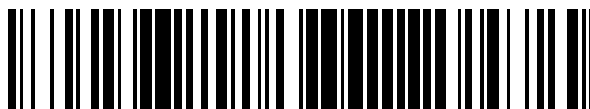


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 997**

51 Int. Cl.:

C07D 473/16 (2006.01)

C07D 473/34 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2008** **E 08866388 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 2245031**

54 Título: **Derivados de purina 6,9-disustituídos y su uso como cosméticos y composiciones cosméticas**

30 Prioridad:

28.12.2007 US 966559

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.05.2014

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BOTANY,
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH
REPUBLIC (100.0%)
Rozvojova 263
165 02 Prague 6 - Lysolaje, CZ**

72 Inventor/es:

**SZUCOVA, LUCIE;
ZATLOUKAL, MAREK;
SPICHAL, LUKAS;
VOLLER, JIRI;
DOLEZAL, KAREL;
STRNAD, MIROSLAV y
MASSINO, FRANK J.**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 463 997 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de purina 6,9-disustituidos y su uso como cosméticos y composiciones cosméticas

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a derivados de purina 6,9-disustituidos así como a su uso como, o en, cosméticos y/o preparaciones cosméticas.

10 **Antecedentes de la técnica**

En los últimos años, las aminopurinas 6-sustituidas han asumido una significación bioquímica considerada. Algunos compuestos de este tipo promueven el crecimiento de plantas y pertenecen al grupo de reguladores del crecimiento denominados citocininas (Letham, Ann. Rev. Plant. Physiol. 18, 349, 1967). En bioensayos de citocininas basados en la inducción de división celular en cultivos de tejidos vegetales, el compuesto más activo es la citocinina que se produce de manera natural, trans-zeatina (6-((E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino)purina: Letham, Planta 74:228, 1967). Las citocininas estrechamente relacionadas con zeatina se producen como bases en ARN soluble (Skoog *et al.*, Science 154:1354, 1966). En los ARN de serina y tirosina de levaduras, plantas y animales, la citocinina es adyacente al anticodón. El crecimiento de cultivos de células de mamífero se inhibe por determinadas adenosinas N⁶-sustituidas con actividad citocinina (Grace *et al.*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8:23, 1967). Tras el descubrimiento de quinetina (Miller *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 77:1392, 1955), hubo una oleada de actividad que condujo al hallazgo de 6-bencilaminopurina (BA), una citocinina activa y fácilmente obtenible. Posteriormente se realizaron muchas investigaciones sobre la fisiología de las citocininas con esta sustancia.

La alquilación de citocininas naturales en la posición 9 del núcleo de purina puede producirse en plantas. El ácido lupínico, un conjugado de zeatina en N9 con el aminoácido alanina, fue el primer metabolito de este tipo detectado (MacLeod *et al.*, J. Org. Chem. 41: 3959, 1976; Duke *et al.*, Phytochemistry 18:819, 1978; Parker *et al.*, Planta 142:239, 1978). Más tarde, se identificó el derivado de 9-alanilo correspondiente como metabolito de BA en plántulas de judías (Letham *et al.*, Phytochemistry 17:2053, 1979; Zhang *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:181, 1989). Como la 9-alanil-zeatina, presentó baja actividad biológica y mayor estabilidad que las bases correspondientes (Parker *et al.*, Planta 142:239, 1978; Palni *et al.*, Planta 160:242, 1984; Zhang *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:181, 1989). La minimización de la conjugación de BA ha sido de interés tanto biotecnológico como agronómico durante algún tiempo (véanse, por ejemplo, Zhang *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:181, 1989; Werbrouck *et al.*, Physiol. Plant. 98:291, 1996). Los derivados de BA 9-sustituidos que liberan lentamente BA libre pueden tener actividades citocinina potenciadas (por ejemplo, retardo de la senescencia, morfogénesis *in vitro*, estimulación de la división celular, etc.) ya que estos compuestos no están sujetos directamente a inactivación mediante conjugación.

Se han notificado varios derivados de citocininas 9-sustituidos pero sus relaciones estructura-actividad todavía siguen siendo un enigma. Los derivados de 9-alquilo más eficaces desarrollados hasta ahora son 9-(2-tetrahidropiranyl)-BA (van Overbeek *et al.*, Science 156:1497, 1967) y 9-(2-tetrahidrofuranil)-BA (Zhang *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:181, 1989), que demostraron ambos ser considerablemente más activos que BA en provocar varias respuestas de crecimiento. Puesto que el grupo tetrahidropiranyl se escinde fácilmente mediante hidrólisis ácida, se había sugerido que la alta actividad biológica de 9-(2-tetrahidropiranyl)-N⁶-alquiladeninas es probablemente una consecuencia de la escisión lenta del sustituyente en 9 (Young *et al.*, Phytochemistry 8: 1199, 1969). Posteriormente, Fox *et al.* (Plant Physiol. 47:275, 1971) estudiaron el metabolismo del 9-metil-BA menos activo en tejido calloso de soja y tabaco y demostraron la rápida conversión en varios productos. No se identificaron los metabolitos de manera definitiva, aunque se propuso que se producía la conversión en BA libre. Pietrafesa *et al.*, (Physiol. Plant. 53:249, 1981) examinaron el metabolismo de 9-metil-BA en la germinación de semilla de lechuga y sugirieron la formación de BAR y BAR5'P basándose en datos cromatográficos. No obstante, no se detectó BA libre. Finalmente, la aplicación de una 9-(2-tetrahidropiranyl)- y una 9-(2-tetrahidrofuranil)-BA, evaluadas por su capacidad de retardar la senescencia de hojas de soja, condujo a liberación de BA libre (Zhang *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:181, 1989). También se desbencilaron ambos compuestos en adenina sustituida con un resto 9-tetrahidropiranyl y 9-tetrahidrofuranilo, respectivamente. La alta actividad observada de estas 6-bencilamino-9-alquilpurinas podría ser una consecuencia de su capacidad para liberar la base libre y mantener una concentración óptima de las concentraciones de base libre a lo largo de un periodo prolongado (Zhang *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:181, 1989). Por tanto, la susceptibilidad a desalquilación enzimática es probablemente el factor crítico que determina la actividad biológica de 9-alquil-citocininas. Por tanto los compuestos menos activos (Kende *et al.*, Plant Physiol. 43: 1244, 1968; Young *et al.*, Phytochemistry 8:1199, 1969; Corse *et al.*, J. Plant Growth Regul. 8:211, 1989; Motyka *et al.*, SPB Acad Publ., ISBN 90-5103-066-5, pág. 215, 1992) probablemente no son susceptibles de escindir el sustituyente en 9 y presentan actividad baja o nula debido a su estabilidad. La actividad potenciada de 9-alquil-BA con relación a las de BA, puede atribuirse por consiguiente a su capacidad para liberar gradualmente la base libre activa.

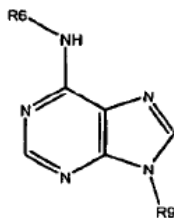
El documento US 2007/009474 da a conocer n-bencil-9-(2-tetrahidropiranyl)adenina para el tratamiento de la piel.

Esta invención proporciona análogos de citocininas reguladores del crecimiento, de diferenciación y antisenescentes

que tienen un índice de selectividad y eficacia mejorado (es decir, que son menos tóxicos aunque más eficaces) que los análogos conocidos hasta ahora.

Descripción de la invención

Esta invención proporciona derivados de purina 6,9-disustituídos de fórmula general I



y sus sales farmacéuticamente aceptables

en la que R6 es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heterocicloalquilo, heteroalquilo o arilalquilo que contiene al menos una sustitución de hidroxilo en el mismo, y

en la que R9 es un grupo tetrahidropiran-2-ilo, tetrahidrofuran-2-ilo, 4-clorobutilo o 1-etoxietilo;

en los que alquilo indica una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que contiene de 1 a 8 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionado del grupo que contiene grupo hidroxilo, halógeno, alquiloxilo, ariloxilo, alquilamino, arilamino, amino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, alquiloxicarbonilamino, ariloxicarbonilamino, arilo, heterociclo y heteroarilo;

en los que alquenilo indica una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada que contiene de 2 a 7 átomos de carbono con al menos un doble enlace en la misma (por ejemplo, vinilo, alilo, 1-propenilo, 1-metiletenilo, but-1 a 3-enilo, pent-1 a 4-enilo, hex-1 a 5-enilo, hept-1 a 6-enilo, alilo, isopentenilo, dimetilalilo) que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 6 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino,

en los que alquinilo indica una cadena de alquinilo ramificada o no ramificada que contiene de 2 a 7 átomos de carbono con al menos un triple enlace en la misma (por ejemplo, etinilo, propargilo, metiletinilo, but-1 a 3-inilo, pent-1 a 4-inilo, hex-1 a 5-inilo, hept-1 a 6-inilo) que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 6 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, alquiloxicarbonilamino y ariloxicarbonilamino;

en los que cicloalquilo indica un grupo alquilo monocíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 átomos de carbono (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o adamantilo) que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;

en los que arilo indica un grupo carbocíclico aromático que contiene de 6 a 18 átomos de carbono con al menos un anillo aromático o un anillo condensado múltiple con al menos un anillo aromático (por ejemplo, fenilo, bifenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, fluorenilo, indenilo, fenantrenilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, naftilo, antrilo o fenantrilo), que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;

en los que heterociclo indica un grupo heterocíclico que contiene de 4 a 9 átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que contiene átomo de oxígeno, átomo de azufre y átomo de nitrógeno (por ejemplo, tienilo, furilo, piranilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazilo, benzotienilo, naftotienilo, benzofuranilo, cromenilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, quinolilo, isoquinolilo, ftalazinilo, quinoxalinilo, cinolinilo o quinazolinilo), que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a

7 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquioxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquioxicarbonilamino;

5 en los que heteroarilo indica un heterociclo en el que al menos un anillo heterocíclico es aromático que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquioxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquioxicarbonilamino;

10 en los que heterocicloalquilo indica un grupo $-R_a\text{-Het}$ en el que Het es un grupo heterociclo y R_a es un grupo alquilo que puede estar opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquioxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquioxicarbonilamino;

15 en los que heteroarilalquilo indica un grupo $-R_a\text{-HetAr}$ en el que HetAr es un grupo heteroarilo y R_a es tal como se definió anteriormente;

20 en los que arilalquilo indica un grupo $-R_b\text{-Ar}$ en el que Ar es grupo arilo y R_b es una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, estando el grupo arilo sustituido independientemente con de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquioxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquioxicarbonilamino;

25 en los que halógeno indica un átomo de flúor, bromo, cloro o yodo,

en los que hidroxilo indica un grupo $-\text{OH}$,

30 en los que mercapto indica un grupo $-\text{SH}$,

en los que amino indica un grupo $-\text{NH}_2$,

35 en los que carbamoilo indica un grupo $-\text{CONH}_2$,

en los que ciano indica un grupo $-\text{CN}$,

en los que carboxilo indica un grupo $-\text{COOH}$,

40 en los que nitro indica un grupo $-\text{NO}_2$,

en los que sulfo indica un grupo $-\text{SO}_3\text{R}_c$ en el que R_c es hidrógeno o alquilo,

45 en los que sulfamido indica el grupo $\text{SO}_2\text{NR}_c\text{R}_c'$ en el que R_c y R_c' son independientemente hidrógeno o alquilo,

en los que acilo indica un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_d$, en el que R_d es alquilo, arilo, arilalquilo o cicloalquilo,

en los que aciloxilo indica un grupo $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{R}_e$ en el que R_e es alquilo, arilo o heterociclo,

50 en los que acilamino indica un grupo $-\text{NHCOR}_f$, en el que R_f es alquilo, heterociclo o arilo,

en los que alquioxicarbonilamino indica un grupo $-\text{NHCOOR}_g$ en el que R_g es alquilo o cicloalquilo,

en los que ariloxicarbonilamino indica un grupo $-\text{NHCOOR}_h$ en el que R_h es arilo,

55 en los que alquioxilo indica un grupo $-\text{OR}_h$ en el que R_h es alquilo, cicloalquilo o arilalquilo,

en los que ariloxilo indica un grupo $-\text{OR}_g$ en el que R_g es arilo,

60 en los que alquilamino indica un grupo $-\text{NR}_i\text{R}_j$ en el que R_i es hidrógeno, alquilo o heterociclo y R_j es alquilo o heterociclo,

en los que arilamino indica un grupo $-\text{NR}_k\text{R}_h$ en el que R_k es hidrógeno o arilo y R_h es alquilo, arilo o heterociclo,

65 en los que alquiltio indica un grupo $-\text{SR}_h$ en el que R_h es tal como se definió anteriormente, y

en los que arltilio indica un grupo -SR_g en el que R_g es tal como se definió anteriormente.

Los derivados de purina 6,9-disustituídos preferidos incluyen 6-(2-hidroxiciclopropilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxiciclobutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxiciclohexilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-3-clorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-clorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-4-clorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-3-yodobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-5-yodobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-4-yodobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-3-bromobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-bromobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-4-bromobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-3-fluorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-fluorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-4-fluorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2,3-dihidroxi-4-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2,4-dihidroxi-3-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2,5-dihidroxi-4-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3,5-dihidroxi-4-clorobencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-4-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-5-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-4-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-2-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3,5-dimetil-4-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3,5-dibromo-4-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroximetil-3-metilalil)amino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(Z)-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(E)-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-3-piridilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-4-piridilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(2-hidroxi-4-morfolinilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxi-1-pirrolidinilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-2-metilnilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilnilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-6-metilnilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-carboxi-4-hidroxianilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-2-metoxianilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metoxianilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los derivados de purina 6,9-disustituídos particularmente preferidos incluyen 6-(4-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(E)-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilnilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metoxianilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención son los derivados de purina 6,9-disustituídos de fórmula general I para su uso como cosméticos para inhibir el envejecimiento y la senescencia de células de mamífero, especialmente células epidérmicas tales como queratinocitos o fibroblastos.

Un aspecto adicional de la invención son los derivados de purina 6,9-disustituídos de fórmula general I para tratar estados patológicos de la piel (por ejemplo, lupus, eccema alérgico, eccema tóxico, dermatitis atópica, ictiosis,

papiloma, enfermedad de Bowen, queratosis seborreica, queratosis actínica, carcinoma de células escamosas y basales, y similares).

Otro aspecto de la invención son los derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I para tratar la inflamación, tratar o acelerar la cicatrización de lesiones, y proporcionar un alivio sustancialmente inmediato del dolor y/u otras respuestas inmunológicas resultantes de la inflamación.

En una realización preferida, los derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I se usan para tratar enfermedades de inflamación de la piel como dermatitis atópica, liquen plano, hiperpigmentación y lesiones por herpes simple.

La presente invención proporciona una composición que comprende uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I o sus sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; las sales farmacéuticamente aceptables especialmente preferidas se forman con metales alcalinos, amonio o aminas y pueden estar en forma de racematos, isómeros ópticamente activos, o sus sales de adición con ácidos. Tales composiciones pueden contener otros componentes siempre que sean aceptables para la aplicación a células de mamífero y no afecten o interfieran de manera adversa en las actividades del uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos; estos componentes pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más excipientes y/o componentes usados normalmente en productos cosméticos.

Un aspecto adicional de la invención es la composición que comprende uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, o sus sales de adición con ácidos, y uno o más excipientes destinados para inhibir el envejecimiento y la senescencia de células epidérmicas de mamífero, tales como queratinocitos o fibroblastos.

Un aspecto adicional de la invención es la composición que comprende uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, o sus sales de adición con ácidos, y uno o más excipientes destinados para tratar estados patológicos de la piel.

En una realización preferida, el objeto de la invención es la composición que comprende uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, o sus sales de adición con ácidos, y uno o más excipientes, destinados para tratar lupus, eccema alérgico, eccema tóxico, dermatitis atópica, ictiosis, papiloma, enfermedad de Bowen, queratosis seborreica, queratosis actínica, carcinoma de células escamosas y basales.

Otro aspecto de la invención es la composición que comprende uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general I o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con metales alcalinos, amonio o aminas, en forma de racematos o isómeros ópticamente activos, o sus sales de adición con ácidos, y uno o más excipientes destinados para tratar la inflamación, para acelerar la cicatrización de lesiones, y proporcionar un alivio sustancialmente inmediato del dolor y otras respuestas inmunológicas resultantes de la inflamación.

Las composiciones de la presente invención son útiles para inhibir el envejecimiento y/o la senescencia, mejorar el aspecto estético de células de mamífero (especialmente células epidérmicas tales como queratinocitos o fibroblastos) y/o piel de mamífero, y/o mejorar el efecto adverso del envejecimiento en células de mamífero (especialmente células epidérmicas tales como queratinocitos o fibroblastos). Para los fines de esta invención, "inhibir" pretende incluir ralentizar, revertir o detener el desarrollo de características cosméticas no deseadas, o de otra manera mejorar el aspecto estético. Estas composiciones son particularmente útiles para inhibir el envejecimiento y la senescencia y/o mejorar el aspecto estético de células epidérmicas humanas y/o piel humana.

Las composiciones de la presente invención también son útiles para el tratamiento de determinados estados patológicos de la piel, tales como lupus, eccema alérgico, eccema tóxico, dermatitis atópica, ictiosis, papiloma, enfermedad de Bowen, queratosis seborreica, queratosis actínica, carcinoma de células escamosas y basales, y similares.

Las composiciones de la presente invención también son útiles para tratar estados relacionados con inflamación, tales como inflamación, lesiones (por ejemplo, acelerar la cicatrización de las mismas), dolor y/u otras respuestas inmunológicas resultantes de, o relacionadas con, inflamación (por ejemplo, proporcionar un alivio de la misma) y/o tratar enfermedades de inflamación de la piel (por ejemplo, dermatitis atópica, liquen plano, hiperpigmentación, lesiones por herpes simple, y similares).

La presente invención proporciona además los derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general (I) para su uso en un método para mejorar el efecto adverso del envejecimiento en células de mamífero (especialmente células epidérmicas tales como queratinocitos o fibroblastos), comprendiendo dicho método aplicar una cantidad eficaz de

un derivado de purina 6,9-disustituido novedoso de esta invención a las células de mamífero. La aplicación de manera tópica a la piel humana es una realización especialmente preferida.

La presente invención proporciona además los derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general (I) para su uso en un método para tratar estados patológicos en un mamífero, comprendiendo dicho método aplicar una cantidad eficaz de un derivado de purina 6,9-disustituido novedoso de esta invención a las células de mamífero.

La presente invención proporciona además los derivados de purina 6,9-disustituidos de fórmula general (I) para su uso en un método para tratar un estado de inflamación en un mamífero, comprendiendo dicho método aplicar una cantidad eficaz de un derivado de purina 6,9-disustituido novedoso de esta invención a células de mamífero.

COMPOSICIONES. Las composiciones cosméticas de esta invención comprenden en general desde aproximadamente el 0,05% (p/p) hasta aproximadamente el 10% (p/p) del principio activo (es decir, uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos tal como se describen en el presente documento), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% (p/p) hasta aproximadamente el 2% (p/p). Las composiciones cosméticas pueden estar en forma de una crema, un aerosol, una loción lechosa, una loción, un emplasto, un cataplasma, un champú, una barra de labios, una pomada, una pasta, espuma, una tintura, una pulverización, o similares.

Las pomadas son emulsiones de aceite en agua, que comprenden no más del 70%, pero preferiblemente el 20 - 50% de agua o fase acuosa. La fase grasa consiste, en particular, en hidrocarburos, por ejemplo vaselina, aceite de parafina o parafinas duras, que comprenden preferiblemente hidroxicompuestos adecuados, tales como alcoholes grasos o ésteres de los mismos, por ejemplo alcohol cetílico o alcoholes de cera de lana, tales como cera de lana, para mejorar la capacidad de unión de agua. Los emulsionantes son sustancias lipófilas, tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitano (Span), por ejemplo oleato de sorbitano y/o isoestearato de sorbitano. Aditivos para la fase acuosa son, por ejemplo, humectantes, tales como polialcoholes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol y/o polietilenglicol, o conservantes y sustancias odoríferas.

Las pomadas grasas son anhidras y comprenden, como base, en particular, hidrocarburos, por ejemplo parafina, vaselina o aceite de parafina, y además grasas que se producen de manera natural o semisintéticas, por ejemplo triglicéridos de ácidos grasos de coco hidrogenados, o, preferiblemente, aceites hidrogenados, por ejemplo aceite de ricino o cacahuete hidrogenado, y además ésteres parciales de ácidos grasos de glicerol, por ejemplo mono y di-estearato de glicerol, y por ejemplo, alcoholes grasos. También pueden contener emulsionantes y/o aditivos mencionados en relación con las pomadas que aumentan la captación de agua.

Las cremas son emulsiones de aceite en agua, que comprenden más del 50% de agua. Bases aceitosas usadas son, en particular, alcoholes grasos, por ejemplo alcoholes laurílico, cetílico o estearílico, ácidos grasos, por ejemplo ácido palmítico o esteárico, ceras de líquidas a sólidas, por ejemplo miristato de isopropilo, cera de lana o cera de abejas, y/o hidrocarburos, por ejemplo vaselina (petrolato) o aceite de parafina. Los emulsionantes son sustancias tensioactivas con propiedades predominantemente hidrófilas, tales como emulsionantes no iónicos, por ejemplo ésteres de ácidos grasos de polialcoholes o aductos de etileno de los mismos, tales como ésteres de ácidos grasos poliglicéricos o ésteres grasos de polioxietileno-sorbitano (Tween), y además ésteres de alcoholes grasos de polioxietileno o ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, o emulsionantes iónicos, tales como sales de metales alcalinos de sulfatos de alcoholes grasos, por ejemplo laurilsulfato de sodio, cetilsulfato de sodio o estearilsulfato de sodio, que se usan habitualmente en presencia de alcoholes grasos, por ejemplo alcohol cetosteárico o alcohol estearílico. Aditivos para la fase acuosa son, entre otros, agentes que impiden que las cremas se sequen, por ejemplo polialcoholes, tales como glicerol, sorbitol, propilenglicol y/o polietilenglicoles, y además conservantes y sustancias odoríferas.

Las pastas son cremas y pomadas que contienen constituyentes de polvo que absorben secreciones, tales como óxidos metálicos, por ejemplo óxido de titanio u óxido de zinc, y además talco y/o silicatos de aluminio, que tienen la tarea de unirse a la humedad o las secreciones presentes.

Las suspensiones en aceite comprenden, como componente aceitoso, los aceites vegetales, sintéticos o semisintéticos. Aceites que pueden mencionarse son, en particular, ésteres de ácidos grasos líquidos que contienen, como componente ácido, un ácido graso de cadena larga que tiene 8-22, en particular 12-22, átomos de carbono, por ejemplo ácido láurico, ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido behénico o ácidos insaturados, por ejemplo ácido oleico, ácido eláidico, ácido eúrico, ácido brásídico o ácido linoleico, si es apropiado con la adición de antioxidantes, por ejemplo vitamina E, b-caroteno o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno. El componente de alcohol de estos ésteres de ácidos grasos no tiene más de 6 átomos de carbono y es mono o polihidroxilado, por ejemplo alcohol mono, di o trihidroxilado, por ejemplo metanol, etanol, propanol, butanol o pentanol, o isómeros de los mismos, pero en particular glicol y glicerol. Por tanto, los ésteres de ácidos grasos son, por ejemplo: oleato de etilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, "Labrafil M 2375" (trioleato de polioxietileno-glicerol de Gattefosé, París), "Labrafil M 1944 CS" (glicéridos poliglicolados insaturados preparados mediante una alcoholólisis de aceite de hueso de albaricque y compuestos por glicéridos y ésteres de polietilenglicol; de Gattefosé, París), "Labrasol" (glicéridos poliglicolados saturados preparados mediante una alcoholólisis de TCM y compuestos por glicéridos y ésteres de polietilenglicol; de Gattefosé,

París) y/o "Miglyol 812" (triglicérido de ácidos grasos saturados de longitud de cadena de C₈ a C₁₂ de Hüls AG, Alemania), y en particular aceites vegetales, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de almendras, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, aceite de soja y, en particular, aceite de cacahuete.

Se administran espumas desde recipientes presurizados y son emulsiones de aceite en agua líquidas presentes en espuma de aerosol. Como los gases propelentes, se usan hidrocarburos halogenados, tales como alcanos polihalogenados, por ejemplo diclorofluorometano y diclorotetrafluoroetano, o, preferiblemente, hidrocarburos gaseosos no halogenados, aire, N₂O o dióxido de carbono. Las fases aceitosas usadas son, entre otras, las mencionadas anteriormente para pomadas y cremas, y también se usan los aditivos mencionados en ese momento.

Las tinturas y disoluciones comprenden habitualmente una base etanólica acuosa a la que se añaden humectantes para reducir la evaporación, tales como polialcoholes, por ejemplo glicerol, glicoles y/o polietilenglicol, y sustancias de reengrase, tales como ésteres de ácidos grasos con polietilenglicoles inferiores, es decir, sustancias lipófilas solubles en la mezcla acuosa para sustituir las sustancias grasas eliminadas de la piel con el etanol, y, si es necesario, otros excipientes y aditivos.

La invención también se refiere a los derivados de purina 6,9-disustituídos de fórmula general (I) para su uso en un procedimiento o método para el tratamiento de la senescencia celular y los estados patológicos mencionados anteriormente. Los compuestos pueden administrarse profiláctica o terapéuticamente en forma de composiciones cosméticas, preferiblemente en una cantidad que es eficaz frente a la senescencia celular o los estados patológicos mencionados.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos de manera adicional. Los compuestos que no se encuentran dentro de la fórmula general I se incluyen en los ejemplos para fines de comparación.

El material de partida para los compuestos de fórmula I es 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina, sintetizado a partir de 6-cloropurina y 3,4-dihidropirano usando ácido p-toluenosulfónico según la bibliografía (Robins *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 83, 2574 (1961)). Se prepararon las bencilaminas sustituidas de partida, no disponibles comercialmente (obtenidas si no de Sigma Aldrich o Fluorochem), a partir de los aldehídos correspondientes en presencia de un catalizador metálico adecuado. Se preparó 3-metil-but-2-enilamina mediante una síntesis de tres etapas a partir del haluro correspondiente usando la síntesis de Gabriel. Se preparó 4-hidroxi-3-metil-E-but-2-enil-amina mediante una síntesis de cinco etapas a partir de isopreno según la bibliografía (Ohsugi *et al.*, Agr. Biol. Chem., 38 (10), 1925, (1974)).

Se realizaron análisis elementales (C, H y N) en el analizador EA1108 CHN (Fissons Instruments). Se determinaron los puntos de fusión en el aparato de punto de fusión B-540 de BÜCHI y están sin corregir. Se llevó a cabo cromatografía en capa fina (CCF) analítica usando placas de gel de sílice 60 WF₂₅₄ (Merck), disolvente CHCl₃:MeOH:NH₄OH conc. (8:2:0,2, v/v/v). Se registraron los espectros de masas ES+ usando sonda directa en el espectrómetro de masas ZMD 2000 de Waters. El intervalo de monitorización de masa fue de 10 - 1500 uma. Se recogieron los espectros usando barridos cíclicos de 3,0 segundos y aplicando un voltaje de cono de muestra de 25 V a una temperatura de bloqueo de fuente de 150°C, una temperatura de desolvatación de 80°C y una velocidad de flujo de gas de desolvatación de 200 l/hora. Se acopló directamente el espectrómetro de masas a un sistema de datos MassLynx. Se midieron los espectros de RMN en el espectrómetro Avance AV 300 de Bruker funcionando a una temperatura de 300 K y una frecuencia de 300,13 MHz (¹H) y 75,48 MHz (¹³C), respectivamente. Se prepararon las muestras disolviendo los compuestos en DMSO-d₆. Se usó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

EJEMPLO 1: 6-(4-Hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 4-hidroxibencilamina y 5 ml de trietilamina en n-propanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó el disolvente de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de dietil éter. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 80%, sólido blanco. CCF (EtOAc:hexano (1:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,57 tt (2H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 3,3 Hz); 1,72 qq (1H, J_a = 12 Hz, J_b = 3,3 Hz); 1,95 tt (2H, J_a = 11 Hz, J_b = 2,1 Hz); 2,27 qq (1H, J_a = 12,0 Hz, J_b = 3,3 Hz); 3,67 m (1H); 4,0 dd (1H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 2,1 Hz); 4,6 s (2H); 5,63 dd (1H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 2,1 Hz); 6,67 d (2H, J = 8,4 Hz); 7,15 d (2H, J = 8,4 Hz); 8,02 sa (1H); 8,21 s (1H); 8,33 s (1H); 9,21 s (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 326 (100).

EJEMPLO 2: 6-(3-Hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 3-hidroxibencilamina y 5 ml de trietilamina en n-butanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-butanol mediante evaporación a vacío se añadió agua para eliminar los residuos de n-butanol. Se trató el material resultante con agua y se repartió en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el

residuo posteriormente con 30 ml de dietil éter. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 90%, sólido blanco. CCF (EtOAc:hexano (1:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 99%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,57 m (2H); 1,70 m (1H); 1,95 m (2H); 2,27 qq (1H, J_a = 11,7 Hz, J_b = 4,0 Hz); 3,66 m (1H); 4,0 d (1H); 4,63 sa (2H); 5,67 dd (1H, J_a = 11,3 Hz, J_b = 1,8 Hz); 6,58 dd (1H, J_a = 8,2 Hz, J_b = 1,5 Hz); 6,73 (d, 1H, J = 7,7 Hz); 7,07 t (1H, J = 7,7 Hz); 8,21 s (1H); 8,33 sa (1H); 8,36 sa (1H); 9,26 s (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 326 (100).

EJEMPLO 3: 6-(2-Hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 2-hidroxibencilamina y 5 ml de trietilamina en n-propanol durante 3 h. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó el disolvente de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de dietil éter. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 90%, sólido blanco. CCF (EtOAc:hexano (1:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,58 m (2H); 1,70 m (1H); 1,95 m (2H); 2,26 qq (1H, J_a = 11,8 Hz, J_b = 4,0 Hz); 3,67 m (1H); 4,0 d (1H, J = 11,3 Hz); 4,64 sa (2H); 5,63 dd (1H, J_a = 11,3 Hz, J_b = 1,8 Hz); 6,73 t (1H, J = 7,5 Hz); 6,82 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 7,06 t (1H, J = 7,5 Hz); 7,14 d (1H, J = 7,5 Hz); 8,21 s (1H); 8,35 sa (1H); 8,37 sa (1H); 9,82 sa (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 326 (100).

EJEMPLO 4: 6-(2,3-Dihidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (2100 mg) de clorhidrato de 2,3-dihidroxibencilamina y 7 ml de trietilamina en n-propanol durante 3 h. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó el disolvente de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de éter de petróleo. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 60%, sólido blanco. CCF (CHCl₃:metanol) (4:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO): 1,57 m (2H); 1,71 m (1H); 1,95 m (2H); 2,27 qq (1H, J_a = 12 Hz, J_b = 4,0 Hz); 3,67 m (1H); 4,00 d (1H, J = 11,7 Hz); 4,58 sa (2H); 5,63 dd (1H, J_a = 11,2 Hz, J_b = 1,9 Hz); 6,55 tt (1H, J_a = 7,7 Hz, J_b = 1,5 Hz); 6,63 dd (1H, J_a = 7,7 Hz, J_b = 1,8 Hz); 6,66 dd (1H, J_a = 7,7 Hz, J_b = 1,8 Hz); 8,24 s (1H); 8,27 sa (1H); 8,37 s (1H); 8,96 sa (1H); 9,53 sa (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 342 (100).

EJEMPLO 5: 6-(E)-(4-Hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1754 mg) de (E)-hemioxalato de (4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamina) y 3 ml de trietilamina en n-butanol durante 3 h. Tras la eliminación del n-butanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de dietil éter. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 75%, sólido blanco. CCF (CHCl₃:metanol) (4:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,36 m (2H); 1,66 s (3H); 1,71 m (1H); 1,94 m (2H); 2,25 m (1H); 3,67 m (1H); 3,78 d (2H, J = 5,7 Hz); 4,00 d (1H, J = 10,8 Hz); 4,14 sa (2H); 4,71 t (1H, J = 5,7 Hz); 5,52 t (1H, J = 6,0 Hz); 5,61 dd (1H, J_a = 10,8 Hz, J_b = 2,0 Hz); 7,83 sa (1H); 8,21 s (1H); 8,31 sa (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 304 (100).

EJEMPLO 6: 6-(4-Hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (2318 mg) de oxalato de 4-hidroxi-3-metilbutilamina y 5 ml de trietilamina en n-propanol durante 3 horas y posteriormente 24 horas a la temperatura del laboratorio. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se repartió en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de hexano. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 75%, sólido blanco. CCF (CHCl₃:metanol) (4:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 0,88 d (3H, J = 6,6 Hz); 1,34 m (1H); 1,56 m (3H); 1,70 m (1H); 1,71 m (1H); 1,93 m (2H); 1,94 m (1H); 2,26 m (1H); 3,25 m (1H); 3,52 sa (2H); 3,67 m (1H); 4,0 d (1H, J = 11,3 Hz); 4,42 t (1H, J = 5,1 Hz); 5,61 d (1H, J = 10,6 Hz); 7,10 sa (1H); 8,20 s (1H); 8,30 s (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 306 (100).

EJEMPLO 7: 6-(4-Hidroxianilino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2387 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidropiran-2-il)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1309 mg) de 4-hidroxifenilamina (4-hidroxianilina) y 4 ml de N-etildiisopropilamina en n-butanol durante 3 h. Tras la eliminación del n-butanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó el disolvente de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de éter. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento: 90%, sólido blanco. CCF (CHCl₃:CH₃OH:NH₃) (90:10:0,1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,56 tt (2H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 3,3 Hz); 1,72 qq (1H, J_a = 11,6 Hz, J_b = 3,3 Hz); 1,94 tt (2H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 3,3 Hz); 2,28 qq (1H, J_a = 11,6 Hz, J_b = 3,3 Hz); 3,66 m (1H); 3,98 dd (1H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 2,1 Hz); 5,62 dd (1H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 2,1 Hz); 7,02 d (2H, J = 8,5 Hz); 8,19 s (1H); 8,26 d (2H, J = 8,5 Hz); 8,29 s (1H); 8,95 s (1H). EM (ES+): [M+H]⁺ = 312 (100).

Tabla 1: Compuestos preparados mediante el método de los ejemplos 1-7

SUSTITUYENTE DE PURINA			ANÁLISIS DE CHN [%]	ANÁLISIS DE EM - ZMD	
	R6	R9		[M-H] ^{-a)}	[M+H] ^{+b)}
1	(E)-(4-hidroxi-2-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,0; H = 6,7; N = 23,6	302	304
2	(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,8; H = 6,9; N = 23,5	302	304
3	(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,6; H = 6,9; N = 22,8	302	304
4	(Z)-(4-hidroxi-1,3-dimetilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	C = 60,0; H = 7,4; N = 22,4	316	318
5	(E)-(4-hidroxi-1,3-dimetilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	C = 60,4; H = 7,5; N = 22,4	316	318
6	4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 58,9; H = 7,5; N = 23,0	304	306
7	4-hidroxi-2-en-1-ilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 58,1; H = 6,6; N = 24,2	288	290
8	2-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 62,4; H = 5,9; N = 21,3	324	326
9	3-hidroxi-4-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 62,8; H = 5,9; N = 21,3	324	326
10	4-hidroxi-5-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 62,7; H = 5,8; N = 21,6	324	326
11	2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,6; H = 6,3; N = 20,2	354	356
12	2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,6; H = 6,3; N = 20,3	354	356
13	2-hidroxi-5-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,6; H = 6,3; N = 20,2	354	356
14	2,3-dihidroxi-4-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,9; H = 5,7; N = 20,7	340	342
15	2,4-dihidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,7; H = 5,6; N = 20,5	340	342
16	2,5-dihidroxi-2-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 60,0; H = 5,7; N = 20,6	340	342
17	2,6-dihidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,5; H = 5,6; N = 20,9	340	342
18	3,4-dihidroxi-2-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 60,1; H = 5,7; N = 20,6	340	342
19	3,5-dihidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 60,1; H = 5,6; N = 20,7	340	342
20	4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,1; H = 5,8; N = 18,4	384	386
21	4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,1; H = 5,9; N = 18,6	384	386
22	4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,6; H = 6,3; N = 20,2	354	356
23	3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,5; H = 6,3; N = 20,2	354	356
24	2,3,4-trihidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 57,2; H = 5,4; N = 19,7	356	358
25	2,4,5-trihidroxi-2-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 57,2; H = 5,2; N = 20,2	356	358
26	2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,4; H = 6,3; N = 20,2	338	340
27	2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,1; H = 6,4; N = 20,4	338	340
28	4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,5; H = 6,3; N = 20,5	338	340
29	4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 63,7; H = 6,4; N = 20,4	338	340
30	3-hidroxi-4-furfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 57,0; H = 5,3; N = 22,4	314	310
31	4-hidroxi-5-furfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 57,0; H = 5,4; N = 22,3	314	316

32	5-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 57,1; H = 5,4; N = 22,3	314	316
33	5-hidroxi-pent-2-en-1-ilo	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,4; H = 6,9; N = 23,1	302	304
34	2-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 61,6; H = 5,6; N = 22,8	310	312
35	3-hidroxiinilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 61,6; H = 5,5; N = 23,0	310	312
36	4-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 61,2; H = 5,5; N = 22,6	310	312
37	4-hidroxi-3-metilanolino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 62,7; H = 5,9; N = 21,7	324	326
38	4-hidroxi-5-metilanolino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 62,8; H = 5,9; N = 21,7	324	326
39	2,4-dihidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 58,6; H = 5,2; N = 21,7	326	328
40	3,4-dihidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 58,5; H = 5,2; N = 21,1	326	328
41	4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 58,0; H = 5,8; N = 19,1	370	372
42	4-hidroxi-2,6-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 57,7; H = 5,8; N = 19,1	370	372
43	3-hidroxi-4-metoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,6; H = 5,6; N = 20,8	340	342
44	2,3,4-trihidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 5,7; H = 5,1; N = 20,9	342	344
45	4-hidroxi-3-metoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 59,8; H = 5,6; N = 20,5	340	342
46	1-metil-4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	C = 60,2; H = 7,9; N = 21,9	318	320
a) Disolución: MeOH p.a. + HCOOH					
b) Disolución: MeOH p.a. + H ₂ O + NH ₃					

EJEMPLO 8: 6-(4-Hidroxibencilamino)-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2240 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 4-hidroxibencilamina y 5 ml de N-etildisopropilamina en n-propanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de éter de petróleo. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 80%, sólido blanco. CCF (EtOAc:hexano (1:1) (v:v)): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,36 tt (2H, J_a = 7,8 Hz, J_b = 2,2 Hz); 2,23 m (1H); 2,32 m (1H); 3,62 dd (1H, J_a = 10,8 Hz, J_b = 3,8 Hz); 3,87 dd (1H, J_a = 10,8 Hz, J_b = 3,8 Hz); 4,62 s (2H); 6,23 dd (1H, J_a = 5,3 Hz, J_b = 1,5 Hz); 6,71 d (2H, J = 8,3 Hz); 7,21 d (2H, J = 8,3 Hz); 8,06 sa (1H); 8,16 s (1H); 8,28 s (1H); 9,23 s (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 312 (100).

EJEMPLO 9: 6-(3-Hidroxibencilamino)-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2240 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 3-hidroxibencilamina y 5 ml de N-etildisopropilamina en n-propanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de éter de petróleo. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 85%, sólido blanco. CCF (EtOAc: hexano (1:1) (v:v)): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 2,20 sep. (1H, J = 6,8 Hz); 2,22 sep. (1H, J = 6,8 Hz); 2,44 m (2H); 3,91 q (1H, J = 7,3 Hz); 4,14 q (1H, J = 7,3 Hz); 4,63 sa (2H); 6,26 m (1H); 6,59 dd (1H, J_a = 7,8 Hz, J_b = 2,2 Hz); 6,73 s (1H); 6,75 d (1H, J = 7,8 Hz); 7,07 t (1H, J = 7,8 Hz); 8,20 s (1H); 8,26 sa (1H); 8,27 s (1H); 9,23 sa (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 312 (100).

EJEMPLO 10: 6-(2-Hidroxibencilamino)-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2240 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 2-hidroxibencilamina y 5 ml de trietilamina en n-propanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de éter de petróleo. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 80%, sólido blanco. CCF (EtOAc:hexano) (1:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 2,22 sep. (1H); 2,44 m (1H); 3,82 q (1H, J = 7,3 Hz); 4,15 q (1H, J = 7,3 Hz); 4,69 sa (2H); 6,26 m (1H); 6,73 t (1H, J = 7,5 Hz); 6,82 d (1H, J = 7,9 Hz); 7,06 t (1H, J = 7,8 Hz); 7,17 d (1H, J = 7,3 Hz); 8,05 sa (1H); 8,22 s (1H); 8,23 s (1H); 9,82 sa (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 312 (100).

EJEMPLO 11: 6-(4-Hidroxi-3-metoxibencilamino)-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2240 mg) de 6-cloro-9-(tetrahidrofuran-2-il)-purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1838 mg) de 4-hidroxi-3-metoxibencilamina y 5 ml de trietilamina en n-propanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-propanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de éter de petróleo. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento del 80%, sólido blanco. CCF (EtOAc:hexano) (1:1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 0,90 d (3H, J = 6,6 Hz); 1,32 m (1H); 1,57 m (1H); 1,84 m (1H); 1,95 m (1H); 2,12 m (2H); 2,29 m

(1H); 3,26 m (1H); 3,51 sa (2H); 3,73 m (1H); 3,89 m (1H); 4,40 t (1H, J = 5,1 Hz); 6,12 d (1H, J = 5,2 Hz); 7,74 sa (1H); 8,18 s (1H); 8,28 s (1H: EM (ES): $[M+H]^+ = 342$ (100).

Tabla 2: Compuestos preparados mediante el método de los ejemplos 8-11;

SUSTITUYENTE DE PURINA			ANÁLISIS DE CHN [%]	ANÁLISIS DE EM - ZMD	
	R6	R9		$[M-H]^{-a)}$	$[M+H]^{+b)}$
47	(E)-(4-hidroxi-2-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,7; H = 6,3; N = 24,7	288	290
47	(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,6; H = 6,8; N = 23,9	288	290
49	(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,9; H = 6,4; N = 24,5	288	290
50	(Z)-(4-hidroxi-1,3-dimetilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,0; H = 7,2; N = 23,1	302	304
51	(E)-(4-hidroxi-1,3-dimetilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,0; H = 7,2; N = 23,3	302	304
52	4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,8; H = 7,3; N = 24,1	290	292
53	1-metil-4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,0; H = 7,6; N = 22,9	304	306
54	4-hidroxibut-2-en-1-ilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 56,7; H = 6,2; N = 25,4	274	276
55	2-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 61,5; H = 5,5; N = 22,7	310	312
56	3-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 61,5; H = 5,4; N = 22,5	310	312
57	4-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 61,5; H = 5,4; N = 22,7	310	312
58	2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,7; H = 5,1; N = 21,0	340	342
59	2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,5; H = 5,5; N = 20,9	340	342
60	2-hidroxi-5-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,6; H = 5,5; N = 20,7	340	342
61	2,3-dihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,5; H = 5,2; N = 21,5	326	328
62	2,4-dihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,7; H = 5,1; N = 21,5	326	328
63	2,5-dihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 55,8; H = 5,1; N = 21,4	326	328
64	2,6-dihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,5; H = 5,1; N = 21,7	326	328
65	3,4-dihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,7; H = 5,2; N = 21,5	326	328
66	3,5-dihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,5; H = 5,1; N = 21,5	326	328
67	4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,0; H = 5,6; N = 19,3	370	372
68	4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,7; H = 5,6; N = 19,5	370	372
69	4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,7; H = 5,5; N = 20,8	340	342
70	3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,8; H = 5,6; N = 20,6	340	342
71	2,3,4-trihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,7; H = 6,0; N = 18,3	384	386
72	2,4,5-trihidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 59,2; H = 6,1; N = 18,7	384	386
73	2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 62,5; H = 6,0; N = 22,0	324	326
74	2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 62,1; H = 5,8; N = 21,9	324	326
75	4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 62,9; H = 5,8; N = 21,4	324	326
76	4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 62,6; H = 5,8; N = 21,6	324	326
77	3-hidroxifurfurilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 55,5; H = 5,1; N = 23,8	300	302
78	4-hidroxifurfurilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 55,9; H = 5,2; N = 22,7	300	302
79	5-hidroxifurfurilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 55,4; H = 4,9; N = 23,5	300	302
80	5-hidroxi-pent-2-en-1-ilo	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,1; H = 6,6; N = 24,2	288	290
81	2-hidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 60,3; H = 5,0; N = 23,6	296	298

82	3-hidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 60,1; H = 5,1; N = 23,7	296	298
83	4-hidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 60,4; H = 5,0; N = 23,7	296	298
84	4-hidroxi-3-metilanilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 61,5; H = 5,2; N = 22,7	310	312
85	4-hidroxi-5-metilanilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 61,6; H = 5,2; N = 22,8	310	312
86	2,4-dihidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,1; H = 4,7; N = 22,7	312	314
87	3,4-dihidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,4; H = 4,8; N = 22,3	312	314
88	4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 56,9; H = 5,4; N = 20,1	356	358
89	4-hidroxi-2,6-dimetoxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 57,0; H = 5,6; N = 19,9	356	358
90	3-hidroxi-4-metoxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,4; H = 5,6; N = 21,5	326	328
91	4-hidroxi-3-metoxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 58,7; H = 5,2; N = 21,4	326	328
92	2,3,4-trihidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 54,1; H = 4,4; N = 19,9	328	330
93	2,4,5-trihidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	C = 54,3; H = 4,3; N = 19,8	328	330
a) Disolución: MeOH p.a. + HCOOH					
b) Disolución: MeOH p.a. + H ₂ O + NH ₃					

EJEMPLO 12: 6-(4-Hidroxibencilamina)-9-(4-clorobutil)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2451 mg) de 6-cloro-9-(4-clorobutil)purina (preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina), 12 mmol (1478 mg) de 4-hidroxibencilamina y 5 ml de trietilamina en n-butanol durante 3 horas. Tras la eliminación del n-butanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó el disolvente de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de dietil éter. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en metanol. Rendimiento: 70%, sólido blanco. CCF (CHCl₃:CH₃OH:NH₃) (85:15:0,1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,89 m (4H); 3,46 dd (2H, J_a = 11,0 Hz, J_b = 3,6 Hz); 4,22 tt (2H, J_a = 13,0 Hz, J_b = 3,5 Hz); 4,61 s (2H); 6,59 d (2H, J = 8,3 Hz); 7,27 d (2H, J = 8,3 Hz); 8,18 s (1H); 8,22 sa (1H); 8,31 s (1H); 9,18 s (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 346 (100).

Tabla 3: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 12

SUSTITUYENTE DE PURINA			ANÁLISIS DE CHN [%]	ANÁLISIS DE EM - ZMD	
	R6	R9		[M-H] ^{-a)}	[M+H] ^{+b)}
94	(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	4-clorobutilo	C = 54,2; H = 6,5; N = 22,7	308	310
95	(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	4-clorobutilo	C = 54,0; H = 6,4; N = 23,1	308	310
96	4-hidroxi-3-metilbutilamino	4-clorobutilo	C = 53,5; H = 7,1; N = 23,1	310	312
97	1-metil-4-hidroxi-3-metilbutilamino	4-clorobutilo	C = 55,3; H = 7,4; N = 21,5	324	326
98	4-hidroxibut-2-en-1-ilamino	4-clorobutilo	C = 52,8; H = 6,1; N = 11,9	294	296
99	2-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 57,5; H = 5,5; N = 21,2	344	346
100	3-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 58,1; H = 5,5; N = 21,3	344	346
101	4-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 57,8; H = 5,4; N = 21,7	344	346
102	2-hidroxi-3-metoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,9; H = 5,5; N = 19,9	360	362
103	2-hidroxi-4-metoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 56,1; H = 5,6; N = 19,7	360	362
104	2-hidroxi-5-metoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 56,5; H = 5,7; N = 19,0	360	362
105	2,3-dihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,2; H = 5,1; N = 20,4	346	348
106	2,4-dihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,1; H = 5,2; N = 20,6	346	348
107	2,5-dihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,2; H = 5,2; N = 20,4	346	348
108	2,6-dihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,1; H = 5,1; N = 20,4	346	348
109	3,4-dihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,0; H = 5,2; N = 20,1	346	348
110	3,5-dihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,3; H = 5,2; N = 20,2	346	348
111	4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,0; H = 5,7; N = 18,1	390	392
112	4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 55,1; H = 5,7; N = 18,2	390	392
113	4-hidroxi-3-metoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 56,1; H = 5,6; N = 19,6	360	362
114	3-hidroxi-4-metoxibencilamino	4-clorobutilo	C = 56,1; H = 5,5; N = 19,7	360	362
115	2,3,4-trihidroxibencilamino	4-clorobutilo,	C = 52,1; H = 4,7; N = 19,8	362	364

116	2,4,5-trihidroxibencilamino	4-clorobutilo	C = 52,4; H = 4,9; N = 19,5	362	364
117	2-hidroxi-3-metilbencilamino	4-clorobutilo	C = 58,7; H = 5,7; N = 20,7	344	346
118	2-hidroxi-5-metilbencilamino	4-clorobutilo	C = 59,2; H = 5,9; N = 19,9	344	346
119	4-hidroxi-3-metilbencilamino	4-clorobutilo	C = 58,7; H = 5,8; N = 20,4	344	346
120	4-hidroxi-5-metilbencilamino	4-clorobutilo	C = 58,9; H = 5,7; N = 20,4	344	346
121	3-hidroxifurfurilamino	4-clorobutilo	C = 52,2; H = 5,0; N = 22,4	320	322
122	4-hidroxifurfurilamino	4-clorobutilo	C = 52,1; H = 5,0; N = 22,1	320	322
123	5-hidroxifurfurilamino	4-clorobutilo	C = 52,4; H = 5,2; N = 21,9	320	322
124	2-hidroxianilino	4-clorobutilo	C = 56,7; H = 5,1; N = 21,9	316	318
125	3-hidroxianilino	4-clorobutilo	C = 56,3; H = 5,0; N = 22,3	316	318
126	4-hidroxianilino	4-clorobutilo	C = 56,6; H = 5,0; N = 22,4	316	318
^{a)} Disolución: MeOH p.a. + HCOOH ^{b)} Disolución: MeOH p.a. + H ₂ O + NH ₃ * para ³⁵ Cl					

EJEMPLO 13: 6-(4-Hidroxibencilamina)-9-(1-etoxiet-2-il)purina. Se sometió a reflujo una mezcla de 10 mmol (2270 mg) de 6-cloro-9-(1-etoxiet-2-il)purina preparada a partir de 10 mmol (1546 mg) de 6-cloropurina, 12 mmol (1478 mg) de 4-hidroxibencilamina y 4 ml de N-etildisopropilamina en n-butanol durante 3 h. Tras la eliminación del n-butanol mediante evaporación a vacío, se trató el material resultante con agua y se extrajo en acetato de etilo. Se evaporó la fase de acetato de etilo y se lavó el residuo posteriormente con 30 ml de hexano. Se retiró el residuo sólido mediante filtración y se cristalizó el producto bruto en isopropanol. Rendimiento: 65%, sólido blanco. CCF (CHCl₃:CH₃OH:NH₃ (85:15:0,1) (v:v): mancha única; HPLC: pureza > 98%. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): 1,12 t (3H, J = 6,8 Hz); 3,16 m (1H); 3,23 m (1 H); 3,82 dd (2H, J_a = 13,0 Hz, J_b = 3,8 Hz); 4,31 m (2H); 4,60 s (2H); 6,70 d (2H, J = 8,3 Hz); 7,30 d (2H, J = 8,3 Hz); 8,18 sa (1H); 8,23 s (1H); 8,32 s (1H); 9,25 s (1H). EM (ES): [M+H]⁺ = 314 (100).

Tabla 4: Compuestos preparados mediante el método del ejemplo 13

SUSTITUYENTE DE PURINA			ANÁLISIS DE CHN [%]	ANÁLISIS DE EM - ZMD	
	R6	R9		[M-H] ^{-a)}	[M+H] ^{+b)}
127	(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	1-etoxiet-2-ilo	C = 57,0; H = 7,2; N = 24,3	290	292
128	(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	1-etoxiet-2-ilo	C = 57,1; H = 7,3; N = 24,2	290	292
129	4-hidroxi-3-metilbutilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 57,1; H = 7,6; N = 24,2	292	294
130	4-hidroxibut-2-en-1-ilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 56,3; H = 6,9; N = 25,2	276	278
131	2-hidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 60,9; H = 6,0; N = 22,9	312	314
132	3-hidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 61,1; H = 6,0; N = 22,5	312	314
133	4-hidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 60,8; H = 6,1; N = 22,5	312	314
134	2-hidroxi-3-metoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 59,1; H = 6,0; N = 21,0	342	344
135	2-hidroxi-4-metoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 59,5; H = 6,0; N = 20,6	342	344
136	2-hidroxi-5-metoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 59,3; H = 6,0; N = 20,9	342	344
137	2,3-dihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 58,0; H = 5,7; N = 21,4	328	330
138	2,4-dihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 58,5; H = 5,5; N = 21,9	328	330
139	2,5-dihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 58,4; H = 5,8; N = 21,3	328	330
140	2,6-dihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 58,5; H = 5,8; N = 21,7	328	330
141	3,4-dihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 58,1; H = 5,7; N = 21,7	328	330
142	3,5-dihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 58,3; H = 5,8; N = 21,8	328	330
143	4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 57,4; H = 6,4; N = 19,0	372	374
144	4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 57,6; H = 6,8; N = 19,3	372	374
145	4-hidroxi-3-metoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 59,2; H = 6,2; N = 20,4	342	344
146	3-hidroxi-4-metoxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 59,0; H = 6,3; N = 20,4	342	344
147	2,3,4-trihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 55,5; H = 5,6; N = 20,8	344	346
148	2,4,5-trihidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	C = 55,1; H = 5,3; N = 20,4	344	346
^{a)} Disolución: MeOH p.a. + HCOOH ^{b)} Disolución: MeOH p.a. + H ₂ O + NH ₃ * para ³⁵ Cl					

EJEMPLO 14: Estimación de la actividad biológica como citocininas de compuestos novedosos en bioensayo de callo. Se mantuvo callo de tabaco dependiente de citocininas *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 a 25°C en la oscuridad en medio MS modificado, que contenía por 1 litro: 4 mmol de ácido nicotínico, 2,4 mmol de clorhidrato de

piridoxina, 1,2 mmol de tiamina, 26,6 mmol de glicina, 1,37 mmol de glutamina, 1,8 mmol de mio-inositol, 30 g de sacarosa, 8 g de agar, 5,37 mmol de NAA y 0,5 mmol del compuesto sometido a prueba. Se llevó a cabo subcultivo cada tres semanas. Catorce días antes del bioensayo, se transfirió el tejido caloso a los medios sin el compuesto sometido a prueba. Se determinó la actividad biológica a partir del aumento del peso del callo fresco tras cuatro semanas de cultivo. Se prepararon cinco réplicas para cada concentración del compuesto sometido a prueba y se repitió dos veces toda la prueba. A partir de los datos obtenidos, se seleccionó la concentración con la mayor actividad para cada compuesto sometido a prueba. Se calculó la actividad relativa del compuesto a esta concentración (tabla 8). Se definió la actividad obtenida para 6-bencilaminopurina (BAP) 10^{-5} M como el 100%.

Se disolvieron los compuestos que iban a someterse a prueba en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó la disolución hasta 10^{-3} M con agua destilada. Se diluyó adicionalmente esta disolución madre con los respectivos medios usados para la prueba biológica hasta una concentración que oscilaba entre 10^{-8} M y 10^{-4} M. La concentración final de DMSO no superó el 0,2% y por tanto no afectó a la actividad biológica en el sistema de ensayo usado. Los compuestos enumerados en la tabla 5 pueden dividirse en dos grupos. El primer grupo contiene citocininas naturales representadas por purinas N⁶-sustituidas (compuestos conocidos en la técnica anterior que sirven como control). El segundo grupo contiene las purinas 6,9-disustituidas novedosas derivadas de los compuestos del primer grupo. Los resultados en la tabla 5 muestran que la sustitución en la posición 9 del anillo de purina con tetrahidropiraniolo, tetrahidrofuranilo y otros sustituyentes fácilmente escindibles condujo en general a un aumento de la actividad citocinina en el bioensayo de callo en comparación con los análogos de citocinina originales.

Tabla 5: El efecto de compuestos novedosos sobre el crecimiento de callo de tabaco dependiente de citocininas
Nicotiana tabacum L. cv. Wisconsin 38

Compuesto sometido a prueba		concentración con mayor actividad (mol.l ⁻¹)	Actividad (%) [10^{-5} mol.l ⁻¹ BAP = 100%]
R6	R9		
bencilamino	H	10^{-6}	100
bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	103 (± 12)
2-hidroxibencilamino	H	10^{-6}	72,3 (± 9)
2-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	80 (± 7)
2-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	78 (± 8)
3-hidroxibencilamino	H	10^{-5}	116 (± 11)
3-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	139 (± 16)
3-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	125 (± 14)
3-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10^{-4}	111,6 (± 20)
3-hidroxibencilamino	1-etoxietilo	10^{-4}	109,4 (± 14)
4-hidroxibencilamino	H		n.a.
4-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	36 (± 5)
4-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	27 (± 6)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	H	10^{-5}	869 (± 12)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	965 (± 3)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	89 (± 12)
(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	4-clorobutilo	10^{-4}	103,5 (± 16)
(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	1-etoxietilo	10^{-4}	102,8 (± 15)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	H	10^{-5}	83,2 (± 15)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	112 (± 13)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	105 (± 11)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	4-clorobutilo	10^{-4}	84 (± 8)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	1-etoxietilo	10^{-4}	95 (± 6)
2-hidroxi-3-metoxibencilamino*	H		n.a.
2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	11 (± 1)
3,5-dihidroxibencilamino*	H	10^{-6}	39 (± 6)

3,5-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	45 ($\pm$ 4)
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	43 ($\pm$ 2)
2,4-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	5 ($\pm$ 4)
2,5-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	20 ($\pm$ 8)
3,4-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	61 ($\pm$ 13)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	39 ($\pm$ 12)
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	43 ($\pm$ 15)
4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	62 ($\pm$ 8)
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	55 ($\pm$ 17)
2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	9,2 ($\pm$ 7)
2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	121 ($\pm$ 11)
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	4 ($\pm$ 3)
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	6 ($\pm$ 2)
3-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	52 ($\pm$ 17)
4-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-6}	91 ($\pm$ 13)
2-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	30 ($\pm$ 9)
3-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	65 ($\pm$ 13)
4-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	22 ($\pm$ 6)
4-hidroxi-3-metilanilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	12 ($\pm$ 4)
4-hidroxi-5-metilanilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	10 ($\pm$ 7)
4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	19 ($\pm$ 9)
4-hidroxi-2,6-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-5}	15 ($\pm$ 11)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-6}	27 ($\pm$ 9)
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	31 ($\pm$ 7)
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-6}	47 ($\pm$ 12)
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	12 ($\pm$ 3)
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	2 ($\pm$ 0,8)
4-hidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	10 ($\pm$ 3)
4-hidroxi-3-metilanilino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-5}	7 ($\pm$ 2)
n. a. significa no activo			
*la citocinina control descrita en Doležal <i>et al.</i> (Bioorg. Med.Chem. 14: 875, 2006).			

EJEMPLO 15: Pruebas de compuestos novedosos para determinar la actividad citocinina típica en bioensayo de *Amaranthus*. Se realizó un bioensayo de *Amaranthus* convencional con varias modificaciones. Se esterilizaron en la superficie las semillas de *Amaranthus caudatus* var. *atropurpurea* en N-clorobencenosulfonamida al 10% (p/v) durante 10 min y se lavaron 5 veces con agua desionizada. Se colocaron en placas de Petri de 14 cm que contenían papeles tisú saturados con agua desionizada. Tras 72 h de cultivo a 25°C en la oscuridad, se cortaron las raíces de las plántulas. Se colocaron los explantes, que consistían en dos cotiledones e hipocótilos, en placas de Petri de 5 cm sobre dos capas de papel filtro empapado con 1 ml del medio de incubación que contenía 10 mmol de Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 , pH 6,8, 5 mmol de tirosina y el compuesto que iba a someterse a prueba. Había 20 explantes por placa. Se llevó a cabo el procedimiento bajo una luz de seguridad verde en una sala oscura. Tras 48 h de incubación a 25°C en la oscuridad, se extrajo betacianina congelando los explantes en 4 ml de ácido acético 3,33 mM. Se determinó la concentración de betacianina a partir de las absorbencias a 537 nm y 620 nm tal como sigue: $\text{DA} = \text{A}_{537\text{nm}} - \text{A}_{620\text{nm}}$. A

partir de los datos obtenidos, se seleccionó la concentración con la mayor actividad para cada compuesto sometido a prueba. Se calculó la actividad relativa del compuesto a esta concentración. Se definió la actividad obtenida para 6-bencilaminopurina (BAP) 10^{-5} M como el 100%. Los valores mostrados en la tabla 6 son medias de cinco réplicas y se repitió dos veces toda la prueba.

Se disolvieron los compuestos que iban a someterse a prueba en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó la disolución hasta 10^{-3} M con agua destilada. Se diluyó adicionalmente esta disolución madre con los medios respectivos usados para la prueba biológica a una concentración que oscilaba entre 10^{-8} M y 10^{-4} M. La concentración final de DMSO no superó el 0,2% y por tanto no afectó a la actividad biológica en el sistema de ensayo usado. Los compuestos enumerados en la tabla 6 pueden dividirse de nuevo en dos grupos. El primer grupo contiene citocinina clásica representada por purinas N⁶-sustituidas (compuestos conocidos en la técnica anterior que sirven como control). El segundo grupo contiene los derivados 6,9-disustituídos novedosos de los compuestos del primer grupo. Los resultados muestran que la sustitución en la posición 9 del esqueleto de purina condujo en general a un aumento del contenido en betacianina (color púrpura) en explantes de cotiledón/hipocótilo de *Amaranthus caudatus* en comparación con las citocininas naturales correspondientes.

Tabla 6: El efecto de compuestos novedosos sobre el contenido en betacianina en explantes de cotiledón/hipocótilo de *Amaranthus caudatus*

Compuesto sometido a prueba		Concentración con mayor actividad (mol.l ⁻¹)	Actividad (%) [10 ⁻⁶ mol.l ⁻¹ BAP = 100%]
R6	R9		
bencilamino	H	10 ⁻⁵	100
bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	120,7 (±18)
2-hidroxibencilamino	H	10 ⁻⁴	32,6 (± 12)
2-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	41,6 (± 5)
2-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	33 (± 5)
2-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10 ⁻⁴	47,5 (± 8)
3-hidroxibencilamino	H	10 ⁻⁵	99 (± 15)
3-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	105,1 (± 21)
3-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	107 (± 16)
3-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10 ⁻⁴	102,5 (± 18)
3-hidroxibencilamino	1-etoxietilo	10 ⁻⁴	108,2 (± 18)
4-hidroxibencilamino	H		n.a.
4-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	25,3 (± 9)
4-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	13 (± 4)
4-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10 ⁻⁴	33,4 (± 6)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	H	10 ⁻⁵	116 (± 13)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	299,4 (± 14)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	117 (± 7)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	4-clorobutilo	10 ⁻⁴	123,8 (± 12)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	1-etoxietilo	10 ⁻⁴	92,5 (± 10)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	H	10 ⁻⁴	75 (± 13)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	83 (± 6)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	80 (± 7)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	4-clorobutilo	10 ⁻⁴	81 (± 6)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	1-etoxietilo	10 ⁻⁴	85 (± 7)
2-hidroxi-3-mehoxibencilamino	H	10 ⁻⁴	19 (± 3)
2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	32 (± 7)
2-hidroxi-3-metoxibencilamino	4-clorobutilo	10 ⁻⁴	53 (± 6)
3,5-dihidroxibencilamino*	H	10 ⁻⁵	53 (± 9)
3,5-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁵	53 (± 9)
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	37 (± 6)

2,5-dihidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	35,1 ($\pm$ 9)
3,4-dihidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	52 ($\pm$ 13)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	8 ($\pm$ 3)
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	12 ($\pm$ 5)
4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	57 ($\pm$ 11)
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	41 ($\pm$ 7)
2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	68,8 ($\pm$ 17)
2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	68,4 ($\pm$ 11)
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	7 ($\pm$ 1)
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	5 ($\pm$ 3)
3-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	65 ($\pm$ 12)
4-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	115 ($\pm$ 18)
2-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	65 ($\pm$ 10)
3-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	122 ($\pm$ 11)
4-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	32 ($\pm$ 7)
4-hidroxi-3-metil-anilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	15 ($\pm$ 5)
4-hidroxi-5-metil-anilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	17 ($\pm$ 6)
4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	10 ($\pm$ 4)
4-hidroxi-2,6-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	8 ($\pm$ 2)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	2 ($\pm$ 1)
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	7 ($\pm$ 3)
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	32 ($\pm$ 9)
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	2 ($\pm$ 0,7)
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	22 ($\pm$ 6)
4-hidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	22 ($\pm$ 6)
4-hidroxi-3-metil-anilino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	6 ($\pm$ 3)
n. a. significa no activo			
*la citocinina control descrita en Doležal <i>et al.</i> (Bioorg. Med.Chem. 14: 875, 2006).			

EJEMPLO 16: Pruebas de propiedades de antisenescencia de compuestos de citocinina novedosos en segmentos de hoja de trigo. Se lavaron semillas de trigo de invierno, *Triticum aestivum* cv. Hereward, bajo agua corriente durante 24 horas y entonces se sembraron sobre vermiculita empapada con la solución de Knop. Se colocaron en la cámara de crecimiento a 25°C con un periodo de luz de 16 h - 8 h a 50 mmol.m⁻².s⁻¹. Tras 7 días, estaba completamente desarrollada la primera hoja y había empezado a crecer la segunda hoja. Se retiró una sección de punta de 35 mm de largo de la primera hoja de cada una de 5 plántulas y se recortó ligeramente hasta un peso combinado de 100 mg. Se colocaron los extremos basales de las cinco puntas de hoja en los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno que contenía 150 ml de la disolución de compuesto sometido a prueba cada uno. Se insertó toda la placa en una caja de plástico revestida con papel tisú empapado con agua destilada para impedir que las secciones de la hoja se secasen. Tras 96 h de incubación en la oscuridad a 25°C, se retiraron las hojas y se extrajo la clorofila mediante calentamiento a 80°C durante 10 min en 5 ml de etanol al 80% (v/v). Entonces se restableció el volumen de muestra a 5 ml mediante la adición de etanol al 80% (v/v). Se registró la absorbancia del extracto a 665 nm. Además, se midieron los extractos de clorofila procedentes de hojas frescas y puntas de hoja incubadas en agua desionizada. A partir de los datos obtenidos, se seleccionó la concentración con la mayor actividad para cada compuesto sometido a prueba. Se calculó la actividad relativa del compuesto a esta concentración (tabla 7). Se definió la actividad obtenida para 6-bencilaminopurina (BAP) 10⁻⁴ M como el 100%. Los valores mostrados son medias de cinco réplicas y se repitió dos veces el experimento completo.

Se disolvieron los compuestos que iban a someterse a prueba en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó la disolución

hasta 10^{-3} M con agua destilada. Se diluyó adicionalmente esta disolución madre con agua destilada hasta una concentración que oscilaba entre 10^{-8} M y 10^{-4} M. La concentración final de DMSO no superó el 0,2% y por tanto no afectó a la actividad biológica en el sistema de ensayo usado.

- 5 Los compuestos enumerados en la tabla 7 pueden dividirse en 2 grupos. El primer grupo contiene citocininas naturales, representadas por purinas N⁶-sustituidas (compuestos conocidos en la técnica anterior que sirven como controles). El segundo grupo contiene las purinas 6,9-disustituidas novedosas derivadas de los compuestos del primer grupo. Los resultados muestran que la sustitución en la posición 9 del esqueleto de purina condujo en general a un aumento de la actividad antisenescente en comparación con las citocininas clásicas correspondientes.

10

Tabla 7: El efecto de compuestos novedosos sobre la retención de clorofila en puntas de hojas de trigo cortadas (se muestran las desviaciones estándar de la media para 10 determinaciones de réplicas)

Compuesto sometido a prueba		Concentración con mayor actividad (mol.l^{-1})	Actividad (%) [$10^{-4} \text{mol.l}^{-1}$ BAP = 100%]
R6	R9		
bencilamino	H	10^{-4}	100
bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	105 ($\pm 0,5$)
2-hidroxibencilamino	H	10^{-4}	22,4 (± 5)
2-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	23,6 (± 7)
2-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	26 (± 2)
2-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10^{-4}	47,5 (± 8)
3-hidroxibencilamino	H	10^{-4}	105,9 (± 14)
3-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	133,1 (± 15)
3-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	113 (± 18)
3-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10^{-4}	102,5 (± 18)
3-hidroxibencilamino	1-etoxietilo	10^{-4}	108,2 (± 18)
4-hidroxibencilamino	H		n.a.
4-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	10,1 (± 9)
4-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	3 (± 1)
4-hidroxibencilamino	4-clorobutilo	10^{-4}	33,4 (± 8)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	H	10^{-4}	28,3 (± 17)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	38,2 (± 7)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	45 (± 6)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	4-clorobutilo	10^{-4}	73,8 (± 12)
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	1-etoxietilo	10^{-4}	92,5 (± 10)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	H	10^{-4}	89 (± 11)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	95 (± 8)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10^{-4}	91 (± 4)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	4-clorobutilo	10^{-4}	89 (± 7)
4-hidroxi-3-metilbutilamino	1-etoxietilo	10^{-4}	94 (± 10)
2-hidroxi-3-metoxibencilamino*	H	10^{-4}	34 (± 5)
2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	50 (± 5)
3,5-dihidroxibencilamino*	H	10^{-4}	134 (± 10)
3,5-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	145 (± 12)
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	35 ($\pm 9,5$)
2,5-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	15 (± 5)
3,4-dihidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	71,3 (± 17)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10^{-4}	42 (± 13)

4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	22 (± 4)
4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	55 (± 18)
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	47 (± 11)
2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	16,4 (± 3)
2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	82 (± 12)
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	9 (± 2)
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	3 (± 1)
3-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	45 (± 13)
4-hidroxifurfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	101 (± 17)
2-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	11 (± 4)
3-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	23 (± 7)
4-hidroxi-3-metilnilino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	7 (± 5)
4-hidroxi-5-metilnilino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	10 (± 3)
4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	28 (± 9)
4-hidroxi-2,6-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	10 ⁻⁴	14 (± 4)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	36 (± 10)
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	14 (± 5)
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	35 (± 8)
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	1,4 (± 2)
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	17 (± 5)
4-hidroxianilino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	28 (± 4)
4-hidroxi-3-metilnilino	tetrahidrofuran-2-ilo	10 ⁻⁴	4 (± 3)
*las citocininas control descritas en Doležal <i>et al.</i> (Bioorg. Med.Chem. 14: 875, 2006).			

EJEMPLO 17: Inhibición del envejecimiento de células humanas normales por compuestos novedosos. En este ejemplo, se tiñeron fibroblastos diploides humanos (células HCA de diversos niveles de pase: pase 20 - designado como HCA20; pase 40 - designado como HCA40; pase 60 - designado como HCA60) para determinar la actividad 3-galactosidasa. Se retiró el medio usado para el cultivo celular, se lavaron las células dos veces en PNS y se fijaron en 2-3 ml de disolución de fijación compuesta por formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% en PBS. Se incubaron las células a temperatura ambiente durante 5 minutos, y entonces se lavaron dos veces con PBS. Se incubaron las células posteriormente a 37°C (sin CO₂) durante 16 horas en 2-3 ml de la disolución que comprendía ferrocianuro de potasio (5 mM), ferrocianuro de potasio (5 mM), MgCl₂ (2 mM), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (1 mg/ml), en tampón fosfato/citrato, pH 6,0. Tras este periodo de incubación, se observaron las muestras de células con el fin de detectar la presencia de células azules, lo que indicaría que X-gal se había escindido (células senescentes de manera positiva). En este experimento, se tiñeron de azul las células senescentes, pero no otras células debido a la acción de β-galactosidasa sobre el sustrato.

Tabla 8: El efecto de compuestos novedosos sobre varias células senescentes en el cultivo de fibroblastos humanos

Sustituyente		CÉLULAS SENESCENTES (%)		
R6	R9	HCA20	HCA40	HCA60
bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	3	4	47
(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	4	5	15
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidropiran-2-ilo	5	2	25
2-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	2	26
3-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	5	3	25
4-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	5	5	16
2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	3	3	25
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	3	4	27

3,4-dihidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	3	4	15
4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	5	17
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	5	21
4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	4	19
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	5	7	29
2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	6	30
2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	5	4	30
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	6	22
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	3	4	20
3-hidroxi-furfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	4	18
4-hidroxi-furfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	4	16
5-hidroxi-furfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4	7	24
2-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	4	6	29
3-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	5	4	28
4-hidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	4	6	16
4-hidroxi-3-metil-anilino	tetrahidropiran-2-ilo	3	4	19
4-hidroxi-6-metil-anilino	tetrahidropiran-2-ilo	4	4	18
4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	4	5	22
4-hidroxi-2,6-dimetoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	4	6	24
3-hidroxi-4-metoxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	5	4	28
(Z)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	4	5	15
4-hidroxi-3-metilbutilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	5	2	25
2-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	4	2	26
3-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	5	3	25
4-hidroxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	5	5	16

Tal como se muestra en la tabla 8, con un número creciente de pases, la tinción se volvió más oscura. Para las células más antiguas, sólo había células azules que oscilaban entre azul brillante y color casi opaco. Los derivados de purina 6,9-disustituidos eran muy eficaces en comparación con 6-(bencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il)purina en la retención de un nivel mucho menor de células senescentes tras 60 pases. En el caso de cultivo de larga duración, las células tratadas con los compuestos de la invención pudieron vivir durante un periodo un 30% más largo que las células control.

EJEMPLO 18: Actividad citotóxica *in vitro* de compuestos novedosos. La baja citotoxicidad de los compuestos es la principal propiedad que determina su uso cosmético. Uno de los parámetros usados, como base para ensayos de citotoxicidad, es la actividad metabólica de células viables. Por ejemplo, se usa ahora ampliamente un ensayo de microtitulación, que usa la calceína AM, para cuantificar la citotoxicidad y proliferación celular. Por ejemplo, se usa este ensayo en programas de selección de fármacos y en pruebas de quimiosensibilidad. Dado que sólo las células metabólicamente activas escinden la calceína AM, estos ensayos detectan exclusivamente células viables. La cantidad de calceína AM reducida corresponde al número de células vitales en el cultivo.

Se usaron línea celular de leucemia linfoblástica de células T humana CEM; leucemias promielocítica HL-60 y monocítica U937; líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7, BT549, MDA-MB-231; células U87MG de glioblastoma; células de carcinoma cervicouterino HELA; células de sarcoma cU2OS y Saos2; carcinoma hepatocelular HepG2; fibroblastos de ratón NIH3T3; macrófagos de médula ósea inmortalizados de ratón B2.4 y B10A.4; leucemia P388D1 y L1210; melanomas B16 y B16F10; osteosarcoma humano HOS; leucemia mieloide humana K-562; melanoma de piel humano G-361, para la selección de rutina de compuestos. Se mantuvieron las células en matraces de cultivo tisular de plástico de 80 cm² de Nunc/Corning y se cultivaron en medio de cultivo celular (DMEM con glucosa 5 g/l, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml, suero de ternera fetal al 10% y bicarbonato de sodio).

Se añadieron las suspensiones celulares que se prepararon y se diluyeron según el tipo de célula particular y la densidad de células objetivo esperada (2.500-30.000 células por pocillo basándose en las características de crecimiento celular) mediante pipeta (80 ml) a placas de microtitulación de 96 pocillos. Se dejaron los inoculados durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C y el 5% de CO₂ para la estabilización. Se añadieron diluciones de cuatro veces de la concentración de prueba pretendida a tiempo cero en alícuotas de 20 ml a los pocillos de la placa de microtitulación. Habitualmente, se evaluó el compuesto sometido a prueba en seis diluciones de 4 veces. En pruebas de rutina, la mayor concentración de pocillo fue de 166,7 mM, pero puede cambiarse dependiendo del agente. Se examinaron por duplicado todas las concentraciones de fármaco. Las incubaciones de células con los compuestos sometidos a prueba duraron 72 horas a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y humedad del 100%. Al final del periodo de incubación, se sometieron a ensayo las células usando calceína AM. Se pipetearon diez microlitros de la disolución madre en cada pocillo y se incubaron durante 1 hora. Se midió la fluorescencia (FD) con el instrumento Labsystem FIA Reader Fluoroscanner Ascent (R.U.). Se calculó la supervivencia de células tumorales (GI₅₀) usando el siguiente cálculo: $TCS = (FD_{\text{pocillo expuesto a fármaco}} / FD_{\text{media pocillos control}}) \times 100\%$. Se calculó el valor de GI₅₀, la concentración de fármacos letal para el 50% de las células tumorales, a partir de las

curvas de dosis-respuesta obtenidas.

Citotoxicidad cero de los compuestos novedosos es el requisito previo básico para las aplicaciones cosméticas. Se sometió a prueba la citotoxicidad de los compuestos novedosos en un panel de líneas celulares de diferente origen de especie e histogenético (tabla 9). Se ha mostrado en el presente documento que se encontraron actividades iguales en todas las líneas celulares tumorales sometidas a prueba, sin embargo, las células no malignas, por ejemplo, fibroblastos NIH3T3 y linfocitos humanos normales, eran resistentes a citotoxicidad inducida por purina 6,9-disustituida. Los compuestos enumerados en la tabla 9 pueden dividirse en 2 grupos. El primer grupo contiene "citocininas clásicas" representadas por purinas 6-sustituidas (que se conocen en la técnica anterior). El segundo grupo contiene los derivados 6,9-disustituidos novedosos de estos compuestos. Los resultados muestran que la sustitución en la posición 9 del esqueleto de purina con el grupo tetrahidropirano o tetrahidrofuranilo condujo en general a una disminución en la actividad citotóxica en comparación con los análogos de "citocinina clásica". Tal como se demuestra en la tabla 9, la GI_{50} para fibroblastos NIH3T3 y linfocitos humanos normales era siempre mayor de 166,7 mM. Los derivados novedosos no muestran toxicidad para células normales y tumorales en concentraciones de aproximadamente 166,7 mM y por tanto son más adecuadas para aplicaciones cosméticas que las citocininas naturales (derivados de purina 6-sustituidos) y la sustancia control 6-bencilamino-9-(tetrahidropiran-2-il)purina.

Tabla 9: Citotoxicidad de compuestos novedosos para diferentes líneas de células cancerosas

R6	R9	Línea celular sometida a prueba / GI_{50} (μ mol/l)					
		HOS	K-562	MCF7	NIH-3T3	CEM	HL60
furfurilamino	H	>166,7	164,1	>166,7	>166,7	155,1	148,7
isopentenilamino	H	> 166,7	146,9	>166,7	>166,7	92,2	>166,7
bencilamino	H	> 166,7	138,9	166,1	> 166,7	>166,7	>166,7
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
3-hidroxi-bencilamino	H	>166,7	128,4	>166,7	> 166,7	90,1	79,2
2-hidroxi-bencilamino	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	69,2	78
bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7	123,4	158,2	>166,7	>166,7	163,4
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
4-hidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
2-hidroxi-5-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
3-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7
4-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>116,7		>166,7	>160,7	>166,7	>166,7
4-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
4-hidroxi-furfurilamino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7	> 166,7	>166,7	>166,7		>166,7
4-hidroxi-3-metilnilino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7
4-hidroxi-5-metilnilino	tetrahidropiran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7
2,4-dihidroxianilino	tetrahidropiran-2-ilo	> 166,7		>166,7	>166,7		>166,7
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	tetrahidrofuran-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7
4-hidroxi-bencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	>166,7		>166,7	> 166,7		>166,7
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	4-clorobutilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7
4-hidroxi-bencilamino	4-clorobutilo	>166,7		>166,7	>166,7		> 166,7
(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)	1-etoxiet-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7

ilamino)							
4-hidroxibencilamino	1-etoxiet-2-ilo	>166,7		>166,7	>166,7		>166,7

EJEMPLO 19: Actividad inmunosupresora. Los compuestos que tienen la capacidad para inhibir de manera selectiva la proliferación de linfocitos son potentes inmunosupresores que también pueden usarse de manera ventajosa en aplicaciones cosméticas. Uno de los parámetros más importantes de la inmunidad celular específica es la respuesta proliferativa de linfocitos frente a antígenos o mitógenos policlonales. La mayoría de linfocitos periféricos de mamífero normales son células en reposo. Los antígenos o mitógenos policlonales no específicos pueden activar células linfoides y esto está acompañado por cambios drásticos del metabolismo intracelular (actividad mitocondrial, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, formación de células blásticas y proliferación celular). Se ha desarrollado una variedad de ensayos *in vitro* para medir la respuesta proliferativa de linfocitos. El usado más comúnmente es el método de incorporación de ^3H -timidina.

Durante la proliferación celular, el ADN debe replicarse antes de que la célula se divida en dos células hijas. Esta asociación de dosis entre duplicación celular y síntesis de ADN es muy atractiva para evaluar la proliferación celular. Si se añaden precursores de ADN marcados al cultivo celular, las células que están a punto de dividirse incorporan el nucleótido marcado en su ADN. Tradicionalmente, esos ensayos implican habitualmente el uso de nucleósidos radiomarcados, particularmente timidina tritiada (^3H]-TdR). La cantidad de la ^3H]-TdR incorporada en el ADN celular se cuantifica mediante recuento de centelleo líquido.

Se obtuvo sangre periférica heparinizada humana de voluntarios sanos mediante punción de la vena cubital. Se diluyó la sangre en PBS (1:3) y se separaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, 1,077 g/ml) a 2200 rpm durante 30 minutos. Tras la centrifugación, se lavaron los linfocitos en PBS y se resuspendieron en medio de cultivo celular (RMPI 1640, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml, suero de ternera fetal al 10% y bicarbonato de sodio).

Se añadieron las células, diluidas a la densidad objetivo de 1.100.000 células/ml, mediante pipeta (180 ml) a placas de microtitulación de 96/pocillos. Se añadieron diluciones de cuatro veces de la concentración de prueba pretendida a tiempo cero en alícuotas de 20 ml a los pocillos de la placa de microtitulación. Habitualmente, se evaluó el compuesto sometido a prueba en seis diluciones de 4 veces secuenciales. En pruebas de rutina, la mayor concentración de pocillo fue de 266,7 mM. Se examinaron todas las concentraciones de fármacos por duplicado. Se activaron todos los pocillos, con la excepción de controles no estimulados, con 50 ml de concanavalina A (25 mg/ml). Las incubaciones de células con el compuesto sometido a prueba duraron 72 horas a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO_2 y humedad del 100%. Al final del periodo de incubación, se sometieron a ensayo las células usando la ^3H]-TdR.

Se incubaron los cultivos celulares con 0,5 mCi (20 ml de disolución madre 500 mCi/ml) por pocillo durante 6 horas a 37°C y el 5% de CO_2 . Se usó el colector de células automatizado para lisar las células en agua y adsorber el ADN sobre filtros de fibra de vidrio en forma de placas de microtitulación. Se retuvo el ADN, que incorporó ^3H]-TdR sobre el filtro mientras que el material no incorporado pasó a su través. Se secaron los filtros a temperatura ambiente durante la noche y se sellaron en una bolsa de muestra con 10-12 ml de agente de centelleo. Se determinó la cantidad de la ^3H]-TdR presente en cada filtro (en cpm) mediante recuento de centelleo en el contador de centelleo líquido Betaplate. Se calculó la dosis eficaz del inmunosupresor (DE) usando la siguiente ecuación: $\text{DE} = (\text{CPM}_{\text{pocillo expuesto a fármaco}} / \text{CPM}_{\text{medio pocillos control}}) \times 100\%$ (CPM = cuentas por minuto). Se calculó el valor de DE_{50} , la concentración de fármaco que inhibe la proliferación del 50% de linfocitos, a partir de las curvas de dosis-respuesta obtenidas.

Para evaluar la actividad inmunosupresora de purinas 6,9-disustituidas, se analizó su capacidad para inhibir la proliferación inducida por mitógeno policlonal de linfocitos humanos normales (tabla 10). Los datos demuestran que estos compuestos sólo tienen actividad marginal sobre la incorporación de ^3H -timidina, no obstante, inhiben de manera eficaz la proliferación de linfocitos activados. La dosis inmunosupresora eficaz de los derivados novedosos en condiciones *in vitro* era próxima a 1-20 mM. Estos resultados representan un nuevo descubrimiento de actividad biológica de compuestos derivados de citocininas que podría encontrar una aplicación en cosméticos.

Tabla 10: Actividad inmunosupresora de compuestos novedosos.

Compuesto sometido a prueba		DE_{50} de linfocitos humanos (mM)
R6	R9	
bencilamino	H	n.a.
2-hidroxibencilamino	H	68
3-metilbut-2-en-1-ilamino	H	79,5
bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	44,7
2-hidroxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4,5

2-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	7
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	4,2
3,4-dihidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	9,5
3,5-dihidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	18,7
2-hidroxi-3-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	2,2
2-hidroxi-5-metilbencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	6,4
2-hidroxi-bencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	10,2
2-hidroxi-3,5-dimetoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	6,5
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	tetrahidrofuran-2-ilo	9,7
2-hidroxi-3-metil-anilino	tetrahidrofuran-2-ilo	14,3
2-hidroxi-bencilamino	4-clorobutilo	6,7
2-hidroxi-3-metoxibencilamino	4-clorobutilo	9,2
2-hidroxi-4-metoxibencilamino	4-clorobutilo	8,3
3,4-dihidroxi-bencilamino	1-etoxietilo	10,8
3,5-dihidroxi-bencilamino	1-etoxietilo	21,4
n. a. significa no activo		

EJEMPLO 20: Actividad antiinflamatoria. Los compuestos de fórmula 1 que tienen actividades antiinflamatorias pueden usarse como cosméticos para tratar trastornos de inflamación en la piel como dermatitis atópica, liquen plano, hiperpigmentación y lesiones por herpes simple. Por ese motivo, se cultivó glioma de rata C6 (ATCC n.º CCL107) como monocapa en un medio químicamente definido libre de suero que contenía F10 de Ham-medio esencial mínimo (1:1 v/v), L-glutamina 2 mM, vitaminas de medio esencial mínimo al 1% (v/v) (100x), aminoácidos no esenciales de medio esencial mínimo al 1% (v/v) (100x), penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml y selenito de sodio 30 nM. Se realizó incubación a 37°C en una atmósfera humidificada. Se realizaron los ensayos en la fase de crecimiento logarítmica a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm². Se indujo síntesis de AMPc intracelular mediante la adición de (-)isoproterenol 5 mM. Tras incubación de 30 min a 37°C, se retiró el medio y se determinó la cantidad celular de AMPc usando el kit de Amersham de inmunoensayo de AMPc-enzima. Se determinó el valor de I₅₀ a partir de una curva de dosis-respuesta por duplicado. Se midió el efecto de las purinas 6,9-disustituidas novedosas tras la adición simultánea con isoproterenol. Las citocininas clásicas, conocidas en la técnica anterior, eran inactivas.

Tabla 11: Modulación de la actividad de receptores β -adrenérgicos mediante purinas sustituidas

Compuesto sometido a prueba		Efecto
R6	R9	
bencilamino	H	n.a.
3-hidroxi-bencilamino	H	n.a.
furfurilamino	H	n.a.
4-hidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	activación de 1,8 veces
3,4-dihidroxi-bencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	activación de 1,7 veces
4-hidroxi-2,6-dimetoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	activación de 1,3 veces
4-hidroxi-3-metoxibencilamino	tetrahidropiran-2-ilo	activación de 1,6 veces
n. a. significa no activo		

Dado que están presentes receptores purinérgicos A2 y similares a P2Y₁, acoplados negativa y positivamente a adenilato ciclasa, respectivamente, en glioma de rata C6, queda por determinar si la modulación de la síntesis de AMPc se debe a la inhibición de la activación de receptores β -adrenérgicos por isoproterenol, o se debe a la activación de receptores purinérgicos.

EJEMPLO 21: Desarrollo y contenido de una pomada. Se describe una formulación de pomada adecuada para tratar trastornos psoriásicos de la piel. Se proporcionan a continuación los componentes de la formulación (expresados en gramos de ingrediente por 100 g de pomada).

	Ingrediente/100 g
6-(4-hidroxi-bencil)amino-9	
-(tetrahidropiran-2-il)purina (pTTHP)	1,0 g
butilhidroxitolueno (Nipanox BHT)	0,2 g
butilparabeno (Nipabuty)	0,2 g
monoetil éter de dietilenglicol (Transcutol P)	10,0 g
dibehenato de glicerol (Comprit 888 ATO)	22,0 g
laurato de propilenglicol (Lauroglycol FCC)	66,6 g

La posible consistencia de la pomada puede modificarse adicionalmente mediante adición de vaselina blanca. Se espera que el sistema transdérmico Transcutol P/Lauroglycol FCC aumente la eficacia de pTTHP.

EJEMPLO 22: Formulación de gel. Se describe una formulación de gel adecuada para tratar trastornos psoriásicos

de la piel. Se proporcionan a continuación los componentes de la formulación (expresados en gramos de ingrediente por 100 g de gel).

	Ingrediente/100 g
6-(4-hidroxibencil)amino-9	
-(tetrahidropiran-2-il)purina (pTTHP)	1,0 g
butilhidroxitolueno (Nipanox BHT)	0,2 g
butilparabeno (Nipabutyl)	0,2 g
monoetil éter de dietilenglicol (Transcutol P)	10,0 g
sílice coloidal anhidra (Zeopharm 177)	5,0 g
laurato de propilenglicol (Lauroglycol FCC)	83,6 g

- 5 La consistencia del gel puede modificarse adicionalmente mediante la adición de sílice coloidal anhidra. Se espera de nuevo que el sistema transdérmico Transcutol P/Lauroglycol FCC aumente la eficacia de pTTHP. Se espera que la sílice coloidal anhidra ralentice la penetración del principio activo.

- 10 EJEMPLO 23: Procedimiento de preparación para una pomada que va a aplicarse de manera tópica en la piel. Una formulación de pomada de ese tipo es tal como sigue:

	Componente/200g
6-(4-hidroxibencil)amino-9	
-(tetrahidropiran-2-il)purina (pTTHP)	2,0 g
butilhidroxitolueno (Nipanox BHT)	0,4 g
butilparabeno (Nipabutyl)	0,4 g
monoetil éter de dietilenglicol (Transcutol P)	20,0 g
dibehenato de glicerol (Compritol 888 ATO)	44,0 g
laurato de propilenglicol (Lauroglycol FCC)	133,2 g

Procedimiento recomendado:

- 15 Fase A - Se disolvió pTTHP (2 g) en 20 g de Transcutol P mientras se agitaba de manera continua a temperatura ambiente en un primer recipiente. Puede acelerarse el proceso de disolución mediante calentamiento de la disolución hasta una temperatura máxima de 40°C.
- 20 Fase B - Se disolvieron Nipanox BHT (0,4 g) y 0,4 g de Nipabutyl mientras se agitaba de manera continua en 133,2 g de Lauroglycol FCC a una temperatura de aproximadamente 70°C en un segundo recipiente. Se calienta la disolución aceitosa transparente hasta una temperatura de aproximadamente 80°C y se funden 44 g de Compritol 888 ATO en la misma mientras se agita de manera continua. Se enfría la disolución aceitosa transparente hasta aproximadamente 60°C.
- 25 A medida que se enfría la fase B y con agitación continua, se añade la fase A. Se obtiene una sustancia similar a pomada blanquecina y entonces se carga en recipientes de plástico (aproximadamente 15 g de pomada por recipiente).

- 30 EJEMPLO 24: Formulación de una composición para la aplicación tópica en la piel. Una composición para aplicación tópica en la piel contiene los siguientes ingredientes:

	Cantidad
6-(4-hidroxibencil)amino-9	
-(tetrahidropiran-2-il)purina (pTTHP)	0,1%
Fase aceitosa:	
Alcohol cetílico	5,0%
Monoestearato de glicerilo	15,0%
Monooleato de sorbitano	0,3%
Polisorbato 80 USP	0,3%
Fase acuosa	
Metilcelulosa 100 cps	1,0%
Metilparabeno	0,25%
Propilparabeno	0,15%
Agua purificada	c.s. hasta el 100%

Se disolvieron el metilparabeno y el propilparabeno en agua caliente y se dispersó la metilcelulosa posteriormente en el agua caliente. Se enfrió la mezcla a 6°C hasta que se disolvió la metilcelulosa (fase acuosa). Entonces se

calentó la fase acuosa hasta 72°C y se añadió a la fase aceitosa a 70°C mientras se agitaba de manera continua. Se añadió pTHPP a una temperatura de 35°C y se agitó la mezcla resultante de manera continua hasta su dispersión. Esta composición puede aplicarse en la piel al menos diariamente hasta que se alcance el efecto de mejora de la piel deseado (antienvejecimiento).

EJEMPLO 25: Evaluación de diversas bencil-piraniil-aminopurinas sustituidas sobre fibroblastos de piel humana. Se evaluaron las siguientes aminopurinas para determinar su efecto a corto plazo sobre fibroblastos de piel humana:

- (1) 6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina;
- (2) 6-(3-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina;
- (3) 6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina; y
- (4) 6-(3-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina.

Se usaron quinetina (N⁶-furfuriladenina) y/o 6-furfurilamino-9-tetrahidropiraniilpurina como controles.

Procedimientos generales. Se prepararon disoluciones madre de los compuestos de prueba disolviendo aproximadamente 40-60 mg en 1 ml de DMSO. Se diluyeron adicionalmente 250 µl de su volumen en 100 ml de medio completo. La concentración de DMSO máxima en el medio fue del 0,25%; la concentración final de la sustancia en el medio fue de 400 µM. Se almacenó la disolución madre en la nevera a 4°C. Se diluyó la disolución madre en el medio de cultivo celular (DMEM) según se requirió.

Se realizaron todos los experimentos antes y cerca de los cultivos de pase tardío de la línea de fibroblastos de piel de adulto humano normal (línea celular SNF20 establecida a partir de una biopsia de piel de mama obtenida de una mujer joven, de veinte años de edad, no fumadora y sana en el momento de operación de reducción de mama). Con el fin de comprobar los efectos de los compuestos de prueba sobre células senescentes, se usaron células de pase tardío con duración de vida del 90% completada. El medio contenía DMEM (con antibióticos) y suero de ternera fetal al 10%. La incubación fue a 37°C con humedad del 95%.

Características de crecimiento. Se realizaron experimentos de crecimiento a corto plazo usando placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (área de crecimiento de 1,9 cm²). Se sembraron aproximadamente 10.000 células en 6 conjuntos de placas de 24 pocillos. Se dejaron que las células se uniesen y se estabilizasen durante 24 h en medio de cultivo normal para lograr diversas concentraciones finales (intervalo de 40 a 500 µM). Se cambió el medio de cultivo con la adición de productos químicos de prueba dos veces a la semana. Se contaron los números de células tras diferentes días de tratamiento en 2 pocillos de cada concentración del producto químico de prueba usando el método normal de tripsinización celular y recuento usando un contador Coulter. Se fijó el tercer pocillo en cada categoría mediante metanol frío y se tiñó con tinción de Giemsa para registro permanente y para fotografía. Se continuaron los experimentos hasta que los cultivos se volvieron completamente confluentes y no era posible crecimiento adicional.

Unión celular. Estos estudios se refieren en general al potencial de migración celular y efectos de toxicidad a corto plazo. Los compuestos de prueba, así como los controles, no afectaron significativamente a la frecuencia de unión de fibroblastos de piel humanos tras tratamiento de 6 horas a de 40 a 200 µM; a 400 µM, se redujo la frecuencia de unión para todas las muestras de prueba y de control. No se observó toxicidad inmediata. En todos los estudios adicionales, podrían añadirse los compuestos de prueba o control al medio de cultivo en el momento de la siembra de células.

Curva de crecimiento de una etapa. Este estudio de crecimiento a corto plazo (llevado a cabo a lo largo de 11 días) hace un seguimiento del potencial de crecimiento celular o bien estimulado o bien inhibido y proporciona información sobre la toxicidad retardada. Se evaluaron los compuestos de prueba así como controles a 40, 80, 200 y 400 µM. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	Incremento en el número de células (%)			
	40 µM	80 µM	200 µM	400 µM
6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina	+10	+10	tóxico	tóxico
6-(3-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina	+20	+25	0	-
6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina	+30	+20	+10	> -50
6-(2,5-dimetoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina	+5	+10	> -50	> -50
Quinetina (control)	+5	+10	-30	-40
6-furfurilamino-9-tetrahidropiraniilpurina (control)	+20	+20	< +5	> -50

Morfología celular. Se examinaron células de los cultivos anteriores para determinar su morfología en el día 6 y el día 11 para evaluar la salud global de las células. Los cultivos que usaron los compuestos de prueba así como un

control (sólo se usó 6-furfurilamino-9-tetrahidropiraniipurina) parecían sanos y mantuvieron su forma de huso en redes similares a huellas dactilares con bajos residuos intracelulares y sin agrandamiento de las células para ninguna de las tasas de dosis.

Actividad mitocondrial. Se midió la supervivencia celular tras la exposición a diversas dosis con un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se sembraron aproximadamente 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos 24 horas antes del experimento. Entonces se trataron las células con diversas dosis de los compuestos control y de prueba individuales. Se lavaron los pocillos en solución de Hank y se añadió medio nuevo. Tras tres días, se añadió MTT (Sigma, M2128) a 0,5 mg/ml en medio. Tras 4 horas, se retiró MTT y se añadieron isopropanol y HCl para disolver los cristales de MTT durante 12-16 horas. Se midió la absorbancia a 595 nm.

Los compuestos de prueba 6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina, 6-(3-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina y 6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina y ambos controles dieron como resultado viabilidad celular estimulada en hasta aproximadamente el 20% para tasas de dosis de hasta aproximadamente 50 μ M. El compuesto de prueba 6-(2,5-dimetoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina no mostró ninguna estimulación a tasas de dosis similares. A tasas de aproximadamente 100 μ M, todos los compuestos de prueba y los controles mostraron una disminución en la actividad.

Actividad lisosómica. El rojo neutro se capta preferentemente en los lisosomas de la célula. Se mantuvieron células de fibroblasto en cultivo y se expusieron a compuestos de prueba a lo largo de un intervalo de concentraciones. Se examinaron visualmente los cultivos tras 72 horas, y se determinó el número de células viables y/o el contenido en proteínas de células totales mediante el método de captación de rojo neutro. Este ensayo sólo detecta células viables. Cualquier compuesto que tiene un efecto localizado sobre los lisosomas, por tanto, dará como resultado una reflexión artificialmente baja (o posiblemente alta) de la viabilidad celular y el número de células. Este factor, sin embargo, hace que el sistema sea útil para detectar los compuestos de prueba que afectan selectivamente a los lisosomas, especialmente cuando se usa junto con otras pruebas que pueden determinar el número de células.

También se usó el ensayo de rojo neutro para evaluar y clasificar la citotoxicidad de los compuestos de prueba. Se inocularon pocillos individuales de una placa de microtitulación de cultivo tisular de 96 pocillos con 0,2 ml de los medios apropiados que contenían células (habitualmente 3×10^3 células). Tras de 1 a 2 días de incubación, se retiraron los medios y se reemplazaron por medio sin modificación (control) o por medio modificado con concentraciones variadas del compuesto que iba a someterse a prueba. Tras 3 días de exposición al compuesto de prueba, se retiraron los medios y se reemplazaron por medios que contenían rojo neutro al 0,001%. Entonces se devolvió la placa de ensayo a la incubadora durante otras 3 horas para permitir la captación del colorante supravital en los lisosomas de células viables. Después de eso, se retiraron los medios y se lavaron las células rápidamente con formaldehído al 0,5%-CaCl₂ al 1% seguido por 0,2 ml de una disolución de ácido acético al 1%-etanol al 50% para extraer el colorante de las células. Tras 10 min a temperatura ambiente y una agitación breve pero rápida en un agitador de placas de microtitulación, se transfirieron las placas a un espectrofotómetro de microplacas equipado con un filtro de 540 nm para medir la absorbancia del colorante extraído.

El patrón de tinción para el ensayo de rojo neutro mostró células que experimentaron autofagia (eliminación de desechos celulares) en todos los compuestos de prueba. El análisis de rojo neutro mostró un perfil de toxicidad diferente del obtenido usando la actividad mitocondrial. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Actividad relativa	Concentración máxima (mM)
6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	alta	200
6-(3-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	alta	80
6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	alta	200
6-(2,5-dimetoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	la mayor	40
Quinetina (control)	moderada	80
6-furfurilamino-9-tetrahidropiraniipurina (control)	alta	80

El pretratamiento de los compuestos de prueba y controles a diversas dosis mejoró la tasa de recambio lisosómica con respecto a las células no tratadas en diversos grados tal como se muestra en la tabla a continuación.

	Actividad aumentada (%)
6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	10-30
6-(3-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	15-20
6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	10-30
6-(2,5-dimetoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina	20-45
Quinetina (control)	10-15
6-furfurilamino-9-tetrahidropiraniipurina (control)	30-40

Estudios de rejuvenecimiento y supervivencia celular.

Se usó el efecto de los compuestos de prueba sobre la morfología de células cerca de ser senescentes para determinar si podrían retardar o mantener alteraciones relacionadas con la edad en la morfología de células T. Se obtuvieron células de paso tardío cerca de la senescencia usando placas de cultivo de tejido de 12 pocillos. Se sembraron aproximadamente 10.000 células en dos conjuntos de placas de 12 pocillos. Se dejaron que las células se uniesen y se estabilizasen durante 24 horas en medio de cultivo normal para lograr diversas concentraciones finales (intervalo de 40 a 200 μM). Se contaron los números de células tras 10 y 20 días de tratamiento en 2 pocillos de cada concentración del compuesto de prueba usando el método de tripsinización celular normal con recuento con contador Coulter. Se fijó el tercer pocillo en cada categoría mediante metanol frío y se tiñó con tinción de Giemsa para registro permanente y para fotografía. Se llevó a cabo el experimento durante un periodo de veinte días.

Ninguno de los compuestos de prueba provocó efectos perjudiciales o letales sobre la salud de las células ni siquiera tras 20 días de pretratamiento prolongado. Tras 10 días no hubo diferencias significativas en el aspecto de las células. En general, no hubo agrandamiento significativo de las células y una ausencia de células multinucleadas con niveles reducidos de residuos celulares. Los compuestos de prueba a tasas de dosis de 40 y 80 μM condujeron a efectos de edad beneficiosos observables tras 20 días.

Cuantificación de la supervivencia mediante el número de células. Se sembraron los números iguales de células senescentes (a una densidad de $1,5 \times 10^3$) en matraces separados y se trataron con diferentes concentraciones de compuestos de prueba. Se determinaron los números de células usando un contador Coulter tras la tripsinización y resuspensión de las células tras 10 y 20 días de tratamiento.

En células cerca de la senescencia no hubo un aumento significativo en los números de células debido al tratamiento con los compuestos de prueba o compuestos control hasta 80 μM . En general, las células tenían un mejor aspecto pero no aumentaron sus números. Sin embargo, se observó una reducción significativa en los números de células a tasas de dosis superiores a 80 μM .

Duplicación de ADN y detección. Se realizan estudios de toxicidad usando el ensayo de BrdU (marcaje con 5-bromo-2'-desoxi-uridina y detección usando el lector de placas de Elisa). Este ensayo se basa en la medición de la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina durante la síntesis de ADN como marcador para la proliferación celular. Se determinó la proporción de células que experimentan la duplicación de ADN, y por tanto que entran en la siguiente ronda de la división celular, marcando las células con bromodesoxiuridina, usando un kit disponible comercialmente (Roche Diagnostics GmbH). Se cultivaron las células en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añadió BrdU al medio de cultivo y se incorporó en el ADN recién sintetizado (concentración resultante de 110 μM). Entonces se incubó la placa durante aproximadamente 2-18 horas y se fijó con 200 μl de fijador de etanol (etanol 0,5 M/HCl) tras lavado con PBS. El tratamiento con 100 μl de disolución de trabajo de nucleasa (dilución 1:100 con tampón de incubación) por pocillo durante 30 min a 37°C en ausencia de CO_2 mejora la accesibilidad de la BrdU mediante la detección de anticuerpo. Se añaden a 100 μl de fragmentos Fab anti-BrdU-POD con 9,9 μl de PBS y BSA (concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$); se retiró el conjugado de anticuerpo y se lavó con PBS. La etapa final implica la adición de 100 μl de peroxidasa por pocillo incubada a temperatura ambiente hasta que las muestras positivas mostraron un color verde, que era claramente distinguible del color del sustrato de peroxidasa pura. Se midió la absorbancia a 405 nm con referencia a 490 nm y se correlacionó directamente con el nivel de BrdU incorporada en la célula.

Dos de los compuestos de prueba (6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina y 6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniilpurina) mostraron sólo una ligera reducción (< 5%) en la división o el crecimiento celular a la mayor tasa de dosificación de 200 μM . Los demás compuestos de prueba así como los dos compuestos de prueba que acaban de mencionarse a tasas menores no afectaron de manera significativa a la división o el crecimiento celular. Por tanto, la división o el crecimiento celular parecieron normales.

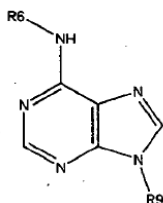
Organización del citoesqueleto. Uno de los cambios cruciales relacionados con la edad durante el envejecimiento celular *in vitro* son las alteraciones en la organización del citoesqueleto. Normalmente los fibroblastos jóvenes tienen un patrón difuso de actina dispersa de manera homogénea por la totalidad de la célula con poca o ninguna polimerización en comparación con el patrón de tinción similar a varillas altamente polimerizadas observado de la manera más común en células agrandadas y senescentes. Se estudió el patrón de tinción de actina del citoesqueleto tiñendo las células con ligando fluorescente faloidina marcada con FITC, usando un microscopio de fluorescencia. Entonces se examinaron visualmente las células tratadas y no tratadas para identificar cualquier cambio dentro de las células. No se usaron controles.

Se observaron las alteraciones no visibles en la organización del citoesqueleto de células tratadas con compuestos de prueba. No hubo desplazamiento ni cambio evidente del patrón difuso de actina dispersa de manera homogénea por la totalidad de la célula (fenotipo joven) a filamentos de actina polimerizados similares a varillas (fenotipo envejecido).

- 5 Basándose en estas evaluaciones a corto plazo (es decir, unión celular, supervivencia, crecimiento, actividad mitocondrial, actividad lisosómica, estudios de reversión y morfología de cultivos de paso temprano y cerca de la senescencia de fibroblastos de piel humanos de adulto) parece que los cuatro compuestos de prueba serían adecuados para su uso en formulaciones cosméticas u otras formulaciones para el tratamiento de la piel, incluyendo piel humana, prefiriéndose más 6-(2-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina, 6-(3-hidroxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina y 6-(2-metoxibencilamino)-9-tetrahidropiraniipurina.

REIVINDICACIONES

1. Derivados de purina 6,9-disustituídos de fórmula general I



I

y sus sales farmacéuticamente aceptables,

en la que R6 es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heterocicloalquilo, heteroalquilo o arilalquilo que contiene al menos una sustitución de hidroxilo en el mismo, y

en la que R9 es un grupo tetrahidropiran-2-ilo, tetrahidrofuran-2-ilo, 4-clorobutilo o 1-etoxietilo;

en los que alquilo indica una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que contiene de 1 a 8 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, halógeno, alquiloxilo, ariloxilo, alquilamino, arilamino, amino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, alquiloxycarbonilamino, ariloxycarbonilamino, arilo, heterociclo y heteroarilo;

en los que alquenilo indica una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada que contiene de 2 a 7 átomos de carbono con al menos un doble enlace en la misma, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 6 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino,

en los que alquinilo indica una cadena de alquinilo ramificada o no ramificada que contiene de 2 a 7 átomos de carbono con al menos un triple enlace en la misma, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 6 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, alquiloxycarbonilamino y ariloxycarbonilamino;

en los que cicloalquilo indica un grupo alquilo monocíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino;

en los que arilo indica un grupo carbocíclico aromático que contiene de 6 a 18 átomos de carbono con al menos un anillo aromático o un anillo condensado múltiple con al menos un anillo aromático, que está sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino;

en los que heterociclo indica un grupo heterocíclico que contiene de 4 a 9 átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en átomo de oxígeno, átomo de azufre y átomo de nitrógeno, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino;

en los que heteroarilo indica un heterociclo en el que al menos un anillo heterocíclico es aromático, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo,

ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;

en los que heterocicloalquilo indica un grupo $-R_a\text{-Het}$ en el que Het es un grupo heterociclo y R_a es un grupo alquilo, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;

en los que heteroarilalquilo indica un grupo $-R_a\text{-HetAr}$ en el que HetAr es un grupo heteroarilo y R_a es tal como se definió anteriormente;

en los que arilalquilo indica un grupo $-R_b\text{-Ar}$ en el que Ar es un grupo arilo y R_b es una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;

en los que halógeno indica un átomo de flúor, bromo, cloro o yodo,

en los que hidroxilo indica un grupo $-\text{OH}$,

en los que mercapto indica un grupo $-\text{SH}$,

en los que amino indica un grupo $-\text{NH}_2$,

en los que carbamoilo indica un grupo $-\text{CONH}_2$.

en los que ciano indica un grupo $-\text{CN}$,

en los que carboxilo indica un grupo $-\text{COOH}$,

en los que nitro indica un grupo $-\text{NO}_2$,

en los que sulfo indica un grupo $-\text{SO}_3\text{R}_c$ en el que R_c es hidrógeno o alquilo,

en los que sulfamido indica el grupo $\text{SO}_2\text{NR}_c\text{R}_c'$ en el que R_c y R_c' son independientemente hidrógeno o alquilo,

en los que acilo indica un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_d$, en el que R_d es alquilo, arilo, arilalquilo o cicloalquilo,

en los que aciloxilo indica un grupo $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{R}_e$ en el que R_e es alquilo, arilo o heterociclo,

en los que acilamino indica un grupo $-\text{NHCOR}_f$, en el que R_f es alquilo, heterociclo o arilo,

en los que alquiloxicarbonilamino indica un grupo $-\text{NHCOOR}_g$ en el que R_g es alquilo o cicloalquilo,

en los que ariloxicarbonilamino indica un grupo $-\text{NHCOOR}_h$ en el que R_h es arilo,

en los que alquiloxilo indica un grupo $-\text{OR}_h$ en el que R_h es alquilo, cicloalquilo o arilalquilo,

en los que ariloxilo indica un grupo $-\text{OR}_g$ en el que R_g es arilo,

en los que alquilamino indica un grupo $-\text{NR}_i\text{R}_j$ en el que R_i es hidrógeno, alquilo o heterociclo y R_j es alquilo o heterociclo,

en los que arilamino indica un grupo $-\text{NR}_k\text{R}_h$ en el que R_k es hidrógeno o arilo y R_h es alquilo, arilo o heterociclo,

en los que alquiltio indica un grupo $-\text{SR}_h$ en el que R_h es tal como se definió anteriormente, y

en los que ariltio indica un grupo $-\text{SR}_g$ en el que R_g es tal como se definió anteriormente.

2. Derivados de purina 6,9-disustituídos según la reivindicación 1, seleccionados del grupo que consiste en 6-(2-hidroxiciclopropilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(3-hidroxiciclobutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-

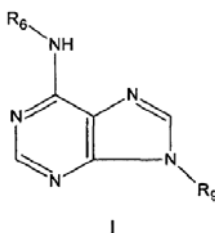
[illegible]

3. Derivados de purina 6,9-disustituídos según la reivindicación 2, seleccionados del grupo que consiste en 6-(4-hidroxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metoxibencilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(E)-(4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(E)-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(1'-metil-4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilbutilamino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metilanilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, 6-(4-hidroxi-3-metoxianilino)-9-(tetrahidropiran-2-il, tetrahidrofuran-2-il, 4-clorobutil, 1-etoxietil)purina, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. Composición cosmética que comprende una cantidad eficaz de uno o más derivados de purina 6,9-disustituidos o sus sales farmacéuticamente aceptables y uno o más excipientes, en la que los derivados de purina 6,9-disustituidos son tal como se definen en la reivindicación 1.

5. Composición cosmética según la reivindicación 4, en la que los derivados de purina 6,9-disustituidos son tal como se definen en la reivindicación 2.

6. Composición cosmética según la reivindicación 4, en la que los derivados de purina 6,9-disustituídos son tal como se definen en la reivindicación 3.
7. Derivados de purina 6,9-disustituídos según la reivindicación 1, para su uso en la inhibición del envejecimiento o la senescencia de células epidérmicas de mamífero.
8. Derivados de purina 6,9-disustituídos según la reivindicación 2, para su uso en la inhibición del envejecimiento o la senescencia de células epidérmicas de mamífero.
9. Derivados de purina 6,9-disustituídos según la reivindicación 3, para su uso en la inhibición del envejecimiento o la senescencia de células epidérmicas de mamífero.
10. Derivados de purina 6,9-disustituídos de fórmula general I, o sus sales farmacéuticamente aceptables,



en la que R6 es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heterocicloalquilo, heteroalquilo o arilalquilo que contiene al menos una sustitución de hidroxilo en el mismo, y

en la que R9 es un grupo tetrahidropiran-2-ilo, tetrahidrofuran-2-ilo, 4-clorobutilo o 1-etoxietilo;

en los que alquilo indica una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que contiene de 1 a 8 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, halógeno, alquiloxilo, ariloxilo, alquilamino, arilamino, amino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, alquiloxycarbonilamino, ariloxycarbonilamino, arilo, heterociclo y heteroarilo;

en los que alquenilo indica una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada que contiene de 2 a 7 átomos de carbono con al menos un doble enlace en la misma, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 6 sustituyentes seleccionados del grupo que contiene halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino,

en los que alquinilo indica una cadena de alquinilo ramificada o no ramificada que contiene de 2 a 7 átomos de carbono con al menos un triple enlace en la misma, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 6 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, alquiloxycarbonilamino y ariloxycarbonilamino;

en los que cicloalquilo indica un grupo alquilo monocíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino;

en los que arilo indica un grupo carbocíclico aromático que contiene de 6 a 18 átomos de carbono con al menos un anillo aromático o un anillo condensado múltiple con al menos un anillo aromático, que está sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, grupo hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino;

en los que heterociclo indica un grupo heterocíclico que contiene de 4 a 9 átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en átomo de oxígeno, átomo de azufre y átomo de nitrógeno, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxycarbonilamino y alquiloxycarbonilamino;

- 5 en los que heteroarilo indica un heterociclo en el que al menos un anillo heterocíclico es aromático, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;
- 10 en los que heterocicloalquilo indica un grupo $-R_a\text{-Het}$ en el que Het es un grupo heterociclo y R_a es un grupo alquilo, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 7 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;
- 15 en los que heteroarilalquilo indica un grupo $-R_a\text{-HetAr}$ en el que HetAr es un grupo heteroarilo y R_a es tal como se definió anteriormente;
- 20 en los que arilalquilo indica un grupo $-R_b\text{-Ar}$ en el que Ar es un grupo arilo y R_b es una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, que está opcionalmente sustituido independientemente con de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo alquilo, halógeno, hidroxilo, alquiloxilo, ariloxilo, amino, alquilamino, arilamino, mercapto, carboxilo, ciano, nitro, carbamoilo, sulfo, sulfamido, acilo, acilamino, aciloxilo, alquiltio, ariltio, cicloalquilo, ariloxicarbonilamino y alquiloxicarbonilamino;
- 25 en los que halógeno indica un átomo de flúor, bromo, cloro o yodo,
- en los que hidroxilo indica un grupo $-\text{OH}$,
- en los que mercapto indica un grupo $-\text{SH}$,
- 30 en los que amino indica un grupo $-\text{NH}_2$,
- en los que carbamoilo indica un grupo $-\text{CONH}_2$.
- 35 en los que ciano indica un grupo $-\text{CN}$,
- en los que carboxilo indica un grupo $-\text{COOH}$,
- en los que nitro indica un grupo $-\text{NO}_2$,
- 40 en los que sulfo indica un grupo $-\text{SO}_3\text{R}_c$ en el que R_c es hidrógeno o alquilo,
- en los que sulfamido indica el grupo $\text{SO}_2\text{NR}_c\text{R}_c'$ en el que R_c y R_c' son independientemente hidrógeno o alquilo,
- 45 en los que acilo indica un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_d$, en el que R_d es alquilo, arilo, arilalquilo o cicloalquilo,
- en los que aciloxilo indica un grupo $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{R}_e$ en el que R_e es alquilo, arilo o heterociclo,
- 50 en los que acilamino indica un grupo $-\text{NHCOR}_f$, en el que R_f es alquilo, heterociclo o arilo,
- en los que alquiloxicarbonilamino indica un grupo $-\text{NHCOOR}_g$ en el que R_g es alquilo o cicloalquilo,
- en los que ariloxicarbonilamino indica un grupo $-\text{NHCOOR}_h$ en el que R_h es arilo,
- 55 en los que alquiloxilo indica un grupo $-\text{OR}_h$ en el que R_h es alquilo, cicloalquilo o arilalquilo,
- en los que ariloxilo indica un grupo $-\text{OR}_g$ en el que R_g es arilo,
- 60 en los que alquilamino indica un grupo $-\text{NR}_i\text{R}_j$ en el que R_i es hidrógeno, alquilo o heterociclo y R_j es alquilo o heterociclo,
- en los que arilamino indica un grupo $-\text{NR}_k\text{R}_h$ en el que R_k es hidrógeno o arilo y R_h es alquilo, arilo o heterociclo,
- 65 en los que alquiltio indica un grupo $-\text{SR}_h$ en el que R_h es tal como se definió anteriormente, y

en los que arilitio indica un grupo $-SR_g$ en el que R_g es tal como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento de estados patológicos de la piel en un mamífero.

- [illegible]

estados patológicos de la piel en un mamífero.

- | | | |
|----|-----|---|
| 5 | 13. | Derivados de purina 6,9-disustituidos según la reivindicación 1, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de respuestas inmunológicas resultantes de, o asociadas con, inflamación en la piel de mamífero. |
| 10 | 14. | Derivados de purina 6,9-disustituidos según la reivindicación 2, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de respuestas inmunológicas resultantes de, o asociadas con, inflamación en la piel de mamífero. |
| 15 | 15. | Derivados de purina 6,9-disustituidos según la reivindicación 3, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de respuestas inmunológicas resultantes de, o asociadas con, inflamación en la piel de mamífero. |
| 20 | 16. | Derivados de purina 6,9-disustituidos según la reivindicación 1, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en la mejora de efectos adversos del envejecimiento en células de mamífero. |
| | 17. | Derivados de purina 6,9-disustituidos según la reivindicación 2, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en la mejora de efectos adversos del envejecimiento en células de mamífero. |
| | 18. | Derivados de purina 6,9-disustituidos según la reivindicación 3, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en la mejora de efectos adversos del envejecimiento en células de mamífero. |