

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-277  
(22) Přihlášeno: 17.05.2020  
(40) Zveřejněno: 21.07.2021  
(Věstník č. 29/2021)  
(47) Uděleno: 10.06.2021  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 21.07.2021  
(Věstník č. 29/2021)

C07D 473/34 (2006.01)  
A61K 31/52 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 17/00 (2006.01)  
A61P 17/06 (2006.01)  
A61P 17/10 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01)  
A61P 25/04 (2006.01)  
A61P 37/06 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
VOLLER, Jiří, et al. Plant hormone cytokinins for modulating human aging and age-related diseases. In: Hormones in Ageing and Longevity. Springer, Cham, 2017. p. 311-335; ISSN: 2199-9007; BRIZZOLARI, Andrea, et al. Evaluation of the antioxidant activity and capacity of some natural N6-substituted adenine derivatives (cytokinins) by fluorimetric and spectrophotometric assays. Journal of Chromatography B, 2016, 1019: 164-168; E-ISSN: 1873-376X; VOLLER, Jiří, et al. Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study. Phytochemistry, 2010, 71.11-12: 1350-1359; ISSN: 0031-9422; TRÁVNÍČEK, Zdeněk, et al. 6-(4-Hydroxybenzylamino) purin-3-ium chloride: a protonated form of para-topoline. Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online, 2007, 63.9: o3859-o3859; ISSN: 1600-5368.

(73) Majitel patentu:  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,  
Praha 6, Lysolaje, CZ

(72) Původce:  
doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D., Olomouc,  
Nemilany, CZ  
RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D., Šumperk, CZ  
Mgr. Karel Doležal, Dr., DSc., Hlubočky, CZ  
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,  
Neředín, CZ  
Mgr. Jan Walla, Olomouc, Nová Ulice, CZ  
Mgr. Jiří Voller, Ph.D., Brno, Bystřice, CZ

(74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:  
**Mesylátová sůl para-topolinu, přípravky ji obsahující, a její použití**

(57) Anotace:  
Předmět vynálezu se týká mesylátové soli *para*-topolinu a její krystalické formy. Dále se týká použití této látky v kosmetických a léčebných aplikacích, a přípravků obsahujících tuto látku. Mesylátová sůl *para*-topolinu mesylátu má širokou škálu biologických aktivit, včetně antioxidačních, protizánětlivých, anti-senescentních a protistárnoucích, přitom má nízkou toxicitu a výbornou rozpustnost ve vodě.

## Mesylátová sůl *para*-topolinu, přípravky ji obsahující, a její použití

### Oblast techniky

5

Vynález se týká 6-(4-hydroxybenzylamino)purinu (*para*-topolin) mesylátu (methylsulfonátu), jejího použití v kosmetických, léčebných aplikacích i v zemědělství, a přípravků obsahujících tuto sůl.

10

### Dosavadní stav techniky

Cytokininy jsou rostlinné signální látky (fytohormony), které hrají ústřední roli v regulaci buněčného dělení rostlinných buněk a v četných vývojových procesech rostlin. Cytokininy objevili F. Skoog, C. Miller a spolupracovníci v 50. letech 20. století jako faktory, které podporují buněčné dělení (cytokinezi). Prvním objeveným cytokininem byl derivát adeninu s názvem kinetin (6-furfurylaminopurin), který byl izolován jako produkt degradace DNA. První běžný identifikovaný přírodní cytokinin byl izolován z nezralých kukuřičných zrn a pojmenován zeatin (chemický název: 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin). V současnosti je známo několik dalších cytokininů s podobnými heterocyklickými strukturami. Cytokininy mají široké spektrum biologických účinků.

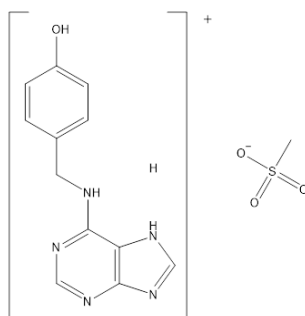
6-(4-Hydroxybenzylamino)purin (*para*-topolin, *pT*) je cytokinin, jehož kosmetické a léčebné vlastnosti jsou známy, např. z US 8552013. Bohužel je však *para*-topolin prakticky nerozpustný ve vodě, ale má vysokou permeabilitu buněčnou membránou. Nízká rozpustnost ve vodě a pomalá rychlost rozpouštění jsou často omezujícími faktory odpovědnými za nízkou biologickou dostupnost farmaceutických/kosmetických sloučenin, což omezuje jejich použití. Přes dlouhodobě známou skutečnost, že *para*-topolin má určité vlastnosti sloučeniny proti stárnutí, nebyly při ošetření kůže vyvinuty žádné úspěšné režimy s použitím *para*-topolinu. Jedním přijatelným vysvětlením je pravděpodobně špatná rozpustnost a špatná biologická dostupnost, jakož i rychlý metabolismus *para*-topolinu ve fázi II v jeho známé formě.

Předkládaný vynález si klade za cíl vyvinout vodorozpustnou formu *para*-topolinu, vhodnou zejména pro kosmetické a léčebné použití.

35

### Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je 6-(4-hydroxybenzylamino)purin (*para*-topolin) mesylát (methylsulfonát). Jedná se o sůl, která jako kationt obsahuje protonovaný 6-(4-hydroxybenzylamino)purin, tedy 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium, a jako aniont obsahuje methylsulfonát, běžně nazývaný mesylát. Látku lze znázornit strukturálním vzorcem I,



45

(I)

V jednom provedení vynálezu se jedná o krystalickou formu *para*-topolin mesylátu. Tato sloučenina krystalizuje v triklinické krystalové soustavě s prostorovou grupou P-1.

5 S výhodou je předmětem vynálezu krystalická forma *para*-topolin mesylátu mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK $\alpha$ : 9,0; 9,2; 17,0; 17,9; 18,1; 22,3; 22,4; 24,1; 26,4  $\pm$  0,2° 2-theta. Výhodněji může mít další charakteristické reflexe: 13,6; 15,6; 16,3; 16,7; 19,8; 25,7; 27,2  $\pm$  0,2° 2-theta.

10 V rámci předkládaného vynálezu bylo na základě zkoumání monokrystalové struktury zjištěno, že krystalická forma mesylátové soli *para*-topolinu má obecný sumární vzorec C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S s protonizovaným purinovým *p*-topolinovým kationtem a mesylátovým aniontem. Centrosymetrické dimery asymetrické jednotky jsou propojeny řadou intermolekulárních vodíkových vazeb, které jsou realizovány hlavně mezi protonizovaným kationtem a mesylátovým aniontem, což ovlivňuje  
15 torzní úhly a spolu s vlastní sítí vodíkových vazeb přispívá k vynikající rozpustnosti sloučeniny ve vodě.

*Para*-topolin mesylát podle předkládaného vynálezu má širokou škálu biologických aktivit, včetně  
20 antioxidačních, protizánětlivých, antisenescentních, protistárnoucích a pro-diferenciačních aktivit, které jsou zvláště užitečné ve farmaceutických a kosmetických aplikacích, například při léčbě kožních chorob nebo při zlepšení stavu pleti. Sloučenina podle předkládaného vynálezu má rovněž minimální nebo nulovou toxicitu.

Konkrétněji je předmětem předkládaného vynálezu je *para*-topolin mesylát pro použití *in vivo* při  
25 ochraně buněk, organel, orgánů nebo celých organismů proti oxidačnímu nebo elektrofilnímu stresu, pro použití při detoxikaci a eliminaci reaktivních oxidantů a elektrofilů, pro použití jako antioxidantu při inhibici peroxidace lipidů, proteinů a DNA u zvířat a rostlin.

Dále je předmětem předkládaného vynálezu konkrétněji *para*-topolin mesylát pro použití *in vitro*  
30 při ochraně buněk, organel nebo orgánů proti oxidačnímu nebo elektrofilnímu stresu, pro použití při detoxikaci a eliminaci reaktivních oxidantů a elektrofilů, pro použití jako antioxidantu při inhibici peroxidace lipidů, proteinů a DNA u buněk, organel nebo orgánů zvířat a rostlin.

Předmětem předkládaného vynálezu je také *para*-topolin mesylát pro použití jako léčivo. Může být  
35 použit k léčbě zvířat (ve veterinární medicíně) i k léčbě lidí (v humánní medicíně).

S výhodou je předmětem vynálezu *para*-topolin mesylát pro použití pro léčbu nebo zlepšení chorob či stavů kůže, jako je akné, erytém a zarudnutí.

40 S výhodou je předmětem vynálezu *para*-topolin mesylát pro použití jako antineurodegenerativní léčivo nebo pro potlačení imunostimulace či zánětu, například při léčení artritidy nebo potlačení rejekce transplantátu nebo poskytnutí úlevy od bolesti.

S výhodou je předmětem vynálezu *para*-topolin mesylát pro použití při prevenci a léčbě chorob  
45 spojených s oxidačním stresem v kůži, zejména chorob vybraných z rakoviny kůže, psoriázy, fibrózních poruch, jako je sklerodermie, onemocnění štěpu proti hostiteli (GVHD), hypertrofických jizev, nefrogenní systémové fibrózy (NSF), alergického ekzému, toxického ekzému, atopické dermatitidy, lichen planus, hyperpigmentace a lézí herpes simplex, ichtyózy, papilomu, Bowenovy choroby, seboroické keratózy, aktinické keratózy, bazálních a skvamózních  
50 buněčných karcinomů.

Předmětem předkládaného vynálezu je také použití *para*-topolin mesylátu jako kosmeticky účinné  
látky. Kosmetické použití této sloučeniny zahrnuje omlazení buněk a tkání, stimulaci buněčné  
55 proliferace a/nebo diferenciaci, inhibici, oddálení nebo snížení nepříznivých účinků stárnutí buněk a tkání, zejména epidermálních buněk, jako jsou keratinocyty nebo fibroblasty. Kosmetická použití

také zahrnují zlepšení celkového vzhledu a stavu savčí kůže, zejména pak lidské kůže. Mohou tak být zlepšovány kosmetické stavy kůže, jako je například akné, erytém, zarudnutí a podobně.

5      Předmětem předkládaného vynálezu je také použití *para*-topolin mesylátu *in vitro* pro omlazení buněk a tkání, stimulaci buněčné proliferace, morfogeneze a/nebo diferenciaci, inhibici buněčného stárnutí a stárnutí tkání, například v kulturách keratinocytů nebo fibroblastů.

10      Inhibice, oddálení nebo snížení nepříznivého účinku stárnutí buněk znamená, že vývoj morfologických změn, které se normálně vyskytují se stárnutím v normálních buňkách *in vitro* nebo *in vivo*, je zpomalen, zvrácen a/nebo zastaven. Mezi nepříznivé účinky stárnutí patří také změny genové exprese a biosyntézy proteinů související s věkem. Ameliorativní účinek je takový, který vykazuje zvýšení rychlosti růstu nebo celkové proliferativní kapacity buněk. Inhibice, oddálení nebo snížení nepříznivých účinků stárnutí na buňky může být detekováno jako zpoždění nebo zvrácení nástupu morfologických a fenotypových změn souvisejících s věkem, které se běžně  
15      vyskytují se stárnutím buněk. Změny související s věkem *in vivo* zahrnují změny v tkáních, jako je vývoj nebo zvýšení počtu nebo hloubky vrásek, linek, ochablá kůže, změna barvy, výskyt stařeckých skvrn, kožovité a/nebo zažloutlé oblasti pokožky, nežádoucí kosmetický vzhled pokožky a související změny strukturální a funkční integrity tkáně.

20      Předkládaný vynález dále poskytuje kosmetické a farmaceutické kompozice obsahující *para*-topolin mesylát a alespoň jeden kosmetický a/nebo farmaceutický přijatelný nosič.

25      *Para*-topolin mesylát nebo přípravky jej obsahující je při léčebném nebo kosmetickém použití aplikován systemicky nebo lokálně. Častým typem aplikace je aplikace topická, ale možná je i aplikace injekční, perorální, nebo jiná vhodná forma aplikace podle uvážení lékaře. Při použití v buněčných nebo tkáňových kulturách se *para*-topolin mesylát nebo přípravky jej obsahující aplikují na ošetřované buňky nebo tkáň.

30      Farmaceutické a kosmetické kompozice

Vhodné cesty pro systémovou aplikaci jsou orální, inhalační, injekční (intravazální, intramuskulární, subkutánní), bukální, sublinguální a nasální. Lokální podání je například možné ve formě krémů, mastí, mlék, roztoků, očních a ušních kapek, ve formě vaginálních přípravků a rektálních čípků. Pro terapii onemocnění skalpu a kůže jsou výhodou lékovou formou roztoky,  
35      krémy a masti.

Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta a místě onemocnění, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

40      Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od  
45      0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

Kosmetické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

50      Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Kosmetické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným  
55      způsobem.

rozpuštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

- 5 Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, 10 brasidovou a linoleovou, případně s přísávkem antioxidantů, např. vitamínu E, beta-karotenu nebo 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a 15 glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyleát, isopropylmyristát, isopropylpalmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylenglyceroltrioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou TCM a složené z 20 glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C8 až C12 od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.
- 25 Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulózové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl 30 karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylenglykol nebo jeho deriváty. Jádra potahovaných tablet mohou být potažena 35 vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylenglykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů 40 odolných vůči žaludeční šťávě, roztoky vhodných celulózových preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Další formy podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo 45 podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalně koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafinový olej nebo 50 tvrdé parafíny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. 55 smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylenglykol, sorbitol a/nebo polyethylenglykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafín, vazelínu nebo parafínový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejně, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo stearylalkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropylmyristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafínový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetylstearylalkoholu nebo stearylalkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylenglykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N<sub>2</sub>O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-ethanolicou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylenglykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylenglykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže ethanolem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě kosmetických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického nebo kosmetického přípravku.

#### Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje porovnání XRPD práškových difraktogramů krystalické soli *para*-topolin mesylátu (*p*-topolin mes) a *para*-topolinu (*p*-topolin base).

Obr. 2 znázorňuje výsledky stability krystalické soli *para*-topolin mesylátu formou XRPD práškového difraktogramu změřeného po 30 dnech uložení látky při teplotě 25 °C – nebyly zaznamenány žádné strukturní změny.

Obr. 3 znázorňuje molekulární strukturu centrosymetrického dimeru krystalické soli *para*-topolin mesylátu včetně sítě intermolekulárních vodíkových vazeb

5 Obr. 4 znázorňuje krystalovou strukturu (crystal packing) krystalické soli *para*-topolin mesylátu včetně sítě intermolekulárních vodíkových vazeb.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

10 Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu bez omezení jeho rozsahu. Pokud není zmíněno jinak, všechna procentuální množství jsou založena na hmotnosti sloučenin.

#### Příklad 1: Příprava krystalického *para*-topolin mesylátu (methansulfonátu)

15 *p*-Topolin, volná báze (241 mg; 1 mmol) byl rozptýlen v metanolu (10 ml), míchán při teplotě místnosti a byla přidána methansulfonová kyselina (100 mg; 1,03 mmol). Po krátké době se suspence změnila v homogenní průsvitně žlutý roztok. Výsledná směs byla ponechána míchat při teplotě místnosti po dobu 10 minut a pak byla odpařena na rotační vakuové odparce za vzniku žlutého pevného residua, které bylo promyto acetonem (10 ml) a byl získán nažloutlý krystalický  
20 prášek. Produkt byl zfiltrován, promyt acetonem (3x 5 ml) a vysušen při 60 °C do konstantní hmotnosti.

Výtěžek: 300 mg (88 %); čistota (HPLC-UV/VIS): 99 %+; ESI-MS:  $[M + H]^+ = 242,2$

25 Nažloutlé průsvitné krystaly byly připraveny rozpuštěním získané pevné látky v methanolu a ponecháním k volné krystalizaci odpařením rozpouštědla po 7 dní.

#### Příklad 2: Stanovení teploty tání krystalického *para*-topolin mesylátu a porovnání s *para*-topolinem

30 Teplota tání krystalické soli *para*-topolin mesylátu byla stanovena na přístroji Büchi Melting point B-540 apparatus a porovnána s *para*-topolinem volnou bází. Zatímco interval teploty tání krystalické soli *para*-topolin mesylátu byl stanoven 186 až 188 °C, interval teploty tání výchozí volné báze *para*-topolinu byl určen mezi 281 a 283 °C. To znamená, že interval teplot tání těchto  
35 dvou látek se zásadně liší, rozdíl činí cca 95 °C. Oba materiály použité k měření byly krystalické pevné látky.

#### Příklad 3: XRPD prášková rtg difrakce krystalického *para*-topolin mesylátu

40 Prášková rentgenová difrakční studie byla provedena na difraktometru Bruker D8 Advance ECO s Cu K-alfa zářením a SSD160 detektorem. Přibližně 5 mg vzorku bylo jemně vmáčknuto do XRPD držáku vzorku přístroje. Vzorek byl následně vložen do přístroje v transmisním módu a analyzován za použití tabelovaných experimentálních podmínek viz níže.

45 XRPD podmínky měření

	Osa scanu gonio	
	výchozí pozice [°2th.]	4,0000
	konečná pozice [°2th.]	40,00
50	Step size [°2th.]	0,0100
	doba scanu [s]	0,3 (48) s
	typ scanu	kontinuální
	Offset [°2th.]	0,0000
	typ divergenční štěrbin	fixní
55	velikost divergenční štěrbin [°]	0,3000

	délka vzorku [mm]	10,00
	teplota měření [° c.]	25,00
	materiál anody	Cu
	K-alpha1 [Å]	1,54060
5	K-alpha2 [Å]	1,54443
	K-beta [Å]	1,39225
	K-a2/k-a1 poměr	0,50000
	nastavení generátoru	40 ma, 25 kv
	goniometrický poloměr [mm]	250,00
10	Dist. Focus-diverg. Slit [mm]	110,00
	Ni Kbeta filtr	ano
	monochromátor dopadajícího paprsku	ne
	Spinning	ne

- 15 Práškový XRPD difraktogram krystalické soli *para*-topolin mesylátu a práškový XRPD difraktogram *para*-topolinu byly získány za podmínek popsanych výše. Na obrázku 1 je srovnání difraktogramů krystalické soli *para*-topolin mesylátu a *para*-topolinu formou překryvu. Z překrytí je patrné, že se difraktogramy výrazně liší. To dokladuje také tabulka 1 pro krystalickou sůl *para*-topolinu mesylátu a tabulka 2 pro *para*-topolin. V obou tabulkách jsou uvedeny relativní intenzita záření, d-spacing (mezirovinná vzdálenost) a odpovídající úhly  $2\theta$ .
- 20

Tabulka 1: Měřené XRPD úhly, d-spacing a intenzita záření pro krystalickou sůl *para*-topolin mesylát

úhel ( $2\theta$ )	d-spacing	Rel. Intenzita
9,049	9,76473	34,00 %
9,146	9,66095	61,00 %
10,924	8,09291	3,90 %
11,189	7,90175	7,10 %
12,047	7,3409	15,60 %
12,67	6,98133	1,40 %
13,569	6,52029	28,00 %
13,858	6,38532	8,10 %
14,188	6,23735	7,10 %
14,538	6,08798	7,20 %
15,629	5,66533	28,00 %
16,329	5,42417	24,40 %
16,572	5,34504	13,00 %
16,698	5,30489	21,20 %
17,021	5,2052	51,50 %
17,318	5,11653	4,30 %
17,424	5,08561	3,00 %
17,904	4,95037	59,40 %
18,11	4,89436	39,90 %
18,361	4,82823	19,00 %
18,706	4,73993	10,80 %
19,583	4,52944	10,70 %
19,779	4,485	26,50 %
20,201	4,39237	0,90 %
21,518	4,12628	17,40 %
21,698	4,09245	15,40 %



21,87	4,0608	18,10 %
22,262	3,99002	37,00 %
22,409	3,96422	100,00 %
23,21	3,82922	13,70 %
24,06	3,69581	32,80 %
24,112	3,688	27,60 %
24,227	3,6707	32,60 %
24,881	3,57573	5,30 %
25,712	3,46203	30,60 %
25,973	3,42784	11,10 %
26,391	3,37442	34,80 %
26,56	3,35339	7,70 %
27,19	3,27711	20,10 %
27,045	3,29436	7,40 %
27,311	3,26288	12,60 %
27,686	3,21953	11,30 %
27,832	3,20289	16,50 %
28,04	3,17958	18,50 %
28,433	3,13661	6,70 %
28,851	3,09205	11,20 %
29,104	3,06582	5,00 %
30,593	2,91981	15,00 %
31,017	2,88087	1,30 %
31,292	2,85623	4,80 %
31,543	2,83409	2,60 %
32,06	2,78953	0,50 %
32,441	2,75766	0,90 %
32,861	2,72331	1,80 %
33,261	2,69152	0,70 %
34,146	2,62369	1,70 %
34,639	2,58749	1,30 %
35,023	2,55998	4,50 %
35,773	2,50803	1,00 %
36,182	2,48062	1,10 %
36,692	2,44732	4,20 %
37,299	2,40884	3,90 %
37,802	2,37797	1,00 %
38,391	2,34284	1,50 %
38,897	2,31351	0,70 %
39,514	2,27878	1,80 %

Tabulka 2: Měřené XRPD úhly, d-spacing a intenzita záření pro *para*-topolin

úhel (°2 $\theta$ )	d spacing	Rel. Intenzita
6,749	13,08594	55,80 %
8,858	9,97457	1,00 %
10,631	8,31467	1,00 %
11,76	7,51896	3,00 %

13,148	6,72814	43,30 %
13,567	6,52143	3,30 %
13,954	6,34164	5,70 %
14,361	6,16281	6,00 %
15,199	5,82456	2,10 %
15,533	5,70029	20,60 %
15,887	5,57406	18,60 %
16,476	5,37596	2,90 %
16,821	5,2665	7,10 %
17,307	5,11956	14,40 %
17,723	5,00039	38,20 %
17,852	4,9646	42,30 %
18,907	4,68984	30,40 %
19,531	4,54138	41,10 %
20,014	4,43284	1,60 %
20,442	4,34101	64,70 %
21,171	4,19322	3,50 %
21,424	4,14415	8,80 %
22,074	4,02358	12,10 %
22,516	3,94557	8,20 %
22,929	3,87556	5,80 %
23,509	3,78124	1,30 %
23,766	3,74081	36,20 %
24,201	3,67456	25,70 %
24,397	3,64555	100,00 %
24,86	3,57867	13,70 %
25,106	3,54423	11,00 %
25,271	3,52137	3,30 %
26,371	3,37702	60,60 %
26,902	3,31153	0,60 %
27,388	3,2538	8,20 %
27,824	3,20383	4,30 %
28,407	3,13936	12,80 %
28,607	3,11784	6,90 %
29,19	3,05695	39,80 %
29,708	3,00484	3,00 %
30,035	2,97278	3,20 %
30,88	2,89333	7,50 %
31,412	2,84558	3,30 %
31,918	2,8016	4,50 %
32,143	2,78253	11,80 %
32,396	2,76136	1,60 %
33,1	2,7042	2,20 %
34,177	2,62143	4,20 %
35,093	2,55506	2,20 %
35,474	2,52849	4,90 %
36,368	2,46834	0,60 %
36,889	2,43471	3,20 %
37,273	2,41045	1,90 %

38,063	2,36222	0,70 %
38,42	2,34111	0,70 %
39,532	2,2778	0,50 %
39,686	2,26928	0,60 %

Příklad 4:  $^1\text{H}$  nukleární magnetická rezonance (NMR) *para*-topolin mesylátu a porovnání se spektrem *para*-topolinu

5  $^1\text{H}$  NMR byla měřena na přístroji JEOL 500 SS při teplotě 300 K a frekvenci 500.13 MHz. Vzorky byly připravovány rozpuštěním sloučenin DMSO- $d_6$ . Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako interní standard. Kalibrace chemického posunu je vztažena ke zbytkovému píku rozpouštědla v  $^1\text{H}$  DMSO- $d_6$ , a to 2,50 ppm. Každý vzorek byl připraven v ca. 5mg koncentraci. Chemické posuny identifikované ve spektru 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylátu (*para*-topolin mesylátu) odpovídají popisované chemické sloučenině a jsou následující:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,48 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,22 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 6,75 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 4,70 (d,  $J = 4,6$  Hz, 2H), 2,34 (s, 3H), chemické posuny identifikované ve spektru 6-(4-hydroxybenzylamino)purin (*para*-topolinu) jsou následující:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,89 (s, 1H), 9,23 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,09 (s, 2H), 7,15 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 6,66 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 4,57 (s, 2H). Při porovnání obou spekter jsou patrné signifikantní rozdíly, zejména u těch chemických posunů, které jsou v sousedství protonizovaných vodíků v 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium kationtu v porovnání s 6-(4-hydroxybenzylamino)purinem (*para*-topolinem bázi).

20 Příklad 5: Rozpustnost *para*-topolinu mesylátu ve vodě

Rozpustnost látky ve vodě byla stanovována podle následujícího protokolu. Byl připraven supernasycený roztok krystalické soli *para*-topolin mesylátu ve vodě. Byl zfiltrován od viditelně nerozpuštěných částic a byl obdržen nasycený roztok *para*-topolin mesylátu ve vodě. Nasycený roztok byl zředěn 1:10 000 a změřen na přístroji HPLC Alliance Waters 2690 s chromatografickou kolonou o průměru 2,1 mm a délce 150 mm se sorbentem C18 Symmetry o porozitě 5  $\mu\text{m}$ . Vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi (MeOH:  $\text{HCOONH}_4$  - 1: 9). Vzorek byl eluován v metanolovém gradientu (10 až 90 %, po dobu 35 min) při pH 4 a průtokové rychlosti 0,3 ml/min. Absorbance sloučenin byla detekována v UV oblasti záření 210 až 400 nm. Plocha píku byla stanovena 2 729 231 a porovnána s plochami píku u dříve změřených konkrétních koncentrací krystalické soli *para*-topolin mesylátu ve vodě viz tabulka 3 níže.

Získaná plocha píku byla porovnána s plochami píku u určitých konkrétních koncentrací látky ve vodě a tak byla určena výsledná koncentrace nasyceného roztoku *para*-topolin mesylátu.

35 Tabulka 3.: Změřené plochy píku pro konkrétní koncentrace krystalické soli *para*-topolin mesylátu ve vodě

c ( $\mu\text{M}$ )	plocha píku
50	1 101 534
100	2 091 000
250	5 578 605

40 To znamená, že koncentrace krystalické soli *para*-topolin mesylátu ve vodě je přibližně 1,208 M, tj. 407 mg/ml, což je o několik řádů vyšší rozpustnost než u *para*-topolinu báze. U *para*-topolinu báze byla popsána rozpustnost ve vodě < 0,04 mg/ml.

45 Příklad 6: Rozpustnost *para*-topolin mesylátu a *para*-topolinu v různých organických rozpouštědlech

Rozpustnost v různých organických rozpouštědlech byla měřena za použití následujícího protokolu. Přibližně 10mg vzorek *para*-topolinu a *para*-topolin mesylátu byl umístěn do vialek. Pět objemových alikvot každého rozpouštědla bylo přidáno do jednotlivých vialek. Před každým následujícím přidáním byla směs ověřena na rozpustnost, a pokud nebyl vzorek rozpuštěn, bylo pokračováno s přidavkem dalšího alikvotu rozpouštědla. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4.: Rozpustnost *p*-topolinu a *p*-topolin mesylátu v různých organických rozpouštědlech

rozpouštědlo	<i>p</i> -topolin	<i>p</i> -topolin mesylát
methanol	0,25 mg/ml	5 mg/ml
ethanol	0,25 mg/ml	0,4 mg/ml
DMF	5 mg/ml	14 mg/ml
DMSO	6,66 mg/ml	10 mg/ml
acetone	0,2 mg/ml	0,33 mg/ml
Heptan	<0,1 mg/ml	<0,1 mg/ml
acetonitril	<0,25 mg/ml	<0,25 mg/ml

10

Příklad 7: Stabilitní studie krystalického *para*-topolin mesylátu pomocí práškové rtg difrakce

Stabilita vzorku byla testována při uložení látky při 25 °C. Nebyla pozorována žádná změna struktury ani barvy po 30 dnech uložení pevné látky *para*-topolin mesylátu. Po těchto 30 dnech byl změřen práškový difraktogram a nebyla zaznamenána žádná změna struktury (změna difraktogramu). Obrázek 2 ukazuje porovnání originálního XRPD práškového difraktogramu látky a přeměření tohoto difraktogramu po 30 dnech při 25 °C. Nebyly detekovány žádné změny tohoto difraktogramu.

20

Příklad 8: Disproporcionační studie krystalického *para*-topolin mesylátu

50mg vzorek krystalického *para*-topolin mesylátu byl rozpuštěn v 1 ml destilované vody, ponechán 48 h v roztoku a pak zkrystalován a byl změřen XRPD difraktogram, aby byly zjištěny případné disproporcionační změny. Z difraktogramu nebyla žádná disproporcionace pozorována, látka svou strukturu nezměnila.

25

Příklad 9: Monokrystalová rentgenostrukturní analýza krystalického *para*-topolin mesylátu a popis jeho molekulové a krystalové struktury

30 Příprava monokrystalů: Krystaly pro monokrystalovou rtg analýzu byly vypěstovány z roztoků *para*-topolin mesylátu (asi 100 mg) v methanolu (30 cm<sup>3</sup>). Roztok byl ponechán k volnému odpařování rozpouštědla po dobu 7 dnů a po této době vznikly průsvitné krystaly, ze kterých byly vybrány vhodné zástupci pro rtg monokrystalovou analýzu.

35 Monokrystalová rtg difrakce: Pro analýzu byly vybrány podlouhlé průsvitné krystalky. Difrakční data byla měřena za použití čtyřkruhového mikrofokálního difraktometru Supernova s Cu/K $\alpha$  zářením kolimovaným pomocí tenkovrstvých zrcadel, s použitím uzavřené mikro-fokusované rtg trubice, který je vybaven CCD detektorem Atlas S2, pracujícím při teplotě 105 K.

40 Při analýze krystalové struktury bylo zjištěno, že *para*-topolin mesylát je centrosymetrický dimer spojený níže diskutovanými vodíkovými vazbami. Krystalová soustava byla určena jako triklinická s prostorovou grupou P-1 s následujícími parametry základní buňky: a=7,5356 Å, b=10,5681 Å, c=19,7793 Å,  $\alpha$ =101,1060°,  $\beta$ =95,940°,  $\gamma$ =105,3230°, a objemem základní buňky V=1470,75 Å<sup>3</sup>. Strukturní model byl nalezen za použití software Superflip nebo SHELXT a vypočten metodou nejmenších čtverců softwarem JANA2006. Sběr dat, redukce a absorpční korekce pro danou

45

sloučeninu byly uskutečněny s použitím software CrysAlisPro (Rigaku, Oxford Diffraction, 2018, CrysAlis version 1.171.40.35a). Asymetrická jednotka zkoumané sloučeniny je složena z 6-(4-hydroxybenzylamino)purinového kationtu (*para*-topolinový kationt) a mesylátového (methylsulfonátového) aniontu. Kationt je protonizován na jednom z dusíkových atomů a sloučenina krystalizuje v triklinické krystalové soustavě s prostorovou grupou P-1. Některé vodíkové atomy napojené na kyslíky byly lokalizovány v diferenční mapě. Síť intermolekulárních vodíkových vazeb mezi N...H atomy v purinu a kyslíkovými atomy mesylátu spojují vždy dvě molekuly sloučeniny v centrosymetrické dimery. Tyto vodíkové vazby stabilizují celý systém a konkrétně propojují N6...H6a atom purinové struktury s O1a atomem mesylátu, dále N7a...H7a purinu s O2a atomem mesylátu, O4b...H104b hydroxyly připojeného na benzenový kruh *para*-topolinu s O1a kyslíkem mesylátu a vice versa O4b...H4b vodíkový atom *para*-topolinu s O1b kyslíkovým atomem mesylátu viz obrázek 3. Mimo tyto interakce je purinový kationt spojen dvěma vodíkovými vazbami mezi N3a...H3a vodíkem a N9a dusíkem dalšího *para*-topolinového kationtu v krystalové struktuře, která je uvedena na obrázku 4. Výsledný “konvenční” R-faktor (založený na F a 6049 reflexích s  $[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ ) byl 0,0271.

Monokrystalová struktura krystalické soli *para*-topolin mesylátu odhalila, že se jedná o sloučeninu obecného sumárního vzorce  $C_{13}H_{15}N_5O_4S$  s *p*-topolinovým kationtem kompenzovaným mesylátovým aniontem. Centrosymetrické dimery asymetrické jednotky jsou spolu propojené sítí intermolekulárních vodíkových vazeb, které jsou zejména realizovány mezi kationtem a aniontem, což přispívá k výborné rozpustnosti dané látky ve vodě oproti jeho volné bázi *para*-topolinu nebo jiným popsaným solím, například *para*-topolin hydrochloridu. Jsou výrazně ovlivněny tzv. torzní úhly v molekule. Tyto úhly mají často dopad na fyzikální vlastnosti a rozpustnost zkoumaných molekul a jsou silně ovlivněny právě formací husté sítě intermolekulárních vodíkových vazeb.

#### Příklad 10: Schopnost vychytávat volné radikály metodou ORAC

Schopnost látek vychytávat volné radikály *in vitro* byla stanovena pomocí metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Ve stručnosti, 100  $\mu$ l fluoresceinu (500 mM) a 25  $\mu$ l roztoku zkoumané látky byly napipetovány do každé jamky 96jamkové mikrotitrační desky předehřáté na 37 °C. Samotná reakce byla spuštěna přidávkem 25  $\mu$ l 250mM AAPH. Po 5s třepání byla odečítána fluorescence (Ex. 485 nm, Em. 510 nm) každé 3 min po dobu 90 min pomocí přístroje Infinite 200 (TECAN, Švýcarsko). Plocha pod křivkou byla použita k vyjádření antioxidační kapacity relativní vůči troloxu, který je používán jako standard. Látky s ORAC aktivitou vyšší než 1 jsou efektivnější než trolox, který je hydrofilním ekvivalentem vitamínu E. Trolox, ve vodě rozpustný analog vitamínu E, je známý svou antioxidační aktivitou, u které se také ukázalo, že je odpovědná za jeho ochrannou aktivitu v lidských buňkách. Test ORAC, který se obecně používá pro stanovení antioxidační aktivity, ukázal, že několik cytokininů, jako je *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*) a *para*-topolin (*pT*), bylo spojeno s vysokou celkovou antioxidační aktivitou vyjádřenou v ekvivalentech Trolox (TE). Takové aktivity jsou pravděpodobně úzce spojeny s elektronově bohatým systémem C6-hydroxybenzylamino substituentu. Ukázalo se, že mesylátová sůl *para*-topolinu je nejúčinnější látkou.

Tabulka 5. Údaje o kyslíkové radikálové absorpční kapacitě (ORAC) vyjádřené v ekvivalentech Troloxu (TE) na ekvimolárním základě.

	Průměr (TE)	SD (n=3)
6-(3-hydroxybenzylamino)purin ( <i>mT</i> )	4,509	0,687
6-(2-hydroxybenzylamino)purin ( <i>oT</i> )	7,026	1,179
6-(4-hydroxybenzylamino)purin ( <i>pT</i> )	16,799	0,829
6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylát ( <i>pT</i> mesylát)	21,436	1,306

Příklad 11: Protizánětlivá aktivita *para*-topolinu a jeho mesylátu

Byla stanovena protizánětlivá aktivita *para*-topolinu a *para*-topolin mesylátu podle tohoto vynálezu; cytokinin kinetin byl také hodnocen jako kontrola. Krysí gliomové C6 buňky (ATCC č. CCL107) byly kultivovány v monovrstvě v chemicky definovaném besérovém médiu obsahujícím Ham's F10/minimální esenciální médium (1:1 obj./obj.), 2 mM L-glutaminu, 1% (obj./obj.). Minimální vitamíny esenciálního média (100x), 1% (obj./obj.) minimální esenciální aminokyseliny neesenciální (100x), 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu a 30 nM seleničitanu sodného. Inkubace byla prováděna při 37 °C ve 100% zvlhčené atmosféře. Testy byly prováděny v logaritmické růstové fázi při hustotě  $2,5 \times 10^5$  buněk/cm<sup>2</sup>. Intracelulární syntéza cAMP byla indukována přidáním 5mM (-)-isoproterenolu; současně byly přidány různé koncentrace testovaných sloučenin ve stejné době jako (-)-isoproterenol. Po 30 minutách inkubace bylo buněčné množství cAMP stanoveno pomocí ELISA testu (cAMP-enzymová imunoanalýza od Amersham). Hodnoty IC<sub>50</sub> byly stanoveny z křivky závislosti odpovědi na dávce ve dvojím provedení. Byly získány následující výsledky:

	Protizánětlivá aktivita
	IC <sub>50</sub> (μM)
kinetin (6-furfurylaminopurin)	0
6-(4-hydroxybenzylamino)purin ( <i>para</i> -topolin, pT)	7
6-(4-hydroxybenzylamino)purin mesylát ( <i>para</i> -topolin mesylát, pTmes)	13

*Para*-topolin a *para*-topolin mesylát vykazaly protizánětlivou aktivitu, přičemž sůl byla téměř dvakrát účinnější než výchozí volná báze. Kinetin byl v testovacím protokolu neaktivní a byl použit jako cytokininová kontrola.

## Příklad 12: Účinek nové sloučeniny na senescentní lidské diploidní fibroblasty

Senescentní lidské diploidní fibroblasty (buňky různých úrovní pasáže: pasáž 20 - P20; pasáž 40 - označená P40; pasáž 80 - označená P80) byly naočkovány do 24-jamkové destičky (10 000 buněk/jamku). Kultivační médium (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 μg/ml streptomycinu a 10% fetální telecí sérum) bylo odstraněno a nahrazeno kultivačním médiem obsahujícím testovanou sloučeninu v koncentračním rozmezí 0 až 12,5 μM. Každá koncentrace byla testována trojmo. Buňky byly následně inkubovány při 37 °C (bez CO<sub>2</sub>) po dobu 16 hodin ve 2 až 3 ml roztoku obsahujícího ferrikyanid draselný (5 mM), feroxyanid draselný (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), X-gal (5-brom)-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (1 mg/ml), v citrát/fosfátovém pufru, pH 6,0) Po této inkubační době byly vzorky buněk pozorovány, aby se zjistila přítomnost modrých buněk, což naznačuje, že X-gal byl rozštěpen (pozitivně senescentní buňky). V tomto experimentu byly senescentní buňky, ale ne jiné buňky, obarveny modře v důsledku působení β-galaktózidázy na substrát. Jak je ukázáno v tab. 6, se zvyšujícím se počtem pasáží zbarvení ztmavlo. U nejstarších buněk existovaly pouze modré buňky od jasné modré až po téměř neprůhlednou barvu. Oba *para*-topoliny (báze i mesylátová sůl) byly účinné při udržení mnohem nižší hladiny senescentních buněk po 80 pasážích. V případě dlouhodobé kultivace byly ošetřené buňky schopny žít o 30 % déle než kontrolní buňky.

Tabulka 6. Účinek nové sloučeniny na počet senescentních buněk v kultuře lidských fibroblastů

Sloučenina	Senescentní buňky (%)		
	P20	P40	P80
pasáže buněk			
KONTROLA	3	14	38
6-(4-hydroxybenzylamino)purin ( <i>para</i> -topolin)	4	14	25
6-(4-hydroxybenzylamino)purin mesylát ( <i>para</i> -topolin mesylát)	3	12	21

Příklad 13: *In vitro* cytotoxická aktivita (metabolizace kalceinu AM).

5

Protože toxické sloučeniny negativně ovlivňují metabolické procesy buněk, je mnoho standardních testů cytotoxicity založeno na měření rychlosti metabolizace různých umělých substrátů. Výsledný produkt je pak kvantifikován například pomocí spektrometrie. Testy lze snadno modifikovat pro použití v 96-jamkových destičkách. Pro vyhodnocení cytotoxicity *para*-topolinu a jeho soli podle vynálezu byl použit mikrotitrační test založený na kvantifikaci metabolizace Calceinu AM. Test je široce používán v programech screeningu léků a při testování chemosenzitivity. V živých buňkách je Calcein AM enzymaticky hydrolyzován a kumulace výsledného kalceinu se projevuje zelenou fluorescencí.

10

Následující buněčné linie - RPMI 8226 (mnohočetný myelom), CEM (T-lymfoblastická leukémie), K562 (chronická myeloidní leukémie), HL-60 (promyelocytární leukémie), MCF-7 (adenokarcinom prsu), HeLa (karcinom děložního čípku), G361 (maligní melanom), HOS (lidský osteosarkom) a BJ (lidské předkožkové fibroblasty) - byly získány ze sbírky American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Tyto buňky byly udržovány ve standardním médiu DMEM nebo RPMI (Sigma, MO, USA) doplněném tepelně inaktivovaným fetálním hovězím sérem (10 %) 2 mM L-glutaminem a penicilin-streptomycinem (1 %) za standardních podmínek buněčné kultury (37 °C) C, 5 % CO<sub>2</sub> ve vlhkém prostředí a subkultivovány dvakrát nebo třikrát týdně pomocí standardního trypsinizačního postupu.

20

Přibližně 10 000 buněk v 80 µl média bylo naočkováno do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Po 12 hodinách inkubace byly sloučeniny, které se měly testovat, přidány ve 20 µl podílech. Kontrolní kultury byly ošetřeny samotným DMSO. Konečná koncentrace DMSO v médiu nepřesáhla 0,5 %. Byla testována sériová, trojnásobná ředění (celkem šest, nejvyšší koncentrace v inkubacích 166 µM) každé sloučeniny. Po 72 hodinách inkubace byl přidán roztok Calcein AM (Molecular Probes) do konečné koncentrace 1 µg/ml a buňky byly inkubovány další hodinu. Fluorescence volného kalceinu byla poté kvantifikována s použitím fluorometru Fluoroscan Ascent (Microsystems) a procento přežívajících buněk v každé jamce bylo vypočteno dělením OD získané z každé buňky exponovanými buňkami střední OD získanou z kontrolních jamek × 100 %. Nakonec byly vypočteny hodnoty IC<sub>50</sub> (koncentrace způsobující 50 % pokles aktivity buněčné esterázy) pro každou sloučeninu generovaných z křivek závislosti odpovědi na dávce (Kryštof et al., 2005, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12, 3283-3286). Zde uvedené hodnoty IC<sub>50</sub> jsou průměry získané z alespoň tří nezávislých experimentů, kde jednotlivé hodnoty replikace spadaly do 20% průměru. Inhibice růstu byla vypočtena pomocí následující rovnice:  $IC_{50} = (\text{průměr } FD_{\text{jamka exponovaná k léčivu}} - \text{průměr } FD_{\text{blank}}) / (\text{průměr } FD_{\text{kontrolní jamky}} - \text{průměr } FD_{\text{blank}}) \times 100\%$ . Hodnota IC<sub>50</sub>, koncentrace léčiva způsobující 50% snížení konverze Calceinu AM, byla vypočtena z získaných křivek závislosti odpovědi na dávce.

30

35

40

Cytotoxicita sloučenin byla testována na panelu buněčných linií různého histogenetického a druhového původu. Jak je uvedeno v tab. 7, IC<sub>50</sub> *para*-topolinových derivátů překročila obvykle maximální testovanou koncentraci, což znamená, že sloučeniny by mohly být aplikovány v koncentracích vyvolávajících požadovaný účinek bez negativních vedlejších účinků. *Para*-topolin mesylát nebyl vůbec cytotoxický, kdežto *para*-topolin byl toxický pro buňky chronické myeloidní leukémie K562.

45

Tabulka 7. Cytotoxická aktivita *para*-topolinů vyjádřená jako hodnoty IC<sub>50</sub> ve 3-denním testu Calcein-AM. Prezentované hodnoty jsou průměry alespoň 3 nezávislých experimentů, kde jednotlivé replikáty spadají do intervalu 20 % kolem průměru.

5

	CEM	HL60	K562	RPMI 8226	HOS	MCF7	G361	HELA
<i>para</i> -topolin	>167	>167	140	>167	>167	>167	>167	>167
<i>para</i> -topolin mesylát	>167	>167	>167	>167	>167	>167	>167	>167

Příklad 14: Cytotoxická aktivita *in vitro* na normálních fibroblastech (metabolizace MTT)

Test MTT (metabolická tetrazoliová toxicita) je standardní kolorimetrický test pro hodnocení cytotoxicity. Mitochondriální dehydrogenázová aktivita převádí žlutou MTT na fialový formazan, který se měří pomocí spektrometrie. Lidské diploidní fibroblasty BJ (pasáž 18 až 22) byly naočkovány na 96-jamkovou destičku (5 000 buněk na jamku). Po 6 hodinách, kultivační médium (DMEM s 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanu sodného) bylo nahrazeno kultivačním médiem obsahujícím testované sloučeniny v koncentračním rozmezí 0 až 200 μM. Nejvyšší koncentrace byla upravena, pokud rozpustnost sloučeniny byla omezující. Každá koncentrace byla testována pentaplikátem. MTT byl přidán k buňkám po 72 hodinách inkubace (konečná koncentrace 0,5 mg/ml) a inkubace pokračovala další 3 hodiny. MTT byl solubilizován pomocí DMSO a byla měřena absorbance při 570 nm. Inhibice růstu (GI) byla vypočtena pomocí následující rovnice: GI = (průměr jamek ošetřených léčivem - průměr jamek A<sub>blank</sub> / průměr A<sub>kontrolních jamek</sub> - průměr A<sub>blank</sub>) x 100 %. Hodnota GI<sub>20</sub>, koncentrace léčiva způsobující 20% pokles aktivity mitochondriální dehydrogenázy, byla vypočtena ze získaných křivek závislosti odpovědi na dávce. Jak je uvedeno v tab. 8, GI<sub>20</sub> *para*-topolinů překročilo většinou maximální testovanou koncentraci, což naznačuje, že sloučeniny by mohly být aplikovány v koncentracích vyvolávajících požadovaný účinek bez negativních vedlejších účinků. Na druhé straně mnoho dalších přírodních isoprenoidních cytokininových bází a ribosidů vykazovalo vysokou cytotoxicitu

10

15

20

25

Tabulka 8. Cytotoxicita pro lidské diploidní fibroblasty (GI<sub>20</sub>, μM)

Sloučenina	BJ
6-(4-hydroxybenzylamino)purin ( <i>para</i> -topolin)	138
6-(4-hydroxybenzylamino)purin mesylát <i>para</i> -topolin mesylát	>167
6-(benzylamino)purin ribosid	1,7
6-furfurylamino purin (kinetin)	>167
6-furfurylamino purin ribosid (Kinetin ribosid)	2,1

30

Příklad 15: Amesův test

*Para*-topolin a *para*-topolin mesylát byly testovány na mutagenitu bakteriálním testem reverzních mutací. Provedení testu bylo založeno na metodě EU B.13/14 Mutagenicity – Reverse mutation test using bacteria, která je analogem metodiky OECD Test Guideline No. 471. Byly použity čtyři indikátory kmene *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 a také byl použit jeden kmen *Escherichia coli* WP2 uvrA. Zkoušené látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a byly testovány v dávkách 10 až 1000 μg na jednu desku, která byla aplikována na plotny v objemu 0,1 ml. Experimenty byly prováděny s metabolickou aktivací se supernatantem z krysích jater a směsi kofaktorů stejně jako bez metabolické aktivace. Pracovní postup byl proveden podle dokumentů Metody B. 13 / 14, Mutagenicity – Reverse mutation test using bacteria, Council Regulation (EC) No.440/2008. Published in O. J. L 142, 2008 a podle metodiky OECD Test Guideline 471, Bacterial Reverse Mutation Test. Adopted July 21, 1997. Při testování v uspořádání

35

40



uvedeném výše se testované látky projevily jako nemutagenní pro všechny použité testovací kmeny s metabolickou aktivací stejně jako bez metabolické aktivace.

5 Příklad 16: Biologická dostupnost *para*-topolinu a *para*-topolin mesylátu po intraduodenálním a intravenózním podání samcům potkanů

10 *Příprava dávkovacích roztoků pro studii in-vivo:* *Para*-topolin a *para*-topolin mesylát byly skladovány při pokojové teplotě v sušárně a chráněny před světlem. Dávkovací roztoky byly připraveny čerstvé z prášků v den dávkování. Dávkovací roztok pro intravenózní podávání (IV) byl připraven v koncentraci 1 mg/ml v 50:50 DMSO : solný roztok (slaninka). Dávkovací roztoky pro intraduodenální podávání (ID) byly připraveny v koncentraci 2 mg/ml v 0,2% roztoku karboxymethylcelulózy sodné (NaCMC) ve vodě.

15 *Dávkování zvířatům:* Farmakokinetika *para*-topolinů byla hodnocena u samců krys Sprague-Dawley na lačno. Každé zvíře bylo opatřeno kanylou jugulární žíly (JVC) pro odběr krve. Zvířata určená pro intravenózní dávkování byla vybavena dalším JVC pro podávání dávky. Zvířata určená pro intraduodenální dávkování byla pro podávání dávky vybavena intraduodenální kanylou (IDC).

20 Chirurgicky modifikovaná zvířata byla umístěna po jedné do klece. Všechna zvířata byla před zahájením studie zásobena komerčním krmivem pro hlodavce (LabDiet, Certified Rodent Diet # 5002) ad libitum. Krmivo bylo potom zvířatům zadrženo po dobu nejméně dvanácti hodin před studií a během studie, až do osmi hodin po dávce, když bylo jídlo vráceno. Voda byla přiváděna ad libitum. Intraduodenální dávkovací roztoky byly podávány jako jedna bolusová dávka v čase nula v den podání. Intravenózní dávky byly podávány jako pomalá injekce IV po dobu přibližně 1  
25 minuty. Časy odběru krve začaly na konci infuze. Byly odebrány vzorky krve. Návrh studie je uveden v tab. 9.

Tabulka 9. Srovnávací farmakokinetická studie *para*-topolinu a *para*-topolin mesylátu u potkanů

Ošetřená skupina	Testovaná sloučenina	Způsob podání	Dávka (ml/kg)	Dávk. konc. roztoku (ml/kg)	Dávk. objem (ml/kg)	Vehiculum	Odběry krve – časové body
1.	<i>para</i> -topolin	ID	20	10	2	0,2% NaCMC v H <sub>2</sub> O	0, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 h
2.	<i>para</i> -topolin mesylát	ID	20	10	2	0,2% NaCMC v H <sub>2</sub> O	0, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 h
3.	<i>para</i> -topolin	IV	1	1	1	50% DMSO ve slanince	0, 5, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 h
4.	<i>para</i> -topolin mesylát	IV	1	1	1	50% DMSO ve slanince	0, 5, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 h

30 Každý vzorek krve byl odebrán z krys pomocí kanyly jugulární žíly a umístěn do chlazených polypropylenových zkumavek obsahujících heparin sodný jako antikoagulační činidlo. Vzorky byly odstředěny při teplotě 4 °C a při rychlosti 13 000 ot/min po dobu 5 minut. Vzorky byly během zpracování udržovány chlazené. Každý vzorek plazmy byl rozdělen do dvou alikvotů. První alikvot obsahoval 50 µl plazmy. Veškerý zbývající objem plazmy byl použit pro druhý alikvot. Vzorky pak byly umístěny na suchý led a uloženy v mrazničce nastavené pro udržování -60 °C až -80 °C. Celková koncentrace *para*-topolinu ve vzorcích plazmy byla analyzována pomocí LC-MS/MS po inkubaci přes noc se směsí enzymů glukuronidáza/arylsulfatáza. Farmakokinetické parametry byly vypočteny pomocí softwaru WinNonlin.

*Analýza vzorků plazmy:* Byla vyvinuta analytická metoda LC-MS/MS pro stanovení *para*-topolinu v plazmě potkanů (metoda publikována Novákem et al., *Phytochemistry*, 69, 2008: 2214-2224). Před analýzou vzorku byla analyzována standardní křivka pro stanovení specifity, rozsahu a linearity metody. Celkový *para*-topolin ve vzorcích plazmy byl stanoven předběžným ošetřením všech vzorků enzymy  $\beta$ -glukuronidázy/arylsulfatázy a inkubací před analýzou. Inkubace s enzymatickou směsí dekonjugovala jakýkoli glukuronidový nebo sulfátový metabolit *para*-topolinu zpět do původní formy.

*Kritéria přijatelnosti pro analýzu LC-MS/MS:* Jedna standardní křivka byla vložena do každého analytického pokusu. Aby běh proběhl adekvátně, musí být přesnost minimálně 5 z 8 standardů s přesností  $\pm 20\%$ , s výjimkou LLOQ, kde je přijatelná  $\pm 25\%$ .

*Farmakokinetická analýza:* Jednotlivé plazmatické koncentrace v závislosti na čase pro *para*-topolin byly podrobeny nekompartmentální analýze s použitím farmakokinetického programu WinNonlin v. 4.1. Plazmatickým koncentracím pod limitem kvantifikace (10 ng/ml) byla přiřazena hodnota nula pouze pro PK analýzu.

*Výsledky:* Průměrná plazmatická koncentrace a profily PK *para*-topolinu ve srovnání s *para*-topolin mesylátem se po dávkování ID výrazně lišily. Průměrná maximální plazmatická koncentrace ( $C_{\max}$ ) z *para*-topolin mesylátu byla 4,2-krát vyšší ve srovnání s maximální plazmatickou koncentrací *para*-topolinu,  $6526 \pm 897$  ng/ml a  $1312 \pm 765$  ng/ml. Již do 15 minut po ID dávce *para*-topolin mesylátu byla pozorována maximální plazmatická koncentrace ( $C_{\max}$ ) *para*-topolinu, zatímco  $C_{\max}$  *para*-topolinu byla pozorována 2 hodiny po dávce *para*-topolinu podávaného ve formě volné báze (tab. 9). Biologická dostupnost *para*-topolinu z mesylátové soli *para*-topolinu byla  $53 \pm 12\%$  ve srovnání s  $13 \pm 4,1\%$  pro *para*-topolin (tab. 10).

Tabulka 10. Farmakokinetické parametry po intraduodenální aplikaci 20 mg/kg odpovídající formy (průměr  $\pm$  SD, n = 3).

PK parametr	<i>para</i> -topolin	<i>para</i> -topolin mesylát
$C_{\max}$ (ng/ml)	$1312 \pm 765$	$6526 \pm 897$
$t_{\max}$ (h)	$2,1 \pm 0$	$0,82 \pm 0,9$
AUC <sub>last</sub> (h · kg · ng/ml/mg)	$408 \pm 111$	$1157 \pm 342$
Biodostupnost (%)	$13 \pm 4,1$	$53 \pm 12$

#### Příklad 17: Přípravky

Kosmetické přípravky obvykle obsahují 0,1 až 99 % z hmotnosti, obzvláště 0,1 až 95 % hmotn., směsi účinných látek obsahující *para*-topolin mesylát podle tohoto vynálezu, 1 až 99,9 % hmotn. pevné nebo kapalné přípravky, a od 0 do 25 % hmotn., obzvláště 0,1 až 25 % hmotn., povrchově aktivního činidla. Zatímco komerční produkty jsou obvykle formulovány jako koncentráty, konečný uživatel bude normálně používat zředěné formulace. Tyto prostředky mohou také obsahovat další přísady, jako jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný kokosový, řepkový olej nebo sójový olej), činidla proti pění, například silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojidla, látky způsobující lepivost a také hnojiva nebo jiné aktivní složky. Výhodné formulace mají zejména následující složení: (% = hmotnostní procenta):

Emulgované koncentráty	a)	b)	c)	d)
aktivní složka	5 %	10 %	25 %	50 %
dodecylbenzensulfonan vápenatý	6 %	8 %	6 %	8 %
polyoxyethylovaný ricinový olej (polyglykolether ricinového oleje)	4 %	-	4 %	4 %
oktylfenolpolyglykolether (7 až 8 mol ethylenoxid)	-	2 %	-	2 %

cyklohexanon	-	-	10 %	20 %
směs aromatických uhlovodíků C9-C12	83 %	82 %	53 %	18 %

Emulze o vyžadované finální koncentraci mohou být získány z takového koncentrátu zředěním vodou.

Roztoky	a)	b)	c)	d)
aktivní složka	5 %	10 %	50 %	90 %
1-methoxy-3-(3-methoxy-propoxy)propan	-	20 %	20 %	-
polyethylenglykol MW 400	20 %	10 %	-	-
oktylfenolpolyglykolether (7 až 8 mol ethylenoxid)	-	-	30 %	10 %
směs aromatických uhlovodíků	75 %	60 %	-	-

5

Roztoky jsou vhodné k aplikaci ve formě mikrokapeček.

Smáčivé prášky	a)	b)	c)	d)
aktivní složka	5 %	25 %	50 %	80 %
ligninsulfonan sodný	4 %	-	3 %	-
laurylsulfát sodný	2 %	3 %	-	4 %
diisobutylnaftalensulfonát sodný	-	6 %	5 %	6 %
oktylfenolpolyglykolether (7 až 8 mol ethylenoxid)	-	1 %	2 %	-
vysoce disperzní kyselina křemičitá	1 %	3 %	5 %	10 %
kaolin	87 %	61 %	37 %	-

10 Aktivní složka je důkladně promísena s pomocnými látkami a směs je důkladně rozemleta ve vhodném mlýnu. Suspenzi libovolné koncentrace je možné získat smísením vzniklého prachu s vodou.

Suspenzní koncentrát	a)	b)	c)	d)
aktivní složka	3 %	10 %	25 %	50 %
ethylenglykol	5 %	5 %	5 %	5 %
nonylfenolpolyglykolether (15 mol etylenoxid)	-	1 %	2 %	-
lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
karboxymethylcelulóza	1 %	1 %	1 %	1 %
37% vodný roztok formaldehydu	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
emulze silikonového oleje	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %
voda	85 %	78 %	64 %	38 %

15 Jemně rozemletá aktivní složka je smíchána s pomocnými látkami. Vzniklý suspenzní koncentrát umožňuje přípravu suspenze o požadované koncentraci zředěním vodou.

Suché kapsle

20 5000 Tobolek, z nichž každá obsahuje 0,25 g *para*-topolin mesylátu, se připraví následujícím způsobem:

Složení: léčivá látka: 1250 g; talek 180 g; pšeničný škrob: 120 g; stearát hořečnatý: 80 g; laktóza 20 g.

25 Postup přípravy: Rozetřené látky jsou tlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí stroje na plnění tobolek.

Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g *para*-topolin mesylátu jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

Složení: 250 g Účinná látka + 21 g Lauroglycol

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v Lauroglykol® (propylenglykollaurát, Gattefossé SA, Saint Priest, Francie) a roztřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g *para*-topolin mesylátu jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

Složení: 250 g účinné složky v 1 l PEG 400, 1 litr Tween 80.

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o mh mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween 80 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát, Atlas Chem Inc., Inc., USA., dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a roztřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 18. Gelový přípravek

Formulace mastí byla testována během pilotní klinické studie se 4 dobrovolníky různí, což je onemocnění kůže. Složky jsou uvedeny v gramech na 100 g.

Látka	Obsah
<i>para</i> -topolin mesylát	1,0 g
butylhydroxytoluenum	0,2 g
butylparaben	0,2 g
diethylenglykolmonoethylether	10,0 g
silica colloidalis anhydrica	5,0 g
propylenglykollaurát	83,6 g

Gel této konzistence může být navíc modifikován přidáním oxidu křemičitého, silica colloidalis anhydrica. Také se opět předpokládá, že transdermální systém Transcutol P/Lauroglycol FCC zvýší účinnost mesylátové soli *para*-topolinu. Oxid křemičitý colloidalis anhydrica pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky.

Příklad 19: Postup přípravy kožní masti

Složky masti jsou uvedeny v gramech na 200 g:

Látka	Obsah
<i>para</i> -topolin mesylát	2,0 g
butylhydroxytoluenum	0,4 g
butylparaben	0,4 g
diethylenglykolmonoethylether	20,0 g
glyceroldibehenát	44,0 g
propylenglycollaurát	132,2 g

Doporučený postup

Fáze A: 2 g mesylátové soli *para*-topolinu se rozpustí ve 20 g Transcutol P za stálého míchání při teplotě místnosti v oddělené skleněné nebo nerezové nádobě. Proces rozpouštění může být urychlen zahříváním roztoku na maximální teplotu 40 °C.

5

Fáze B: 0,4 g Nipanox BHT a 0,4 g Nipabutyl se rozpustí za stálého míchání ve 133,2 g Lauroglykolu FCC při teplotě přibližně 70 °C, v další samostatné skleněné nebo nerezové nádobě. Čirý olejovitý roztok se zahřívá na teplotu přibližně 80 °C a 44 g Compritol 888 ATO se taví v něm, za stálého míchání. Čirý olejovitý roztok se ochladí na cca 60 °C za stálého míchání a ochlazení a smísí se s fází A. Vzniklá bělavá mast je rozdělena na přibližně 15 g porce a plní se do předem připravených plastových nádob.

10

Příklad 20: Formulace přípravku pro lokální aplikaci na kůži

15

Prostředek pro místní aplikaci na kůži obsahuje následující složky podle hmotn. %:

Aktivní složka:	<i>para</i> -topolin mesylát	0,1 %
Olejová fáze:	Cetylalkohol	5,0 %
	Glycerylmonostearát	15,0 %
	Sorbitanmonooleát	0,3 %
	Polysorbát 80 USP	0,3 %
Vodná fáze:	Methylcelulóza 100 cps	1,0 %
	Methylparaben	0,25 %
	Propylparaben	0,15 %
	Vyčištěná voda q.s. na	77,9 %

Methylparaben a propylparaben se rozpustí v horké vodě a následně se v ní disperguje i methylcelulóza. Směs se pak ochladí na 60 °C, dokud se methylcelulóza nerozpustí. Směs se potom zahřívá na 72 °C a přidá se do olejové fáze, která se zahřívá na teplotu 70 °C za stálého míchání. Mesylátová sůl *para*-topolinu se přidá při teplotě 35 °C a výsledná směs se míchá až do okamžiku rozptýlení. Tento prostředek se aplikuje na kůži přinejmenším každý den, dokud se nedosáhne požadovaného zmírnění stárnutí kůže (proti stárnutí).

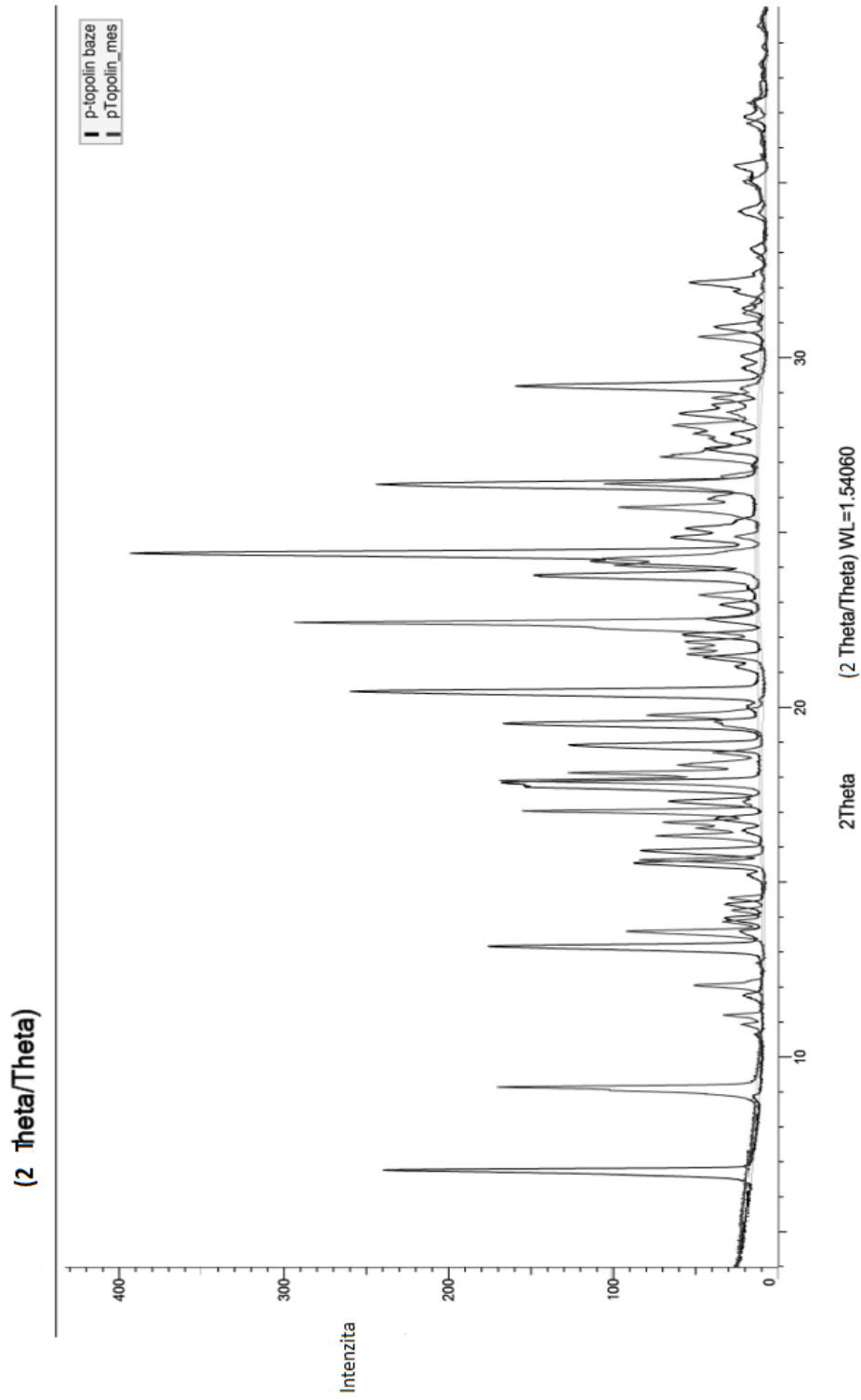
20

## PATENTOVÉ NÁROKY

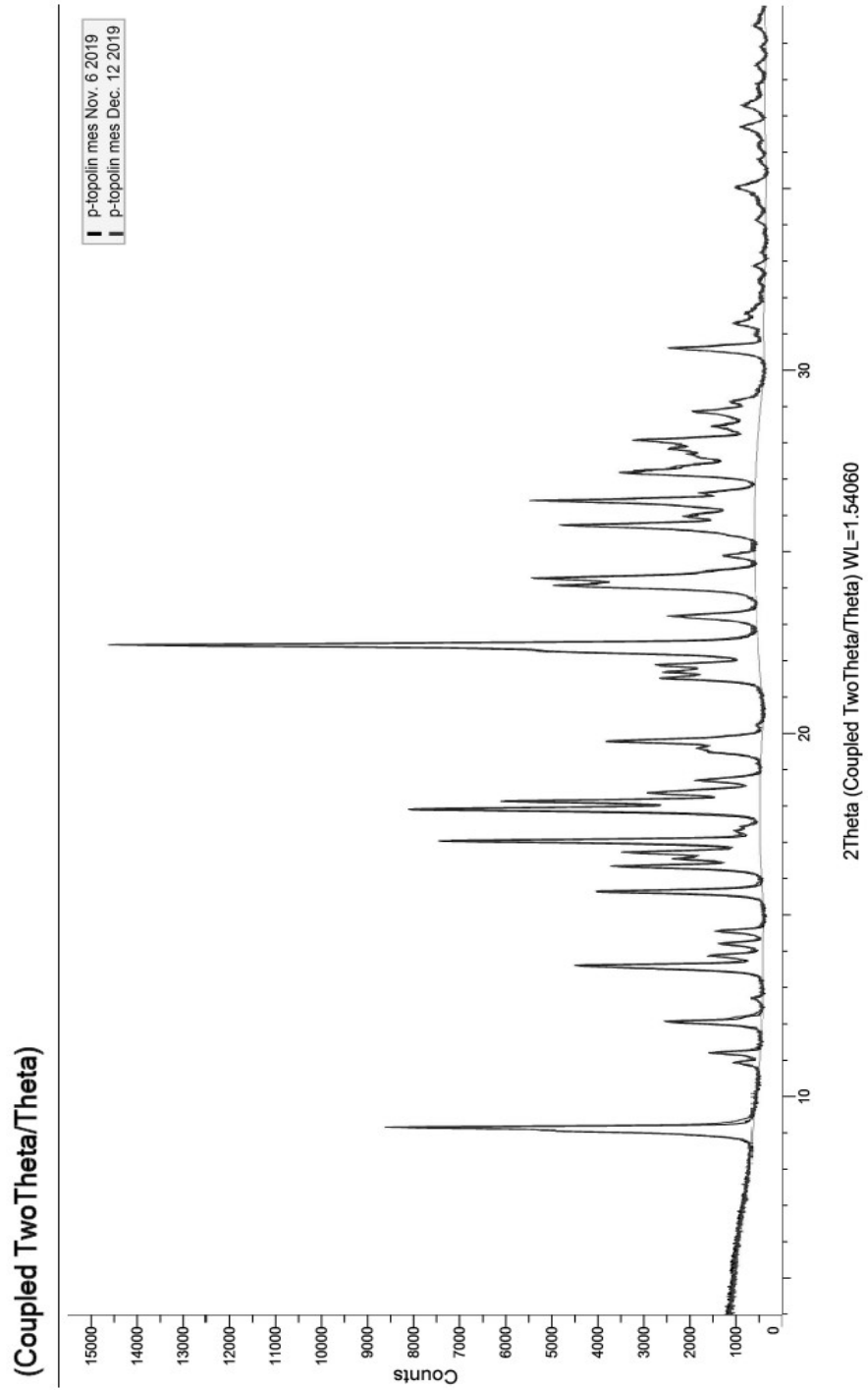
- 5 1. 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylát.
2. Krystalická forma 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylátu, **vyznačená tím**, že má charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK $\alpha$ : 9,0; 9,2; 17,0; 17,9; 18,1; 22,3; 22,4; 24,1; 26,4  $\pm$  0,2° 2-theta.
- 10 3. Krystalická forma podle nároku 2, **vyznačená tím**, že má další charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK $\alpha$ : 13,6; 15,6; 16,3; 16,7; 19,8; 25,7; 27,2  $\pm$  0,2° 2-theta.
- 15 4. 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako léčivo.
5. 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití při léčbě nebo zlepšení chorob či stavů kůže, neurodegenerativních chorob, nebo pro potlačení imunostimulace nebo zánětu.
- 20 6. 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití při prevenci a léčbě chorob a stavů vybraných z rakoviny kůže, psoriázy, fibrózních poruch, jako je sklerodermie, onemocnění štěpu proti hostiteli tzn. GVHD, hypertrofických jizev, nefrogenní systémové fibrózy tzn. NSF, alergického ekzému, toxického ekzému, atopické dermatitidy, lichen planus, hyperpigmentace a lézí herpes simplex, ichtyózy, papilomu, Bowenovy choroby, seboroické keratózy, aktinické keratózy, bazálních a skvamózních buněčných karcinomů, artritidy, rejekce transplantátu, bolesti, akné, erytému a zarudnutí.
- 25 7. Použití 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylátu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 jako kosmeticky účinné látky.
- 30 8. Použití podle nároku 7, které zahrnuje omlazení buněk a tkání; zlepšení celkového vzhledu a stavu kůže; zlepšení stavu akné a/nebo erytému; snížení zarudnutí; snížení počtu a/nebo hloubky vrásek, linek; zlepšení stavu vybraného z ochablé kůže, změny barvy, výskytu stařeckých skvrn, kožovitých a/nebo zažloutlých oblastí pokožky; zlepšení kosmetického vzhledu pokožky.
- 35 9. Použití 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylátu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 *in vitro* pro omlazení buněk a tkání, stimulaci buněčné proliferace, morfogeneze a/nebo diferenciac, inhibici buněčného stárnutí a stárnutí tkání.
- 40 10. Kosmetická a/nebo farmaceutická kompozice, **vyznačená tím**, že obsahuje 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium mesylát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a alespoň jeden kosmeticky a/nebo farmaceuticky přijatelný nosič.

45

4 výkresy

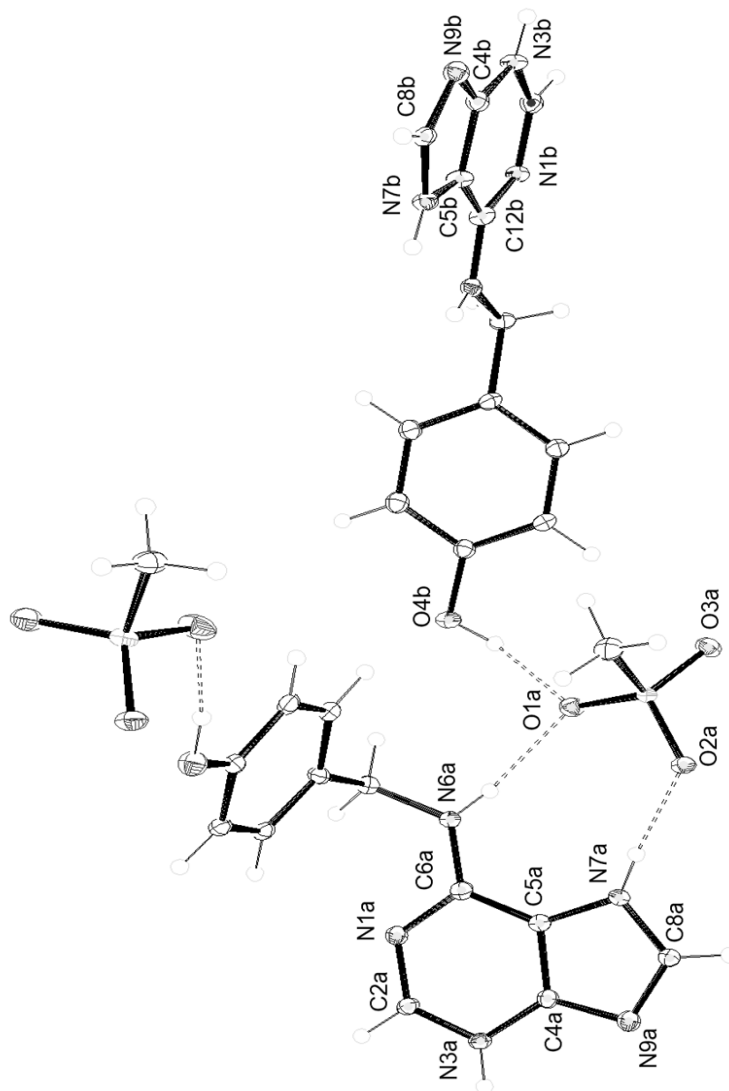


Obr. 1

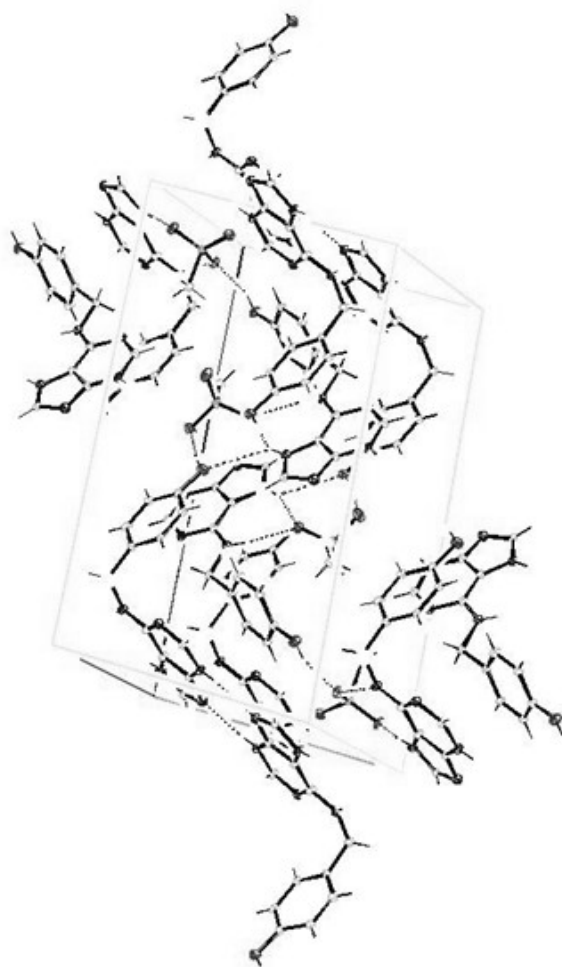


Obr. 2





Obr. 3



Obr. 4