

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS  
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN  
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 873496 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS  
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG  
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE  
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **873496**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
**C12N 5/00  
C12P 21/00  
A61K 31/70**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **12.12.1986**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.08.1987**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.08.1987**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **12.12.1986 PCT/US1986/002716**  
Internationell ansökan - International  
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority  
13.12.1985 US 808886

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Goodman, Michael G., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Eläinten soluvasteiden modulointi isoksantopteriini-8-(1'-beta-aldogly kosidyli)-johdannaisia sisältävilkostumuksilla.  
Modulering av djurens cellulära responser med sammansättningar innehållande  
isoxantopterin-8-(1'-beta-aldoglykosidyl)-derivat.**

Eläinten soluvasteiden modulointi isoksantopteriini-8-(1'-beta-aldoglykosidyyli)-johdannaisia sisältävillä koostumuksilla

Esillä oleva keksintö kohdistuu eläinten soluvasteiden modulointiin ja erityisemmin antigeenispesifisten immuuni- ja eläinten muiden soluvasteiden modulointiin koostumuksilla, jotka sisältävät isoksantopteriinin johdannaista, jolla on alhainen moolipaino.

Eläinten immuunijärjestelmä koostuu lukuisista osista, jotka vaikuttavat erikseen ja/tai toimivat yhdessä eliminoidakseen tai neutraloidakseen substanssit, jotka tämä järjestelmä tunnistaa vieraiksi isäntäeläimelle. Yleensä, mutta ei välttämättä, substanssi, jonka immuunijärjestelmä tunnistaa vieraaksi, on alkuperältään isännälle eksogeeninen. Esimerkkejä tällaisista eksogeenisistä substansseista ovat tarttuvat bakteerit ja niiden solutoiminnan sivutuotteet, viruspartikkelit ja niiden proteiinit, hyönteisten pistojen injektoimat proteiinit ja niiden kaltaiset. Autoimmuunisairauksissa, kuten nivelreumassa, isännän immuunijärjestelmä havaitsee vieraiksi isännän valmistamat proteiinit tai itsevalmistuneet proteiinit.

Immuunijärjestelmän päävaikuttajia ovat leukosyytit, jotka käsittelevät tyymiinialkuperää olevat lymfosyytit (T-solut), luuytimessä tuotetut lymfosyytit (B-solut), neutrofiilit, jotka, interalia, tuottavat entsyymejä, jotka valmistavat hapettavia aineita, kuten vetyperoksidia, joilla on sytotoksisia vaikutuksia bakteereihin, ja makrofagit, jotka edustavat T-soluille ja B-soluille vierasta substanssia tai immunogeeniä (antigeeni) samoin kuin tuottavat proteiinia, jota nimitetään interleukiiniksi, joka osallistuu T-solujen muuntumiseen T-auttajasoluiksi ja B-solujen ja T-solujen proliferaatioon. Komplementilla, joka on proteiinien yhdistelmäseos, joka komplementti toimii määrättyllä kaskaditavalla vieraiden substanssien suhteen, on suuri merkitys immuunivasteissa.

B-solut voidaan erottaa T-soluista siten, inter alia, että niiden pintakalvoissa on läsnä monomeerisia immunoglobuliineja (vasta-aineita). Kypsät B-solut erittävät vasta-aineita ympäristöönsä, kun ne ovat sopivasti aktivoituneita.

Immunoglobuliineja on viisi tunnettua luokkaa, jotka on tunnistettu IgA:ksi, IgD:ksi, IgE:ksi, IgG:ksi ja IgM:ksi viiden antigeenisesti erilaisen raskas ketjuproteiinin perusteella, jotka muodostavat osan immunoglobuliinimolekyylistä. B-solut sisältävät ei-immunoglobuliinisolumerkitsimiä, jotka käsittävät kpmplementtiresseptorin (CR), immunoglobuliinin Fc-osan (FcR) reseptorin, I-alueeseen liittyneet antigeenit (Ia) ja ryhmän differentiaatioantigeenejä (Lyb 1-7), jotka on tunnistettu antisээрumeilla ja muilla tavoin ja korreloivat B-solujen kypsymisen ja aktivaation erilaisten aspektien kanssa. Nämä merkitsemet ovat käyttökelpoisia fenotyypissä B-solujen ja B-solualapopulaatioiden tunnistamisessa.

Kun immunoglobuliinit vaikuttavat vieraisiin substansseihin tai antigeeniin, T-solujen ja erityisesti auttaja-T-solujen uskotaan olevan tarpeellisia stimuloimaan B-soluja jakaantumaan ja erilaistumaan vasta-ainetta erittäviksi soluiksi huomoraalista immuniteettia varten. Suppressori-T-solut vaikuttavat humoraalisen immuniteetin säätelyyn, kun sytotoksiset T-solut ja T-soluvälittäjät, jotka ovat viivästetyntyyppisesti yliherkkiä, ovat soluvälitteisen immuniteerin päätekijät.

Muriini-T-soluilla on pinta-antigeeneja, jotka on nimitetty Lyt 1:ksi, 2:ksi ja 3:ksi sekä L3T4:ksi, jotka ovat yhteydessä T-solutoimintaan. Auttaja-T-soluprekursorit ovat Lyt 1<sup>+</sup>, 2<sup>-</sup>, 3<sup>-</sup>, L3T4<sup>+</sup>-fenotyyppejä. Nämä solut osallistuvat tavallisesti B-solujen aktivointiin ja säätelyyn.

Auttaja-T-solujen tiedetään osallistuvan immunoglobuliinia erittävien B-solujen aktivointiin ja differentiaatioon sen jälkeen, kun B-solut ovat vastaanottaneet ensimmäisen viestin aktiivaltalta immunogeeniseltä (antigeeniseltä) aineelta, joka tavallisesti esiintyy siinä antigeeniä edustavan solun toiminnan jäl-

keen. Kuitenkin tapa, jolla T-solut auttavat B-solujen aktiivointia ja differentiaatiota on väittelynalainen.

Eläinsolujen osoittamaa immuunivastetta voidaan muunnella keino-  
tekoisella suppressorilla (immuunisuppressio) tai tehostamisella  
(immuunipotentiaatio). Keinotekoisesti aiheutettu immunosuppres-  
sio voidaan saada aikaan kuudella tavanomaisella menetelmällä:  
(1) antigeenin suppressiivisen annoksen antamisella, (2) spesi-  
fisten antiseerumien tai vasta-aineiden antamisella, (3) käyttä-  
mällä muita biologisia reagensseja, kuten antilymfosyytti-anti-  
seerumia, (4) käyttämällä lääkkeitä tai hormoneja, (5) säteilyttämällä ja (6) imukudoksen kirurgisella poistamisella. Immu-  
nopotentiaatio voidaan saada aikaan antamalla ainetta, joka vai-  
kuttaa (1) määrän lisääntymiseen, johon immuunivaste kehittyy,  
(2) vasteen intensiteetin tai tason kohoamiseen, (3) vasteen  
pitkittymiseen tai (4) vasteen kehittymiseen muuksi ei-immuno-  
geeniseksi substanssiksi.

Aineita, joiden tiedetään tehostavan immuunivasteita, nimitetään  
yleensä apuaineiksi ja ne voidaan sijoittaa kahteen luokkaan:  
(1) niihin, jotka saavat aikaan yleisen potentiaation, so.  
substanssit, jotka tehostavat solunsisäistä ja/tai humoraalista  
immuunivastetta antigeenien laajaa kirjoa varten ja (2) ne,  
jotka saavat aikaan spesifisen potentiaation, so. substanssit,  
jotka tehostavat spesifisiä vasteita tiettyihin antigeneihin.

Substanssit, jotka voivat toimia apuaineina, voidaan ryhmitellä  
seuraaviin luokkiin: (1) vesi- ja öljyemulsiot, esim. Freundin  
apuaine, (2) synteettiset polynukleotidit ja muut polyanionit,  
(3) hormonit, lääkkeet ja sykliset nukleotidit, (4) mikrobi-  
tuotteet, esim. endotoksiinit, (5) lymfokiinit ja monokiinit,  
kuten interleukiinit ja (6) synteettiset peptidit, esim. besta-  
tiini ja tuftsiini.

Substanssi, joka kykenee immuunivasteen erityiseen potentiaa-  
tioon on siirtotekijä, dialysoiva leukosyyttiute (DLE), joka  
saadaan ihmisen perifeeraalisista leukosyyteistä. On raportoitu,  
että siirtotekijällä on vaikutusta potilaissa, joilla on

immuunivajasta ja mahdollista vaikutusta syöpäpotilaissa ja potilaissa, joilla on rajoittunut immuunivajaus. Kuitenkin tämän aineen vaikutus on erittäin kiistanalainen ja siitä on vielä paljon opittavaa.

Monissa sairauksissa ja fysiologisissa tiloissa, kuten X-kromosomiin kytkeytyneessä agammaglobulinemiassa, vanhuudenheikkoudessa ja lääkeaineen aiheuttamassa immunosuppressiossa, B-soluaktivaatio ja -differentiaatio puuttuu tai on vain alhaisella tasolla vähentäen siten isännän immuunivastekykyä. Nämä sairaudet ja tilat edustavat immunosuppressoivia tiloja. Tällöin tehostunut B-soluaktivaatio ja -differentiaatio, jos se voidaan saada aikaan, pyrkii edullisesti vähentämään immunologisia puutteellisuuksia, jotka voivat ilmetä sairautena, ja/tai parantaa potilaan tilaa.

Immunopotentioitu tila voidaan kuvata ruumiillisena kuntona rokotuksen jälkeen. Tällöin immuunivastetta tehostetaan aiheuttamalla primääri vaste rokotuksen immunogeeniin ja sitä voidaan edullisesti tehostaa yhä edelleen "vahvennus"-ruiskeella immunogeeniä tai rokotetta, jota annetaan myöhemmin, jotta saadaan immuniteetin parantunut taso ja/tai kesto.

Lymfokiinit ja monokiinit ovat immunopotentioivia proteiineja, joita lymfosyytit ja vastaavasti monosyytti-makrofagiperäiset solut tuottavat. Yksi monokiini, interleukiini-1, on makrofagien tuottama, kun niitä stimuloi mitogeeni tai antigeeni. Interleukiini-1 on tavallisesti edellytyksenä primäärisen antigeenivasteen tuottamiselle.

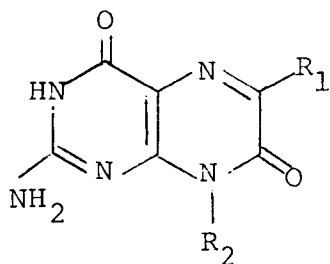
Interleukiini-1 osallistuu T-solujen interleukiini-2:n tuotantoon. Interleukiini-2 on T-solujen kasvutekijä ja osallistuu auttaja-T-solujen transformaatioon. Niin ollen interleukiini-1-tuotannon induktio tai proteiiniherkän toiminnan induktio T-soluissa, joka on samanlainen kuin interleukiini-1:n tuottama, olisi edullinen tehostettaessa immuunivastetta, erityisesti kun makrofageja ei ole läsnä tai kun niiden monokiinituotanto on vajavainen.

Goodamanille ja Weiglelle myönnetty US-patentti 4 539 205 kuvaa eläinten soluvasteiden modulointia 8-substituoiduilla guanidiinijohdannaisilla, jotka ovat sitoutuneet 9-1' aldoosiin, jossa on 5 tai 6 hiiliatomia aldoosiketjussa (rengas). Tässä patentissa kuvatut solumoduloinnit kohdistuvat enimmäkseen immunomodulointiin, kuten adjuvantisiteettiin tuotettaessa primääri- ja sekundääri-immuunivasteita. Selostetaan myös toimintaa tiettyjä neoplastisia tiloja vastaan, kuten T-soluja korvaavaa toimintaa, IL-1 kaltaista toimintaa tymosyyteissä ja lysomaalisten entsyymien irtoamisen induktiota neutrofiileista. 8-substituenteilla, jotka ovat näissä molekyyलेissä, on elektroneja puoleensa vetäviä induktiivisia vaikutuksia vedyn suhteen. Täten halo-, merkapto- tai sen tioksotautomeerit, asyylimerkapto-, alkyylisulfido-, nitro-, syano-, keto-, halometyyli- ja metyleenioksialkyyli ja niiden kaltaiset selostettiin käyttökelpoisiksi, kun taas elektronin luovuttavat substituentit, kuten aminoryhmä, todettiin epäaktiivisiksi.

Lisäksi EP-patenttihakemus n:o 83306791.1 selostaa lisäksi 8-hydroksiguanidiinijohdannaisen (8-oksoguanini), 7-metyyli-8-oksoguanini-johdannaisen ja 7-metyyli-8-tiokso-guanidiinijohdannaisen käyttöä eläinsoluvasteiden moduloinnissa. Edelleen US-patentissa n:o 4 539 205 selostettuja tuloksia guanidiinijohdannaisten käyttämisestä on selostettu, koska ne ovat samanlaisia tuloksia, jotka on saatu käyttämällä guaniinijohdannaisia, jotka on selostettu ensimmäisen kerran tuossa hakemuksessa.

Pfleidererille myönnetty US-patentti 3 798 210 kuvaa 8-(1'-glykosidyyli)pteridiinien, jotka käsittävät isoksantopteriinijohdannaiset, synteesiä. Tämä patentti opettaa sen koostumuksen käyttöä aktiivisena farmaseuttisena aineena spesifisiä patogeeneja vastaan, kuten malaria, tuberkuloottiset basillit, patogeeniset sienet, gram-positiiviset ja gram-negatiiviset bakteerit, sekä ensisijaisesti viruksia vastaan, kuten herpesvirus ja influenssavirus. Erään Pfleidererin patentin koostumuksista ovat myös käyttökelpoisia tässä, mutta ei antibiootteina kuten patentissa opetetaan. Tämä käyttö kuvataan tämän jälkeen.

Eläinsoluvasteet moduloidaan saattamalla elänsolut kosketukseen koostumuksen kanssa, joka sisältää laimentavan määrän fysiologisesti siedettävää kantoainetta, joka on sekoitettu vaikuttavaan määrään aktiivista ainetta, joka on isoksantopteriini johdannainen. Isoksantopteriini johdannaisen rakenne on kaavan



mukainen, jossa

R<sub>1</sub> on radikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, alemmasta alkyylistä, hydroksi-alemmasta-alkyylistä, polyhydroksi-alemmasta-alkyylistä, fenyylistä, fenyylim-alemmasta-alkyylistä, alemmasta alkyylifenyylistä, alemmasta-alkoksi-fenyylistä, halofenyylistä, trifluoro-metyylifenyylistä, hydroksista, oksosta (O=), alemmasta alkoksista, fenyylim-alemmasta-alkoksista, halosta, merkaptosta, tioksosta (S=), alemmasta alkyylitiosta, alemmasta alkyloyylitiosta, fenyylim-alemmasta-alkyylitiosta, alemmasta alkanoyylistä (alempi asyyli), karboksista, alemmasta alkoksikarbonyylistä, alemmasta alkyylikarboksista, alemmasta alkyleeni-alemmasta-alkyylikarboksylaattista, alemmasta-alkoksi-alemmasta-alkyylim-karbonyylistä ja karboksamidosta ja alemmasta-alkylim-karboksamidosta, joissa karboksamidoryhmällä on kaava CONR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, jossa R<sub>3</sub> ja R<sub>4</sub> ovat samat tai eri ja ne on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä ja alemmasta alkyylistä, tai NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> yhdessä muodostavat heterosyklisen renkaan, jossa on viisi tai kuusi atomia renkaassa;

R<sub>2</sub> on beta-sitoutunut aldoglykosidiradikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu l'-aldopentosidyylistä, l'-aldoheksosidyylistä, mono-deoksygenoidusta l'-aldopentosidyylistä ja mono-deoksygenoidusta l'-aldoheksosidyylistä ja niiden O-substituoidusta alemmasta alkyylistä, alemmasta alkanoyylistä, bentsyyli- ja bentsoyylim johdannaisista, joissa O-substituentti, jos se on läsnä yhdessä happiatomissa, on läsnä kaikissa käytettävissä olevissa renkaan substituenttihappiatomeissa; farmaseuttisesti hyväksyttävät isoksantopteriini johdannaisen suolat; ja

isoksantopteriini johdannaisen tautomeerit.

Solujen koostumuksen välistä kosketusta ylläpidetään ajanjakso, joka on riittävä kosketuksessa olevien soluvasteiden modulointiin.

Immunogeeni (antigeeni) -spesifisten humoraalisten immuunivasteiden tehostaminen, joka johtaa adjuvantisiteettiin, joka tuottaa tehostuneen vasta-aine-erittymisen immunogeenin läsnäollessa on erityinen esimerkki eläinsoluvasteesta, jota voidaan moduloida esillä olevan keksinnön mukaisesti. Termi "moduloida" erilaisissa kieliopillisissa muodoissaan, kuten sitä on käytetty tässä, tarkoittaa elänsoluvasteen tehostamista sekä inhibointia in vitro ja/tai in vivo.

Tämän keksinnön mukaista soluvastetta moduloivaa koostumusta voidaan käyttää aiheuttamaan erilaisia, joskin suhteellisia tuloksia, jotka riippuvat, inter alia, antotavasta, annoksesta ja solupopulaatiosta, johon sitä annetaan. Aktiivinen isoksantopteriini johdannaisaine voi olla koostumuksessa sekoitettuna kantoaineeseen kiinteän isoksantopteriini johdannaisen suspensionä kiinteässä tai nestemäisessä kantoaineessa tai liuotettuna liuotteeksi kantajassa.

Saattamalla leukosyytit, kuten B-lymfosyytit, kosketukseen tämän keksinnön mukaisen koostumuksen kanssa ja ylläpitämällä kosketusta ennalta määriteltä ajanjakso, moduloidaan näiden leukosyyttien immuunivastetta. B-lymfosyytti-(B-solu)-vasteiden modulointi voidaan saada aikaan käsittelemällä B-soluja vaikuttavalla määrällä immunogeeniä, jotta muodostetaan immunogeenillä imeytettyjä B-soluja, jota seuraa B-solujen saattaminen kosketukseen immuunivastetta moduloivan koostumuksen kanssa ja edelleen vaikuttavalla määrällä immunogeeniä. B-soluvasteita voidaan myös moduloida saattamalla B-solut kosketukseen herättävän immunogeenin ja tämän keksinnön mukaisen immuunivastetta moduloivan koostumuksen kanssa, jonka jälkeen seuraa immunogeenillä imeytettyjen solujen saattaminen kosketukseen lisäksi vaikuttava immunogeeniä yksin tai edelleen immuunivastetta moduloivan koostumuksen kanssa. Lisäksi immuunivastetta moduloivaa koostu-

musta voidaan antaa saattamalla eläinsolut kosketukseen, ja sen jälkeen seuraa, samalla kun isoksantopteriini johdannainen on kosketuksissa eläinsolujen kanssa. so. läsnä in vivo tai in vitro, immunogeenin yhden tai useamman immunoivan annoksen kanssa. Nämä soluvastemoduloinnit sisältyvät niihin vaikutuksiin, joita nimitetään adjuvantisiteetiksi; so. isoksantopteriini johdannainen toimii apuaineena immunogeenille ja aiheuttaa siten immunogeeni- tai antigeenispesifisen moduloinnin.

Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan käyttää soluissa in vivo sekä in vitro. Koostumukset voidaan antaa ihonalaisesti, suonensisäisesti, intraperitoneaalisesti nestemäisessä muodossa tai suun kautta pillereinä, kapseleina tai nestemäisessä muodossa lietteenä, suspensiona tai liuoksena.

Esillä olevalla keksinnöllä on monia etuja ja hyötyjä.

Yksi tämän keksinnön eduista on se, että sen käyttö voi aiheuttaa "toisen viestin", jota vaaditaan 3 lymfosyytin aktivointiin ja differentiaatioon reaktiona ensimmäiseen, herättävään (immunogeeniseen) viestiin.

Tämän keksinnön etuna on, että eläinsolujen saattaminen kosketuksiin, kuten tässä on kuvattu, voi johtaa näiden solujen aktivointiin ja differentiaatioon, mikä puolestaan voi johtaa proteiinituotannon induktioon, kuten on tapauksessa, kun immunoglobuliini (vasta-aine) erittyy B-soluista, monokiini erittyy makrofageista ja lymfokiini erittyy T-soluista.

Toinen esillä olevan keksinnön etu on, että tehostetut immuunivasteet voivat vaikuttaa sekä T-auttajasolutoiminnan läsnä- että poissaollessa. Täten tehostettuja immuunivasteita on havaittavissa sekä T-soluista riippuvissa solujärjestelmissä että T-soluista riippumattomissa solujärjestelmissä, mikä tekee tämän keksinnön käyttökelpoiseksi, kun isännän leukosyytit ovat immuunisopimattomat, kun ne ovat menettäneet T-auttajasolutoiminnan, samoin kuin leukosyyteissä.

Muut tämän keksinnön edut ja hyödyt ilmenevät alan asiantuntijalle seuraavasta yksityiskohtaisesta kuvauksesta.

A. Isoksantopteriini-8-aldoglykosidit

2-amino-4-hydroksipteridiini ja sen johdannaiset tunnetaan alalla pteriininä ja sen johdannaisina vastaavasti. Prototrooppisesti aktiiviset pteriinit esitetään tavallisesti suositummassa tautomeerisessä kaavassaan 2-aminopterin-4-onina ja sen johdannaisina. Pfleiderer, kpl. 2.16, Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Vol. 3. osa 2B, Katritzky ja Rees, toim., Pergamon Press, New York (1984), s. 63-327.

2-amino-4,7-dihydroksipteriini ja sen tautomeeri 2-aminopteriini-4,7-dioni tunnetaan isoksantopteriininä. Isoksantopteriinin tarkempi kemiallinen nimi on 2-amino-3,4,7,8-tetrahydro-4,7-dioksopteridiini. Tässä käyttökelpoiset koostumukset voidaan nimittää isoksantopteriiniksi ja sen johdannaisiksi. Näillä kaikilla käyttökelpoisilla isoksantopteriinijohdannaisilla on aldoglykosidi (sokerialdehydi) substituenttina pteriinirengasjärjestelmän 8-asemassa ja ne voivat sisältää jonkin muun substituentin kuin vedyn 6-asemassa.

Tässä käyttökelpoiset isoksantopteriinijohdannaisten valmistamiseen käytettävät isoksantopteriini ja 6-substituoidut isoksantopteriinit valmistetaan itsessään helposti tunnetuissa reaktioissa. Eräässä reaktiokaavassa 2,5,6-triamino-4-hydroksipyrimidiini reagoitetaan alfa-ketohapon kanssa, jossa substituentti beta muodostaa karboksiryhmän  $R_1$ -ryhmän rakenteellisissa kaavoissa. Katso Hurst, An Introduction To The Chemistry And Biochemistry Of Pyrimidines, Purines And Pteridines, John Wiley & Sons, New York, s. 86-103 (1980) ja sitaatteja siinä. Toisessa reaktiokaavassa edellä mainittu pyrimidiini reagoitetaan asetyleeni-dikarboksyylihapon di-alempi-alkyyliesterin kanssa, jotta muodostetaan alempi-alkyyli-karboksyylihappo 6-asemassa ja sen alempi alkyyliesteri. Iwanami, Bull. Chem. Soc. Japan, 44:1314 (1971). Muista koostumuksista ja reaktiokaavioista kerrotaan Pfleidererissä, kappale 2.16, Comprehensive Heterocyclic Chemistry, supra.

Tässä käyttökelpoiset isoksantopteriini-8-aldoglykosidi-johdannaiset valmistetaan edullisesti isoksantopteriinistä tai 6-substituoidusta isoksantopteriinijohdannaisesta, johon lisätään aldoglykosidinen ryhmä Pfleidererin menetelmällä, kuten kuvataan US-patentissa n:o 3 798 210, jonka selitys sisältyy tähän viitteenä. Muita valmistusmenetelmiä, kuten 2-amino-3,4-dihydro-5-nitro-4-okso-6-aminoglysidyyli-pyrimidiinin sykloisointi, jonka on kuvanneet Lohrmann ja Forrest, J. Chem. Soc., 460-465 (1965), voidaan käyttää.

Lyhyesti, Pfleidererin tekniikan mukaisesti, sopiva substituoitu isoksantopteriini on O-metalloitu 7-asemassa neliarvoisella metallilla, joka on neljänestä pääryhmästä ja jaksollinen järjestelmän III-V-jaksosta. Täten valmistettu O-metalloitu koostumus reagoitetaan aldoglykosidillä, jonka 1'-asemaan on itsessään johdettu hydroksyyli-ryhmä reaktiivisena esterinä, kuten alempi karboksyylihapoesteri, kuten etikkahapon esteri tai eetterinä, kuten alempi alkyylieetteri, kuten metyylietteri. 1'-aseman hydroksyyli voidaan korvata haloryhmällä kuten bromidilla, kuten opettivat Pfleider ja hänen työtoverinsa, Chem. Ber., 106, 317-331 (1973); Chem. Ber., 106, 1952-1975 (1973); ja Chem. Ber., 107, 339-361 (1974).

Neljarvoinen germanium, tina ja erityisesti pii ovat edullisia O-metalloivia aineita. Erityisen edullinen metalloiva aine on heksametyylidisilatsaani.

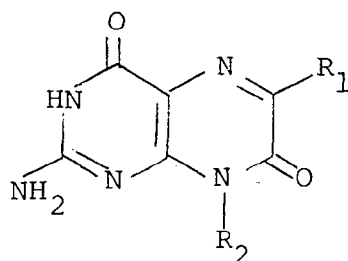
On edullista käyttää voimakasta happokatalyyttiä, esim. epäorgaanista happoa kuten rikkihappoa, O-metalloivan aineen, kuten heksametyylidisilatsaanin, kanssa. Heksametyylidisilatsaania käytetään edullisesti ylimääränä veden poissaollessa ja edullisesti mieluummin typen tai argonin kuin ilman läsnäollessa.

7-O-metalloitu isoksantopteriini kerätään sen jälkeen tavallisesti ja se reagoitetaan inertissä liuottimessa, kuten kuivassa bentseenissä, jossa on aldoglykosidia, jonka hydroksyyli-ryhmät ovat muuten paitsi 1'-asemassa suojattuja, esim. bentsoyylillä tai asetyyli-ryhmillä. Valitun aldoglykosidin 1'-asema on suojattu kuten yllä kerrottiin.

Glyksidaatioreaktio suoritetaan edullisesti elohopeasuolan, kuten elohopeahalidin tai elohopeahalidien seoksen, läsnäollessa, jolloin käytetään aldoglysidyyli-1'-eetteriä tai -1'-esteriä. Käytetään korkeaa lämpötilaa, kuten palautusbentseeniä, 0,1 Mpa:n paineessa aldoglysylointireaktiota varten (sokerin ja isoksantopteriinin kondensaatio).

Elohopeasuola, jos sitä käytetään, suodatetaan heti reaktioväliaineesta, kun reaktio on ohi ja isoksantopteriini-8-(hydroksisuojaattu aldoglykosidi)-johdannainen otetaan talteen esim. pylväskromatografialla. Hydroksisuojaavat ryhmät, esim. bentsooyli tai asetyyli poistetaan sen jälkeen standardimenetelmillä, kuten reagoittamalla natrium-metoksidi-metanolissa, jota seuraa neutralointi. Haluttu isoksantopteriini-8-(1'-aldoglykosidi)-johdannainen koostaan sen jälkeen ja puhdistetaan esim. kiteyttämällä.

Käyttökelpoisilla isoksantopteriinijohdannaisilla on rakenne, joka vastaa kaavaa



jossa

$R_1$  on radikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, alemmasta alkyylistä, hydroksi-alemmasta-alkyylistä, polyhydroksi-alemmasta alkyylistä, fenyylistä, fenyyli-alempi-alkyylistä, alempi-alkyyli-fenyylistä, alempi-alkoksi-fenyylistä, halofenyylistä, trifluorometyylifenyylistä, hydroksista, oksosta (O=), slemmasta alkoksista, fenyyli-alempi-alkoksista, halosta, merkaptosta, tioksosta (S=), alemmasta alkyylitiosta, alemmasta alkyloyylitiosta, fenyyli-alempi-alkyylitiosta, alemmasta alkanoyylistä (alempi asyyli), karboksista, alemmasta alkoksikarbonyylistä, alemmasta alkyylikarboksista, alemmasta-alkyleeni-alemmasta-alkyylikarboksylaattista, alemmasta-alkoksi-alemmasta-alkyylikarbonyylistä ja karboksamidosta ja alemmasta alkyylikarboksamidosta, joissa karboksamidoryhmällä on kaava  $CONR_3R_4$ , jossa  $R_3$  ja  $R_4$  ovat samat tai erilaiset ja ovat valitut ryhmästä,

joka koostuu vedystä ja alemmasta alkyylistä tai  $\text{NR}_3\text{R}_4$  muodostavat yhdessä heterosyklisen renkaan, jossa on viisi tai kuusi atomia renkaassa;

$\text{R}_2$  on beta-sitoutunut aldoglykosidiradikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu 1'-aldopentosidyylistä, 1'-aldoheksosidyylistä, mono-deoksygenoidusta 1'-aldopentosidyylistä ja mono-deoksygenoidusta 1'-aldoheksosidyylistä ja niiden O-substituoidusta alemmasta alkyylistä, alemmasta alkanoyylisestä, bentsyylistä ja bentsoyylijohdannaisista, jolloin O-substituentti, jos se on läsnä yhdessä happiatomissa, on läsnä kaikissa käytettävissä olevissa renkaan substituenttihakkeissa;

isoksantopteriinijohdannaisen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat; ja

isoksantopteriinijohdannaisen tautomeerit.

Ryhmät ja radikaalit, joita nimitetään "alemmiksi" ilmaisevat, että niillä on 1 - noin 6 hiiliatomia ja edullisesti 1 - noin 3 hiiliatomia. Alempi alkyyliradikaalit käsittävät, esimerkiksi, metyylin, etyylin, propyylin, isopropyylin, n-butyylin, sek.-butyylin, t-butyylin, n-pentyylin, 2-metyyli-3-butyylin, 1-metyyllibutyylin, 2-metyyllibutyylin, neopentyylin, n-heksyylin, 1-metyyllipentyylin, 3-metyyllipentyylin, 1-etyyllibutyylin, 2-etyyllibutyylin, 2-heksyylin, 3-heksyylin ja niiden kaltaiset.

Hydroksi-alempi-alkyyliradikaalit käsittävät hydroksimetyylin, 2-hydroksietyylin, 2-hydroksipropyylin, 3-hydroksipropyylin, 3-hydroksi-2-butyylin, 3-hydroksi-2,2-dimetyyllipropyylin, 6-hydroksiheksyylin ja niiden kaltaiset.

Polyhydroksi-alempi-alkyyliradikaalit käsittävät 1,2-dihydroksietyylin, 1,2,3-trihydroksipropyylin, 2,3-dihydroksipropyylin, 3,4-dihydroksibutyylin ja niiden kaltaiset. Alan asiantuntijat ymmärtävät, että tarkastellut polyolit eivät sisällä enempää kuin yhden hydroksyyli-ryhmän alemman alkyyliryhmän jokaisella hiiliatomilla.

Fenyyli-alempi-alkyyliradikaalit käsittävät fenyyli-substituoidut alempi alkyyliradikaalit, jotka on lueteltu edellä, jolloin

radikaalin alkyyliosaa on sidottu isoksantopteriinin-8-aldoglykosidin 6-asemaan. Esimerkkinä ovat radikaalit käsittävät bent-syylin, fenetyylin, 2-fenyylipropyylin, 2-fenyyli-3-metyylipentyylin ja niiden kaltaiset.

Alempi-alkyyli-fenyyli-radikaalit ovat edellä kuvattuja alempi alkyyli-radikaaleja, jotka on substituoitu fenyyli-radikaalilla, joka itse on sitoutunut isoksantopteriini-8-aldoglykosidin 6-asemaan. Esimerkkejä tällaisista alempi alkyyli-fenyyli-radikaaleista ovat o-ksyyli, p-(2-heksyyli)fenyyli, m-(isopropyyli)-fenyyli ja niiden kaltaiset. Trifluorimetyylifenyyli, joka on orto-, meta- tai parasubstituoitu sitoutumisasemaan isoksantopteriinin 6-asemaan, koostuu alempi alkyyli-fenyyli-radikaalien alaluokasta.

Alempi alkoksi-fenyyli-radikaalit voidaan katsoa orto-, meta- tai para-isoksantopteriinillä substituoitujen fenolien alempi alkyyli-etteiksi, jolloin alempi alkyyli-ryhmä on kuten edellä kuvattu. Esimerkit alempi alkoksi-fenyyli-radikaaleista käsittävät o-metoksifenyylin, m-sek.-butoksifenyylin ja p-(2-etylibutoksi)-fenyylin.

Halofenyyli-radikaaleina käytetään halogeenilla substituoituja fenyyli-radikaaleja, joissa halogeeni on edullisesti fluori, kloori ja bromi ja se käsittää myös jodin. Esimerkit radikaaleista käsittävät o-klorofenyylin, p-fluorofenyylin ja m-bromofenyylin.

Hydroksi- ja merkptoradikaaleja kutsutaan tässä okso- tai tiokso-radikaaleiksi vastaavasti johtuen niiden tautomeerisestä muodostuksesta.

Alempi alkoksiradikaalit voidaan katsoa eetteiksi, jotka ovat muodostuneet 6-hydroksi-isoksantopteriinistä ja edellä kuvattua alempi alkyyli-ryhmästä. Esimerkit radiakaleista käsittävät metoksin, etoksin, propoksin, iso-propoksin, n-butoksin ja niiden kaltaiset. Fenyyli-alempi-alkoksiradikaalit voidaan samaten katsoa eetteiksi, jotka ovat muodostuneet 6-hydroksi-isoksan-

topteriinistä ja edellä kuvatusta fenyyli-alempi-alkyyli-radikaalista. Esimerkkejä näistä aineista ovat bentsyylioksi, 2-fenyylietoksi, 2-fenyylipropoksi ja niiden kaltaiset.

Haloradikaalit käsittävät edullisesti kloorin, bromin sekä fluorin että jodin.

Alempi alkyyli- ja fenyyli-alempi-alkyyli-radikaalit ovat sulfidieettereitä ja ovat analogisia edellä kuvattujen happieettereiden kanssa, kuten alkoksi- ja fenyyli-alempi-alkoksi-radikaalit vastaavasti.

Karboksiradikaali on karboksyylihappo ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ), joka on sitoutunut isoksantopteriini-8-aldoglykosidin 6-asemaan. Alempi alkoksi-karbonyli-radikaali voidaan katsoa 6-karboksi-isoksantopteriinin esteriksi, joka on muodostunut alemman alkyylialkoholin kanssa, jolloin alkoholin alempi alkyyliosaa on alempi alkyyli-radikaali, kuten edellä kuvattiin. Esimerkkejä estereistä ovat etyyli-, metyyli-, t-butyli-, neo-pentylikarboksylaattit ja niiden kaltaiset. Näitä estereitä voidaan myös nimittää etoksikarbonyyliksi, metoksikarbonyyliksi, t-butoksikarbonyyliksi ja neo-pentoksikarbonyyliksi vastaavasti.

Alempi alkyyli-karboksiradikaaleja ovat edellä kuvatut alempi alkyyli-radikaalit, jotka sisältävät edelleen karboksiryhmän. Alempi-alkoksi-alempi-alkyyli-karbonyli-radikaalit voidaan katsoa substituentti-alempi-alkyyli-karboksiradikaalien estereiksi, joilla on alempia alkyylialkoholeja, jotka kuvattiin juuri edellä. Esimerkit alemmista alkyyli-karboksiradikaaleista käsittävät karboksimetyyliin, 2-karboksietyyliin, 2-karboksiheksyyliin ja niiden kaltaiset. Esimerkit alempi-alkoksi-alempi-alkyyli-karbonyli-radikaaleista käsittävät 3-isopropoksikarbonylipropyyliin, 4-heksyylioksikarbonylipentyyliin ja niiden kaltaiset.

Karboksamido- ja alempien alkyylikarboksamidoradikaalien voidaan katsoa muodostuneen karboksi- tai alemmasta alkyyli-karboksi-substituentista tai amiinista. Karboksamidoryhmällä on kaava  $\text{CONR}_3\text{R}_4$ , jossa  $\text{R}_3$  ja  $\text{R}_4$  ovat samat tai erilaiset ja ovat valitut

ryhmästä, joka koostuu vedystä ja alemmasta alkyylistä. Vaihtoehtoisesti  $NR_3R_4$  yhdessä voivat muodostaa heterosyklisen renkaan, jossa on viisi tai kuusi atomia renkaassa. Esimerkit käyttökelpoisista amiineista käsittävät metyyliamiinin, propyyliamiinin, sek.-butyyliamiinin, heksyyliamiinin, dimetyyliamiinin, metyylietyyliamiinin, butyyliheksyyliamiinin, pyrrolidiinin, morfoliinin, piperidiinin, pyrrolin ja 4-metyylipiperatsiinin. Substituomattomat karboksiamidit (joissa  $R_3$  ja  $R_4$  ovat vety) ovat muodostuneet ammoniakista amiinina.

Alemmat alkanoyyliradikaalisubstituentit, jotka tunnetaan alempi-  
na asyyli- tai asyyliradikaaleina, sisältävät karbonyyliryhmän sitoutuneena suoraan isoksantopteriinirenkään 6-asemaan muodostaen siten ketonikoostumukset tai aldehydin, kuten on tarkoituksenmukaista. Esimerkit alemmista alkanoyyliryhmistä sisältävät formyylin, asetyylin, propionyylin, 2-metyylipropionyylin, butyryylin, 3-metyylivaleryylin ja niiden kaltaiset. Radikaalin asyylihiiltä pidetään osana "alempaa" alkanoyyli- tai asyyli-ryhmää.

Alempi alkyyli- tai alempi asyyli- tai asyyliradikaali katsotaan tio-  
esteriksi, joka koostuu isoksantopteriinijohdannaisen ja alempi  
alkyylikarbonihapon sopivasta 6-merkaptosubstituentista. Esimerkkejä tällaisista radikaaleista ovat tioasetyyli, tiopropionyyli, tioheksanoyyli ja niiden kaltaiset.

Alempi-alkyleeni-alempi-alkyylikarboksylaattiradikaali voidaan katsoa substituentti-hydroksi-alempi-alkyyli- tai asyyliradikaalin ja alempi alkyylikarboksyylihapon esteriksi. Hydroksi-alempi-alkyyli- tai asyyliradikaalin substituenteista on keskusteltu aikaisemmin, koska niillä on alemman alkyylikarboksyylihappojen alempi alkanoyyli- (alempi-alkyyli) osat, jotka voivat olla läsnä tällaisissa estereissä.

Isoksantopteriini-8-aldoglykosidit ovat heikkoja emäksiä ja voivat sellaisenaan muodostaa happoadditiosuoloja. Isoksantopteriinijohdannaisen farmaseuttisesti hyväksyttävät ei-toksiset happoadditiosuolat ovat tässä käyttökelpoisia ja ne voidaan muodostaa käsittelemällä isoksantopteriini-8-aldoglykosidi sopivalla hapolla. Esimerkit ei-orgaanisista hapoista käsittävät kloorivety-

hapon, bromivetyhapon, rikkihapon, fosforihapon ja niiden kaltaiset hapot. Esimerkit orgaanisista hapoista käsittävät etikkahapon, propionihapon, glykolihapon, palorypälehapon, malonihapon, sukkiinihapon, maleiinihapon, fumaarihapon, maliinihapon, viinihapon, sitruunahapon, bentsoehapon, kanelihapon, mandeliinihapon, metaanisulfonylhapon, etaanisulfonylhapon, bentseenisulfonylhapon, p-tolueenisulfonylhapon, salisyylihapon, p-aminosalisyylihapon ja niiden kaltaiset hapot. Päinvastoin voidaan happoadditiosuolamuoto muuntaa vapaa emäsmuodoksi käsittelemällä alkalilla.

Käyttökelpoiset isoksantopteriinijohdannaiset sisältävät myös 6-substituoituja karboksyylihappoja ja alempia alkyylisubstituoituja karboksyylihappoja, kuten jo todettiin. Näiden karboksyylihappojen emäksisiä suoloja tarkastellaan myös ja ne on muodostettu käsittelemällä karboksyylihappoa sopivalla alkalisella reagenssilla, jotta muodostuu 6-isoksantopteriini-8-aldoglykosidi-karboksylaatti-kationisuola. Esimerkit ei-toksisista tällaisten karboksyylihappojen kationisuoloista käsittävät natriumin, kaliumin, sinkin, alumiinin, kalsiumin, magnesiumin ja niiden kaltaiset.

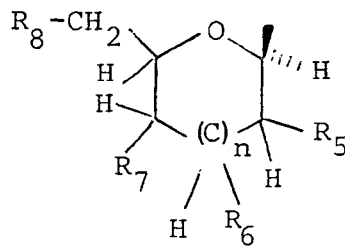
Käyttökelpoisten isoksantopteriinijohdannaisten 8-aldoglykosidi-osat ( $R_2$ ) ovat syklisiä, käsittävät 5 tai 6 hiiliatomia ja ne on valittu ryhmästä, joka käsittää 1'-aldopentosidyyli-, 1'-aldoheksosidyyli-, mono-deoksygenoidun 1'-aldopentosidyyli- ja mono-deoksygenoidun 1'-aldoheksosidyyli-radikaalin.

Esimerkkejä 1'-aldopentosidyyli-radikaaleista ovat riboosin, arabiinooosin, lyksoosin ja ksyloosin 1'-radikaalit, joiden nimet ovat 1'-ribofuranosidyyli-, 1'-arabinofuranosidyyli-, 1'-lyksofuranosidyyli- ja 1'-ksylofuranosidyyli-radikaali vastaavasti. Esimerkkejä 1'-aldoheksosidyyli-radikaaleista ovat glukoosin, galaktoosin, mannoosin, guloosin, alloosin, altroosin ja ramnoosin 1'-radikaalit, joiden nimet ovat 1'-glukopyranosidyyli-, 1'-galaktopyranosidyyli-, 1'-mennopyranosidyyli-, 1'-gulopyranosidyyli-, 1'-allopyranosidyyli-, 1'-altropyranosidyyli-, 1'-ramnopyranosidyyli-radikaali vastaavasti. Esimerkki mono-deoksygenoidusta 1'-aldopentosidyyli-radikaalista on deoksiriboosin radikaali, jonka nimi on 1'-(2'-deoksi)-ribofuranosidyyli-radikaali. Esimerkki

mono-deoksygenoidusta 1'-aldoheksosidyyli-*radikaalista* on deoksi-*guloosin radikaali*, jota nimitetään 1'-(2'-deoksi)guloopyranosidyyli-*radikaaliksi*.

Käyttökelpoisilla aldoglysidyyli-*radikaaleilla* voi olla yksi tai useampia hydroksyyli-*ryhmiä*, jotka on esteröity alemmalla alkanoyli-*radikaalilla*, kuten formyyllillä, asetyyllillä, propionyyllillä tai heksanoyllillä tai myös bentsooyli-*radikaalilla*. Aldoglukosidyyli-*radikaalit* ovat myös käyttökelpoisia, kun ne on esteröity alemmalla alkyyllillä, erityisesti metyyli- ja etyyli-*radikaaleilla*, samoin kuin bentsoyलिएetterit ovat myös käyttökelpoisia.

Sopivat aldoglukosidyyli-*radikaalit* ovat kaavan



mukaisia,

jossa kaavassa  $n$  on yksi tai nolla;

$R_5$  on vety, hydroksi, alempi alkoksi, kuten metoksi ja etoksi (ja muut kuten edellä kuvattiin), bentsoylioksi-, alempi alkanoylioksi, kuten formyylioksi, asetoksi (ja muu alempi alkyyli-*karboksylaattiradikaali*, kuten edellä kuvattiin) tai bentsoksi.

$R_6$ , kun se on läsnä, samoin kuin  $R_7$  ja  $R_8$  ovat kaikki samat. Nämä *radikaalit* voivat olla hydroksi, alempi alkyyलिएetteri (alempi alkoksi), kuten metoksi ja etoksi, bentsoyलिएetteri (bentsoylioksi), alempi alkanoyli-*radikaali* (alempi asyyli), kuten formyylioksi, asetoksi, tai bentsoaattiesteri (bentsoksi). Kun  $R_5$  on muu kuin vety,  $R_5 = R_6$  kun läsnä =  $R_7 = R_8$ . Tällöin O-*substituentti*, jos se on läsnä yhdessä happiatomissa, on läsnä kaikissa käytettävissä olevissa renkaan *substituenttihakpi-atomeissa*.

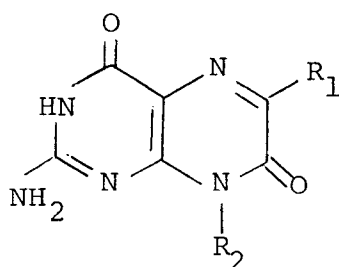
Edellä olevan kaavan *sidokset* eivät ole tarkoitettu ilmaisemaan

mitään sterespesifistä konfiguraatiota, paitsi 1'-asemassa, jossa beta-anomeeri on kielletty.

Edullisessa käytössä valitaan aldoglykosidyyli-radikaali ryhmästä, joka koostuu 1'-ribofuranosidyyli-, 1'-glukopyranosidyyli- ja 1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli-radikaaleista. Tällöin edullisesti kun  $n$  on nolla ja  $R_5$ ,  $R_7$  ja  $R_8$  ovat kaikki hydroksi,  $R_6$  on poissa, aldoglykosidyyli-radikaali valitaan ryhmästä, joka koostuu 1'-ribofuranosidyylistä; kun  $n$  on nolla,  $R_5$  on vety ja  $R_7$  ja  $R_8$  ovat hydroksi,  $R_6$  on poissa, aldoglykosidyyli-radikaali on 2'-deoksi-1'-ribofuranosidyyli; ja kun  $n$  on 1 ja  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8 =$  hydroksi, 1'-glukopyranosidyyli on aldoglykosidyyli-radikaali.

Kuten jo mainittiin, aldoglykosidi on sitoutunut 1'-asemastaan isoksantopteriinijohdannaisen 8-asemaan. Silloin kun nimitys on isoksantopteriinijohdannainen, tätä sidosta voidaan kuvata 8-1'-sidokseksi. Aldoglykosidin beta-anomeeriä pidetään edullisena vaikka alfa- ja beta-anomeerien seoksia voidaan myös käyttää. Käytetty aldoglykosidi on D-stereokonfiguraatiossa ja tätä konfiguraatiota edellytetään, vaikkei sitä ole mainittu.

Esimerkkinä olevien isoksantopteriinijohdannaisten rakennekaavat, jotka johdannaset ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä, ovat esitetty jäljempänä, jolloin  $R_1$  ja  $R_2$  ovat kuten on esitetty taulukossa, joka seuraa rakennekaavaa.



Taulukko

<u><math>R_1</math></u>	<u><math>R_2</math></u>
metyyli	1'-arabinofuranosidyyli
iso-propyyli	1'-lyksofuranosidyyli
n-butyli	1'-ribofuranosidyyli

t-butyyli	1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli
neo-pentyyli	1'-ksylofuranosidyyli
n-heksyyli	1'-gulopyranosidyyli
bentsyyli	1'-galaktopyranosidyyli
fenetyyli	1'-mannopyranosidyyli
2-fenyylipropyli	1'-(2',3',4',6'-tetra-O-asetyyli)-glukopyranosidyyli
2-fenyli-3-metyylipentyyli	1'-(2',3',5'-tri-O-asetyyli)ribofuranosidyyli
o-ksylyyli	1'-(2',3',5'-tri-O-asetyyli)arabinofuranosidyyli
p-(2-heksyyli)fenyyli	1'-(2'-deoksi-3',5'-di-O-metyyli)-ribofuranosidyyli
m-(iso-propyyli)fenyyli	1'-(2',3',4',6'-tetra-O-etyyli)-glukopyranosidyyli
p-(trifluorometyyli)fenyyli	1'-(2',3',5'-tri-O-bentsyyli)-ribofuranosidyyli
o-metoksifenyyli	1'-(2',3',5'-tri-O-bentsoyyli)-ribofuranosidyyli
m-sek.-butoksifenyyli	1'-(2',3',4',6'-tetra-O-etyyli)-glukopyranosidyyli
p-(2-etyylibutoksi)fenyyli	1'-(2'-deoksi-3',5'-di-O-metyyli)-ribofuranosidyyli
o-klorofenyyli	1'-glukopyranosidyyli
m-bromofenyyli	1'-allopyranosidyyli
p-fluorofenyyli	1'-altropyranosidyyli
hydroksi	1'-ramnopyranosidyyli
merkapto	1'-galaktopyranosidyyli
metoksi	1'-glukopyranosidyyli
iso-propoksi	1'-ksylofuranosidyyli
n-heksyylioksi	1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli
bentsoksi	1'-ribofuranosidyyli
2-fenylietoksi	1'-lyksofuranosidyyli
2-fenyylipropoksi	1'-(2'-deoksi)gulopyranosidyyli
kloori	1'-glukopyranosidyyli
bromi	1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli
fluori	1'-ribofuranosidyyli
jodi	1'-ribofuranosidyyli

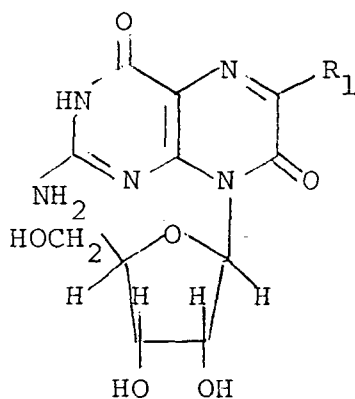
etyylisulfidi	1'-glukopyranosidyyli
bentsyylisulfidi	1'-arabinofuranosidyyli
karboksi	1'-lyksofuranosidyyli
karbometoksi	1'-ribofuranosidyyli
karbetoksi	1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli
karbo-t-butoksi	1'-ksylofuranosidyyli
neo-pentoksikarbonyyli	1'-glukopyranosidyyli
2-karboksietyyli	1'-galaktopyranosidyyli
4-karboksibutyli	1'-mannopyranosidyyli
etyylikarboksimetyyli	1'-(2',3',4',6'-tetra-O-asetyyli)- glukopyranosidyyli
sek-.butyylikarboksietyyli	1'-(2',3',5'-tri-O-asetyyli)ribo- furanosidyyli
natriumkarboksi	1'-(2',3',5'-tri-O-asetyyli)arabino- furanosidyyli
hydroksimetyyli	1'-(2',3',5'-tro-O-metyyli)ribo- furanosidyyli
2-hydroksietyyli	1-(2',3',4',6'-tetra-O-bentsyyli)- allopyranosidyyli
1,2-dihydroksietyyli	1'-(2'-deoksi)gulopyranosidyyli
1,2,3-trihydroksipro- pyyli	1'-ramnopyranosidyyli

Erityisen edullisia isoksantopteriini-8-glykosideja ovat ne, joilla on vety, hydroksi, alempi alkyyli, kuten metyyli, karboksi ja alempi alkyyliekarboksyylaatti, kuten etyyli- tai metyyli-karboksyylaatti (etoksikarbonyyli tai metoksikarbonyyli) ja polyhydroksi-alempi-alkyyli sitoutuneena 6-asemaan, jossa molekyylin 8-aldoglykosidiosa on beta-1-ribofuranosidyyli, beta-1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli ja beta-1'-glukopyranosidyyli. Esimerkkejä tällaisista erityisen edullisista aineista ovat:

8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriini;  
 8-(1'-beta-D-2'-deoksiribofuranosidyyli)isoksantopteriini;  
 8-(1'-beta-D-glykopyranosidyyli)isoksantopteriini;  
 6-hydroksi-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriini;  
 6-hydroksi-8-(1'-beta-D-2'-deoksiribofuranosidyyli)isoksantopte-  
 riini; 6-hydroksi-8-(1'-beta-D-glykopyranosidyyli)isoksantopte-

riini; 6-metyyli-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli) isoksantopteriini; 6-metyyli-8-(1'-beta-D-glykopyranosidyyli) isoksantopteriini; 6-metyyli-8-(1'-beta-D-2'-deoksiribofuranosidyyli) isoksantopteriini; 6-karboksi-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli) isoksantopteriini; 6-karboksi-8-(1'-beta-D-glukopyranosidyyli) isoksantopteriini; 6-karboksi-8-(1'-beta-D-2'-deoksiribofuranosidyyli) isoksantopteriini; 6-metoksykarbonyyli-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli) isoksantopteriini; 6-metoksykarbonyyli-8-(1'-beta-D-2'-deoksiribofuranosidyyli) isoksantopteriini; ja 6-metoksykarbonyyli-8-(1'-beta-D-glukopyranosidyyli) isoksantopteriini.

Eriyisen edullisia tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettäviä isoksantopteriinijohdannaisia ovat ne koostumukset, joissa  $R_2$  on 1'-D-ribofuranosidyyli- $\beta$ -dikaali, ja jossa  $R_1$  on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, metyylistä ja karboksista. Näillä koostumuksilla on rakenteet, jotka ovat kaavan



mukaisia,

jossa  $R_1$  on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, metyylistä ja karboksista.

#### B. Kosketuksiin saatettavat koostumukset

Tässä keksinnössä käytettävä aktiivinen aine, joka on isoksantopteriini, saatetaan kosketuksiin eläinsolujen kanssa, joiden vasteet ovat moduloitavissa in vitro soluviljelmissä tai in vivo antamalla eläimelle peroraalisesti tai parenteraalisesti tavantoinen annosyksikkö koostumuksia, so. koostumukset sisältävät yksikköannoksen muodossa fysiologisesti siedettävän kantoaineen sekoitettuna isoksantopteriinin vaikuttavaan yksikkömäärään.

Termi "yksikköannos" ja sen kieliopilliset muodot, siten kuin niitä on käytetty tässä, tarkoittavat fysikaalisesti erillisiä yksikköjä, jotka ovat sopivia yksikköannoksia ihmispotilaille sekä muille lämminverisille eläimille, jokainen yksikkö sisältää ennalta määritellyn tehokkaan määrän aktiivista ainetta, jonka on laskettu aiheuttavan toivotun terapeuttisen vaikutuksen yhdessä tarvittavan fysiologisesti siedettävän kantoaineen, esim. laimennusaineen tai apuaineen kanssa. Tämän keksinnön mukaisten uusien yksikköannostusmuotojen erittely annetaan ohessa ja ne ovat suoraan riippuvaisia (a) aktiivisen isoksantopteriini johdannaisaineen ainutlaatuisista piirteistä ja erityisen terapeuttisesta vaikutuksesta, joka saavutetaan, ja (b) rajoituksista, jotka ovat luontaisia seostuksen alalla, kuten aktiivinen aine terapeuttista käyttöä varten in vitro yhtä hyvin in vivo ihmisissä ja muissa eläimissä.

Esimerkkejä sopivista yksikköannosmuodoista ovat tämän keksinnön mukaisesti tabletit, kapselit, pillerit, jauhepaketit, granulat, purutabletit ja niiden kaltaiset, minkä tahansa edellä olevan segregoidut kerrannaiset, samoin kuin nestemäiset liuokset, emulsiot ja suspensiot. Nestemäiset koostumukset voidaan antaa tavallisin tavoin, kuten ihonalaisesti, intraperitoneaalisesti, intramuskulaarisesti, peroraalisesti tai niiden kaltaisesti.

Aktiivisen aineen määrä, joka annetaan in vivo, riippuu potilaan iästä ja painosta, käsiteltävän erityisestä kunnosta, antamisen lukuisuudesta ja antamistavasta. Annos voi olla alueella noin 0,01 - 200 mg ruumiinpainon kiloa kohti, edullisimmin noin 0,1 - noin 25 mg ruumiinpainon kiloa kohti ja edullisimmin noin 1 - noin 10 mg ruumiinpainon kiloa kohti. Täysikasvuisen aikuisen annos on alueella noin 5 - noin 1400 mg päivittäin annettuna yhtenä annoksena tai jaettuna 3 tai 4 osaan. Eläinten annokset vastaavat ihmisten annoksia annettujen määrien ollessa suhteessa eläimen painoon ja aineenvaihduntaan verrattuna täysikasvuiseen ihmiseen.

Konsentraatiot eläinsolujen in vitro-kosketuksiin saattamista varten ovat noin  $1 \times 10^{-8}$ -moolisia - noin  $1 \times 10^{-3}$ -moolisia solukonsentraatioille, joissa on noin  $2-5 \times 10^6$  solua millilitraa

kohti. Edullisimmin konsentraatio on noin  $1 \times 10^{-7}$ -moolisesta noin  $1 \times 10^{-4}$ -mooliseen ja vielä edullisimmin noin  $3 \times 10^{-6}$ -moolisesta noin  $3 \times 10^{-5}$ -mooliseen samoissa solukonsentraatioissa. Koostumus eläinsolujen kosketuksiin saattamista varten voi olla kiinteää tai nestemäistä. Isoksantopteriinijohdannainen voidaan sekoittaa kiinteään isoksantopteriinijohdannaisen suspensioksi kiinteään tai nestemäiseen fysiologisesti siedettävään kantoaineeseen tai voidaan liuottaa liuoksena tai suspendoituuna kantoaineeseen tai niiden yhdistelmänä.

Fysiologisesti siedettävät kantoaineet ovat hyvin tunnettuja alalla. Esimerkkejä nestemäisistä kantoaineista ovat steriilit vesipitoiset liuokset, jotka eivät sisällä mitään aineita lisättyinä aktiiviseen aineeseen ja veteen tai sisältävät puskuria, kuten natriumfosfaattia fysiologisessa pH-arvossa, fysiologista suolaliuosta tai molempia, kuten fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta. Lisäksi vesipitoiset kantoaineet voivat sisältää useampaa kuin yhtä puskurisuolaa, kuten sellaisia suoloja kuin natrium- ja kalsiumkloridi, dekstroosi ja muut liuotteet. Näitä viimeksi mainittuja kantoaineita valaisevat Ringerin ruiske, dekstroosiruiske, dekstroosi- ja natriumkloridiruiske ja laktooitu Ringerin ruiske.

Nestemäiset koostumukset voivat sisältää myös nestefaaseja veden lisäksi ja sen puuttuessa. Esimerkkejä sellaisista lisänestefaaseista ovat glyseriini, kasviöljyt, kuten puuvillansiemenöljy tai seesamiöljy ja vesi-öljyemulsiot.

Esimerkit kiinteistä kantoaineista käsittävät ne aineet, joita tavallisesti käytetään pillereiden tai tablettien valmistuksessa ja ne käsittävät maissijauhon, laktoosin, dikalsiumfosfaatin, paksunnosaineita kuten tragantti ja metyyliiselluloosa U.S.P., hienojakoinen  $\text{SiO}_2$ , polyvinyylipyrrolidoni, magnesiumstearaatti ja niiden kaltaiset. Lisäksi kiinteät kantoaineet voivat sisältää biologisesti hajotettavia ja ei-biologisesti hajotettavia polymeerejä, polypeptidikantoaineita, affiniteettikantoaineita, kuten AFFI-GEL 601 (fenyyli-boronaattihartsia, jota saadaan Bio-Rad Laboratories'ta, Richmond, CA), ja liposomeja, kuten

alalla on tunnettua. Antioksidantteja, kuten metyyliiparabeeniä ja propyyliiparabeeniä voi olla läsnä sekä kiinteissä että nestemäisissä koostumuksissa samoin kuin makeutusaineita, kuten ruoko- tai juurikassokeria, natriumsakkariinia, natriumsyklatiinia ja dipeptidimetyyliesterimakeuttajaa, jota myy tavaramerkillä NUTRASWEET (aspartaami) G.D.Searle Co.

Koostumuksen ja eläinsolujen välistä kosketusta pidetään yllä ajanjakso, joka on riittävä kosketukseen saatetuille soluille, jotta ne osoittavat soluvasteensa modulointia. Soluvasteen modulointi (toiminta) voi ilmetä itsessään tehostuneena vasta-aine-eirityksenä, tehostuneena T-auttajatoimintana, tehostuneena sytokiinituotantona ja niiden kaltaisena.

In vivo-käyttöä varten eläinsolujen ja koostumuksen optimaalisten konsentraatioiden välistä kosketusta pidetään tyypillisesti yllä ajanjakso, joka on riittävä, jotta eläin poistaa aineenvaihdunnallaan, eritteinä tai molemmin tavoin isoksantopteriinijohdannaisen kehostaan. Tämä ajanjakso voi olla pidempi kuin mitä vaaditaan soluvasteen ilmenemiseen. Yksilöllisen yksikköannoksen kosketusta pidetään yllä tavallisesti noin yhden päivän ja noin seitsemän päivän välinen ajanjakso. Jatkuvasta kosketuksesta voi olla etua immunovajavaiselle isäntäeläimelle.

Kosketusta in vitro voidaan ylläpitää ajanjakso, joka on riittävä jonkin edellä kuvatun solutoiminnan ilmenemiseksi, kuten on määritelty vakiotutkimusmenetelmillä. Tällaiset ylläpitoajat kestävät tyypillisesti noin yhdestä noin seitsemään päivään ja tavallisimmin noin kahdesta noin neljään päivään.

### C. Moduloidut soluvasteet

#### I. In vitro-apuaineistus

Saattamalla eläinten vasta-ainetta tuottavat solut kosketuksiin tämän käyttökelpoisen koostumuksen kanssa saadaan apuvaikutus primääriin soluvasteeseen SBRC:ä ja muita immunogeeneja (antigeenit) vastaan, kun arvioidaan in vitro. Immuunivastetta moduloivaa koostumusta ja vaikuttavaa määrää immunogeeniä (lampaan punaiset verisolut; SBRC) sekoitetaan tavanomaisesti niiden

saattamiseksi olennaisen samanaikaisesti kosketuksiin solujen kanssa. Sanoja "antigeeni" ja "immunogeeni" on käytetty samankirkityksisest.

Optimaalisessa konsentraatiossa koostumus sisältää tehokkaan määrän käyttökelpoista isoksantopteriini johdannaista, joka tehostaa vastetta SRBC:ään 2-6-kertaisesti. Vaikutus on annoksesta riippuvainen. Vasta-aine vasteen tehostamista ei voida selittää spesifisellä vasteella SRBC:tä vastaan eikä polyklonaalisella vasteella isoksantopteriini johdannaiseen.

Koostumuksen apuvaikutus, joka koostumus sisältää käyttökelpoisen isoksantopteriini johdannaisten, vaikuttaa sekä soluihin, joilla on immunogeenikokemusta (herätetyt) että naiveihin soluihin. Molemmat vasteet tehostuvat saattamalla solut kosketuksiin koostuksien kanssa, jotka sisältävät vaikuttavan määrän isoksantopteriini johdannaista. Tämä apuvaikutus riippuu viljelmään lisätyn immunogeenin konsentraatiosta.

Joskin immuunivasteiden, so. B-lymfosyyttien tai B-solujen vasteteiden, havaitaan tehostuneen immunogeenin kaikilla immunogeenisesti vaikuttavilla määrillä, tehostumisen määrä on tavallisesti suurin optimaalisilla tai lähes optimaalisilla immunogeenikonsentraatioilla. Lisäksi isoksantopteriini johdannaissadjuvantiteetti on synergistinen immunogeenin kanssa eikä juuri vaikuta itsenäisten immunogeenispesifisten ja polyklonaalisten (ei-spesifisten) vasteteiden yhteismäärään.

Vasta-ainetuotannon tehostuminen koostumuksilla jotka sisältävät isoksantopteriini johdannaista, ei koske vain ainoastaan naiiveja, immunogeenikokemattomia B-soluja, vaan myös immunogeenikokeneita tai muisti-B-soluja, kuten aikaisemmin huomautettiin. Täten primäärit IgM- samoin kuin sekundaarit IgM- ja IgG-vasteet immunogeeniin (antigeeni) lisääntyvät saatettaessa B-solut kosketuksiin koostumuksen kanssa, joka sisältää vaikuttavan määrän isoksantopteriini johdannaista aktiivisena aineena ja kun tätä kosketusta pidetään yllä, kuten edellä selitettiin.

Muistivasteita varten B-solut herätetään käsittelemällä vaikuttavalla herättävällä määrällä immunogeenia, kuten hyvin tiedetään. Tämä herättävä käsittely voi tapahtua immuunivastetta moduloivan koostumuksen läsnä- tai poissaollessa. Kun se saatetaan kosketuksiin tällaisen koostumuksen läsnäollessa, on B-solujen käsitteleminen immunogeenin herättävällä määrällä edullisesti olennaisen samanaikainen; so. noin 12 tunnin sisällä saattamalla solut kosketukseen tämän keksinnön mukaisesti käytettävällä koostumuksella. Edullisemmin immunogeeni sisällytetään immuunivastetta moduloivaan koostumukseen, jollei sen vaikutus heikkene ollessaan tässä koostumuksessa, esim. denaturoimisella.

Moduloitu soluvaste voidaan saada aikaan saattamalla B-solut kosketuksiin olennaisen yhtäaikaisesti vaikuttavan, herättävän immunogeenin ja immuunivastetta moduloivan tässä käyttökelpoisen koostumuksen määrän kanssa, jota seuraa, sen jälkeen kun primääri immuunivaste on saatu aikaan, herätettyjen solujen saattaminen lisäkosketuksiin edelleen vaikuttavan määrän kanssa immunogeeniä (antigeeniä) pelkästään tai oleellisen samanaikaisesti immuunivastetta moduloivan koostumuksen kanssa.

Kun B-solut on herätetty tässä käyttökelpoisen aineen poissaollessa, adjuvantisiteetti voi ilmetä, kun herätetyt solut käsitellään edelleen lisämäärällä vaikuttavaa immunogeenia olennaisesti samanaikaisesti näiden herätettyjen solujen ollessa kosketuksissa tähän käyttökelpoisen koostumuksen kanssa. Moduloitu soluvaste voidaan täten saada ilmenemään käsittelemällä B-solut, jotka on herätetty, vaikuttavalla, herättävällä määrällä immunogeenia, jossa on lisänä vaikuttava määrä immunogeenia ja immuunivastetta moduloivaa koostumusta, joka on tässä käyttökelpoinen, ja joka on saatettu kosketuksiin B-solujen kanssa edullisesti olennaisen samanaikaisesti (12 tunnin sisällä), kuin ne solut, jotka käsiteltiin toisella vaikuttavalla määrällä immunogeeniä.

Isoksantopteriini johdannaisista sisältävien koostumusten, jotka ovat tässä käyttökelpoisia, on ajateltu tehostavan primääriä humoraalista immuunivastetta vaikuttamalla suoraan B-soluun ja/tai soluun, jossa immunogeeni on läsnä. Täten näiden johdan-

naisten käyttö tehostaa vasta-ainevastetta, joka kohdistuu T-riippumattomia antigeeneja vastaan, so. vasteet, jotka kohdistuvat B-soluihin ja soluihin, joissa immunogeeni on läsnä. Lisäksi koostumukset, jotka sisältävät isoksantopteriinijohdannaisista voivat korvata B-solujen tarpeen T-auttajasoluille, kuten edellä selitettiin ja siten käynnistää apuvaikutuksensa viljelmissä, jotka on initioitu intaktisten funktionaalisten T-solujen poissaollessa. T-solujen korvaaminen T-soluauttajatoiminnalla, joka sisältyy sekalaiseen lymfosyyttiviljelmä-(MLC)-supernaatteihin, ei pienennä isoksantopteriinin kykyä lisätä vasta-ainevastetta.

Edelleen synergia, joka on havaittu liukenevan T-solusignaaliin, joka sisältyy MLC-supernaattiin, ja isoksantopteriinijohdannaisista sisältävän koostumuksen välillä, ilmaisee, että jokaisen syöttämä signaali on laadullisesti erilainen. Tämä synergia havaitaan laajalla alueella supernaattikonsentraatioissa, mikä ilmaisee, että isoksantopteriinijohdannainen ei aiheuta yksinkertaisesti useampaa samaa "signaalia" kuin T-solut aiheuttavat. Verrattavissa oleva synergian aste voidaan havaita, kun tällaiset T-soluviljelmät täydennetään T-soluilla enemmän kuin T-solun kaltaisilla supernaateilla (jotka ovat tosiasiaa johdettu T-soluista) ja saatetaan ne kosketuksiin immunogeenin läsnäollessa isoksantopteriinijohdannaisista sisältävän koostumuksen, joka on käyttökepeinen tässä keksinnössä, kanssa.

Isoksantopteriinijohdannaisien adjuvantisiteetin T-soluvälitteiset vaikutukset eivät sulkeudu pois tarkkailemalla T-riippumattomuutta tätä adjuvantisiteettiä varten, so. T-soluista riippumattoman pinnan olemassaolo ei tue T-soluista riippuvan faasin olemassaoloa. Täten olennaista tehostumista voidaan havaita koostumuksista, jotka sisältävät isoksantopteriiniä stimulointiolosuhteissa, joissa on alhaisia annoksia T-riippumatonta ja T-riippuvaista tyyppiin 2 antigeenia (T-soluista riippuvat tilanteet) kuin T-riippumatonta tyyppiin 1 antigeenia (täydellisemmin T-soluista riippumatonta), mikä viittaa T-soluista riippuvaisen komponentin läsnäoloon. Lisäksi isoksantopteriinijohdannaisen on ajateltu vaikuttavan (joko suoraan tai epäsuorasti) T-soluauttajien prekursoreihin lisäämällä näiden solujen populaa-

tiokykyä vahvistaen vasta-ainevastetta immunogeeneihin.

## 2. Immuunivasteen in vivo-modulointi

On havaittu immunopotentioivia vaikutuksia primäärivasta-aine-(B-solu)-vasteessa SRBC:hen in vivo, kun nestemäistä koostumusta, joka sisältää tässä käyttökelpoisen isoksantopteriinijohdannaisen, saatetaan kosketuksiin eläinsolujen kanssa, esimerkiksi injektoimalla koostumusta CBA/CaJ-hiireen 30 minuuttia SRBC-immunogeenin injektioon jälkeen, esim. olennaisen samanaikaisesti. Eläimet sietävät suhteellisen korkeita annoksia, esim. noin 2,5 mg per eläin (noin gramma per kilogramma).

Immunogeeniannosriippuvaisuusaluetta edellä mainitussa hiiressä isoksantopteriinijohdannaisen vakaan tason apuvaikutukseen, joka johdannainen on injektoitu intraperitoneaalisesti (i.p.), verrataan normaaliin suolaliuos (NS) i.p.-injektioihin kontrollina. Kun immuunivasteessa on tehostumista kaikilla käyttökelpoisilla immunogeeni-injektio-annoksilla, suurenee tavanomaisesti tehostuminen enemmän kuin pohjalla olevan vasteen suuruus lisääntyy.

Eläinsoluvasteiden in vivo-modulointiin, kuten edellä kuvattu primääri-immunisointi, voidaan vaikuttaa, kuten edellä kuvattiin suhteessa B-solujen sekundääri-immuunivasteiden in vitro-modulointiin.

## 3. T-soluja korvaava toiminta

Tämän keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää korvaamaan T-soluja vasta-ainevasteissa T-riippuvaa immunogeenia vastaan. Tällöin T-solu depletoidaan in vitro käsittelemällä täydentävillä ja monoklonaalisilla anti-thy-1,2-vasta-aineilla ja viljellään ilman tai SRBC:n kanssa immunogeenia koostumusten läsnäollessa, jotka sisältävät isoksantopteriinijohdannaisista lisääntyvinä pitoisuuksina. Näissä olosuhteissa eristetyt B-soluviljelmät eivät kykene reagoimaan immunogeeniin, jollei niitä täydennetä T-solun kaltaisella signaalilla, kuten sellaisella, joka sisältyy koostumukseen, joka sisältää vaikuttavan määrän isoksantopteriinijohdannaisista. Moduloitu soluvaste on annoksesta

riippuva samoin kuin immunogeenista riippuva. Lisäksi tämän vasteen ei katsota vaikuttavan B-solujen ei-spesifiseen polykloonaaliin aktivointiin.

Käyttämällä tämän keksinnön mukaista T-solun kaltaista signaalia immunogeenistimuloituihin B-soluihin syrjäytetään T-solujen tarve kokonaan olosuhteissa, jolloin tarvitaan muuten T-riippuvaista vastetta. Tällöin mureiini-B-soluviljelmien täydentäminen, jotka solut on depletoitu thy-1,2-sisältävillä T-soluilla, koostumuksella joka sisältää tehokkaan määrän isoksantopteriini-johdannaista, korvaa T-auttajasolutarpeen primaarisen vasta-ainevasteen generaatiossa SRBC:ää vastaan. Tämä ilmenee, jos splenosyytit on depletoitu T-soluista in vitro-käsittelyllä monoklonaalisilla anti-thy-1,2-vasta-aineilla ja komplementilla tai in vivo-injektiolla kaniinin anti-hiiri-thymosyytti-seerumia (ATS), jota seuraa in vitro-käsittely ATS:llä, anti-thy-1,2:-lla, anti-Lyt-1:llä ja anti-Lyt-2:lla ja komplementilla kuten Harwell et al. on kuvannut, J. Exp. Med. 152:893 (1980).

Tämän keksinnön mukaisen koostumuksen toimintamekanismin on ajateltu eroavan T-johdettujen lymfokiinien toimintamekanismista ja T-korvaavien (tai B-soluja stimuloivien) aktiivisuus sisältyy tähän. Tämä on osoitettu isoksantopteriinijohdannaisen ja T-auttajatekijän synergistisillä vaikutuksilla, joka generoidaan MLC-supernaateissa, jolloin supernaattit lisäävät anti-SRBC-peitetä muodostavaa solu-(PFC)-vastetta, jota vahvistetaan lisäämällä koostumuksia, jotka sisältävät tehokkaan määrän isoksantopteriinijohdannaista.

#### 4. Adjuvantisiteetti oraalisella annostuksella

Tämän keksinnön mukaisten koostumusten adjuvantisiteetti, joka koostumus on annettu in vivo i.p. tai ihonalaisella injektiolla on selitetty aikaisemmin. Tämän keksinnön mukaisten koostumusten adjuvantisiteetti, jotka koostumukset annetaan oraalisesti putkella, joka ulottuu eläimen mahalaukuun tai käyttämällä pyöreäkärkistä syöttöneulaa, joka ulottuu kunkin eläimen ruokatorveen voidaan myös käyttää.

Tällöin SRBC injektoidaan i.p. ja PFC-määrittely tehdään 7 päivää SRBC:n i.p.-initiaalisen injektoinnin jälkeen. Tässä käyttökelpoiset koostumukset, jotka sisältävät tehokkaan määrän isoksantopteriinijohdannaista, annetaan peroraalisesti joko saman vuorokauden aikana kuin SRBC:n immunogeeninen annos tai 72 tuntia sen jälkeen. Tämän keksinnön mukaisen koostumuksen antaminen sen saattamiseksi kosketukseen eläinsolujen kanssa saa aikaan tehostuneen primäärivasteen antigeenia vastaan joko saattamalla eläinsolut kosketukseen saman vuorokauden aikana, jona solut altistettiin immunogeenille tai 72 tuntia sen jälkeen.

In vitro-kosketuksiin saattamista varten solut viljellään tavanomaisesti väliaineessa, joka käsittää isoksantopteriinijohdannaista edellä kuvatussa konsentraatiossa. In vivo-kosketuksiin saattamista varten koostumus annetaan eläimelle yhden tai kaksi kertaa ja kosketusta ylläpidetään niin kauan kuin viimeksi annettu annos on poistunut eläimen kehosta ja siten kosketuksesta eläimen soluihin normaaleilla ruumiintoiminnoilla, kuten edellä on selostettu.

Esimerkki 1: Tabletit

Tabletit sisältävät seuraavia aineita:

	<u>Paino-osaa</u>
8-(1'-beeta-D-ribofuranosidyyli)- isoksantopteriini	0,5
Laktoosi, tomumaiseksi jauhettu	37,4
Maissijauho, kuiva	35,5
Hienojakoinen SiO <sub>2</sub>	5,6
Polyvinyylipyrrolidoni	0,6
Magnesiumstearaatti	<u>0,4</u>
	80,0

Isoksantopteriinijohdannainen sekoitetaan perusteellisesti laktoosiin, 25,0 paino-osaan maissijauhoa ja 4,0 paino-osaan SiO<sub>2</sub>:a. Saatava seos kostutettiin sitten tasaisesti polyvinyylipyrrolidonin 5 %:sella etanoliliuoksella. Kosteaa massaa kuljetetaan sitten yhden millimetrin mesh-seulan läpi, jotta saadaan

granulaatti. Tuotettu granulaatti kuivataan noin 24 h 60°C:ssa kammiokuivaamossa. Kuivattu granulaatti kuljetetaan uudelleen yhden millimetrin mesh-seulan läpi. 70,0 osaa saadusta granulaatista sekoitetaan sopivassa sekoittimessa seokseen, joka koostuu lopusta SiO<sub>2</sub>:sta, lopusta maissijauhosta ja kaikesta magnesiumstearaatista, joka seos on edeltä seulottu yhden millimetrin mesh-seulalla. Täten saatu seos puristetaan sitten tableteiksi, jotka painavat 800 mg kukin ja sisältävät 5 mg isoksantopteriiniä.

Esimerkki 2: Tärkkelyskapselit

Kapselin sisältö on yhdistetty seuraavista aineista:

	<u>Paino-osaa</u>
6-karboksi-8-(1'-beta-D-glukopyranosidyyli)isoksantopteriini	1,0
Laktoosi	450,0
Maissijauho	<u>549,0</u>
	1000,0

Isoksantopteriinijohdannainen sekoitetaan vähitellen laktoosiin. Kun kaikki laktoosi on sekoitettu, saatu seos yhdistetään maissijauhoon. Tuloksena oleva seos täytetään kapseleihin, jotka sisältävät 1,0 g seosta. Jokainen kapseli sisältää 1,0 mg isoksantopteriinijohdannaisista.

Esimerkki 3: Tabletit

10 000 tabletin erä, joista tableteista jokainen sisältää 50 mg 6-metyyli-8-(1'-beta-D-deoksiribofuranosidyyli)-isoksantopteriiniä, valmistetaan seuraavista aineityypeistä ja -määristä.

6-metyyli-8-(1'-beta-D-deoksiribofuranosidyyli)isoksantopteriini	500 grammaa
Dikalsiumfosfaatti	1000 grammaa
Metyyliselluloosa, U.S.P. (15 cps)	75 grammaa
Talkki	150 grammaa
Maissijauho	250 grammaa
Magnesiumstearaatti	<u>25 grammaa</u>
	2000 grammaa

Isoksantopteriinijohdannainen ja dikalsiumfosfaatti sekoitettiin hyvin, granuloiitiin 7,5-prosenttisessa metyyliiselluloosan vesiliuoksessa ja seulottiin seulan n:o 8 läpi (U.S. standardiseulasarja) ja kuivattiin huolellisesti. Kuivatut granulat seulottiin seulan n:o 12 läpi (U.S.-standardiseulasarja), sekoitettiin perinpohjaisesti talkin, tärkkelyksen ja magnesiumstearaatin kanssa ja puristettiin tableteiksi.

Näitä tabletteja voidaan käyttää vasta-ainetuotannon tehostamiseen, kun niitä annetaan suun kautta 1-3 tabletin annoksena joka 6-8 tunti.

Esimerkki 4: Injektoitavat valmisteet

Valmistettiin steriili valmiste, joka on sopiva ihonalaiseen tai intrakaviteettiseen injektointiin ja joka sisältää 50 mg 6-karboksietyyli-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä jokaisessa aineen millilitrassa ja se valmistettiin seuraavista aineista ja ainemääristä:

6-karboksietyyli-8-(1-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriini	5 grammaa
Fysiologinen suolaliuos	98 millilitraa
Puuvillasiemenöljy (tai seesamöljy)	2 millilitraa

Isoksantopteriinijohdannainen ja suolaliuos sekoitettiin ja sonikoitiin ajanjakso, joka oli riittävä saamaan aikaan olennaisen homogeenisen dispersion. Puuvillasiemenöljy (tai seesamöljy) sekoitettiin seuraavaksi ja uusi seos homogenisoitiin samalla tavoin emulsion aikaansaamiseksi. Emulgoinnin jälkeen tämän steriilin valmisteen lopputilavuudesta 1-3 % injektointiin subkutaanisesti tai intraperitoneaalisesti kerran viikossa tehostamaan humoraalista immuniteettiä.

Esimerkki 5: Vesipitoinen valmiste oraaliseen käyttöön

Valmistettiin vesipitoinen valmiste oraaliseen käyttöön, joka valmiste sisältää jokaisessa 5 ml:ssa (1 teelusikallinen) 5 milligrammaa 6-karboksi-8-(1'-beta-D-glukopyranosidyyli)isoksantopteriinia, seuraavista aineista:

6-karboksi-8-(1-beta-D-glukopyrano- sidyyli)-isoksantopteriini	1,0 grammaa
Metyyliparabeeni, U.S.P.	0,75 grammaa
Propyyliiparabeeni, U.S.O.	0,25 grammaa
Sakkariini-natrium	1,25 grammaa
Syklamaatti-natrium	0,25 grammaa
Glyseriini	300 millilitraa
Traganttumpulveri	1,0 grammaa
Appelsiiniöljyaromi	1,0 grammaa
F.D.- ja C.-appelsiiniväri	0,75 grammaa
Deionisoitu vesi, q.s.	1000 millilitraan saakka

Annos, joka on teelusikallinen, voidaan käyttää 2-4 kertaa päivässä humoraalisen immunitetin tehostamiseen.

#### Soluun yhteydessä olevat olosuhteet

##### Lymfosyyttiviljelmät

Valmistetaan seerumia sisältävä viljelyväliaine, joka sisältää seuraavia 100 millilitraa kohti: 91,9 millilitraa RPMI 1640:ä (Flow Laboratories, Inc., Rockville, MD), 0,1 ml 100 x glutamiinia, 1,0 ml 100 x natriumpyruvaattia, 1,0 ml 50 x ei-eetterisiä aminohappoja, 1,0 ml vettä, joka sisältää  $10^4$  yksikköä penisilliini G:tä ja  $10^4$  mikrogrammaa streptomysiiniä, ja 5,0 millilitraa ylläpitävän määrän fetaalista vasikanseerumia (FCS). Nämä ainekset sekoitettiin näennäisesti homogeenisiksi. Pernasolususpensiot ja populaatiot rikastettiin pernan B-soluiksi, jotka valmistettiin kuten Goodman et al. ovat kuvanneet J. Immunol., 212:1905 (1978).

Primäärin humoraalisen immuunivasteen arvioimista lampaan erytrosyyttejä (SRBC) varten,  $5 \times 10^6 - 10^7$  muriini-pernasolua viljeltiin 1,0 ml:ssa 5 % FCS:ää sisältävää väliainetta 4-5 päivää immunogeenin läsnäollessa. Soluja inkuboitiin viljelylevyillä (3424, Costar, Cambridge, MA)  $37^\circ\text{C}$ :ssa kostutetussa ilmakehässä 10 %  $\text{CO}_2$  ilmassa käyttäen kudosisviljelylaatikoita (CBS Scientific, Del Mar, CA), joita ravistettiin taajuudella 7 kierrosta min. Varastoitua SRBC:tä on saatavissa Colorado Serum Co.:lta, Denver, CO.

Peitteen muodostavien (PFC)-solujen viljely

SRBC:tä vastustavat PFC:tä erittävät vasta-aineet arvioitiin 4 tai 5 päivän viljelyn jälkeen käyttämällä Jernen ja Nordinin, Science, 140:405 (1983) hemolyyttisen peitekokeen modifikaatiota.

Hiiret. CBA/CaJ-hiiret, jotka olivat 8-16 viikon ikäisiä hankittiin Jackson Laboratorystä, Bar Harbor, ME. Kaikkia hiiriä ylläpidettiin Wayne Lab Blox F6-pelleteissä (Allied Mills, Inc., Chicago, IL) ja kloorattua vettä tehtiin happamaksi HCl:lla pH-arvoon 3,0.

Soluvalmisteet. Perna- ja kateenkorvasolususpensiot valmistettiin kuten Goodman et al. ovat kuvanneet J. Immunol., 121:1905 (1978). Kateenkorvasolut, jotka oli rikastettu T-lymfosyyttejä varten, valmistettiin kuljettamalla nylon-villa(NW)-kolonnin läpi Julius et al.:in ohjeen mukaisesti, Eur. J. Immunol., 3:645 (1973). B-solurikastetut populaatiot valmistettiin käsittelemällä  $10^8$  pernasolua monoklonaalisen anti-Thy-1,2-vasta-aineen (New England Nuclear, Boston, MA) 1:1000 liuksella 30 min  $4^{\circ}\text{C}$ :ssa. Käsitellyt solut sentrifugoitiin 280 x painovoimalla 10 min, vasta-aineet poistettiin ja solut uudelleensuspendoitiin CBA-RBC-absorboidun guineasian komplementissa  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa 45 min. Solut pestiin sitten ja viljeltiin kuten edellä kuvattiin.

Materiaalit. Tri. Wolfgang Pfleiderer, Konstanzin Yliopisto, Konstanz, Saksan Liittotasavalta, lahjoitti isoksantopteriini-8-beta-D-ribonukleosidin. Tri. Roland Robins, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, lahjoitti 8-oksoguanosiinin (8-oxoGuo). Ihmis-IL-2, erä 144-52, saatiin osittain puhdistettuna valmisteenä Electro-Nucleonics, Incista, Silver Spring, MD. Tämän valmisteen havaittiin olevan vapaa interferoni-gamma-aktiviteetista.

Injektiot. Hiiret injektioitiin i.p. pestyn SRBC:n suspension eri konsentraatioina suolaliuksessa. Sen jälkeen injektioitiin eri aikoina isoksantopteriinijohdannaisista erilaisina määrinä i.p. tai subkutaanisti. Isoksantopteriinijohdannaisia injektioitiin tavanomaisesti suspension suolavedessä, vesi-öljyemulsiossa tai 10 mg/ml natriumkarboksietyyli-selluloosassa (CMC) norma-

lissa suolaliuoksessa (NS) tai fysiologisessa suolaliuoksessa. Oraalisen syötön tutkimisen takia hiiret inkuboitiin poly(propyleeni)-katetreilla ulottuen suusta vatsalaukkuun tai pyöreäkärkisellä 20 gauge-syöttöneulalla ja mitatut koostumismäärät johdettiin niiden läpi.

Esimerkki 6: Primäärivasta-ainevasteen tehostaminen

$5 \times 10^6$  elinkelpoista hiiren pernasolua viljeltiin 1 ml:ssa serumia sisältävää väliainetta SRBC:n läsnä- tai poissaollessa kasvavin määrin 8-(1'-beta-D-ribofuranosudyyli)isoksantopteriiniä ollessa konsentraatioalueella nolasta (ei yhtään)  $1 \times 10^4$ -molaariseen. PFC:SRBC laskettiin 4 päivän kuluttua viljelystä.

Kahden tutkimuksen tulokset käyttäen mureiinijärjestelmää, kuten edellä kuvattiin, esitetään taulukossa 1, joka seuraa.

Taulukko 1

Isoksantopteriini-8-beta-D-ribosidin adjuvantiteetti muriiniin  
Primäärinen vasta-ainevaste

<u>Antigeeni</u> <sup>1</sup>	<u>Nukleosidi</u> <sup>2</sup>	Välitön anti-SRBC PFC/viljelmä	
		<u>Tutkimus 1</u>	<u>Tutkimus 2</u>
ei yhtään	ei yhtään	62	35
SRBC	ei yhtään	468	495
	Isoks. rib:a		
SRBC	$10^{-8}$	638	418
SRBC	$10^{-7}$	773	948
SRBC	$10^{-6}$	778	660
SRBC	$10^{-5}$	490	540
SRBC	$10^{-4}$	208	178
	8-oksoGuo:a		
SRBC	$3 \times 10^{-4}$	6217	-

<sup>1</sup>  $5 \times 10^6$  SRBC:ää käytetty antigeeninä per viljelmä.

<sup>2</sup> Nukleosidien on merkitty olevan poissa.

(ei yhtään) tai pitoisuudessa moolia/litra, esim.  $10^{-5}$ . Isoks.

Rib = isoantopteriini ribosidi, 8-oksoGuo = 8-oksoguanosiini.

Kuten voidaan nähdä PFC:n annoksesta riippuva tehostuminen SRBC:n ja isoksantopteriini johdannaisen läsnäollessa niissä viljelmissä, jotka sisältävät pelkästään SRBC:tä on otettu huomioon. Tämän koostumuksen aktiivisuus niinkin matalassa pitoisuudessa kuin  $10^{-8}$ -moolinen oli yllättävä.

Esimerkki 7: Sekundäärivasta-aine vasteen tehostuminen

$10^7$  elinkykyisiä SRBC-herätettyjä CBA/CaJ-hiiren pernasolua viljeltiin seerumia sisältävässä väliaineessa 8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriinin erilaisten pitoisuuksien läsnä tai poissaollessa, jossa oli yhdistettynä  $6 \times 10^5$  SRBC per ml viljelmää. Välitön PFC-suhde SRBC:hen määriteltiin 4 päivää viljelyn jälkeen. Erilaisia viljelmiä valmistettiin kontrolliksi käyttäen samoja differentiaalimääriä SRBC:tä, mutta josta puuttui isoksantopteriini johdannainen.

PFC:t lisääntyivät viljelmissä, jotka sisälsivät sekä isoksantopteriiniä että SRBC:tä verrattuna viljelmiin, jotka sisälsivät SRBC:tä yksin.

Käyttämällä 6-metyyli-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä ja 6-karboksi-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä saadaan samanlaisia tuloksia.

Esimerkki 8: Immuunivasteen in vivo-modulointi

CBA/CaJ-hiiret injektoidiin intraperitoneaalisesti  $6 \times 10^6$  SRBC:llä ja kolme päivää myöhemmin käytettiin kasvavia määriä 6-metyyli-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä CMC:ssä. Pitoisuuksia nollasta 2,5 milligrammaan per eläin käytettiin. Välittömän PFC:n määrittäminen suhteessa SRBC:hen 5 päivää sen jälkeen osoittaa vasta-aine vasteen annoksesta riippuvan tehostumisen.

Samanlaisia tuloksia saatiin käyttämällä 8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä ja 6-karboksi-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä isoksantopteriini johdannaisena.

Esimerkki 9: Ihmisen primääri-immuunivasteen in vitro-tehostaminen

Ihmisen periferiaalisia verilymfosyyttejä (PBL) valmistettiin normaalista heparinoidusta suoniverestä Ficoll-diatriatsoaattitaajuusgradienttisentrifugaatiolla. PBL poistettiin suppressori-T-soluista, joilla on histamiini-tyyppi-2-reseptori kiinnittämällä ne histamiini-kani-albumiinilla peitettyjen muovisten petrilevyjen pinnalle (Cell-ect n:o 2-välinesarja; Seragen, Boston, MA) ja ottamalla talteen ei-kiinnittyvät solut huuhtomalla, kuten Wysocki ja Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:2844 (1978) ovat kuvanneet, ja Cavagnaro ja Osband, Biotechniques, January/February: 30 (1983) modifioineet.

Näissä tutkimuksissa käytetty kudosisviljelyväliaine valmistettiin seuraavasti: sadasosa millilitraa (ml), joka sisälsi 87,9 ml RPMI 1640 (Flow Laboratories, Rockville, MD), 0,1 ml 100 x glutamiinia, 1,0 ml 1,0-moolista HEPES-puskuria (Microbiological Associates, Bethesda, MD), 1,0 ml vettä, joka sisälsi  $10^4$  U penisilliini G:tä ja  $10^4$  mikrogrammaa streptomysiiniä ja 10 ml tuoretta autologista kuumentamalla inaktivoitua plasmaa. Primäärin humoraalisen immuunivasteen SRBC:tä vastaan arvioimiseksi viljeltiin lymfoidisoluja tiheydessä  $2 \times 10^6$ /ml tilavuudessa 1,0 ml, joka sisälsi  $5 \times 10^6$  SRBC:tä antigeenina (Colorado Serum Co., Denver, CO) yhdessä IL-2:n ja isoksantopteriini-ribonukleosidin kanssa.

Peitettä muodostavien solujen (PFC), jotka erittävät vasta-ainetta SRBC:tä vastaan, luettelointi suoritettiin 6 päivää viljelyn jälkeen käyttäen Jerne ja Nordin, Science 140:405 (1963), hemolyttisen peitekokeen modifikaatiota. Solut käsiteltiin täydellisellä väliaineella ennen peittämistä; ne peitettiin standardissa matalassa  $M_T$  agarosissa (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) ja inkuboitiin SRBC:llä absorboidulla guinea-sian komplementilla yksi tunti 1,5 tunnin ilman komplementtia inkuboinnin jälkeen.

Kahden tutkimuksen tulokset on osoitettu taulukossa 2 jäljessä.

## Taulukko 2

Isoksantopteriini-8-beta-D-ribonukleosidin adjuvantisiteetti ihmiseen

## Primäärinen vasta-ainevaste

<u>Antigeeni</u> <sup>1</sup>	<u>Nukleosidi</u> <sup>2</sup>	Välitön anti-SRBC PFC/viljelmä <sup>3</sup>	
		<u>Tutkimus 1</u>	<u>Tutkimus 2</u>
ei	ei	7	12
SRBC	ei	5383	363
	Isoks.rib.:a		
SRBC	10 <sup>-8</sup>	5258	-
SRBC	10 <sup>-7</sup>	6017	-
SRBC	10 <sup>-6</sup>	5483	-
SRBC	10 <sup>-5</sup>	7592	665
SRBC	3 x 10 <sup>-5</sup>	-	248
SRBC	10 <sup>-4</sup>	32000	180
SRBC	3 x 10 <sup>-4</sup>	-	230
	8-oksoGuo:a		
SRBC	3 x 10 <sup>-4</sup>	-	1175
SRBC	10 <sup>-3</sup>	10000	-

<sup>1</sup>SRBC:tä käytetty antigeeninä 5 x 10<sup>6</sup> solua per viljelmä.

<sup>2</sup>Nukleosidejä on merkitty olevan poissa (ei) tai pitoisuudessa moolia per litra, esim. 10<sup>-5</sup> isoks.rib. = isoksantopteriini-ribosidi; 8-okso-Guo = 8-oksoguanosiini.

<sup>3</sup>Välittömästi anti-SRBC-peitettä muodostavat solut (PFC) per viljelmä määriteltiin kuten edellä käyttäen PBL:ää kahdesta eri ihmisluovuttajasta.

Kuten voidaan nähdä edellä annetuista tiedoista, saatiin annoksesta riippuva antigeenispesifinen tehostuminen isoksantopteriini-ribonulkeosidilla. Saadut tulokset olivat korkeammassa pitoisuudessa isoksantopteriinijohdannaista kuin mitä oli optimaalista esimerkin 6 hiirijärjestelmässä. Nämä tulokset ovat yhdenmukaisia muriini- ja ihmisjärjestelmien tulosten kanssa, jotka on havaittu käyttämällä 8-substituoituja guanosiineja. Katso

Goodman ja Hennen, Cell. Immunol., 102:395 (1986) ja Goodman ja Weigle, J. Immunol., 135:3284 (1985).

Esimerkki 10: T-soluja korvaava toiminta

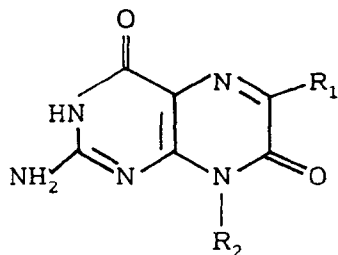
$4 \times 10^6$  elinkykyistä CBA/CaJ-hiiren pernasolua käsiteltiin ensin komplementtia kiinnittävillä monoklonaalisilla vasta-aineilla, jotka immunoreagoivat T-solujen thy-1,2-antigeenien kanssa ja toiseksi komplementilla, joka liuottaa minkä tahansa läsnä olevan T-solun (New England Nuclear, Boston, MA). Tällä tavoin käsitellyt T-solut kasvoivat sen jälkeen SRBC:n kanssa tai ilman sitä immunogeeninä seerumia sisältävässä väliaineessa sisältäen lisäksi kasvavia määriä 8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)-isoksantopteriiniä määrinä nolasta  $10^{-4}$ -mooliseen. Välitön PFC-suhde SRBC:hen määriteltiin 4 päivää sen jälkeen. Tämän tutkimuksen tulokset osoittavat, että isoksantopteriinijohdannaisen läsnäolo osallistuu B-soluvasteen indusoitumiseen immunogeeniin ja että indusoitu tulos on annoksesta riippuva. Täten saattamalla liukenemattomat pernasolut (esim. B-solut) kosketuksiin tähän käyttökelpoisen koostumuksen kanssa saadaan aikaan T-solukaltainen "signaali" näihin liukenemattomiin soluihin.

Samankaltaisia tuloksia on saatu käyttämällä 6-metyyli-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä ja 6-karboksi-8-(1'-beta-D-ribofuranosidyyli)isoksantopteriiniä korvaamaan edellä esitetty isoksantopteriinijohdannainen.

Esillä olevaa keksintöä on kuvattu ottaen huomioon edullisimmat suoritusmuodot. Alan asiantuntijalle on selvää, että esitetyn aiheen modifikaatioita ja/tai muunnelmia voidaan tehdä ilman poikkeamista tässä esitetyn keksinnön piiristä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä eläinten soluvasteen moduloimiseksi, t u n - n e t t u siitä, että eläinten solut saatetaan kosketuksiin in vitro koostumuksen kanssa, joka sisältää laimentavan määrän fysiologisesti siedettävää kantoainetta sekoitettuna vaikuttavaan määrään aktiivista ainetta, joka on isoksantopteriinijohdannainen, jonka rakenne on kaavan



mukainen, jossa

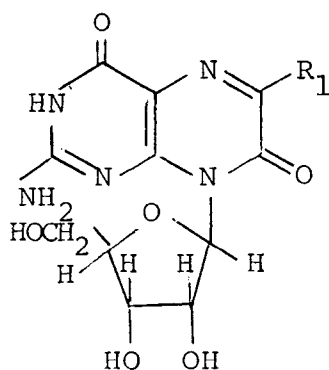
$R_1$  on radikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, alemmasta alkyylistä, hydroksi-alemmasta-alkyylistä, polyhydroksi-alemmasta-alkyylistä, fenyylistä, fenyyli-alemmasta-alkyylistä, alemmasta-alkyyli-fenyylistä, alemmasta-alkoksi-fenyylistä, halofenyylistä, trifluoro-metyylifenyylistä, hydroksista, oksosta, alemmasta alkoksista, fenyyli-alemmasta alkoksista, halosta, merkaptosta, tioksosta, alemmasta alkyylitiosta, alemmasta alkylooylitiosta, fenyyli-alemmasta-alkyylitiosta, alemmasta alkanoyylistä, karboksista, alemmasta alkoksikarbonyylistä, alemmasta alkylikarboksista, alemmasta-alkyleeni-alemmasta-alkyyli-karboksylaattista, alemmasta-alkoksi-alemmasta-alkyylikarbonyylistä ja karboksamidosta ja alemmasta-alkyyli-karboksamidosta, joissa karboksamidoryhmällä on kaava  $CONR_3R_4$ , jossa  $R_3$  ja  $R_4$  ovat samat tai erilaiset ja ne on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä ja alemmasta alkyylistä tai  $NR_3R_4$  yhdessä muodostavat heterosyklisen renkaan, jossa on viisi tai kuusi atomia renkaassa;

$R_2$  on beta-sitoutunut aldoglykosidiradikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu 1'-aldopentosidyylistä, 1'-aldoheksosidyylistä, monodeoksygenoidusta 1'-aldopentosidyylistä ja monodeoksygenoidusta 1'-aldoheksosidyylistä ja niiden O-substituoidusta alemmasta alkyylistä, alemmasta alkanoyylistä, bentsyyli- ja bentsoyyl johdannaisista, joissa O-substituentti, jos läsnä yhdessä happiatomissa, on läsnä kaikissa käytettävissä olevissa renkaan substituenttihakpiatomeissa;

sanotun isoksantopteriinijohdannaisen tautomeerit; ja sanotun isoksantopteriinijohdannaisen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat; ja sanotun kosketuksen ylläpitäminen ajanjakson, joka on riittävä sanotuille soluille niiden vasteen modulointiin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että  $R_2$  on valittu ryhmästä, joka koostuu 1'-ribofuranosidyyli-, 1'-(2'-deoksi)ribofuranosidyyli- ja 1-glukopyranosidyyli-radikaaleista.

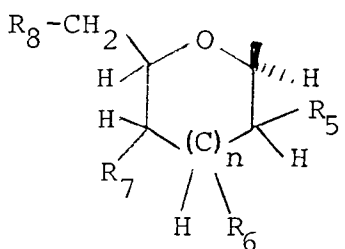
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sanotun isoksantopteriinikoostumuksen rakenne on kaavan



mukainen.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että  $R_1$  on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, metyylistä ja karboksista.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sanotun aldoglykosidyyli-radikaalin rakenne on kaavan



mukainen, jossa  $n$  on nolla tai yksi;

$R_5$  on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, hydroksista, alemmasta alkoksista, bentsyylioksista, alemmasta alkanoyylioksista ja bentsoksista;

$R_6$ ,  $R_7$  ja  $R_8$  ovat samat ja ovat valitut ryhmästä, joka koostuu hydroksista, alemmasta alkoksista, bentsyylioksista, alemmasta alkanoyylioksista ja bentsoksista; ja

jossa  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8$ , kun  $R_5$  on muu kuin vety.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että  $n$  on nolla ja  $R_5$ ,  $R_7$  ja  $R_8$  ovat vety.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että  $n$  on yksi ja  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  ja  $R_8$  ovat vety.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sanotut solut ovat leukosyyttejä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sanotut leukosyytit ovat B-lymfosyyttejä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisävaiheen sanottujen B-lymfosyyttien käsittelemiseksi vaikuttavalla määrällä immunogeenia ennen niiden saattamista kosketuksiin sanotun koostumuksen kanssa, jolloin sanottu immunogeeni herättää sanotut B-lymfosyytit.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sanotut B-lymfosyytit saatetaan kosketuksiin sanotun koostumuksen kanssa immunogeenin lisämäärän yhteydessä käytettynä ensin herättämään sanotut B-lymfosyytit immuunivastetta varten.

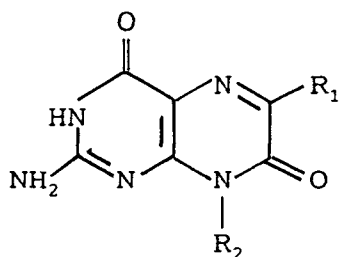
12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sanotut B-lymfosyytit saatetaan kosketuksiin sanotun koostumuksen kanssa olennaisen samanaikaisesti immunogeenin vaikuttavan määrän kanssa.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eläinten soluvaste, jota moduloidaan, on immuuni-

vaste ja että eläinsolut, jotka saatetaan kosketuksiin sanotun koostumuksen kanssa, ovat leukosyyttejä.

14. Menetelmä leukosyyttien soluvasteiden tehostamiseksi, joka käsittää vaiheet:

leukosyyttien saattaminen kosketuksiin *in vitro* koostumuksen kanssa, joka sisältää laimentavan määrän fysiologisesti siedettävää kantoainetta sekoitettuna vaikuttavaan määrään aktiivista ainetta, joka on isoksantopteriinijohdannainen, jonka rakenne on kaavan



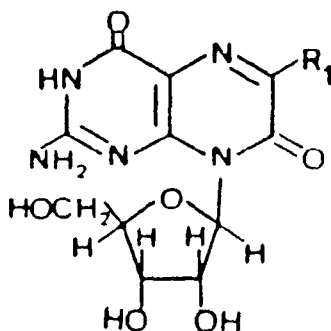
mukainen, jossa

$R_1$  on radikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, alemmasta alkyylistä, hydroksi-alemmasta-alkyylistä, polyhydroksi-alemmasta-alkyylistä, fenyylistä, fenyyli-alemmasta-alkyylistä, alemmasta-alkyyli-fenyylistä, alemmasta-alkoksi-fenyylistä, halofenyylistä, trifluorometyylifenyylistä, hydroksista, oksosta, alemmasta alkoksista, fenyyli-alemmasta-alkoksista, halosta, merkaptosta, tioksosta, alemmasta-alkyyli-tiosta, alemmasta-alkyloyllitiosta, fenyyli-alemmasta-alkyyli-tiosta, alemmasta-alkanoyylistä, karboksista, alemmasta-alkoksi-karbonyylistä, alemmasta-alkyylikarboksista, alemmasta-alkyleeni-alemmasta-alkyylikarboksylaatista, alemmasta-alkoksi-alemmasta-alkyylikarbonyylistä ja karboksamidosta ja alemmasta-alkyylikarboksamidosta, joissa karboksamidoryhmällä on kaava  $CONR_3R_4$ , jossa  $R_3$  ja  $R_4$  ovat samat tai erilaiset ja ne on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä ja alemmasta alkyylistä tai  $NR_3R_4$  muodostavat yhdessä heterosyklisen renkaan, jossa on viisi tai kuusi atomia renkaassa;

$R_2$  on beta-sitoutunut aldoglykosidiradikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu 1'-aldopentosidyylistä, 1'-aldoheksosidyylistä, mono-deoksygenoidusta 1'-aldopentosidyylistä ja mo-

no-deoksygenoidusta 1'-aldoheksosidyylistä ja niiden O-substituiduista alemmasta alkyylistä, alemmasta alkanoyylistä, bentsyyli- ja bentsoyyl johdannaisista, jolloin O-substituentti, jos läsnä yhdessä happiatomissa, on läsnä kaikissa käytettävissä olevissa renkaan substituenttihakpiatomeissa; sanotun isoksantopteriinijohdannaisen tautomeerit; ja sanotun isoksantopteriinijohdannaisen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat; ja sanotun kosketuksen ylläpitämisen ajanjakso, joka on riittävä sanotuille leukosyyteille niiden vasteiden moduloimiseksi.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sanotun isoksantopteriinijohdannaisen rakenne on kaavan

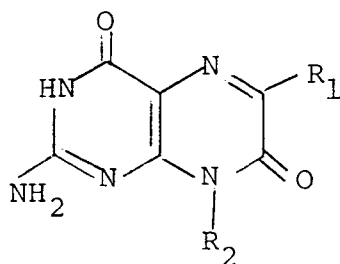


mukainen.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R<sub>1</sub> on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, metyylistä ja karboksista.

17. Menetelmä vasta-aineiden erittymisen tehostamiseksi ennalta valittuja immunogeenejä vastaan, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet:

immunoglobuliinia tuottavien solujen saattaminen kosketuksiin in vitro koostumuksen kanssa, joka sisältää laimentavan määrän fysiologisesti siedettävää kantoainetta sekoitettuna (a) vaikuttavaan määrään ennalta valikoitua immunogeeniä, joka kiihdyttää sanottujen vasta-aineiden erittymistä ja (b) adjuvantin määrään isoksantopteriinijohdannaista, jonka rakenne on kaavan



mukainen, jossa

$R_1$  on radikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä, alemmasta alkyylistä, hydroksi-alemmasta-alkyylistä, polyhydroksi-alemmasta-alkyylistä, fenyylistä, fenyyli-alemmasta-alkyylistä, alemmasta-alkyylifenyylistä, alemmasta-alkoksifenyylistä, halofenyylistä, trifluorometyyli-alemmasta-alkyylifenyylistä, hydroksista, oksosta, alemmasta alkoksista, fenyyli-alemmasta-alkoksista, halosta, merkaptosta, tioksista, alemmasta alkyylitiosta, alemmasta alkyloyylitiosta, fenyyli-alemmasta-alkyylitiosta, alemmasta alkanoyylista, karboksista, alemmasta-alkoksikarbonyylistä, alemmasta-alkyylisokarboksista, alemmasta-alkyleeni-alemmasta-alkyylisokarboksylaattista, alemmasta-alkoksi-alemmasta-alkyylisokarbonyylistä ja karboksamidosta ja alemmasta-alkyylisokarboksamidosta, jossa karboksamidoryhmällä on kaava  $\text{CONR}_3\text{R}_4$ , jossa  $R_3$  ja  $R_4$  ovat samat tai erilaiset ja ne on valittu ryhmästä, joka koostuu vedystä ja alemmasta alkyylistä tai  $\text{NR}_3\text{R}_4$  muodostavat yhdessä heterosyklisen renkaan, jossa on viisi tai kuusi atomia renkaassa;

$R_2$  on beta-sitoutunut aldoglykosidiradikaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu 1'-aldopentosidyylistä, 1'-aldoheksosidyylistä, mono-deoksygenoidusta 1'-aldopentosidyylistä ja mono-deoksygenoidusta 1'-aldoheksosidyylistä ja niiden O-substituoidusta alemmasta alkyylistä, alemmasta alkanoyylistä, bentsyyli- ja bentsoyylisubstituoidusta, jolloin O-substituentti, jos läsnä yhdessä happiatomissa, on läsnä kaikissa käytettävissä olevissa renkaan substituenttihappiatomeissa;

sanotun isoksantopteriinijohdannaisen tautomeerit; ja sanotun isoksantopteriinijohdannaisen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat; ja

sanottua kosketusta ylläpidetään ajanjakso, joka on riittävä sanottuille kosketuksiin saatetuille soluille vasta-aineitten erittämiseksi sanottuja immunogeenejä vastaan.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t -  
t u siitä, että sanotut immunoglobuliineja tuottavat solut on  
herätetty sanotulla ennalta valitulla immunogeenillä ennen sa-  
nottua kosketuksiinsaattamisvaihetta.