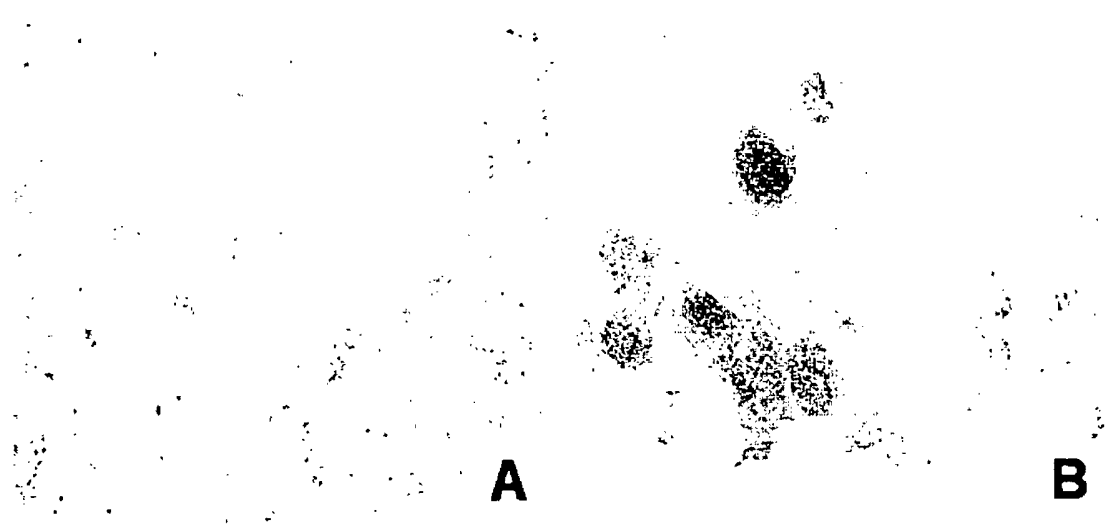


Figur 1: Inhibering av vekst av K562 (A) og CEM (B) tumorcellelinjer med undersøkte forbindelser.

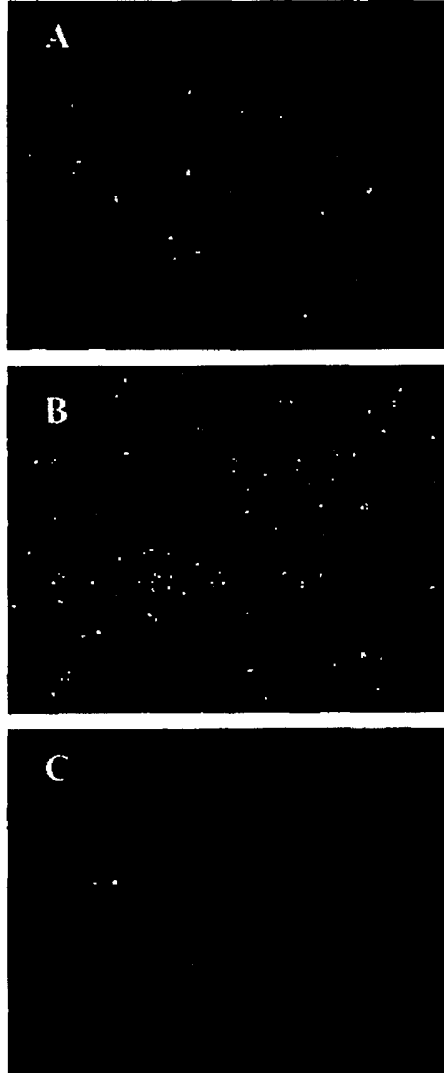
- 5 Cytotoksisitet ble bestemt ved nærvær av Calcein AM. Aktivitet presenteres som prosentdel av maksimal aktivitet (ved fravær av inhibitorer). iP: isopentyladenin; 2F BAP: 6-(2-fluorbenzylamino)purin; 2Cl BAP: 6-(2-klorbenzylamino)purin; 2OH-3OCH₃ BAP: 6-(2-hydroksy-3-metoksybenzylamino)purin.
- 10



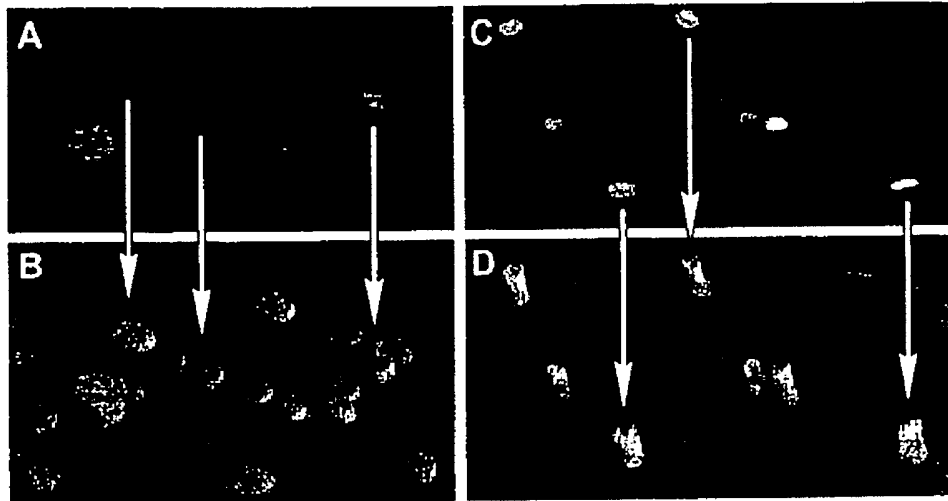
2/10



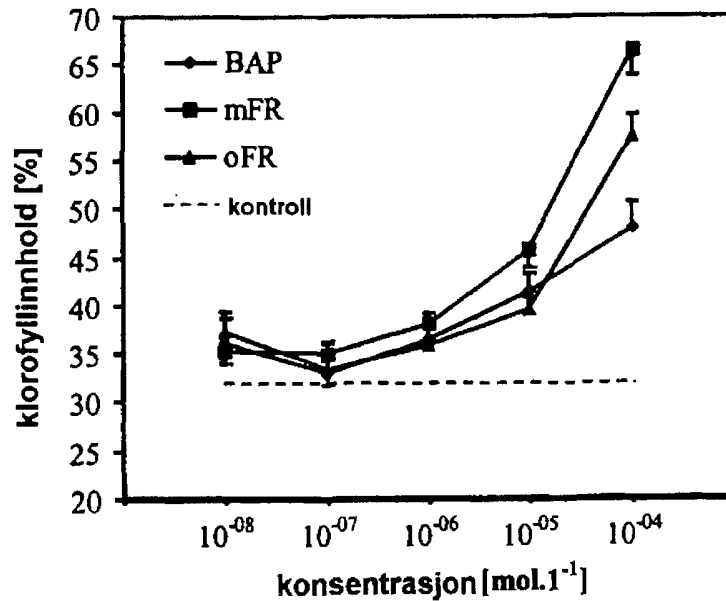
Figur 2: Senescente celler i kultur av humane fibroblaster
5 (B) (de andre celler (A)) farget blå grunnet virkningen av
 β -galaktosidase på substratet X-gal (5-brom-4-klor-3-
indolyl- β -D-galaktopyranosid) (1 mg/ml).



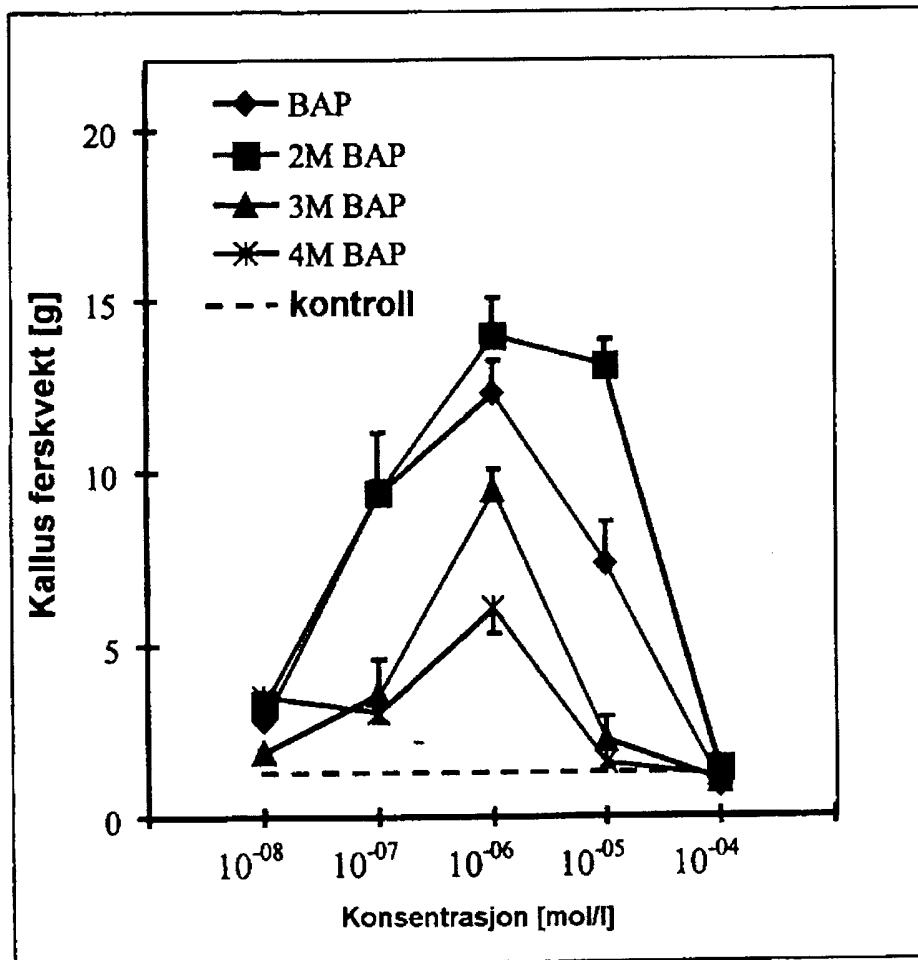
Figur 3: Indusert apoptose i tumorceller MCF-7 cellelinjer etter applikasjon av cytokinin 6-(2-hydroksy-3-metoksybenzylamino)purin. A MCF-7, apoptotiske celler: 6 h, 12, 20 μ M, B MCF-7, sekundære, nekrotiske celler (det vil si nekrose etter apoptose), 12 h, 12, 40 μ M; C MCF-7, nekrotiske celler, 24h, 12, 40 μ M. Anexin FITC V (Mol. Probes) og propidium jodidfarging: anexin - grønn, PI - rød.



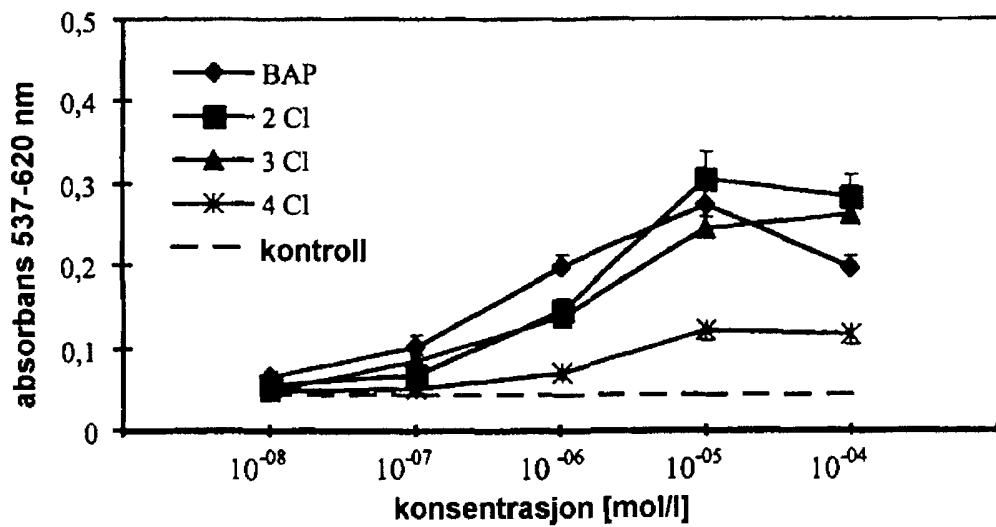
Figur 4: Apoptotisk cellepåvisning ved å bruke Annexin (grønn fluorescens) og Hoechst 33285 (blå fluorescens) farging. Analysert ved å bruke "Olympus image analysis" etter behandling av MCF-7 tumorceller med 6-(2-hydroksey-3-metoksybenzylamino)purin. A,B-kontrollceller uten behandling; C,D-apoptotiske celler (kondensasjon av kromatin); A,C-fluorescensmikroskopi; B,D-fluorescens bildeanalyse.



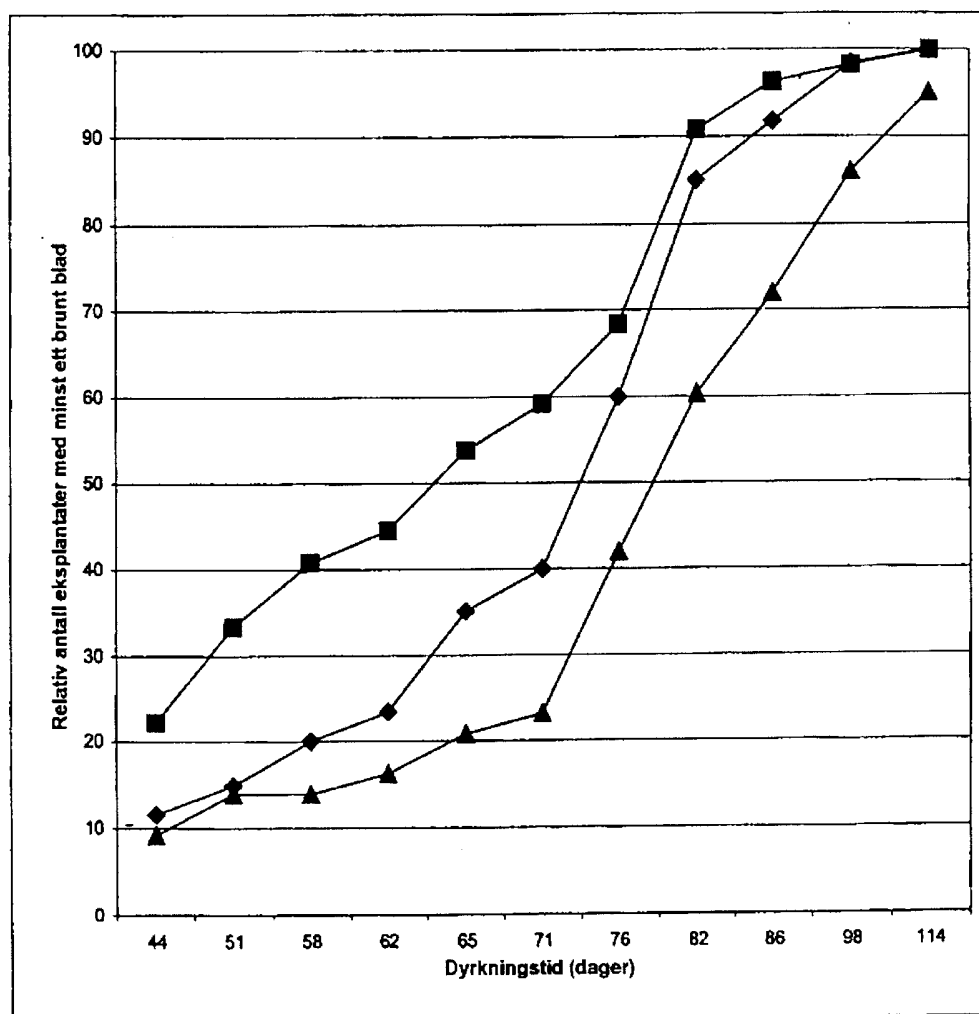
Figur 5: Effekt av undersøkte forbindelser på retensjon av klorofyll i avkuttete hvetebladtupper. Verdier uttrykkes som % av initialt klorofyllinnhold av ferske blad før inkuberingen. Feilstaver viser standardavvik av 5 gjennomsnittet for 5 replikate bestemmelser. Stiplet linje indikerer kontrollinkubering uten noe cytokinin som var $31,7 \pm 0,9$.



Figur 6: Effekt av undersøkte forbindelser på ferskvektutbytte av tobakk calluskultur. Feilstaver viser standardavvik av gjennomsnittet for 5 replikater 5 bestemmelser. Stiplet linje indikerer verdien for kontrollbehandlingen uten noe cytokinin, $2,2 \pm 0,4$ g.

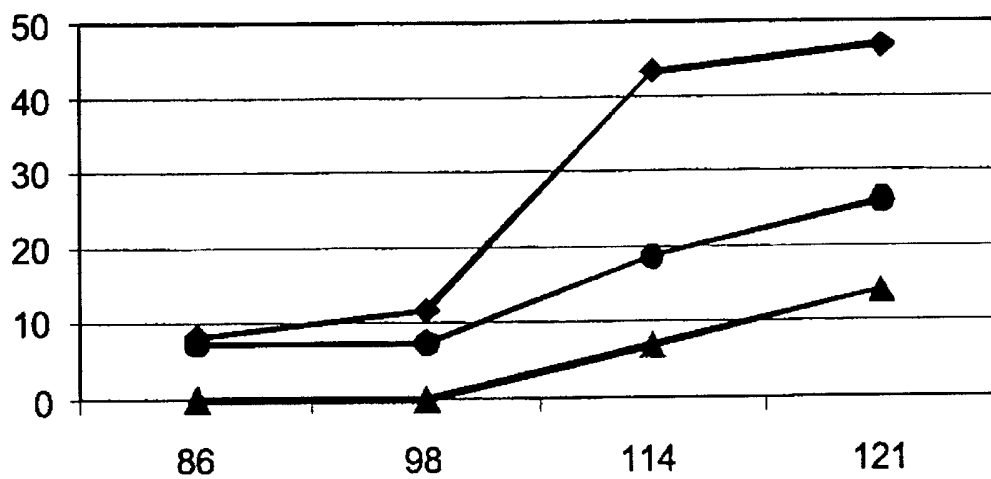


Figur 7: Effekt av undersøkte forbindelser på mørk induksjon av betacyaninsyntese i *Amaranthus caudatus* kotyledon-/hypokotyleksplantater. Feilstaver viser standardavvik av gjennomsnittet for 5 replikate bestemmelse. Stiplet linje indikerer verdiene for kontrollbehandlingen uten tilsatt cytokinin, $0,043 \pm 0,009$. Verdier representerer forskjellen i O.D.-enheter mellom absorpsjon ved 537 og 620 nm.



Figur 8: Relativt antall av eksplantater med minst ett brunt blad i funksjon av dyrkingstid

(■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP).



Figur 9: Relativt antall døde eksplantater i forhold til dyrkingstid (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAP).



Figur 10: Venstre: Dødt Rosa eksplantat på BA inneholdende medium; høyre: kraftig levedyktig rosa plante etter 121 dagers dyrking på mMeOBAP-inneholdende medium.