



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월02일

(11) 등록번호 10-1478727

(24) 등록일자 2014년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/52 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7002557

(22) 출원일자(국제) 2007년07월10일

심사청구일자 2012년06월21일

(85) 번역문제출일자 2009년02월06일

(65) 공개번호 10-2009-0047457

(43) 공개일자 2009년05월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/073142

(87) 국제공개번호 WO 2008/008770

국제공개일자 2008년01월17일

(30) 우선권주장

11/774,652 2007년07월09일 미국(US)

60/806,871 2006년07월10일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US5602139 A*

US5021422 A*

Journal of the American Chemical Society,

Vol. 83, pp. 2574-2570, 1961*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

인스티튜트 오브 엑스페리멘탈 보타니, 아카데미
오브 사이언시즈 오브 더 체코 리퍼블릭

체코 공화국 165 02 프라하 6 - 리솔라예 로즈보
요바 263

(72) 발명자

스즈코바 루시예

체코 779 00 올로모우크 노베 사디 한드케호
757/1에이

자틀로우칼 마렉

체코 787 01 슴페르크 레블루크니 18아

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 6,9-이치환 퓨린 유도체 및 피부 치료를 위한 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 인 비트로 및 인 비보에서 포유동물 세포, 특히, 인간 피부 세포를 포함하는 포유동물 세포 및 인간의 피부에 대한 노화의 유해한 효과를 개선시키기 위한 방법 및 조성물과 6,9-이치환 퓨린 유도체를 포함하는 조성물을 투여하는 것에 의해 포유동물에서 과증식성 피부 질환 및 관련된 피부 질환의 치료를 제공한다.

(72) 발명자

스피칼 루카스

체코 올로모우크 772 00 나 스트렐니치 30

프로리히 루텍

체코 올로모우크 779 00 나 포조브체 39

들레잘 카렐

체코 올로모우크 779 00 보스코브코바 8

스트르나드 미로슬라브

체코 올로모우크 779 00 자파드니 25

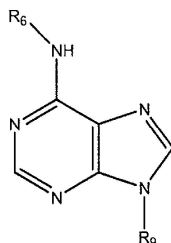
마씨노 프랭크 제이

미국 캘리포니아 94558 나파 사우스 뉴포트 드라이브 86

특허청구의 범위

청구항 1

6,9-이치환 퓨린 유도체를 유효성분으로 포함하는, 포유동물 피부의 미용적 외양을 개선시키는 미용 조성물로서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이고,



상기에서 R₆은 푸르푸릴(furfuryl), 메톡시-치환 푸르푸릴(methoxy-substituted furfuryl), 페닐, 메톡시-치환 페닐, 및 메톡시-치환 벤질이고, R₉은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로피라닐이고, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 상기 포유동물 피부의 미용적 외양을 개선시키기 위한 유효량으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R₆은 푸르푸릴 또는 메톡시-치환 푸르푸릴이고 상기 R₉은 2-테트라히드로피라닐이고, 상기 포유동물 피부는 인간 피부인 것인 미용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 R₆은 푸르푸릴이고 상기 R₉은 2-테트라히드로피라닐이고, 상기 포유동물 피부는 인간 피부인 것인 미용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.05 내지 10 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.05 내지 10 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.05 내지 10 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.1 내지 2 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.1 내지 2 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 9

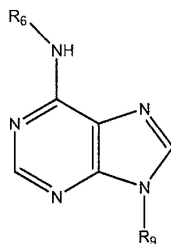
제3항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.1 내지 2 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

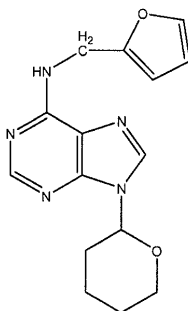
6,9-이치환 퓨린 유도체를 유효성분으로 포함하는, 포유동물의 염증 치료용 약학적 조성물로서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이고,



상기에서 R₆은 푸르푸릴, 메톡시-치환 푸르푸릴, 페닐, 메톡시-치환 페닐, 또는 메톡시-치환 벤질이고, R₉은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로퓨라닐인 것인 약학적 조성물.

청구항 12

6,9-이치환 퓨린 유도체를 유효성분으로 포함하는, 포유동물 세포에서 노화의 유해한 효과를 개선시키는 항노화 약학적 조성물로서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염인 것인 약학적 조성물:



청구항 13

제12항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.05 내지 10 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 약학적 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.1 내지 2 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 약학적 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 인간 피부 세포인 것인 약학적 조성물.

청구항 16

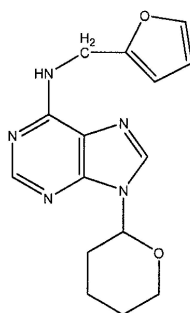
제13항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 인간 피부 세포인 것인 약학적 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 인간 피부 세포인 것인 약학적 조성물.

청구항 18

6,9-이치환 퓨린 유도체를 유효성분으로 포함하는, 인간 피부의 미용적 외양을 개선시키는 미용 조성물로서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이고, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 상기 인간 피부의 미용적 외양을 개선시키기 위한 유효량으로 존재하는 것인 미용 조성물:



청구항 19

제18항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.05 내지 10 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 0.1 내지 2 퍼센트의 양으로 존재하는 것인 미용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2006년 7월 10일에 출원된 미국 임시출원 제60/806,871호에 대해 우선권을 주장하는, 2007년 7월 9일에 출원된 미국특허출원 제11/774,652호의 계속이며, 상기 출원들은 이에 의해 그 전체가 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0002] 본 발명은 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo)에서 포유동물 세포, 특히, 인간 피부 세포를 포함한 포유동물 세포에 대한 노화의 유해한 효과를 개선(counter)시키기 위한 방법과 조성물, 및 6,9-이치환 퓨린 유도체(disubstituted purine derivatives)를 투여하는 것에 의해 포유동물에서 과증식성(hyperproliferative) 피부 질환 및 관련 피부 질환의 치료를 제공한다.

배경기술

[0003] 세포 노화(cellular aging) 또는 세포 노쇠(cellular senescence)는 외생 성장 인자의 대한 세포의 반응 상실을 포함한, 증식력 또는 증식 능력의 연령-의존적 상실을 동반하는 형태학적 변화에 의해 발현되는 정상 비-형질전환(non-transformed) 세포의 보편적인 특성이다. 세포 노화의 현상을 설명하기 위해 다양한 이론들이 제안되었다. 실험적 증거는 증식력 또는 증식능력의 연령-의존적 상실이 유전적 프로그램의 기능일 수 있다는 것을 시사한다(예를 들면, Smith et al., Mech. Age. Dev. 13, 387 (1980); 및 Kirkwood et al., Theor. Biol. 53, 481 (1975) 참조). 이 증거는 휴지 세포 노화 표현형(quiescent cellular senescent phenotype)이 증식성 표현형에 대해 우성이고(예를 들면, Pereira-Smith et al., Somatic Cell Genet. 8, 731 (1982); 및 Norwood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1, 223 (1974) 참조) 어린 세포와의 융합 전에, 노화 세포에서 단백질 합성이 이중핵 이접합체(heterodikaryon)의 어린 핵 내에서 DNA 합성의 억제를 위해 요구된다(예를 들면, Burmer et al., Exp. Cell Res. 145, 708 (1983); and Drescher-Lincoln et al., Exp. Cell Res. 153, 208 (1984) 참조)는 것을 보여주는 인 비트로 인간 섬유모세포와의 세포 융합 연구를 포함한다. 또한, 노화 섬유모세포 mRNA의 어린 섬유모세포로의 미세주입은 어린 세포가 DNA를 합성하는 능력(예를 들면, Lumpkin et al., Science 232, 393 (1986) 참조) 및 세포 주기의 S기로의 진입(Lumpkin et al., Exp. Cell Res. 160, 544 (1985))을 억제한다. 또한, 인 비트로에서 노화 섬유모세포에서 독특한 mRNA 종이 증폭된다(예를 들면, 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); 및 Giordano, Exp. Cell Res. 185, 399 (1989) 참조). 노화 인간 섬유모세포에 전사 수준에서 c-fos 발현의 억제를 포함한, 변형된 유전적 프로그램이 존재한다는 것이 시사되었다(예를 들면, Seshadri et al., Science 247, 205 (1990) 참조). 따라서, 어린 세포와 늙은 세포 간의 유전자형 및 표현형 차이가 있을 것으로 보인다.

[0004] 최근년에, 6-치환 아미노퓨린(6-substituted aminopurine)이 상당한 생화학적 중요성을 나타내고 있다. 이 종류의 일부 화합물들은 식물 성장을 촉진하고 "시토키닌(cytokinines)"이라 불리는 성장 조절자의 군에 속한다

(Letham, Ann. Rev. Plant. Physiol. 18, 349 (1967)). 식물 조직 배양에서 세포 분열의 유도에 근거한 생물학적 분석(bioassay)에서, 가장 활발한 시토키닌 화합물은 천연 시토키닌인 트랜스-제아틴(trans-zeatin)(6-(E)-4-히드록시-3-메틸부트-2-에닐아미노)퓨린(Letham, Planta 74, 228 (1967))이다. 제아틴과 밀접하게 관련된 시토키닌은 가용성 RNA 내의 염기로 나타난다(Skoog et al., Science 154, 1354 (1966)). 효모, 식물 및 동물의 세린 및 티로신 RNA에서, 상기 시토키닌은 안티코돈에 인접한다. 포유동물 세포 배양의 성장은 시토키닌 활성을 갖는 특정한 N⁶-치환 아데노신에 의해 억제된다(Grace et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8, 23 (1967)). 줄기 절편(stem segment), 잎꽂이(leaf cutting) 및 발생중인 포도에서, 6-벤질아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(BPA)이 시토키닌 6-벤질아미노퓨린(BA)보다 더 높은 성장을 유발하는 것으로 보고되었다. 조직 배양 생물학적 분석 및 일부 원예종에서, BPA가 또한 보다 활성이 높은 것으로 확인되었다(Werbrouck et al., Physiol. Plant 98, 291 (1996)).

[0005]

추가적으로, 특정한 6-(치환 아미노)퓨린(키네틴 및 제아틴 포함)이 상당한 노화 방지 및 기타 특징을 갖는 것으로 확인되고 인간 피부 및/또는 인간 피부 세포를 포함한, 포유동물 세포의 치료를 위해 유용한 것으로 발견되었다. 그와 같은 조성물의 국소 적용은 피부의 미용적 외양의 개선을 가능하게 하고; 그와 같은 조성물은 또한 피부 및 관련 질환 또는 상태의 치료를 위해 이용되었다. 중요한 것은, 이 6-(치환 아미노)퓨린은 사용된 양에서 처리된 포유동물 세포의 성장 속도 및 전체 증식능을 실질적으로 증가시키지 않는다는 것이다. 예를 들면, 미국특허 제5,371,089호(1994년 12월 6일) 및 제5,602,139호(1997년 2월 11일)(피부의 미용적 외양 개선); 미국특허 제5,614,407호(1997년 3월 25일)(배양에서 일반적으로 포유동물 세포의 노화를 동반하는 느린 또는 지연된 형태적 변화); 및 미국특허 제5,021,422호(1991년 6월 4일) 및 제5,164,394호(1992년 11월 17일)(일부 과증식성 피부 질환의 치료) 참조. 전술된 모든 특허는 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 인간 피부에 대한 6-(치환 아미노)퓨린의 항노화 작용은 또한 키네틴(N⁶-푸르푸릴-아데닌)의 존재가 세포의 연속적인 계대(serial passaging)와 연관된 다수의 형태학적 및 생화학적 특성의 발생을 지연시키고 그 수준을 감소시키는 것인 배양된 인간 섬유모세포에서 Rattan 및 Clark(Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 665-672 (1994))에 의해 입증되었다. 노화 세포의 정상적인 세포 기능을 유지하는데 있어서 그와 같은 6-(치환 아미노)퓨린의 효과가 노화 피부의 생기(vitality)를 보존하는 그들의 용도에 대한 기반을 제공한다. 보다 최근에는, Gerald Weinstein 박사에게 의해 University of California, Irvine에서 수행된 임상적 연구(Cosmetic Dermatology 15, 29-32 (2003))가 0.005 내지 0.10% 농도 범위의 국소용 키네틴 제품(Kinerase®)이 경미하게 내지 중등 정도로 광-손상된(mild to moderately photodamaged) 얼굴 피부의 외양을 개선시켰다는 것을 보여주었다. 12주 및 24주 후 치료는 의사 및 대상자 모두에 의해 평가된 바와 같이, 기준(baseline) 대비 피부 질감(skin texture)의 외양, 반상 과다색소침착(mottled hyperpigmentation), 및 미세 주름의 상당한 개선을 가져왔다. 치료는 또한 경피 수분 손실(transepidermal water loss)의 감소에 의해 평가된 바와 같이, 피부 장벽 기능의 개선을 가져왔다.

[0006]

세포 노화의 과정을 예방, 역전 또는 둔화시키는 것은 생물 과학의 지속적인, 그러나, 달성하기 어려운 목표이고, 이는 다수의 중요하고 실용적인 결과를 가질 것이다. 인간 피부 또는 다른 기관에서 세포의 노화를 예방하는 것은 구조적 및 기능적 완전성(integrity) 및 미용적 완전성의 보존과 연관될 것이다. 배양된 세포가 어린 세포의 특징을 유지하도록 처리되는 경우, 배양에서 그와 같은 세포에 의한 귀중한 산물의 생성이 개선될 수 있다.

[0007]

6-(치환 아미노)퓨린, 특히 키네틴과 제아틴이 중요한 항노화 및 기타 특성을 가지나, 추가적인 성장-조절성, 분화성, 및/또는 항-노화성 화합물을 제공하는 것이 바람직할 것이다. 그와 같은 화합물이 현재 이용되고 있는 6-(치환 아미노)퓨린보다 개선된 선택성 및 효율성(즉, 더 낮은 독성 및/또는 더 높은 효율성)을 갖는다면 특히 바람직할 것이다. 본 발명은 그와 같은 개선된 항노화 화합물을 제공한다.

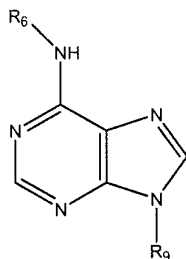
발명의 상세한 설명

[0008]

발명의 요약

[0009]

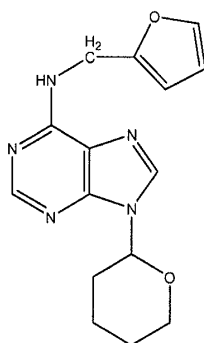
본 발명은 하기 일반식의 6,9-이치환 퓨린 유도체 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이고



[0010]

[0011]

식 중에서, R₆은 푸르푸릴(furfuryl), 메톡시-치환 푸르푸릴(methoxy-substituted furfuryl), 페닐, 메톡시-치환 페닐, 및 메톡시-치환 벤질이고, R₉은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로푸라닐이다. 메톡시-치환 푸르푸릴기는 예를 들면, 3-메톡시푸르푸릴, 4-메톡시푸르푸릴, 및 5-메톡시푸르푸릴을 포함한다. 메톡시-치환 페닐기는 예를 들면, 2-메톡시페닐, 3-메톡시페닐, 4-메톡시페닐, 2,3-디메톡시페닐, 2,4-디메톡시페닐, 2,5-디메톡시페닐, 3,4-디메톡시페닐, 3,5-디메톡시페닐, 2,3,4-트리메톡시페닐, 및 2,3,5-트리메톡시페닐을 포함한다. 메톡시-치환 벤질기는 예를 들면, 2-메톡시벤질, 3-메톡시벤질, 4-메톡시벤질, 2,3-디메톡시벤질, 2,4-디메톡시벤질, 2,5-디메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, 3,5-디메톡시벤질, 2,3,4-트리메톡시벤질, 및 2,3,5-트리메톡시벤질을 포함한다. 바람직한 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기 일반식을 갖는 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(N⁶-푸르푸릴-9-(2-테트라히드로피라닐)아데닌 또는 피라닐 키네틴으로도 불림)이다:



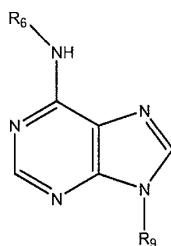
[0012]

[0013]

이 6,9-이치환 퓨린 유도체는 항-노화성, 항-염증성, 및/또는 면역억제성(immunosuppressive) 특성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0014]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 노화 및 노쇠를 억제하고, 각질형성세포(keratinocyte) 또는 섬유모세포와 같은, 포유동물 표피 세포의 미용적 외양을 개선하고, 및/또는 각질형성세포 또는 섬유모세포와 같은 포유동물 표피 세포에서 노화의 유해한 효과를 개선시키는 미용용 조성물(cosmetic composition)로서 유용하다. 그들은 노화 및 노쇠를 억제하고, 인간 표피 세포 및/또는 인간 피부의 미용적 외양을 개선시키기 위한 미용용 조성물로서 특히 유용하다. 따라서, 본 발명은 포유동물 세포에서 노화의 유해한 효과를 개선시키는 방법으로서, 상기 방법은 유효량의 6,9-이치환 퓨린 유도체를 상기 포유동물에 적용하는 단계를 포함하고, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이고



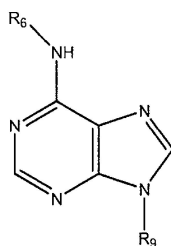
[0015]

[0016]

상기에서 R₆은 푸르푸릴, 메톡시-치환 푸르푸릴, 페닐, 메톡시-치환 페닐, 및 메톡시-치환 벤질이고, R₉은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로푸라닐인 것인 방법을 제공한다.

[0017]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 또한, 과증식성 피부 질환을 포함한, 일부 피부 질환의 치료를 위해서 유용하다. 이 6,9-이치환 퓨린 유도체를 함유한 조성물은 예를 들면, 루푸스, 알레르기성 습진, 중독성 습진, 아토피 피부염, 비늘증(ichthyosis), 유두종(papilloma), 보웬병(Bowen's disease), 지루 각화증(seborrheic keratosis), 광선 각화증(actinic keratosis), 기저세포암종 및 편평세포암종(basal and squamous cell carcinoma) 등과 같은 피부 상태의 치료를 위해 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 포유동물 세포에서 피부 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 그와 같은 치료를 필요로 하는 포유동물 세포에 유효량의 6,9-이치환 퓨린 유도체를 적용하는 단계를 포함하고, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이고



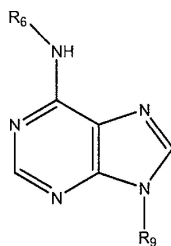
[0018]

[0019]

상기에서 R_6 은 푸르푸릴, 메톡시-치환 푸르푸릴, 페닐, 메톡시-치환 페닐, 및 메톡시-치환 벤질이고, R_9 은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로푸라닐인 것인 방법을 제공한다.

[0020]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 염증-관련 상태를 치료하기에 유용하다. 그와 같은 염증-관련 상태는 예를 들면, 염증, 병변(lesions)(예를 들면, 그의 치유를 가속화시킴), 통증 및 기타 염증으로부터 초래되는 면역학적 반응(예를 들면, 그의 완화를 제공함), 및/또는 염증 피부 질환(예를 들면, 아토피 피부염, 편평 태선(lichen planus), 과다색소침착, 헤르페스 심플렉스 병변(Herpes simplex lesions), 등을 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한, 포유동물 세포에서 염증 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 그와 같은 치료를 필요로 하는 포유동물 세포에 유효량의 6,9-이치환 퓨린 유도체를 적용하는 단계를 포함하고, 상기 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이고



[0021]

[0022]

상기에서 R_6 은 푸르푸릴, 메톡시-치환 푸르푸릴, 페닐, 메톡시-치환 페닐, 및 메톡시-치환 벤질이고, R_9 은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로푸라닐인 것인 방법을 제공한다.

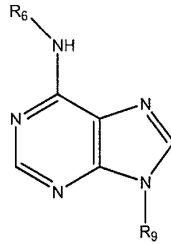
[0023]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 전술된 식의 유리 화합물의 형태 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 조성물에서 이용될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은 예를 들면, 알칼리 금속, 암모늄, 또는 아민에 의해 형성될 수 있다. 유도체 또는 그들의 염은 라세미 혼합물 또는 광학적 활성 이성질체의 형태일 수 있고, 그들은 또한 산과의 부가염(addition salt)의 형태일 수 있다.

[0024]

상세한 설명

[0025] 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 하기의 일반식을 가지며



[0026]

[0027] 식 중에서, R₆은 푸르푸릴, 메톡시-치환 푸르푸릴, 페닐, 메톡시-치환 페닐, 및 메톡시-치환 벤질이고, R₉은 2-테트라히드로피라닐 또는 2-테트라히드로푸라닐이다. 메톡시-치환 푸르푸릴기는 예를 들면, 3-메톡시푸르푸릴, 4-메톡시푸르푸릴, 및 5-메톡시푸르푸릴을 포함한다. 메톡시-치환 페닐기는 예를 들면, 2-메톡시페닐, 3-메톡시페닐, 4-메톡시페닐, 2,3-디메톡시페닐, 2,4-디메톡시페닐, 2,5-디메톡시페닐, 3,4-디메톡시페닐, 3,5-디메톡시페닐, 2,3,4-트리메톡시페닐, 및 2,3,5-트리메톡시페닐을 포함한다. 메톡시-치환 벤질기는 예를 들면, 2-메톡시벤질, 3-메톡시벤질, 4-메톡시벤질, 2,3-디메톡시벤질, 2,4-디메톡시벤질, 2,5-디메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, 3,5-디메톡시벤질, 2,3,4-트리메톡시벤질, 및 2,3,5-트리메톡시벤질을 포함한다. 바람직한 6,9-이치환 퓨린 유도체는 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린이다. 이 6,9-이치환 퓨린 유도체는 인간 세포를 포함한 포유동물 세포와 접촉시, 항-노화, 항염증, 및/또는 면역 억제 특성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0028]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 각질형성세포 및 섬유모세포와 같은, 포유동물 표피 세포의 노화 및 노쇠를 억제하고, 및/또는 미용적 외양을 개선시키는 미용용 조성물로서 유용하다. 그들은 인간 표피 세포 및/또는 인간 피부의 노화 및 노쇠를 억제하고, 및/또는 미용적 외양을 개선시키기 위한 미용용 조성물로서 특히 유용하다.

[0029]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 또한, 과증식성 피부 질환을 포함한(그러나 이에 한정되지 않음), 일부 피부 질환 또는 상태의 치료를 위해서 유용하다. 이 6,9-이치환 퓨린 유도체를 함유한 조성물은 예를 들면, 루푸스, 알레르기성 습진, 중독성 습진, 아토피 피부염, 비늘증, 유두종, 보웬병, 지루 각화증, 광선 각화증, 기저 세포암종 및 편평세포암종, 여드름, 홍반(erythema) 등의 치료를 위해 이용될 수 있다.

[0030]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 또한, 염증을 치료하고, 병변의 치유를 가속화시키고, 통증 및 염증으로부터 초래된 기타 면역학적 반응의 완화를 제공하고, 및/또는 염증 피부 질환 또는 상태(예를 들면, 아토피 피부염, 편평 태선, 과다색소침착, 헤르페스 심플렉스 병변 등)를 치료하기 위해 유용하다.

[0031]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 전술된 식의 유리 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 조성물에서 이용될 수 있다; 그와 같은 6,9-이치환 퓨린 유도체 단독 또는 그의 혼합물이 이용될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은 예를 들면, 알칼리 금속, 암모늄, 또는 아민에 의해 형성될 수 있다. 유도체 또는 그들의 염은 라세미 혼합물 또는 광학적 활성 이성질체의 형태일 수 있고, 그들은 또한 산과의 부가염의 형태일 수 있다.

[0032]

본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 일반적으로 목적 세포(예를 들면, 인간 피부)에 적용하기에 적합한 담체 조성물에 의도된 용도에 적합한 양으로 담긴다. 그와 같은 조성물은 예를 들면, 미용적 조성물 및 약제학적 조성물을 포함한다. 일반적으로, 그와 같은 조성물은 예를 들면, 약 0.005 퍼센트 내지 약 20 퍼센트의 활성 성분, 바람직하게는 약 0.05 퍼센트 내지 약 10 퍼센트, 및 보다 바람직하게는 약 0.1 퍼센트 내지 약 2 퍼센트의 활성 성분을 포함한다. 조성물, 특히, 미용적 및 약제학적 조성물은 용액, 크림, 에어로졸, 밀크 로션(milky lotion), 로션, 젤, 석고(plaster), 습포제(poultice), 샴푸, 린스틱, 연고, 페이스트, 발포제(foam), 팅크제(tincture), 스프레이, 등의 제형일 수 있다. 조성물의 제형은 그의 의도된 용도를 위해 적합한 한, 결정적인 것은 아니다.

[0033]

본 명세서에서 제공되는 화합물의 투여를 위해 적합한 미용적 및 약제학적 담체 또는 비히클은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에게 특정한 투여 방식에 적합한 것으로 알려진 임의의 담체를 포함한다. 또한, 상기 화합물은 조성물 내의 유일한 약제학적 활성 성분으로 제제화되거나 또는 다른 활성 성분들과 조합될 수 있다. 활성 화합물은 치료된 개체에 대해 심각한 독성 효과 없이 치료적으로 및/또는 미용적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 양으로 담체 내에 담긴다. 유효 농도는 조직 배양 및 무모 마우스(hairless mouse) 또는 기타 적합한 동물 모델을 포함한, 인 비트로 시스템 및 인 비보 시스템을 이용하여 화합물을 테스트하는 것에 의해 실

험적으로 결정될 수 있다. 치료적으로 및/또는 미용적으로 유용한 효과는 유익한 방식으로 포유동물 세포, 특히 인간 세포, 특히, 인간 피부 세포의 노화와 연관된 질병 상태 또는 유해한 미용 효과를 연기, 지연, 예방, 역전, 감소, 및 변형시키는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 그와 같은 미용적 효과는 예를 들면, 노화 또는 태양/바람에 대한 노출에 의해 이미 손상된 인간 피부의 외양을 개선하고, 손상되지 않은 피부에서 애초에 그와 같은 손상의 발생을 예방(또는 지연)하고, 및/또는 이미 손상된 피부에서 추가적인 그와 같은 손상의 발생을 예방(또는 지연)하는 것을 포함할 수 있다. 그와 같은 치료적 효과는 예를 들면, 질병 상태에 의해 이미 손상된 인간 피부의 상태를 개선하고, 그와 같은 질병 상태를 처음부터 예방(또는 지연)하고, 및/또는 추가적인 그와 같은 질병 상태의 재발을 예방(또는 지연)하는 것을 포함할 수 있다.

[0034]

조성물에서 활성 화합물의 농도는 활성 화합물의 흡수, 불활성화, 분비 속도, 투여 일정(dosage schedule), 및 투여량 및 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에게 공지된 다른 인자들에 의존할 것이다. 통상적으로, 치료적 및/또는 미용적 유효량은 치료된 조직에 약 0.005 퍼센트 이상, 바람직하게는 약 0.05 퍼센트 이상, 및 보다 바람직하게는 약 0.1 퍼센트 이상의 농도를 전달해야 한다. 활성 성분은 한번에 투여될 수 있거나, 또는 시간 간격을 두고 투여될 다수의 보다 작은 투여량으로 나누어질 수 있다. 정확한 투여량 및 치료의 지속기간은 치료 대상 조직의 함수이고 공지된 테스트 프로토콜을 이용하거나 또는 인 비보 또는 인 비트로 테스트 데이터로부터의 외삽(extrapolation)에 의해 실험적으로 결정될 수 있는 것으로 이해된다. 농도 및 투여량 값은 또한 치료된 개체의 연령에 따라 변할 수 있는 것으로 이해된다. 또한, 특별한 대상에 대해, 특정한 투여 계획(dosage regimen)이 개별적인 필요 및 조성물을 투여하거나 또는 조성물의 투여를 감독하는 사람의 전문적인 판단에 의해 시간의 경과에 따라 조정되어야 하고, 본 명세서에 기재된 농도 범위는 예시적인 것에 불과하며, 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 한정하도록 의도되지 않는 것으로 이해된다.

[0035]

피부의 치료를 위해, 상기 화합물은 6,9-이치환 퓨린 유도체가 약제학적으로 또는 미용적으로 허용가능한 담체와 혼합된 것인 피부로의 국부 또는 국소 적용용 미용적 또는 약제학적 조성물로 제제화될 수 있다. 상기 조성물은 겔, 크림, 로션, 고체, 용액, 현탁액, 에어로졸, 등의 제형으로 제공될 수 있다. 인간 피부의 치료용 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 무독성이고 피부학적으로 허용가능한 것으로 알려진 크림, 연고, 로션, 겔, 용액, 고체 베이스(solid base) 또는 비히클에 약 0.005 내지 약 20 퍼센트, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 10 퍼센트, 및 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 약 2 퍼센트의 유효 농도 범위로 6,9-이치환 퓨린 유도체를 갖는 국소 적용용으로 제제화된다. 인간 피부에 대한 사용을 위한 조성물에 용해, 현탁, 분산, 또는 혼합된 6,9-이치환 퓨린 유도체의 농도 또는 중량 분획은 6,9-이치환 퓨린 유도체가 일반적으로 약 0.005 퍼센트 이상, 바람직하게는 약 0.05 퍼센트 이상, 및 바람직하게는 약 0.1 퍼센트 이상의 유효 농도로 피부의 활성 세포(예를 들면, 섬유모세포)에 전달되어, 노화의 유해한 효과가 감소, 역전 또는 지연되게 할 것이다. 상한은 세포 분열 속도 또는 세포의 전체 증식 능력이 실질적으로 증가되지 않도록, 특히, 치료된 세포 또는 조직이 암성(cancerous) 또는 전-암성(pre-cancerous) 변화 또는 병변의 발달과 같은 다른 미용적으로 바람직하지 않은 변화의 전형적인 징후를 보이지 않도록 조절되어야 한다. 상한은 최대 약 20 퍼센트일 수 있으나, 보다 낮은 상한(예를 들면, 10 퍼센트, 2 퍼센트 또는 심지어 1 퍼센트)이 일반적으로 바람직하며, 이는 노화 방지 효과가 그와 같이 더 낮은 속도에서 명확하고, 세포 분열 속도 또는 세포의 전체 증식 능력의 바람직하지 않은 증가의 위험이 최소화되기 때문이다. 일반적으로, 피부를 수화시키는 피부 연화 또는 윤활 비히클(lubricating vehicle)이 피부를 건조시키는, 에탄올과 같은 휘발성 비히클보다 더 바람직하다.

[0036]

인간 피부에 사용하기 위한 조성물의 제조를 위해 적합한 베이스 또는 비히클의 예는 페트롤라툼, 페트롤라툼 플러스 휘발성 실리콘(petrolatum plus volatile silicone), 라놀린, 콜드 크림(USP), 및 친수성 연고(USP)이다. 그와 같은 방법은 국소 투여를 포함한다. 국소 적용을 위해 제제화된, 예를 들면, 유화되거나, 현탁되거나 또는 적합한 연고 또는 크림 베이스와 혼합된 하나 이상의 6,9-이치환 퓨린 유도체의 유효량을 포함하는 조성물이 제조될 수 있다.

[0037]

허용가능한 비히클의 선택은 주로 6,9-이치환 퓨린 유도체가 투여되는 방식에 의해 결정된다. 국소 적용을 위한 적합한 약제학적으로 및 피부학적으로 허용가능한 비히클은 로션, 크림, 용액, 현탁액, 겔, 고체 등에서 사용하기에 적합한 비히클을 포함한다. 일반적으로, 비히클은 속성상 유기(organic)이거나 수성 유제(emulsion)이고, 6,9-이치환 퓨린 유도체를 그 내부에 분산, 현탁 또는 용해시킬 수 있다. 비히클은 예를 들면, 약제학적으로 허용가능한 연화제, 피부 흡수 증강제(skin absorption enhancer), UV 보호제(UV protectant), 향산화제, 완충액, 착색제, 방향제(fragrance), 유화제(emulsifier), 충전제, 증점제, 용매, 등을 포함한다.

[0038]

그와 같은 제형의 보다 상세한 목록 및 설명(완전한(exhaustive) 것으로 의도되지 않음)은 하기와 같다:

- [0039] (1) 로션. 로션은 하나 이상의 6,9-이치환 퓨린 유도체의 유효 농도를 함유한다. 유효 농도는 바람직하게는 약 0.05 내지 약 10 퍼센트의 농도로 6,9-이치환 퓨린 유도체를 피부의 활성 세포, 특히, 진피의 섬유세포에 전달하기에 유효하다. 로션은 또한, 약 1 내지 약 50 퍼센트, 바람직하게는 약 3 내지 약 15 퍼센트의 피부 연화제를 포함하고, 잔량(balance)은 물, 적합한 완충액, C₂ 또는 C₃ 알코올, 또는 물 또는 상기 완충액 및 상기 알코올의 혼합액일 수 있다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에게 인간의 피부에 적용하기에 적합한 것으로 알려진 피부연화제(emollient)가 이용될 수 있다. 이들은 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다:
- [0040] (a) 미네랄 오일, 페트롤라툼(petrolatum), 파라핀, 세레신(ceresin), 오조케리트(ozokerite), 미정질 왁스(microcrystalline wax), 폴리에틸렌, 및 퍼히드로스쿠알렌(perhydrosqualene)을 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 탄화수소 오일 및 왁스.
- [0041] (b) 디메틸폴리실록산, 메틸페닐폴리실록산, 수용성 및 알코올-가용성 실리콘-글리콜 공중합체를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 실리콘 오일.
- [0042] (c) 식물, 동물 및 해양 원(marine source)으로부터 유래된 것을 포함한, 트리글리세리드 지방 및 오일. 예는 피마자유, 홍화유, 면실유, 옥수수 오일, 올리브 오일, 대구 간유(cod liver oil), 아몬드 오일, 아보카도 오일, 팜유, 참기름, 및 대두유를 포함한다(그러나, 이에 한정되지 않음).
- [0043] (d) 아세틸화 모노글리세리드를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 아세토글리세리드 에스테르.
- [0044] (e) 에톡실화 글리세릴 모노스테아레이트를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 에톡실화 글리세리드.
- [0045] (f) 10개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 알킬 에스테르. 본 발명에서 지방산의 메틸, 이소프로필 및 부틸 에스테르가 유용하다. 예는 헥실 라우레이트, 이소헥실 라우레이트, 이소헥실 팔미테이트(palmitate), 이소프로필 팔미테이트, 이소프로필 미리스테이트, 데실 올리에이트, 이소데실 올리에이트, 헥사데실 스테아레이트, 데실 스테아레이트, 이소프로필 이소스테아레이트, 디이소프로필 아디페이트, 디이소헥실 아디페이트, 디헥실데실 아디페이트, 디이소프로필 세바케이트, 라우릴 락테이트, 미리스틸 락테이트, 및 세틸 락테이트를 포함한다(그러나, 이에 한정되지 않음).
- [0046] (g) 10개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 지방산의 알케닐 에스테르. 그의 예는 올레일 미리스테이트, 올레일 스테아레이트, 및 올레일 올리에이트를 포함한다(그러나, 이에 한정되지 않음).
- [0047] (h) 9개 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 지방산. 적합한 예는 펠라곤산, 라우르산, 미리스탄, 팔미탄, 스테아르산, 이소스테아르산, 히드록시스테아르산, 올레산, 리놀레산, 리시놀레산, 아라키돈산, 베헨산, 및 에루스산을 포함한다(그러나 이에 한정되지 않음).
- [0048] (i) 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 세틸 알코올, 헥사데실 알코올, 스테아릴 알코올, 이소스테아릴 알코올, 히드록시스테아릴 알코올, 올레일 알코올, 리시놀레일 알코올, 베헤닐 알코올, 에루실 알코올, 및 2-옥실 도데실 알코올을 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 10개 내지 22개의 탄소 원자를 포함하는 지방 알코올(fatty alcohol).
- [0049] (j) 결합된 1개 내지 50개의 에틸렌 옥시드기 또는 1개 내지 50개의 프로필렌 옥시드기 또는 그의 혼합을 갖는 라우릴 알코올, 세틸 알코올, 스테아릴 알코올, 이소스테아릴 알코올, 올레일 알코올, 및 콜레스테롤 알코올과 같은(그러나, 이에 한정되지 않는), 10개 내지 20개의 탄소 원자의 에톡실화 지방 알코올을 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 지방 알코올 에테르.
- [0050] (k) 에톡실화 지방 알코올의 지방산 에스테르를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 에테르-에스테르.
- [0051] (l) 라놀린, 라놀린 오일, 라놀린 왁스, 라놀린 알코올, 라놀린 지방산, 이소프로필 라놀레이트, 에톡실화 라놀린, 에톡실화 라놀린 알코올, 에톡실화 콜레스테롤, 프로폭실화 라놀린 알코올, 아세틸화 라놀린, 아세틸화 라놀린 알코올, 라놀린 알코올 리놀리에이트, 라놀린 알코올 리시놀리에이트(ricinoleate), 라놀린 알코올 리시놀리에이트의 아세테이트, 에톡실화 알코올-에스테르의 아세테이트, 라놀린의 수소화분해(hydrogenolysis), 에톡실화 수소화(ethoxylated hydrogenated) 라놀린, 에톡실화 소르비톨 라놀린, 및 액체 및 반고체 라놀린 흡수 염기(absorption base)를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 라놀린 및 그의 유도체.
- [0052] (m) 프로필렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜(M.W. 2000- 4000), 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 글리콜, 폴리옥시프로필렌 폴리옥시에틸렌 글리콜, 글리세롤, 에톡실화 글리세롤, 프로폭실화 글리세롤, 소르비톨, 에톡실화 소르비톨, 히드록시프로필 소르비톨, 폴리에틸렌 글리콜(M.W. 200-6000), 메톡시 폴리에틸

렌 글리콜 350, 550, 750, 2000, 5000, 폴리[에틸렌 옥사이드] 단일중합체(homopolymer)(M.W. 100,000-5,000,000), 폴리알킬렌 글리콜 및 유도체, 핵실렌 글리콜(2-메틸-2,4-펜탄디올), 1,3-부틸렌 글리콜, 1,2,6-핵산트리올, 에토헥사디올 USP(2-에틸-1,3-핵산디올), C₁₅-C₁₈ 비시날 글리콜(vicinal glycol) 및 트리메틸올프로판의 폴리옥시프로필렌 유도체를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 다가 알코올 및 폴리에테르 유도체.

[0053]

(n) 에틸렌 글리콜 모노-지방산 에스테르 및 디-지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노-지방산 에스테르 및 디-지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜(M.W. 200-6000) 모노-지방산 에스테르 및 디-지방산 에스테르, 프로필렌 글리콜 모노-지방산 에스테르 및 디-지방산 에스테르, 폴리프로필렌 글리콜 2000 모노올레이트, 폴리프로필렌 글리콜 2000 모노스테아레이트, 에톡실화 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 글리세릴 모노-지방산 에스테르 및 디-지방산 에스테르, 폴리글리세롤 폴리-지방산 에스테르, 에톡실화 글리세릴 모노스테아레이트, 1,3-부틸렌 글리콜 모노스테아레이트, 1,3-부틸렌 글리콜 디스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 폴리올 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 다가 알코올 에스테르.

[0054]

(o) 밀랍, 스페르마세티(spermaceti), 미리스틸 미리스테이트(myristyl myristate), 및 스테아릴 스테아레이트, 및 에테르-에스테르의 혼합물을 형성하는 다양한 에틸렌 옥사이드 함량의 에톡실화 소르비톨과 밀랍의 반응 산물인, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 밀랍을 포함하나, 이에 한정되지 않는 밀랍 유도체를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 왁스 에스테르.

[0055]

(p) 카나우바 및 칸텔릴라 왁스를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 식물성 왁스.

[0056]

(q) 레시틴 및 유도체를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 인지질.

[0057]

(r) 콜레스테롤 및 콜레스테롤 지방산 에스테르를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 스테롤.

[0058]

(s) 지방산 아마이드, 에톡실화 지방산 아마이드(ethoxylated fatty acid amide), 및 고체 지방산 알칸올아미드를 포함하는(그러나, 이에 한정되지 않는) 아마이드.

[0059]

로션은 또한 약 1 내지 약 10 퍼센트, 보다 바람직하게는 약 2 내지 약 5 퍼센트의 유화제를 포함할 수 있다. 유화제는 비이온성, 음이온성 또는 양이온성일 수 있다. 만족스러운 비이온성 유화제의 예는 10개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 지방 알코올, 2 내지 20 몰의 에틸렌 옥사이드 또는 프로필렌 옥사이드와 축합된 10개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 지방 알코올, 2 내지 20 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된 알킬 사슬에 6개 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 알킬 페놀, 에틸렌 옥사이드의 모노-지방산 에스테르 및 디-지방산 에스테르, 지방산 모이어티가 10개 내지 20개의 탄소 원자를 포함하는 것인 에틸렌 글리콜의 모노-지방산 에스테르 또는 디-지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜, 분자량 200 내지 6000의 폴리에틸렌 글리콜, 분자량 200 내지 3000의 프로필렌 글리콜, 글리세롤, 소르비톨, 소르비탄, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 및 친수성 왁스 에스테르를 포함한다(그러나 이에 한정되지 않음). 적합한 음이온성 유화제는 지방산 모이어티가 10개 내지 20개의 탄소 원자를 포함하는 것인 지방산 비누, 예를 들면, 소듐염, 포타슘 및 트리에탄올아민 비누를 포함한다(그러나 이에 한정되지 않음). 기타 적합한 음이온성 유화제는 알킬 모이어티에 10개 내지 30개의 탄소 원자를 갖는, 알칼리 금속, 암모늄, 또는 치환된 암모늄 알킬 술페이트, 알킬 아릴술포네이트, 및 알킬 에톡시 에테르 술포네이트를 포함한다(그러나 이에 한정되지 않음). 상기 알킬 에톡시 에테르 술포네이트는 1개 내지 50개의 에틸렌 옥사이드 유닛을 포함한다. 만족스러운 양이온성 유화제에는 4차 암모늄, 모르폴리늄 및 피리디늄 화합물이 있다. 전술된 단락에 기재된 일부 피부 연화제는 또한 유화 특성을 갖는다. 그와 같은 피부 연화제를 함유한 로션이 제제화되는 경우, 추가적인 유화제가 조성물에 포함될 수 있으나, 추가적인 유화제가 필요하지 않다.

[0060]

로션의 잔량(balance)은 일반적으로 물 또는 C₂ 또는 C₃ 알코올, 또는 물과 상기 알코올의 혼합액이다. 로션은 단순히 모든 성분들을 혼합하는 것에 의해 제제화될 수 있다. 바람직하게는, 6,9-이치환 퓨린 유도체는 혼합물에 용해, 현탁되거나 또는 균일하게 분산된다.

[0061]

그와 같은 로션의 다른 통상적인 성분들이 포함될 수 있다. 하나의 그와 같은 첨가제는 조성물의 약 1 내지 약 10 퍼센트 수준인 증점제이다. 적합한 증점제의 예는 가교된(cross-linked) 카르복시폴리메틸렌 중합체, 에틸 셀룰로오스, 폴리에틸렌 글리콜, 트라가칸스검(gum tragacanth), 카라야검(gum kharaya), 잔탄검(xanthan gum) 및 벤토니르(bentonire), 히드록시에틸 셀룰로오스, 및 히드록시프로필 셀룰로오스를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0062]

인간의 얼굴 피부에 로션으로 적용하기에 적합한 조성물의 하나의 바람직한 예는 10부(parts)의 글리세롤 모노

스테아레이트, 10부의 세틸 알코올, 30부의 스페르마세티, 10부의 트윈(Tween) 20(소르비탄 모노스테아레이트의 폴리옥시알킬렌 유도체), 10부의 스팬(Span) 20(소르비탄 모노라우레이트), 12.5부의 글리세린, 및 100부의 물을 혼합하는 것에 의해 제조된 베이스 내에 본 발명의 6,9-이치환 푸린 유도체(바람직하게는 피라닐 키네티)를 약 0.5 내지 약 10 퍼센트로 함유한다.

[0063] (2) **크림**. 크림은 하나 이상의 6,9-이치환 푸린 유도체의 유효 농도를 함유하도록 제제화된다. 유효 농도는 통상적으로 약 0.5 내지 약 10 퍼센트의 농도로 6,9-이치환 푸린 유도체를 피부의 활성 세포, 특히, 진피의 섬유모세포에 전달하기에 유효한 양이다. 크림은 또한, 약 5 내지 약 50 퍼센트, 바람직하게는 약 10 내지 약 25 퍼센트의 피부 연화제를 포함하고, 나머지는 물 또는 등장성 완충액과 같은, 다른 적합한 무독성 담체이다. 로션에 대해 전술된 바와 같은 피부 연화제가 또한 크림 조성물에서 이용될 수 있다. 크림은 또한 전술된 바와 같은, 적합한 유화제를 포함할 수 있다. 유화제는 약 3 내지 약 50 퍼센트, 바람직하게는 약 5 내지 약 20 퍼센트의 수준으로 조성물에 포함된다.

[0064] (3) **용액 및 현탁액**. 용액은 통상적으로 약 0.5 내지 약 10 퍼센트의 농도로 6,9-이치환 푸린 유도체를 피부의 활성 세포, 특히, 진피의 섬유모세포에 전달하기에 유효한 양인 하나 이상의 6,9-이치환 푸린 유도체의 유효량을 포함하도록 제제화된다; 잔량(balance)은 물, 적합한 유기 용매 또는 기타 적합한 용매 또는 완충액이다. 용매 또는 용매 시스템의 일부로서 유용한 적합한 유기 물질들은 하기와 같다: 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜(M.W. 200-600), 폴리프로필렌 글리콜(M.W. 425-2025), 글리세린, 소르비톨 에스테르, 1,2,6-헥산트리올, 에탄올, 이소프로판올, 디에틸 타르트로이트, 부탄디올, 및 그의 혼합물. 그와 같은 용매 시스템은 또한 물을 포함할 수 있다.

[0065] 용액 또는 현탁액으로 제제화된 이 조성물들은 피부에 적용될 수 있거나, 또는 에어로졸로 제제화되어 피부에 스프레이로 적용될 수 있다. 에어로졸 조성물은 약 25 내지 약 80 퍼센트, 바람직하게는 약 30 내지 약 50 퍼센트의 적합한 추진제(propellant)를 더 포함한다. 그와 같은 추진제의 예는 염소화(chlorinated), 불소화(fluorinated) 및 염소불화(chlorofluorinated) 저 분자량 탄화수소(lower molecular weight hydrocarbon)이다. 아산화 질소, 이산화탄소, 부탄, 및 프로판이 또한 추진제 기체로 이용된다. 이 추진제들은 용기 내의 내용물을 방출시키기에 적합한 양 및 압력으로 본 발명이 속하는 기술 분야에서 이해되는 바와 같이 이용된다.

[0066] (4) **겔**. 겔 조성물은 적합한 증점제를 전술된 용액 또는 현탁액 조성물에 단순히 혼합시키는 것에 의해 제제화될 수 있다. 적합한 증점제의 예는 로션에 대해 앞서 기술되었다.

[0067] 겔화(gelled) 조성물은 통상적으로 약 0.05 내지 약 10 퍼센트로 6,9-이치환 푸린 유도체를 피부의 활성 세포, 특히, 진피의 섬유모세포에 전달하기에 유효한 양인 하나 이상의 6,9-이치환 푸린 유도체의 유효량; 약 5 내지 약 75 퍼센트, 바람직하게는 약 10 내지 약 50 퍼센트의 전술된 바와 같은 유기 용매; 약 0.5 내지 약 20 퍼센트, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 퍼센트의 증점제를 포함하고, 잔량은 물 또는 기타 수성 담체이다.

[0068] (5) **고체**. 고체 제형의 조성물은 입술이나 신체의 다른 부위에 적용하도록 의도된 스틱-형(stick-type) 조성물로 제제화될 수 있다. 그와 같은 조성물은 하나 이상의 6,9-이치환 푸린 유도체의 유효량을 함유한다. 그 양은 통상적으로 약 0.05 내지 약 10 퍼센트로 6,9-이치환 푸린 유도체를 피부의 활성 세포, 특히, 진피의 섬유모세포에 전달하기에 유효한 양이다. 상기 고체는 또한 약 50 내지 약 98 퍼센트, 바람직하게는 약 60 내지 약 90 퍼센트의 전술된 피부 연화제를 포함한다. 이 조성물은 약 1 내지 약 20 퍼센트, 바람직하게는 약 5 내지 약 15 퍼센트의 적합한 증점제를 더 포함할 수 있고, 원하거나 또는 필요한 경우, 유화제와 물 또는 완충액을 더 포함할 수 있다. 로션에 대해 전술된 증점제가 고체 제형의 조성물에서 적합하게 이용될 수 있다.

[0069] 다른 성분들, 예를 들면, 피부 적용용 조성물에 바람직한 안정성, 향기, 또는 색상 또는 태양으로부터의 화학광선의 차폐와 같은 다른 바람직한 특성을 제공하는 것으로 본 발명이 속하는 기술 분야에서 알려진, 메틸-파라반 또는 에틸-파라반을 포함한 보존제, 향수, 염료, 등이 또한 이와 같은 종류의 국소 적용 또는 기타 적용용 조성물에서 이용될 수 있다.

[0070] 조성물은 또한 6,9-이치환 푸린 유도체가 아닌, 레티노이드, 키네티, 및/또는 제아틴과 같은, 다른 유해한-노화-효과-완화성(adverse-age-effect-ameliorative) 활성 성분을 포함할 수 있으나, 옥신(auxin)과 같은, 세포-분열 유도 특성을 강화시키거나 또는 유도하는 성분들을 포함해서는 안된다. 바람직한 조성물은 유일한 유해한-노화-효과-완화성 성분으로서, 하나 이상의 6,9-이치환 푸린 유도체를 포함한다.

[0071] 인간의 피부에 사용되는 조성물은 치료를 원하는 피부의 부위에 바람직하게는 1일 1회 적용되거나, 또는 원하는 효과를 달성하기 위해 필요한 경우, 보다 자주 적용될 수 있다. 정확한 치료 계획(treatment regimen)은 치료

대상 개체에 의존적이며 제제 및 특히, 치료대상 개체의 연령에 따라 실험적으로 확인될 수 있는 것으로 이해된다. 상당한 유해 효과 또는 지속적인 바람직하지 않는 부작용 없이 원하는 노화-완화 효과가 달성되는 한, 어떠한 치료 계획도 허용가능하다.

[0072] 인간 피부를 치료하는 방법은 피부에 바람직하게는 매일, 인간 피부의 치료에 적합한 본 발명의 조성물을 전술된 바와 같이, 불확정 기간 동안, 일반적으로 당사자가 피부 노화의 유해 효과의 개선을 누리기를 원하는 기간 동안 적용하는 것에 의해 실시된다. 유용한 효과(예를 들면, 피부의 기저세포층의 섬유모세포에서 노화-관련 형태학적 변화를 지연시킴)가 피부 표면에서 명확하게 나타나기 시작하기 전에 조성물의 1일 1회 피부 적용이 적용 대상자의 연령, 조성물이 적용되는 피부의 상태, 및 조성물 내의 6,9-이치환 퓨린 유도체의 농도에 따라 1개월 이상 동안 및 최대 약 1년 이상 동안 요구되어야 한다. 6,9-이치환 퓨린 유도체의 적용이 종료되는 경우, 상기 방법에 의해 개선된 노화 효과가 일정 기간 후에 다시 일어날 수 있다.

[0073] 인간 피부의 섬유모세포(또는 각질형성세포와 같은, 다른 활성 세포)의 경우, 상기 방법은 생리학적으로 허용가능한 크림, 연고, 로션, 젤, 용액, 향수, 고체 또는 기타 피부의 외부 표면에 적용하기에 적합한 다른 제형으로 제제화된 조성물을 피부의 외부 표면에 적용하는 것에 의해 실시되고, 상기 조성물은 하나 이상의 6,9-이치환 퓨린 유도체를 진피에 있는 피부의 활성 세포(예를 들면, 섬유모세포)에 대한 노화의 유해한 효과를 개선하기에 유효한 유효 농도로 피부의 진피에 전달하기에 유효한 농도로 포함하고, 그에 의해, 처리된 피부는 미처리(untreated) 피부보다 더 느리게 노화되고 및/또는 치료 전보다 주름 및/또는 처짐(sagging) 또는 다른 노화의 미용적 지표의 감소에 의해 발현되는 바와 같이 외양이 더 젊어진다. 그와 같은 농도는 통상적으로 약 0.05 내지 약 10 퍼센트(바람직하게는 약 0.1 내지 약 2 퍼센트)이다. 실험적으로 결정될 수 있는, 정확한 농도는 담체 또는 전달 비히클 및 조성물이 피부 표면에 제공되는 제형의 함수이다.

[0074] 본 발명은 또한 포유동물 세포, 특히 인간 세포(및 보다 특별하게는 인간 피부 세포)의 노화의 유해한 효과를 개선시키고, 세포 노화 및 전술된 바와 같은 질병 상태의 치료를 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 하나 이상의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 전술된 조성물의 제형으로 전술된 유효량으로 예방 또는 치료를 위해 투여될 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는, 포유동물 세포의 노화의 유해한 효과를 개선하는 것(ameliorating the adverse effect of aging of mammalian cells)은 정상적인 포유동물 세포에서 인 비보 또는 인 비트로에서 노화와 함께 일반적으로 일어나는 형태학적 변화의 발생이 둔화, 역전 및/또는 지연되는 것을 의미한다. 노화의 유해한 효과는 또한 유전자 발현 및 단백질 생합성에서 노화 관련 변화를 포함한다. 본 명세서에서 지칭되는 개선(ameliorative) 효과는 치료되는 세포의 성장 속도 또는 전체 증식 능력을 실질적으로 증가시키지 않으면서 달성된다.

[0076] 인 비트로 및/또는 인 비보 세포에 대한 효과를 포함한, 세포에 대한 노화의 유해한 효과를 개선시키는 것은 세포의 노화에 따라 일반적으로 일어나는 노화-관련 형태학적 및 표현형적 변화의 지연 또는 역전으로 검출될 수 있다. 이 변화들은 더 늙은 세포의 외생 성장 인자에 대한 반응 상실 및/또는 늙은 세포에서 발견되는 자가형광(autofluorescence)의 높은 수준과 같은, 조직 배양 세포에서 검출되는 변화를 포함한다. 세포가 노화되면서, 그들은 증식 능력의 연령-의존적 상실을 보인다. 배양된 늙은 섬유모세포는 편평화되고 불규칙한 형태, 비정상적으로 큰 크기, 빈약한 성장, 배양기 바닥(culture substratum)의 단위 면적당 낮은 세포 수율, 다핵 세포의 상당한 빈도, 트립신 처리(trypsinization)의 어려움, 합류점(confluence)까지의 성장 불능, 및/또는 배양 배지에서 파편(debris)의 높은 생성율을 포함한, 다수의 연령-관련 특성을 보인다. 어린 세포들은 늙은 세포보다 성장 인자에 대한 보다 높은 반응성 및 더 높은 DNA 및 단백질 합성 속도를 보인다. 조직 배양에서 인간을 포함한, 어린 포유동물의 섬유모세포는 건강하고 투명한 것으로 보이고, 규칙적이고, 길고, 얇은 방추-형태를 가지며, 배양기 바닥에서 합류상태가 되도록 다수로(in arrays) 단단하게 채워지고, 상호 간에 과도하게 성장하지 않고, 하나의 핵 이외의 것을 거의 갖지 않으며, 배양 배지 내에 파편을 거의 생성하지 않는다. 인 비보에서 연령 관련 변화는 주름, 선(line)의 발생, 또는 그 갯수나 깊이의 증가, 처진 피부, 변색, 얼룩(blotchiness), 피부의 미용적 외양과 연관된 가죽같은(leathery), 및/또는 황색화된(yellowed) 외양 및 조직의 구조적 및 기능적 완결성의 연관된 변화와 같은, 포유동물 조직의 변화를 포함한다. 본 발명의 조성물은 연령-관련 변화 및 노화와 밀접하게 연관되지 않을 수 있는 변화(예를 들면, 여드름, 홍반, 발적, 등)를 포함한, 피부의 전체 외양 및 상태를 개선하는데 효과적이다. 본 발명의 목적을 위해, 노화와 밀접하게 관련되지 않을 수 있거나 또는 심지어 노화와 무관할 수 있는 변화들이 연령-관련 변화에 포함되도록 의도된다.

[0077] 본 발명의 방법은 다른 치료 방법 또는 미용적 방법(특히, 인간 피부의 치료와 연관된 방법)과 조합되어 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 예를 들면, 레이저 또는 기타 광-기반 치료 또는 장치와 조합되어 이용될

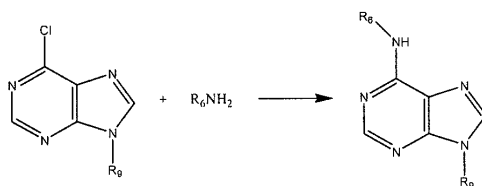
수 있다.

[0078] 본 명세서에서 사용된, 섬유모세포와 같은, 정상 세포의 전체 증식 능력(total proliferative capacity)은 세포의 유한 증식 능력(finite proliferative capacity)의 척도이고 그와 같은 세포의 배양이 배양의 성장이 중단될 때까지 수행할 수 있는 세포 수의 배가(doubling)의 총 수를 의미하며, 상기 세포들이 유래된 공여자의 연령의 함수이다. 태아 조직으로부터 수득된 세포가 성인 조직으로부터 수득된 세포보다 배양에서 더 큰 증식 능력을 보인다.

[0079] 본 명세서에서 사용된, 성장 속도 또는 증식 속도는 세포가 분열하는 속도의 척도이다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 인정되는 척도의 일 단위는 배가 시간의 역수이다. 정상 세포의 배양의 생존 기간의 종료시에, 배양 성장의 중단은 매우 빠르게 나타나서, 어린 세포의 특징적인 정상 근사값(near normal value)으로부터 단지 수회의 배가 내에 0으로 감소된다.

[0080] 본 명세서에서 사용된, 성장 속도 또는 전체 증식 능력을 실질적으로 변화시키는 것(substantially altering the growth rate or total proliferative capacity)은 세포 및 조직 간에 정상 변이 내에 속하는 양을 넘어서 세포 분열 속도 또는 세포 배가의 횟수를 변화시키는 것을 의미한다. 특히, 성장 속도 또는 전체 증식 능력은 처리된 세포들이 불멸화(immortalize)되거나 악성 형질전환(malignant transformation)을 수행하도록 변화되지 않는다. 인 비보에서 처리된 세포를 처리한 경우, 처리된 조직은 실질적으로 크기나 두께를 변화시키지 않거나, 또는 전암성(precancerous) 또는 암성 세포를 발생시키지 않는다. 성장 속도 및 전체 증식 능력을 평가하는 방법이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에게 알려져 있다. 본 명세서에 예시된 방법을 포함한, 그와 같은 방법은 성장 속도 또는 전체 증식 능력의 변화를 평가하기 위해 이용될 수 있다.

[0081] 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 일반적으로



[0082]

[0083] 적합한 아민과의 반응에 의해 상응하는 6-클로로-9-치환 퓨린(6-chloro-9-substituted purine)으로부터 제조될 수 있다.

[0084] 본 발명의 바람직한 6,9-이치환 퓨린 유도체를 제조하기 위해 이용될 수 있는, 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린은 문헌(Robins et al., J. Am. Chem. Soc. 83, 2574 (1961))에 따라 p-톨루엔설폰산을 이용하여 6-클로로퓨린 및 3,4-디히드로피란으로부터 합성될 수 있다. 상업적으로 이용가능하지 않은(아니면, Sigma Aldrich 또는 Florochem을 통해 수득되는) 출발 물질인 미치환 벤질아민 또는 메톡시-치환 벤질아민, 페닐아민 및 푸르푸릴아민이 적합한 금속 촉매의 존재 하에 상응하는 알데히드로부터 제조될 수 있다. 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린이 p-톨루엔설폰산을 이용하여 6-클로로퓨린 및 3,4-디히드로피란으로부터 합성될 수 있다.

[0085] 하기의 실시예들은 예시적 목적을 위해서만 포함되고 본 발명의 범위를 한정하도록 의도되지 않는다. 달리 표시되지 않으면, 모든 농도, 비율 등은 중량을 기준으로 한다. 본 명세서에서 인용된 모든 참조문헌은 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

실시예

[0086] **실시예 1.** 본 실시예는 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 에틸아세테이트(750 ml) 중의 6-클로로퓨린(60 g, 388 mmol)과 토스산 일수화물(tosic acid monohydrate)(1 g)의 혼합물을 50℃에서 강하게 교반시켰다. 30분 동안 55-60℃의 반응 온도를 유지하면서, 3,4-디히드로피란(40 ml, 438 mmol)을 점적하였다(dropwise)(Robins et al., 1961). 상기 용액을 추가로 1시간 동안 교반하면서, 그 동안 실온까지 냉각시켰다. 농축된 암모니아 수용액(35 ml)을 첨가하고 상기 용액을 5분 동안 교반시켰다. 균일한 암녹색 용액을 뒤이어 200 ml의 물로 2회 추출시켰다(2x200 ml). 황색의 에틸아세테이트 추출물을 소듐 술페이트 상에서 밤새 건조시키고 -20℃에서 냉각시켰다. 축적된 황색 고체를 37℃에서 오산화인(phosphorus pentoxide) 상에서 진공상태 하에 다시 건조시켰다. 수율: 66.9 g (72.2%). MS(ES): $[M+H]^+ = 239$ (100).

[0087]

실시예 2. 본 실시예도 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 에틸아세테이트(200 ml) 중의 6-클로로퓨린(50 g, 323 mmol)와 p-톨루엔술폰산(2.5 g, 14.5 mmol)의 혼합물을 실온에서 강하게 교반시켰다. 30분 동안 2,3-디히드로퓨란(37.5 g, 535 mmol)을 점적하였다. 상기 용액을 추가로 1시간 동안 교반하면서, 그 동안 6-클로로퓨린을 완전히 용해시켰다(Lewis et al., J. Org. Chem.; 26; 1961 ; 3837). 뒤이어, 물과 1:1의 물비로 혼합된 암모니아 수용액(150 ml)을 첨가하였다. 그 후, 균일한 암황색(dark-yellow) 용액을 100 ml의 물로 2회 추출시켰다(2x100 ml). 황색의 에틸아세테이트 추출물을 소듐 술포이트 상에서 밤새 건조시켰다. 그 후, 용액을 여과시키고 증발시켰다. 진공 증발 후에, 정제되지 않은 황색 오일을 37℃에서 오산화인 상에서 진공상태 하에 건조시켰다. 황색의 조 생성물(crude product)을 석유 에테르로부터 재결정화시켰다. 수율: 80%, 황색 고체. 용융점: 92-95℃. TLC(톨루엔:에틸아세테이트, 1:2 (v:v), 단일 스팟. HPLC 순도: >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). MS(ES): [M+H]⁺ = 225 (100).

[0088]

실시예 3. 본 실시예는 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 푸르푸릴아민(100 g, 91 ml, 1030 mmol)에, 30.3 g의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(126.9 mmol)을 첨가했다. 철저한 혼합을 통해 고체를 완전히 용해시켰다. 균일한 용액을 60분 동안 90℃에서 가열하고 뒤이어 실온에서 냉각시켰다. 무색의 결정질 푸르푸릴아민 히드록로라이드가 즉시 침전되었고, 여과에 의해 제거되었다. 남은 여과액을 진공 상태에서 증발시켰다. 이소-옥탄(600 ml)을 황색 오일에 첨가하고, 완전히 진탕시키고, 실온에서 방치시켰다. 생성물을 약 1시간에 걸쳐 서서히 결정화시켰다. 백색의 고체 침전물을 여과에 의해 분리하고, 에틸에테르(50 ml)로 세척하고, 밤새 자연건조시켜서 용매를 제거하였다. 조 생성물을 메탄올에서 재결정화시켰다. 수율: 24.4 g (81.52 mmol, 64.2%). 용융점: 정확하게 144-145℃, 분해 없음. TLC(클로로포름:메탄올 95:5(v:v)): 단일 스팟(R_f=0.35). TLC(클로로포름): 단일 스팟(R_f=0.34). HPLC 순도: 99+%. 원소 분석% (기대/관찰): C = 60.19/60.14, H = 5.72/5.70, N = 23.40/23.30.

[0089]

실시예 4. 본 실시예는 또한, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 100 ml의 n-프로판올에 담긴 푸르푸릴아민(1456 mg, 15 mmol)에, 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(2247 mg, 10 mmol) 및 트리에틸아민(3.6 ml, 25 mmol)을 첨가했다. 철저한 혼합을 통해 고체를 완전히 용해시켰다. 균일한 용액을 100℃에서 3시간 동안 가열하고 뒤이어 실온에서 냉각시켰다. 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(100 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(100 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고 뒤이어 잔류물을 50 ml의 디에틸에테르로 세척하였다. 백색의 조 생성물을 메탄올에서 재결정화시켰다. 수율: 85%, 백색 고체. 용융점: 128-129℃. TLC (CHCl₃:메탄올, 8:2 (v:v), 단일 스팟. HPLC 순도: >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). MS(ES): [M+H]⁺ = 286 (100).

[0090]

실시예 5. 본 실시예는 6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 10 mmol 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(1546 mg)의 6-클로로퓨린으로부터 제조됨), 12 mmol 4-메톡시벤질아민 및 5 ml의 트리에틸아민의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류(reflux)시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물로 처리하고 에틸아세테이트에 추출시켰다. 에틸아세테이트 상(ethylacetate phase)을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과시키고, 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 30 ml의 디에틸에테르로 세척하였다. 고체 잔류물을 여과에 의해 분리시키고 조 생성물을 메탄올로부터 재결정화시켰다. 수율: 80 %, 백색 고체. 용융점: 137-138℃. TLC (CHCl₃:메탄올 (8:2 (v:v)): 단일 스팟. HPLC 순도: > 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). MS(ES): [M+H]⁺ = 340

(100).

[0091]

실시예 6. 본 실시예는 6-(2-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 1546 mg의 6-클로로퓨린으로부터 제조된 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(2387 mg, 10 mmol), 2-메톡시벤질아민(1470 mg, 12 mmol) 및 5 ml의 트리에틸아민(35 mmol)의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. 철저한 혼합으로 고체를 완전히 용해시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(100 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(100 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 50 ml의 페트role에테르로 세척하였다. 백색 조 생성물을 메탄올로부터 재결정화시켰다. 수율: 90%, 백색 고체. 용융점: 106-108°C. TLC (CHCl₃:메탄올, (8:2 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 1.56m(2H); 1.71 m(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); 4.71bs(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). MS(ES): [M+H]⁺ = 340 (100).

[0092]

실시예 7. 본 실시예는 6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. (1546 mg의 6-클로로퓨린으로부터 제조된) 10 mmol의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린, 12 mmol의 4-메톡시벤질아민 및 5 ml의 트리에틸아민의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 뒤이어 물로 처리하고 에틸아세테이트에 추출시켰다. 에틸아세테이트 상을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 30 ml의 디에틸에테르로 세척하였다. 고체 잔류물을 여과에 의해 분리하고, 조 생성물을 메탄올로부터 결정화시켰다. 수율: 80 %, 백색 고체. 용융점: 182-183°C. TLC (CHCl₃:메탄올 (8:2 (v:v)): 단일 스팟. HPLC 순도: > 98 %. ¹H NMR (400 MHz, DMSO): 2.02sxt(1H, J = 7.4 Hz); 2.21sxt(1H, J = 7.4 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); 8.1 bs(1H); 8.19s(1H); 8.29s(1H). MS(ES): [M+H]⁺ = 326 (100).

[0093]

실시예 8. 본 실시예는 6-(2-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 2247 mg (10 mmol)의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(1546 mg의 6-클로로퓨린으로부터 제조됨), 2-메톡시벤질아민(1470 mg, 12 mmol) 및 5 ml의 트리에틸아민(35 mmol)의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. 철저한 혼합으로 고체를 완전히 용해시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(100 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(100 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 50 ml의 헥산으로 세척하였다. 백색의 조 생성물을 메탄올로부터 재결정화시켰다. 수율: 90%, 백색 고체. 용융점: 97-99°C. TLC (CHCl₃:메탄올, 8:2 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >98%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): 2.02m(1H); 2.21sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.43m(2H); 3.83s(3H); 3.91q(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). MS(ES): [M+H]⁺ = 326 (100).

[0094]

실시예 9. 본 실시예는 6-(3-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 10 mmol의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린, 12 mmol의 3-메톡시벤질아민 및 5 ml의 트리에틸아민의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물로 처리하고 에틸아세테이트에 추출시켰다. 에틸아세테이트 상을 Na₂SO₄에서 건조시키고, 여과시키고, 뒤이어 증발시켰다. 유성 잔류물(oily residue)을 30 ml의 n-헥산으로 세척했을 때, 백색의 분말 생성물이 형성되었다. 조 생성물을 메탄올로부터 결정화시켰다. 수율: 70 %, 백색 고체. 용융점: 134-135°C. TLC(CHCl₃:CH₃OH (85:15 (v:v)): 단일 스팟. HPLC 순도: > 99 %. ¹H NMR(400 MHz, DMSO): 1.56m(2H); 1.70m(1H), 1.94m(2H); 2.30qq(1H, J_a = 11.0, 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); 6.83t(1H, $J = 7.7$ Hz); 6.97d(1H, $J = 7.7$ Hz); 7.14d($J = 7.7$ Hz); 7.20tt(1H, $J_a = 7.7$ Hz, $J_b = 1.5$ Hz); 8.09bs(1H); 8.21s(1H); 8.36s(1H). MS(ES): $[M+H]^+ = 340$ (100).

[0095]

실시예 10. 본 실시예는 6-(4-메톡시페닐아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. (1546 mg의 6-클로로퓨린으로부터 제조된) 2387 mg (10 mmol)의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린, 4-메톡시페닐아민 (1803 mg, 15 mmol) 및 5 ml의 디이소프로필아민(35 mmol)의 혼합물을 n-프로판올(100 ml)에서 5시간 동안 환류시켰다. 철저히 혼합에 의해 고체를 완전히 용해시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(50 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(50 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 50 ml의 페트role에테르로 세척하였다. 수율: 90%, 백색 고체. 용융점: 150-151°C. TLC (에틸아세테이트:톨루엔, 3:1 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >98%. $^1\text{H-NMR}$ (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); 6.91 d(1H, $J = 9.0$ Hz); 7.78d(1H, $J = 9.0$ Hz); 8.34s(1H); 8.47s(1H); 9.72s(1H). MS(ES): $[M+H]^+ = 326$ (100).

[0096]

실시예 11. 본 실시예는 6-(3-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 10 mmol의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(1546 mg의 6-클로로퓨린으로부터 제조됨), 12 mmol의 3-메톡시벤질아민 및 5 ml의 트리에틸아민의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물로 처리하고 에틸아세테이트에 추출시켰다. 에틸아세테이트 상을 Na_2SO_4 에서 건조시키고, 여과시키고, 뒤이어 증발시켰다. 뒤이어 잔류물을 30 ml의 n-헥산으로 세척했다. 백색의 분말 고체를 여과에 의해 분리하고 조 생성물을 메탄올로부터 결정화시켰다. 수 시간 후에, 순수한 투명 결정을 수득하였다. 수율: 80 %, 백색 고체. 용융점: 87-88°C. TLC(CHCl_3 :메탄올 (8:2 (v:v)): 단일 스팟. HPLC 순도: > 98 %. $^1\text{H-NMR}$ (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). MS(ES): $[M+H]^+ = 326$ (100).

[0097]

실시예 12. 본 실시예는 6-(2,5-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 2387 mg (10 mmol)의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린, 2,5-디메톡시벤질아민(dimethoxybenzylamine)(2006 mg, 12 mmol) 및 5 ml의 트리에틸아민(35 mmol)의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. 철저히 혼합에 의해 고체를 완전히 용해시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(100 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(100 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 50 ml의 디에틸에테르로 세척하였다. 백색 고체를 여과에 의해 분리하고, 진공 하에 건조시켰다. 수율: 95%, 백색 고체. 용융점: 150-152°C. TLC(에틸아세테이트:헥산, 1:2 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >98%. $^1\text{H-NMR}$ (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). MS(ES): $[M+H]^+ = 370$ (100).

[0098]

실시예 13. 본 실시예는 6-(2,5-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 제조를 예시한다. 2247 mg (10 mmol)의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(1546 mg의 6-클로로퓨린으로부터 제조됨), 2,5-디메톡시벤질아민(2006 mg, 12 mmol) 및 5 ml의 트리에틸아민(35 mmol)의 혼합물을 n-프로판올에서 3시간 동안 환류시켰다. 철저히 혼합에 의해 고체를 완전히 용해시켰다. n-프로판올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(100 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(100 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 50 ml의 디에틸에테르로 세척하였다. 백색의 조 생성물을 메탄올에서 재결정화시켰다. 수율: 90%, 백색 고체. 용융점: 103-104°C. TLC(에틸아세테이트:헥산, 1:2 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >98%. $^1\text{H-NMR}$ (400

MHz, DMSO): 2.02m(1H); 2.21 sep(1H, J = 6.8 Hz); 2.43m(2H); 3.60s(3H); 3.78s(3H); 3.91q(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). MS(ES): [M+H]⁺ = 356 (100).

[0099]

실시예 14. 본 실시예는 6-(2,3,4-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린의 제조를 예시한다. 2387 mg (10 mmol)의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린, 2,3,4-트리메톡시벤지아민 히드로클로라이드 (2799 mg, 12 mmol) 및 8 ml의 트리에틸아민(57 mmol)의 혼합물을 n-부탄올(45 ml)에서 3시간 동안 환류시켰다. 철저한 혼합에 의해 고체를 완전히 용해시켰다. n-부탄올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(50 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(50 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 30 ml의 디에틸에테르로 세척하였다. 백색의 고체를 여과에 의해 분리하고 메탄올로부터 재결정화시켰다. 수율: 90%, 백색 고체. 용융점: 142-143°C. TLC(에틸아세테이트:헥산, 1:2 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >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). MS(ES): [M+H]⁺ = 400(100).

[0100]

실시예 15. 본 실시예는 6-(2,3,4-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린의 제조를 예시한다. 2247 mg (10 mmol)의 6-클로로-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린(1546 mg의 6-클로로푸린으로부터 제조됨), 2,3,4-트리메톡시벤지아민 히드로클로라이드(2799 mg, 12 mmol) 및 8 ml의 트리에틸아민(57 mmol)의 혼합물을 n-부탄올에서 3시간 동안 환류시켰다. 철저한 혼합에 의해 고체를 완전히 용해시켰다. n-부탄올의 진공 증발 후에, 결과적으로 수득된 물질을 물(50 ml)로 처리하고 에틸아세테이트(50 ml)에 추출시켰다. 에틸아세테이트 추출물을 증발시키고, 뒤이어 잔류물을 50 ml의 헥산으로 세척하였다. 백색의 고체를 메탄올에서 재결정화시켰다. 수율: 90%, 백색 고체. 용융점: 140-141°C. TLC (에틸아세테이트:헥산, 1:2 (v:v)), 단일 스팟. HPLC 순도: >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); 3.91q(1H, J = 7.4 Hz); 4.13q(1H, J = 7.4 Hz); 4.65bs(2H); 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). MS(ES): [M+H]⁺ = 386 (100).

[0101]

실시예 16. 배양된 인간 피부 섬유모세포에 대한 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린의 효과에 관한 여러 단계, 예비 연구를 수행하였다. 최초 연구는 배양물 중의 인간 피부 섬유모세포로의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린(40 내지 400 μM)의 첨가를 포함했다. 세포의 배양 플라스크의 표면으로의 부착 비율(percentage)은 6 시간의 처리 후에 영향받지 않았다. 본 실시예에서 보고된 나머지 실험들에서는, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린을 세포를 접종하는 것과 동시에 배양 배지에 직접 첨가하였다.

[0102]

3일의 처리 후에 배양된 인간 피부 섬유모세포의 생존에 대한 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린의 효과를 결정하기 위해 보다 광범위한 농도(0.01 내지 500 μM)를 테스트하였다. 1 내지 200 μM의 농도에서, 세포 성장 및 생존의 약간의 자극이 있었을 수 있다. 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린에 의한 세포의 처리에 따른 독성이나 다른 부정적 효과는 명백하지 않았다.

[0103]

6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린(0 내지 400 μM) 처리의 어린 인간 섬유모세포의 단계 성장에 대한 효과도 평가하였다. 세포 성장은 미처리 시료와 40, 80, 및 200 μM 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린으로 처리된 시료에서 유사했다. 약 400 μM의 처리 수준에서, 세포 성장의 약간의 증가가 있었을 수 있다. 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린 처리 세포 및 미처리 세포에서 아포토시스(apoptosis) 및 베타-갈락토시다아제 염색의 정도를 결정하기 위해 유사한 실험을 수행하였다. 다양한 투여량의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린으로 처리된 인간 섬유모세포의 아포토시스 또는 조기 노화의 유도에 대한 시사는 없었다.

[0104]

노화 세포에 대한 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린의 효과도 조사하였다. 동일한 수의 노화 세포를 별개의 플라스크에 접종하고 상이한 농도의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린(0 내지 400

μM)으로 처리하였다. 처리 7일 및 14일 후에 트립신처리 및 세포의 재현탁 후 Coulter 카운터를 이용하여 세포 수를 결정하였다. 처리 7일 후에 부정적인 효과는 관찰되지 않았다. 처리 14일 후에, 200 μM 이상의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린으로 처리된 노화 세포의 생존에 대해 약간의 부정적인 효과가 있을 수 있다. 보다 낮은 농도에서는, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린-처리된 노화 세포의 수의 약간의 증가가 있으나, 부정적인 효과는 관찰되지 않았다.

[0105] 95% 이상의 수명을 보낸 말기 계대(late passage) 노화 세포들도 연령-관련 변화를 평가하기 위해 상이한 농도의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(0 내지 200 μM)으로 처리했다. 3일 후에 액틴 염색 패턴을 조사했다. 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린에 의한 처리는 일반적으로 액틴 염색 패턴을 고도로 중합된 패턴에서 덜 중합된 필라멘트 패턴으로 변화시켰다. 액틴 염색의 덜 중합되고 확산된 패턴은 일반적으로 인간 섬유모세포의 유년기(youthful) 특성과 연관된다. 따라서, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린은 노화 세포에서 액틴 배열(organization)의 일부 연령-관련 변화를 역전시키는 것으로 보인다.

[0106] 또한, 노화된 인간 피부 섬유모세포를 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(0 내지 400 μM)으로 처리하고 연령-관련 변화의 역전에 대해 평가하였다. 처리 7일 및 30일 후에 세포의 외양에 상당한 차이가 있었다. 처리된 세포들은 보다 가늘어지고 처리 30일 후에 정렬되어 배열된다는 점에서 전반적으로 더 어려보인다. 심지어 보다 높은 농도(200 및 400 μM)에서도, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린-처리된 세포들은 미처리 세포에 비해 더 작고 세포내 파편들을 덜 갖는 것으로 보였다.

[0107] 이 연구들에 근거하여, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린은 어린 인간 피부 섬유모세포 및 노화된 인간 피부 섬유모세포에 의한 내약성이 양호하고(well tolerated) 액틴 패턴 및 노화 세포의 형태의 비교적 더 어린 특성으로의 역전의 측면에서 긍정적인 효과를 갖는 것으로 보인다. 추가적인 성장 또는 세포 분열의 유의성 있는 유도는 관찰되지 않았다.

[0108] **실시예 17.** 칼세인(Calcein) AM 및 일련의 상이한 조직발생(histogenetic) 기원 및 종 기원의 세포주에 의한 마이크로타이터(micortiter) 분석법을 이용하여 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체의 인 비트로 세포독성 활성을 결정하였다; 키네티도 대조군으로서 조사하였다. 대사적으로 활성이 있는 세포들만이 칼세인 AM(칼세인의 테트라아세톡시메틸 에스테르)을 절단하기 때문에, 칼세인의 세포내 농도는 배양물 내의 살아있는 세포의 수에 상응된다.

[0109] 하기의 세포주를 이용하였다: 인간 골육종(HOS); 유방암 MCF-7; 인간 골수성 백혈병 K-562; 및 마우스 섬유모세포 NIH3T3. 세포들을 Nunc/Corning 80cm² 플라스틱 조직 배양 플라스크에 보관시키고 세포 배양 배지(5 g/l 글루코오스, 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신, 10% 송아지 태아 혈청(fetal calf serum), 및 탄산수소나트륨을 포함하는 DMEM)에서 배양하였다. .

[0110] 특정한 세포 종류에 따라 세포 현탁액을 준비하고 희석시키고, 기대되는 표적 세포 밀도(세포 성장 특성에 기반한, 웰 당 2,500-30,000개의 세포)를 피펫(80 μl)에 의해 96/웰 마이트로타이터 플레이트에 첨가하였다. 접종원을 안정화를 위해 37°C 및 5% CO₂에서 24시간의 전-인큐베이션(pre-incubation) 기간 동안 방치하였다. 의도된 테스트 농도의 5배 희석을 0 시간 차(time 0)에 마이크로타이터 플레이트 웰에 20μl의 분량으로 첨가하였다. 테스트 화합물을 전반적으로 6개의 4배 희석에서 평가하였다. 본 연구에서 이용된 최고 웰 농도는 166.7 μM이었다. 모든 시료를 3배수로 조사하였다. 세포의 테스트된 화합물과의 인큐베이션은 5% CO₂ 대기 및 100% 습도에서 37°C에서 72시간 동안 수행하였다. 상기 인큐베이션 기간의 종료 시에, 칼세인 AM을 1 μg/ml의 최종 농도까지 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션시켰다. Labsystem FIA Reader Fluoroscanner Ascent(UK)로 형광 강도(FI)를 측정하였다. 세포 생존율(cell survival)(GI₅₀)은 하기 식을 이용하여 계산하였다: $GI_{50} = (FI_{\text{화합물}} - FI_{\text{대조군}}) / (FI_{\text{대조군}} - FI_{\text{블랭크}}) \times 100\%$. 세포의 50%에 대한 치사 약물 농도인 GI₅₀ 값은 수득된 투여량 반응 곡선으로부터 계산하였다.

[0111] 하기의 결과를 수득하였다:

[0112]

화합물	테스트된 세포주에 대한 GI ₅₀ (μmol/l)			
	HOS	K-562	MCF7	NIH-3T3
키네티	>166.7	164.1	>166.7	155.1

6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	>166.7	>166.7	>166.7	>166.7
6-(3,5-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	>166.7	-	>166.7	>166.7
6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	>166.7	>166.7	>166.7	>166.7
6-(2,3-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	>166.7	-	>166.7	>166.7
6-(3-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	>166.7	-	>166.7	>166.7
6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	>166.7	-	>166.7	>166.7

[0113] 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 최대 166.7 μ M의 농도에서 세포에 대해 최소 독성을 보이거나 또는 무독성을 보였고, 따라서, 미용적 적용을 위해 적합하다.

[0114] **실시예 18.** 96-웰 플레이트에 대해 최적화된 표준 MTT 분석법에 의해, 인간 이배체 섬유모세포에 대한 수개의 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체의 인 비트로 세포독성 활성을 결정하였다. 상기 분석법은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의한 MTT의 대사적 전환 산물의 분광분석법에 의한 측정에 근거한다.

[0115] 중간 계대(middle passage)에 있는 인간 포피 섬유모세포(human forskin fibroblast)(세포주 BJ)를 75 cm^2 플라스틱 조직 배양 플라스크에서 유지시키고 세포 배양 배지에서 배양하였다(5 g/l 글루코오스, 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 10% 송아지 태아 혈청, 및 탄산수소 나트륨을 포함하는 DMEM).

[0116] 96-웰 플레이트의 웰당 약 5,000개의 세포를 접종하였다. 24시간 후에, 세포 배양 배지를 테스트 화합물을 포함하는 세포 배양 배지로 교체하였다. 테스트 화합물은 6개의 2-배 희석에서 평가하였다. 본 연구에서 이용된 최고 농도는 통상적으로 200 μ M이었다. 배양 배지에서 한정된 용해도를 갖는 화합물의 경우에, 최고 농도를 조정하였다. 모든 테스트 화합물은 5배수로(in five replicates) 검사하였다. 세포의 테스트 화합물과의 인큐베이션은 5% CO_2 대기 및 100% 습도에서 37°C에서 72시간 동안 수행하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시에, 배양 배지를 MTT (0.5 mg/ml)를 함유한 세포 배양 배지로 교체하고 세포를 3시간 더 인큐베이션시켰다. 형성된 포르마잔을 DMSO에 의해 가용화시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 테스트된 화합물이 세포의 MTT 환원 활성을 억제하는 능력을 $\text{IC}_{10} = (A_{\text{화합물에 노출된 웰}} - \text{평균 } A_{\text{블랭크}}) / (\text{평균 } A_{\text{대조군 웰}} - \text{평균 } A_{\text{블랭크}}) \times 100\%$ 로 계산하였다. MTT 환원 활성(MTT reducing activity)의 10% 감소를 유발하는 농도인 IC_{10} 을 수득된 투여량 반응 곡선으로부터 계산하였다.

[0117] 하기의 결과를 수득하였다:

[0118]

화합물	테스트된 최대 농도 ($\mu\text{mol/l}$)	IC_{10} ($\mu\text{mol/l}$)
6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	100	>100
6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	100	>100
6-(3-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	100	>100
6-(2,4-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	25	>25
6-(3,5-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(3,4-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(3,4-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(2,3,4-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	37.5	>37.5
6-(2,3,4-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(2,4,5-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(2,4,5-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200
6-(2,4,6-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	50	>50

6-(3,4,5-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	100	>100
6-(3,4,5-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	200	>200

[0119] 테스트된 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체는 넓은 농도 범위에서 미토콘드리아 활성 및 세포 생존력에 대해 유해한 효과를 보이지 않았고, 따라서, 미용적 적용을 위해 적합하다.

[0120] **실시예 19.** 수 개의 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체에 의한 노화의 억제를 결정하였다; 키네티도 대조군으로서 평가하였다. 인간 이배체 섬유모세포(다양한 계대 수준의 HCA 세포: 계대 25 - HCA25로 지정함; 계대 45 - HCA45로 지정함; 및 계대 80 - HCA80으로 지정함)를 β -갈락토시다아제 활성에 대해 염색하였다. 세포 배양을 위해 이용된 배지를 제거하고, 세포들을 PBS로 2회 세척하고, PBS 중의 2% 포름알데히드 및 0.2% 글루타르알데히드를 포함하는 고정 용액(fixing solution) 2-3 ml에서 고정시켰다. 세포들을 실온에서 5분 동안 인큐베이션시키고, 그 후, PBS로 2회 세척하였다. 뒤이어, 세포들을 시트릭/포스페이트 완충액(pH 6.0) 중의 포타슘 페리시아니드(5 mM), 포타슘 페로시아니드(5 mM), $MgCl_2$ (2 mM), X-gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴- β -D-갈락토피라노시드)(1 mg/ml)를 포함하는 용액 2-3 ml에서 1 내지 16 시간 동안 (CO_2 부재 하에) 37°C에서 인큐베이션시켰다. 각 계대에서 배지에 테스트 화합물(약 50 μ M)을 첨가하였다. 이 인큐베이션 기간 후에, X-gal이 분해되었다는 것을 나타내는 청색 세포(명확한 노화 세포(positively senescent cell))를 검출하기 위해, 세포 시료를 관찰하였다. 이 실험에서, β -갈락토시다아제의 기질에 대한 작용 때문에 노화 세포만이 청색으로 염색되었다.

[0121] 결과가 하기에 제시된다:

화합물	노화 세포 (%)		
	HCA25	HCA50	HCA80
키네티	3	5	38
6-(2-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	4	6	22
6-(3-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	5	5	24
6-(4-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	4	3	26
6-(2,4-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	4	6	25
6-(2,3,4-트리메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	4	5	31
6-(푸르푸릴아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	3	4	12
6-(2,4-디메톡시페닐아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	4	4	29
6-(3,4-디메톡시페닐아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	5	7	28
6-(2,4,5-트리메톡시페닐아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	5	4	25

[0123] 6,9-이치환 퓨린 유도체는 80 계대 후의 노화 세포의 보다 낮은 수준을 유지하는데 있어서 일반적으로 키네티보다 더 효과적이었다.

[0124] **실시예 20.** 수개의 본 발명의 6,9-이치환 퓨린 유도체의 항-염증 활성을 결정하였다; 키네티도 대조군으로서 평가하였다. 랫트 C6 신경아교종(glioma)(ATCC No. CCL107)을 Ham's F10/최소 필수 배지(minimal essential medium)(1:1 v/v), 2 mM L-글루타민, 1 % (v/v) 최소 필수 배지 비타민(100x), 1 % (v/v) 최소 필수 배지 비필수 아미노산(100x), 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 및 30 nM 소듐 셀레니트를 포함하는 무혈청 화학적 한정 배지(serum-free chemically defined medium)에서 단일층으로 배양하였다. 인큐베이션은 가습 대기(humidified atmosphere)에서 37°C에서 수행하였다. 분석은 2.5×10^5 세포/ cm^2 의 밀도에서 지수적 성장기에서 수행하였다. 5 mM (-)-이소프로테레놀의 첨가에 의해 세포내 cAMP 합성을 유도하였다; 다양한 양의 테스트 화합물을 (-)-이소프로테레놀과 동시에 첨가하였다. 37°C에서 30분의 인큐베이션 후에, 배지를 제거하고, Amersham으로부터의 cAMP-효소 면역 분석법 키트를 이용하여 세포내 cAMP의 양을 결정하였다. I_{50} 값을 투여량-반응 곡선으로부터 이배수(duplicate)로 결정하였다.

[0125] 하기의 결과를 수득하였다:

화합물	항-염증 활성	
	I_{50} (μ M)	효과

키네티	-	활성 없음
6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	13	억제
6-페닐아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	45	억제
6-(3-메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	7	억제
6-(3,5-디메톡시벤질아미노)-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린	11	억제

[0127] 6,9-이치환 퓨린 유도체는 항-염증 활성을 보였다.

[0128] 키네티는 테스트 프로토콜에서 불활성이었다.

[0129] **실시예 21.** 통상적으로 허용되는 프로토콜 및 절차를 이용하여 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 안전성과 관련된 다수의 테스트를 수행하였다. 이 연구들의 결과가 본 명세서에서 요약된다.

[0130] **에임즈(Ames) 테스트.** 표준 프로토콜 및 절차에 기초하여 용매인 DMSO와 2.5, 5.0, 15, 50, 500, 1500, 및 5000 $\mu\text{g}/\text{플레이트}$ 의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 투여량 수준을 이용하여 테스트를 수행하였다(Ames et al., Mutation Research, 31, 347-364 (1975); Maron et al., Mutation Research, 113, 173-215 (1983)). 아로클로르(Aroclor)-유도 랫트 간 S9의 존재 및 부재 하에 히스티딘 요구성 살모넬라 티피뮤리움 (*Salmonella typhimurium* histidine auxotroph) TA98 및 TA100을 이용하여, 테스트된 수준의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린에 의해 양성의 돌연변이 생성 반응이 관찰되지 않았다.

[0131] **인 비트로 염색체 이상(Chromosome Aberration) 스크리닝 분석법.** 염색체 파괴 가능성(clastogenic potential)을 평가하기 위해, 아크로클로르-유도 S9 활성화 시스템의 존재 및 부재 하에 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포를 이용한 염색체 이상 스크리닝 분석법에서 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린을 테스트하였다. DMSO를 용매로 사용하고 투여 속도는 0.272 내지 272 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위였다. 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린 처리된 시료에서 구조적 또는 수적인 이상을 갖는 세포의 비율은 용매 대조군 시료의 경우보다 유의성 있게 증가되지 않았다. 이 연구에 근거하여, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린은 CHO 세포에서 염색체의 구조적 이상 및 수적인 이상의 유도에 대해 음성인 것으로 결론지었다.

[0132] **용모요막 혈관 분석법(Chorioallantoic Membrane Vascular Assay: CAMVA).** Bagley et al., Alternative Methods in Toxicology, Vol. 6 in Progress in In Vitro Toxicology, 131-138 (1988)에 기재된 절차를 이용하여, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 안점막 자극(ocular irritation) 가능성을 평가하였다. 14일 동안 인큐베이션된 White Leghorn 난의 용모요막에 40 μl 의 테스트 화합물(및 증류수 중의 보다 낮은 3개의 농도)을 투여하고 30분간 더 인큐베이션시키고, 그 시간 동안 혈관 출혈, 모세혈관 주입(capillary injection), 및/또는 빈 혈관(ghost vessel)의 존재에 대해 조사하였다. RC_{50} 값(처리된 난의 50%에서 양성 반응을 생성하는 계산된 농도)은 105%였다. 이 분석의 조건에서, 1% 미만의 RC_{50} 값은 자극제(irritant)로 간주되고, 3%를 초과하는 RC_{50} 값은 비-자극제(non-irritant)로 간주된다. 따라서, 이 분석법에 근거하여, 테스트 화합물은 비-자극제인 것으로 확인되었다.

[0133] **표피 MTT 생존력 분석법(Epiderm MTT Viability Assay).** MatTek Corporation's EpiDerm™ System (인간 표피의 다층, 고도 분화 모델을 형성하기 위해 배양된 NHEK(normal, human-derived epidermal keratinocyte)로 구성됨)을 이용하여, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린은 비-자극성으로 분류될 것으로 예상되는 것으로 결정되었다.

[0134] **급성 경구 독성(Acute Oral Toxicity).** 암컷 Wistar 랫트에 경구로 2000 mg/kg의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린을 투여하고, 투여 1/2, 1, 2, 3, 및 4 시간 후 및 그 후 14일 동안 1일 1회 독성 및 약리적 효과를 관찰하였다; 연구 후에 CO_2 를 이용하여, 모든 동물들을 인도적으로 희생시키고 육안으로 병리를 조사하였다(gross pathology). 모든 동물들은 경구 투여량에서 생존했고; 연구 동안 중량 변화는 정상이었으며; 및

부검 결과는 정상이었다.

[0135]

[0136]

인체 누적 자극 첩포 테스트(Human Repeated Insult Patch Test). 약 0.1 퍼센트의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린을 함유한 테스트 겔(약 0.2 ml)을 2 cm²(2 cm square)의 폐쇄 첩포(occlusion patch) 상에 배치하고, 이를 각 개체의 등에 배치하고 24시간 동안 방치했다. 이 절차를 동일한 영역에서 9회 적용이 이루어질 때까지 월요일, 수요일, 및 금요일마다 반복하였다(유도기). 모든 새로운 적용 전에 상기 영역을 조사하였다. 9번째 첩포의 제거 후 약 10-14일 후에, 등의 새로운 영역에 유발 첩포(challenge patch)를 적용하고(유발기(challenge phase)) 24시간 후 및 72시간 후에 반응성에 대해 조사하였다. 피부 반응은 6점 척도(six-point scale)에 근거하였다(0 = 효과의 증거 없음; + = 겨우 인지가능함(barely perceptible); 1 = 경미함(mild); 2 = 보통임(moderate); 3 = 현저함(marked); 및 4 = 심각함(severe)).

[0137]

52명의 대상자가 유도기 및 유발기를 완료했다(대상자당 총 10회의 적용). 본 연구를 완료한 개체 중에, 단 한 명이 유발기의 적용 후 간신히 인지가능한 등급(+)을 가졌고(24시간 후에만 인지가능한 수준이고; 72시간 후 조사했을 때는 효과의 증거가 없었음); 이 하나의 관찰된 반응은 속성상 자극 또는 과민반응(allergic)의 증거로 간주되지 않았다. 모든 다른 개체들은 유도기 또는 유발기 동안 자극의 증거를 보이지 않았다(즉, 척도에서 0). 대상자에서 유도된 알레르기 접촉 피부염(allergic contact dermatitis) 또는 다른 자극의 증거는 관찰되지 않았다.

[0138]

실시예 22. 무모 마우스 모델(광노화(photoaging) 치료의 연구를 위한 정립된 모델)을 이용하여, 본 발명의 6,9-이치환 푸린 유도체의 국소 피부 노화-방지 치료제(topical skin anti-aging treatment)로서의 안전성 및 효능을 조사하였다. 암컷 SKH-1 무모 마우스(5주령, 20-25 그램, Charles River Laboratories, Wilmington, MA)를 상부에 필터가 장착된 케이지(filter-top cage)에 개별적으로 수용시키고, 전달 후 5-7일 동안 적응시켰다. 마우스를 두개의 상이한 대조군(미처리 대조군, 비히클 대조군) 및 치료제 대조군(상업적으로 입수가능한 0.05% 트랜스-레티노산 크림)을 포함하여, 처리군(n=6)으로 분리하였다. 물과 마우스의 사료는 무제한으로(ad libitum) 공급했다.

[0139]

실험군(군당 6 마리의 마우스)은 하기의 처리를 포함했다: (1) 미처리 대조군; (2) 비히클 대조군(MillCreek Lotion); (3) 키네틴(MillCreek Lotion 중 0.1%); (4) 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)푸린(MillCreek Lotion 중 0.1%); 및 (5) 치료제 대조군(0.05% 트랜스-레티노산 크림). 다양한 처리를 약 20 mg의 투여량으로 무모 마우스의 등쪽 피부(약 2 cm x 2 cm)에 3주 동안 매일(월요일부터 금요일까지) 적용하였다.

[0140]

기준시점(baseline)(1회 처리 전) 및 주별로, 등쪽 피부를 대상으로 경피 수분 손실(transepidermal water loss: TEWL), 피부 수분 함량 및 피부 탄성(skin elasticity)을 측정하였다. 브로모데옥시우리딘을 세포 증식의 면역조직화학적 마커로 이용하여, 표피 세포 증식에 대한 이 제제의 가능한 효과를 조사하였다. 이 국소 제제의 피부 효과(cutaneous effect)를 결정하기 위해, 처리된 피부와 대조군 피부의 조직학적 검사도 이용하였다.

[0141]

정립된 평점 기준(scoring criteria)을 이용하여 부위의 홍반(자극)의 가능한 발생도를 평가하기 위해 일별 검사를 수행하였고, 상기 평점 기준에서 0점 = 무 반응; 1점 = 매우 경미한 발적(redness); 2점 = 경미한 발적; 3점 = 보통의 발적/자극; 4점 = 심각한 발적/자극; 5점 = 매우 심각한 발적/자극; 및 6점 = 괴사였다.

[0142]

피부 수분 함량 및 피부 탄성의 측정은 피부에 대한 보습제 및 주름-방지 효과를 파악하기 위해 이용되는 중요한 비침습적(noninvasive) 방법이다. 기준시점 및 주 간격으로 표적 피부 부위의 피부 수분 함량 및 탄성을 측정하기 위해 DermaLab™ 조합 장치를 이용하였다. 이 장치에는 피부 표면 상에 배치되는 듀얼 프로브(dual probe)가 장착되어 있었고, 개별적인 파라미터의 정량적 측정이 수행되고 측정값이 통합된 컴퓨터에 기록되었다.

[0143]

모든 동물군에 최종 적용 4시간 후에 브로모데옥시우리딘(100 mg/kg)을 복막 내로(I.P.) 주사하였다. 3시간 후에, 동물들을 CO2 흡입 및 경추 탈구에 의해 희생시켰다. 테스트 부위를 절제하고 각 처리 부위 및 미처리 대조군 부위로부터 6 mm 펀치 생검을 수득하였다. 파라핀 포매(paraffin embedding) 및 항-BrdU 염색을 위해 생검물을 4% 중성 포르말린을 함유한 표지된 바이알에 넣었다. 파라핀 절편을 5 μm 두께로 절단하고 BrdU 면역조직화학 키트(immunohistochemistry kit)(X1545K from Exalpha Biologicals, Inc.) 및 표준 염색 프로토콜을 이용하여 염색시켰다. 슬라이드를 Mayer 헤마톡실린에서 약하게 대조염색시키고 각 절편에 대해 표피 mm 당 BrdU-양성

세포의 수에 대해 광학 현미경 하에서 평가하였다.

- [0144] 각 처리 부위 및 미처리 대조구 피부로부터 피부 생검을 채취하였다. 생검물을 4% 중성 완충 포르말린에서 고정시키고, 파라핀에 포매시키고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 표피, 진피 및 각질층의 조직에 대한 처리의 효과를 결정하기 위해 염색된 피부 절편을 검사하였다. 또한, 생검물을 현미경으로 관찰하여 염증성 세포에 대해 검사하였다.
- [0145] **피부 자극(Skin Irritation)**. 3주 동안의 연장된 처리에 의해 테스트 산물들은 양호한 내약성을 보였다(well tolerated). 트랜스-레티노산 크림만이 1주 내지 3주의 처리 후에 상당한 자극(3점)을 유발했다. 모든 다른 처리들은 1.5점 미만이었으며, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린 처리는 3주의 기간 동안 1점 미만이었다.
- [0146] **피부 수분 함량(Skin Moisture Content)**. 치료제 대조군은 피부 전도도(skin conductance)의 유의성 있는 감소 및, 따라서, 피부의 감소된 수분 함량을 보였다. 대조적으로, 테스트 화합물 및 비히클 단독은 피부 수분 함량의 점진적 증가를 생성했다. 3주 차에, 모든 테스트 화합물의 평균 수분 함량은 비히클 또는 미처리 대조군보다 더 높았다. 일반적으로, 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린 처리는 검사된 화합물의 수분 함량의 가장 높은 증가 중 하나를 생성했다.
- [0147] **피부 탄성(Skin Elasticity)**. 어느 테스트 군에서도 3주의 테스트 기간 동안 처리군의 피부 탄성의 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았다. 따라서, 처리군의 피부 탄성은 미처리 대조군 및 비히클 단독 처리군의 피부 탄성과 유사했다.
- [0148] **브로모데옥시우리딘(BrdU) 염색**. 테스트 화합물의 표피 세포 증식에 대한 효과를 결정하기 위해 표피의 브로모데옥시우리딘 염색을 측정하였다. 미처리 대조군 또는 비히클 대조군 대비 테스트 화합물에서 표피 BrdU 염색의 통계적 차이가 없거나 또는 테스트 화합물 간에 BrdU 염색에서 차이가 없었다. 치료제 대조구-처리된 조직은 레티노이드-유도 염증과 관련될 수 있는, 진피층의 일부 국소화된 염색 영역 외에는 표피 BrdU 염색을 갖지 않았다.
- [0149] 3주의 처리 후 연구의 완료시 조직 생검을 수득하였다. 조직학적 평가는 모든 테스트 화합물에 대해 정상적인 "건강하게" 보이는 피부를 확인했다. 대조적으로, 치료제 대조군은 표피의 현저하게 증가된 두께 및 진피층의 염증성 변화를 보였다. H&E 염색된 생검물의 피부 구획 두께(skin compartment thickness)를 광학 현미경에 의해 측정하였다. 3주의 처리 후 측정된 표피, 진피 및 각질층의 두께는 비히클 및 미처리 대조군의 경우와 유사했다. 대조적으로, 치료제 대조군은 표피 및 진피 두께를 증가시켰다.
- [0150] 이 결과는 미용적 외양을 개선하고 자극 없이 노화 피부의 활력을 보존하기 위한 용도에 대한 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린의 안전성 및 효능에 대한 증거를 제공한다.
- [0151] **실시예 23**. 광손상된 얼굴 피부의 임상적 징후 및 증상을 개선하기 위해 12주 동안 1일 2회 적용된 국소 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(0.10%)의 미용적 효능 및 개체의 내성(tolerance)을 결정하기 위해 임상적 연구를 수행하였다. 경증 내지 중증의 광 손상된 얼굴 피부 징후를 갖는 40세 내지 65세의 여성 지원자 40명이 본 연구에 참여했다. 34명이 본 연구를 완료했다; 본 연구를 완료한 대상자의 평균 연령은 약 54세였다. 대상자들에게 연속된 12주 동안 1일 2회(이른 아침 및 취침 약 1시간 전) 얼굴 피부 전체에 테스트제품을 도포하도록 지시했다. 또한, 대상자들에게 자외선 차단제(sunscreen) 또는 순한 클린저(mild cleanser) 및 색조 화장품의 이용을 제외하고는, 본 연구 동안 다른 국소용 스킨 케어 제품이나 약제를 얼굴에 사용하지 말도록 지시했다. 테스트 제품은 비히클인 MillCreek Lotion 중에 0.1 퍼센트의 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린을 포함했다.
- [0152] 대상자들을 2주, 4주, 8주, 및 12주 차에 평가했다. 처리된 얼굴 피부를 대상으로 연구 개시(기준 시점) 시 및 2주, 4주, 8주 및 12주 차에 피부 노화의 임상적 징후(예를 들면, 굵은 주름 및 미세 주름, 거칠기, 반상 과다 색소침착)에 대해 평가했다. 기준 시점 대비 개선(주름, 질감, 얼룩, 색, 및 전체 개선)에 대한 대상자의 자가 평가도 수득했다. 또한, 모든 대상자의 볼에서 경피 수분 손실(TEWL) 및 피부 수분 측정을 수행하였다.
- [0153] **경피 수분 손실(Transepidermal Water Loss: TEWL)**. TEWL은 각질층을 통한 수분 손실의 양을 의미한다. TEWL 값의 증가는 증발에 의한 수분 손실(evaporative water loss)(예를 들면, 발한 또는 증발) 또는 피부 장벽 손상(skin barrier damage)을 시사한다. TEWL 값의 감소는 장벽 기능의 개선 또는 피부 상의 장벽 존재를 시사한다.

중앙 처리 유닛에 연결된 프로브(습도 및 온도 센서를 포함함)로 구성된 TEWL 미터(Courage & Khazaka, Koln, Germany)를 이용하여 TEWL 측정을 수행하였다. 각 대상자에 대해, 프로브를 양 볼의 중앙에 배치하고 2배수로 측정값을 취하였다.

[0154] **피부 수분 측정(Skin Moisture Measurement).** 피부의 전기적 특성의 변화를 측정하는 것에 의해 피부 수분 함량의 간접적인 측정을 수행하였다. NOVA DPM 9003[®] (NOVA Technologies, Gloucester, MA1 USA)을 이용하여 피부에서 교류저항에 기반한 전기용량 측정값(impedance based capacitance measurement)을 취하였다. 상기 장치는 부하된 교류의 다양한 미리 선별된 주파수(최대 1 MHz)에서 측정을 수행했다. 전기용량과 직접적으로 관련된 값은 임의적 단위(arbitrary unit)로 결정된다: 보다 높은 값은 테스트 부위에서 수분의 증가된 수준을 나타내는 더 큰 전기용량을 나타낸다. 각 테스트 대상자에 대해 양 볼의 중심에서 삼배수로 측정값을 취하였다.

[0155] **개체의 얼굴 피부의 전문가 평가.** 기준시점 (0일 차) 방문시, 검사자가 5-점 척도를 이용하여 미세 주름, 굵은 주름, 거칠기, 반상 과다색소침착 및 기타 파라미터의 존재에 대해 각 대상자의 얼굴을 평가했다(0 = 없음(None); 1 = 최소(Minimal); 2 = 미약(Mild); 3 = 양호(Moderate); 및 4 = 심각(Severe)). 피부 광손상(주름, 거칠기 및 반상 과다색소침착)의 전체 중증도(overall severity)를 10점 척도를 이용하여 평가했다(0 = 없음(None); 1 - 3 = 미약(Mild); 4 - 6 = 양호(Moderate); 및 7 - 9 = 심각(Severe)); 6보다 높은 기준시점 중증도 점수(baseline severity score)를 갖는 대상자는 본 연구에서 배제시켰다.

[0156] 각 후속 방문에서, 검사자는 6-점 척도를 이용하여 기준시점 대비 전반적인 개선을 평가했다(1 = 탁월한 개선(excellent improvement); 2 = 현저한 개선(marked improvement); 3 = 양호한 개선(moderate improvement); 4 = 미약한 개선(slight improvement); 5 = 개선 없음(no improvement); 및 6 = 악화(worse)).

[0157] **효능에 대한 개체의 인지(Subject's Perception of Efficacy).** 각 후속 방문에서, 대상자들에게 5-점 척도를 이용하여 피부 질감, 피부 색, 얼룩(즉, 갈색 반점), 미세 주름 및 전반적 개선에 대한 기준시점 대비 개선을 평가하는 자가-평가 설문지를 작성하도록 요청했다(1 = 많이 개선됨(much improved); 2 = 다소 개선됨(somewhat improved); 3 = 변화 없음(no change); 4 = 다소 악화됨(somewhat worse); 및 5 = 매우 악화됨(much worse)).

[0158] **결과.** 모든 대상자에 대해 평균되어, 평균값으로 보고된 하기의 테스트 결과를 획득하였다.

	기준시점	2주 차	4주 차	8주 차	12주 차
TEWL (g/m ² /hr)	13.15	12.89	11.70*	13.08	9.54*
기준시점 대비 변화		-1.98%	-9.62%	0.11%	-27.79%
피부 수분 (임의적 단위)	118.03	125.37*	141.30*	158.04*	165.42*
기준시점 대비 변화		6.22%	20.96%	35.10%	41.21%

[0159]

[0160] * 기준시점 대비 유의성 있는 차이 ($p \leq 0.05$).

[0161] TEWL 값의 감소는 피부 장벽 기능의 개선을 나타내고; TEWL 값의 증가는 장벽 특성의 파괴를 나타낼 수 있다. 피부 수분의 증가는 간접적으로 수분 수준의 증가를 나타낸다.

[0162] 검사자의 전반적 피부 상태의 평가에 대해, 5-점 척도를 이용하여 하기의 결과를 획득하였다(0 = 없음(None); 1 = 최소(Minimal); 2 = 미약(Mild); 3 = 양호(Moderate); 및 4 = 심각(Severe)).

	기준시점	2주 차	4주 차	8주 차	12주 차
미세 주름	2.23	2.18	1.97*	1.74*	1.62*
기준시점 대비 변화		-1.28%	-11.25%	-21.79%	-27.63%
굵은 주름	2.25	2.35	2.22	2.20	2.03*
기준시점 대비 변화		4.44%	-4.76%	-7.23%	-13.75%
거칠기(roughness)	1.68	1.05*	0.58*	0.23*	0.26*
기준시점 대비 변화		-37.31%	-63.79%	-85.71%	-83.64%
반상 과다색소침착	1.73	1.70	1.50*	1.23*	1.03*
기준시점 대비 변화		-1.45%	-15.63%	-30.65%	-40.68%
피부 자극	0	0	0	0	0
기준시점 대비 변화		0	0	0	0
여드름	0.63	0.60	0.53	0.53	0.32*
기준시점 대비 변화		-4.00%	-13.64%	-9.52%	-45.00%
홍반 [†]	0.60	0.40 ^{††}	0.31*	0.20*	0.21*
기준시점 대비 변화		-33.33%	-47.62%	-66.67%	-66.67%

* 기준시점 대비 유의성 있는 차이(p<0.05)

[†] 데이터가 기준시점에 홍반의 징후를 가진 대상자에만 한정되는 경우, 모든 시기에 유의성 있는 차이가 있었다. 데이터가 기준시점에 홍반의 징후를 갖지 않은 대상자에만 한정되는 경우, 모든 시기에 유의성 있는 증가가 없었고, 이는 홍반의 가시적 징후의 유도가 없다는 것을 나타낸다.

^{††} 2주 차에 홍반의 유의성 있는 감소를 강하게 시사함(p=0.056).

전술된 표에서 파라미터의 음의 비율 변화(negative percentage change)는 관련 파라미터의 개선을 나타낸다. 하나 이상의 시점에서 미세 주름 및 굵은 주름, 거칠기, 과다색소침착, 여드름, 및 홍반에 대한 유의성 있는 개선이 전문 평가자에 의해 인정되었다. 피부 자극은 관찰되지 않았다.

10점 척도(0 = 없음; 1 - 3 = 미약; 4 - 6 = 양호; 및 7 - 9 = 심각)를 이용한, 피부 노화와 관련된 미용적 외양에 기반한 전반적 피부 상태에 대한 검사자의 평가는 하기와 같았다: 기준시점 4.10; 2주 차 4.05(기준시점 대비 -1.22% 변화); 4주 차 3.56(기준시점 대비 -15.23% 변화); 8주 차 3.20(기준시점 대비 -24.32% 변화); 및 12주 차 3.03(기준시점 대비 -27.97% 변화). 4주, 8주, 및 12주 차에 확인된 차이는 유의성이 있었다(p ≤ 0.001). 전반적 피부 상태의 음의 비율 변화는 피부 노화와 관련된 미용적 외양의 개선을 나타낸다.

6-점 척도(1 = 탁월한 개선(excellent improvement); 2 = 현저한 개선(marked improvement); 3 = 양호한 개선(moderate improvement); 4 = 미약한 개선(slight improvement); 5 = 개선 없음(no improvement); 및 6 = 악화(worse))를 이용한, 피부 상태(기준시점 대비)의 전반적 개선에 대한 검사자의 평가는 하기와 같았다: 2주 차 4.95; 4주 차 4.44(2주 차 데이터 대비 -10.61% 변화); 8주 차 4.11(2주 차 데이터 대비 -16.67% 변화); 및 12주 차 4.12(2주 차 데이터 대비 -17.16% 변화). 4주, 8주, 및 12주 차에 확인된 차이는 유의성이 있었다(p ≤ 0.001). 전반적 개선의 음의 비율 변화는 피부 상태의 개선을 나타낸다.

5-점 척도(1 = 많이 개선됨(much improved); 2 = 다소 개선됨(somewhat improved); 3 = 변화 없음(no change); 4 = 다소 악화됨(somewhat worse); 및 5 = 매우 악화됨(much worse))를 이용한, 연구 동안 피부 상태에 대한 대상자의 자가 평가 결과는 하기와 같았다:

	2주 차	4주 차	8주 차	12주 차
피부 질감 (skin texture)	2.21	2.03*	1.91*	1.74*
2주 차 데이터 대비 변화		-8.97%	-15.58%	-23.38%
피부색	2.74	2.50*	2.23*	2.12*
2주 차 데이터 대비 변화		-5.32%	-18.28%	-22.58%
얼룩/갈색 반점	2.70	2.58	2.26*	2.15*
2주 차 데이터 대비 변화		-6.19%	-18.95%	-23.16%
미세 주름	2.62	2.11*	2.00*	1.88*
2주 차 데이터 대비 변화		-18.68%	-23.60%	-28.09%
전반적 개선	2.36	2.14	1.97*	1.91*
2주 차 데이터 대비 변화		-6.17%	-16.25%	-18.75%

*2주 차 데이터 대비 유의성 있는 차이($p \leq 0.05$).

전술된 표에서 파라미터의 음의 비율 변화는 관련 파라미터의 개선을 나타낸다. 대상자들은 피부 질감, 피부 색, 얼룩, 갈색 반점, 및 미세 주름에 대해 하나 이상의 시기에서 유의성 있는 개선을 보고했다. 또한, 대상자들은 8주 차 및 12주 차에 그들의 피부의 전반적 상태 및 외양의 개선을 보고했다.

전반적으로, 대상자들은 전문가 평가 및 자가 평가에 근거하여, 연구 기간 동안 전반적 피부 상태의 유의성 있는 개선 및 노화와 연관된 유해한 효과의 유의성 있는 감소를 경험했다. 피부 자극 또는 기타 유해한 효과는 관찰되지 않았다.

실시예 24. 본 실시예는 선행(earlier) 연구에서 국소 적용된 키네틴(0.1%)에 대해 생성된 유사한 임상적 데이터와 실시예 23으로부터 취해진 국소 적용된 6-푸르푸릴아미노-9-(2-테트라히드로피라닐)퓨린(0.10%)에 대한 임상적 데이터를 비교했다. 키네틴에 대한 선행 임상 시험 프로토콜은 본 발명의 화합물(the inventive compound)에 대해 실시예 23에 기재된 프로토콜과 유사했다; 32명의 여성 지원자들이 선행 키네틴 연구를 완료했다. 이 비교는 양 연구에서 평가된 파라미터 중 일부에 대한 8주 차 및 12주 차 데이터에 대한 피부 상태의 전문가 평가 및 자가 평가에 근거한다.

전문가의 평가에 기반한 비교는 하기와 같다:

	기준시점 대비 평균 개선			
	8주 차 데이터		12주 차 데이터	
	키네틴	본 발명의 화합물	키네틴	본 발명의 화합물
TEWL	13%	1%	15%	28%
미세 주름	2%	22%*	6%*	28%*
굵은 주름	4%	7%	4%	14%*
거칠기(roughness)	35%	86%*	52%*	84%*
반상 과다색소침착	25%*	31%*	25%*	41%*
전반적 피부 상태	3%	24%*	4%*	28%*

*임상적으로 유의성 있는 개선($p \leq 0.05$)

[0179]

대상자의 자가 평가에 기반한 비교는 하기와 같다:

	기준 시점 대비 개선을 보고한 개체			
	8주 차 데이터		12주 차 데이터	
	키네틴	본 발명의 화합물	키네틴	본 발명의 화합물
질감 (texture)	77%	83%	87%	88%
미세 주름	57%	83%	71%	88%
얼룩	50%	60%	74%	63%
색	53%	66%	71%	68%

[0180]