

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 216**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2007 PCT/US2007/073142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2008 WO08008770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2007 E 07799439 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2043630**

54 Título: **Derivados de purina 6,9-disustituida para uso cosmético**

30 Prioridad:

10.07.2006 US 806871 P
09.07.2007 US 774652

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2017

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;
FROHLICH, LUDEK;
DOLEZAL, KAREL;
STRNAD, MIROSLAV y
MASSINO, FRANK J.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 603 216 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-DISUSTITUIDA PARA USO COSMÉTICO

Ámbito Técnico

5 **[0002]** La presente invención proporciona el uso de compuestos de Fórmula (I) para mejorar la apariencia cosmética de las células epidérmicas de mamíferos o células de la piel humana.

La presente solicitud se define en las reivindicaciones anexas. Materias que no están comprendidas en el ámbito de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Estado de la Técnica

10 **[0003]** El envejecimiento celular o la senescencia celular es una característica universal de las células normales no transformadas, la cual se manifiesta por alteraciones morfológicas, acompañadas por una pérdida del potencial o capacidad proliferativos, dependientes de la edad, incluyendo la incapacidad de las células para responder a los factores de crecimiento exógenos. Se han propuesto una variedad de teorías para explicar el fenómeno de la senescencia celular. La evidencia experimental sugiere que la pérdida del potencial o capacidad proliferativos dependientes de la edad puede ser la función de un programa genético (véase, por ejemplo, Smith et al., Mech. Age. Dev. 13, 387 (1980); y Kirkwood et al., Theor. Biol. 53, 481 (1975)). Esta evidencia incluye estudios de fusión celular con fibroblastos humanos *in vitro*, los cuales demuestran que el fenotipo quiescente de senescencia celular es dominante sobre el fenotipo proliferativo (véase, por ejemplo, Pereira-Smith et al., Somatic Cell Genet. 8, 731 (1982); y Norwood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1, 223 (1974)) y que la síntesis de proteínas en células senescentes, anterior a la fusión con células jóvenes, es necesaria para la inhibición de la síntesis del ADN en el núcleo joven del heterodicarionte (véase, por ejemplo, Burmer et al., Exp. Cell Res. 145, 708 (1983); y Drescher-Lincoln et al., Exp. Cell Res. 153, 208 (1984)). También, la microinyección de mRNA de fibroblastos senescentes en fibroblastos jóvenes inhibe la habilidad de las células jóvenes para sintetizar ADN (véase, por ejemplo, Lumpkin et al., Science 232, 393 (1986)) y la entrada de la célula joven en la fase S del ciclo celular (Lumpkin et al., Exp. Cell Res. 160, 544 (1985)). Además, especies de mRNA únicas son amplificadas en fibroblastos senescentes *in vitro* (véase, por ejemplo, Wellinger et al., J. Cell Biol., 34, 203 (1986); Flemming et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4099 (1988); West et al., Exp. Cell Res. 184, 138 (1989); y Giordano, Exp. Cell Res. 185, 399 (1989)). También se ha sugerido que existe un programa genético alterado en fibroblastos senescentes humanos, lo cual implica la represión de la expresión de c-fos a nivel transcripcional (véase, por ejemplo, Seshadri et al., Science 247, 205 (1990)). Por lo tanto, parece haber diferencias genotípicas, así como también fenotípicas, entre células jóvenes y viejas.

35 **[0004]** En los últimos años, 6-aminopurinas sustituidas han adquirido un considerable significado bioquímico. Algunos compuestos de este tipo promueven el crecimiento vegetal y pertenecen al grupo de reguladores de crecimiento denominados "citoquininas" (Letham, Ann. Rev. Plant. Physiol. 18, 349 (1967)). En bioensayos basados en la inducción de la división celular en cultivos de tejidos vegetales, el compuesto citoquinina más activo es la citoquinina natural *trans*-zeatina (6-((E)-4-hidroxi-3-metilbutil-2-enilamino)purina, Letham, Planta 74, 228 (1967)). Citoquininas estrechamente relacionadas con zeatina se dan como bases en ARN soluble (Skoog et al., Science 154, 1354 (1966)). En los RNA de serina y tirosina de levaduras, plantas y animales, la citoquinina está adyacente al anticodon. El crecimiento de cultivos celulares de mamíferos es inhibido por determinadas adenosinas N⁶-sustituidas con actividad citoquinina (Grace et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8, 23 (1967)). Con secciones del tallo, cortes de hojas y uvas en desarrollo, 6-bencilamino-9-(2-tetrahidropiraniil)purina (BPA) ha sido reportado por provocar un mayor crecimiento que 6-bencilaminopurina (BA) de citoquinina. En bioensayos de cultivos celulares y algunas especies hortícolas, BPA también se ha demostrado como más activo (Werbrouck et al., Physiol. Plant 98, 291 (1996)).

50 **[0005]** Adicionalmente, determinadas aminopurinas 6-sustituidas (incluyendo kinetina y zeatina) han demostrado que tienen significantes propiedades anti-envejecimiento y otras propiedades, y se han encontrado útiles para el tratamiento de células de mamíferos, incluyendo la piel humana y/o las células de la piel humana. La aplicación tópica de tales composiciones permitieron la mejora de la apariencia cosmética de la piel; tales composiciones también podrían ser empleadas para el tratamiento de la piel y enfermedades o condiciones relacionadas. Significativamente, estas aminopurinas 6-sustituidas no incrementan de manera sustancial, en las cantidades empleadas, la tasa de crecimiento y la capacidad proliferativa total de las células de mamífero tratadas. Véase, por ejemplo, las patentes US 5,371,089 (6 de Diciembre, 1994) y 5,602,139 (11 de Febrero, 1997) (mejora de la apariencia cosmética de la piel); Patente US 5,614,407 (25 de Marzo, 1997) (ralentizar o retrasar cambios morfológicos que habitualmente acompañan al envejecimiento de las células de mamíferos en cultivos); y Patentes US 5,021,422 (4 de Junio, 1991) y 5,164,394 (17 de Noviembre 1992) (tratamiento de ciertas enfermedades hiperproliferativas de la piel). Todas las patentes enumeradas quedan con esto incorporadas por referencia. Las acciones anti-envejecimiento de aminopurinas 6-sustituidas sobre la piel humana fueron también demostradas por Rattan y Clark (Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 665-672 (1994) en cultivos de fibroblastos

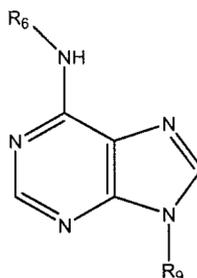
humanos, donde la presencia de kinetina (N6-furfuril-adenina) retrasó la aparición y disminuyó la relevancia de muchas características morfológicas y bioquímicas asociadas con pases seriados de células. La efectividad de tales aminopurinas 6-sustituidas para mantener la función celular normal en células que están envejeciendo, proporciona la base para su uso en preservar la vitalidad de piel en proceso de envejecimiento. Más recientemente, estudios clínicos realizados en la Universidad de California, Irvine por el Dr. Gerald Weinstein (Cosmetic Dermatology 15, 29-32 (2003)) mostraron que productos tópicos con kinetina en concentraciones que varían entre 0,005 y 0,10% (Kinerase®), mejoran la apariencia de piel facial levemente a moderadamente fotodañada. Los tratamientos tras 12 y 24 semanas produjeron una mejora significativa en la apariencia de la textura de la piel, hiperpigmentación moteada, y arrugas finas, en comparación con el estado basal, tal y como evaluado tanto por el médico como por los sujetos. Los tratamientos también produjeron una mejora en la función barrera de la piel, tal y como evaluado por medio de una disminución de la pérdida de agua transepidérmica.

[0006] Prevenir, revertir o ralentizar el proceso de envejecimiento celular ha sido una persistente, aunque esquiva, meta de la ciencia biológica, lo cual tendría una serie de significativas y prácticas consecuencias. Prevenir el envejecimiento de las células de la piel humana u otros órganos estaría asociado con la conservación de la integridad estructural y funcional y también de la integridad cosmética. Si células cultivadas pudieran tratarse de manera que retuvieran características de células jóvenes, la producción de productos valiosos por tales células en cultivo podría ser mejorada.

[0007] A pesar de que aminopurinas 6-sustituidas, especialmente kinetina y zeatina, tienen significantes propiedades anti-envejecimiento y otras propiedades, sería deseable proporcionar compuestos adicionales reguladores del crecimiento, diferenciadores, y/o anti-senescentes. Sería especialmente deseable si tales compuestos tuvieran una selectividad y eficacia (es decir, menos tóxicos y más eficaces) que las aminopurinas 6-sustituidas actualmente empleadas. La presente invención proporciona tales compuestos anti-envejecimiento mejorados.

25

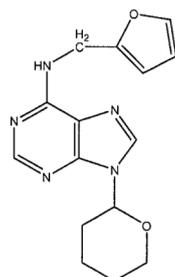
Resumen de la Invención



[0008] La presente invención está dirigida a derivados de purina 6,9-disustituida de la fórmula general y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde R₆ es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, bencilo metoxi-sustituido; y donde R₉ es 2-tetrahidropirano o 2-tetrahidrofuranilo. Grupos furfurilo metoxi-sustituidos incluyen, por ejemplo, 3-metoxifurfurilo, 4-metoxifurfurilo, y 5-metoxifurfurilo. Grupos fenilo metoxi-sustituidos incluyen, por ejemplo, 2-metoxifenilo, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 2,3-dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 2,5-dimetoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2,3,5-trimetoxifenilo. Grupos bencilo metoxi-sustituidos incluyen, por ejemplo, 2-metoxibencilo, 3-metoxibencilo, 4-metoxibencilo, 2,3-dimetoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,5-dimetoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, 3,5-dimetoxibencilo, 2,3,4-trimetoxibencilo, 2,3,5-trimetoxibencilo. El derivado de purina 6,9-disustituida preferido es 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (también conocido como N6-furfuril-9-(2-tetrahidropiranyl)adenina o piranil kinetina), la cual tiene la fórmula general

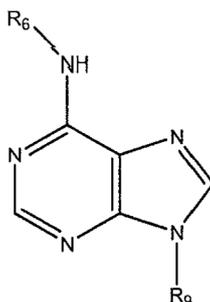
30

35



Estos derivados de purina 6,9-disustituida han demostrado poseer propiedades anti-senescentes, antiinflamatorias y/o propiedades inmunosupresoras.

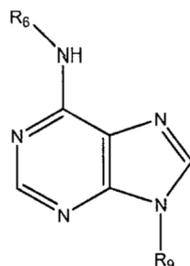
5 **[0009]** Los derivados de purina 6,9-disustituida de las presentes reivindicaciones son útiles como composiciones cosméticas para inhibir el envejecimiento y la senescencia, mejorando la apariencia cosmética de células epidérmicas de mamíferos, tales como queratinocitos o fibroblastos, y/o mitigar los efectos adversos del envejecimiento en células epidérmicas de mamíferos, tales como queratinocitos o fibroblastos. Son especialmente útiles como composiciones cosméticas para inhibir el envejecimiento y la senescencia y/o mejorar la apariencia cosmética de las células epidérmicas humanas y/o de la piel humana. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para mitigar los efectos adversos del envejecimiento en células de mamífero, donde dicho método comprende aplicar una cantidad efectiva de un derivado de purina 6,9-disustituida a las células de mamífero, donde el derivado de purina 6,9-disustituida tiene la fórmula general



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_6 es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido, y bencilo metoxi-sustituido; y donde R_9 es 2-tetrahidropiranilo o 2-tetrahidrofuranilo.

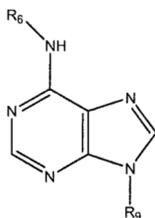
20 **[0010]** En algunos aspectos, los derivados de purina 6,9-disustituida también son útiles para el tratamiento de ciertas enfermedades de la piel, incluyendo enfermedades hiperproliferativas de la piel. Las composiciones que contienen estos derivados de purina 6,9-disustituida pueden, por ejemplo, ser empleadas para el tratamiento de condiciones de la piel, tales como lupus, eccema alérgico, eccema tóxico, dermatitis atópica, ictiosis, papiloma, enfermedad de Bowen, queratosis seborreica, queratosis actínica, carcinoma basal y de células escamosas, y similares. Por lo tanto, la descripción también proporciona un método para tratar enfermedades de la piel en células de mamífero, donde dicho método comprende aplicar una cantidad efectiva de un derivado de purina 6,9-disustituida a las células de mamífero que necesitan tal tratamiento, donde el derivado de purina 6,9-disustituida tiene la fórmula



general

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_6 es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido, y bencilo metoxi-sustituido; y donde R_9 es 2-tetrahidropiraniilo o 2-tetrahidrofuranilo.

[0011] En algunos aspectos, los derivados de purina 6,9-disustituida también son útiles para tratar condiciones relacionadas con inflamación. Tales condiciones relacionadas con inflamación incluyen, por ejemplo, inflamación, lesiones (por ejemplo, acelerar la curación de las mismas), dolor y otras respuestas inmunológicas que resultan de una inflamación (por ejemplo, proporcionando alivio de las mismas), y/o tratar enfermedades inflamatorias de la piel (por ejemplo, dermatitis atópica, liquen plano, hiperpigmentación, lesiones por herpes simple, y similares.). Por lo tanto, la descripción también proporciona un método para tratar condiciones de inflamación en células de mamífero, donde dicho método comprende aplicar una cantidad efectiva de un derivado de purina 6,9-disustituida a las células de mamífero que necesitan tal tratamiento, donde el derivado de purina 6,9-disustituida tiene la fórmula general

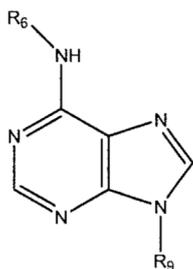


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_6 es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido, y bencilo metoxi-sustituido; y donde R_9 es 2-tetrahidropiraniilo o 2-tetrahidrofuranilo.

[0012] Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención pueden ser empleados en composiciones en forma de compuestos libres de las fórmulas anteriores o como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Sales farmacéuticamente aceptables pueden ser formadas con, por ejemplo, metales alcalinos, amonio, o aminas. Los derivados o sus sales puede estar en la forma de una mezcla racémica o de isómeros ópticamente activos; también pueden estar en forma de sales de adición con ácidos.

Descripción detallada

[0013] Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención tienen la fórmula general



donde R_6 es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido, y bencilo metoxi-sustituido; y donde R_9 es 2-tetrahidropiraniilo o 2-tetrahidrofuranilo. Grupos furfurilo metoxi-sustituídos incluyen, por ejemplo, 3-metoxifurfurilo, 4-metoxifurfurilo, y 5-metoxifurfurilo. Grupos fenilo metoxi-sustituídos incluyen, por ejemplo, 2-metoxifenilo, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 2,3-dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 2,5-dimetoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, y 2,3,5-trimetoxifenilo. Grupos bencilo metoxi-sustituídos incluyen, por ejemplo, 2-metoxibencilo, 3-metoxibencilo, 4-metoxibencilo, 2,3-dimetoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,5-dimetoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, 3,5-dimetoxibencilo, 2,3,4-trimetoxibencilo, y 2,3,5-trimetoxibencilo. El derivado de purina 6,9-disustituida preferido es 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiraniil)purina. Estos derivados de purina 6,9-disustituida han demostrado poseer propiedades anti-senescentes, antiinflamatorias y/o propiedades inmunosupresoras cuando se ponen en contacto con células de mamífero, incluidas células humanas.

5 **[0014]** Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención son útiles como composiciones cosméticas para inhibir el envejecimiento y la senescencia y/o mejorar la apariencia cosmética de células epidérmicas de mamíferos, tales como queratinocitos o fibroblastos. Son especialmente útiles como composiciones cosméticas para inhibir el envejecimiento y la senescencia y/o mejorar la apariencia cosmética de las células epidérmicas humanas y/o de la piel humana.

10 **[0015]** En algunos aspectos, los derivados de purina 6,9-disustituida también son útiles para el tratamiento de ciertas enfermedades o condiciones de la piel, incluyendo (pero no limitadas a) enfermedades hiperproliferativas de la piel. Las composiciones que contienen estos derivados de purina 6,9-disustituida pueden, por ejemplo, ser empleados para el tratamiento de lupus, eccema alérgico, eccema tóxico, dermatitis atópica, ictiosis, papiloma, enfermedad de Bowen, queratosis seborreica, queratosis actínica, carcinoma basal y de células escamosas, acné, eritema y similares.

15 **[0016]** En algunos aspectos, los derivados de purina 6,9-disustituida también son útiles para tratar la inflamación, acelerar la curación de lesiones, proporcionar alivio del dolor y de otras respuestas inmunológicas resultantes de la inflamación, y/o tratar enfermedades o condiciones inflamatorias de la piel (por ejemplo, dermatitis atópica, liquen plano, hiperpigmentación, lesiones por herpes simplex, eritema y similares).

20 **[0017]** Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención pueden ser empleados en composiciones en forma de compuestos libres de las fórmulas anteriores o como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; puede emplearse un derivado de purina 6,9-disustituida individualmente o una mezcla de los mismos. Sales farmacéuticamente aceptables pueden ser formadas con, por ejemplo, metales alcalinos, amonio, o aminas. Los derivados o sus sales puede estar en la forma de una mezcla racémica o de isómeros ópticamente activos; también pueden estar en forma de sales de adición con ácidos.

25 **[0018]** Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención generalmente están contenidas en una composición excipiente adecuada para la aplicación a las células de interés (por ejemplo, piel humana) y en una cantidad adecuada para su uso previsto. Tales composiciones incluyen, por ejemplo, composiciones cosméticas y farmacéuticas. Generalmente, tales composiciones comprenden de alrededor del 0,005 a alrededor del 20 por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de alrededor del 0,05 a alrededor del 10 por ciento, y más preferiblemente de alrededor del 0,1 a alrededor del 2 por ciento. Las composiciones, especialmente las composiciones cosméticas y farmacéuticas, pueden estar en la forma de soluciones, cremas, aerosoles, lociones lechosas, lociones, geles, apósitos, cataplasmas, champús, lápices labiales, ungüentos, pastas, espumas, tinturas, pulverizaciones y similares. La forma de la composición no es crítica, siempre y cuando sea adecuada para su uso previsto.

35 **[0019]** Excipientes o vehículos cosméticos y farmacéuticos aptos para la administración de los compuestos aquí proporcionada incluye cualquier excipiente conocido para aquellos expertos en la materia como adecuado para la forma particular de administración. Adicionalmente, los compuestos pueden ser formulados como el ingrediente activo farmacéutico único en la composición o pueden ser combinados con otros ingredientes activos. El compuesto activo está incluido en el excipiente en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente y/o cosméticamente útil en ausencia de graves efectos tóxicos en el individuo tratado. La concentración efectiva puede ser determinada de manera empírica, ensayando los compuestos empleando sistemas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo cultivos tisulares y ratones sin pelo u otros modelos animales apropiados. Efectos terapéuticamente y/o cosméticamente útiles incluyen, pero no están limitados a, retrasar, ralentizar, prevenir, revertir, reducir, y por lo demás modificar de un modo beneficioso, un estado patológico o efectos cosméticos adversos asociados con el envejecimiento de las células de mamíferos, especialmente células humanas, y aún más especialmente células de la piel humana. Tales efectos cosméticos pueden incluir, por ejemplo, mejorar la apariencia de la piel humana ya dañada por envejecimiento o exposición al sol/viento, prevenir (o ralentizar) en primer lugar la aparición de tal daño en piel indemne, y/o prevenir (o ralentizar) la aparición de daño adicional en piel ya dañada. Tales efectos terapéuticos pueden incluir, por ejemplo, mejorar la condición de la piel humana ya dañada por un estado patológico, prevenir (o ralentizar) en primer lugar la aparición de tal estado patológico, y/o prevenir (o ralentizar) la reaparición de estados patológicos adicionales.

55 **[0020]** La concentración de compuesto activo en la composición dependerá de la absorción, la inactivación, las tasas de excreción del compuesto activo, la pauta de dosificación, y la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Normalmente una dosis terapéuticamente y/o cosméticamente eficaz debe liberar una concentración de al menos alrededor del 0,005 por ciento, preferiblemente al menos alrededor del 0,05, y más preferiblemente al menos alrededor del 0,1 por ciento del compuesto activo al tejido tratado. El ingrediente activo puede administrarse de una sola vez, o puede dividirse en un número de dosis inferiores para ser administradas a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función del tejido que está siendo tratado y pueden ser determinadas de manera empírica empleando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación a partir de datos de ensayos *in vivo* o *in vitro*. Es de señalar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo

tratado. También debe entenderse que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados a lo largo del tiempo, según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos aquí son a modo de ejemplo solamente, y no pretenden limitar el alcance de las composiciones reivindicadas.

[0021] Para el tratamiento de la piel, los compuestos se pueden formular como composiciones cosméticas o farmacéuticas para aplicación local o tópica sobre la piel, en las cuales los derivados de purina 6,9-disustituida se mezclan con un excipiente farmacéuticamente o cosméticamente aceptable. Las composiciones se pueden proporcionar en forma de geles, cremas, lociones, sólidos, soluciones, suspensiones, aerosoles, y similares. Las composiciones para tratar piel humana se formulan para aplicación tópica con un derivado de purina 6,9-disustituida en un intervalo de concentración eficaz, entre alrededor del 0,005 a alrededor del 20 por ciento, preferiblemente de alrededor del 0,05 a alrededor del 10 por ciento, y más preferiblemente de alrededor del 0,1 a alrededor del 2 por ciento en una crema, ungüento, loción, gel, solución, base sólida o excipiente conocidos en la técnica por ser no tóxicos y dermatológicamente aceptables. La fracción de la concentración o del peso del derivado de purina 6,9-disustituida disuelto, suspendido, dispersado, o mezclado de otra manera en una composición para su uso con la piel humana será tal que el derivado de purina 6,9-disustituida es liberado a las células activas de la piel (por ejemplo, fibroblastos) en una concentración eficaz, generalmente al menos alrededor del 0,005 por ciento, preferiblemente al menos alrededor del 0,05 por ciento, y preferiblemente al menos alrededor del 0,1 por ciento, de tal manera que los efectos adversos del envejecimiento se reducen, revierten o retardan. El límite superior se debe ajustar de tal manera que la tasa de división celular o la capacidad proliferativa total de las células no sea incrementada sustancialmente, en particular de tal manera que las células o tejidos tratados no presentan signos típicos de alteraciones cancerosas o pre-cancerosas o cualquier otro cambio cosméticamente no deseado, tal como el desarrollo de lesiones. Aunque el límite superior puede ser de hasta alrededor del 20 por ciento, en general se prefieren límites superiores inferiores (tales como 10 por ciento, 2 por ciento, o incluso 1 por ciento), ya que los efectos anti-envejecimiento son evidentes en tales intervalos inferiores y el riesgo de un incremento indeseable en la tasa de división celular o la capacidad proliferativa total de las células se minimiza. En general, los vehículos emolientes o lubricantes que ayudan a hidratar la piel son más preferidos que los vehículos volátiles, tales como etanol, los cuales resecan la piel.

[0022] Ejemplos de bases o vehículos adecuados para la preparación de composiciones para su uso con piel humana son petrolato, petrolato más siliconas volátiles, lanolina, crema fría (USP), y ungüento hidrofílico (USP). Las composiciones se pueden preparar para que contengan una cantidad eficaz de uno o más derivados de purina 6,9-disustituida formulados para aplicación tópica, tales como emulsionados, suspendidos o mezclados de otro modo con un ungüento adecuado o crema base.

[0023] La elección de un vehículo aceptable se determina en gran medida por la forma en que el derivado de purina 6,9-disustituida va a ser administrado. Tales métodos incluyen la administración tópica. Vehículos farmacéuticamente y dermatológicamente aceptables para aplicación tópica incluyen los adecuados para uso en lociones, cremas, soluciones, suspensiones, geles, sólidos y similares. Generalmente, el vehículo es o bien de naturaleza orgánica o una emulsión acuosa y capaz de tener el derivado de purina 6,9-disustituida dispersado, suspendido o disuelto en el mismo. El vehículo puede incluir, por ejemplo, emolientes farmacéuticamente aceptables, potenciadores de la absorción por la piel, protectores UV, antioxidantes, tampones, agentes colorantes, fragancias, emulsionantes, cargas, agentes espesantes, disolventes, y similares.

[0024] Sigue una lista más detallada y descripción de tales formas (lo cual no se pretende que sea exhaustivo):

[0025] (1) Lociones. Las lociones contienen una concentración efectiva de uno o más derivados de purina 6,9-disustituida. La concentración efectiva es preferiblemente efectiva para liberar a las células activas de la piel los derivados de purina 6,9-disustituida en una concentración de entre alrededor del 0,05 a alrededor del 10 por ciento, en particular a los fibroblastos en la dermis. Las lociones también pueden contener de alrededor del 1 a alrededor del 50 por ciento, preferiblemente de alrededor del 3 a alrededor del 15 por ciento, de un emoliente y el resto de agua, un tampón adecuado, un alcohol C₂ o C₃, o una mezcla de agua o el tampón y el alcohol. Se puede emplear cualquier emoliente conocido para los expertos en la materia como adecuado para aplicación a la piel humana. Esto incluye, pero no se limita a, los siguientes:

[0026] (a) Aceites y ceras de hidrocarburos, incluyendo (pero no limitado a) aceite mineral, petrolato, parafina, ceresina, ozoquerita, cera microcristalina, polietileno y perhidroescualeno.

[0027] (b) Aceites de silicona, incluyendo (pero no limitado a) dimetilpolisiloxanos, metilfenilpolisiloxanos, copolímeros de silicona-glicol solubles en agua y solubles en alcohol.

[0028] (c) Grasas y aceites de triglicéridos, incluidos aquellos derivados de fuentes vegetales, animales y marinas. Ejemplos incluyen (pero no se limitan a) aceite de ricino, aceite de cártamo, aceite de semilla de

ES 2 603 216 T3

algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de hígado de bacalao, aceite de almendras, aceite de aguacate, aceite de palma, aceite de sésamo y aceite de soja.

[0029] (d) Ésteres de acetoglicérido, incluyendo (pero no limitados a) monoglicéridos acetilados.

5 **[0030]** (e) Glicéridos etoxilados, incluyendo (pero no limitado a) tales como monoestearato de glicerilo etoxilado.

10 **[0031]** (f) Alquilesteres de ácidos grasos con 10 a 20 átomos de carbono. Metil-, isopropil- y butilésteres de ácidos grasos son útiles aquí. Ejemplos incluyen (pero no se limitan a) laurato de hexilo, laurato de isohexilo, palmitato de isohexilo, palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, oleato de decilo, oleato de isodecilo, estearato de hexadecilo, estearato de decilo, isoestearato de isopropilo, adipato de diisopropilo, adipato de diisohexilo, adipato de dihexildecilo, sebacato de diisopropilo, lactato de laurilo, lactato de miristilo, y lactato de cetilo.

[0032] (g) Alquenilésteres de ácidos grasos con 10 a 20 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos incluyen (pero no se limitan a) miristato de oleilo, estearato de oleilo, y oleato de oleilo.

15 **[0033]** (h) Ácidos grasos con 9 a 22 átomos de carbono. Ejemplos adecuados incluyen (pero no se limitan a) ácidos pelargónico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, isoesteárico, hidroxiesteárico, oleico, linoleico, ricinoleico, araquidónico, behénico, y erúcico.

[0034] (i) Alcoholes grasos con 10 a 22 átomos de carbono, incluyendo (pero no limitado a) alcoholes láurico, miristílico, cetílico, hexadecanoico, estearílico, isoestearílico, hidroxiestearílico, oleílico, ricinoleílico, behenílico, erucílico, y 2-octil dodecanoico.

20 **[0035]** (j) Éteres de alcohol grasos, incluyendo (pero no limitado a) alcoholes grasos etoxilados de 10 a 20 átomos de carbono, tales como (pero no están limitados a) alcoholes láurico, cetílico, estearílico, isoestearílico, oleílico y de colesterol, teniendo unidos al mismo de 1 a 50 grupos de óxido de etileno o de 1 a 50 grupos de óxido de propileno o mezclas de los mismos.

25 **[0036]** (k) Éter-ésteres, incluyendo (pero no limitado a) ésteres de ácidos grasos de alcoholes grasos etoxilados.

30 **[0037]** (l) Lanolina y derivados, incluyendo (pero no limitados a) lanolina, aceite de lanolina, cera de lanolina, alcoholes de lanolina, ácidos grasos de lanolina, lanolato de isopropilo, lanolina etoxilada, alcoholes de lanolina etoxilada, colesterol etoxilado, alcoholes de lanolina propoxilada, lanolina acetilada, alcoholes de lanolina acetilada, linoleato de alcoholes de lanolina, ricinoleato de alcoholes de lanolina, acetato de ricinoleato de alcoholes de lanolina, acetato de ésteres de alcohol etoxilados, hidrogenolisis de lanolina, lanolina etoxilada hidrogenada, sorbitol delanolina etoxilada, y bases de absorción de lanolina líquidos y semisólidos.

35 **[0038]** (m) Alcoholes polihídricos y derivados de poliéter, incluyendo (pero no limitado a) propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol (P.M. 2000-4000), polioxietileno-polioxipropileno-glicoles, polioxipropileno-polioxietileno-glicoles, glicerol, glicerol etoxilado, glicerol propoxilado, sorbitol, sorbitol etoxilado, hidroxipropilsorbitol, polietilenglicol (P.M. 200-6000), polietileno-metoxiglicoles 350, 550, 750, 2000, 5000, homopolímeros de poli[óxido de etileno] (P.M. 100.000-5.000.000), polialquilexiglicoles y derivados, hexilenglicol (2-metil-2,4-pentanodiol), 1,3-butilenglicol, 1,2,6-hexanotriol, etohexadiol USP (2-etil-1,3-hexanodiol), glicol vecinal C₁₅-C₁₈ y polioxipropileno-derivados de trimetilolpropano.

40 **[0039]** (n) Ésteres de alcoholes polihídricos, incluyendo (pero no limitado a) mono- y di-ésteres de ácido graso de etilenglicol y mono- y di-ésteres de ácido graso de dietilenglicol, polietilenglicol (P.M. 200-6000), mono- y di-ésteres grasos, mono- y di-ésteres de ácido graso de propilenglicol, monooleato de polipropilenglicol 2000, monoestearato de polipropilenglicol 2000, monoestearato de propilenglicol etoxilado, mono- y di-ésteres de ácido graso de glicerilo, poliésteres de ácido graso de poliglicerol, monoestearato de glicerilo etoxilado, monoestearato de 1,3-butilenglicol, diestearato de 1,3-butilenglicol, éster de ácido graso de polioxietileno poliol, ésteres de ácido graso de sorbitan, y ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitan.

50 **[0040]** (o) Ésteres de ceras, incluyendo (pero no limitado a) cera de abejas, esperma de ballena, miristato de miristilo y estearato de estearilo y derivados de cera de abeja, incluyendo, pero no limitado a, polioxietileno sorbitol de cera de abejas, los cuales son productos de reacción de cera de abejas con sorbitol etoxilado con un contenido variable de óxido de etileno, que forman una mezcla de éter-ésteres.

[0041] (p) Ceras vegetales, incluyendo (pero no limitado a) ceras de carnauba y candelilla.

[0042] (q) Fosfolípidos, incluyendo (pero no limitado a) lecitina y derivados.

[0043] (r) Esteroles, incluyendo (pero no limitado a) ésteres de colesterol y de ácidos grasos de colesterol.

[0044] (s) Amidas, incluyendo (pero no limitado a) amidas de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos etoxiladas, y alcanolamidas de ácidos grasos sólidos.

[0045] Las lociones también pueden contener de alrededor del 1 a alrededor del 10 por ciento, más preferiblemente de alrededor del 2 a alrededor del 5 por ciento, de un emulsionante. Los emulsionantes pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos. Ejemplos de emulsionantes no iónicos adecuados incluyen (pero no se limitan a) alcoholes grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono, alcoholes grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono condensados con 2 a 20 moles de óxido de etileno u óxido de propileno, alquiflenoles con 6 a 12 átomos de carbono en la cadena alquílica, condensados con 2 a 20 moles de óxido de etileno, mono- y di-ésteres de ácidos grasos de óxido de etileno, mono- y di-ésteres de ácidos grasos de alquil etoxi éter, donde la unidad de ácido graso contiene de 10 a 20 átomos de carbono, dietilenglicol, polietilenglicoles de peso molecular de 200 a 6000, propilenglicoles de peso molecular de 200 a 3000, glicerol, sorbitol, sorbitán, polioxietilén sorbitol, polioxietilén sorbitán y ésteres de ceras hidrofílicos. Emulsionantes aniónicos adecuados incluyen (pero no se limitan a) los jabones de ácidos grasos, por ejemplo, jabones de sodio, potasio y trietanolamina, en los cuales la unidad de ácido graso contiene de 10 a 20 átomos de carbono. Otros emulsionantes aniónicos adecuados incluyen (pero no se limitan a) los alquilsulfatos de metal alcalino, de amonio o de amonio sustituido, alquilarilsulfonatos, y sulfonatos de alquil etoxi éter con 10 a 30 átomos de carbono en la unidad alquilo. Los sulfonatos de alquil etoxi éter contienen de 1 a 50 unidades de óxido de etileno. Entre los emulsionantes catiónicos adecuados están compuestos de amonio cuaternario, morfolinio y piridinio. Algunos de los emolientes descritos en los párrafos precedentes también tienen propiedades emulsionantes. Cuando se formula una loción que contiene un emoliente tal, no es necesario un emulsionante adicional, aunque puede incluirse en la composición.

[0046] El resto de la loción generalmente es agua o un alcohol C₂ o C₃, o una mezcla de agua y el alcohol. Las lociones se pueden formular simplemente mezclando todos los componentes entre sí. Preferiblemente el derivado de purina 6,9-disustituida se disuelve, suspende o dispersa uniformemente de otra manera en la mezcla.

[0047] Pueden ser incluidos otros componentes convencionales de tales lociones. Uno de tales aditivos es un agente espesante a un nivel de alrededor del 1 a alrededor del 10 por ciento de la composición. Ejemplos de agentes espesantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros de carboxipolimetileno reticulado, etilcelulosa, polietilenglicoles, goma de tragacanto, goma de karaya, gomas xantana y bentonita, hidroxietilcelulosa, e hidroxipropilcelulosa.

[0048] Un ejemplo preferido de una composición adecuada para aplicación sobre la piel facial humana como una loción, contiene alrededor del 0,5 a alrededor del 10 por ciento de un derivado de purina 6,9-disustituida de esta invención (preferiblemente piranil kinetina) en una base preparada mezclando 10 partes de monoestearato de glicerol, 10 partes de alcohol cetílico, 30 partes de esperma de ballena, 10 partes de Tween 20 (derivado de polioxialquileno de monoestearato de sorbitán), 10 partes de Span 20 (monolaurato de sorbitán), 12,5 partes de glicerina, y 100 partes de agua.

[0049] (2) Cremas. Las cremas están formuladas para contener una concentración efectiva de uno o más derivados de purina 6,9-disustituida. La concentración efectiva es típicamente una cantidad efectiva para liberar al tejido tratado los derivados de purina 6,9-disustituida en una concentración de entre alrededor del 0,5 a alrededor del 10 por ciento, en particular a los fibroblastos en la dermis. Las cremas también contienen de alrededor del 5 a alrededor del 50 por ciento, preferiblemente de alrededor del 10 a alrededor del 25 por ciento, de un emoliente y el resto es agua u otro excipiente no tóxico adecuado, tal como un tampón isotónico. Los emolientes, como se ha descrito anteriormente para las lociones, también se pueden usar en las composiciones de crema. La crema también puede contener un emulsionante adecuado, como se describió anteriormente. El emulsionante se incluye en la composición a un nivel de alrededor del 3 a alrededor del 50 por ciento, preferiblemente de alrededor del 5 a alrededor del 20 por ciento.

[0050] (3) Soluciones y suspensión. Las soluciones se formulan para contener una cantidad efectiva de uno o más derivados de purina 6,9-disustituida que es típicamente una cantidad efectiva para liberar a células activas de la piel los derivados de purina 6,9-disustituida a entre alrededor del 0,5 a alrededor del 10 por ciento, en particular los fibroblastos de la dermis; el resto es agua, un disolvente orgánico adecuado u otro disolvente adecuado o tampón. Materiales orgánicos adecuados útiles como disolvente o una parte de un sistema disolvente son los siguientes: propilenglicol, polietilenglicol (P.M. 200-600), polipropilenglicol (P.M. 425-2025), glicerina, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol, etanol, isopropanol, tartrato de dietilo, butanodiol, y mezclas de los mismos. Tales sistemas disolventes pueden contener también agua.

[0051] Estas composiciones que se formulan como soluciones o suspensiones pueden aplicarse sobre la piel, o pueden ser formuladas como un aerosol y se aplica a la piel como una pulverización. Las composiciones de aerosol además contienen de alrededor del 25 a alrededor del 80 por ciento, más preferiblemente de alrededor del 30 a alrededor del 50 por ciento, de un propulsor adecuado. Ejemplos de tales propulsores son los hidrocarburos de bajo peso molecular clorados, fluorados y clorofluorados.

También se emplean óxido nitroso, dióxido de carbono, butano y propano como gases propulsores. Estos propulsores se emplean tal como se entiende en el estado de la técnica en una cantidad y bajo una presión adecuada para expulsar el contenido del contenedor.

5 **[0052] (4) Geles.** Las composiciones de gel se pueden formular mezclando simplemente un agente espesante adecuado con las composiciones de solución o suspensión descritas anteriormente. Ejemplos de agentes espesantes adecuados han sido previamente descritos con respecto a las lociones.

10 **[0053]** Las composiciones gelificadas contienen una cantidad efectiva de derivados de uno o más derivados de purina 6,9-disustituída, la cual típicamente es una cantidad efectiva para liberar a las células activas de la piel, en particular los fibroblastos de la dermis, los derivados de purina 6,9-disustituída a entre alrededor del 0,05 a alrededor del 10 por ciento; de alrededor del 5 a alrededor del 75 por ciento, preferiblemente de alrededor del 10 a alrededor del 50 por ciento, de un disolvente orgánico como descrito anteriormente; de alrededor del 0,5 a alrededor del 20 por ciento, preferiblemente de alrededor del 1 a alrededor del 10 por ciento del agente espesante; siendo el resto agua u otro excipiente acuoso.

15 **[0054] (5) Sólidos.** Las composiciones de formas sólidas se pueden formular como composiciones de tipo barra, destinados a aplicarse en los labios u otras partes del cuerpo. Tales composiciones contienen una cantidad efectiva de uno o más derivados de purina 6,9-disustituída. La cantidad es típicamente una cantidad efectiva para liberar a las células activas de la piel, particularmente los fibroblastos de la dermis, los derivados de purina 6,9-disustituída, a entre alrededor del 0,5 a alrededor del 10 por ciento. Los sólidos también contienen de alrededor del 50 a alrededor del 98 por ciento, preferiblemente de alrededor del 60 a alrededor del 90 por ciento, de los emolientes anteriormente descritos. Esta composición puede contener además desde alrededor del 1 a alrededor del 20 por ciento, preferiblemente de alrededor del 5 a alrededor del 15 por ciento, de un agente espesante adecuado, y, si se desea o es necesario, emulsionantes y agua o tampones. Agentes espesantes descritos anteriormente con respecto a las lociones se emplean adecuadamente en las composiciones en forma sólida.

25 **[0055]** También se pueden emplear en cualquiera de estos tipos de composiciones para aplicación tópica, u otra forma de aplicación, otros ingredientes, tales como conservantes, incluyendo metil-parabeno o etil-parabeno, perfumes, colorantes o similares, que son conocidos en la técnica por proporcionar a composiciones para aplicación sobre la piel la estabilidad, fragancia o color deseables, u otras propiedades deseables, tales como blindaje de rayos actínicos del sol.

30 **[0056]** La composición también puede incluir otros ingredientes activos mitigantes de efectos adversos por la edad, tales como retinoides, kinetina, y/o zeatina, distintos de los derivados de purina 6,9-disustituída, pero no debe incluir ingredientes que potencian o inducen propiedades inductoras de la división celular, tales como auxina. Composiciones preferidas contienen, como el único ingrediente activo mitigante de efectos adversos por la edad, uno o más derivados de purina 6,9-disustituída.

35 **[0057]** Composiciones para uso con piel humana preferiblemente se pueden aplicar una vez al día o, si es necesario para lograr el resultado deseado, más a menudo, a las áreas de la piel para la que se pretende el tratamiento. Se entiende que el régimen de tratamiento preciso depende del individuo tratado y puede determinarse empíricamente dependiendo de la formulación y, en particular, de la edad del individuo tratado. Cualquier régimen es aceptable, siempre que se logren los efectos mitigantes de la edad deseados, sin efectos secundarios indeseables sustancialmente perjudiciales o duraderos.

40 **[0058]** Los métodos para tratar piel humana se practican mediante la aplicación sobre la piel, preferiblemente a diario, de una composición de la invención adecuada para el tratamiento de piel humana, tal y como tratado anteriormente, por un período indefinido, en general, mientras la persona desee disfrutar de la mitigación de los efectos adversos del envejecimiento de la piel. Una aplicación diaria de una composición sobre la piel debería ser necesaria durante al menos alrededor de un mes, y hasta al menos alrededor de un año, dependiendo de la edad de la persona, la condición de la piel a la que se aplica la composición, y la concentración de derivado de purina 6,9 disustituída en la composición, antes de que los efectos beneficiosos (por ejemplo, retrasando cambios morfológicos relacionados con la edad en fibroblastos de la capa celular basal de la piel) comiencen a ser evidentes en la superficie de la piel. Si la aplicación del derivado de purina 6,9-disustituída se finaliza, los efectos del envejecimiento mitigados por el método pueden producirse de nuevo después de algún tiempo.

55 **[0059]** Para fibroblastos (u otras células activas, tales como queratinocitos) de la piel humana, el método se practica aplicando sobre la superficie externa de la piel una composición que está formulada como una crema, ungüento, loción, gel, solución, perfume, sólido u otra forma adecuada, fisiológicamente aceptable, para la aplicación sobre la superficie externa de la piel, donde la composición contiene uno o más derivados de purina 6,9-disustituída en una concentración efectiva para liberar a la dermis de la piel una concentración efectiva, efectiva para mitigar los efectos adversos del envejecimiento sobre células activas (por ejemplo, fibroblastos) en la dermis, por lo que la piel tratada envejece más lentamente que piel no tratada y/o se vuelve más joven en apariencia que anteriormente al tratamiento, tal como se manifiesta por una reducción en la formación de arrugas y/o flacidez u otros indicadores cosméticos de edad. Tales concentraciones son típicamente de alrededor del 0,05 a alrededor del 10 por ciento

(preferiblemente de alrededor del 0,1 a alrededor del 2 por ciento). La concentración precisa, la cual puede ser determinada empíricamente, es una función del vehículo excipiente o de liberación y de la forma en la cual se presenta la composición sobre la superficie de la piel.

5 **[0060]** La divulgación también se refiere a métodos para el tratamiento de la senescencia celular y de los estados patológicos mencionados anteriormente, así como para mitigar los efectos adversos del envejecimiento de las células de mamíferos, especialmente células humanas (y más especialmente células de la piel humana). El o los derivados de purina 6,9-disustituida de esta divulgación pueden ser administrados de manera profiláctica o terapéutica, en forma de composiciones descritas anteriormente y en las cantidades efectivas descritas anteriormente.

10 **[0061]** Tal y como empleado aquí, mitigar el efecto adverso del envejecimiento de las células de mamífero significa que el desarrollo de las alteraciones morfológicas que ocurren normalmente con el envejecimiento en células normales de mamífero *in vitro* o *in vivo*, se ralentiza, se revierte y/o se retrasa. Los efectos adversos del envejecimiento también incluyen alteraciones en la expresión génica y en la biosíntesis de proteínas, relacionadas con la edad. El efecto mitigante referido aquí se consigue sin incrementar sustancialmente la tasa de crecimiento o la capacidad proliferativa total de las células que son tratadas.

15 **[0062]** La mitigación de los efectos adversos del envejecimiento en células, incluyendo los efectos en células *in vitro* y/o *in vivo*, puede detectarse como un retraso o reversión de la aparición de las alteraciones morfológicas y fenotípicas relacionados con la edad que habitualmente se producen con el envejecimiento de las células. Estas alteraciones incluyen las alteraciones detectadas en las células de cultivos tisulares, tales como la incapacidad de las células más viejas de responder a factores de crecimiento exógenos y/o al alto nivel de autofluorescencia encontrado en las células viejas. Según envejecen las células, exhiben una pérdida del potencial proliferativo dependiente de la edad. Células de fibroblasto cultivadas que son viejas, muestran numerosas características relacionadas con la edad, incluyendo morfología aplanada e irregular, tamaño anormalmente grande, crecimiento escaso, rendimiento celular por unidad de superficie de sustrato del cultivo bajo, una frecuencia significativa de células polinucleadas, dificultad en la tripsinización, la incapacidad de crecer hasta confluencia, y/o una alta tasa de producción de desechos en el medio de cultivo. Las células jóvenes muestran mayor capacidad de respuesta a factores de crecimiento y tasas de síntesis de ADN y de proteínas más elevadas que las células viejas. Células de fibroblastos de mamíferos jóvenes, incluidos los humanos, en cultivo tisular, se muestran sanas y limpias; poseen una morfología regular, larga y delgada, fusiforme; están densamente dispuestas en formaciones, mientras alcanzan la confluencia en sustratos de cultivo; no crecen más unas que otras; rara vez tienen más de un núcleo; y producen pocos desechos en el medio de cultivo. Alteraciones *in vivo* relacionadas con la edad incluyen alteraciones en los tejidos de mamíferos, tales como el desarrollo de, o el aumento del o la profundidad de las arrugas, líneas, flacidez de la piel, decoloraciones, manchas, apariencia coriácea y/o amarilleada, asociados a la apariencia cosmética de la piel, así como a las alteraciones en la integridad estructural y funcional del tejido. Las composiciones de esta invención son efectivas para mejorar la apariencia general y el estado de la piel, incluyendo las alteraciones relacionadas con la edad y alteraciones que podrían no estar estrechamente relacionadas con el envejecimiento (por ejemplo, el acné, eritema, enrojecimiento, y similares). Para los fines de esta invención, tales alteraciones que podrían no estar estrechamente relacionadas con el envejecimiento, o incluso podrían ser independientes del envejecimiento, pretenden estar incluidas en las alteraciones relacionadas con la edad.

20 **[0063]** Los métodos de esta invención pueden emplearse en combinación con otros métodos terapéuticos o cosméticos (especialmente aquellos asociados con el tratamiento de la piel humana). Por lo tanto, los presentes métodos pueden emplearse en combinación con, por ejemplo, tratamientos o dispositivos de láser o basados en otros tipos de luz.

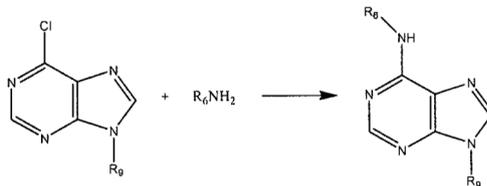
25 **[0064]** Tal y como empleado aquí, la capacidad proliferativa total de las células normales, tales como células de fibroblastos, es una medida de la capacidad proliferativa finita de células y se refiere al número total de duplicaciones del número celular, a la cual puede someterse un cultivo de tales células antes de que el crecimiento del cultivo cese, y es una función de la edad del donante del que se obtuvieron las células. Las células obtenidas a partir de tejido fetal presentan una mayor capacidad proliferativa en cultivo que las células obtenidas a partir de tejido adulto.

30 **[0065]** Tal y como empleado aquí, la tasa de crecimiento o la tasa de proliferación es una medida de la velocidad a la que las células se dividen. Una unidad de medida reconocida por los expertos en la materia es el recíproco del tiempo de duplicación. Al final del ciclo de vida de un cultivo de células normales, el cese del crecimiento del cultivo aparece muy rápidamente, disminuyendo desde valores casi normales, característicos de las células jóvenes, a cero, en solamente unas pocas duplicaciones.

35 **[0066]** Tal y como empleado aquí, alterar sustancialmente la tasa de crecimiento o la capacidad total proliferativa significa alterar la tasa de división celular o el número de duplicaciones celulares más allá de lo que está dentro de la variación normal entre células y tejidos. En particular, la tasa de crecimiento o la capacidad proliferativa total no se altera de tal manera que las células tratadas sean inmortalizadas o

experimenten una transformación maligna. En el caso de células tratadas *in vivo*, el tejido tratado no altera sustancialmente el tamaño, el espesor o desarrolla células precancerosas o cancerosas. Métodos para la evaluación de la tasa de crecimiento y la capacidad proliferativa total son conocidos por los expertos en la materia. Cualquiera de estos métodos, incluyendo los ejemplificados aquí, se puede emplear para evaluar la alteración en la tasa de crecimiento o en la capacidad proliferativa total.

[0067] Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención por lo general pueden



prepararse a partir de las correspondientes purinas 6-cloro-9-sustituidas, mediante reacción con la amina apropiada.

6-Cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina, la cual se puede emplear para preparar los derivados de purina 6,9-disustituida preferidos de esta invención, puede sintetizarse a partir de 6-cloropurina y 3,4-dihidropirano, empleando ácido p-toluensulfónico, de acuerdo con la bibliografía (Robins et al., J. Am. Chem. Soc. 83, 2574 (1961)). Bencilaminas, fenilaminas y furfurilaminas de partida, no sustituidas o metoxi-sustituidas, no disponibles comercialmente (de lo contrario, obtenidas a través de Sigma Aldrich o Fluorochem), pueden prepararse a partir de los aldehídos correspondientes, en presencia de un catalizador metálico adecuado. La 6-cloro-9-(2-tetrahidrofuranil)purina puede sintetizarse a partir de 6-cloropurina y 3,4-dihidrofurano, empleando ácido p-toluensulfónico.

[0068] Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos. A menos que se indique lo contrario, todas las concentraciones, proporciones y similares están basados en peso.

[0069] Ejemplo 1. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. Una mezcla de 6-cloropurina (60 g, 388 mmol) y monohidrato de ácido tósico (1 g) en acetato de etilo (750 ml) se agitó vigorosamente a 50°C. Se añadió 3,4-dihidropirano (40 ml, 438 mmol) gota a gota a lo largo de un período de 30 min, manteniendo la temperatura de reacción entre 55-60°C (Robins et al., 1961). La solución fue agitada durante una hora adicional, y a lo largo de este período se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadió amoníaco acuoso concentrado (35 ml) y la solución se agitó durante 5 min. Subsiguientemente se extrajo una solución homogénea de color verde oscuro con 2 x 200 ml de agua. El extracto de acetato de etilo de color amarillo se secó durante la noche sobre sulfato de sodio y después se enfrió a -20°C. El sólido amarillo generado se secó nuevamente al vacío sobre pentóxido de fósforo a 37°C. Rendimiento: 66,9 g (72,2%). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺ = 239 (100).

[0070] Ejemplo 2. El ejemplo también ilustra la preparación de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. Una mezcla de 6-cloropurina (50 g, 323 mmol) y ácido p-toluensulfónico (2,5 g, 14,5 mmol) en acetato de etilo (200 ml) se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Se añadió 2,3-dihidrofurano (37,5 g, 535 mmol) gota a gota a lo largo de un período de 30 min. La solución se agitó durante una hora adicional, durante la cual se disolvió completamente la 6-cloropurina (Lewis et al., J. Org. Chem., 26; 1961; 3837). Subsiguientemente, se añadió amoníaco acuoso (150 ml) mezclado con agua, en relación molar 1:1. Se extrajo entonces una solución homogénea de color amarillo oscuro con 2x100 ml de agua. El extracto de acetato de etilo de color amarillo se secó durante la noche sobre sulfato de sodio. Entonces, la solución se filtró y se evaporó. Después de la evaporación al vacío, se secó al vacío un aceite crudo de color amarillo sobre pentóxido de fósforo a 37°C. El producto crudo de color amarillo se recristalizó a partir de éter de petróleo. Rendimiento: 80%, sólido amarillo. Punto de fusión: 92-95°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (tolueno:acetato de etilo, 1:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >97%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.05sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.22sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.48m(2H); 3.95q(1H, J = 7.4 Hz); 4.20qq(1H, J_a = 7.4 Hz, J_b = 1.9 Hz); 6.40m(1H); 8.78s(1H); 8.80s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺ = 225 (100).

[0071] Ejemplo 3. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-fururilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. A furfurilamina (100 g, 91 ml, 1030 mmol) se añadieron 30,3 g de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl) purina (126,9 mmol). El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. La solución homogénea se calentó a 90°C durante 60 minutos y subsiguientemente se enfrió hasta temperatura ambiente. Inmediatamente se depositó y separó por filtración hidrocloreuro de furfurilamina cristalino, incoloro. El filtrado restante se evaporó al vacío. Se añadió isooctano (600 ml) al aceite amarillo, se agitó intensamente, y se permitió reposar a temperatura ambiente. El producto cristalizó lentamente a lo largo de alrededor de 1 hora. Un precipitado sólido blanco se separó por filtración, se lavó con éter etílico (50 ml), y se secó al aire durante la noche para eliminar el disolvente. El producto crudo se recristalizó en

metanol. Rendimiento: 24,4 g (81,52 mmol, 64,2%). Punto de fusión: de manera precisa 144-145°C, ninguna descomposición. Cromatografía en capa fina (TLC) (cloroformo:metanol (95:5 (v: v))), una sola mancha (Rf=0,35). Cromatografía en capa fina (TLC) (cloroformo): una sola mancha (Rf=0,34). Pureza HPLC: 99+%. Análisis elemental % (esperado / encontrado): C = 60,19/60,14, H = 5,72/5,70, N = 23,40/23,30.

[0072] Ejemplo 4. El ejemplo también ilustra la preparación de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)-purina. A furfurilamina (1456 mg, 15 mmol) dispuesta en 100 ml de n-propanol, se añadieron 6-cloro-9-(2-tetrahidrofuranil)purina (2247 mg, 10 mmol) y trietilamina (3,6 ml, 25 mmol). El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. La solución homogénea se calentó a 100°C durante 3 horas y subsiguientemente se enfrió hasta temperatura ambiente. Después de la evaporación al vacío, el material resultante se trató con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de éter dietílico. El producto crudo blanco se recrystalizó en metanol. Rendimiento: 85%, sólido blanco. Punto de fusión: 128-129°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (CHCl₃:metanol, 8:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >99%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.22sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.42m(2H); 3.91q(1H, J = 7.4 Hz); 4.14q(1H, J = 7.4 Hz); 4.70bs(2H); 6.23dd(1H, J_a = 3.2 Hz, J_b = 0.9 Hz); 6.26m(1H); 6.36t(1H, J = 2.4 Hz); 7.53m(1H); 8.19bs(1H); 8.24s(1H); 8.27s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺ = 286 (100).

[0073] Ejemplo 5. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(4-metoxibencilamino)-9-(2-tetrahidropiraniil)purina. Una mezcla de 10 mmol de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiraniil)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), 12 mmol de 4-metoxibencilamina y 5 ml de trietilamina fue refluida en n-propanol durante 3 horas. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua y se extrajo en acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 30 ml de éter dietílico. Un residuo sólido se separó por filtración y el producto crudo se recrystalizó a partir de metanol. Rendimiento: 80 %, sólido blanco. Punto de fusión: 137-138°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (CHCl₃:metanol, 8:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: > 98 %. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.55m(2H); 1.68m(1H); 1.93m(2H); 2.26qq (J_a = 11.0 Hz, J_b = 4.3 Hz); 3.64qq (1H, J_a = 11.0 Hz, J_b = 4.3 Hz); 3.70s(3H); 4.00d(1H, J = 11.0 Hz); 4.65s(2H); 5.63dd(1H, J_a = 11.0 Hz, J_b = 2.2 Hz); 6.85d(2H, J = 8.8Hz); 7.28d(2H, J = 8.8 Hz); 8.23s (1H); 8.29bs(1H); 8.34s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺ = 340 (100).

[0074] Ejemplo 6. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(2-metoxibencilamino)-9-(2-tetrahidropiraniil)purina. Una mezcla de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiraniil)purina (2387 mg, 10 mmol), preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina, 2-metoxibencilamina (1470 mg, 12 mmol) y 5 ml de trietilamina (35 mmol), se refluidó en n-propanol durante 3 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de éter de petróleo. El producto crudo blanco se recrystalizó en metanol. Rendimiento: 90%, sólido blanco. Punto de fusión: 106-108°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (CHCl₃:metanol, 8:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.56m(2H); 1.71in(1H); 1.94m(2H); 2.27qq(1H, J_a = 12.3 Hz, J_b = 3.8 Hz); 3.67m(1H); 3.83s(3H); 4.20m(1H); 4.71 bs(2H); 5.64dd(1H, J_a = 11.3 Hz, J_b = 1.9 Hz); 6.83tt(1H, J_a = 7.4 Hz, J_b = 0.9 Hz); 6.97dd(1H, J_a = 8.2 Hz, J_b = 0.7 Hz); 7.14d(1H, J = 7.3 Hz); 7.20tt(1H, J_a = 7.8 Hz, J_b = 1.7 Hz); 8.09s(1H); 8.21 s(1H); 8.36s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺ = 340 (100).

[0075] Ejemplo 7. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(4-metoxibencilamino)-9-(2-tetrahidrofuranil)purina. Una mezcla de 10 mmol de 6-cloro-9-(2-tetrahidrofuranil)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), 12 mmol de 4-metoxibencilamina y 5 ml de trietilamina fue refluida en n-propanol durante 3 horas. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante consecuentemente se trató con agua y se extrajo en acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 30 ml de éter dietílico. El residuo sólido se separó por filtración y el producto crudo se recrystalizó a partir de metanol. Rendimiento: 80 %, sólido blanco. Punto de fusión: 182-183°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (CHCl₃:metanol, 8:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: > 98 %. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02sxt(1H, J = 7.4 Hz); 2.21sxt(1H, J = 0.9 Hz); 2.44m(2H); 3.72s(3H); 3.90q (1H, J = 7.4 Hz); 4.15q (J = 7.4 Hz); 4.67s(H); 6.28m(1H); 6.86d(2H, J = 8.7 Hz); 7.31d(2H, J = 8.7 Hz); 8.1bs(1H); 8.19s(1H); 8.29s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): (M+H)⁺ = 326(100).

[0076] Ejemplo 8. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(2-metoxibencilamino)-9-(2-tetrahidrofuranil)purina. Una mezcla de 2247 mg (10 mmol) de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiraniil)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), 2-metoxibencilamina (1470 mg, 12 mmol) y 5 ml de trietilamina (35 mmol), se refluidó en n-propanol durante 3 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de hexano. El producto crudo blanco se recrystalizó en metanol. Rendimiento: 90%, sólido blanco. Punto de fusión: 97-99°C. Cromatografía en

capa fina (TLC) (CHCl₃:metanol, 8:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02m(1H); 2.21sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.43m(2H); 3.83s(3H); 3.91 q(1H, J = 7.4 Hz); 4.14q(1H, J = 7.4 Hz); 4.68bs(2H); 6.26m(1H); 6.83tt(1H, J_a = 7.4 Hz, J_b = 0.9 Hz); 6.98dd(1H, J_a = 8.2 Hz, J_b = 0.7 Hz); 7.12d(1H, J = 7.3 Hz); 7.20tt(1H, J_a = 7.8 Hz, J_b = 1.7 Hz); 8.05bs(1H); 8.18s(1H); 8.27s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺= 326 (100).

[0077] Ejemplo 9. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(3-metoxibencilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. Una mezcla de 10 mmol de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina, 12 mmol de 3-metoxibencilamina y 5 ml de trietilamina fue refluida en n-propanol durante 3 horas. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua y se extrajo en acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y subsiguientemente se evaporó. Cuando el residuo oleoso se trató con 30 ml de n-hexano, se formó un producto blanco en polvo. El producto crudo se cristalizó a partir de metanol. Rendimiento: 70 %, sólido blanco. Punto de fusión: 134-135°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (CHCl₃:CH₃OH, 85:15 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >99%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.56m (2H); 1.70m (1H), 1.94m(2H); 2.30qq (1H, J_a=11.0Hz, J_b =4.3 Hz); 3.67tt (1H, J_a=11.0 Hz, J_b=4.3 Hz); 3.83s(3H); 4.00d(1H, J = 11Hz); 4.71 s(2H); 5.64dd (1H, J_a= 11.0 Hz, J_b=4.3 Hz); 6.831 (1H, J = 7.7 Hz); 6.97d (1H, J = 7.7 Hz); 7.14d (J = 7.7 Hz); 7.20tt(1H, J_a=7.7Hz, J_b=1.5 Hz); 8.09bs(1H): 8.21 s(1H); 8.36s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺= 340 (100).

[0078] Ejemplo 10. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(4-metoxifenilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. Una mezcla de 2387 mg (10 mmol) de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), 4-metoxifenilamina (1803 mg, 15 mmol) y 5 ml de diisopropilamina (35 mmol), se refluidó en n-propanol (100 ml) durante 5 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de éter de petróleo. Rendimiento: 90%, sólido blanco. Punto de fusión: 150-151 °C. Cromatografía en capa fina (TLC) (acetato de etilo:tolueno, 3:1 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.59m(2H); 1.73m(1H); 1.97m(2H); 2.31qq(1H, J_a = 12.3 Hz, J_b = 3.8 Hz); 3.69m(1H); 4.02m(1H); 5.68dd(1H, J_a = 11.3 Hz, J_b = 1.9 Hz); 6.91d(1H, J = 9.0 Hz); 7.78d(1H, J = 9.0 Hz); 8.34s(1H); 8.47s(1H); 9.72s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺= 326 (100).

[0079] Ejemplo 11. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(3-metoxibencilamino)-9-(2-tetrahidrofuranil)purina. Una mezcla de 10 mmol de 6-cloro-9-(2-tetrahidrofuranil)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), 12 mmol de 3-metoxibencilamina y 5 ml de trietilamina se refluidó en n-propanol durante 3 horas. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua y se extrajo en acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se lavó subsiguientemente con 30 ml de n-hexano. Se separó por filtración un residuo sólido blanco y el producto crudo se cristalizó a partir de metanol. Después de varias horas, se obtuvieron cristales transparentes puros. Rendimiento: 80 %, sólido blanco. Punto de fusión: 87-88°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (CHCl₃:metanol, 8:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: > 98 %. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02sxt(1H, J = 7.4 Hz); 2.22sxt(1H, J = 7.4 Hz); 2.45m(2H); 3.84s(3H); 3.91q (1H, J = 7.4 Hz); 4.14q (1H, J = 7.4 Hz); 4.68s(2H); 6.26m (1H); 6.83t (1H, J = 7.7 Hz); 6.98d(1H, J = 7.7 Hz); 7.11d(1H, J = 7.7 Hz); 7.20t(1H, J = 7.7 Hz); 8.06bs(1H); 8.17s(1H); 8.27s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺ = 326 (100).

[0080] Ejemplo 12. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(2,5-dimetoxibencilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. Una mezcla de 2387 mg (10 mmol) de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina, 2,5-dimetoxibencilamina (2006 mg, 12 mmol) y 5 ml de trietilamina (35 mmol), se refluidó en n-propanol durante 3 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de éter dietílico. Un sólido blanco se separó por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 95%, sólido blanco. Punto de fusión: 150-152°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (acetato de etilo:hexano, 1:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.56m(2H); 1.70m(1H); 1.94m(2H); 2.27qq (1H, J_a = 12.3 Hz, J_b = 3.8 Hz); 3.60s(3H); 3.70s(3H); 3.66m(1H); 3.78s(3H); 4.00m(1H); 4.68bs(2H); 5.64dd(1H, J_a = 11.2 Hz, J_b = 2.0 Hz); 6.75m(2H); 6.89dd(1H, J_a = 9.2 Hz, J_b = 1.9 Hz); 8.10bs(1H); 8.21 s(1H); 8.36s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺= 370 (100).

[0081] Ejemplo 13. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(2,5-dimetoxibencilamino)-9-(2-tetrahidrofuranil)purina. Una mezcla de 2247 mg (10 mmol) de 6-cloro-9-(2-tetrahidrofuranil)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), 2,5-dimetoxibencilamina (2006 mg, 12 mmol) y 5 ml de trietilamina (35 mmol), se refluidó en n-propanol durante 3 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-propanol, el material resultante se trató con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de éter dietílico. Un producto crudo blanco se

recristalizó en metanol. Rendimiento: 90%, sólido blanco. Punto de fusión: 103-104°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (acetato de etilo:hexano, 1:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02m(1H); 2.21 sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.43m(2H); 3.60s(3H); 3.78s(3H); 3.91 q(1H, J = 7.4 Hz); 4.14q(1H, J = 7.4 Hz); 4.65bs(2H); 6.26m(1H); 6.74m(2H); 6.90d(1H, J = 8.8 Hz); 8.10bs(1H); 8.18s(1H); 8.28s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺= 356 (100).

[0082] Ejemplo 14. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(2,3,4-trimetoxibencilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. Una mezcla de 2387 mg (10 mmol) de 6-cloro-9-(2-tetrahidropiranyl)purina, hidrocloreto de 2,3,4-trimetoxibencilamina (2799 mg, 12 mmol) y 8 ml de trietilamina (57 mmol), se reflujo en n-butanol (45 ml) durante 3 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-butanol, el material resultante se trató con agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 30 ml de éter dietílico. Un sólido blanco se separó por filtración y se recristalizó a partir de metanol. Rendimiento: 90%, sólido blanco. Punto de fusión: 142-143°C. Cromatografía en capa fina (TLC) (acetato de etilo:hexano, 1:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.57m(2H); 1.72m(1H); 1.95m(2H); 2.27qq(1H, J_a = 12.3 Hz, J_b = 3.8 Hz); 3.67m(1H); 3.73s(3H); 3.75s(3H); 3.84s(3H); 4.00m(1H); 4.66bs(2H); 5.63dd(1H, J_a = 11.3 Hz, J_b = 1.9 Hz); 6.69d(1H, J = 8.7 Hz); 6.91d(1H, J = 8.7 Hz); 8.04bs(1H); 8.20s(1H); 8.34s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): (M+H)⁺= 400 (100).

[0083] Ejemplo 15. Este ejemplo ilustra la preparación de 6-(2,3,4-trimetoxibencilamino)-9-(2-tetrahidrofuranil)purina. Una mezcla de 2247 mg (10 mmol) de 6-cloro-9-(2-tetrahidrofuranil)purina (preparada a partir de 1546 mg de 6-cloropurina), hidrocloreto de 2,3,4-trimetoxibencilamina (2799 mg, 12 mmol) y 8 ml de trietilamina (57 mmol), se reflujo en n-butanol durante 3 horas. El sólido se disolvió completamente mediante mezcla exhaustiva. Después de la evaporación al vacío del n-butanol, el material resultante se trató con agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml). El extracto de acetato de etilo se evaporó y el residuo subsiguientemente se lavó con 50 ml de hexano. Un producto crudo blanco se recristalizó en metanol. Rendimiento: 90%, sólido blanco. Punto de fusión: 140-141 °C. Cromatografía en capa fina (TLC) (acetato de etilo:hexano, 1:2 (v:v)), una sola mancha. Pureza HPLC: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.22sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.44m(2H); 3.73s(3H); 3.75s(3H); 3.84s(3H); 3.91 q(1H, J = 7.4 Hz); 4.13q(1H, J = 7.4 Hz); 4.65bs(2 H); 6.26m(1H); 6.70d(1H, J = 8.6 Hz); 6.90d(1H, J = 8.6 Hz); 8.03bs(1H); 8.19s(1H); 8.26s(1H). Espectrometría de masas-espectro de energía MS (ES): [M+H]⁺= 386 (100).

[0084] Ejemplo 16. Se han llevado a cabo diversos estudios a corto plazo, preliminares, del efecto de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina en células de fibroblastos de piel humana cultivadas. El estudio inicial implicó la adición de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl) purina (40 a 400 μM) a células de fibroblastos de piel humana en un cultivo. El porcentaje de unión de las células a la superficie del frasco de cultivo no se vio afectado después de 6 horas de tratamiento. En los restantes experimentos presentados en este ejemplo, se añadió la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina directamente al medio de cultivo, al mismo tiempo que se sembraron las células.

Se ensayó un rango más amplio de concentraciones (de 0,01 a 500 μM), para determinar los efectos de la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina sobre la supervivencia de los fibroblastos de piel humana cultivados después de 3 días de tratamiento. A concentraciones de entre 1 y 200 μM, puede haber habido una ligera estimulación del crecimiento y de la supervivencia celular. No fueron aparentes ni toxicidad ni otros efectos negativos debido al tratamiento de las células con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina.

También se evaluó el efecto del tratamiento con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0 a 400 μM) sobre el crecimiento a corto plazo de los fibroblastos humanos jóvenes. El crecimiento celular fue similar en las muestras sin tratar y en muestras tratadas con 40, 80, y 200 μM de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina. En niveles de tratamiento de alrededor de 400 μM puede haber habido una ligera disminución en el crecimiento de las células. Experimentos similares se llevaron a cabo para determinar la extensión de apoptosis y la tinción con beta-galactosidasa en células tratadas con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina y no tratadas. No hubo indicios de la inducción de apoptosis o senescencia prematura de fibroblastos humanos tratados con las diferentes dosis de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina.

También se examinó el efecto de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina en células senescentes. Un número igual de células senescentes se sembraron en matraces separados y después se trataron con diferentes concentraciones de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0 a 400 μM). El número de células se determinó después de 7 y 14 días de tratamiento, empleando un contador Coulter, después de la tripsinización y resuspensión de las células. No se observaron efectos negativos después de 7 días. Después de 14 días de tratamiento, puede haber habido un ligero efecto negativo sobre la supervivencia de las células senescentes con 200μM de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina o más. A concentraciones inferiores, no se observaron efectos negativos, a pesar de que podría haber habido un ligero aumento en el número de células de las células senescentes tratadas con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina.

5 Células senescentes de pasos finales, con un ciclo de vida de más del 95%, también fueron tratadas con diferentes concentraciones de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0 a 200 µM) para evaluar las alteraciones relacionadas con la edad. Los patrones de tinción con actina se examinaron después de tres días. El tratamiento con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina generalmente alteró el patrón de tinción con actina, desde un patrón altamente polimerizado a un patrón de filamentos menos polimerizados. Patrones menos polimerizados y difusos de tinción con actina, generalmente están asociados con características juveniles de fibroblastos humanos. Por lo tanto, la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina parece revertir algunas de las alteraciones relacionadas con la edad en la organización de la actina en células senescentes.

10 Fibroblastos senescentes de piel humana se trataron también con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0 a 400 µM) y se evaluaron para la reversión de alteraciones relacionadas con la edad. Hubo diferencias significativas en la apariencia de las células después de 7 y 30 días de tratamiento. Las células tratadas fueron en general de apariencia más joven, en los términos de volverse más delgadas y dispuestas en formaciones, después de 30 días de tratamiento. Incluso a
15 concentraciones más altas (200 y 400 µM), las células tratadas con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina parecían ser más pequeñas y tener menos desechos intracelulares en comparación con células no tratadas.

En base a estos estudios, la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina parece ser bien tolerada por los fibroblastos de piel humana jóvenes y senescentes, y tener efectos positivos en términos de reversión del patrón de actina y de la morfología de células senescentes a características relativamente más jóvenes. No se observó inducción significativa de crecimiento adicional o división celular.

20 **[0085] Ejemplo 17.** La actividad citotóxica *in vitro* de varios de los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención se determinó empleando un ensayo de microtitulación con calceína AM y un panel de líneas celulares de diferentes orígenes histogenéticos y de especies; también se examinó la kinetina como un control. Debido a que sólo las células metabólicamente activas escinden calceína AM (tetraacetoximetiléster de calceína), la concentración intracelular de calceína se corresponde con el número de células vitales en el cultivo.

25 **[0086]** Se emplearon las siguientes líneas celulares: osteosarcoma humano (HOS); carcinoma de mama MCF-7; leucemia mieloide humana K-562; y fibroblastos de ratón NIH3T3. Las células se mantuvieron en recipientes plásticos de cultivo tisular Nunc/Corning de 80 cm², y se cultivaron en medio de cultivo celular (DMEM con 5 g/l de glucosa, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomocina, 10% de suero fetal bovino, y bicarbonato de sodio).

30 **[0087]** Se prepararon y diluyeron las suspensiones celulares según el tipo de célula particular y la densidad celular objetivo esperada (2.500-30.000 células por pocillo, en base a las características de crecimiento celular) y se añadieron mediante pipeta (80 µl) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se permitió un período de pre-incubación a los inoculados de 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ para estabilización. Se añadieron diluciones cuadruplicadas de la concentración de ensayo prevista, a tiempo cero, en alícuotas de 20µl a los pocillos de la placa de microtitulación. Los compuestos ensayados en general se evaluaron a seis diluciones cuadruplicadas. La mayor concentración de pocillo empleada en el presente estudio fue de 166,7 µM. Todas las muestras se examinaron por triplicado. Las incubaciones de las células con los compuestos ensayados se realizaron durante 72 horas a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y humedad del 100%. Al final del periodo de incubación, se añadió calceína AM hasta una concentración final de 1 µg/ml incubada durante 1 hora. La intensidad de fluorescencia (FI) se midió con un lector Labsystem FIA Reader Fluoroscanner Ascent (Reino Unido). La supervivencia de las células (GI₅₀) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$GI_{50} = (FI_{\text{pocillo expuesto a compuesto}} / FI_{\text{pocillo de control promedio}}) / (FI_{\text{pocillo de control promedio}} - FI_{\text{blanco promedio}}) \times 100\%$$

El valor de GI₅₀, la concentración del fármaco letal para el 50% de las células, se calculó a partir de las curvas de respuesta a dosis obtenidas.

50 **[0088]** Se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	GI ₅₀ (µmol/l) para la línea celular ensayada			
	HOS	K-562	MCF7	NIH-3T3
Kinetina	>166,7	164,1	>166,7	155,1
6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
6-(3,5-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	>166,7	-	>166,7	>166,7

6-(4-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
6-(2,3-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	>166,7	-	>166,7	>166,7
6-(3-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	>166,7	-	>166,7	>166,7
6-(4-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	>166,7	-	>166,7	>166,7

Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención mostraron una toxicidad mínima o ninguna toxicidad para las células en concentraciones de hasta 166,7 μM , y por lo tanto son adecuados para aplicaciones cosméticas.

5 **[0089] Ejemplo 18.** La actividad citotóxica *in vitro* de varios de los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención contra fibroblastos diploides humanos se determinó mediante el ensayo estándar MTT, optimizado para placas de 96 pocillos. El ensayo se basa en la medición espectrofotométrica del producto de la conversión metabólica de MTT por las mitocondrias de las células vivas.

10 Fibroblastos humanos de prepucio (línea celular BJ) a pases intermedios se mantuvieron en recipientes plásticos de cultivo tisular de 75 cm^2 y se cultivaron en medio de cultivo celular (DMEM con 5 g/l de glucosa, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, 10% de suero fetal bovino y bicarbonato de sodio).

15 **[0091]** Alrededor de 5000 células fueron sembradas por pocillo de la placa de 96 pocillos. Después de 24 horas el medio de cultivo celular fue reemplazado por el medio de cultivo celular que contiene un compuesto de ensayo. Los compuestos ensayados en general se evaluaron a seis diluciones duplicadas. La mayor concentración empleada en el presente estudio fue habitualmente de 200 μM . En el caso de compuestos con solubilidad limitada en el medio de cultivo, se ajustó la concentración máxima. Cada compuesto de ensayo se examinó en cinco repeticiones. Se incubaron las células con los compuestos ensayados durante 72 horas a 37°C, en atmósfera de 5% de CO_2 y humedad del 100%. Al final del periodo de incubación, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo celular que contiene MTT (0,5 mg/ml) y las células se incubaron durante otras 3 horas. El formazano formado se solubilizó mediante DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm. La capacidad de los compuestos ensayados para inhibir la actividad reductora del MTT en las células fue calculada como

$$\text{IC} = (\text{A}_{\text{pocillo expuesto a compuesto}} - \text{A}_{\text{blanco promedio}}) / (\text{A}_{\text{pocillo control promedio}} - \text{A}_{\text{blanco promedio}}) \times 100\%.$$

25 El IC_{10} , la concentración del fármaco que causa una reducción del 10% de la actividad reductora del MTT, se calculó a partir de las curvas de respuesta a dosis obtenidas.

[0092] Se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	Máxima concentración ensayada ($\mu\text{mol/l}$)	IC_{10} ($\mu\text{mol/l}$)
6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	200	>200
6-furfurilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	200	>200
6-(4-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	100	>100
6-(4-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	100	>100
6-(3-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	100	>100
6-(2,4-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	25	>25
6-(3,5-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	200	>200
6-(3,4-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	200	>200
6-(3,4-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	200	>200
6-(2,3,4-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	37,5	>37,5
6-(2,3,4-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	200	>200
6-(2,4,5-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	200	>200
6-(2,4,5-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	200	>200
6-(2,4,6-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	50	>50
6-(3,4,5-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	100	>100

6-(3,4,5-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	200	>200
---	-----	------

Los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención no mostraron ningún efecto perjudicial sobre la actividad mitocondrial y la viabilidad celular en un amplio rango de concentraciones y por lo tanto son adecuados para aplicaciones cosméticas.

- 5 **[0093] Ejemplo 19.** Se determinó la inhibición de la senescencia por varios de los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención; la kinetina también se evaluó como un control. Fibroblastos diploides humanos (células HCA de diversos estadíos de pases: pase 25 - designado HCA25; pase 45 - designado HCA45; y pase 80 - designado HCA80) se tiñeron para actividad de β -galactosidasa. El medio empleado para el cultivo celular se eliminó, las células se lavaron dos veces en PBS, y se fijaron en 2 a 3 ml de solución de fijación, compuesta por un 2% de formaldehído y un 0,2% de glutaraldehído en PBS. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y después se lavaron dos veces con PBS. Las células subsiguientemente se incubaron a 37°C (sin CO₂) durante 1 a 16 horas en 2-3 ml de la solución que comprende ferricianuro 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 cítrico/ fosfato (pH 6,0). Se añadieron los compuestos de ensayo (alrededor de 50 μ M) al medio en cada pase. Después de este período de incubación, se observaron las muestras celulares con el fin de detectar la presencia de células azules, lo que indica que X-gal habría sido escindido (positivo para células senescentes). En este experimento, solamente las células senescentes se tiñeron de azul, debido a la acción de la β -galactosidasa sobre el sustrato.
- 10
- 15
- 20 **[0094]** Los resultados se presentan a continuación:

Compuesto	Células Senescentes (%)		
	HCA25	HCA50	HCA80
Kinetina	3	5	38
6-(2-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	4	6	22
6-(3-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	5	5	24
6-(4-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	4	3	26
6-(2,4-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	4	6	25
6-(2,3,4-trimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	4	5	31
6-furfurilamino-9-(2-tetrahidrofuranil)purina	3	4	12
6-(2,4-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	4	4	29
6-(3,4-dimetoxifenilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	5	7	28
6-(2,4,5-trimetoxifenilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	5	4	25

Los derivados de purina 6,9-disustituida fueron en general más efectivas que la kinetina en la retención de niveles más bajos de células senescentes después de 80 pases.

- 25 **[0095] Ejemplo de Referencia 20.** Se determinó la actividad anti-inflamatoria de varios de los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención; la kinetina también se evaluó como un control. Glioma de rata C6 (ATCC No. CCL107) fue cultivado en monocapa en medio exento de suero, químicamente definido, que contiene medio HAM F-10 / medio esencial mínimo (1:1 v/v), 2 mM L-glutamina, 1% (v/v) vitaminas de medio esencial mínimo (100x), 1% (v/v) amino ácidos no esenciales de medio esencial mínimo (100x), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, y 30 nM de selenito de sodio. La incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera humidificada. Los ensayos se realizaron en la fase de crecimiento logarítmico a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm². La síntesis intracelular de AMPc fue inducida mediante la adición de 5 mM (-)-isoproterenol; se añadieron diversas cantidades de los compuestos de ensayo, al mismo tiempo que el (-)-isoproterenol. Después de 30 min de incubación a 37°C, se retiró el medio y se determinó la cantidad celular de cAMP, empleando el kit de inmunoensayo de enzima cAMP de Amersham. El valor de I₅₀ se determinó a partir de una curva dosis-respuesta por duplicado.
- 30
- 35

[0096] Se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	Actividad anti-inflamatoria	
	I ₅₀ (μ M)	Efecto

Compuesto	Actividad anti-inflamatoria	
	I ₅₀ (µM)	Efecto
Kinetina	-	No activo
6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	13	Inhibición
6-fenilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	45	Inhibición
6-(3-metoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	7	Inhibición
6-(3,5-dimetoxibencilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina	11	Inhibición

Los derivados de purina 6,9-disustituida demostraron actividad anti-inflamatoria. La kinetina fue inactiva en el protocolo de ensayo.

5 **[0097] Ejemplo 21.** Se han llevado a cabo una serie de ensayos relacionados con la seguridad de la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina, empleando protocolos y procedimientos convencionalmente aceptados. Los resultados de estos estudios se resumen aquí.

10 **[0098] Ensayo de Ames.** Los ensayos se llevaron a cabo empleando DMSO como disolvente, y los niveles de dosis de la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina a 2,5, 5,0, 15, 50, 500, 1500, y 5000 µg/placa, basados en protocolos y procedimientos estándar (Ames et al., Mutation Research, 31, 347-364 (1975); Maron et al., Mutation Research, 113, 173-215 (1983)). Empleando auxótrofos para la histidina de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, en presencia y ausencia de hígado de rata inducido por Aroclor S9, no se observaron respuestas mutagénicas con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina en los niveles ensayados.

[0099] Ensayo *in vitro* de cribado de aberraciones cromosómicas.

15 La 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina fue ensayada en el ensayo *in vitro* de cribado de aberraciones cromosómicas, empleando células de ovario de hámster chino (CHO), tanto en ausencia como en presencia de un sistema de activación S9 inducido por Acroclor, para evaluar su potencial clastogénico. Se empleó DMSO como el disolvente y el intervalo de dosis osciló desde 0,272 hasta 272 µg/ml. El porcentaje de células con aberraciones estructurales o numéricas en las muestras tratadas con
20 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina no se incrementó de manera significativa por encima del de las muestras de control con disolvente. En base a este estudio, se concluyó que la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina es negativa con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas en células CHO.

25 **[0100] Ensayo Vascular en Membrana Corioalantoidea.** El potencial de la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina para la irritación ocular se determinó mediante el procedimiento descrito en Bagley et al., Alternative Methods in Toxicology, Vol. 6 in Progress in *in vitro* Toxicology, 131-138 (1988). La membrana corioalantoidea de huevos de gallina White Leghorn, incubada durante 14 días, se dosificó con 40 µg del compuesto de ensayo (y tres concentraciones inferiores en agua destilada) y después se incubaron adicionalmente durante alrededor de 30 minutos, momento en el cual se examinó la membrana corioalantoidea con respecto a hemorragia vascular, inyección capilar, y/o la presencia de vasos
30 sanguíneos fantasma. El valor de RC₅₀ (concentración calculada que produce una reacción positiva en el 50% de los huevos tratados) fue del 105%. En las condiciones de este ensayo, un valor de RC₅₀ menor del 1% sería considerado un irritante, mientras que un valor de RC₅₀ mayor del 3% sería considerado un no irritante. Por lo tanto, en base a este ensayo, se encontró que el compuesto de ensayo es no irritante.

35 **[0101] Ensayo MTT de Viabilidad en Epidermis.** Empleando un sistema MatTek Corporation's EpiDerm™ (que consiste en queratinocitos epidérmicos normales, obtenidos de humanos (NHEK), los cuales se han cultivado para formar un modelo altamente diferenciado de la epidermis humana de múltiples capas), se determinó que la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina sería de esperar que fuera clasificada como no irritante.

40 **[0102] Toxicidad Oral Aguda.** Ratas Wistar hembra se les dosificó por vía oral 2000 mg/kg de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina y después se observaron 1/2, 1, 2, 3, y 4 horas después de la dosificación y a continuación una vez al día durante 14 días, con respecto a efectos toxicológicos y farmacológicos; todos los animales fueron sacrificados de manera humanitaria empleando CO₂ después del estudio y se examinaron con respecto a patología macroscópica. Todos los animales sobrevivieron a
45 la dosis oral; cambios de peso durante el estudio fueron normales; y los resultados de la necropsia fueron normales.

[0103] Patch Test con Aplicación repetida en Humanos. Gel de ensayo (alrededor de 0,2 ml), que contiene alrededor del 0,1 por ciento de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina, dispuesto sobre un

parche de oclusión cuadrado de 2 cm, se colocó sobre la espalda de cada sujeto y se mantuvo durante 24 horas. Este procedimiento se repitió todos los lunes, miércoles y viernes hasta que se hubieron realizado nueve (9) aplicaciones en la misma zona (fase de inducción). El área fue examinado antes de cada nueva aplicación. Alrededor de 10-14 días después de que se hubiera retirado el noveno parche, un parche de desafío (fase de desafío) se colocó en una nueva zona de la espalda y entonces se examinó 24 y 72 horas después para reactividad. Las respuestas cutáneas se basaron en una escala de seis puntos (0 = no hay evidencia de efecto; + = apenas perceptibles; 1 = leves, 2 = moderadas, 3 = marcadas, y 4 = severas).

[0104] Cincuenta y dos (52) sujetos completaron las fases de inducción y desafío (un total de 10 aplicaciones por sujeto). De los sujetos que completaron el estudio, sólo un sujeto tenía una calificación de apenas perceptible (+) después de la aplicación en la fase de desafío (solamente a 24 horas; cuando se examinó a las 72 horas no hubo evidencia de efecto); ésta respuesta única observada no fue considerada evidencia de irritación o de naturaleza alérgica. Todos los demás sujetos no presentaron ninguna evidencia de irritación (es decir, 0 en la escala) durante las fases de inducción o desafío. No se observó evidencia de dermatitis de contacto alérgica inducida u otra irritación en sujetos humanos.

[0105] **Ejemplo 22.** La seguridad y eficacia de los derivados de purina 6,9-disustituida de esta invención como tratamientos tópicos anti-edad de la piel, se examinaron empleando el modelo de ratón sin pelo (un modelo bien establecido para el estudio de los tratamientos de fotoenvejecimiento). Ratones sin pelo SKH-1 hembra (5 semanas de edad, 20-25 gramos, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) fueron alojados individualmente en jaulas de filtro superior, y se aclimataron durante 5-7 días después de la entrega. Los ratones se dividieron en grupos de tratamiento (n = 6), incluyendo dos grupos de control diferentes (control no tratado, control de vehículo) y un control terapéutico (crema con 0,05% de ácido trans-retinoico comercialmente disponible). Agua y comida para ratones se proporcionaron *ad libitum*.

[0106] Los grupos experimentales (6 ratones por grupo) incluyeron los siguientes tratamientos: (1) Control no tratado; (2) Control de vehículo (loción MillCreek); (3) Kinetina (0,1% en loción MillCreek); (4) 6-Furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0,1% en loción MillCreek); y (5) Control terapéutico (crema con 0.05% de ácido trans-retinoico). Los diferentes tratamientos se aplicaron diariamente (lunes a viernes) durante 3 semanas sobre la piel del dorso (alrededor de 2 cm x 2 cm) de los ratones sin pelo, a una dosificación de alrededor de 20 mg.

[0107] En el estado basal (anterior al primer tratamiento), y semanalmente, la piel dorsal se midió con respecto a la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), el nivel de humedad de la piel, y elasticidad de la piel. El posible efecto de estas formulaciones tópicas sobre la proliferación de células epidérmicas se investigó empleando bromodesoxiuridina como un marcador inmunohistoquímico de la proliferación celular. El examen histológico de la piel tratada y control también se empleó para determinar los efectos cutáneos de estas formulaciones tópicas.

[0108] Se realizaron inspecciones diarias para evaluar la posible aparición de eritema (irritación) de la zona, empleando criterios de puntuación establecidos, donde Grado 0 = sin respuesta; Grado 1 = enrojecimiento muy ligero; Grado 2 = enrojecimiento leve; Grado 3 = enrojecimiento / irritación moderados; Grado 4 = enrojecimiento / irritación severos; Grado 5 = enrojecimiento / irritación muy severos; y Grado 6 = necrosis.

[0109] Las mediciones del nivel de humedad de la piel y la elasticidad de la piel son métodos no invasivos importantes, los cuales se emplean para caracterizar los efectos humectantes y anti-arrugas sobre la piel. Se empleó un instrumento de combinación DermaLab™ para medir el nivel de humedad de la piel y la elasticidad de las zonas objetivo de la piel en el estado basal y a intervalos semanales. Este instrumento estaba equipado con sondas duales, las cuales se colocan sobre la superficie de la piel, y se tomó una medición cuantitativa de los respectivos parámetros y se registraron las mediciones en un ordenador integrado.

[0110] A todos los grupos de animales se les inyectó bromodesoxiuridina (100 mg/kg) I.P. 4 horas después de la aplicación final. Los animales se sacrificaron entonces mediante inhalación de CO₂ 3 horas más tarde, seguido de dislocación cervical. Las zonas de ensayo se extirparon y se obtuvieron biopsias por punción de 6 mm de cada zona de tratamiento y de las zonas de control no tratadas. Las biopsias se depositaron en viales etiquetados que contenían 4% de formalina tamponada neutral, para la inclusión en parafina y tinción con anti-BrdU. Secciones de parafina fueron cortadas a un espesor de 5 µm y se tiñeron empleando el kit de inmunohistoquímica BrdU (X1545K de Exalpha Biologicals, Inc.) y un protocolo de tinción estándar. Los portaobjetos se contratiñeron débilmente en hematoxilina de Mayer y se evaluó con un microscopio óptico el número de células BrdU-positivas por mm de epidermis para cada sección.

[0111] Se tomaron biopsias de piel de cada zona de tratamiento y de piel no tratada como control. Las biopsias se fijaron en 4% de formalina tamponada neutra, se incluyeron en parafina, y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se examinaron las secciones de piel teñidas para determinar los efectos del tratamiento sobre la histología epidérmica, dérmica, y de la capa córnea. Las biopsias también se examinaron microscópicamente con respecto a células inflamatorias.

[0112] Irritación de la piel. Los productos de ensayo fueron bien tolerados con el tratamiento prolongado durante 3 semanas. Solamente la crema de ácido trans-retinoico causó irritación significativa (Grado 3), tras 1 a 3 semanas de tratamiento. Todos los demás tratamientos se encontraron por debajo del Grado 1,5, cayendo el tratamiento con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina por debajo del Grado 1 a lo largo del período de 3 semanas.

[0113] Nivel de Humedad de la Piel. El control terapéutico mostró una disminución significativa en la conductancia de la piel y, por tanto, una disminución del nivel de humedad de la piel. Por el contrario, los compuestos ensayados y el vehículo solo produjeron un incremento gradual en el nivel de humedad de la piel. En la semana 3 el contenido medio de humedad de todos los compuestos ensayados fue mayor que el control de vehículo o el control no tratado. En general, el tratamiento con 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina produjo uno de los mayores incrementos en la humedad de la piel de los compuestos examinados.

[0114] Elasticidad de la piel. No se observaron cambios significativos en la elasticidad de la piel de los grupos de tratamiento durante el período de ensayo de 3 semanas, para ninguno de los grupos de ensayo. Por lo tanto, la elasticidad de la piel de los grupos de tratamiento fue comparable a la del control no tratado y los grupos de tratamiento con vehículo solamente.

[0115] Tinción con bromodesoxiuridina (BrdU). La tinción con bromodesoxiuridina de la epidermis se midió para determinar el efecto de los compuestos ensayados sobre la proliferación de células epidérmicas. No hubo diferencia estadística en la tinción epidérmica con BrdU en los compuestos ensayados, en comparación con el control sin tratar o el control de vehículo, o cualquier diferencia en la tinción con BrdU con los compuestos de ensayo. Los tejidos terapéuticos tratados con control no mostraban tinción epidérmica con BrdU, pero algunas zonas localizadas de tinción en la dermis, posiblemente relacionadas con la inflamación inducida por retinoides.

[0116] Se obtuvieron biopsias de tejido a la terminación del estudio tras 3 semanas de tratamiento. La evaluación histológica mostró piel normal de apariencia "sana" con todos los compuestos ensayados. En contraste, el control terapéutico mostró un marcado aumento del espesor de la epidermis y cambios inflamatorios en la dermis. El grosor de la sección de piel de las biopsias teñidas con H & E fue medido por microscopía óptica. El espesor de la epidermis, la dermis y la capa córnea, medida tras 3 semanas de tratamiento, fue comparable a la del vehículo y del control sin tratar. En contraste, el control terapéutico aumentó tanto el espesor epidérmico como el espesor dérmico.

[0117] Estos resultados proporcionan evidencia tanto de la seguridad como de la eficacia de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina para su uso para mejorar la apariencia cosmética y para conservar la vitalidad de la piel en proceso de envejecimiento sin irritación.

[0118] Ejemplo 23. Se ha llevado a cabo un estudio clínico para determinar la eficacia cosmética y la tolerancia por parte de los sujetos de la 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0,10%) aplicada de manera tópica dos veces al día durante 12 semanas, para mejorar los signos y síntomas clínicos de la piel facial fotodañada. Se reclutaron para el estudio cuarenta voluntarias con edades de entre 40 y 65 años con signos de leves a moderados de piel facial fotodañada. Treinta y cuatro sujetos completaron el estudio; la edad media de los sujetos que completaron el estudio fue de alrededor de 54 años. Los sujetos fueron instruidos para aplicar el producto ensayado a la piel facial completa dos veces al día (eso es, por la mañana temprano y aproximadamente 1 hora antes de la hora de acostarse) durante 12 semanas consecutivas. Los sujetos también fueron instruidos para no emplear otros productos tópicos o medicaciones de cuidado de la piel durante el estudio, aparte de filtros solares o limpiadores suaves y el uso de cosméticos con color. El producto ensayado comprendía 0,1 por ciento de 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina en Loción MillCreek como vehículo.

[0119] Los sujetos fueron evaluados en las semanas 2, 4, 8 y 12. La piel facial tratada se evaluó con respecto a signos clínicos del envejecimiento cutáneo (por ejemplo, arrugas gruesas y finas, aspereza, hiperpigmentación moteada) al inicio del estudio (estado basal), así como a las 2, 4, 8 y 12 semanas. También se obtuvo la autoevaluación de los sujetos con respecto a la mejora en comparación con el estado basal (arrugas, textura, manchas, color y mejora global). Adicionalmente, se tomaron mediciones para la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y para la humedad de la piel en las mejillas de todos los sujetos.

[0120] Pérdida de agua transepidérmica (TEWL). TEWL se refiere a la cantidad de pérdida de vapor de agua a través de la capa córnea. Un incremento en los valores de TEWL sugiere o bien la pérdida de agua por evaporación (por ejemplo, sudoración o evaporación) o daños en la barrera de la piel. Una disminución en los valores de TEWL sugiere o bien la mejora de la función de barrera o la presencia de una barrera sobre la piel. Se tomaron mediciones de TEWL empleando un sensor de TEWL (Courage & Khazaka, Colonia, Alemania) compuesto por una sonda (que contiene sensores de humedad y temperatura) conectada a una unidad de procesamiento central. Para cada sujeto, la sonda se colocó en el centro de ambas mejillas y las mediciones se tomaron por duplicado.

[0121] Mediciones de la humedad de la piel. Se realizó una medición indirecta del nivel de humedad de la piel midiendo los cambios en las propiedades eléctricas de la piel. Se tomaron mediciones de capacitancia basadas en impedancia sobre la piel, empleando un dispositivo NOVA DPM 9003 (NOVA Technologies, Gloucester, MA, EE.UU.). El dispositivo realiza mediciones a diferentes frecuencias preseleccionadas (hasta 1 MHz) de la corriente alterna aplicada. Se determina un valor directamente relacionado con la capacitancia en unidades arbitrarias; un valor mayor indica una mayor capacitancia, lo cual indica un mayor nivel de humedad en la zona de ensayo. Se tomaron mediciones por triplicado en el centro de ambas mejillas para cada sujeto del ensayo.

[0122] Evaluación por Expertos de la Piel Facial del Sujeto. En la visita de estado basal (Día 0), un investigador evaluó la cara de cada sujeto con respecto a la presencia de arrugas finas, arrugas gruesas, aspereza, hiperpigmentación moteada, y otros parámetros, empleando una escala de cinco puntos (0 = ninguna; 1 = mínima; 2 = leve; 3 = moderada, y 4 = severa). La gravedad global del fotodaño de la piel (arrugas, aspereza e hiperpigmentación moteada) se evaluó empleando una escala de 10 puntos (0 = Ninguno; 1-3 = leve; 4-6 = Moderado; y 7-9 = Severo); sujetos con puntuaciones de gravedad del estado basal mayores que 6 fueron excluidos del estudio.

[0123] En cada visita subsiguiente, el investigador evaluó la mejora general en comparación con el estado basal empleando una escala de 6 puntos (1 = mejora excelente; 2 = mejora marcada; 3 = mejora moderada; 4 = leve mejoría; 5 = ninguna mejora; y 6 = peor.

[0124] Percepción de la eficacia por parte del sujeto. En cada visita subsiguiente, se solicitó a los sujetos que completaran un cuestionario de autoevaluación, para evaluar la mejora desde el estado basal para la textura de la piel, color de la piel, manchas (eso es, manchas marrones), arrugas finas; y la mejora global, empleando una escala de cinco puntos (1 = muy mejorado; 2 = algo mejorado; 3 = sin cambios; 4 = algo peor, y 5 = mucho peor).

[0125] Resultados. Se obtuvieron los siguientes resultados de ensayo, promediados para todos los sujetos y registrados como valores medios.

	Estado basal	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 12
TEWL (g/m ² /hr)	13,15	12,89	11,70*	13,08	9,54*
Cambio respecto al estado basal	/	-1,98%	-9,62%	0,11%	-27,79%
Humedad de la piel (unidades arbitrarias)	118,03	125,37*	141,30*	158,04*	165,42*
Cambio respecto al estado basal	/	6,22%	20,96%	35,10%	41,21%

* Diferencia significativa (p≤0,05) en comparación con el estado basal.

Una disminución en los valores de la TEWL indica una mejora en la función barrera de la piel; un incremento en los valores de TEWL puede indicar una interrupción en las propiedades de barrera. Un incremento de la humedad de la piel indica indirectamente un incremento en los niveles de hidratación.

[0126] Para la evaluación por parte del investigador de las condiciones generales de la piel, se obtuvieron los siguientes resultados empleando una escala de cinco puntos (0 = ninguna; 1 = mínima; 2 = leve; 3 = moderada, y 4 = severa).

	Estado basal	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 12
Arrugas finas	2,23	2,18	1,97*	1,74*	1,62*
Cambio respecto al estado basal	/	-1.28%	-11.25%	-21.79%	-27.63%
Arrugas gruesas	2,25	2,35	2,22	2,20	2,03*
Cambio respecto al estado basal	/	4.44%	-4.76%	-7.23%	-13.75%
Aspereza	1,68	1,05*	0,58*	0,23*	0,26*

Cambio respecto al estado basal	/	-37.31%	-63.79%	-85.71 %	-83.64%
Hiperpigmentación moteada	1,73	1,70	1,50*	1,23*	1,03*
Cambio respecto al estado basal	/	-1.45%	-15.63%	-30.65%	-40.68%
Irritación de la piel	0	0	0	0	0
Cambio respecto al estado basal	/	0	0	0	0
Acné	0,63	0,60	0,53	0,53	0,32*
Cambio respecto al estado basal	/	-4.00%	-13.64%	-9.52%	-45.00%
Eritema [†]	0,60	0,40 ^{††}	0,31*	0,20*	0,21*
Cambio respecto al estado basal	/	-33.33%	-47.62%	-66.67%	-66.67%

* Diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en comparación con el estado basal.

5 [†] Si los datos fueron restringidos solamente a los sujetos que tenían signos de eritema en el estado basal, hubo una diferencia significativa en todos los períodos de tiempo. Cuando los datos fueron restringidos solamente a los sujetos que no tenían signos de eritema en el estado basal, no hubo aumento significativo en cualquier período de tiempo, indicando la no inducción de signos visibles de eritema.

^{††} Altamente sugestivo ($p=0,056$) de un aumento significativo de eritema en la semana 2.

10 Un porcentaje de cambio negativo en los parámetros de la tabla anterior representa una mejora en el parámetro relevante. Se observó una mejora significativa por parte de los expertos evaluadores en uno o más períodos de tiempo para las arrugas finas y gruesas, aspereza, hiperpigmentación moteada, acné y eritema. No se observó ninguna irritación de la piel.

15 **[0127]** La evaluación del investigador de la condición general de la piel basada en la apariencia cosmética relacionada con el envejecimiento de la piel, empleando una escala de 10 puntos (0 = Ninguna; de 1 - 3 = Leve; 4 - 6 = Moderada; y 7 - 9 = Severa), fue la siguiente: 4,10 en el estado basal; 4,05 a las 2 semanas (cambio del -1,22% respecto al estado basal); 3,56 a las 4 semanas (cambio del -15,23% respecto al estado basal); 3,20 a las 8 semanas (cambio del -24,32% respecto al estado basal); y 3,03 a las 12 semanas (cambio del -27,97% respecto al estado basal). Las diferencias observadas en las semanas 4, 8 y 12 fueron significativas ($p \leq 0,001$). Un porcentaje de cambio negativo en la condición general de la piel representa una mejora en la apariencia cosmética relacionada con el envejecimiento de la piel.

20 **[0128]** La evaluación del investigador de la mejora general de la condición de la piel (en relación al estado basal), empleando una escala de 6 puntos (1 = mejora excelente; 2 = mejora marcada; 3 = mejora moderada; 4 = leve mejoría; 5 = ninguna mejora; y 6 = peor), fue la siguiente: 4,95 a las 2 semanas; 4,44 a las 4 semanas (cambio del -10,61 % respecto a los datos de la semana 2); 4,11 a las 8 semanas (cambio del -16,67% respecto a los datos de la semana 2); y 4,12 a las 12 semanas (cambio del -17,16% respecto a los datos de la semana 2). Las diferencias observadas en las semanas 4, 8 y 12 fueron significativas ($p \leq 0,001$). Un porcentaje de cambio negativo en mejoría general representa una mejora en las condiciones de la piel.

30 **[0129]** Los resultados de la auto evaluación de los sujetos de las condiciones de la piel durante el estudio, empleando una escala de cinco puntos (1 = muy mejoradas; 2 = algo mejoradas; 3 = sin cambios; 4 = algo peores, y 5 = mucho peores), fueron los siguientes:

	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 12
Textura de la piel	2,21	2,03*	1,91*	1,74*
Cambio relativo a los datos de la semana 2	/	-8,97%	-15,58%	-23,38%
Color de la piel	2,74	2,50*	2,23*	2,12*
Cambio relativo a los datos de la semana 2	/	-5,32%	-18,28%	-22,58%
Manchas/manchas	2,70	2,58	2,26*	2,15*

	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 12
marrones				
Cambio relativo a los datos de la semana 2	/	-6,19%	-18,95%	-23,16%
Arrugas finas	2,62	2,11*	2,00*	1,88*
Cambio relativo a los datos de la semana 2	/	-18,68%	-23,60%	-28,09%
Mejoría general	2,36	2,14	1,97*	1,91*
Cambio relativo a los datos de la semana 2		-6,17	-16,25%	-18,75%

* Diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en comparación con los datos de la semana 2.

5 Un porcentaje de cambio negativo en los parámetros de la tabla anterior representa una mejora en el parámetro relevante. Los sujetos informaron de una mejora significativa en uno o más periodos de tiempo para la textura de la piel, color de la piel, manchas, manchas marrones, y arrugas finas. Además, los sujetos informaron de una mejora significativa en las semanas 8 y 12 en el estado general y la apariencia de su piel.

10 [0130] En general, los sujetos experimentaron una mejora significativa en la condición general de la piel y una reducción significativa de los efectos adversos asociados con el envejecimiento durante el periodo de estudio, basado tanto en la evaluación de expertos como en la autoevaluación. No se observaron irritación de la piel ni otros efectos adversos.

15 [0131] **Ejemplo 24.** Este ejemplo compara los datos clínicos para 6-furfurilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)purina (0,10%) aplicada de manera tópica, tomados del Ejemplo 23, con datos clínicos similares, generados por kinetina (0,1%) aplicada de manera tópica, de un estudio anterior. El protocolo para el ensayo clínico anterior para kinetina fue similar al protocolo como descrito en el Ejemplo 23 para el compuesto inventivo; treinta y dos voluntarias completaron el estudio con kinetina previo. Esta comparación está basada en las evaluaciones por parte de expertos y autoevaluaciones del estado de la piel para datos de ocho y doce semanas, para algunos de los parámetros evaluados en ambos estudios.

[0132] Las comparaciones basadas en la evaluación por parte de expertos son las siguientes:

	Mejoría media desde estado basal			
	Datos de la Semana Ocho		Datos de la Semana Doce	
	Kinetina	Compuesto inventivo	Kinetina	Compuesto inventivo
TEWL	13%	1%	15%	28%
Arrugas finas	2%	22%*	6%*	28%*
Arrugas gruesas	4%	7%	4%	14%*
Aspereza	35%	86%*	52%*	84%*
Hiperpigmentación moteada	25%*	31%*	25%*	41%*
Condición general de la piel	3%	24%*	4%*	28%*

20 * Mejoras clínicamente significativas ($p \leq 0,05$)

[0133] Las comparaciones basadas en la autoevaluación por parte de los sujetos son las siguientes:

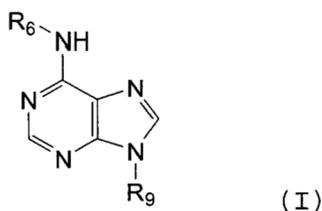
	Sujetos que refirieron Mejoría respecto al Estado Basal	
	Datos de la Semana Ocho	Datos de la Semana Doce

ES 2 603 216 T3

	Kinetina	Compuesto inventivo	Kinetina	Compuesto inventivo
Textura	77%	83%	87%	88%
Arrugas finas	57%	83%	71 %	88%
Manchas	50%	60%	74%	63%
Color	53%	66%	71%	68%

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la apariencia cosmética de las células epidérmicas de mamíferos, el cual comprende el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



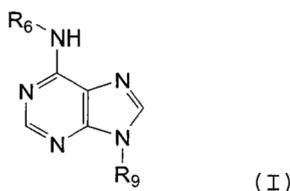
5 donde R₆ es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido o bencilo metoxi-sustituido, y R₉ es 2-tetrahidropiraniilo o 2-tetrahidrofuranilo.

2. El método según la reivindicación 1, donde las células de mamífero son células de piel humana.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, donde en la fórmula (I) R₆ es furfurilo o furfurilo metoxi-sustituido y R₉ es 2-tetrahidropiraniilo.

4. El método según la reivindicación 3, donde R₆ es furfurilo.

10 5. Un método para mejorar la apariencia cosmética de células de piel humana, el cual comprende el uso de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



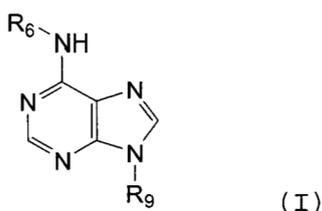
donde R₆ es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido o bencilo metoxi-sustituido, y R₉ es 2-tetrahidropiraniilo o 2-tetrahidrofuranilo.

15 6. El método según la reivindicación 5, donde las células de piel humana están en un ser humano vivo.

7. El método según la reivindicación 5 o 6, donde en la fórmula (I) R₆ es furfurilo o furfurilo metoxi-sustituido y R₉ es 2-tetrahidropiraniilo.

8. El método según la reivindicación 7, donde R₆ es furfurilo.

20 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde el contenido del compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la composición es de 0,05-10%, preferiblemente 0,1-2%.



10. Uso no terapéutico de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

25 donde R₆ es furfurilo, furfurilo metoxi-sustituido, fenilo, fenilo metoxi-sustituido o bencilo metoxi-sustituido, y R₉ es 2-tetrahidropiraniilo o 2-tetrahidrofuranilo, para mejorar la apariencia cosmética de células epidérmicas de mamíferos.

ES 2 603 216 T3

11. El uso no terapéutico según la reivindicación 10, donde en la fórmula (I) R_6 es furfurilo o furfurilo metoxi-sustituido y R_9 es 2-tetrahidropiraniilo.
12. El uso no terapéutico según la reivindicación 11, donde R_6 es furfurilo.
- 5 13. El uso no terapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está presente en una composición que comprende además un excipiente cosmético.
14. El uso no terapéutico según la reivindicación 13, donde el contenido del compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la composición es de 0,05-10%, preferiblemente 0,1-2%.