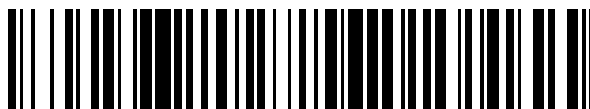


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 209**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

C07H 19/167 (2006.01)

C07H 19/173 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2008** **PCT/PL2008/000089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2009** **WO09067035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2008** **E 08851400 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016** **EP 2225228**

54 Título: **Procedimiento de obtención de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados, composición antienvjecimiento y utilización de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados en la fabricación de una composición antienvjecimiento**

30 Prioridad:

25.11.2007 PL 38386707

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

26.04.2017

73 Titular/es:

**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN
(100.0%)
UL. NOSKOWSKIEGO 12/14
61-704 POZNAN, PL**

72 Inventor/es:

**BARCISZEWSKI, JAN;
MARKIEWICZ, WOJCIECH T.;
WYSZKO, ELIZA;
MARKIEWICZ, MARIA;
NOWAK, MONIKA;
ROLLE, KATARZYNA;
ADAMSKA, EWELINA y
CHMIELEWSKI, MARCIN, K.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 610 209 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

Procedimiento de obtención de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados, composición antienvjecimiento y utilización de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados en la fabricación de una composición antienvjecimiento.

Los objetos de la presente invención son una composición antienvjecimiento y la utilización de 4-furfurilcitosina y/o sus derivados en la fabricación de composiciones antienvjecimiento. Dado que la 4-furfurilcitosina y sus derivados poseen una serie de propiedades biológicas, pueden utilizarse como una composición que presenta un efecto antienvjecimiento excelente para prevenir la flacidez de la piel y la pérdida de brillo y para mejorar su apariencia estética sin cambiar significativamente la velocidad de crecimiento y la capacidad de crecimiento total de la piel. Se presentan procedimientos óptimos de fabricación de este compuesto, mientras que al mismo tiempo se obtiene la mayor eficacia de proceso posible, poniendo un énfasis particular en su utilidad en las industrias farmacéutica y cosmética.

En las descripciones de patente JP2000319184 (publ. 21/11/2000), WO9220340 (publ. 26/11/1992) un procedimiento para mejorar la apariencia estética de la piel de mamíferos mediante la aplicación de una composición que incluye una cantidad eficaz de una citocinina aminopurina a la piel de mamíferos. Una composición que incluye una cantidad eficaz de citocinina purina 6-(amino-sustituída) [por ejemplo, cinetina (6-furfurilaminopurina) o similares] se aplica a la piel de mamíferos en una cantidad tal que pueda mejorar de forma suficiente su apariencia estética, pero que no cambie significativamente la velocidad de crecimiento y la capacidad de crecimiento total de la piel.

En las descripciones de patente CA2107896 (publ. 17/11/1992), CA1339503 (publ. 21/10/1997) se describe un procedimiento y una composición para tratar enfermedades hiperproliferativas de la piel usando citocininas 6-aminopurinas. Se ha descubierto que las citocininas purinas (6-amino-sustituídas), tales como cinetinas, inducen diferenciación, y por lo tanto reducen o suprimen la velocidad anormalmente alta de proliferación de células hiperproliferantes asociadas con enfermedades de la piel hiperproliferativas, tales como psoriasis. Así, la presente invención proporciona procedimientos y composiciones para tratar enfermedades hiperproliferativas de la piel en mamíferos, en particular las enfermedades asociadas con células epidérmicas hiperproliferantes en seres humanos, mediante la administración a las células hiperproliferantes asociadas con dicha enfermedad, en la piel de un mamífero que padece la misma, una cantidad eficaz inductora de diferenciación de una citocinina purina 6-(amino-sustituída).

En la descripción de patente US5151425 (publ. 29/02/1992) se describen un procedimiento y una composición para tratar la inflamación y la respuesta inmunitaria a la misma. Las citocininas vegetales son eficaces para tratar la inflamación, para acelerar la curación de lesiones y para proporcionar un alivio sustancialmente inmediato al dolor, el picor y otras respuestas inmunológicas resultantes de la inflamación. La citocinina vegetal se administra a un mamífero en una preparación farmacéuticamente adecuada. Una composición para uso tópico según el procedimiento comprende una cantidad eficaz de la citocinina vegetal en un vehículo adecuado para su aplicación tópica a la piel humana, por ejemplo, una pomada hidrófila, alcohol isopropílico o una formulación en polvo.

En la solicitud de patente WO2006080262 (publ. 03/08/2006) se describe un aptámero AGE-2. Un aptámero AGE-2 se une al producto final de glicación avanzada (AGE-2) que se origina en gliceraldehído, pero no a seroalbúmina humana, y comprende por lo menos 35 bases y en el mismo el contenido de citosina en sus bases es por lo menos el 35% o el contenido de guanina en sus bases es por lo menos el 32%.

En la solicitud de patente KR20010001290 (publ. 05/01/2001) se ha descrito una composición para uso externo que muestra un efecto de mejora sobre arrugas de la piel y un efecto de inhibición sobre la formación de arrugas. Se proporciona una composición para uso externo que contiene retinoide, estero vegetal, isoflavonoide, citocinina y ácido glicirrético que mejora las arrugas de la piel y muestra un efecto de inhibición bueno sobre la formación de arrugas.

En la solicitud de patente JP2001031549 (publ. 06/02/2001) se han descrito un agente para reconstituir haces de fibras de colágeno dérmico y un cosmético que contiene el mismo. El compuesto puede extraerse de una planta o sintetizarse a partir de adenina, etc., como materias primas. Cuando el agente de reconstitución se usa para preparaciones para la piel de uso externo, el contenido del agente de reconstitución es preferentemente de 0,001 a 5% en peso, de forma especialmente preferida de 0,005 a 1% en peso.

En la solicitud de patente US4753948 (publ. 28/06/1988) se describen derivados de furfurilo de bis-indoles de tipo vinblastina y composiciones farmacéuticas que los contienen. La invención se refiere a derivados de furfurilo novedosos de la fórmula general (I), (I) en la que R1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo, R2 representa un grupo hidroxilo o etilo en la posición beta; R3 significa un grupo etilo en la posición alfa; R4 representa un átomo de hidrógeno; o R3 y R4 representan conjuntamente un puente de oxígeno; y B representa un hidroxilo de un grupo O-acrilo, así como a sus sales de adición de ácidos y a preparaciones farmacéuticas que contienen estos compuestos. Además, la invención se refiere a un proceso para preparar estos compuestos y preparaciones. Los compuestos de la fórmula general (I) muestran actividad citostática con menos toxicidad que la de fármacos alcaloides de bis-indol de tipo vinblastina conocidos disponibles comercialmente.

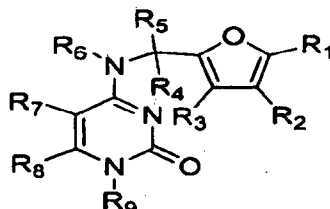
El documento DE 4323615 divulga un agente cosmético antienvjecimiento prematuro de la piel y un agente adecuado que protege el cuerpo humano de daños biológicos provocados por factores ambientales, y los agentes son adecuados como protectores/filtros frente al sol y rayos solares/radiación solar. El agente comprende ácido nucleicos, partes o derivados de los mismos como sustancia activa.

El documento CA 1339503 divulga procedimientos y composiciones para mejorar los efectos adversos del envejecimiento en células de mamífero sin aumentar la velocidad de crecimiento celular o la capacidad proliferativa total. Más específicamente, la invención se refiere a procedimientos de uso de compuestos conocidos, cinetina y otras citocininas purinas 6-(amino-sustituidas), para contrarrestar efectos adversos del envejecimiento en células de mamífero en cultivo e *in vivo*, incluidas células de la piel humana, y composiciones para llevar a cabo dichos procedimientos.

A pesar de los compuestos, las composiciones y los procedimientos de fabricación de dichas composiciones para uso externo descritos anteriormente que muestran un efecto de mejora sobre arrugas de la piel y un efecto de inhibición de la formación de arrugas, composiciones que incluyen citocininas, citocininas sustituidas y derivados de furfurilo novedosos que se aplican a la piel de mamíferos en una cantidad tal que pueda mejorar suficientemente su apariencia estética, existe aún la necesidad de obtener un procedimiento óptimo de fabricación de compuestos que muestren una actividad citostática con menos toxicidad que se utilicen para preparaciones para la piel.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una composición antienvjecimiento y la utilización de 4-furfurilcitosina y/o sus derivados en la fabricación de una composición antienvjecimiento y obtener una composición de uso externo para la piel que tenga un efecto antienvjecimiento excelente para prevenir la flacidez de la piel y la pérdida de brillo. La realización de dicho objetivo establecido y la solución de problemas con respecto a las composiciones antienvjecimiento, que puedan utilizarse en la fabricación de composiciones antienvjecimiento y que se apliquen a la piel de mamíferos en una cantidad tal que pueda mejorar suficientemente su apariencia estética, que no modifiquen significativamente la velocidad de crecimiento y la capacidad de crecimiento total de la piel, se han logrado en la presente invención.

El objeto de la presente invención es una composición antienvjecimiento, caracterizada por que contiene 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados, de la fórmula general



en la que:

R₁, R₂, R₃ = H o alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo o arilo

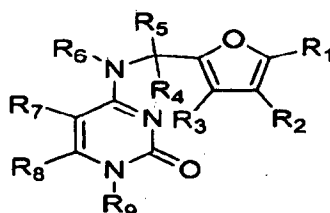
R₄, R₅, R₆ = H o alquilo

R₇, R₈ = H, CH₃, alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo

R₉ = H, D-2-desoxirribósido, D-ribósido, tetrahidropirano.

Preferentemente, la composición se caracteriza por que el contenido de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados en la composición es de hasta el 2%.

Otro objeto de la invención es la utilización de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados, de fórmula general



en la que:

$R_1, R_2, R_3 = H$ o alquilo, alquenoilo, alquinilo, hidroxialquilo o arilo

$R_4, R_5, R_6 = H$ o alquilo

$R_7, R_8 = H, CH_3$, alquilo, alquenoilo, alquinilo, hidroxialquilo

$R_9 = H$, D-2-desoxirribósido, D-ribósido, tetrahidropirano, en la producción de composiciones antienviejimiento.

Preferentemente, dicha utilización se caracteriza por que el contenido de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados en la preparación antienviejimiento es de hasta el 2%.

Las figuras adjuntas facilitan una mejor explicación de la naturaleza de la presente invención.

La figura 1 presenta la síntesis descrita de 4-N-furfurilcitosina, en la que:

(I) 4-N-p-toluenosulfonil-2'-desoxicitidina, (II) 4-N-furfuril-2'-desoxicitidina, (III) 4-N-furfurilcitosina, (IV) citosina y (a) furfurilamina (V), (5 equiv.) en piridina, 80 °C, 24 h; (b) HCl acuoso 1 M, 100 °C, 0,5 h.

La figura 2 presenta un análisis de citotoxicidad de furfurilcitosina (FC) en células de fibroblasto cultivadas de 1 día a 5 semanas.

A. Imágenes de células de fibroblasto tratadas con furfurilcitosina 100 μM frente al control no tratado (C). Las células se analizaron después de 1 día - 5 semanas.

B. Análisis RT-PCR de la expresión de ADNc de GAPDH en células de fibroblasto cultivadas 5 semanas en presencia de FC 100 μM frente a control no tratado. El ARN total se aisló a partir de células vivas para la reacción RT. La PCR se realizó con cebadores específicos. Se separaron fragmentos de 300 pb en agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio.

C. Gráfico que muestra el porcentaje de participación de la expresión de ADNc de GAPDH efectuada por FC.

Se estimó una expresión de GAPDH del 100% para células de control. Las diferencias en el nivel de expresión se determinaron usando un PhosphorImager y un programa ImageQant.

La figura 3 presenta el efecto de furfurilcitosina (FC) sobre la expresión génica de DNMT-1 en células HeLa.

A. Imágenes de células HeLa cultivadas durante 24 horas tratadas con FC 100 μM frente a células no tratadas.

B. Análisis RT-PCR de la expresión génica de DNMT-1 (500 pb) en células HeLa tratadas con FC frente a células no tratadas. El análisis de la expresión génica de GAPDH (300 pb) se realizó como control interno. Se separaron fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

La figura 4 presenta la síntesis de 4-N-furfuril-5-metilcitosina (III), en la que I es un 4-(1,2,4-triazol-1-il)-5-metil-2-pirimidon-1-il- β -D-3',5'-di-O-acetil-2'-desoxirribofuranósido y II es una 4-N-furfuril-5-metil-2'-desoxicitidina, (a) es una furfurilamina (1,5 equiv.), acetonitrilo, 50 °C, 2 h, y (b) HCl, metanol, agua, Δ , 4 h.

La figura 5 presenta la estructura general de furfurilcitosina, en la que

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = R_9 = H$) y

sus derivados, en los que:

$R_1, R_2, R_3 = H$ o alquilo, alquenoilo, alquinilo, hidroxialquilo o arilo

$R_4, R_5, R_6 = H$ o alquilo

$R_7, R_8 = H, CH_3$, alquilo, alquenoilo, alquinilo, hidroxialquilo

$R_9 = H$, D-2-desoxirribósido, D-ribósido, tetrahidropirano.

A continuación, se presentan unas formas de realización ejemplificativas de la presente invención definida anteriormente.

Ejemplos

Todos los disolventes utilizados en las reacciones se purificaron y se secaron según procedimientos estándar. En las reacciones se utilizaron reactivos habitualmente disponibles: cloruro de trimetilsililo - TMSI (POCH, Polonia), cloruro de p-toluenosulfonilo (Fluka), amoníaco acuoso concentrado (Merck), furfurilamina (Fluka). Se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) en placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck), en la que se aplicó el sistema de disolventes siguiente: (A) diclorometano/metanol (8:2) como eluyente. Para detectar la absorbancia UV se usó luz

ultravioleta de onda corta (254 nm). La separación mediante cromatografía en columna se llevó a cabo en una columna de 0,063 – 0,200 mm silanizada con gel de sílice 60 inversa (Merck) en el eluyente siguiente: agua caliente/metanol (99,9:0,1). Los espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C se registraron utilizando un espectrómetro Varian 300 MHz. Se utilizaron DMSO y DMSO con D_2O como disolvente. Los espectros de masas (EMS) se midieron con ES-MS Micromass ZQ (Waters).

Ejemplo 1

Purificación del producto

El producto principal (4-N-furfurilcitosina) mostró una solubilidad baja en todo tipo de disolventes; la mejor solubilidad se observó en agua, y aumenta con la temperatura. Por esta razón, la purificación en la columna se realizó en agua caliente (40 – 45°C). La columna se remitió con papel de aluminio, debido a que se llevó a cabo una reducción de la temperatura del agua para precipitar el producto sobre el gel. La purificación del producto se realizó dos veces, debido a que la degradación ácida de ribosa proporcionó un lote de subproductos, que obstaculizó la purificación.

El producto principal se eluyó en solución de metanol al 0,1% en agua caliente. Cuando la temperatura del disolvente fue superior a 45°C, el producto pudo eluir más pronto. La 4-N-furfurilcitosina se cristalizó en agua, proporcionando cristales incoloros, que forman agujas finas.

Ejemplo 2

Efecto de 4-N-furfurilcitosina sobre la morfología de células de pasaje tardío después de 7 y 14 días.

Se estudió el papel de FC en citotoxicidad (inducción de apoptosis, expresión génica). La acción de FC parece ser novedosa y queremos investigar su función potencial como agente quimioterapéutico.

Inicialmente, evaluamos el efecto citotóxico de FC sobre la viabilidad de células de fibroblasto cultivadas con FC 100 μM durante 5 semanas. Observamos una reducción en la viabilidad celular justo después de 3 semanas; el cultivo de control no tratado con FC creció bien. Se observaron muchas menos células vivas y después de 5 semanas estaban claramente muertas (figura 2A).

Para confirmar esta observación se aisló ARN total y se realizó una RT/PCR para analizar la expresión génica de GAPDH total como resultado de las condiciones de supervivencia de células (figura 2B). El análisis con PhosphorImager se realizó para determinar diferencias en la expresión de GAPDH en células de fibroblasto. Observamos que es 72% inferior en células tratadas con FC en comparación con el control (figura 2C).

En otro ensayo analizamos la influencia de FC sobre la expresión génica específica. En este caso fue DNMT-1. El efecto de FC sobre la expresión de DNMT-1 se comprobó en células HeLa después de 24 horas (figura 3A). Se observó un aumento en la expresión de DNMT-1 en células tratadas con FC en comparación con células HeLa de control de muestras de control no tratadas. El nivel de expresión de GAPDH fue estable y similar (figura 3B).

Cultivo celular

Se mantuvieron de forma rutinaria células HeLa y de fibroblasto en este laboratorio. Se cultivaron células de fibroblasto en medio Optimem suplementado con 10% de suero de ternero fetal y antibióticos, se cultivaron células HeLa en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternero fetal y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$). Todas las líneas celulares se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 en aire a 37°C.

Se utilizaron 1×10^6 células en placas de 6 pocillos para estudiar el efecto de citotoxicidad de FC sobre el crecimiento celular en presencia o en ausencia de FC.

Aislamiento de ARN y análisis PCR

El ARN total se aisló de células utilizando reactivo TRIZOL (Invitrogen). Las muestras para análisis de la expresión génica se prepararon a partir de células HeLa y de fibroblasto. Se retiraron partes alícuotas (1×10^6 células) y se homogeneizaron en reactivo TRIZOL (Invitrogen). El ARN total se extrajo después con cloroformo y se precipitó utilizando iso-propanol y etanol. La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando: 2 μg de ARN, cebador aleatorio y transcriptasa inversa RevertAid™ H Minus M-MuLV (Fermentas) según las instrucciones de los fabricantes. El ADNc resultante se amplificó con cebadores complementarios a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH (G1: GGGTGGAGCCAAACGGGTC, G2: GGAGTTGCTGTTGAAGTCGA). La reacción PCR se inició con desnaturalización a 94°C durante 2 min, hibridación a 55°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 30 s, seguida de 30 ciclos. Se sometieron a electroforesis volúmenes iguales de productos de amplificación sobre gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Las diferencias en el nivel de expresión se determinaron utilizando un PhosphorImager y un programa ImageQant.

Ejemplo 3

5 Síntesis química de 4-N-furfuril-5-metilcitosina.

La síntesis química de 4-N-furfuril-5-metilcitosina (III) se realizó en tres etapas (figura 4).

10 La primera etapa fue la síntesis de 4-(1,2,4-triazol-1-il)-5-metil-2-pirimidon-1-il-β-D-3',5'-di-O-acetil-2'-desoxirribofuranósido según el procedimiento descrito por *Matteucci et al.* [Matteucci M.D., Webb T.R. "Hybridization triggered cross-linking of deoxyoligonucleotides" (1986) *Nucleic Acids Research*, 14, 19, 7661-7674].

La segunda etapa fue la reacción de furfurilamina con 4-(1,2,4-triazol-1-il)-5-metil-2-pirimidon-1-il-β-D-3',5'-di-O-acetil-2'-desoxirribofuranósido.

15 La tercera etapa fue la obtención de 4-N-furfuril-5-metilcitosina mediante hidrólisis ácida del enlace de N-glicósido utilizando una solución acuosa de un ácido inorgánico. Cuando la reacción finalizó, el ácido se neutralizó por medio de solución en metanol de hidróxido de sodio; los disolventes se evaporaron. Después de redissolver en agua el producto se extrajo con n-butanol, que a continuación se evaporó a sequedad, proporcionando un precipitado blanco-amarillo.

20 4-N-Furfuril-5-metilo-2'-desoxicitidina (II)

25 A una solución de 4-(1,2,4-triazol-1-il)-5-metil-2-pirimidon-1-il-β-D-3',5'-di-O-acetil-2'-desoxirribofuranósido (I) (388 mg, 1,325 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 ml) se le añadió furfurilamina (0,176 ml 1,987 mmol). El matraz de reacción se cerró y se mantuvo a 50°C durante 2 horas. El producto en forma de un residuo beis se filtró. Para retirar los grupos acetilo, el residuo se introdujo en el matraz de reacción con metanol (15 ml) y amoníaco acuoso al 32% (15 ml). La mezcla se calentó hasta ebullición durante una hora. Después, los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo seco se extrajo con cloruro de metileno (20 ml) y agua (3 x 20 ml). La capa acuosa (con producto) se evaporó. Se obtuvo una espuma blanca con un rendimiento de 94%.

30 El análisis TLC mostró que la reacción se había completado: R_f (AcOEt: MeOH, 6:4) 0,5. ES-EM: ES⁺ m/z 322 [M + H]⁺, 360 [M + K]⁺.

35 RMN de ¹H: (300 MHz, DMSO) δ 1,8 (s, 3H, CH₃); 1,9 (m, 1H, H-2'); 2 (m, 1H, H-2''); 3,5 (d, J=2,4 Hz, 2H, H-5'); 3,7 (c, J = 3,8 Hz, J = 6,7 Hz, 1H, H-4'); 4,2 (t, J = 2,9 Hz, 1H, H-3'); 4,5 (d, J= 5,8 Hz, 2H, H-8); 5,0 (m, 1H, 5'-OH); 5,1 (m, 1H, 3'-OH); 6,1 (t, J= 5,8 Hz, 1H, H-1'); 6,2 (d, J=2,9 Hz, 1H, H-9); 6,3 (m, 1H, H-10); 7,3 (m, 1H, H-11); 7,8 (s, 1H, H-6); 8 (m, 1H, NH).

40 4-N-Furfuril-5-metilcitosina (III)

Se disolvió 4-N-furfuril-5-metil-2'-desoxicitidina (399 mg, 1,245 mmol) en la mezcla de agua (10 ml) y metanol (5 ml), a la que se añadió ácido HCl acuoso concentrado (0,31 ml, 3,736 mmol). La mezcla se calentó hasta ebullición durante aproximadamente 4 horas, controlando el progreso de la reacción en la placa de TLC. Después, el ácido se neutralizó utilizando solución en metanol de NaOH 1 M y después los disolventes se evaporaron. El residuo seco se separó en agua (10 ml) y n-butanol (3 x 10 ml) y después se añadió a la capa orgánica el carbono activo (0,300 g). El carbono se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad obteniéndose un residuo blanco-amarillo con un rendimiento de 74%.

50 El progreso de la reacción se realizó en la placa de TLC, cubierta con gel de silano en el eluyente B: R_f (AcOEt: MeOH 6:4) 0,4 lub C: R_f (acetona: agua 15:1) 0,7.

ESI-EM: ES⁺ m/z 206 [M + H]⁺, 238 [M + H + MeOH]⁺, 244 [M + K]⁺.

55 RMN de ¹H (300 MHz, D₂O) δ 1,3 (s, 3H, CH₃); 4,6 (s, 2H, H-8); 6,2 (m, 1H, H-9); 6,3 (m, 1H, H-10); 7,3 (m, 1H, H-11); 7,4 (s, 1H, H-6).

Conclusiones:

60 Estos resultados sugirieron que la FC indujo un efecto citotóxico en células de fibroblasto cultivadas durante un tiempo prolongado (5 semanas). Esta observación aparece después de 3 semanas de células cultivadas y se acentúa. Para explicar este efecto se trataron células Hela con FC para analizar la expresión génica específica.

65 Observamos que la FC inhibe la expresión de ADN metiltransferasa (DNMT-1) en células HeLa en comparación con el control. Es esencial que la metilación en la posición 5' de citosina de dinucleótidos CpG dentro y alrededor de genes ejerza una influencia principal sobre la transcripción. La metilación del ADN puede ser causante del

silenciamiento transcripcional. La enzima desempeña un papel esencial en la regulación de células de mamífero. La alteración en el patrón de metilación del ADN puede promover tumorigénesis y predispone genes a eventos mutacionales.

- 5 La FC, el compuesto de molécula pequeña, puede bloquear la expresión de DNMT-1 y se aplica como inhibidor potente con un potencial significativo para el desarrollo posterior del fármaco.

4-Furfurilcitosina 8424_07 PCT.ST25

10 **Listado de secuencias**

<110> Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

- 15 <120> Procedimiento de obtención de 4-furfurilcitosina y/o sus derivados, una composición antienvjecimiento y utilización de 4-furfurilcitosina y/o sus derivados en la fabricación de composiciones antienvjecimiento

<130> 8424/07/P-R/AT

<140> PCT/PL2008/0000

- 20 <141> 25/11/2008

<150> PL383867

<151> 25/11/2007

- 25 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

- 30 <211> 19

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 1

- 35 ggggtggagcc aaacgggtc

19

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

- 40 <213> oligonucleótido sintético

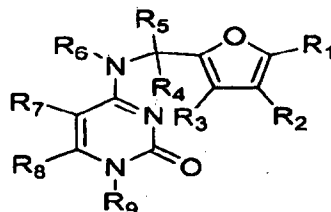
<400> 2

ggagttgctg ttgaagtcgc a

21

REIVINDICACIONES

1. Composición antienvjecimiento, caracterizada por que contiene 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados, de la fórmula general

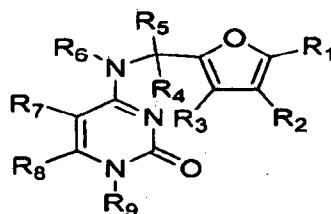


en la que:

R₁, R₂, R₃ = H o alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo o arilo
R₄, R₅, R₆ = H o alquilo
R₇, R₈ = H, CH₃, alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo
R₉ = H, D-2-desoxirribósido, D-ribósido, tetrahidropiranilo.

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el contenido de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados en la composición es de hasta 2%.

3. Utilización de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados, de una fórmula general



en la que:

R₁, R₂, R₃ = H o alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo o arilo
R₄, R₅, R₆ = H o alquilo
R₇, R₈ = H, CH₃, alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo
R₉ = H, D-2-desoxirribósido, D-ribósido, tetrahidropiranilo, en la producción de composiciones antienvjecimiento.

4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por que el contenido de 4-N-furfurilcitosina y/o sus derivados en la preparación antienvjecimiento es de hasta 2%.

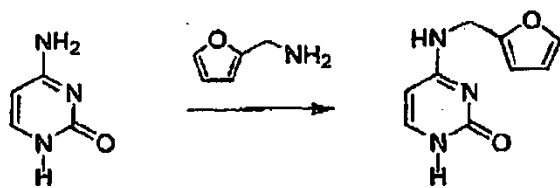


Fig. 1A

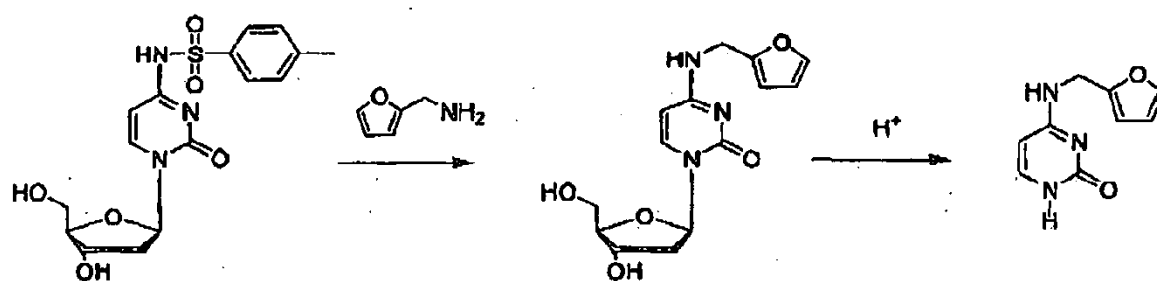


Fig. 1B

Fig. 1

A

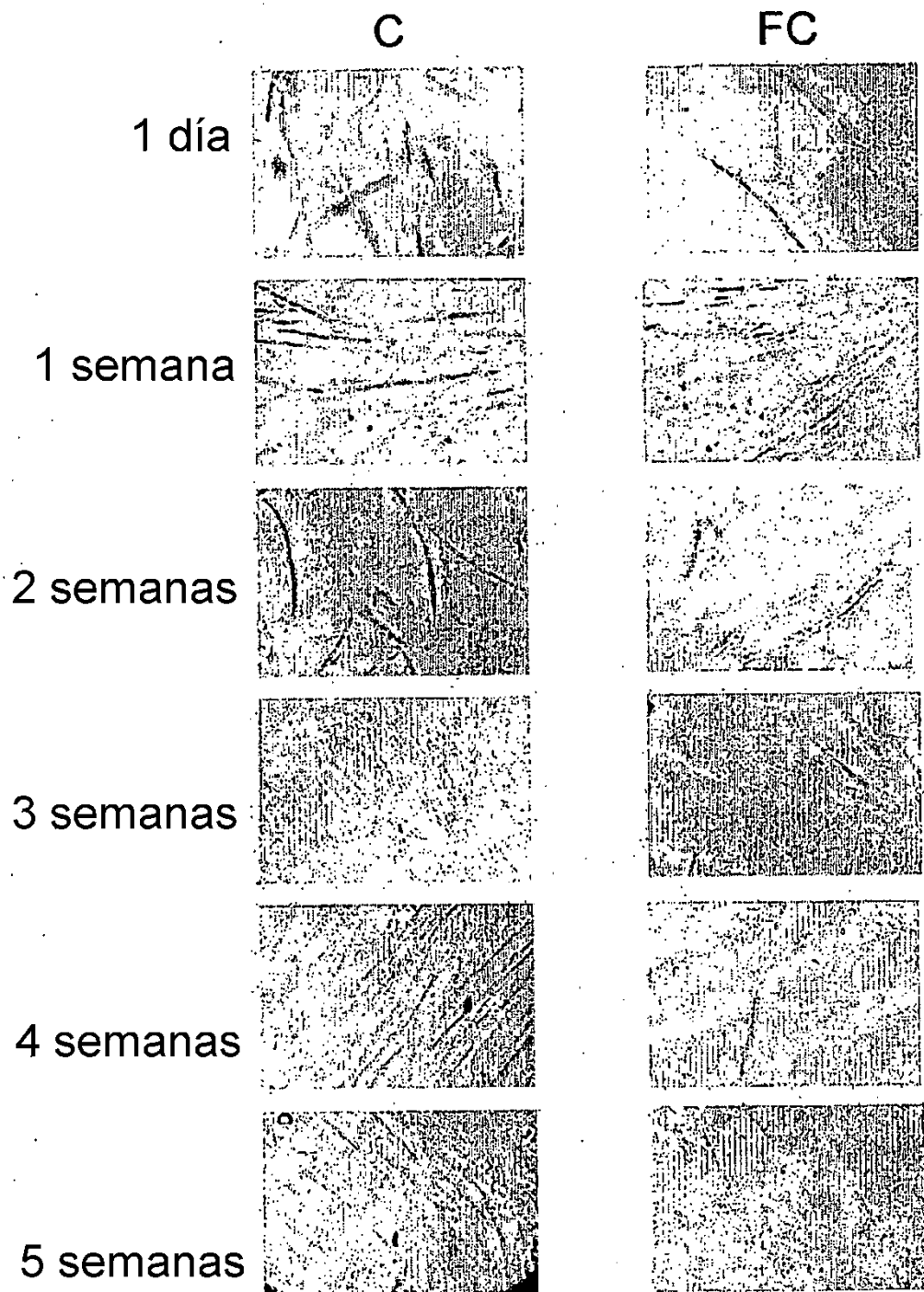
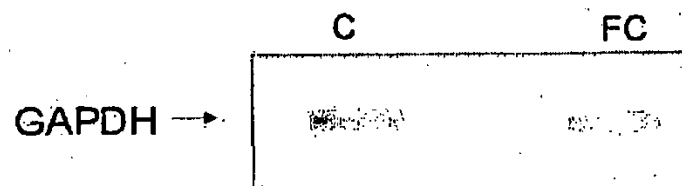


Fig. 2A

B



C

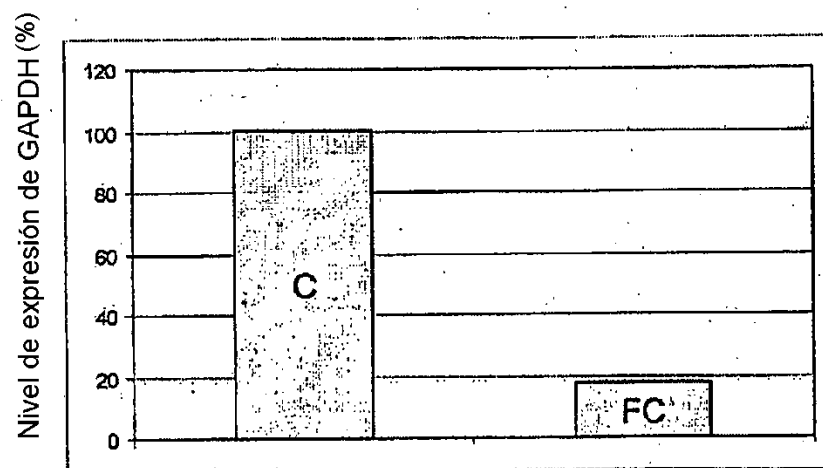
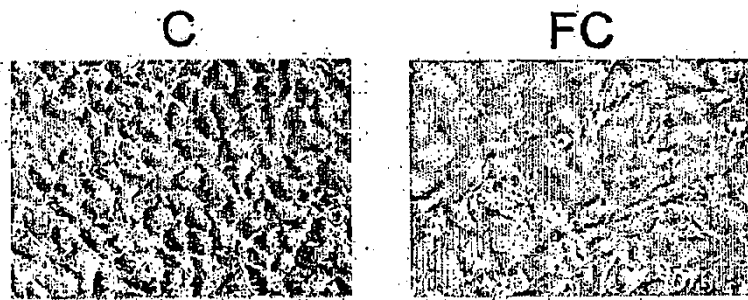


Fig. 2B, 2C

A



B

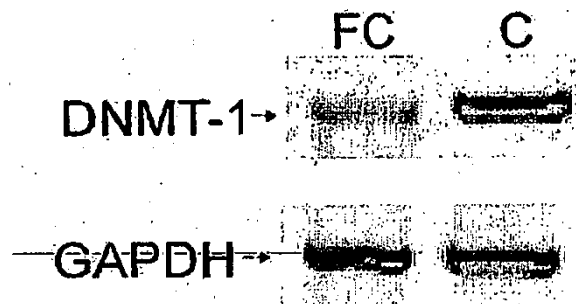
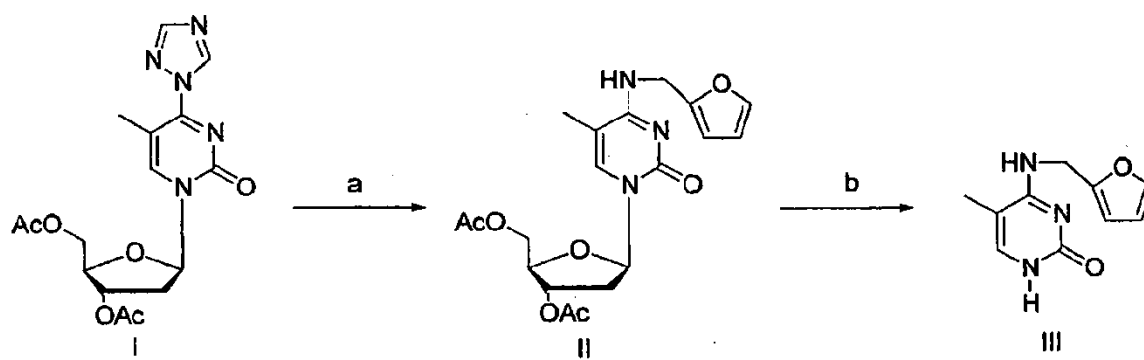


Fig. 3

**Fig. 4**

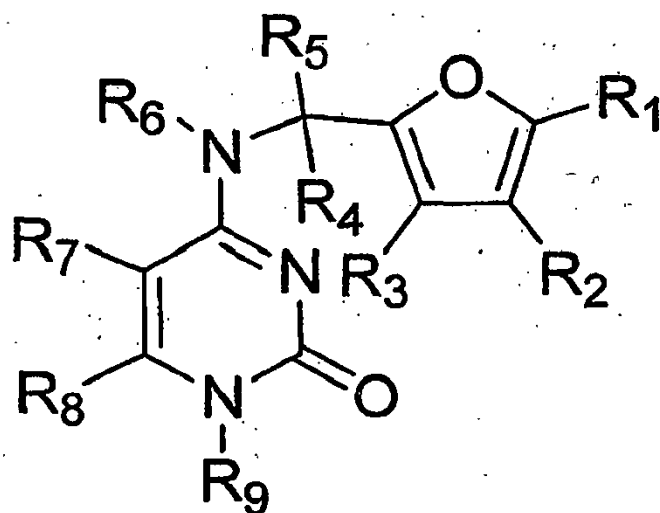


Fig. 5