

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 015848

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2011.12.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/375* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

(21) Номер заявки  
200970110

(22) Дата подачи заявки  
2007.07.10

---

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ 6,9-ДИЗАМЕЩЁННОГО ПУРИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ  
ЛЕЧЕНИЯ КОЖИ

---

(31) 60/806,871; 11/774,652

(56) US-A-5602139  
US-A1-20050113340

(32) 2006.07.10; 2007.07.09

(33) US

(43) 2009.06.30

(86) PCT/US2007/073142

(87) WO 2008/008770 2008.01.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ИНСТИТУТ ОФ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БОТАНИ,  
ЭКЪДЕМИ ОФ САЙЕНСИЗ ОФ ДЗЕ  
ЧЕХ РИПАБЛИК (CZ)

(72) Изобретатель:

Зуцова Луциэ, Затлоукал Марек,  
Спихаль Лукас, Фроглих Лудек,  
Долезаль Карел, Стрнад Мирослав  
(CZ), Массино Фрэнк Дж. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение предлагает способы и композиции для противодействия отрицательным действиям старения на клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo*, в частности, клетки человеческой кожи и человеческую кожу, и лечения гиперпролиферативных и родственных кожных заболеваний у млекопитающих путем применения композиции, содержащей производные 6,9-дизамещенных пуринов.

---

015848  
B1

015848  
B1

### Родственная заявка

Настоящая заявка является повторной заявкой U.S. Patent Application No. 11/774652, выданной 9 июля 2007 г., которая испрашивает приоритет предварительной заявки U.S. Provisional Application No. 60/806871, выданной 10 июля 2006 г., содержание которой приводится в данном описании путем ссылки на нее.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение предлагает способы и композиции для противодействия негативному воздействию старения на клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo*, в частности, включая клетки кожи человека, и лечения гиперпролиферативных и родственных заболеваний кожи у млекопитающих путем введения композиций, содержащих производные 6,9-дизамещенного пурина.

### Уровень техники

Старение клеток или физиологическое старение клеток является общей отличительной чертой нормальных нетрансформированных клеток, которая обнаруживается по морфологическим изменениям, сопровождаемым возрастной потерей пролиферативного потенциала или пролиферативной способности, включая неспособность клеток отвечать на экзогенные факторы роста. Для объяснения явления клеточного старения было предложено множество теорий. Экспериментальные данные позволяют сделать предположение, что возрастная потеря пролиферативного потенциала или пролиферативной способности может зависеть от генетической программы (см., например, Smith et al., *Mech. Age. Dev.* 13, 387 (1980); и Kirkwood et al., *Theor. Biol.* 53, 481 (1975)). Эти экспериментальные данные включают исследования слияния клеток с человеческими фибробластами *in vitro* и показывают, что скрытый фенотип клеточного старения является доминантным по отношению к пролиферативному фенотипу (см., например, Pereira-Smith et al., *Somatic Cell Genet.* 8, 731 (1982); и Norwood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1, 223 (1974)) и что перед слиянием с молодыми клетками для ингибирования синтеза ДНК в молодых ядрах гетеродикариона требуется синтез белка в стареющих клетках (см., например, Burger et al., *Exp. Cell Res.* 145, 708 (1983) и Drescher-Lincoln et al., *Exp. Cell Res.* 153, 208 (1984)). Кроме того, микроинъекция стареющего фибробласта mRNA в молодые фибробласты ингибирует способность молодой клетки синтезировать ДНК (см., например, Lumpkin et al., *Science* 232, 393 (1986)) и вхождение молодой клетки в S фазу клеточного цикла (Lumpkin et al., *Exp. Cell Res.* 160, 544 (1985)). Кроме того, уникальные мРНК виды усиливаются в стареющих фибробластах *in vitro* (см., например, Wellinger et al., *J. Cell Biol.*, 34, 203 (1986); Flemming et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4099 (1988); West et al., *Exp. Cell Res.* 184, 138 (1989); и Giordano, *Exp. Cell Res.* 185, 399 (1989)). Кроме того, было выдвинуто предположение, что в стареющих фибробластах человека существует измененная генетическая программа, которая включает в себе подавление *c-fos* экспрессии на транскрипционном уровне (см., например, Seshadri et al., *Science* 247, 205 (1990)). Таким образом, очевидно, что существуют как генотипические, так и фенотипические различия между молодыми и старыми клетками.

В последние годы значительное биохимическое значение приобрели 6-замещенные аминопурины. Некоторые соединения этого типа ускоряют рост растений и принадлежат к группе регуляторов роста, называемых "цитокинами" (Letham, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 18, 349 (1967)). В биотестах, основанных на индуцировании клеточного деления в культурах растительной ткани, наиболее активным соединением, относящимся к цитокину, является природный цитокинин транс-зеатин (6-((E)-4-гидрокси-3-метилбут-2-ениламино)пурин, Letham, *Planta* 74, 228 (1967)). Цитокинины, близкородственные к зеатину, присутствуют в виде оснований в растворимой РНК (Skoog et al., *Science* 154, 1354 (1966)). В РНКs серина и тирозина дрожжей, растений и животных цитокинин сопредельен с антикодоном. Рост клеточных культур млекопитающих ингибируется определенными N<sup>6</sup>-замещенными аденозинами с цитокининной активностью (Grace et al., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 23 (1967)). Сообщалось, что в случае ствольных сегментов, обрезки листьев и созревания винограда, 6-бензиламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин (ВРА) индуцирует больший рост, чем цитокинин 6-бензиламинопурин (ВА). При биотестах тканевой культуры и некоторых овощных культур также было показано, что ВРА является более активным (Werbrouck et al., *Physiol. Plant* 98, 291 (1996)).

Кроме того, было показано, что конкретные 6-(аминозамещенные)пурины (включая кинетин и зеатин) обладают свойствами значительно замедлять старение и другими свойствами, и было обнаружено, что их можно применять для лечения клеток млекопитающих, включая кожу человека и/или клетки кожи человека. Местное применение таких композиций позволяло улучшить косметический вид кожи; такие композиции можно было бы также использовать для лечения кожи и связанных с ней заболеваниями или состояниями. Важно, что эти 6-(аминозамещенные)пурины при применяемых количествах существенно не увеличивают скорость роста и суммарную пролиферативную способность подвергавшихся лечению клеток млекопитающих. См., например, патентные документы U.S. Patents 5371089 (December 6, 1994) и 5602139 (February 11, 1997) (улучшение косметического вида кожи); U.S. Patent 5614407 (March 25, 1997) (медленные или отсроченные морфологические изменения, которые обычно сопровождают старение клеток млекопитающих в культурах); и U.S. Patents 5021422 (June 4, 1991) и 5164394 (November 17, 1992) (лечение определенных гиперпролиферативных заболеваний кожи). Содержание всех приведенных выше патентных документов приводится в данном описании путем ссылки на них. Действие 6-

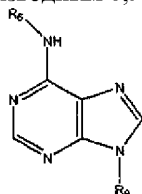
(аминозамещенных)пуринов по предотвращению старения человеческой кожи также были описано в работах Rattan and Clark (Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 665-672 (1994)) на культивированных человеческих фибробластах, где присутствие кинетина ( $N^6$ -фурфуриладенина) задерживало возникновение и понижало степень многих морфологических и биохимических характеристик, связанных с последовательным пассажем клеток. Эффективность таких 6-(аминозамещенных)пуринов при поддержании нормальной функции клетки в процессе старения клеток позволяет их применять для сохранения жизнеспособности стареющей кожи. Совсем недавно клинические исследования, проведенные в University of California, Irvine by Dr. Gerald Weinstein (Cosmetic Dermatology 15, 29-32 (2003)), показали, что препараты для местного применения при концентрациях кинетина от 0,005 до 0,10% (Kinerase®) улучшали внешний вид кожи лица, поврежденной в легкой или средней степени в результате воздействия ультрафиолетового излучения. По оценке как врача, так и пациентов, лечение в течение 12 и 24 недель давало значительное улучшение внешнего вида текстуры кожи, пятнистой гиперпигментации и тонких морщин по сравнению с исходным уровнем. Лечение также улучшало функции кожного барьера, оцениваемого по снижению потери трансэпидермальной воды.

Предотвращение, обращение вспять или замедление процесса клеточного старения на протяжении многих лет является постоянной, хотя и труднодостижимой, целью биологической науки, достижение которой имело бы ряд значительных и практических последствий. Предотвращение старения клеток человеческой кожи или других органов было бы связано с сохранением структурной и функциональной целостностью и также косметической целостностью. Если бы культивированные клетки можно было подвергать лечению, для того чтобы они сохраняли характеристики молодых клеток, можно было бы повысить образование такими клетками ценных продуктов в культуре.

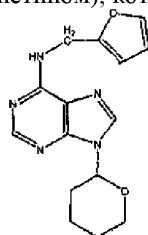
Хотя 6-(аминозамещенные)пурины, в частности, кинетин и зеатин, обладают свойствами значительно замедлять старение и другими свойствами, было бы желательно создать дополнительные соединения, регулирующие рост, дифференцирующие, или замедляющие старение. Было бы особенно желательным, если бы такие соединения обладали повышенной селективностью и эффективностью (то есть, меньшей токсичностью и/или большей эффективностью), чем используемые в настоящее время 6-(аминозамещенные)пурины. Настоящее изобретение предлагает такие улучшенные соединения, замедляющие старение.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к производным 6,9-дизамещенных пуринов общей формулы



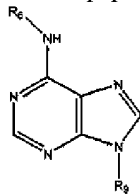
и их фармацевтически приемлемым солям, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом и метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропирином или 2-тетрагидрофуранилом. Метоксизамещенные фурфурильные группы включают, например, 3-метоксифурфурил, 4-метоксифурфурил и 5-метоксифурфурил. Метоксизамещенные фенильные группы включают, например, 2-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-метоксифенил, 2,3-диметоксифенил, 2,4-диметоксифенил, 2,5-диметоксифенил, 3,4-диметоксифенил, 3,5-диметоксифенил, 2,3,4-триметоксифенил и 2,3,5-триметоксифенил. Метоксизамещенные бензильные группы включают, например, 2-метоксибензил, 3-метоксибензил, 4-метоксибензил, 2,3-диметоксибензил, 2,4-диметоксибензил, 2,5-диметоксибензил, 3,4-диметоксибензил, 3,5-диметоксибензил, 2,3,4-триметоксибензил и 2,3,5-триметоксибензил. Предпочтительной производной 6,9-дизамещенного пурина является 6-фурфуриламито-9-(2-тетрагидропиририл)пурин (также называемый  $N^6$ -фурфурил-9-(2-тетрагидропиририл)аденином или пиранилкинетином), который имеет общую формулу



Было обнаружено, что производные 6,9-дизамещенных пуринов обладают свойствами, замедляющими старения, прогнатовоспалительными и/или иммунодепрессивными свойствами.

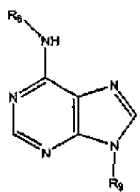
Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут применяться в качестве косметических композиций для замедления старения и одряхления, улучшения косметического вида эпидермальных клеток млекопитающего, таких как кератиноциты или фибробласты, и/или снижения

интенсивности отрицательного воздействия старения на эпидермальные клетки млекопитающего, таких как кератиноциты или фибробласты. Они особенно подходят в качестве косметических композиций для замедления старения и одряхления и/или улучшения косметического вида эпидермальных клеток и/или человеческой кожи. Поэтому настоящее изобретение предлагает способ снижения интенсивности отрицательного воздействия старения на клетки млекопитающего, включающий применение эффективного количества производной 6,9-дизамещенного пурина для клеток млекопитающего, где производная 6,9-дизамещенного пурина является соединением общей формулой



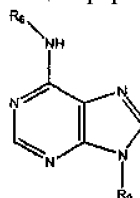
и его фармацевтически приемлемой солью, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом и метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофуранилом.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут также применяться для лечения конкретных кожных заболеваний, включая гиперпролиферативные кожные заболевания. Композиции, содержащие эти производные 6,9-дизамещенных пуринов, могут быть использованы, например, для лечения таких кожных состояний, как волчанка, аллергическая экзема, токсическая экзема, атопический дерматит, ихтиоз, папиллома, чечевицеобразный дискоидный дискератоз, себорейный кератоз, старческий кератоз, базалиома и плоскоклеточный рак, и других подобных состояний. Поэтому настоящее изобретение также предлагает способ лечения кожных заболеваний клеток млекопитающих, включающий применение эффективного количества производной 6,9-дизамещенного пурина для клеток млекопитающих, нуждающихся в таком лечении, где производная 6,9-дизамещенного пурина является соединением общей формулы



и его фармацевтически приемлемой солью, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом и метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофуранилом.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут быть также использованы для лечения связанных с воспалением состояний. Такие связанные с воспалением состояния включают, например, воспаление, повреждения (например, ускорение их заживления), боль и другие иммунологические реакции, обусловленные воспалением (например, обеспечение его облегчения), и/или лечение воспалительных кожных заболеваний (например, атопического дерматита, красного плоского лишая, гиперпигментации, повреждения в результате простого герпеса, и других подобных заболеваний). Поэтому настоящее изобретение также предлагает способ лечения воспалительных состояний в клетках млекопитающих, включающий применение эффективного количества производной 6,9-дизамещенного пурина для клеток млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, где производная 6,9-дизамещенного пурина является соединением общей формулы

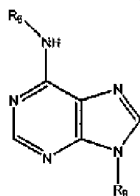


или их фармацевтически приемлемыми солями, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом и метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофуранилом.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут быть использованы в композиции в форме свободных соединений вышеприведенных формул или в форме их фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтически приемлемые соли могут быть образованы, например, со щелочными металлами, аммонием, или аминами. Производные или их соли могут быть в форме рацемической смеси или оптически активных изомеров; они могут также быть в форме солей присоединения с кислотами.

### Подробное описание

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению имеют общую формулу



где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом и метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофуранилом. Метоксизамещенные фурфурильные группы включают, например, 3-метоксифурфурил, 4-метоксифурфурил и 5-метоксифурфурил. Метоксизамещенные фенильные группы включают, например, 2-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-метоксифенил, 2,3-диметоксифенил, 2,4-диметоксифенил, 2,5-диметоксифенил, 3,4-диметоксифенил, 3,5-диметоксифенил, 2,3,4-триметоксифенил и 2,3,5-триметоксифенил. Метоксизамещенные бензильные группы включают, например, 2-метоксибензил, 3-метоксибензил, 4-метоксибензил, 2,3-диметоксибензил, 2,4-диметоксибензил, 2,5-диметоксибензил, 3,4-диметоксибензил, 3,5-диметоксибензил, 2,3,4-триметоксибензил и 2,3,5-триметоксибензил.

Предпочтительной производной 6,9-дизамещенного пурина является 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин. Было обнаружено, что эти производные 6,9-дизамещенных пуринов обладают свойством замедления старения, противовоспалительными и/или иммунодепрессивными свойствами при контакте с клетками млекопитающего, включая клетки человека.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут применяться в качестве косметических композиций для замедления старения и увядания и/или улучшения косметического вида эпидермальных клеток млекопитающего, таких как кератиноциты или фибробласты. Они особенно подходят в качестве косметических композиций для замедления старения и увядания и/или улучшения косметического вида эпидермальных клеток человека и/или кожи человека.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут быть также использованы для лечения определенных кожных заболеваний или состояний, включающих (но этим не ограничивая) гиперпролиферативные кожные заболевания. Композиции, содержащие эти производные 6,9-дизамещенных пуринов, могут быть, например, использованы для лечения волчанки, аллергической экземы, токсической экземы, атопического дерматита, ихтиоза, папилломы, чечевичеобразного дискоидного дискератоза, себорейного кератоза, старческого кератоза, базалиомы и плоскоклеточного рака, угрей, эритемы и других подобных заболеваний и состояний.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут быть также использованы для лечения воспаления, ускорения заживления повреждений, облегчения боли и других иммунологических реакций, обусловленных воспалением, и/или лечения воспалительных кожных заболеваний или состояний (например, атопического дерматита, красного плоского лишая, гиперпигментации, повреждений от простого герпеса, эритемы и других подобных заболеваний и состояний).

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут применяться в композициях, в форме свободных соединений приведенных выше формул или в форме их фармацевтически приемлемых солей; может быть использована только одна такая производная 6,9-дизамещенных пуринов или смесь таких производных 6,9-дизамещенных пуринов.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть образованы, например, со щелочными металлами, аммонием или аминами. Производные или их соли могут быть в форме рацемической смеси или оптически активных изомеров; они могут также быть в форме солей присоединения с кислотами.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению обычно содержатся в композиции носителя, подходящей для применения на представляющих интерес клетках (например, человеческой коже), и в количестве, подходящем для предполагаемого применения. Такие композиции включают, например, косметические и фармацевтические композиции. Обычно такие композиции включают приблизительно от 0,005 до 20% активного ингредиента, предпочтительно приблизительно от 0,05 до 10% и более предпочтительно - приблизительно от 0,1 до 2%. Композиции, в частности косметические и фармацевтические композиции, могут находиться в форме растворов, кремов, аэрозолей, молочных лосьонов, лосьонов, гелей, пластырей, примочек, шампуней, губных помад, мазей, паст, пен, настоек, распыляемых растворов и других подобных формах. Форма композиции конкретно не ограничивается при условии, что она подходит для ее предполагаемого использования.

Косметические и фармацевтические носители или среды, подходящие для введения предлагаемых в данном описании соединений, включают любые носители, известные специалистам в этой области, которые подходят для конкретного способа введения. Кроме того, соединения могут быть приготовлены в виде золья фармацевтически активного ингредиента в композиции, или могут быть объединены с другими активными ингредиентами. Активное соединение содержится в носителе в количестве, достаточном для

достижения терапевтически и/или косметически полезного эффекта при отсутствии серьезных токсических действий на человека, подвергаемого лечению. Эффективная концентрация может быть определена эмпирическим путем в результате испытания соединений с использованием *in vitro* и *in vivo* систем, включающих тканевую культуру и безволосых мышей или других подходящих экспериментальных модельных животных. Терапевтически и/или косметически полезные воздействия включают, но этим не ограничивая, отсрочку, замедление, предотвращение, обращение вспять, снижение и/или же модификацию путем лечения болезненного состояния или неблагоприятных косметических воздействий, связанных со старением клеток млекопитающего, в частности клеток человека, и еще более конкретно - клеток человеческой кожи. Такие косметические воздействия могут включать, например, улучшение внешнего вида кожи человека, уже поврежденной в результате старения или воздействия солнца/ветра, в первую очередь предотвращение (или замедление) возникновения такого повреждения в неповрежденной коже, и/или предотвращение (или замедление) возникновения дополнительного такого повреждения в уже поврежденной коже. Такие терапевтические воздействия могут включать, например, улучшение состояния человеческой кожи, уже поврежденной в результате болезненного состояния, в первую очередь предотвращение (или замедление) возникновения такого болезненного состояния, и/или предотвращение (или замедление) повторного возникновения дополнительных таких болезненных состояний.

Концентрация активного соединения в композиции зависит от абсорбции, инактивирования, скоростей выведения активного соединения, схемы применения и вводимого количества, а также других факторов, известных специалистам в этой области. Обычно терапевтически и/или косметически эффективная доза должна создать концентрацию по меньшей мере около 0,005%, предпочтительно - по меньшей мере около 0,05, и более предпочтительно - по меньшей мере около 0,1% активного соединения в подвергаемой лечению ткани. Активный ингредиент может быть введен за один раз или может быть разделен на ряд меньших доз, которые вводят через определенные интервалы времени. Очевидно, что точная доза и длительность лечения зависят от природы подвергаемой лечению ткани, и они могут быть определены эмпирически с помощью известных протоколов испытаний, или путем экстраполяции данных, полученных при испытаниях *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, что величины концентраций и доз могут также изменяться в зависимости от возраста подвергаемого лечению человека. Кроме того, очевидно, что для любого конкретного пациента конкретные схемы приема лекарственного средства должны быть скорректированы во времени в соответствии с индивидуальной необходимостью и профессиональным заключением лица, вводящего или контролирующего введение композиций, и что установленные в данном описании интервалы концентраций являются только примерными и ни в коей мере не ограничивают объем и осуществление заявленных композиций.

Для лечения кожи соединения могут быть приготовлены в виде косметических или фармацевтических композиций для местного или топического применения на коже, в которых производные 6,9-дизамещенных пуринов смешивают с фармацевтически или косметически приемлемым носителем. Композиции могут быть получены в виде гелей, кремов, лосьонов, твердых форм, растворов, суспензий, аэрозолей и в других подобных формах. Композиции для лечения человеческой кожи готовят для местного применения с производной 6,9-дизамещенного пурина в эффективном концентрационном интервале приблизительно от 0,005 до 20 процентов, предпочтительно - приблизительно от 0,05 до 10% и более предпочтительно - приблизительно от 0,1 до 2% в известных в технике креме, мазе, лосьоне, геле, растворе, твердой основе и среде, которые являются нетоксичными и дерматологически приемлемыми. Для того чтобы отрицательные воздействия старения были уменьшены, обращены вспять или отсрочены, концентрация или массовая доля производной 6,9-дизамещенного пурина, растворенной, суспендированной, диспергированной или же смешанной в композиции для использования с человеческой кожей, должна быть такой, чтобы производная 6,9-дизамещенного пурина достигала эффективной концентрации в активных клетках кожи (например, фибробластах) по меньшей мере обычно около 0,005%, предпочтительно по меньшей мере около 0,05% и предпочтительно по меньшей мере около 0,1%. Верхний предел должен быть скорректирован так, чтобы практически не повышались скорость деления клеток или суммарный пролиферативный потенциал клеток, в частности так, чтобы подвергнутые лечению клетки или ткани не проявляли каких-либо признаков типичных злокачественных или предраковых изменений или каких-либо других косметически нежелательных изменений, таких как образование повреждений. Хотя верхний предел может достигать приблизительно 20%, предпочтительными являются обычно более низкие значения верхнего предела (такие как 10, 2%, или даже 1%), так как в этом случае действия, предотвращающие старение кожи, характеризуются более низкими скоростями, и риск нежелательного увеличения скорости клеточного деления или суммарного пролиферативного потенциала клеток является минимальным. Обычно, более предпочтительными являются смягчающие или обладающие смазывающим свойством среды, которые способствуют гидратации кожи, по сравнению с легко испаряющимися средами, такими как этанол, которые сушат кожу.

Примерами подходящих основ или сред для приготовления композиций для применения на человеческой коже являются вазелин, вазелин с летучими силиконами, ланолин, кольдкрем (USP) и мазь-эмульсия (USP). Могут быть получены композиции, содержащие эффективное количество одной или более производных 6,9-дизамещенных пуринов, приготовленные для местного применения, такие как

эмульгированные, суспендированные или же иначе смешанные с подходящей мазевой или кремовой основой.

Выбор приемлемой среды определяется, в основном, способом введения производной 6,9-дизамещенного пурина. Такие способы включают местное применение. Подходящие фармацевтически и дерматологически приемлемые среды для местного применения включают те, которые подходят для применения в лосьонах, кремах, растворах, суспензиях, гелях, твердых веществах и других подобных средах. Обычно средой является или органическая по природе, или водная эмульсия, которая способна диспергировать, суспендировать или растворять производную 6,9-дизамещенного пурина. Среда может включать, например, фармацевтически приемлемые смягчители, усилители всасывания через кожу, защитные средства от УФ-излучения, антиоксиданты, буферы, окрашивающие добавки, отдушки, эмульгаторы, наполнители, загустители, растворители и другие подобные компоненты.

Более подробный список и описание таких форм (который не претендует на то, чтобы быть исчерпывающим) приведен ниже.

(1) Лосьоны.

Лосьоны содержат эффективную концентрацию одной или более производных 6,9-дизамещенных пуринов. Предпочтительно, чтобы эффективная концентрация была эффективной для создания концентрации производных 6,9-дизамещенных пуринов приблизительно от 0,05 до 10% в активных клетках кожи, в частности в фибробластах дермы. Лосьоны могут также содержать приблизительно от 1 до 50%, предпочтительно - приблизительно от 3 до 15%, умягчителя, и в качестве остальных компонентов - воду, подходящий буфер, C<sub>2</sub> или C<sub>3</sub> спирт, или смесь воды или буфера и спирта. Могут быть использованы любые умягчители, известные специалистам в этой области в качестве подходящих для применения на человеческой коже.

Они включают, но этим не ограничивая, следующие умягчители:

(a) Углеводородные масла и воски, включающие (но этим не ограничивая) минеральное масло, вазелин, парафин, церезин, озокерит, микрокристаллический воск, полиэтилен и пергидросквален.

(b) Силиконовые масла, включающие (но этим не ограничивая) диметилполисилоксаны, метилфенилполисилоксаны, водорастворимые и спирторастворимые сополимеры силикона и гликоля.

(c) Триглицеридные жиры и масла, включающие те, которые получают из растительных, животных и морских источников. Примеры включают (но этим не ограничивая) касторовое масло, сафлоровое масло, хлопковое масло, кукурузное масло, оливковое масло, рыбий жир, миндальное масло, масло авокадо, пальмовое масло, сезамовое масло и соевое масло.

(d) Ацетоглицеридные эфиры, включающие (но этим не ограничивая) ацетилированные моноглицериды.

(e) Этоксиглицериды, включающие (но этим не ограничивая) такие, как этоксиглицеридный глицерилмоностеарат.

(f) Алкиловые эфиры жирных кислот, имеющих от 10 до 20 углеродных атомов. Здесь подходят метиловые, изопропиловые и бутиловые эфиры жирных кислот. Примеры включают (но этим не ограничивая) гексиллаурат, изогексиллаурат, изогексилпальмират, изопропилпальмират, изопропилмирилат, децилолеат, изодецилолеат, гексадецилстеарат, децилстеарат, изопропилстеарат, динизопропиладипат, дигексидециладипат, диизопропилсебагинат, лауриллактат, миристиллактат и цетиллактат.

(g) Алкениловые эфиры жирных кислот, имеющих от 10 до 20 углеродных атомов. Их примеры включают (но этим не ограничивая) олеилмирилат, олеилстеарат и олеилолеат.

(h) Жирные кислоты, имеющие от 9 до 22 углеродных атомов. Подходящие примеры включают (но этим не ограничивая) пеларгоновую, лауриновую, миристиновую, пальмитиновую, стеариновую, изостеариновую, гидроксистеариновую, олеиновую, линолевую, рицинолевою, арахидоновую, бегеновую и эруковую кислоты.

(i) Жирные спирты, имеющие от 10 до 22 углеродных атомов, включающие (но этим не ограничивая) лауриловый, миристиловый, цетиловый, гексадециловый, стеариловый, изостеариловый, гидроксистеариловый, олеиловый, рицинолеиловый, бегениловый, эруциловый и 2-октилдодециловый спирты.

(j) Эфиры жирных спиртов, включающие (но этим не ограничивая) этоксиглицеридные жирные спирты, содержащие от 10 до 20 углеродных атомов, такие как (но этим не ограничивая) лауриловый, цетиловый, стеариловый, изостеариловый, олеиловый и холестерилловый спирты, имеющие присоединенные к ним от 1 до 50 этиленоксидных групп или от 1 до 50 пропиленоксидных групп или их смесей.

(k) Простые эфиры - сложные эфиры, включающие (но этим не ограничивая) эфиры жирной кислоты и этоксиглицеридных жирных спиртов.

(1) Ланолин и его производные, включающие (но этим не ограничивая) ланолин, ланолиновое масло, ланолиновый воск, ланолиновые спирты, ланолиновые жирные кислоты, изопропиллаурилат, этоксиглицеридный ланолин, этоксиглицеридные ланолиновые спирты, этоксиглицеридный холестерин, пропоксиглицеридные ланолиновые спирты, ацетилированный ланолин, ацетилированные ланолиновые спирты, линолеаты ланолиновых спиртов, рицинолеаты ланолиновых спиртов, рицинолеаты ацетатов ланолиновых спиртов, ацетаты эфиров этоксиглицеридных спиртов, продукты гидрогенолиза ланолина, этоксиглицеридные

рованный гидрированный ланолин, этоксилированные производные сорбита и ланолина и жидкие и полутвердые ланолиновые абсорбирующие основы.

(m) Производные многоатомных спиртов и полиэфиров, включающие (но этим не ограничивая) пропиленгликоль, дипропиленгликоль, полипропиленгликоль (молекулярная масса 2000-4000), полиоксипропилен-полиоксипропиленгликоли, полиоксипропилен-полиоксипропиленгликоли, глицерин, этоксилированный глицерин, пропоксилированный глицерин, сорбит, этоксилированный сорбит, гидроксипропилсорбит, полиэтиленгликоль (молекулярная масса 200-6000), метоксиполиэтиленгликоли 350, 550, 750, 2000, 5000, гомополимеры полиэтиленоксида (молекулярная масса 100000-5000000), полиалкиленгликоли и их производные, гексиленгликоль (2-метил-2,4-пентандиол), 1,3-бутиленгликоль, 1,2,6-гексантириол, этогексадиол USP (2-этил-1,3-гександиол), C<sub>15</sub>-C<sub>18</sub> вицинальный гликоль и полиоксипропиленовые производные триметилпропана.

(n) Эфиры многоатомных спиртов, включающие (но этим не ограничивая) моно- и диэфиры этиленгликоля с жирными кислотами, моно- и диэфиры диэтиленгликоля с жирными кислотами, полиэтиленгликоль (молекулярная масса 200-6000), моно- и диэфиры жирных кислот, моно- и диэфиры пропиленгликоля с жирными кислотами, моноолеат полипропиленгликоля 2000, моностеарат полипропиленгликоля 2000, моностеарат этоксилированного пропиленгликоля, моно- и диглицериды эфиры жирных кислот, эфиры полиглицеринов с полижирными кислотами, моностеарат этоксилированного глицерина, моностеарат 1,3-бутиленгликоля, дистеарат 1,3-бутиленгликоля, эфиры полиоксипропиленполиолов с жирными кислотами, эфиры сорбитана с жирной кислотой и эфиры полиоксипропиленсорбитана с жирной кислотой.

(o) Эфиры восков, включающие (но этим не ограничивая) пчелиный воск, спермацет, миристилмиристан и стеарилстеарат, и производные пчелиного воска, включающие, но этим не ограничивая, эфиры пчелиного воска и полиоксипропиленсорбита, которые являются продуктами реакции пчелиного воска с этоксилированным сорбитом, содержащим различные количества оксида этилена, которые образуют смесь простые эфиры - сложные эфиры.

(p) Растительные воски, включающие (но этим не ограничивая) воск камаубы и канделильский воск.

(q) Фосфолипиды, включающие (но этим не ограничивая) лецитин и его производные.

(r) Стероиды, включающие (но этим не ограничивая) холестерин и эфиры холестерина и жирных кислот.

(s) Амиды, включающие (но этим не ограничивая) амиды жирных кислот, амиды этоксилированных жирных кислот и алканоламиды твердых жирных кислот.

Лосьоны могут также содержать приблизительно от 1 до 10%, более предпочтительно - приблизительно от 2 до 5% эмульгатора. Эмульгаторы могут быть неионными, анионными или катионными. Примеры подходящих неионных эмульгаторов включают (но этим не ограничивая) жирные спирты, имеющие от 10 до 20 углеродных атомов, жирные спирты, имеющие от 10 до 20 углеродных атомов, конденсированные с от 2 до 20 молями оксида этилена или оксида пропилена, алкилфенолы, имеющие от 6 до 12 углеродных атомов в алкильной цепи, конденсированные с от 2 до 20 молями оксида этилена, моно- и диэфиры оксида этилена с жирными кислотами, моно- и диэфиры этиленгликоля с жирными кислотами, в которых фрагмент жирной кислоты содержит от 10 до 20 углеродных атомов, диэтиленгликоль, полиэтиленгликоли с молекулярной массой от 200 до 6000, пропиленгликоли с молекулярной массой от 200 до 3000, глицерин, сорбит, сорбитан, полиоксипропиленсорбит, полиоксипропиленсорбитан и гидрофильные эфиры воска. Подходящие анионные эмульгаторы включают (но этим не ограничивая) мыла жирных кислот, например натриевые, калиевые и триэтаноламинные мыла, в которых фрагмент жирной кислоты содержит от 10 до 20 углеродных атомов. Другие подходящие анионные эмульгаторы включают (но этим не ограничивая) алкилсульфаты щелочного металла, аммония или замещенного аммония, алкиларилсульфонаты и сульфаты алкилэтоксиэфиров, имеющие от 10 до 30 углеродных атомов в алкильном фрагменте. Сульфаты алкилэтоксиэфиров содержат от 1 до 50 фрагментов оксида этилена. Подходящими катионными эмульгаторами являются соединения четвертичного аммония, морфолина и пиридина. Конкретные смягчители, описанные в предыдущих параграфах, также обладают эмульгирующими свойствами. При приготовлении лосьона, содержащего такой смягчитель, дополнительный эмульгатор не требуется, хотя он может быть и включен в композицию.

Остальной частью лосьона обычно является вода или C<sub>2</sub> или C<sub>3</sub> спирт, или смесь воды и спирта. Лосьоны могут быть приготовлены простым смешением всех компонентов вместе. Предпочтительно, чтобы производную 6,9-дизамещенного пурина растворяли, суспендировали или же равномерно диспергировали в смеси.

Могут быть включены другие традиционные компоненты таких лосьонов. Одной из таких добавок является загуститель при концентрации приблизительно от 1 до 10 мас.% композиции. Примеры подходящих загустителей включают, но этим не ограничивая, сшитые карбоксиполиметиленовые полимеры, этилцеллюлозу, полиэтиленгликоли, трагакантовую камедь, смолу khaqaya, ксантановые камеди и бентонит, гидроксипропиленцеллюлозу и гидроксипропиленцеллюлозу.

Один предпочтительный пример композиции, подходящей для применения на коже лица человека в



качестве лосьона, содержит приблизительно от 0,5 до 10% производной 6,9-дизамещенного пурина по настоящему изобретению (предпочтительно пиранилкинетина) в основе, приготовленной смешением 10 частей моностеарата глицерина, 10 частей цетилового спирта, 30 частей спермацета, 10 частей Твина 20 (полиоксиалкиленовой производной моностеарата сорбитана), 10 частей Span 20 (монолаурата сорбитана), 12,5 частей глицерина и 100 частей воды.

(2) Кремы.

Кремы готовят так, чтобы они содержали эффективную концентрацию одной или более производных 6,9-дизамещенных пуринов. Эффективной концентрацией обычно является количество, эффективное для создания в подвергаемой лечению ткани концентрации производных 6,9-дизамещенных пуринов приблизительно от 0,5 до 10% в активных клетках кожи, в частности в фибробластах дермы. Кремы также содержат приблизительно от 5 до 50%, предпочтительно приблизительно от 10 до 25% умягчителя, и остальными компонентами являются вода или другой подходящий нетоксичный носитель, такой как изотонический буфер. В композициях кремов могут быть также использованы умягчители, описанные выше для лосьонов. Крем может также содержать подходящий описанный выше эмульгатор. Эмульгатор вводят в композицию в концентрации приблизительно от 3 до 50%, предпочтительно приблизительно от 5 до 20%.

(3) Растворы и суспензии.

Растворы готовят так, чтобы они содержали эффективное количество одной или более производных 6,9-дизамещенных пуринов, которое обычно является количеством, эффективным для создания концентрации производных 6,9-дизамещенных пуринов приблизительно от 0,5 до 10% в активных клетках кожи, в частности в фибробластах дермы; остальными компонентами являются вода, подходящий органический растворитель или другой подходящий растворитель или буфер. Подходящими органическими материалами, используемыми в качестве растворителя или части смеси растворителей, являются следующие: пропиленгликоль, полиэтиленгликоль (молекулярная масса 200-600), полипропиленгликоль (молекулярная масса 425-2025), глицерин, эфиры сорбита, 1,2,6-гексанэтриол, этанол, изопропанол, диэтилтарtrat, бутандиол и их смеси. Такие смеси растворителей могут также содержать воду.

Эти композиции, которые готовят в виде растворов или суспензий, могут быть применены на коже или могут быть приготовлены в виде аэрозоля и применены на коже путем распыления. Аэрозольные композиции дополнительно содержат приблизительно от 25 до 80%, предпочтительно приблизительно от 30 до 50% подходящего пропеллента. Примерами таких пропеллентов являются хлорированные, фторированные и хлорфторированные низкомолекулярные углеводороды. В качестве газов-пропеллентов также используют закись азота, диоксид углерода, бутан, и пропан. В технике известно, что эти пропелленты используют в количестве и под давлением, достаточным для выброса содержимого контейнера.

(4) Гели.

Гелевые композиции могут быть приготовлены простым смешением подходящего загустителя с ранее описанными композициями в виде растворов или суспензий. Примеры подходящих загустителей уже были ранее описаны в отношении лосьонов.

Гелевые композиции содержат эффективное количество одной или более производных 6,9-дизамещенных пуринов, которое обычно является количеством, эффективным для создания концентрации производных 6,9-дизамещенных пуринов приблизительно от 0,05 до 10% в активных клетках кожи, в частности в фибробластах дермы; приблизительно от 5 до 75%, предпочтительно приблизительно от 10 до 50% описанного ранее органического растворителя; приблизительно от 0,5 до 20%, предпочтительно приблизительно от 1 до 10% загустителя; при этом остальной частью является вода или другой водный носитель.

(5) Твердые формы.

Композиции твердых форм могут быть приготовлены в виде композиций типа карандаша, предназначенного для применения на губах или других частях тела. Такие композиции содержат эффективное количество одной или более производных 6,9-дизамещенных пуринов. Количество обычно является таким, которое эффективно для создания концентрации производных 6,9-дизамещенных пуринов приблизительно от 0,05 до 10% в активных клетках кожи, в частности в фибробластах дермы. Твердые формы также содержат приблизительно от 50 до 98%, предпочтительно приблизительно от 60 до 90%, ранее описанных умягчителей. Эта композиция может дополнительно содержать приблизительно от 1 до 20%, предпочтительно от 5 до 15% подходящего загустителя и, если желательно или необходимо, эмульгаторы и воду или буферы. В композиции для твердой формы удобно использовать ранее описанные для лосьонов загустители.

В любом из этих типов композиций для местного или другого применения могут быть также использованы другие ингредиенты применяемых на коже композиций, такие как консерванты, включающие метилпарабен или этилпарабен, отдушки, красители или другие подобные ингредиенты, которые известны в технике для обеспечения требуемой стабильности, запаха или цвета, или других желательных свойств, таких как защита от актинического излучения солнца.

Кроме производных 6,9-дизамещенных пуринов композиция может также включать другие активные ингредиенты, уменьшающие отрицательное воздействие старения, такие как ретиноиды, кинетин,

и/или зеатин, но она не должна включать ингредиенты, которые потенцируют или индуцируют клеточное деление, такие как ауксин. Предпочтительные композиции включают в качестве компонента, только уменьшающего отрицательное воздействие старения, одну или более производных 6,9-дизамещенных пуринов.

Композиции для применения на человеческой коже могут быть применены на участках кожи, для которых необходимо лечение, предпочтительно один раз в день или более часто, если это необходимо для достижения желательного результата. Известно, что точная схема лечения зависит от подвергаемого лечению человека и может быть установлена эмпирическим путем в зависимости от лекарственной формы и, в частности, от возраста подвергаемого лечению человека. Приемлемой является любая схема, при условии, что требуемые эффекты уменьшения отрицательного воздействия старения достигаются без существенных вредных или устойчивых нежелательных побочных эффектов.

Способы лечения кожи человека осуществляются путем нанесения на кожу, предпочтительно ежедневно, обсужденной выше композиции изобретения, подходящей для лечения человеческой кожи, в течение неопределенного периода времени, обычно до тех пор, пока пациент желает уменьшить интенсивность отрицательного воздействия старения на кожу. Для того чтобы лечебное воздействие композиции на поверхность кожи (например, отсрочка возрастных морфологических изменений в фибробластах слоя базальных клеток кожи) стало очевидным, необходимо наносить на кожу композицию раз в день, по меньшей мере, в течение месяца, и, по меньшей мере, приблизительно вплоть до одного года, в зависимости от возраста человека, состояния кожи, на которую наносят композицию, и концентрации производной 6,9-дизамещенного пурина в композиции. Если применение производной 6,9-дизамещенного пурина прекращается, то после некоторого периода времени может опять проявляться отрицательное воздействие старения на кожу, которое было уменьшено в результате применения способа настоящего изобретения.

Для фибробластов (или других активных клеток, таких как кератиноциты) кожи человека способ осуществляют путем нанесения на наружную поверхность кожи композиции, которую готовят в виде физиологически приемлемого крема, мази, лосьона, геля, раствора, парфюмерного изделия, твердой формы или другой подходящей формы для нанесения на наружную поверхность кожи, содержащей одну или более производных 6,9-дизамещенных пуринов при концентрации, эффективной для создания в дерме кожи эффективной концентрации для уменьшения интенсивности отрицательных воздействий старения на активные клетки (например, фибробласты) в дерме, в результате чего подвергаемая лечению кожа стареет более медленно, чем кожа, неподвергнутая лечению, и/или становится более молодой на вид, чем перед лечением, что обнаруживается по уменьшению морщин и/или отвислостей, или другим косметическим индикаторам возраста человека. Такие концентрации обычно составляют приблизительно от 0,05 до 10% (предпочтительно - приблизительно от 0,1 до 2%). Точная концентрация, которая может быть определена эмпирическим путем, зависит от носителя или средства доставки, и формы, в которой композицию наносят на поверхность кожи.

Изобретение также относится к способам лечения клеточного старения и упомянутых выше болезненных состояний, а также уменьшения интенсивности отрицательных воздействий старения на клетки млекопитающего, в частности клетки человека (и более конкретно - клетки человеческой кожи). Одно или более производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению могут быть введены профилактически или терапевтически в форме описанной выше композиции и в описанных выше эффективных количествах.

Используемый в данном описании термин "уменьшение интенсивности отрицательных воздействий старения на клетки млекопитающего" означает, что развитие морфологических изменений, которые нормально происходят при старении в нормальных клетках млекопитающего *in vitro* или *in vivo* замедляется, обращается вспять и/или отсрочивается.

Отрицательные воздействия старения также включают возрастные изменения экспрессии генов и биосинтеза белков. Упомянутый в данном описании лечебный эффект достигается без существенного увеличения скорости роста или суммарного пролиферативного потенциала подвергаемых лечению клеток.

Уменьшение интенсивности отрицательных воздействий старения на клетки, включающее воздействие на клетки *in vitro* и/или *in vivo*, может быть выявлено в виде отсрочки или обращения вспять начала возрастных морфологических и фенотипических изменений, которые обычно происходят при старении клеток. Эти изменения включают изменения, выявляемые в тканевых культурах клеток, такие как неспособность старых клеток реагировать на экзогенные факторы роста и/или высокий уровень аутофлуоресценции, обнаруживаемый в старых клетках. По мере старения клеток они проявляют возрастную потерю пролиферативного потенциала. Культивированные старые фибробласты характеризуются многими возрастными характеристиками, включающими плоскую и иррегулярную морфологию, чрезмерно большой размер, редкий рост, низкий выход клеток с единицы поверхности питательной среды культуры, значительную частоту многоядерных клеток, трудность трипсинизации, неспособность роста для конfluence, и/или высокую скорость продуцирования дебриса в культуральной среде.

Молодые клетки проявляют более высокую ответную реакцию к факторам роста и более высокие

скорости синтеза ДНК и белка, чем старые клетки. Молодые фибробласты млекопитающего, включая человека, появляются в тканевой культуре здоровыми и чистыми; обладают регулярной, удлиненной, тонкой веретенообразной морфологией; плотно упакованы в массивы при слиянии на культивируемом субстрате; не прорастают друг в друга; редко имеют больше чем одно ядро; и продуцируют мало дебриса в культуральной среде. Возрастные изменения *in vivo* включают изменения в тканях млекопитающего, такие как развитие, или увеличение числа или глубины морщин, складок, отвислой кожи, изменение цвета, пятнистость, уплотнения и/или желтоватый внешний вид, связанный с косметическим видом кожи, а также связанные изменения в структурной и функциональной целостности ткани. Композиции по настоящему изобретению являются эффективными для улучшения общего внешнего вида и состояния кожи, включая возрастные изменения и изменения, которые могут не быть тесно связаны со старением (например, угри, эритема, покраснение и другие подобные проявления). Для целей по настоящему изобретению предполагается, что такие изменения, которые могут не быть тесно связаны со старением или могут даже не зависеть от старения, включаются в возрастные изменения.

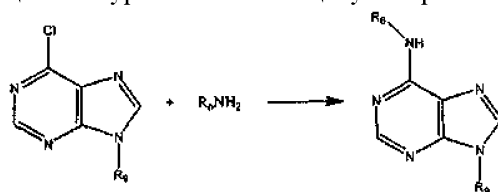
Способы по настоящему изобретению могут применяться в комбинации с другими терапевтическими или косметическими способами (в частности, способами, связанными с лечением кожи человека). Поэтому настоящие способы могут быть применены в комбинации, например, с лазерным лечением или лечением или устройствами на основе других излучений.

Используемый в данном описании термин "суммарный пролиферативный потенциал нормальных клеток, таких как фибробласты" является мерой конечного пролиферативного потенциала клеток и означает суммарное число дубликаций количества клеток, которым культура таких клеток может подвергаться до того, как рост культуры прекращается, и он зависит от возраста донора, от которого были получены клетки. Клетки, полученные из ткани плода, проявляют больший пролиферативный потенциал в культуре, чем клетки, полученные из ткани взрослого человека.

Используемый в данном описании термин "скорость роста или скорость пролиферации" является мерой скорости, при которой делятся клетки. Одной единицей меры, признаваемой специалистами в этой области, является обратная величина времени удвоения. В конце время жизни культуры нормальных клеток, прекращение роста культуры проявляется очень быстро, понижаясь от почти нормальных значений характеристик молодых клеток до нуля в только нескольких удвоениях.

Используемый в данном описании термин "существенно изменяющий скорость роста или суммарный пролиферативный потенциал" означает изменение выше того значения скорости деления клеток или числа удвоений, которое лежит внутри нормальной вариации для клеток и тканей. В частности, если скорость роста или суммарный пролиферативный потенциал не изменяется, то подвергнутые лечению клетки являются бессмертными или подвергаются злокачественному перерождению. В случае подвергнутых *in vivo* лечению клеток подвергнутая лечению ткань существенно не меняет размер, толщину или в ней не происходит развитие предопухолевых или злокачественных клеток. Специалистам в этой области известны способы оценки скорости роста и суммарного пролиферативного потенциала. Для оценки изменения скорости роста или суммарного пролиферативного потенциала может быть использован любой такой способ, включающий те, которые приведены в данном описании в качестве примеров.

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению



обычно могут быть получены из соответствующих 6-хлор-9-замещенных пуринов путем взаимодействия с соответствующим амином.

6-Хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурин, который может быть использован для получения предпочтительных производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению, может быть синтезирован из 6-хлорпурина и 3,4-дигидропирана, используя *p*-толуолсульфоновую кислоту, в соответствии с публикацией (Robins et al., J. Am. Chem. Soc. 83, 2574 (1961)). Исходные незамещенные или метоксизамещенные бензиламины, фениламины и фулфуриламины, отсутствующие в продаже (или же получаемые через фирмы Sigma Aldrich или Fluorochem), могут быть получены из соответствующих альдегидов в присутствии подходящего металлического катализатора. 6-Хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурин может быть синтезирован из 6-хлорпурина и 3,4-дигидрофурана с использованием *p*-толуолсульфоновой кислоты.

Следующие примеры приводятся только в качестве иллюстраций, и их не следует рассматривать в качестве ограничения объема изобретения. Если не указано иначе, все концентрации, отношения и другие подобные показатели рассчитаны по массе. Содержание всех цитируемых публикаций приводится в данном описании путем ссылки на них.

## Пример 1.

Этот пример иллюстрирует получение 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Смесь 6-хлорпурина (60 г, 388 ммоль) и моногидрата п-толуолсульфоновой кислоты (1 г) в этилацетате (750 мл) интенсивно перемешивали при 50°C. Добавляли по каплям 3,4-дигидропирин (40 мл, 438 ммоль) в течение 30 мин, поддерживая температуру реакции в интервале 55-60°C (Robins et al., 1961). Раствор перемешивали еще в течение часа, давая за это время возможность раствору охладиться до комнатной температуры. Добавляли концентрированный водный раствор аммиака (35 мл) и раствор перемешивали в течение 5 мин. Гомогенный темно-зеленый раствор затем экстрагировали водой 2×200 мл. Желтый этилацетатный экстракт сушили в течение ночи над сульфатом натрия и затем охлаждали при -20°C. Образовавшееся желтое твердое вещество сушили опять под вакуумом над пентаоксидом фосфора при 37°C. Выход: 66,9 г (72,2%). MS (ES):  $[M+H]^+ = 239$  (100).

## Пример 2.

Пример также иллюстрирует получение 6-хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. Смесь 6-хлорпурина (50 г, 323 ммоль) и п-толуолсульфоновой кислоты (2,5 г, 14,5 ммоль) в этилацетате (200 мл) интенсивно перемешивали при комнатной температуре. Добавляли по каплям 2, 3-дигидрофуран (37,5 г, 535 ммоль) в течение 30 мин. Раствор перемешивали еще один час, в течение которого 6-хлорпурин полностью растворялся (Lewis et al., J. Org. Chem.; 26; 1961; 3837). Затем добавляли водный аммиак (150 мл), смешанный с водой в мольном отношении 1:1. Гомогенный темно-желтый раствор затем экстрагировали водой 2×100 мл. Желтый этилацетатный экстракт сушили в течение ночи над сульфатом натрия. Затем раствор фильтровали и испаряли. После испарения под вакуумом неочищенное желтое масло сушили под вакуумом над пентаоксидом фосфора при 37°C. Перекристаллизовывали из пертолейного эфира желтый неочищенный продукт.

Выход: 80%, желтое твердое вещество. Температура плавления: 92-95°C.

ТЖХ (толуол:этилацетат, 1:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >97%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,05 sep (1H, J = 6,8 Гц); 2,22 sep (1H, J=6,8 Гц); 2,48 м (2H); 3,95 кв (1H, J = 7,4 Гц); 4,20 кв.кв. (1H, J<sub>a</sub> = 7,4 Гц, J<sub>b</sub> = 1,9 Гц); 6,40 м (1H); 8,78 с (1H); 8,80 с (1H). MS (ES):  $[M+H]^+ = 225$  (100).

## Пример 3.

Этот пример иллюстрирует получение 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. К фурфуриламину (100 г, 91 мл, 1030 ммоль) добавляли 30,3 г 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (126,9 ммоль). Твердое вещество растворялось полностью при активном перемешивании. Гомогенный раствор нагревали при 90°C в течение 60 мин и затем охлаждали при комнатной температуре. Бесцветный, кристаллический гидрохлорид фурфуриламина мгновенно осаждался, и его отфильтровывали. Оставшийся фильтрат испаряли под вакуумом. К желтому маслу добавляли изооктан (600 мл), интенсивно встряхивали и давали возможность постоять при комнатной температуре. Продукт медленно кристаллизовался приблизительно в течение 1 ч. Белый твердый осадок отфильтровывали, промывали этиловым эфиром (50 мл) и сушили воздухом в течение ночи для удаления растворителя. Неочищенный продукт перекристаллизовывали в метаноле. Выход: 24,4 г (81,52 ммоль, 64,2%). Температура плавления: точно при 144-145°C, без разложения. ТЖХ (хлороформ:метанол (95:5 (по объему))) : единственная точка (R<sub>f</sub> = 0,35). ТЖХ (хлороформ): единственная точка (R<sub>f</sub> = 0,34). Чистота по ВЭЖХ: 99+%. Элементный анализ % (ожидаемый/найденный): C = 60,19/60, 14, H = 5,72/5,70, N = 23,40/23,30.

Пример 4. Пример также иллюстрирует получение 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. К фурфуриламину (1456 мг, 15 ммоль), помещенному в 100 мл н-пропанола, добавляли 6-хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурин (2247 мг, 10 ммоль) и триэтиламин (3,6 мл, 25 ммоль). Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании.

Гомогенный раствор нагревали при 100°C в течение 3 ч и затем охлаждали при комнатной температуре. После испарения под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл). Этилацетатный экстракт испаряли, и остаток затем промывали 50 мл диэтилового эфира. Белый неочищенный продукт перекристаллизовывали в метаноле. Выход: 85%, белое твердое вещество. Температура плавления: 128-129°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub>:метанол, 8:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >99%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,02 sep (1H, J = 6,8 Гц); 2,22 sep (1H, J = 7,8 Гц); 2,42 м (2H); 3,91 кв. (1H, J = 7,4 Гц); 4,14 кв. (1H, J = 7,4 Гц); 4,70 уш.с (2H); 6,23 дд (1H, J<sub>a</sub> = 3,2 Гц, J<sub>b</sub> = 0,9 Гц); 6,26 м (1H); 6,36 т (1H, J = 2,4 Гц); 7,53 м (1H); 8,19 уш.с (1H); 8,24 с (1H); 8,27 с (1H). MS (ES):  $[M+H]^+ = 286$  (100).

## Пример 5.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(4-метокси-бензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Смесь 10 ммоль 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), 12 ммоль 4-метоксибензиламина и 5 мл триэтиламина кипятили с обратным холодильником в н-пропаноле в течение 3 ч. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, испаряли, и остаток затем промывали 30 мл диэтилового эфира. Твердый остаток отфильтровывали и неочищенный про-

дукт перекристаллизовывали из метанола. Выход: 80%, белое твердое вещество. Температура плавления: 137-138°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub>:метанол (8:2 (по объему)): единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 1,55 м (2H); 1,68 м (1H); 1,93 м (2H); 2,26 кв.кв. (Ja = 11,0 Гц, Jb = 4,3 Гц); 3,64 кв.кв. (1H, Ja = 11,0 Гц, Jb = 4,3 Гц); 3,70 с (3H); 4,00 д (1H, J=11,0 Гц); 4,65 с (2H); 5,63 дд (1H, Ja = 11,0 Гц, Jb = 2,2 Гц); 6,85 д (2H, J = 8,8 Гц); 7,28 д (2H, J = 8,8 Гц); 8,23 с (1H); 8,29 уш.с (1H); 8,34 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup>=340 (100).

Пример 6.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(2-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Смесь 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил) пурина (2387 мг, 10 ммоль), полученного из 1546 мг 6-хлорпурина, 2-метоксибензиламина (1470 мг, 12 ммоль) и 5 мл триэтиламина (35 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения под вакуумом н-пропанола полученный материал обрабатывали водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл). Этилацетатный экстракт испаряли и остаток затем промывали 50 мл петролейного эфира. Белый неочищенный продукт перекристаллизовывали в метаноле. Выход: 90%, белое твердое вещество. Температура плавления: 106-108°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub>:метанол, (8:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 1,56 м (2H); 1,71 м (1H); 1,94 м (2H); 2,27 кв.кв. (1H, Ja = 12,3 Гц, Jb = 3,8 Гц); 3,67 м (1H); 3,83 с (3H); 4,20 м (1H); 4,71 уш.с (2H); 5,64 дд (1H, Ja = 11,3 Гц, Jb = 1,9 Гц); 6,83 тт (1H, Ja = 7,4 Гц, Jb = 0,9 Гц); 6,97 дд (1H, Ja = 8,2 Гц, Jb = 0,7 Гц); 7,14 д (1H, J = 7,3 Гц); 7,20 тт (1H, Ja = 7,8 Гц, Jb = 1,7 Гц); 8,09 с (1H); 8,21 с (1H); 8,36 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 340 (100).

Пример 7. Этот пример иллюстрирует получение 6-(4-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. Смесь 10 ммоль 6-хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), 12 ммоль 4-метоксибензиламина и 5 мл триэтиламина кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал последовательно обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фазу испаряли, и остаток затем промывали 30 мл диэтилового эфира. Твердый остаток отфильтровывали, и неочищенный продукт кристаллизовали из метанола. Выход: 80%, белое твердое вещество. Температура плавления: 182-183°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub>:метанол (8:2 (по объему)): единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,02 sxt (1H, J = 7,4 Гц); 2,21 sxt (1H, J = 7,4 Гц); 2,44 м (2H); 3,72 с (3H); 3,90 кв (1H, J = 7,4 Гц); 4,15 кв (J = 7,4 Гц); 4,67 с (H); 6,28 м (1H); 6,86 д (2H, J = 8,7 Гц); 7,31 д (2H, J = 8,7 Гц); 8,1 уш.с (1H); 8,19 с (1H); 8,29 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 326 (100).

Пример 8.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(2-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. Смесь 2247 мг (10 ммоль) 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), 2-метоксибензиламина (1470 мг, 12 ммоль) и 5 мл триэтиламина (35 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл). Этилацетатный экстракт испаряли, и остаток затем промывали 50 мл гексана. Белый неочищенный продукт перекристаллизовывали в метаноле. Выход: 90%, белое твердое вещество. Температура плавления: 97-99°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub> :метанол, 8:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,02 м (1H); 2,21 sep (1H, J = 6,8 Гц); 2,43 м (2H); 3,83 с (3H); 3,91 кв. (1H, J = 7,4 Гц); 4,14 кв. (1H, J = 7,4 Гц); 4,68 уш.с (2H); 6,26 м (1H); 6,83 тт (1H, Ja = 7,4 Гц, Jb = 0,9 Гц); 6,98 дд (1H, Ja = 8,2 Гц, Jb = 0,7 Гц); 7,12 д (1H, J = 7,3 Гц); 7,20 тт (1H, Ja = 7,8 Гц, Jb = 1,7 Гц); 8,05 уш.с (1H); 8,18 с (1H); 8,27 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup>=326 (100).

Пример 9.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(3-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Смесь 10 ммоль 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина, 12 ммоль 3-метоксибензиламина 5 мл триэтиламина кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и затем испаряли. При обработке маслянистого остатка 30 мл н-гексана образовывался белый порошкообразный продукт. Неочищенный продукт кристаллизовали из метанола. Выход: 70%, белое твердое вещество. Температура плавления: 134-135°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (85:15 (по объему)): единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >99%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO): 1,56 м (2H); 1,70 м (1H); 1,94 м (2H); 2,30 кв.кв. (1H, Ja = 11,0, Jb = 4,3 Гц); 3,67 тт (1H, Ja = 11,0 Гц, Jb = 4,3 Гц); 3,83 с (3H); 4,00 д (1H, J = 11 Гц); 4,71 с (2H); 5,64 дд (1H, Ja = 11,0 Гц, Jb = 4,3 Гц); 6,83 т (1H, J = 7,7 Гц); 6,97 д (1H, J = 7,7 Гц); 7,14 д (J = 7,7 Гц); 7,20 тт (1H, Ja = 7,7 Гц, Jb = 1,5 Гц); 8,09 уш.с (1H); 8,21 с (1H); 8,36 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 340 (100).

Пример 10.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(4-метоксифениламино)-9-(2-тетрагидропиранил)пурина.

Смесь 2387 мг (10 ммоль) 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), 4-метоксифениламина (1803 мг, 15 ммоль) и 5 мл диизопропиламина (35 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-пропанол (100 мл) в течение 5 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (50 мл). Этилацетатный экстракт испаряли и остаток затем промывали 50 мл петролейного эфира. Выход: 90%, белое твердое вещество. Температура плавления: 150-151°C. ТЖХ (этилацетат:толуол, 3:1 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 1,59 м (2H); 1,73 м (1H); 1,97 м (2H); 2,31 кв.кв. (1H, J<sub>a</sub> = 12,3 Гц, J<sub>b</sub> = 3,8 Гц); 3,69 м (1H); 4,02 м (1H); 5,68 дд (1H, J<sub>a</sub> = 11,3 Гц, J<sub>b</sub> = 1,9 Гц); 6,91 д (1H, J = 9,0 Гц); 7,78 д (1H, J = 9,0 Гц); 8,34 с (1H); 8,47 с (1H); 9,72 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 326 (100).

Пример 11.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(3-метоксibenзиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. Смесь 10 ммоль 6-хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), 12 ммоль 3-метоксibenзиламина и 5 мл триэтиламина кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. После испарения н-пропанола под вакуумом, полученный материал обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и испаряли. Остаток затем промывали 30 мл н-гексана. Белое порошкообразное твердое вещество отфильтровывали, и неочищенный продукт кристаллизовали из метанола. После нескольких часов, получали чистые прозрачные кристаллы. Выход: 80%, белое твердое вещество. Температура плавления: 87-88°C. ТЖХ (CHCl<sub>3</sub>:метанол (8:2 (по объему)): единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,02 sxt (1H, J = 7,4 Гц); 2,22 sxt (1H, J = 7,4 Гц); 2,45 м (2H); 3,84 с (3H); 3,91 кв. (1H, J = 7,4 Гц); 4,14 кв. (1H, J = 7,4 Гц); 4,68 с (2H); 6,26 м (1H); 6,83 т (1H, J = 7,7 Гц); 6,98 д (1H, J = 7,7 Гц); 7,11 д (1H, J = 7,7 Гц); 7,20 т (1H, J = 7,7 Гц); 8,06 уш.с (1H); 8,17 с (1H); 8,27 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 326 (100).

Пример 12.

Этот пример иллюстрирует получение 6-(2,5-диметоксibenзиламино)-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Смесь 2387 мг (10 ммоль) 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина, 2,5-диметоксibenзиламина (2006 мг, 12 ммоль) и 5 мл триэтиламина (35 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл). Этилацетатный экстракт испаряли и остаток затем промывали 50 мл диэтилового эфира.

Белое твердое вещество отфильтровали и сушили под вакуумом. Выход: 95%, белое твердое вещество. Температура плавления: 150-152°C. ТЖХ (этилацетат:гексан, 1:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 1,56 м (2H); 1,70 м (1H); 1,94 м (2H); 2,27 кв. кв. (1H, J<sub>a</sub> = 12,3 Гц, J<sub>b</sub> = 3,8 Гц); 3,60 с (3H); 3,70 с (3H); 3,66 м (1H); 3,78 с (3H); 4,00 м (1H); 4,68 уш.с (2H); 5,64 дд (1H, J<sub>a</sub> = 11,2 Гц, J<sub>b</sub> = 2,0 Гц); 6,75 м (2H); 6,89 дд (1H, J<sub>a</sub> = 9,2 Гц, J<sub>b</sub> = 1,9 Гц); 8,10 уш.с (1H); 8,21 с (1H); 8,36 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 370 (100).

Пример 13.

Пример иллюстрирует получение 6-(2,5-диметоксibenзиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. Смесь 2247 мг (10 ммоль) 6-хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), 2,5-диметоксibenзиламина (2006 мг, 12 ммоль) и 5 мл триэтиламина (35 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-пропанол в течение 3 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения н-пропанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл). Этилацетатный экстракт испаряли, и остаток затем промывали 50 мл диэтилового эфира. Белый неочищенный продукт перекристаллизовывали в метаноле. Выход: 90%, белое твердое вещество. Температура плавления: 103-104°C. ТЖХ (этилацетат:гексан, 1:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,02 м (1H); 2,21 sep (1H, J = 6,8 Гц); 2,43 м (2H); 3,60 с (3H); 3,78 с (3H); 3,91 кв (1H, J = 7,4 Гц); 4,14 кв (1H, J = 7,4 Гц); 4,65 уш.с (2H); 6,26 м (1H); 6,74 м (2H); 6,90 д (1H, J = 8,8 Гц); 8,10 уш.с (1H); 8,18 с (1H); 8,28 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 356 (100).

Пример 14.

Пример иллюстрирует получение 6-(2,3,4-триметоксibenзиламино)-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Смесь 2387 мг (10 ммоль) 6-хлор-9-(2-тетрагидропиранил)пурина, 2,3,4-гидрохлорида триметоксibenзиламина (27 99 мг, 12 ммоль) и 8 мл триэтиламина (57 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-бутаноле (45 мл) в течение 3 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения н-бутанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (50 мл). Этилацетатный экстракт испаряли и остаток затем промывали 30 мл диэтилового эфира. Белое твердое вещество отфильтровывали и пере-

кристаллизовали из метанола. Выход: 90%, белое твердое вещество. Температура плавления: 142-143°C. ТЖХ (этилацетат:гексан, 1:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 1,57 м (2H); 1,72 м (1H); 1,95 м (2H); 2,27 кв.кв. (1H, J<sub>a</sub> = 12,3 Гц, J<sub>b</sub> = 3,8 Гц); 3,67 м (1H); 3,73 с (3H); 3,75 с (3H); 3,84 с (3H); 4,00 м (1H); 4,66 уш.с (2H); 5,63 дд (1H, J<sub>a</sub> = 11,3 Гц, J<sub>b</sub> = 1,9 Гц); 6,69 д (1H, J = 8,7 Гц); 6,91 д (1H, J = 8,7 Гц); 8,04 уш.с (1H); 8,20 с (1H); 8,34 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 400 (100).

Пример 15.

Пример иллюстрирует получение 6-(2)3,4-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина. Смесь 2247 мг (10 ммоль) 6-хлор-9-(2-тетрагидрофуранил)пурина (полученного из 1546 мг 6-хлорпурина), гидрохлорида 2,3,4-триметоксибензиламина (2799 мг, 12 ммоль) и 8 мл триэтиламина (57 ммоль) кипятили с обратным холодильником в н-бутаноле в течение 3 ч. Твердое вещество растворялось полностью при интенсивном перемешивании. После испарения н-бутанола под вакуумом полученный материал обрабатывали водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (50 мл). Этилацетатный экстракт испаряли и остаток затем промывали 50 мл гексана. Белый неочищенный продукт перекристаллизовывали в метаноле. Выход: 90%, белое твердое вещество. Температура плавления: 140-141°C. ТЖХ (этилацетат:гексан, 1:2 (по объему), единственная точка. Чистота по ВЭЖХ: >98%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO): 2,02 sep (1H, J = 6,8 Гц); 2,22 sep (1H, J = 6,8 Гц); 2,44 м (2H); 3,73 с (3H); 3,75 с (3H); 3,84 с (3H); 3,91 кв (1H, J = 7,4 Гц); 4,13 кв (1H, J = 7,4 Гц); 4,65 уш.с (2H); 6,26 м (1H); 6,70 д (1H, J = 8,6 Гц); 6,90 д (1H, J = 8,6 Гц); 8,03 уш.с (1H); 8,19 с (1H); 8,26 с (1H). MS (ES): [M+H]<sup>+</sup> = 386 (100).

Пример 16.

Было проведено несколько недолгих предварительных исследований действия 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина на культивированные фибробласты человеческой кожи. Начальное исследование включало добавление 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (от 40 до 400 мкМ) к фибробластам человеческой кожи в культуре. Шесть часов воздействия не оказывало влияния на процент прикрепления клеток к поверхности колбы с культурой. В остальных экспериментах, о которых сообщается в этом примере, 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин добавляли непосредственно в культуральную среду одновременно с высеванием клеток.

Для определения действия 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина на выживание культивированных фибробластов человеческой кожи после 3 дней обработки проводили испытание в более широком интервале концентраций (от 0,01 до 500 мкМ). При концентрациях от 1 до 200 мкМ можно было отметить легкую стимуляцию роста клеток и выживание. Вследствие воздействия 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина на клетки не наблюдалось проявление токсичности или других отрицательных последствий.

Также оценивалось воздействие 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (от 0 до 400 мкМ) на краткосрочный рост молодых фибробластов человека. Клеточный рост был таким же, как и в образцах, не подвергнутых обработке, и в образцах, подвергнутых воздействию 40, 80 и 200 мкМ 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. При уровнях воздействия около 400 мкМ можно было отметить легкое увеличение роста клеток. Аналогичные эксперименты проводили для определения степени апоптоза и окрашивания бета-галактозидазы в клетках, подвергнутых и не подвергнутых действию 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина. Не было признаков индуцирования апоптоза или преждевременного старения человеческих фибробластов, подвергнутых действию различных доз 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина.

Кроме того, было исследовано действие 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина на стареющие клетки. Одинаковое число стареющих клеток высевали в отдельных пробирках и затем подвергали воздействию различных концентраций 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (от 0 до 400 мкМ). Число клеток определяли после 7 и 14 дней воздействия с помощью счетчика фирмы Coulter после трипсинизации и ресуспендирования клеток. После 7 дней никаких отрицательных последствий воздействия не наблюдалось. После 14 дней воздействия можно было отметить легкий отрицательный эффект на выживание стареющих клеток при концентрации 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина 200 мкМ или более. При более низких концентрациях никаких отрицательных эффектов не наблюдалось, хотя могло происходить некоторое увеличение числа клеток среди стареющих клеток, подвергнутых воздействию 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина.

Для оценки изменений возрастных клеток подвергали также воздействию 6-фурфурил-амино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (при концентрациях от 0 до 200 мкМ) стареющие клетки последнего пассажа с продолжительностью жизни более чем 95%. Окрашенные образцы актина исследовали после трех дней. Воздействие 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина обычно изменяло окрашенный образец актина от высокополимеризованного образца до менее полимеризованного волокнистого образца. Менее полимеризованные и диффузные образцы окрашенного актина обычно ассоциируются с характеристиками молодых фибробластов человека. Таким образом, очевидно, что 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин возвращает к исходному состоянию некоторые из возрастных изменений в

организации актина в стареющих клетках.

Кроме того, подвергали воздействию 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (от 0 до 400 мкМ) стареющие фибробласты человеческой кожи и оценивали реверсию возрастных изменений. Наблюдались значительные различия в виде клеток после 7 и 30 дней воздействия. После 30 дней воздействия подвергнутые воздействию клетки обычно выглядели более молодыми с точки зрения того, что они становились более тонкими и располагались в массивах. Даже при более высоких концентрациях (200 и 400 мкМ) очевидно, что подвергнутые воздействию 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина клетки являются более мелкими и имеют меньший внутриклеточный дебрис по сравнению с необработанными клетками.

На основе этих исследований очевидно, что 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин хорошо переносится молодыми и стареющими фибробластами человеческой кожи и обладает лечебным действием с точки зрения реверсии конфигурации актина и морфологии стареющих клеток к характеристикам относительно более молодых клеток. Не наблюдалось значительного индуцирования дополнительного роста или деления клеток.

Пример 17.

Определяли *in vitro* цитохимическую активность нескольких производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению при помощи микротитровального анализа с использованием кальцеина АМ и набора клеточных линий различной гистогенетического и видового происхождения; кроме того, исследовали кинетин в качестве контроля. Так как только метаболически активные клетки расщепляют кальцеин АМ (тетраацетоксиметиловый эфир кальцеина), внутриклеточная концентрация кальцеина соответствует числу жизнедеятельных клеток в культуре.

Использовали следующие клеточные линии: человеческой остеосаркомы (HOS); карциномы грудной железы MCF-7; человеческого миелолейкоза K-562 и мышинные фибробласты NIH3T3. Клетки содержали в 80-см<sup>2</sup> пластмассовых матрасах для тканевой культуры Nunc/Corning и культивировали в клеточной культуральной среде (DMEM с 5 г/л глюкозы, 2 мМ глутамина, 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% фетальной телячьей сыворотки и бикарбонат натрия).

Готовили суспензию клеток и разбавляли согласно конкретному типу клеток и рассчитанной требуемой клеточной плотности (2500-30000 клеток на лунку, исходя из характеристик роста клеток) и добавляли с помощью пипетки (80 мкл) в 96-луночные титрационные микропланшеты. Для стабилизации посевов использовали 24-часовой прединкубационный период при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В лунки микротитровального планшета при нулевом значении времени добавляли аликвоты объемом 20 мкл четырехкратных разбавлений намеченной испытываемой концентрации. Испытываемые соединения обычно оценивали при шести 4-кратных разбавлениях. Самая высокая используемая в настоящем исследовании концентрация в лунке составляла 166,7 мкМ. Все образцы подвергали испытаниям 3 раза. Инкубации клеток с испытываемыми соединениями проводили в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и влажности 100%. В конце инкубационного периода добавляли кальцеин АМ к конечной концентрации 1 мкг/мл, инкубируемой в течение 1 ч. Измеряли интенсивность флюоресценции (FI) с помощью прибора для чтения планшетов LabSystem FIA Reader Fluoroscan Ascent (UK). Вычисляли выживаемость клетки (GI<sub>50</sub>), используя следующее уравнение:

$$GI_{50} = \left( \frac{FI_{\text{лунки, подвергнутой действию соединения}}}{\text{среднее значение } FI_{\text{контрольной лунки}}} \right) / \left( \frac{\text{среднее значение } FI_{\text{контрольной лунки}} - \text{среднее значение } FI_{\text{холостого опыта}}}{\text{среднее значение } FI_{\text{холостого опыта}}} \right) \times 100\%$$

Величина GI<sub>50</sub>, концентрация препарата, летальная для 50% клеток, была вычислена из полученных кривых зависимости "доза-эффект".

Были получены следующие результаты:



Соединение	GI <sub>50</sub> (мкмоль/л) для испытуемой клеточной линии			
	HOS	K-562	MCF7	NIH-3T3
Кинетин	>166,7	164,1	>166,7	155,1
6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
6-(3,5-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	>166,7	-	>166,7	>166,7
6-(4-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
6-(2,3-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	>166,7	-	>166,7	>166,7
6-(3-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил) пурин	>166,7	-	>166,7	>166,7
6-(4-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил) пурин	>166,7	-	>166,7	>166,7

Производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению показали минимальную токсичность или отсутствие токсичности для клеток при концентрациях вплоть до 166,7 мкМ и, следовательно, они подходят для косметического применения.

#### Пример 18.

При помощи стандартного МТТ анализа, оптимизированного для 96-луночных планшетов, определяли цитотоксическую активность *in vitro* нескольких производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению по отношению к человеческим диплоидным фибробластам. Анализ основан на спектрофотометрическом измерении продукта метаболического превращения МТТ ((3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолюм бромид, или тетразола) митохондрией живых клеток.

Фибробласты крайней плоти человека (клеточная линия VJ) при среднем пассаже выдерживали в 75-см<sup>2</sup> пластмассовых матрасах для тканевой культуры и культивировали в клеточной культуральной среде (DMEM с 5 г/л глюкозы, 2 мМ глутамина, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% фетальной телячьей сыворотки и бикарбонат натрия).

Высевали около 5000 клеток на лунку 96-луночного планшета. После 24 ч клеточную культуральную среду заменяли клеточной культуральной средой, содержащей испытуемое соединение. Испытуемые соединения оценивали при 2-кратных разбавлениях. Самая высокая концентрация, используемая в настоящем исследовании, обычно составляла 200 мкМ. В случае соединений с ограниченной растворимостью в культуральной среде самую высокую концентрацию корректировали. Каждое тестируемое соединение испытывали в пяти опытах. Клетки с тестируемыми соединениями инкубировали в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и влажности 100%. В конце инкубационного периода культуральную среду заменяли клеточной культуральной средой, содержащей МТТ (0,5 мг/мл), и клетки инкубировали в течение еще 3 ч. Образующийся формазан солибилизировали с помощью DMSO и измеряли поглощение при 570 нм. Вычисляли способность испытуемых соединений ингибировать МТТ понижающую активность клеток как

$$IC = \left( \frac{A_{\text{лунки, подвергнутой действию соединения}} - \text{среднее значение } A_{\text{холостого опыта}}}{\text{среднее значение } A_{\text{контрольной лунки}} - \text{среднее значение } A_{\text{холостого опыта}}} \right) \times 100\%$$

IC<sub>10</sub>, концентрация лекарственного средства, вызывающего 10% снижение МТТ понижающей активности, была вычислена из полученных кривых зависимости "доза-эффект". Были получены следующие результаты:

Соединение	Максимальная испытуемая концентрация (мкмоль / л)	IC <sub>10</sub> (мкмоль / л)
6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидрофуранил) пурин	200	>200
6-(4-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	100	>100
6-(4-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил) пурин	100	>100
6-(3-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидрофуранил) пурин	100	>100
6-(2,4-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	25	>25
6-(3,5-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-(3,4-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-(3,4-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-(2,3,4-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	37,5	>37,5
9-(2-тетрагидропиранил) пурин		
6-(2,3,4-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-(2,4,5-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-(2,4,5-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200
6-(2,4,6-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	50	>50
6-(3,4,5-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	100	>100
6-(3,4,5-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	200	>200

Испытуемые производные 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению не показали вредного действия на митохондриальную активность и жизнеспособность клетки в широком интервале концентраций и, следовательно, они подходят для косметического применения.

#### Пример 19.

Исследовали замедление старения рядом производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению; кроме того, оценивали кинетин в качестве контрольного соединения. Человеческие диплоидные фибробласты (HSA клетки различных уровней пассажа: пассаж 25 - обозначаемый как HSA25; пассаж 45 - обозначаемый как HSA45; и пассаж 80 - обозначаемый как HSA80) окрашивали для (β-галактозидазной активности. Удаляли используемую для культивирования клеток среду, клетки промывали дважды в PBS (забуференным фосфатом физиологическом растворе) и фиксировали в 2-3 мл фиксирующего раствора, состоящего из 2% формальдегида и 0,2% глутаральдегида в PBS. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин и затем промывали дважды с помощью PBS. Клетки затем инкубировали при 37°C (без CO<sub>2</sub>) в течение от 1 до 16 ч в 2-3 мл раствора, включающего железосинеродистый калий (5 мМ), ферроцианид калия (5 мМ), MgCl<sub>2</sub> (2 мМ), X-gal (5-бром-4-хлор-3-

индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид) (1 мг/мл), в цитратном/фосфатном буфере (рН 6,0). При каждом пассаже к среде добавляли тестируемые соединения (около 50 мкМ). После инкубационного периода образцы клеток исследовали на предмет обнаружения присутствия голубых клеток, указывающих на то, что X-gal был подвергнут расщеплению (положительно стареющие клетки). В этом эксперименте, вследствие действия  $\beta$ -галактозидазы на субстрат, в голубой цвет окрашивались только стареющие клетки.

Результаты представлены ниже:

Соединение	Стареющие клетки (%)		
	НСА25	НСА50	НСА80
Кинетин	3	5	38
6-(2-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	4	6	22
6-(3-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	5	5	24
6-(4-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	4	3	26
6-(2,4-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	4	6	25
6-(2,3,4-триметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	4	5	31
6-(фурфуриламино)-9-(2-тетрагидрофуранил) пурин	3	4	12
6-(2,4-диметоксифениламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	4	4	29
6-(3,4-диметоксифениламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	5	7	28
6-(2,4,5-триметоксифениламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	5	4	25

Производные 6,9-дизамещенных пуринов были обычно более эффективными, чем кинетин, при сохранении более низких уровней стареющих клеток после 80 пассажей.

Пример 20.

Определяли противовоспалительную активность ряда производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению; кроме того оценивали кинетин в качестве контрольного соединения. Глиому крыс линии С6 (ATCC No, CCL107) культивировали в монослое в бессывороточной химически определенной среде, содержащей Ham's F10/ минимальную поддерживающую среду (1:1 по объему), 2 mM L-глутамина, 1% (по объему) минимальную поддерживающую среду витаминов (100 $\times$ ), 1% (по объему) минимальную поддерживающую среду заменимых аминокислот (100 $\times$ ), 100 U/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина и 30 nM селенистокислого натрия. Инкубирование проводили при 37 $^{\circ}$ C в увлажненной атмосфере. Анализы проводили в фазе логарифмического роста при плотности 2,5 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Внутриклеточный cAMP синтез индуцировали путем добавления 5 mM (-)-изопротеренола; добавляли различные количества испытуемых соединений одновременно с (-)-изопротеренолом. После 30 мин инкубирования при 37 $^{\circ}$ C среду удаляли и определяли клеточное количество cAMP с помощью набора для иммунологического анализа cAMP-фермент фирмы Amersham. Значение I<sub>50</sub> определяли из кривой зависимости "доза-эффект" в двух экземплярах.

Были получены следующие результаты:

Соединение	Противовоспалительная активность	
	I <sub>50</sub> (мкМ)	Действие
Кинетин	-	Неактивен
6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	13	Ингибирование
6-фениламино-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	45	Ингибирование
6-(3-метоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	7	Ингибирование
6-(3,5-диметоксибензиламино)-9-(2-тетрагидропиранил) пурин	11	Ингибирование

Производные 6,9-дизамещенных пуринов продемонстрировали противовоспалительную активность. Кинетин был неактивен в протоколе испытания.

Пример 21.

Был проведен ряд испытаний, относящихся к безвредности 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина, с использованием обычно применяемых протоколов и методик. Далее приводятся результаты этих испытаний.

#### Тест Эймса

Испытания проводили с использованием DMSO в качестве растворителя и уровней доз 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина 2,5, 5,0, 15, 50, 500, 1500, и 5000 мкг/чашка на основе стандартного протокола и методик (Ames et al., Mutation Research, 31, 347-364 (1975); Maron et al., Mutation Research, 113, 173-215 (1983)). При использовании штаммов *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, обуславливающих аутокотрофность по гистидину в присутствии и отсутствии Aroclor-индуцированной печени крысы S9, мутагенные реакции с 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурином при испытываемых концентрациях не наблюдались.

#### In vitro скрининговый анализ хромосомной аберрации

6-Фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин исследовали с помощью скринингово анализа хромосомной аберрации с использованием клеток яичника китайского хомячка (CHO) как при отсутствии, так и в присутствии Aroclor-индуцированной S9. В качестве растворителя использовали DMSO, величину дозы изменяли в интервале от 0,272 до 272 мкг/мл. Процент клеток со структурными или численными аберрациями в образцах, подвергнутых воздействию 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурином, не был значительно повышен по сравнению с контрольными образцами, растворенными в растворителе. На основе этого исследования был сделан вывод, что 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин дает отрицательный результат при индуцировании структурных или численных аберраций хромосом в клетках CHO.

#### Анализ васкуляризации хорионаллантоисной мембраны

Возможную способность 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина раздражать слизистую оболочку глаз оценивали с помощью методики, описанной в публикации Bagley et al., *Alternative Methods in Toxicology*, vol. 6 in *Progress in In Vitro Toxicology*, 131-138 (1988). В хорионаллантоисную мембрану яиц белого леггорна, инкубированную в течение 14 дней, вводили 40 мкл испытуемого соединения (и три более низкие концентрации в дистиллированной воде) и затем дополнительно инкубировали в течение приблизительно 30 мин, в течение которых хорионаллантоисную мембрану анализировали на васкулярное кровоизлияние, капиллярный впрыск и/или присутствие "сосудов-призраков". Значение  $RC_{50}$  (расчитанная концентрация, продуцирующая положительную реакцию в 50% обработанных яичниках) составляло 105%. В условиях этого анализа значение  $RC_{50}$  меньше 1% считается потенциально вызывающим раздражение, в то время как величина  $RC_{50}$  больше чем 3% считается невызывающей раздражение. Следовательно, на основе этого анализа, было обнаружено, что испытуемое соединение не вызывает раздражение.

#### МТТ анализ жизнеспособности эпидермы

С помощью системы MatTek Corporation's EpiDerm(TM) System (состоящей из нормальных, эпидермальных кератиноцитов (NHEK) человека, которые культивировали для образования многослойной, высоко дифференцированной модели эпидермального слоя кожи человека) было определено, что и можно было ожидать, что 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин относится к нераздражающим веществам.

#### Острая пероральная токсичность

Самкам крыс линии Wistar вводили перорально 2000 мг/кг 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина и затем проводили наблюдения через 1/2, 1, 2, 3, и 4 ч после введения дозы и в дальнейшем один раз в день в течение 14 дней токсического и фармакологического воздействия; после исследования всех животных гуманно умертвляли с помощью CO<sub>2</sub> и проверяли на тяжкую патологию. Все животные выдерживали пероральную дозу; изменение веса во время исследования были нормальными; результаты аутопсии также были нормальными.

#### Тест на частое блестящее повреждение у людей

Испытуемый гель (около 0,2 мл), содержащий около 0,1 процента 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина, помещали на давящую повязку размером 2 см<sup>2</sup>, которую накладывали на спину каждого пациента и оставляли в течение 24 ч. Эту процедуру повторяли каждый понедельник, среду и пятницу до тех пор, пока не было сделано девять (9) аппликаций на одну и ту же область (индуктивная фаза). Производили осмотр области перед каждой новой аппликацией. Приблизительно через 10-14 дней после удаления девятой повязки накладывали провокационную повязку (провокационная фаза) на новую область спины и затем после этого осматривали через 24 и 72 часа на реактивность. Реакции кожи оценивались на шестибальной шкале (0 = нет признаков действия; + = чуть заметные; 1 = легкие; 2 = умеренные; 3 = выраженные и 4 = серьезные).

Пятьдесят два (52) пациента закончили индуктивную фазу и провокационную фазу (суммарно 10 аппликаций на пациента). Из пациентов, которые закончили исследование, только один пациент имел

оценку "чуть заметные" (+) после аппликации в провокационной фазе (только через 24 часа; когда осматривали через 72 часа, признак воздействия отсутствовал); эту одну наблюдаемую реакцию не считали по своему характеру признаком раздражения или аллергии. У всех других пациентов не обнаруживались какие-либо признаки раздражения (то есть, 0 по шкале) во время индуктивной или провокационной фаз. У обследуемых людей не наблюдались признаки индуцированного аллергического контактного дерматита или другого раздражения.

#### Пример 22.

Безвредность и эффективность производных 6,9-дизамещенных пуринов по настоящему изобретению при местном применении для омолаживания кожи исследовали с помощью модели безволосой мыши (общепринятая модель для исследований лечения старения кожи от воздействия ультрафиолетовых лучей). Самок безволосых мышей линии SKH-1 (возраст 5 недель, 20-25 г, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) индивидуально размещали в клетках с фильтром наверху и подвергали акклиматизации в течение 5-7 дней после их доставки. Мышей подразделяли на группы лечения (n=6), включающие две различных контрольных группы (контрольная группа без лечения, контрольная группа с лечением лекарственной средой) и лечебную контрольную группу (имеющийся в продаже крем, содержащий 0,05% транс-ретиноевой кислоты). Воду и корм мышам давали без ограничения.

Экспериментальные группы (6 мышей на группу) подвергали следующему лечению: (1) контрольная группа без лечения; (2) контрольная группа, подвергаемая воздействию лекарственной среды (лосьон MillCreek); (3) кинетин (0,1% в лосьоне MillCreek); (4) 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурин (0,1% в лосьоне MillCreek); и (5) лечебная контрольная группа (крем, содержащий 0,05% транс-ретиноевой кислоты). Для кожи спины (приблизительно 2 см × 2 см) безволосых мышей применяли различные виды лечения ежедневно (понедельник-пятница) в течение 3 недель при дозе около 20 мг.

В начале (до 1-ой обработки) и еженедельно проводили измерения на коже спины трансэпидермальной потери влаги (TEWL), увлажненности кожи и эластичности кожи. Возможное действие этих лекарственных форм для местного применения на пролиферацию эпидермальных клеток исследовали с помощью бромдезоксисуридина в качестве иммуногистохимического маркера пролиферации клеток. Гистологическое исследование подвергнутой лечению и контрольной кожи было также использовано для определения действия этих лекарственных форм для местного применения на кожу.

Для оценки возможного возникновения эритемы (раздражения) проводили ежедневные исследования соответствующих мест на коже с помощью установленных критериев классификации, где степень 0 = нет реакции; степень 1 = очень слабое покраснение; степень 2 = легкое покраснение; степень 3 = умеренное покраснение/раздражение; степень 4 = сильное покраснение/раздражение; степень 5 = очень сильное покраснение/раздражение; и степень 6 = некроз.

Измерения увлажненности кожи и эластичности кожи являются важными неинвазивными методами, используемыми для характеристики действий увлажняющих средств и действий, предотвращающих появление морщин, на кожу. Для измерения увлажненности кожи и эластичности требуемых мест кожи в начальный момент и с недельными интервалами использовали комбинированный прибор DermaLab™. Этот прибор был оборудован двумя зондами, которые размещали на поверхности кожи, и с помощью которых проводилось количественное определение взятых соответствующих параметров, измерения которых регистрировались на встроенном компьютере.

Всем группам животных делали интраперитонеально инъекции бромдезоксисуридина (100 мг/кг) через 4 ч после последней аппликации. Животных затем умертвляли с помощью ингаляции CO<sub>2</sub> и затем через 3 ч осуществляли смещение шейных позвонков. Тестируемые места вырезали, и из каждого места, подвергнутого лечению, и из контрольных, не подвергнутых лечению мест, получали 6-мм пункционные биопсии. Биопсии помещали в пробирки с этикетками, содержащие 4% нейтрального забуференного формалина для заливки в парафин и против окрашивания 5-бромдезоксисуридином. Парафиновые срезы нарезали толщиной 5 мкм и окрашивали с помощью иммуногистохимического набора 5-бромдезоксисуридина (X1545K фирмы Exalpha Biologicals, Inc.) и стандартного протокола окрашивания. Микропрепараты были слабо покрашены в гематоксилине Майера и посчитаны под оптическим микроскопом на предмет количества 5-бромдезоксисуридина-положительных клеток на 1 мм эпидермиса для каждого среза.

Биопсии кожи брали с каждого места, подвергнутого лечению, и с контрольной необработанной кожи. Биопсии фиксировали в 4% нейтральном забуференном формалине, заливали в парафин, и окрашивали гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы кожи исследовали для определения воздействия лечения на эпидермальную и дермальную гистологию и гистологию рогового слоя. Биопсии были также микроскопически исследованы для клеток воспалительного инфильтрата.

#### Раздражение кожи

Испытываемые продукты были хорошо переносимы при длительном лечении в течение 3 недель. Только крем из транс-ретиноевой кислоты вызывал значительное раздражение (степень 3), появляющееся после от 1 до 3 недель лечения. Все другие воздействия 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина характеризовались степенью ниже 1,5, которая в течение 3 недель понижа-

лась ниже степени 1.

#### **Увлажненность кожи**

Терапевтический контроль показал значительное снижение электропроводности кожи и, следовательно, пониженную увлажненность кожи. В отличие от этого, испытываемые соединения и только одна лекарственная среда приводили к постепенному повышению увлажненности кожи. На 3 неделе среднее значение увлажненности для всех испытываемых соединений было больше, чем для испытания лекарственной средой или контрольного испытания без лечения. Обычно, лечение 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурином давало одно из самых высоких увеличений увлажненности кожи из исследуемых соединений.

#### **Эластичность кожи**

Не наблюдалось значительных изменений в эластичности кожи из групп, подвергнутых лечению в течение 3 недельных испытаний, для любой из тестируемых групп. Следовательно, эластичность кожи из групп, подвергнутых лечению, была сопоставима с эластичностью кожи из контрольных групп, не подвергнутых лечению, и групп, подвергнутых лечению только лекарственной средой.

#### **Окрашивание бромдезоксипурином (BrdU)**

Для определения действия испытываемых соединений на пролиферацию эпидермальных клеток измеряли окрашивание эпидермиса бромдезоксипурином. Не было статистически значимой разницы в эпидермальном BrdU окрашивании для испытываемых соединений по сравнению с группами, не подвергавшимся лечению, или контрольными группами, подвергавшимися воздействию лекарственной среды, или каких-либо различий BrdU окрашивании с испытываемыми соединениями. Терапевтически контрольные и подвергнутые лечению ткани не имели эпидермального BrdU окрашивания, но некоторые локализованные области окрашивания в дерме, возможно, относились к воспалению, индуцированному ретиноидами.

При завершении исследования после 3 недель лечения были получены биопсии ткани. Гистологическая оценка показала нормальную выглядящую "здоровой" кожу для всех испытываемых соединений. В отличие от этого, терапевтический контроль показал заметно повышенную толщину эпидермиса и воспалительные изменения в дерме. Толщину полости кожи H&E покрашенных биопсий измеряли с помощью оптической микроскопии. Толщина эпидермиса, дермы и рогового слоя, измеренная после 3 недель лечения, была сравнима со значениями для группы, подвергнутой действию лекарственной среды, и контрольной группы, не подвергавшейся лечению. В отличие от этого, терапевтический контроль увеличивал как эпидермальную, так и дермальную толщину.

Эти результаты обеспечивают доказательство как безвредности, так и эффективности 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина для применения с целью улучшения косметического вида и сохранения жизнеспособности стареющей кожи без раздражения.

#### **Пример 23.**

Было проведено клиническое исследование для определения косметической эффективности и переносимости пациентами местно применяемого дважды в день в течение 12 недель 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина (0,10%) для улучшения клинических признаков и симптомов кожи лица, поврежденной в результате действия ультрафиолетовых лучей. В исследовании участвовали сорок женщин-добровольцев в возрасте от 40 до 65, имеющих от слабых до умеренных признаков поражения кожи лица ультрафиолетовыми лучами. Тридцать четыре пациентки участвовали в исследовании до конца; средний возраст пациенток, принимавших участие в исследовании, составлял 54 года. Пациентки были проинструктированы о том, что испытываемый продукт надо наносить на всю поверхность кожи лица дважды в день (то есть, рано утром и приблизительно за 1 ч перед сном) в течение 12 недель подряд. Пациентки также были проинструктированы о том, что во время исследования не должны использоваться на лице никакие другие продукты или медицинские препараты для местного ухода за кожей, кроме солнцезащитных фильтров или мягких косметических очищающих средств, и использования декоративной косметики. Испытуемый продукт включал 0,1 процент 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)пурина в лосьоне MillStreek в качестве лекарственной среды.

Проводили оценку состояние кожи пациенток на 2, 4, 8 и 12 недели. Подвергнутую лечению кожу лица оценивали по клиническим признакам старения кожи (например, глубокие и мелкие морщины, шероховатость, пятнистая гиперпигментация) в начале исследования (начальный уровень), а также на 2, 4, 8 и 12 недели. Также были получены самооценки пациенток по улучшению относительно начального уровня (морщины, структура, пятнистость, цвет и общее улучшение). Кроме того, на щеках всех пациенток проводились измерения трансэпидермальной потери влаги (TEWL) и влажности кожи.

#### **Трансэпидермальная потеря влаги (TEWL)**

TEWL означает количество потери паров воды через роговой слой. Увеличение значений TEWL предполагает или потерю испаряющейся воды (например, потоотделение или испарение), или повреждение кожного барьера. Снижение значений TEWL предполагает либо улучшение защитной функции, либо присутствие барьера на коже. Проводили измерения TEWL с помощью TEWL-метра (фирмы Courage & Khazaka, Köln, Germany), состоящего из зонда (содержащего датчики влажности и температуры), соединенного с центральным процессором. Для каждой пациентки, зонд помещали в центре обеих щек и изме-

рения проводили дважды.

### Измерения влажности кожи

Косвенное измерение увлажненности кожи осуществляли путем измерения изменений электрических свойств кожи. Сопротивление, основанное на измерениях емкости, определяли на коже с помощью прибора NOVA DPM 9003® (фирмы NOVA Technologies, Gloucester, MA1 USA). Прибор выполнял измерения при изменении предварительно выбранных частот (вплоть до 1 МГц) подводимого переменного тока. Величину, непосредственно относящуюся к емкости, определяют в условных единицах; более высокое значение означает более высокую емкость, которая указывает на повышенный уровень влаги в исследуемом месте. Измерения проводились трижды в центре обеих щек для каждой подвергаемой исследованию пациентки.

### Экспертная оценка кожи лица пациентов

При начальном уровне (День 0) посещения исследователь оценивал лицо каждой пациентки на присутствие тонких морщин, глубоких морщин, шероховатости, пятнистой гиперпигментации и другие параметры при помощи пятибалльной шкалы (0 = отсутствуют; 1 = минимальные; 2 = слабые; 3 = умеренные и 4 = тяжелые). Общую тяжесть поражения кожи солнечными лучами (морщины, шероховатость и пятнистая гиперпигментация) оценивали с помощью 10-балльной шкалы (0 = отсутствует; 1-3 = слабое; 4-6 = умеренное; и 7-9 = тяжелое); пациенток с исходными баллами оценки тяжести поражения более 6 исключали из исследования.

В каждый последующий визит исследователь оценивал общее улучшение, сравниваемое с начальными оценками, при помощи 6-балльной шкалы (1 = отличное улучшение; 2 = заметное улучшение; 3 = умеренное улучшение; 4 = легкое улучшение; 5 = нет улучшения и 6 = ухудшение).

### Восприятие пациентами эффективности лечения

При каждом последующем визите для оценки улучшения структуры кожи, цвета кожи, пятнистости (то есть, коричневые пятна), тонких морщин и общего улучшения по сравнению с начальными оценками, проводили опрос пациенток с целью заполнения анкеты самооценки по пятибалльной шкале (1 = значительно улучшилась; 2 = улучшилась в некоторой степени; 3 = нет изменений; 4 = ухудшилась в некоторой степени и 5 = значительно ухудшилась).

### Результаты

Были получены следующие результаты испытаний, усредненные для всех пациенток и приводимые как средние значения.

	Начальные показатели	Неделя 2	Неделя 4	Неделя 8	Неделя 12
TEWL (г/м <sup>2</sup> /час)	13,15	12,89	11,70*	13,08	9,54*
Изменение относительно начальных показателей		-1,98%	-9,62%	0,11%	-27,79%
Влажность кожи (условные единицы)	118,03	125,37*	141,30*	158,04*	165,42*
Изменение относительно начальных показателей		6,22%	20,96%	35,10%	41,21%

\* Значимое различие ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с начальными показателями.

Снижение величин TEWL указывает на улучшение барьерной функции кожи; увеличение величин TEWL может указывать на нарушение барьерных свойств. Повышение влажности кожи косвенно указывает на повышение уровней содержания влаги.

Для оценок исследователя общего состояния кожи были получены следующие результаты при помощи пятибалльной шкалы (0 = отсутствует; 1 = минимальное; 2 = слабое; 3 = умеренное; и 4 = тяжелое).

	Начальные показатели	Неделя 2	Неделя 4	Неделя 8	Неделя 12
Тонкие морщины	2,23	2,18	1,97*	1,74*	1,62*
Изменение относительно начальных показателей		-1,28%	-11,25%	-21,79%	-27,63%
Глубокие морщины	2,25	2,35	2,22	2,20	2,03*
Изменение относительно начальных показателей		4,44%	-4,76%	-7,23%	-13,75%
Шероховатость	1,68	1,05*	0,58*	0,23*	0,26*
Изменение относительно начальных показателей		-37,31%	-63,79%	-85,71%	-83,64%
Пятнистая гиперпигментация	1,73	1,70	1,50*	1,23*	1,03*
Изменение относительно начальных показателей		-1,45%	-15,63%	-30,65%	-40,68%
Раздражение кожи	0	0	0	0	0
Изменение относительно начальных показателей		0	0	0	0
Угри	0,63	0,60	0,53	0,53	0,32*
Изменение относительно начальных показателей		-4,00%	-13,64%	-9,52%	-45,00%
Эритема†	0,60	0,40††	0,31*	0,20*	0,21*
Изменение относительно начальных показателей		-33,33%	-47,62%	-66,67%	-66,67%%

\*Значимое различие ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с начальными показателями.

†Если данные ограничивались только пациентками, имеющими признаки эритемы в начале исследований, то было значимое различие для всех периодов времени. Когда данные ограничивались только пациентками, не имеющими признаков эритемы в начале исследований, то не было значимого повышения в любой период времени, указывающего на отсутствие индуцирования видимых признаков эритемы.

††Весьма вероятное ( $p=0,056$ ) значимое усиление эритемы на неделе 2

Отрицательный процент изменения параметров в вышеприведенной таблице означает улучшение соответствующего параметра. На основании оценок эксперта, не было отмечено значимого улучшения в одном или более периодов времени для тонких и глубоких морщин, шероховатости, пятнистой гипер-



пигментации, угрей и эритемы. Раздражение кожи не наблюдалось.

Оценка исследователя общего состояния кожи на основе косметического вида, относящаяся к старению кожи, при помощи 10-балльной шкалы (0 = нет; 1-3 = легкое; 4-6 = умеренное; и 7-9 = тяжелое) была следующей: 4,10 на начало исследования; 4,05 через 2 недели (-1,22% изменение относительно начальных показателей); 3,56 через 4 недели (-15,23% изменение относительно начальных показателей); 3,20 через 8 недель (-24,32% изменение относительно начальных показателей) и 3,03 через 12 недель (-27,97% изменение относительно начальных показателей). Различия, указанные для недель 4, 8 и 12, были статистически значимыми ( $p < 0,001$ ). Отрицательный процент изменения общего состояния кожи означает улучшение косметического вида стареющей кожи.

Оценка исследователя общего улучшения состояния кожи относительно начальных показателей) при помощи 6-балльной шкалы (1 = отличное улучшение; 2 = заметное улучшение; 3 = умеренное улучшение; 4 = легкое улучшение; 5 = нет улучшения и 6 = ухудшение) была следующей: 4,95 через 2 недели; 4,44 через 4 недели (-10,61% изменение относительно данных для 2 недель); 4,11 через 8 недель (-16,67% изменение относительно данных для 2 недель) и 4,12 через 12 недель (-17,16% изменение относительно данных для 2 недель). Различия, указанные для недель 4, 8 и 12, были статистически значимыми ( $p < 0,001$ ). Отрицательный процент изменения общего улучшения означает улучшение состояния кожи.

Результаты самооценки пациенток состояния кожи во время исследования при помощи пятибалльной шкалы (1 = значительно улучшилось; 2 = улучшилось в некоторой степени; 3 = нет изменений; 4 = ухудшилось в некоторой степени и 5 = значительно ухудшилось) были следующими:

	Неделя 2	Неделя 4	Неделя 8	Неделя 12
Структура кожи	2,21	2,03*	1,91*	1,74*
Изменение относительно данных для 2 недель		-8,97%	-15,58%	-23,38%
Цвет кожи	2,74	2,50*	2,23*	2,12*
Изменение относительно данных для 2 недель		-5,32%	-18,28%	-22,58%
Пятнистость / Коричневые пятна	2,70	2,58	2,26*	2,15*
Изменение относительно данных для 2 недель		-6,19%	-18,95%	-23,16%
Тонкие морщины	2,62	2,11*	2,00*	1,88*
Изменение относительно данных для 2 недель		-18,68%	-23,60%	-28,09%
Общее улучшение	2,36	2,14	1,97*	1,91*
Изменение относительно данных для 2 недель		-6,17%	-16,25%	-18,75%

Значимое различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными для двух недель.

Отрицательный процент изменения параметров в вышеприведенной таблице означает улучшение соответствующего параметра. Пациентки сообщали о значительном улучшении в один или более периодов времени для структуры кожи, цвета кожи, пятнистости, коричневых пятен и тонких морщин. Кроме того, пациентки сообщали о значимом улучшении через 8 и 12 недель общего состояния и вида их кожи.

В итоге, в течение периода исследования пациентки почувствовали значительное улучшение общего состояния кожи и значительное снижение отрицательных действий, связанных со старением, основанное как на оценке эксперта, так и на самооценке. Раздражение кожи или другие отрицательные действия не наблюдались.

Пример 24.

Этот пример сравнивает клинические данные для применяемого местно 6-фурфуриламино-9-(2-тетрагидропиранил)-пурина (0,10%), взятые из примера 23, с аналогичными клиническими данными, полученными для местного применения кинетина (0,1%) из более раннего исследования. Протокол более раннего клинического исследования кинетина был аналогичным протоколу, описанному в примере 23 для соединения изобретения; тридцать две женщины-добровольцы участвовали до конца в более раннем исследовании кинетина. Это сравнение основано на экспертных оценках и самооценках состояния кожи для данных на восьмую и двенадцатую неделю эксперимента для ряда параметров, оцениваемых в обоих исследованиях.

Сравнения на основе экспертной оценки были следующими:

	Средняя величина улучшения относительно начальных показателей			
	Данные для восьмой недели		Данные для двенадцатой недели	
	Кинетин	Соединение изобретения	Кинетин	Соединение изобретения
TEWL	13%	1%	15%	28%
Тонкие морщины	2%	22%*	6%*	28%*
Глубокие морщины	4%	7%	4%	14%*
Шероховатость	35%	86%*	52%*	84%*
Пятнистая гиперпигментация	25%*	31%*	25%*	41%*
Общее состояние кожи	3%	24%*	4%*	28%*

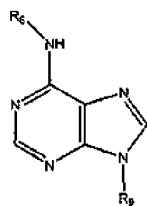
\*Клинически значимые улучшения ( $p < 0,05$ )

Сравнения на основе самооценок пациенток были следующие:

	Улучшения относительно начальных показателей, сообщенные пациентками			
	Данные для восьмой недели		Данные для двенадцатой недели	
	Кинетин	Соединение изобретения	Кинетин	Соединение изобретения
Структура	77%	83%	87%	88%
Тонкие морщины	57%	83%	71%	88%
Пятнистость	50%	60%	74%	63%
Цвет	53%	66%	71%	68%

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения интенсивности отрицательного воздействия старения на клетки млекопитающего, включающий применение эффективного количества производного 6,9-дизамещенного пурина общей формулы



или его фармацевтический приемлемой соли, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом и метоксизамещенным бензилом; где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофурилом.

2. Способ по п.1, где  $R_6$  является фурфурилом или метоксизамещенным фурфурилом, и  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом.

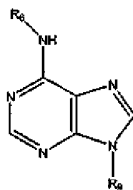
3. Способ по п.1, где количество составляет приблизительно от 0,05 до 10%.

4. Способ по п.2, где количество составляет приблизительно от 0,05 до 10%.

5. Способ по п.1, где количество составляет приблизительно от 0,1 до 2%.

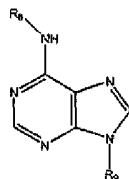
6. Способ по п.2, где количество составляет приблизительно от 0,1 до 2%.

7. Способ лечения заболевания кожи или состояния кожи у млекопитающего, включающий применение к клеткам кожи млекопитающего эффективного количества производного 6,9-дизамещенного пурина общей формулы



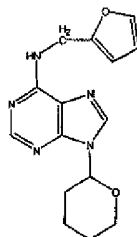
или его фармацевтический приемлемой соли, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом или метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофуранилом.

8. Способ лечения воспалительного состояния у млекопитающего, включающий применение к клеткам млекопитающего эффективного количества производного 6,9-дизамещенного пурина общей формулы



или его фармацевтически приемлемой соли, где  $R_6$  является фурфурилом, метоксизамещенным фурфурилом, фенилом, метоксизамещенным фенилом, или метоксизамещенным бензилом; и где  $R_9$  является 2-тетрагидропиранилом или 2-тетрагидрофуранилом.

9. Способ уменьшения интенсивности отрицательного действия старения на клетки млекопитающего, включающий применение к клеткам млекопитающего эффективного количества производного 6,9-дизамещенного пурина общей формулы

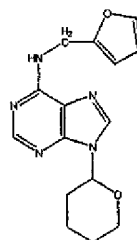


или его фармацевтический приемлемой соли.

10. Способ по п.9, где количество составляет приблизительно от 0,05 до 10%.

11. Способ по п.9, где количество составляет приблизительно от 0,1 до 2%.

12. Способ уменьшения интенсивности отрицательного действия старения на кожу человека, включающий применение к клеткам млекопитающего эффективного количества производного 6,9-дизамещенного пурина общей формулы



или его фармацевтический приемлемой соли.

13. Способ по п.12, где количество составляет приблизительно от 0,05 до 10%.

14. Способ по п.12, где количество составляет приблизительно от 0,1 до 2%.

