

(19)



**SUOMI - FINLAND**

**(FI)**

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS**

**PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN**

**FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

**(10) FI 904445 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **904445**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
**C07H 19/16**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.09.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **10.09.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.03.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

11.09.1989 GB 8920534

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • The Wellcome Foundation Limited, 980 Great West Road, BRENTFORD MIDDLESEX TW8 9GS, ISO-BRITANNIA, (GB)**

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Tisdale, Sylvia Margaret, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)**

**2 • van Tuttle, Joel, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

**3 • Slater, Martin John, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)**

**4 • Daluge, Susan Mary, Chapel Hill, NC 27514, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

**5 • Miller, Wayne Howard, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

**6 • Krenitsky, Thomas Anthony, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

**7 • Koszalka, George Walter, Chapel Hill, NC 27514, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki**

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

**Viruksenvastaisia yhdisteitä**

**Antivirala föreningar**

## Viruksenvastaisia yhdisteitä

Tämä keksintö koskee kemiallisia yhdisteitä, joilla on tartuntaa vastustavaa aktiivisuutta, niiden valmistusmenetelmiä, niitä sisältäviä koostumuksia ja niiden käyttöä erityisesti lois- ja virussairauksien hoidossa. Eri-tyisemmin keksintö koskee 2'-deoksi-2'-fluoriribonukleosideja ja niiden johdannaisia.

Virusvastaisessa kemoterapiassa on olemassa vähän lääkkeitä, jotka sinänsä olisivat tehokkaita viruksia vastaan, mikä johtuu siitä, että on vaikeaa hyökätä viruksia vastaan siten, että infektiomattomat isäntäsolut jäisivät vahingoittumattomiksi. Äskettäin on todistettu, että virukset määräävät itse elinkiertonsa tietyt vaiheet, jotka vaihtelevat eri lajeilla. Virusten ja isännän toimintojen suuren samankaltaisuuden takia, tehokkaat hoidot ovat kuitenkin osoittautuneet hyvin vaikeiksi tunnistaa.

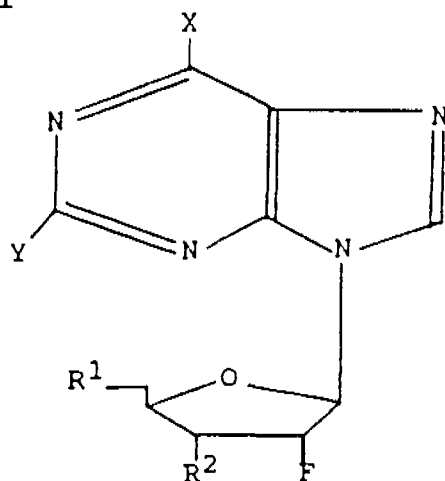
Eräs viraalinen patogeenien ryhmä, joka on vaivannut ihmistä muinaisajoista lähtien ja joka on aiheuttanut useiden miljoonien ihmisten kuoleman vuosisatojen aikana, on influenssavirusten ryhmä. Nämä virukset, erityisesti influenssa A ja B, ovat edelleen eräs suurimmista akuutin hengityssairauden aiheuttajista maailmassa tänään.

Influenssavirukset kuuluvat negatiivisten strand-virusten Ortomyxoviridae kantaan. Toinen negatiivinen strand-virus, jolla on tärkeitä terveydellisiä vaikutuksia, on respiratory syncytial -virus (RSV), joka on pneumovirus, Paramyxoviridae-kannan eräs suku. RSV on alempien hengitysteiden sairauksien pääasiallinen syy vauva-aikana ja lapsuudessa.

Fluorattuja nukleosideja on aikaisemmin ehdotettu käytettäväksi virus- ja loissairauksien hoidossa. Esimerkiksi julkaisussa EP-A-0 287 313 esitetään 2',3'-dideoksi-nukleosideja, jotka on substituoitu fluorilla 2'-asemassa, käytettäväksi ihmisen immuunikatoa aiheuttavan viruksen

hoidossa. Julkaisussa EP-A-0 219 829 esitetään 2'-deoksi-2'-fluori-β-D-arabino-furanosyyli-nukleosideja käytettäviksi loistenvastaisina aineina, erityisesti leishmania-  
 5 tautia vastaan. Uesugi et al., (Nucleosides and Nucleotides 2, 373-, 1983) ja Ikehara et al.; (Chem. Pharma. Bull. 29, 1034-, 1981) ovat kuvanneet menetelmiä tiettyjen 2'-fluori-2'-deoksiribonukleosidien valmistamiseksi.

Nyt on keksitty, että kaavan (I) mukaiset yhdisteet ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat tar-  
 10 tuntaa vastustavia aineita, erityisesti virusten vastaisia. Kaavan (I) mukaiset yhdisteet ovat esimerkiksi aktiivisia influenssavirusta vastaan, erityisesti influenssa A- ja B- ja RSV-infektioita, sekä tiettyjä alkueläimiä, esimerkiksi Trichomonas vaginalis ja Giardia lamblia, vas-  
 15 taan. Kaavassa I



(I)

Y on joko H tai NH<sub>2</sub>;

X on -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>-ryhmä, jossa R<sup>3</sup> ja R<sup>4</sup> voivat olla saman-  
 20 laisia tai erilaisia ja kumpikin on vety, C<sub>1-6</sub>-alkyyli, C<sub>2-6</sub>-alkenyyli, C<sub>3-7</sub>-sykloalkyyli, joista jokainen ryhmä on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla halogeenil-  
 30 la, tai X on Z-R<sup>5</sup>-ryhmä, jossa Z on happi tai rikki ja R<sup>5</sup>:llä on sama määrittely kuin R<sup>3</sup>:lla, tai X on halogeeni tai vety; ja

R<sup>1</sup> ja R<sup>2</sup>, jotka voivat olla samanlaiset tai erilai-  
 35 set, kumpikin ovat:

hydroksyyli-ryhmä;

5 -OCOR<sup>6</sup>H-ryhmä, jossa R<sup>6</sup> on divalenttinen ryhmä, joka on suoraketjuinen tai haarautunut C<sub>1-6</sub>-alkyleeni, C<sub>2-6</sub>-alkenyleeni tai C<sub>3-7</sub>-sykloalkyleeni, joista jokainen on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä;

-OCO<sub>2</sub>R<sup>7</sup>H-ryhmä, jossa R<sup>7</sup> on kovalenttinen sidos tai kuten R<sup>6</sup>:lle on määritetty;

10 -OCOR<sup>6</sup>-COOR<sup>8</sup>, jossa R<sup>6</sup> on kuten edellä on määritellyt ja R<sup>8</sup> on valittu vedystä, suoraketjuisesta tai haarautunut ketjuisesta C<sub>1-6</sub>-alkyylistä tai C<sub>1-6</sub>-alkenyylisestä, joista kumpikin on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä;

15 -OCOR<sup>7</sup>-Z-Ar, jossa R<sup>7</sup> on kuten edellä on määritetty, Z on joko kovalenttinen sidos tai happi ja Ar on aromaattinen rengas, esimerkiksi monosyklinen aryyli (esim. fenyyli) tai heteroaryyli (esim. pyridiini), substituoimaton tai substituoitu yhdellä tai useammalla halogeenilla, C<sub>1-6</sub>-alkyyllillä tai C<sub>1-6</sub>-alkoksilla;

20 -OR<sup>6</sup>H-ryhmä, jossa R<sup>6</sup> on kuten edellä on määritetty;  
OR<sup>6</sup>-Z-Ar-ryhmä, jossa R<sup>6</sup>, Z ja Ar ovat kuten edellä on määritetty;

25 -OCOCHR<sup>9</sup>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, jossa R<sup>10</sup> ja R<sup>11</sup> ovat kuten R<sup>8</sup>:lle on määritetty ja R<sup>9</sup> on vety, suoraketjuinen tai haarautunut ketjuinen C<sub>1-4</sub>-alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksi-, merkapto-, C<sub>1-3</sub>-alkoksi- tai C<sub>1-3</sub>-alkyyli-ryhmällä, R<sup>12</sup>-A-ryhmä, jossa R<sup>12</sup> on C<sub>1-4</sub>-alkyleeniryhmä, joka on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä ja A on -COOH-, -CONH<sub>2</sub>-,  
30 -NH<sub>2</sub>- tai -NH-C(NH)NH<sub>2</sub>-ryhmä tai A on 4 - 11-jäseninen aromaattinen tai ei-aromaattinen syklinen tai heterosyklinen rengassysteemi, joka sisältää 3 - 10 hiiliatomia ja 0, 1, 2 tai 3 typpiatomia renkaassa, renkaan hiiliatomien ja/tai typpiatomien ollessa mahdollisesti substituoituja yhdellä  
35 tai useammalla hydroksiryhmällä;

-OCO-R<sup>13</sup>-ryhmä, jossa R<sup>13</sup> on 4 - 7-jäseninen heterosyklinen rengas, jossa on 3 - 6 hiiliatomia ja 0, 1 tai 2 typpi-atomia, renkaan hiiliatomien ja/tai typpiatomien ollessa mahdollisesti substituoituja yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä; tai

5 mono-, di- tai trifosfaattiesteriryhmä.

Tämä keksintö käsittää edelleen kaavan (I) mukaisien yhdisteiden ja niiden suolojen käytön lääkehoidossa.

Kaavojen -OCOCHR<sup>9</sup>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> ja -OCO-R<sup>13</sup> mukaisia edullisia esteriryhmiä ovat luonnossa esiintyvien  $\alpha$ -aminohappojen esterit, jotka edellä esitetty määrittely sisältää. Erityisen edullisia kaavan -OCOCHR<sup>9</sup>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> mukaisia esteriryhmiä ovat sellaiset, joissa R<sup>9</sup> on C<sub>1-4</sub>-alkyyli-ryhmä ja R<sup>10</sup> ja R<sup>11</sup> ovat kumpikin vety, esimerkiksi valiini tai alaniini.

10

15

On edullista, että kaavan (I) mukaiset yhdisteet esiintyvät useissa tautomeerisissä muodoissa, ja että kun X on -OH-ryhmä, se voi myös olla oksoryhmä. Kaavan (I) mukaiset yhdisteet ja niiden suolat voivat myös esiintyä  $\alpha$ - tai  $\beta$ -anomeerisissä muodoissa. Tämä keksintö käsittää piirissään tämän vuoksi jokaisen erillisistä kaavan (I) mukaisien yhdisteiden  $\alpha$ - ja  $\beta$ -anomeereistä ja niiden seokset.

20

Kaavan (I) mukaisia yhdisteitä ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja kutsutaan tämän jälkeen keksinnön mukaisiksi yhdisteiksi. Termi "aktiivinen aineosa", tässä käytettynä, jollei asiayhteys vaadi muuta, viittaa keksinnön mukaiseen yhdisteeseen.

25

Aktiivisten aineosien aktiivisuutta influenssa A:ta ja B:tä vastaan ei ole tunnettu aikaisemmin ja tämä keksintö tarjoaa myös farmaseuttisia formulaatioita, jotka sisältävät kaavan (I) mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, ja jotka ovat erityisen käyttökelpoisia ehkäisemään influenssa A:n ja B:n kasvu nisäkkäissä ja ihmisessä. Tarjoamme sen takia kiinteitä

30

35

formulaatioita, jotka sisältävät aktiivisen aineosan ja kiinteän kantajan, tai sisäänhengitettävän formulaation, joka sisältää aktiivisen aineosan ja sisäänhengitettävän nestemäisen kantajan.

5 Tämä keksintö käsittää edelleen:

a) menetelmän hoitaa tai ennaltaehkäistä viraalista infektiota, erityisesti influenssavirus- tai RSV-infektiota tai alkueläimen aiheuttamaa infektiota, esimerkiksi *Trichomonas vaginalis* tai *Giardia lamblia*, isännässä, esimerkiksi nisäkkäässä ihminen ja hiiret mukaanlukien, mikä käsittää mainitun nisäkkään hoidon tehokkaalla ei-toksisella määrällä keksinnön mukaista yhdistettä.

b) keksinnön mukaisen yhdisteen käytön sellaisen lääkkeen valmistuksessa, jota käytetään hoidettaessa tai ennaltaehkäistäessä infektiota käsittäen viraalisen infektion erityisesti influenssavirus- tai RSV-infektion tai alkueläinten aiheuttaman infektion, esimerkiksi *Trichomonas vaginalis* tai *Giardia lamblia*.

Tietyt kaavan (I) mukaiset yhdisteet ja niiden suolat ovat uusia yhdisteitä ja tällaiset uudet yhdisteet ja suolat ovat edelleen tämän keksinnön näkökohta. Uudet yhdisteet ovat sellaisia, kuten edellä on määriteltä kaavalle (I) lukuunottamatta niitä, joissa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat kumpikin hydroksi tai  $R^1$  on mono-, di- tai trifosfaatti-5'-esteri ja  $R^2$  on hydroksi tai  $R^1$  on hydroksi ja  $R^2$  on mono-, di- tai trifosfaatti-3'-esteri ja joko (a) X on OH ja Y on  $NH_2$  tai H tai (b) X on  $NH_2$  ja Y on H.

Keksinnön mukaiset edulliset yhdisteet käsittävät sellaiset, joissa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat joko molemmat OH tai  $R^1$  on monofosfaatti ja  $R^2$  on OH, Y on H tai  $NH_2$  ja X on  $-NR^3R^4$ -ryhmä, jossa  $R^3$  ja  $R^4$ , jotka voivat olla samanlaiset tai erilaiset, ovat H,  $C_{1-6}$ -alkyyli, tai X on  $Z-R^5$ -ryhmä, jossa Z on O tai S ja  $R^5$  on  $C_{1-6}$ -alkyyli, tai X on halogeeni tai vety.

Erityisen edulliset kaavan (I) mukaiset yhdisteet käsittävät sellaiset, joissa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat molemmat OH, Y on  $NH_2$  ja X on H, OH,  $NH_2$  tai  $Z-R^5$ , jossa Z on O ja  $R^5$  on  $C_{1-6}$ -alkyyli.

5 Esimerkkejä kaavan (I) mukaisista erityisen edullisista yhdisteistä ovat:

(1) 2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

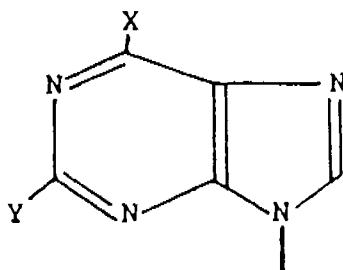
10 (2) 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

(3) 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniniini

(4) 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-metoksi-9H-puriini

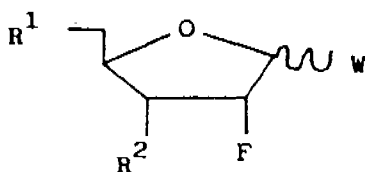
15 Tämä keksintö käsittää edelleen menetelmän uusien kaavan (I) mukaisten yhdisteiden ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, mikä menetelmä käsittää joko

20 (A) kaavan PuH mukaisen puriiniemäksen, jossa kaavassa Pu on puriinijäännös



(Pu)

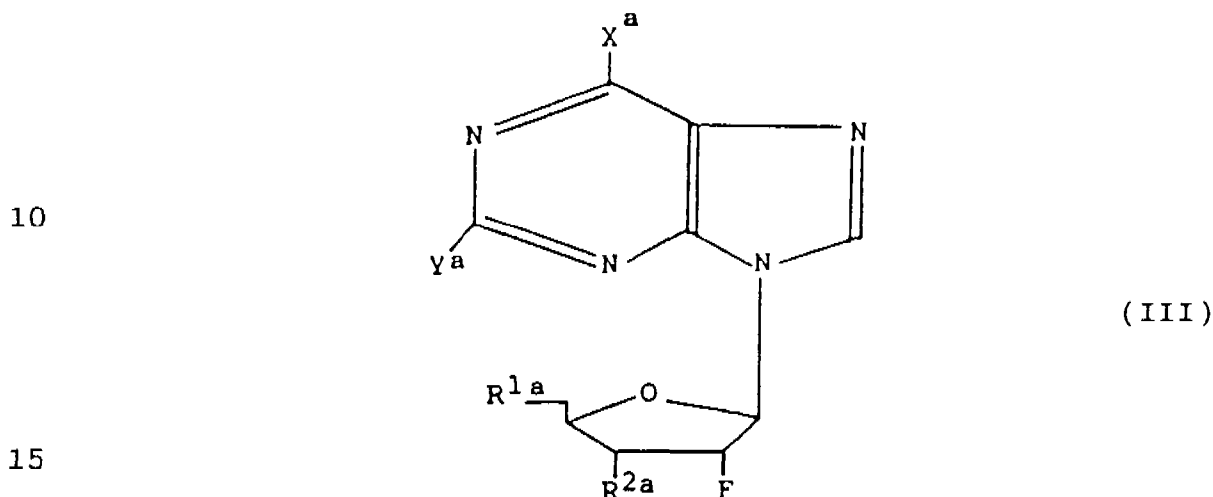
25 (jossa X ja Y ovat kuten edellä on kuvattu) tai sen suolan saattamisen reagoimaan kaavan (II) mukaisen yhdisteen kanssa



(II),

jossa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat kuten edellä on määritelty ja W on joko fosfaattiesteri tai sen suola tai puriini- tai pyrimidiiniosa (muu kuin Pu), jolloin muodostuu kaavan (I) mukainen yhdiste;

5 (B) kaavan (III) mukaisen yhdisteen



(jossa  $X^a$ ,  $Y^a$ ,  $R^{1a}$  ja  $R^{2a}$  mainitussa järjestyksessä ovat ryhmät X, Y,  $R^1$  ja  $R^2$ , kuten edellä on määritelty tai tällaisen ryhmän prekursorimuoto, esim. suojattu, edellyttäen että vähintään yksi X:stä, Y:stä,  $R^1$ :stä ja  $R^2$ :sta on prekursorimuoto) saattamisen reagoimaan aineen kanssa, joka toimii muuntamalla mainitun(tujen) ryhmän(mien) prekursorimuoto halutuksi(tuiksi) ryhmäksi(miksi);

20

(i) saattamalla kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa vähintään  $R^1$ :stä ja  $R^2$ :sta on hydroksiryhmä, reagoimaan sopivan aineen kanssa, joka toimii muuntamalla mainitun hydroksiryhmän vaihtoehtoiseksi ryhmäksi, jotka kuvaa  $R^1$  ja/tai  $R^2$ .

25

(ii) saattamalla kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  eivät ole hydroksi, reagoimaan aineen kanssa, joka toimii muuntamalla mainitun  $R^1$  - ja/tai  $R^2$ -ryhmän hydroksiryhmäksi.

30

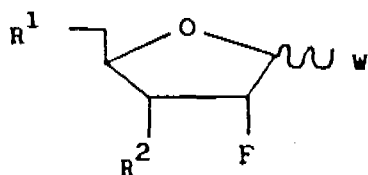
Menetelmä (A), joka erityisesti soveltuu sellaisten kaavan (I) mukaisten yhdisteiden valmistukseen, joissa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat kumpikin hydroksi ja Y on H tai  $NH_2$ , voidaan

35



suorittaa entsyymaattisesti saattamalla kaavan Pu mukainen puriiniemäs, jossa X ja Y ovat kuten edellä on määritelty, tai sen suola, reagoimaan kaavan (II) mukaisen yhdisteen kanssa

5



(II)

10 (jossa R<sup>1</sup> ja R<sup>2</sup> ovat kuten edellä on määritelty ja W on fosfaattiesteri tai sen suola tai puriini- tai pyrimidiiniosa (muu kuin Pu)) vähintään yhden fosforylaasientsyymin, sellaisen kuten puriininukleosidifosforylaasi ja tymidiinifosforylaasi, sekä epäorgaanisen fosfaatin tai  
 15 sen suolan, tai transferaasientyymin, esimerkiksi N-deoksiribosyyli transferaasi, läsnäollessa. Tämän reaktion tarkoituksiin on edullista, että puriini- tai pyrimidiiniosa on β-asemassa ja fosfaattiesteri tai sen suola α-asemassa.

Sopiva kaavan PuH mukainen puriiniemäs voidaan saada kaupallisesti, esimerkiksi Pacific Chemical Laboratories'ltä tai Sigma Chemical Company'ltä tai se voidaan valmistaa tavanomaisilla alan ammattimiehen hyvin tuntemilla menetelmillä tai helposti kemiallisesta kirjallisuudesta saatavilla tiedoilla. Puriiniemäksiä, joissa 2-substituentti on amino tai vety ja 6-substituentti on amino tai metyyli, voidaan esimerkiksi saada kaupallisesti. Puriineita, joissa 2-substituentti on amino ja 6-substituentti on metyyliaminoryhmä, voidaan valmistaa Montgomery'n ja Holum'n (J. A. C. S. 80:404, 1958) menetelmän mukaisesti. Puriineita, joissa 2-substituentti on amino ja 6-substituentti on alkoksi, esimerkiksi metoksi, voidaan valmistaa Balsiger'n ja Montgomery'n (J. Org. Chem. 20:1573, 1960) kuvaamalla menetelmällä.

35 Kaavan (II) mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa alan ammattimiesten hyvin tuntemilla menetelmillä tai hel-

posti kemiallisesta kirjallisuudesta saatavilla tiedoilla. 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiili voidaan esimerkiksi valmistaa Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) kuvaamalla menetelmällä. 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniini voidaan valmistaa S. Uesugi et al:n (Nucleosides and Nucleotides 2, 373-, 1983) kuvaamalla menetelmällä.

Menetelmään (B) liittyen, mikä menetelmä on erityisen sopiva kaavan (I) mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi kaavan (III) mukaisista yhdisteistä, joissa  $R^{1a}$  ja  $R^{2a}$  ovat kumpikin hydroksi, kaavan (III) mukaisten yhdisteiden suojatut ryhmät  $X^a$ ,  $Y^a$ ,  $R^{1a}$  ja  $R^{2a}$  voidaan suojata tavanomaisilla hydroksi- ja aminosuojaryhmillä, sellaisilla kuten asyyli-ryhmät, esimerkiksi alkanoyyli, sellainen kuten bentsooyyli, tai aroyyli-ryhmät, sellainen kuten asetyyli; aralkyyli-ryhmät, esimerkiksi bentsyyli-ryhmä; tai trialkyyli-silyyli-ryhmät, kuten esimerkiksi tert-butyylidimetyylisilyyli, käytetyn suojaryhmän erityisen tyyppin riippuessa suojattavan ryhmän luonteesta.

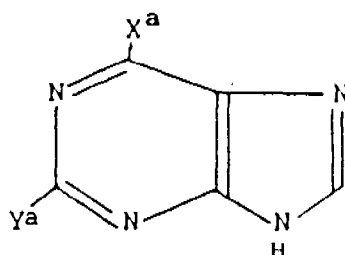
Suojaryhmä voidaan sitten poistaa happo- tai emäs-hydrolyysillä, hydrauksella tai entsyymaattisesti. Asyyli-ryhmät poistetaan tavallisesti emäs-hydrolyysillä ja silyyli-ryhmät happohydrolyysillä tai fluoridi-ionilla. Aralkyyli-ryhmät, sellaiset kuten bentsyyli, poistetaan edullisesti katalyyttisellä hydrauksella, tyyppillisesti katalyytin, sellaisen kuten palladium/hiili, läsnäollessa, tai pelkistään, esimerkiksi alkalimetallilla (esim. natrium) sopivassa liuottimessa, kuten esimerkiksi nestemäinen ammoniakki. On huomattu, että bentsyyli-suojaryhmän käyttö on erityisen edullista sellaisten kaavan (I) mukaisten yhdisteiden valmistuksessa, joissa X on hydroksi tai amino.

Kaavan (I) mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa kaavassa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat  $OCOCHR^9NR^{10}R^{11}$ -ryhmä, menetelmän (B) mukaisesti,  $R^{1a}$ - ja/tai  $R^{2a}$ -ryhmät voidaan suojata esimerkiksi 9-fluorenyylimetyylioksidikarbonyylillä (Fmoc),

tert-butyylisilikonkarbonyylilla (tBOC) tai karbobentsyylisilikonilla (CBZ) ja suojaryhmät voidaan poistaa tavanomaisilla menetelmillä, jolloin saadaan aminohappo  $\text{CHR}^9\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ .

5 Kaavan (III) mukainen lähtöaine voidaan tarkoituksenmukaisesti valmistaa saattamalla sopiva kaavan (IV) mukainen puriiniinimemäs

10



(IV),

15 jossa  $X^a$  ja  $Y^a$  ovat kuten edellä on määriteltä, tai sen suola, reagoimaan pyrimidiininukleosidin kanssa, joka sisältää sopivan sokeritähteen, esimerkiksi 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiili, yhden tai useamman fosforylaasientsyymin, esimerkiksi puriininukleosidifosforylaasi ja tymidiinifosforylaasi, tai transferaasientsyymin, esimerkiksi N-deoksiribosyyli transferaasi, läsnäollessa.

Vaihtoehtoisesti edellä esitetyn kaavan (III) mukainen lähtöyhdiste voidaan valmistaa kemiallisesti saattamalla kaavan (IV) mukainen yhdiste, jossa  $X^a$  ja  $Y^a$  ovat kuten edellä on määriteltä, tai sen silyloitu johdannainen tai sen suola, reagoimaan kaavan (II) mukaisen yhdisteen kanssa, jossa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat kuten edellä on määriteltä, tai muita hydroksin suojattuja muotoja, ja W on sopiva lähtevä ryhmä, esimerkiksi halogeeniatomi, sellainen kuten kloori, asyylioksiryhmä, sellainen kuten asetoksi, alkoksiryhmä, sellainen kuten metoksi, katalyytti, sellainen kuten tina-  
 30 (IV)kloridi tai trimetyyllisilyylitriflaatti, läsnäollessa sopivassa liuottimessa, sellaisessa kuten asetonitriili.

Kaavan (IV) mukaisia puriiniemäksiä voidaan valmistaa vastaavasti puriiniemäksestä, jossa 6-substituentti on sopiva lähtevä ryhmä, esimerkiksi halogeeniatomi, sellainen kuten kloori, mainitun ryhmän nukleofiilisellä korvaamisella. Näin ollen kaavan (IV) mukainen puriiniemäs, jossa  $X^a$  on bentsyylioksi, voidaan valmistaa esimerkiksi käsittelemällä vastaavaa 6-klooripuriinia alkoholilla, sellaisella kuten bentsyylialkoholi, emäksen, esimerkiksi natriumhydridin, läsnäollessa sopivassa liuottimessa, sellaisessa kuten tetrahydrofuraani (THF). Kaavan (IV) mukaisia puriiniemäksiä, joissa  $X^a$  on bentsyyliamino, voidaan valmistaa käsittelemällä vastaavaa 6-klooripuriinia amiinilla, esimerkiksi bentsyyliamiinilla emäksen, esimerkiksi amiinin, sellaisen kuten trietyyliamiini, läsnäollessa sopivassa liuottimessa, sellaisessa kuten metanolissa. Sellaisia puriiniemäksiä, joita käytetään edellä esitettyinä lähtöaineina, voidaan saada kaupallisesti (Aldrich Chemical Company) tai valmistaa alan ammattimiehen hyvin tuntemilla menetelmillä, tai jotka ovat kemiallisesta kirjallisuudesta helposti saatavilla.

Edellä esitetyssä kaavan (III) mukaisten yhdisteiden valmistuksessa käytetyt pyrimidiininukleosidit voidaan valmistaa alan ammattimiehen hyvin tuntemilla menetelmillä tai sellaisilla, jotka saadaan helposti kemiallisesta kirjallisuudesta. Esimerkiksi 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)pyrimidiinit, sellaiset kuten 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiili, voidaan valmistaa Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) kuvaamalla menetelmällä.

On edullista, että kaavan (III) mukaiset yhdisteet voivat olla keksinnön mukaisia yhdisteitä, siten esimerkiksi  $X^a$  voi olla  $-NR^3R^4$ , jossa  $R^3$  ja  $R^4$  ovat kuten edellä on määritelty. Sellaisia yhdisteitä voidaan käsitellä deaminaasientsyymillä, sellaisella kuten adenosiinideaminaa-

si, ja muuttaa kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, jossa X on hydroksi.

Kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat hydroksi, voidaan muuttaa vastaavaksi farmaseuttisesti hyväksyttäväksi kaavan (I) esteriksi, kuten edellä on määritelty, reaktiolla sopivan esteröivän aineen kanssa alalla tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi Martin et al:n, (J. Pharm. Sci. (1987) 76, 180-) kuvaamalla menetelmällä. Näin ollen edellä määriteltyjen sopivien karboksyylihappestereiden valmistamiseksi edellinen kaavan (I) mukainen yhdiste voidaan saattaa reagoimaan happoanhydridin tai happohalidin kanssa, esimerkiksi kaavan QCOOH mukaista karboksyylihappoa vastaava kloridi, jossa kaavassa Q on  $-R^6H-$ ,  $-OR^7H-$ ,  $-R^6COOR^8-$ ,  $-R^7-Z-Ar-$ ,  $-CHR^9NR^{10}R^{11}-$  tai  $-R^{13}$ -ryhmä, jossa  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{13}$ , Z ja Ar ovat kuten edellä on määritelty, sopivan emäksen, kuten trietyyliamiinin läsnäollessa. Vaihtoehtoisesti QCOOH-happo voidaan saattaa reagoimaan kaavan (I) mukaisen yhdisteen kanssa, jossa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat hydroksi, liittävän aineen kuten disykloheksyylikarbodiimidin läsnäollessa.

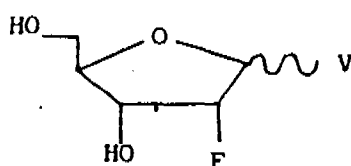
Edellä esitetty kaavan (II) mukainen lähtöaine, jossa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat hydroksi, voidaan saattaa reagoimaan esteröivän aineen kanssa ja näin saatava yhdiste saattaa reagoimaan kaavan PuH mukaisen puriiniemäksen kanssa menetelmän (A) mukaisesti.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä, kun  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat mono-, di- tai trifosfaattiestereitä, voidaan valmistaa kaavan (I) mukaisista yhdisteistä, kun  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat hydroksi, peräkkäisillä fosforylaatioilla mono-, di- ja trifosfaattijohdannaisten kautta tavanomaisilla kemiallisilla tai entsyymaattisilla keinoilla, esimerkiksi käyttämällä nukleosidikinaasia tai fosfotransferaasia nukleotiditrifosfaatin, esimerkiksi ATP:n, läsnäollessa.

Kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat hydroksi, voidaan muuttaa vastaavaksi farmaseuttisesti

hyväksyttäväksi kaavan (I) eetteriksi, kuten edellä on määritelty, reaktiolla sopivan alkyloivan aineen kanssa tavanomaisella tavalla, esimerkiksi kaavan  $Q^1\text{-Hal}$  mukaisella yhdisteellä, jossa  $Q^1$  on  $\text{-R}^6\text{H-}$  tai  $\text{-R}^6\text{-Z-Ar-}$  ryhmä, jossa  $R^6$  ja Ar ovat kuten edellä on määritelty ja Hal on halogeeni, esim. jodi.

Vaihtoehtoisesti sellainen alkyloiva aine voidaan saattaa reagoimaan kaavan



mukaisen sokerin kanssa (jossa V on alkoksiryhmä, sellainen kuten metoksi, tai asyylioksidiryhmä, sellainen kuten asetoksi), jolloin saadaan vastaava 3'-, 5'- tai 3',5'-dieetteri (Bessodes M et al, Synthesis (1988) 560) ja kondensoimalla näin saatava eetteri sopivan kaavan PuH mukaisen puriiniemäksen kanssa, jolloin muodostuu nukleosidi, josta sitten poistetaan suojaryhmät edellä esitetyn menetelmän (B) mukaisesti.

Kun edellä esitetyn menetelmän ensimmäisestä vaiheesta saatu tuote on monoeetteri, esimerkiksi 5'-eetteri, toinen hydroksiryhmä voidaan saattaa reagoimaan karboksyylihapon tai sen johdannaisen kanssa, esim. happoanhydridin tai happohalidien kanssa, esimerkiksi kaavan  $QCOOH$  mukaista karboksyylihappoa, jossa Q on kuten edellä on määritelty, vastaavan kloridin kanssa, jolloin saadaan monoeetteri-monoesterisokeri, esim. 3'-esteri-5'-eetterisokeri. Tämä sokeri voidaan kondensoida sopivan puriinin kanssa, jolloin muodostuu nukleosidi, kuten edellä on esitetty tai viitteen Codington J. F. et al., Carbohydr. Res. (1966) 1455 mukaisesti.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan saada myös kaavan I' mukaisista yhdisteistä, jossa I' on yhdiste, joka vastaa kaavan (I) mukaista yhdistettä, jossa ryhmät  $R^1$  ja  $R^2$  on korvattu muilla suojaryhmillä. Nämä muut suojaryhmät voidaan poistaa tai saattaa reagoimaan, ryhmien  $R^1$  ja  $R^2$  muodostamiseksi, kuten edellä on määritelty.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä, silloin kun ne on valmistettu edellä kuvatun reitin mukaisesti, voidaan käyttää valmistettaessa keksinnön mukaisia yhdisteitä, joissa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  ovat hydroksi, poistamalla suojaryhmät eetteri- ja/tai esteriryhmistä.

Prosessiolosuhteista ja lähtöaineista riippuen kaavan (I) mukainen lopputuote saadaan joko vapaana emäksenä tai suolana. Sekä lopputuotteiden vapaa emäs että suolat sisältyvät keksinnön piiriin. Näin ollen voidaan saada emäksisiä, neutraaleja tai sekasuoloja sekä hemi-, mono-, seskvi- tai polyhydraatteja. Uusien yhdisteiden happoadditiosuolat voidaan tavalla, joka tunnetaan per se, muuttaa vapaaksi emäkseksi käyttämällä emäksisiä aineita, kuten alkaleita tai ioninvaihdolla. Saadut vapaat emäkset voivat myös muodostaa suoloja orgaanisten tai epäorgaanisten happojen kanssa.

Keksinnön mukaiset suolat, joita voidaan tavanomaisesti käyttää hoidossa, käsittävät farmaseuttisesti hyväksyttävät emässuolat, esim. sopivan emäksen johdannaiset, sellaiset kuten alkalimetalli- (esim. natrium), maa-alkalimetalli- (esim. magnesium) suolat, ammoniakkin ja  $NX_4:n$  (jossa X on  $C_{1-4}$ -alkyyli) suolat.

Tämä keksintö käsittää edelleen uudet välituotteet: 2-amino-6-bentsyyliamino-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini, 2-amino-6-bentsyylioksi-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini ja 2-amino-6-bentsyyliitio-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan antaa vastaanottajille, sellaisille kuten nisäkkäille ihmiset mukaanlukien, millä tahansa tavalla, joka soveltuu hoidettavaan tilaan, sopivien tapojen käsittäessä oraalisen, pulmonaarisen, reaktaalisen, nasaalisen, paikallisen (käsittäen bukkiaalisen ja kielen alle antamisen), vaginaalisen ja parenteraalisen (käsittäen subkutaanisen, intramuskulaarisen, intravenoosisen, intradermaalisen, intratekaalisen ja epiduraalisen antamisen) antotavan. On ymmärrettävä, että edullinen tapa voi vaihdella esimerkiksi vastaanottajan kunnosta riippuen.

Yksittäisen aktiivisen aineosan määrä, joka tarvitaan viraalisten infektioiden hoitoon, käsittäen influenssa- ja RSV-infektiot, riippuu useista tekijöistä, jotka käsittävät hoidettavan tilan vakavuuden ja vastaanottajan identiteetin, ja se on viimekädessä hoitavan lääkärin arvostelukyvyn varassa. Yleisesti sopiva, tehokas annos on välillä 0,1 - 100 mg vastaanottajan kehon painokiloa kohti päivässä, edullisesti välillä 10 - 20 mg kehon painokiloa kohti päivässä; optimiannos on noin 15 mg kehon painokiloa kohti päivässä (jollei muuten osoiteta kaikki aktiivisen aineosan painot lasketaan alkuperäisenä yhdisteenä; sen suoloille ja estereille luvut kasvaisivat oikeassa suhteessa). Tehokas annos voidaan vaihtoehtoisesti antaa kahdena, kolmena, neljänä tai useampana osa-annoksena, jotka annetaan sopivin aikavälein päivän aikana. Nämä osa-annokset voidaan antaa yksikköannosmuodoissa, esimerkiksi sellaisissa, jotka sisältävät 1 - 2000 mg, edullisesti 20 - 500 mg, ja edullisemmin 100 - 400 mg aktiivista aineosaa yksikköannosmuotoa kohden.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan antaa yksin tai yhdessä muiden terapeuttisten aineiden kanssa, esimerkiksi amantidiinin tai ribaviriinin kanssa, jotka ovat tunnettuja influenssan vastaisia aineita, tai analgeetin, esimerkiksi kodeiinin, parasetamolin, asperiinin,



ibuprofeenin, tai tulehduksenvastaisen aineen, sellaisen kuten indometasiinin, mefenamiinihapon, naprokseenin tai ibuprofeenin, tai minkä tahansa muiden aineiden kanssa, jotka ollessaan yhdistettynä keksinnön mukaisen yhdisteen kanssa, saavat aikaan hyödyllisen terapeuttisen vaikutuksen.

Vaikka on mahdollista antaa yhdisteitä yksin, on edullista antaa ne farmaseuttisina formulaatioina. Tämän keksinnön mukaiset formulaatiot sisältävät vähintään yhden aktiivisen aineosan, kuten edellä on määritelty, yhdessä yhden tai useamman niille farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa ja mahdollisesti muita terapeuttisia aineosia. Kantajan(jien) tulee olla "hyväksyttävä(viä)" siinä mielessä, että ne ovat yhteensopivia formulaation muiden aineosien kanssa, eivätkä ne ole vahingollisia niiden vastaanottajille.

Formulaatiot käsittävät sellaiset, jotka soveltuvat oraalisesti, pulmonaalisesti, reaktiaalisesti, nasaalisesti, paikallisesti (käsittäen bukkiaalisen ja kielen alle antamisen), vaginaalisesti tai parenteraalisesti (käsittäen subkutaanisen, intramuskulaarisen, intravenoosisen, intradermaalisen, intratekaalisen ja epiduraalisen antamisen) annettaviksi. Formulaatiot voidaan edullisesti antaa yksikköannosmuodossa ja ne voidaan valmistaa millä tahansa farmasien alalla hyvin tunnetuista menetelmistä. Tällaiset menetelmät käsittävät vaiheen, jossa aktiivinen aineosa saatetaan yhteen kantajan kanssa, joka muodostuu yhdestä tai useammasta lisäaineosasta. Yleisesti formulaatiot valmistetaan saattamalla aktiivinen aineosa kauttaaltaan läheisesti yhteen nestemäisten kantajien tai hienoksi jauhettujen kiinteiden kantajien tai molempien kanssa, ja tämän jälkeen, jos tarpeen muotoilemalla tuote.

Tämän keksinnön mukaiset formulaatiot, jotka soveltuvat oraalisesti annettaviksi voidaan antaa erillisinä yksikköinä, sellaisina kuten kapselit, tärkkelyskapselit

5 tai tabletit, jotka kukin sisältävät ennalta määrätyn määrän aktiivista aineosaa; jauheena tai jyväsinä; liuoksena tai suspensiona vesipitoisessa nesteessä tai vedettömässä nesteessä; tai öljy-vedessä-neste-emulsiona tai vesi-öljyssä-neste-emulsiona. Aktiivinen aineosa voidaan myös antaa boluksena tai tahnana tai se voi olla liposomien sisällä.

10 Tabletti voidaan valmistaa puristamalla tai muovaamalla, mahdollisesti yhden tai useamman lisäaineosan kanssa. Puristettuja tabletteja voidaan valmistaa puristamalla sopivalla laitteella aktiivinen aineosa vapaasti virtaavassa muodossa, sellaisessa kuten jauhe tai jyvät, mahdollisesti sekoitettuna sideaineen (esim. povidoni, gelatiini, hydroksipropyylimetyyliselluloosa), liukastavan aineen, inertin laimentimen, säilöntäaineen, hajottavan aineen (esim. natriumtärkkelysglykolaatti, ristosidottu povidoni, ristosidottu natriumkarboksimeetyyliselluloosa), pinta-aktiivisen tai dispergoivan aineen kanssa. Muovatut tabletit voidaan valmistaa muovaamalla sopivassa laitteessa jauhetun yhdisteen seosta, joka on kostutettu inertillä nestemäisellä laimentimella. Tabletit voidaan mahdollisesti päällystää tai uurtaa ja ne voidaan formuloida niin, että ne vapauttavat aktiivista aineosaa hitaasti tai kontrolloidusti käyttäen esimerkiksi hydroksipropyylimetyyliselluloosaa vaihtelevissa suhteissa aikaansaamaan haluttu vapautumisprofiili.

20

25

Kapseli voidaan valmistaa täyttämällä se irrallisella tai puristetulla jauheella sopivassa täyttökoneessa, mahdollisesti yhden tai useamman lisäaineen kanssa. Esimerkkejä sopivista lisäaineista tabletteihin ovat sideaineet, sellaiset kuten povidoni, gelatiini, liukastavat aineet, inertit laimentimet, hajottavat aineet. Kapseleita voidaan myös formuloida pellettejä tai erillisiä alayksiköä sisältäviksi aikaansaamaan hidas tai kontrolloitu ulkopinnan aineosan vapautuminen.

30

35

Tämä voidaan saavuttaa ekstrudoimalla ja pyörittämällä lääkkeen ja ekstruusioapuaineen (esim. mikrokiteinen selluloosa) ja laimentimen, sellainen kuten laktoosi, märkä seos. Näin valmistetut pallot voidaan päällystää puoliläpäisevällä membraanilla (esim. etyylliselluloosalla, Eudragit WE30D), jolloin saadaan viivytetyn vapautumisen ominaisuudet.

Paikallisesti annettavina formulaatiot käytetään edullisesti voiteena tai rasvana, jotka sisältävät aktiivista aineosaa esimerkiksi määrän 0,075 - 20 % paino/paino, edullisesti 0,2 - 15 % paino/paino ja edullisimmin 0,5 - 10 % paino/paino. Formuloitaessa voiteeksi aktiiviset aineosat voidaan käyttää joko parafiini- tai veteensekoittuvan voidepohjan kanssa. Vaihtoehtoisesti aktiiviset aineosat voidaan formuloida rasvaksi öljy-vedessä-rasvapohjan kanssa tai kuten vesi-öljyssä-pohjassa.

Haluttaessa rasvapohjan vesipitoinen faasi voi sisältää esimerkiksi vähintään 30 % paino/paino polyhydristä alkoholia, eli alkoholia, jossa on kaksi tai useampia hydroksyyli-ryhmiä, sellaiset kuten propyleeniglykoli, butaani-1,3-dioli, mannitoli, sorbitoli, glyseroli ja polyetyleeniglykoli sekä näiden seokset. Paikallisesti käytettävät formulaatiot voivat edullisesti sisältää yhdistettä, joka lisää aktiivisen aineosan absorptiota tai tunkeutumista ihon tai muiden sairaiden alueiden läpi. Esimerkkejä tällaisista ihon läpi tunkeutumista lisäävistä aineista ovat dimetyylisulfoksidi ja samanlaiset analogit.

Tämän keksinnön mukaisten emulsioiden öljyfaasi voi muodostua tunnetuista aineosista tunnetulla tavalla. Vaikka tämä faasi voi sisältää pelkästään emulsifioijaa (muutoin tunnetaan emulgaattorina), se edullisesti sisältää seoksen vähintään yhtä emulsifioijaa rasvan tai öljyn tai sekä rasvan että öljyn kanssa. Edullisesti sisällytetään hydrofiilinen emulsifioijana yhdessä lipofiilisen emulsifioijan kanssa, joka toimii stabiloijana. On myös

edullista sisällyttää sekä öljy että rasva. Yhdessä emulsifioija(t) stabiloijan(jien) kanssa tai ilman niitä muodostavat niin kutsutun emulsifioivan vahan, ja vaha yhdessä öljyn ja/tai rasvan kanssa muodostaa niin kutsutun emulsifioiva voidepohjan, joka muodostaa rasvaformulaatioiden dispergoituneen öljyfaasin.

Tämän keksinnön mukaisessa formulaatiossa käytettäviksi sopivat emulgaattorit ja emulsion stabiloijat käsittävät Tween 60:n, Span 80:n, setostearyylialkoholin, myristyylialkoholin, glyserolimonostearaatin ja natriumlaurylsulfaatin.

Sopivien öljyjen tai rasvojen valinta formulaatioon perustuu haluttujen kosmeettisten ominaisuuksien saamiseen, koska aktiivisen yhdisteen liukoisuus useimpiin öljyihin, joita todennäköisesti käytetään farmaseuttisissa emulsioformulaatioissa, on hyvin matala. Näin ollen rasvan tulisi edullisesti olla rasvaamaton, värjäämätön ja pestävä tuote, jonka konsistenssi on sopiva, jotta vältetään vuoto putkista tai muista säiliöistä. Suoraketjuisia tai haarautunut ketjuisia, mono- tai diemäksiä alkyyliestereitä, sellaisia kuten di-isoadipaatti, isosetyyliestearaatti, kookospähkinärasvahappojen propyleeniglykolidiesteri, isopropyylimyristaatti, dekyylioleaatti, isopropyylipalmitaatti, butyyliestearaatti, 2-etyyliheksyyliipalmitaatti, tai haarautunut ketjuisten estereiden seosta, joka tunnetaan Crodamol CAP'na, voidaan käyttää kolmen viimeisen ollessa edullisia estereitä. Näitä voidaan käyttää yksin tai yhdistelminä vaadituista ominaisuuksista riippuen. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää lipidejä, joilla on korkea sulamispiste, sellaisia kuten valkoinen pehmeä parafiini ja/tai nestemäinen parafiini tai muut mineraaliöljyt.

Silmään paikallisesti käytettäväksi sopivat formulaatiot sisältävät myös silmätippoja, joissa aktiivinen aineosa on liuenneena tai suspedoituneena sopivaan kanta-

jaan, erityisesti vesipitoiseen liuottimeen aktiiviselle aineosalle. Aktiivinen aineosa on edullisesti läsnä tällaisissa formulaatioissa konsentraatiossa 0,5 - 20 %, edullisesti 0,5 - 10 %, erityisesti noin 1,5 % paino/paino.

Formulaatiot, jotka soveltuvat paikallisesti käytettäväksi suussa, käsittävät tabletit, jotka sisältävät aktiivisen aineosan maustetussa pohjassa, tavallisesti sakkaroosissa ja akaasiassa tai tragantissa, pastillit, jotka sisältävät aktiivisen aineosan inertissä pohjassa, sellaisessa kuten gelatiini ja glyseriini tai sakkaroosissa ja akaasiassa ja suuvedet, jotka sisältävät aktiivisen aineosan sopivassa nestemäisessä kantajassa.

Formulaatiot rektaalisesti annettaviksi voidaan antaa peräpuikkoina sopivan pohjan kanssa sisältäen esimerkiksi kookosvoita tai korkeampia rasva-alkoholeja (esim. kova vaha European Pharmacopoeia) tai triglyseridejä ja tyydyttyneitä rasvahappoja (esim. Witepsol).

Formulaatiot, jotka soveltuvat nasaalisesti annettaviksi, ja joissa kantaja on kiinteä aine, sisältävät karkeaa jauhetta, jonka partikkelikoko on esimerkiksi välillä 20 - 500 mikronia, ja joka annetaan tavalla, jossa nuuskataan, eli nopealla sisäänhengityksellä nenäkäytävän läpi jauhesäiliöstä, jota pidetään lähellä nenää. Sopivat formulaatiot, joissa kantaja on neste, annettaviksi esimerkiksi nenäspraynä tai nenätippoina, sisältävät aktiivisen aineosan vesipitoisia tai öljyliuoksia.

Sopiva formulaatiot annettaviksi sisäänhengittämällä sisältävät hienopartikkelisisiä pölyjä tai sumuja, jotka voidaan kehittää erityyppisten mitta-annospaineaerosolien, höyryttimien tai sisäänpuhaltimien avulla.

Pulmonaarisesti annettaviksi suun kautta jauheen tai pisaroiden partikkelikoko on tavallisesti välillä 0,5 - 10  $\mu\text{m}$ , edullisesti 1 - 5  $\mu\text{m}$ , vapautumisen keuhkoputken haarautumiin varmistamiseksi. Nasaalisesti annettaessa

edullinen partikkelikoko on välillä 10 - 500 µm pidättymisen nenäonteloon varmistamiseksi.

Mitta-annoshöyryhengityslaitteet ovat paineistettuja aerosolilääkkeenantajia, tavallisesti sisältäen aktiivisen aineosan suspensio- tai liuosformulaation nesteytettyssä propellantissa. Käytettäessä nämä laitteet vapauttavat formulaation venttiilin läpi, joka on säädetty päästämään mitattu tilavuus, tavallisesti 10 - 150 µl, jolloin muodostuu hienopartikkelinen spray, joka sisältää aktiivisen aineosan. Sopivat propellantit käsittävät propaanin ja butaanin, tietyt kloorifluorihiiliyhdisteet, joita tavallisesti kutsutaan "CFS't":ksi, esimerkiksi dikloorifluorimetaani, trikoolifluorimetaani, diklooritetrafluorimetaani, tai näiden seokset. Formulaatio voi lisäksi sisältää yhteisliuottimia, esimerkiksi etanolia, pinta-aktiivisia aineita, sellaisia kuten oleiinihappo tai sorbitaanitrioleaatti, antioksidantteja ja/tai sopivia aromiaineita.

Höyryttimet ovat kaupallisesti saatavia laitteita, jotka muuttavat aktiivisen aineosan liuoksia tai suspensioita hoitaviksi sumutteiksi joko tavalla, jossa kompressoitu kaasu tavallisesti ilma tai happi, tai kiihdytetään kapean venttiilinaukon läpi, tai ultraääniagitaatiolla. Sopivat formulaatiot höyryttimissä käytettäväksi muodostuvat aktiivisesta aineosasta nestemäisessä kantajassa, jotka ne sisältävät jopa 40 % paino/paino formulaatiosta, edullisesti vähemmän kuin 20 % paino/paino. Kantaja on tavallisesti vesi tai laimea vesipitoinen alkoholiliuos, joka on edullisesti valmistettu isotoniseksi ruumiinesteiden kanssa lisäämällä esimerkiksi natriumkloridia. Mahdolliset lisäaineet käsittävät säilöntäaineita, jos formulaatiota ei valmisteta steriilisti, esimerkiksi metyylihydroksibentsoaatti, antioksidantteja, aromiaineita, haihtuvia öljyjä, puskuriaineita ja pinta-aktiivisia aineita.

Sopivat formulaatiot annettaviksi sisäänpuhaltamalla käsittävät hienoiksijauhettuja jauheita, joita voidaan antaa sisäänpuhaltimen avulla tai nuuskata nenäonkaloon. Sisäänpuhaltimessa jauhe on kapsелеissa tai panoksissa, jotka on tavallisesti valmistettu gelatiinista tai muovista, jotka joko puhkaistaan tai avataan in situ ja jauhe joko laitetaan ilmaan, joka vedetään laitteen läpi sisäänhengityksen aikana tai vaihtoehtoisesti jaetaan manuaalisesti toimivan pumpun avulla. Sisäänpuhaltimessa käytetty jauhe muodostuu joko pelkästään aktiivisesta aineosasta tai jauheseoksesta, joka muodostuu aktiivisesta aineosasta, sopivasta jauhelaimentimesta, sellainen kuten laktoosi, ja mahdollisesta pinta-aktiivisesta aineesta. Aktiivinen aineosa muodostaa tavallisesti 0,1 - 100 % paino/paino formulaatiosta.

Paineistetut aerosoliformulaatiot sisäänhengitystä varten on edullisesti järjestetty siten, että jokainen mitattu annos sisältää 0,05 - 5 mg keksinnön mukaista yhdistettä. Samalla tavalla jauheformulaatiot sisäänpuhaltamista varten on järjestetty siten, että jokainen yksikköannos sisältää 0,5 - 50 mg. Liuos- tai suspensioformulaatiot höyrytystä varten on järjestetty siten, että annetaan annoksia, jotka ovat välillä 1 - 1500 mg. Keksinnön mukaisia yhdisteitä tai niiden formulaatioita voidaan antaa näillä laitteilla kerran tai useita kertoja päivässä yhtenä tai useana annoksena, esimerkiksi kolmena tai neljänä, annettuna kunakin kertana.

Formulaatiot, jotka ovat sopivia vaginaalisesti annettaviksi, voidaan antaa pessareina, tamponeina, rasvoina, geeleinä, tahnoina, vaahtoina tai sprayformulaatioina, jotka sisältävät aktiivisen aineosan lisäksi sellaisia kantajia, jotka tunnetaan alalla sopiviksi.

Formulaatiot, jotka ovat sopivia parenteraalisesti annettaviksi käsittävät vesipitoisen ja vedettömät steriilit injektiooliuokset, jotka saattavat sisältää antioksi-

dantteja, puskureita, bakteerien kasvua ehkäiseviä teki-  
 jöitä ja liuennneita aineita, jotka muuttavat formulaation  
 isotoniseksi aiotun vastaanottajan veren kanssa, ja vesi-  
 pitoiset ja vedettömät steriilit suspensiot, jotka saatta-  
 5 vat sisältää suspendoivia aineita ja paksuntavia aineita  
 sekä liposomeja tai muita mikropartikkelijärjestelmiä,  
 jotka on suunniteltu ohjaamaan yhdiste verikomponentteihin  
 tai yhteen tai useampaan elimeen. Formulaatiot voidaan  
 antaa yksikköannos- tai moniannossäiliöissä, esimerkiksi  
 10 tiivistetyissä ampulleissa ja pulloissa, ja niitä voidaan  
 säilyttää pakkaskuivatussa (lyofilisoituina) tilassa, joka  
 tarvitsee ainoastaan steriilin nestemäisen kantajan li-  
 säyksen, esimerkiksi vettä, injektioita varten juuri ennen  
 käyttöä. Injektioliuokset ja -suspensiot voidaan valmistaa  
 15 ex tempore steriileistä edellä kuvatun keltaisista jau-  
 heista, jyväsistä ja tableteista.

Edullisia yksikköannosformulaatioita ovat sellai-  
 set, jotka sisältävät päivittäisen annoksen tai yksikön,  
 päivittäisen osa-annoksen, kuten tässä edellä on selostet-  
 20 tu, tai niiden sopivan fraktion aktiivista aineosaa.

Tulisi ymmärtää, että edellä erityisesti mainittu-  
 jen aineosien lisäksi tämän keksinnön mukaiset formulaa-  
 tiot voivat sisältää muita alalla tavanomaisia aineita  
 riippuen kysymyksessä olevasta formulaatiosta, esimerkiksi  
 25 oraalisesti annettavaksi sopivat saattavat sisältää aromi-  
 aineita.

Seuraavien esimerkkien tarkoitus on kuvata tätä  
 keksintöä ja niitä ei tulisi millään tavalla tulkita sitä  
 rajoittaviksi.

#### 30           Esimerkki 1

9-(2-deoksi-3,5-di-O-propionyyli-2-fluori-β-D-ribo-  
 furanosyyli)guaniinin valmistus

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniini  
 (170 mg, 0,6 mmol), DMAP:n (4-dimetyyliamiinopyridiini)  
 35 (8 mg) ja trietyyliamiinin (0,41 ml, 5 ekv.) liuokseen



DMF:ssä (N,N-dimetyyliformamidi) (4 ml) huoneenlämpötilassa lisättiin propionihapon anhydridiä (0,16 ml, 2,1 ekv.) sekoittaen. 20 tunnin kuluttua lisättiin metanolia (2 ml). Yksi tunti myöhemmin seos haihdutettiin tyhjössä ja jäännös kromatografioitiin SiO<sub>2</sub>:lla käyttäen liekkitekniikkaa. Eluointi suoritettiin CHCl<sub>3</sub>/MeOH:lla (10:1), sitten (6:1), jolloin saatiin otsikon mukaista yhdistettä valkoisena kiinteänä aineena.

Sp. 198 - 200 °C.

10 Analyysi, laskettu 0,2-hydraatille:

C 47,93    H 5,13    N 17,47

saatu:        C 48,22    H 4,94    N 17,0

#### Esimerkki 2

15 9-(2-deoksi-3,5-di-O-asetyyli-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniinin ja 9-(2-deoksi-2-fluori-3,5-di-O-asetyyli-β-D-ribofuranosyyli)-2-N-asetyyliguanin valmistus

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniinin (160 mg, 0,56 mmol), DMAP:n (8 mg) ja trietyyliamiinin (400 µl, 5 ekv.) liuokseen DMF:ssä (4 ml) lisättiin etikkahapon anhydridiä (0,16 ml, 2,5 ekv.) sekoittaen huoneenlämpötilassa. 22 tunnin kuluttua keltainen liuos haihdutettiin tyhjössä, haihdutettiin yhdessä etanolin ja toluenin kanssa ja kromatografioitiin SiO<sub>2</sub>:lla käyttäen liekkitekniikkaa ja eluointi CHCl<sub>3</sub>/MeOH:lla (6:1). Ensin eluoitunut komponentti haihdutettiin, ja haihdutettiin yhdessä toluenin kanssa, jolloin saatiin triasettylijohdannainen valkoisena vaahtona.

Analyyysi, laskettu 0,1-toluaatille:

30 C 47,69    H 4,51    N 16,65

saatu:        C 47,47    H 4,37    N 16,82

Näiden fraktioiden kerääminen ja haihduttaminen, jotka sisälsivät toisen eluoituneen yhdisteen, antoi diasettylijohdannaisen valkoisena kiinteänä aineena.

35 Sp. 232 - 234 °C (haj.)

Analyysi, laskettu 0,25-etanolaatille:

|        |         |        |          |
|--------|---------|--------|----------|
|        | C 45,73 | H 4,63 | N 18,39, |
| saatu: | C 46,02 | H 4,34 | N 18,19  |

**Esimerkki 3**

- 5 9-(2-deoksi-2-fluori-3-O-pivaloyyli-β-D-ribofurano-  
syyli)guaniinin ja 9-(2-deoksi-2-fluori-3,5-di-O-  
pivaloyyli-β-D-ribofuranosyyli)guaniinin valmistus  
9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniinin  
(200 mg, 0,70 mmol), DMAP:n (10 mg) ja trietyyliamiinin  
10 (0,5 ml) liuokseen DMF:ssä (6 ml) huoneenlämpötilassa li-  
sättiin trimetyylietikkahapon anhydridiä (160 µl, 1,1 ekv)  
ja liuosta sekoitettiin 24 tuntia. Sitten lisättiin edel-  
leen 80 µl trimetyylietikkahapon anhydridiä ja sekoitta-  
mista jatkettiin viisi päivää. Reaktio tukahdutettiin me-  
15 tanolilla (1 ml), haihdutettiin alennetussa paineessa val-  
keaksi kiinteäksi aineeksi ja kromatografioitiin SiO<sub>2</sub>:lla  
käyttäen liekkimenetelmää, eluointiin CHCl<sub>3</sub>/MeOH:lla (15:1),  
sitten (10:1), (6:1) ja lopuksi (4:1).

- 20 Kolmas eluoitunut UV:a absorboiva fraktio oli  
3',5'-bispivalaattiesteri vahamaisena kiinteänä aineena  
eetterillä trituroinnin jälkeen.

Sp. 250 - 252 °C (haj.).

Analyysi C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>·0,5·H<sub>2</sub>O vaatii:

- |           |         |        |         |
|-----------|---------|--------|---------|
|           | C 51,94 | H 6,32 | N 15,15 |
| 25 saatu: | C 51,99 | H 6,23 | N 14,83 |

Neljäs eluoitunut UV:a absorboiva fraktio oli 3'-  
pivalaattiesteri valkeana jauheena.

Sp. vähitellen hämärtyy 260 - 320 °C:seen.

Analyysi C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>·0,7H<sub>2</sub>) vaatii:

- |        |         |        |         |
|--------|---------|--------|---------|
| 30     | C 47,17 | H 5,65 | N 18,34 |
| saatu: | C 47,10 | H 5,36 | N 17,93 |

## Esimerkki 4

9-(2-deoksi-2-fluori-3,5-di-O-pivaloyyli-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin, 9-(2-deoksi-2-fluori-3-O-pivaloyyli-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin ja 9-(2-deoksi-2-fluori-5-O-pivaloyyli-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin valmistus

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin (250 mg, 0,93 mmol), DMAP:n (10 mg) ja trietyyliamiinin (0,65 ml) liuokseen kuivassa DMF:ssä (7 ml) lisättiin trimetyylietikkahapon anhydridiä (226 µl, 1,2 ekv.) huoneenlämpötilassa sekoittaen. 24 tunnin kuluttua lisättiin edelleen 60 µl trimetyylietikkahapon anhydridiä, jota seurasi 24 tuntia myöhemmin edelleen 20 µl. Yhden lisäpäivän kuluttua reaktio tukahdutettiin MeOH:lla, haihdutettiin tyhjössä, haihdutettiin yhdessä etanolin kanssa ja puhdistettiin liekkikromatografialla SiO<sub>2</sub>:lla. Eluointi suoritettiin CHCl<sub>3</sub>/MeOH:lla (18:1), (15:1) ja lopuksi (10:1). Ensimmäinen eluoitunut UV:a absorboiva fraktio oli 3',5'-bisesteri valkoisena kiinteänä aineena trituroinnin jälkeen eetterillä.

Sp. 157 - 158 °C.

Analyysi C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>·0,3H<sub>2</sub>O vaatii:

C 54,24    H 6,51    N 15,82

saatu:        C 54,40    H 6,33    N 15,48

Toinen eluoitunut UV:a absorboiva fraktio oli 3'-pivalaattiesteri valkoisena kiinteänä aineena.

Sp. 204 - 250 °C.

Analyysi C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>·0,3H<sub>2</sub>O vaatii:

C 50,22    H 5,79    N 19,53

saatu:        C 50,25    H 5,58    N 19,31

Kolmas eluoitunut UV:a absorboiva fraktio oli 5'-pivalaattiesteri valkoisena vaahtona.

Sp. 130 - 134 °C. Analyysi C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>·0,24H<sub>2</sub>O vaatii:

C 50,46    H 5,76    N 19,62

saatu:        C 50,57    H 5,65    N 19,45

## Esimerkki 5

5 9(2-deoksi-2-fluori-3,5-di-O-valeryyli-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin, 9(2-deoksi-2-fluori-3-O-valeryyli-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin ja 9(2-deoksi-2-fluori-5-O-valeryyli-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin valmistaminen

10 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin (300 mg, 1,11 mmol), DMAP:n (10 mg) ja trietyyliamiinin (0,9 ml) liuokseen kuivassa DMF:ssä (8 ml) lisättiin valeryylihapon anhydridiä (263 µl, 1,2 ekv.) huoneenlämpötilassa sekoittaen. 24 ja 48 tunnin kuluttua lisättiin edelleen 30 µl valeryylihapon anhydridiä. Päivän kuluttua viimeisestä lisäyksestä seos tukahdutettiin MeOH:lla ja sen jälkeen muokattiin ja kromatografioitiin kuten pivalaattiestereiden valmistuksessa. Ensimmäinen eluoitunut UV:a absorboiva komponentti oli 3',5'-biesteri, joka kiteytyi valkoisina kiteinä trituroitaessa eetterillä.

Sp. 96 - 98 °C.

Analyysi  $C_{20}H_{28}FN_5O_5$  vaatii:

20 C 54,91 H 6,45 N 16,01  
saatu: C 54,93 H 6,49 N 15,89

Toinen eluoitunut UV:a absorboiva komponentti oli 3'-valeraattiesteri.

Sp. 182 - 183 °C.

25 Analyysi  $C_{15}H_{20}FN_5O_4$  vaatii:

C 50,98 H 5,71 N 19,82  
saatu: C 50,91 H 5,82 N 19,46

Kolmas eluoitunut UV:a absorboiva komponentti oli 5'-valeraattiesteri, joka kiteytyi trituroitaessa eetterillä.

30

Sp. 115 - 117 °C.

Analyysi  $C_{15}H_{20}FN_5O_4$  vaatii:

C 50,98 H 5,71 N 19,82  
saatu: C 50,76 H 5,81 N 19,44

## Esimerkki 6

## 2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

2,6-diaminopuriinia (Pacific Chemical Laboratories, 0,8 g, 4,8 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al.'n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 50 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (3 850 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (3 760 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. 12. päivänä reaktioseos suodatettiin. Suodos laitettiin 1,5 x 15 cm:n kolonniin, jossa oli anioninvaihtoharts (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Kolonnin pesun jälkeen vesi/metanolilla (7/3) tuote eluoitiin vesi/metanolilla (1/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 1,2-hydraattina.

Sp. 124 °C UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \cdot 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 291 (10,2), 252 (11,8); pH 7, 278,5 (10,3), 255 (9,69); 0,1 N NaOH, 279 (10,6), 255 (9,69).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_6\text{O}_{32} \cdot \text{H}_2\text{O}$ :lle:

|           |         |        |         |        |
|-----------|---------|--------|---------|--------|
| laskettu: | C 39,27 | H 5,07 | N 27,48 | F 6,21 |
| saatu:    | C 39,22 | H 5,09 | N 27,39 | F 6,45 |

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  7,94 (s, 1H, H-8); 6,74 ja 5,79 (2 bs, 4H, 2-NH<sub>2</sub> ja 6-NH<sub>2</sub>); 6,04 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,5 Hz, J = 3,4 Hz); 4,64 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 3'-OH); 5,25 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,5 Hz), 4,98 (m, 0,5 H, 0,5 (H-2')); 4,41 (m, 1 H, H-3'); 3,93 (m, 1H, H-4'), 3,65 (m, 2H, H<sub>a</sub>-5' ja H<sub>B</sub>-5').

## Esimerkki 7

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniini

2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriinia (0,20 g, 0,64 mmol), joka oli valmistettu  
 5 kuten esimerkissä 6, liuotettiin 15 ml:aan vettä. Vasikan suolen adenosiinideaminaasia (4 I.U., Boehringer Mannheim) lisättiin ja liuosta inkuboitiin 37 °C:ssa 4 päivää. Liuos jäädytettiin 4 °C:seen. Kolmen tunnin kuluttua suspensio suodatettiin ensimmäisen erän tuotekiteitä poistamiseksi.  
 10 Suodoksen tilavuutta pienennettiin vakuumissa ja suspensio jäädytettiin 4 °C:seen. Suspensio suodatettiin toisen erän tuotekiteitä poistamiseksi. Tuotekide-erät yhdistettiin, suspendoitiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 1,3-hydraattina.  
 15

Sp. >250 °C (haj.). UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 257 (12,2), 280 (sh); 0,1 N NaOH, 257 - 264 (10,9).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_4 \cdot 1,3 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:

|           |         |        |         |        |
|-----------|---------|--------|---------|--------|
| laskettu: | C 38,91 | H 4,77 | N 22,69 | F 6,16 |
| 20 saatu: | C 38,60 | H 4,82 | N 22,51 | F 6,44 |

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  10,63 (bs, 1H, N1-H); 7,94 (s, 1H, H-8); 6,51 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,00 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,5 Hz, J = 2,9 Hz); 5,59 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 3'-OH); 5,10 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz), 4,90 (m, 0,5 H, 0,5 (H-2')); 4,37 (m, 1H, 3-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 2H, H<sub>a</sub>-5' ja H<sub>b</sub>-5').  
 25

## Esimerkki 8

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini

Adeniinia (Mannheim Research Laboratories, Inc.,  
 30 0,8 g, 5,9 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofurano-  
 syyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa  
 J. F. Codington et al.'n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipus-  
 kuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) ka-  
 35 liumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (2400 I.U.) ja purii-

- ninukleosidifosforylaasia (3900 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Kuudentena päivänä reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. 17. päivänä suspensio suodatettiin ja suodos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin lämpimään veteen. Suspensio suodatettiin ja suodos laitettiin 1,5 x 12 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Tuote eluoitiin vedellä. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,6-hydraattina.
- Sp. 225 - 227 °C nm (haj). UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 257 (14,6); 0,1 N NaOH, 260 (14,9).
- Analyysi, laskettu  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_3 \cdot 0,6 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:
- |           |         |        |         |        |
|-----------|---------|--------|---------|--------|
| laskettu: | C 42,89 | H 4,57 | N 25,01 | F 6,78 |
| saatu:    | C 42,94 | H 4,76 | N 24,98 | F 6,89 |
- $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,35 ja 8,14 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 7,36 (s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>); 6,21 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 3,0 Hz); 5,71 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,0 Hz); 5,42 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 53,0 Hz, J1',2' = 3,0 Hz, J2'3' = 4,5 Hz); 5,25 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,47 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,74 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,56 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 9

#### 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D--ribofuranosyyli)-9H-puriini

- 2-aminopuriinia (Vega Biochemicals, 0,4 g, 3,0 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasii-  
lia (0,2 g, 0,71 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 35 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia.

Tymidiinifosforylaasia (1930 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (1880 I.U.) (T. A. Krenitsky et al:n Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. 24. päivänä reaktioseos laimennettiin 200 ml:ksi vedellä ja 1390 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 1880 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 35. päivänä suspensio haihdutettiin. Jäännös liuotettiin vesi/metanolin (7/3) ja laitettiin 1,5 x 15 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Tuote eluoiitiin vesi/metanolilla (7/3). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 0,6-hydraattina.

Sp. 151 - 153 °C. UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 313 (4,00), 240 - 245; pH 7, 304 (7,00), 243; 0,1 N NaOH, 304 (7,30), 243.

Analyysi, laskettu  $C_{10}H_{12}FN_5O_3 \cdot 0,6 H_2O$ :lle:

laskettu: C 42,89 H 4,75 N 25,01 F 6,78

saatu: C 43,02 H 4,71 N 25,12 F 6,58.

$^1H$ -NMR (80 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,62 ja 8,31 (2s, 2H, H-8 ja H-6), 6,62 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,16 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,7 Hz, J = 2,7 Hz); 5,71 (m, 1,5 H, 3'-OH ja 0,5 (H-2')); 5,12 (m, 1,5 H, 5'-OH ja 0,5 (H-2')); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,66 (m, 2H, H<sub>a</sub>-5' ja H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 10

2-amino-6-syklopropyyliamino-9H-puriini-hydrokloridi

2-amino-6-klooripuriinin (Aldrich Chemical Company, 4,66 g, 27,5 mmol) ja syklopropyyliamiinin (Aldrich Chemical Company, 12,5 g, 220 mmol) liuosta MeOH:ssa (100 ml) kuumennettiin 50 °C:ssa 18 tuntia. Sitten lisättiin 2-metoksietanolia (50 ml) ja reaktioseosta kuumennet-



tiin 70 °C:ssa 6 tuntia lisää. Jäähdytyksen jälkeen pieni määrä reagoimatonta lähtöainetta suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin ja puhdistettiin piidioksidigeelikolonissa  $\text{CHCl}_3$ : 5 % - 10 % MeOH:lla. Tuote kiteytettiin sitten uudelleen kahdesti MeOH:sta ja kerran EtOH:sta hydrokloridisuolana, jolloin saatiin 1,45 g (23 %) tuotetta, sp. 253 - 257 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  6,70 - 6,82 (m, 4,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3,04 (br, s, 1,  $\text{CHN}$ ), 7,35 - 7,55 (br, s, 2,  $\text{NH}_2$ ), 8,13 (s, 1, CH), 9,49 (br s, 1,  $\text{NHCH}$ ), 13,0 - 13,3 (br, s, 2,  $\text{NH}_2^+$ ).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ :lle:

laskettu: C 41,57 H 5,01 N 36,35 Cl 15,34

saatu: C 41,55 H 5,01 N 36,28 Cl 15,4

**2-amino-6-(syklopropyyliamino)-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini**

2-amino-6-(syklopropyyliamino)-9H-puriinihydrokloridia (0,3 g, 1,3 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), jota voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, liuotettiin 20 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (2000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (5540 I.U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 444) lisättiin ja reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa. Viidentenä päivänä 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 5540 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 21 päivänä reaktioseos laitettiin 2,5 x 8 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä tuote eluoitiin vesi/metanolilla (7/3). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,6-hydraattina.

Sp. 120 °C (osittainen sulaminen 80 °C:ssa). UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 295,5 (14,3), 254 (12,7); pH 7, 282 (14,8) 262 (sh); 0,1 N NaOH, 282 (15,2), 262 (sh).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FN}_6\text{O}_3 \cdot 0,6 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:

5 laskettu: C 46,59 H 5,47 N 25,08 F 5,67

saatu: C 46,46 H 5,35 N 25,03 F 5,91

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  7,93 (s, 1H, H-8); 7,38 (bd, 1H, 6-NH,  $J = 4,5$  Hz); 6,04 (dd, 1H, H-1',  $J_{F,1} = 16,4$  Hz,  $J = 3,3$  Hz); 5,88 (bs, 2H, 2-NH); 5,62 (d, 1H, 3'-OH,  $J = 5,9$  Hz); 5,30 (ilmeinen dt, 1H, H-2',  $J_{F,2} = 53,7$  Hz,  $J = 3,8$  Hz); 5,23 (t, 1H, 5'-OH,  $J = 5,4$  Hz); 4,38 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,69 (m, 1H,  $\text{H}_a$ -5'); 3,59 (m, 1H,  $\text{H}_b$ -5'); 3,10 (m, 1H, N-CH); 0,62 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

#### Esimerkki 11

15 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-metoksi-9H-puriini

6-metoksipuriinia (Sigma Chemical Company, 0,8 g, 5,3 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. tymidiinifosforylaasia (2400 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (3900 I.U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Kuudentena päivänä reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. 16. päivänä 2640 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 4360 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 45. päivänä reaktioseos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin lämpimään metanoliin ja suspensio suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin lämpimään veteen ja laitettiin 2,5 x 7 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksi-

dimuoto). Vedellä pesun jälkeen tuote eluoitiin metanoli/vedellä (9/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,3-hydraattina.

Sp. 182 °C UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 250 (8,72), 259 (sh); pH 7, 248 (8,95) 2,59 (sh); 0,1 N NaOH, 250 (9,14), 259 (sh).

Analyysi, laskettu  $C_{11}H_{13}FN_4O_4 \cdot 0,3 H_2O$ :lle:

10 laskettu: C 45,61 H 4,73 N 19,34 F 6,56  
 saatu: C 45,72 H 4,66 N 19,47 F 6,72  
 $^1H$ -NMR (300 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,63 ja 8,58 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 6,34 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 17,1 Hz, J = 2,4 Hz); 5,76 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,45 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 52,7 Hz, J1',2' = 2,4 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,17 (t, 1H, 5'-OH, J = 4,1 Hz); 4,50 (m, 1H, H-3'); 4,11 (s, 3H O-CH<sub>3</sub>); 4,00 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'), 3,62 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 12

20 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-metoksi-9H-puriini

2-amino-6-metoksipuriinia (0,8 g, 4,8 mmol), joka voidaan valmistaa R. W. Balsiger'n ja J. A. Montgomery'n (J. Org. Chem. 20:1573, 1960) mukaisesti, ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (2400 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (3900 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981, ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Kuudentena päivänä reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia.

10. päivänä reaktioseos laimennettiin 200 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. 16. päivänä 2640 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 4360 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin 24. päivänä reaktioseos suodatettiin ja suodos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin metanoliin. Suspensio suodatettiin ja suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin veteen ja laitettiin 2,5 x 7 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (9/1). Sen jälkeen kun liuotin oli poistettu vakuuissa, jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,5-hydraattina.
- Sp. 200 - 202 °C UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 288 (7,85), 244,5 (6,43); pH 7, 279,5 (8,09), 248 (8,85); 0,1 N NaOH, 280 (8,40), 248,5 (8,59).
- Analyysi, laskettu  $C_{11}H_{14}FN_5O_4 \cdot 0,5 H_2O$ :lle:  
 laskettu: C 42,86 H 4,90 N 22,78 F 6,16  
 saatu: C 42,81 H 4,92 N 22,69 F 6,29
- $^1H$ -NMR (300 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,12 (s, 1H, H-8); 6,57 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,11 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,6 Hz); 5,69 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,10 Hz); 5,31 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 53,0 Hz, J1',2' = 2,7 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,17 (t, 1H, 5'OH, J = 4,2 Hz); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,95 (m, 4H, H-4' ja O-CH<sub>3</sub>); 3,74 (m 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,58 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 13

#### 6-syklopropyyliamino-9H-puriini

- 6-klooripuriinin (Aldrich Chemical Company, 4,23 g, 27 mmol) ja syklopropyyliamiinin (Aldrich Chemical Company, 12,5 g, 22 mmol) liuosta MeOH:ssa (100 ml) kuumennettiin 50 °C:ssa 48 tuntia. Liuotin poistettiin, ja raaka tuote puhdistettiin piidioksidigeelikolonniin eluimalla  $CHCl_3$ : 5 % MeOH:lla, jolloin saatiin 5,90 g voimaista kiinteää ainetta. Tämä kiteytettiin uudelleen

MeOH:sta, jolloin saatiin kaksi erää, 2,69 g ja 1,16 g (81,4 % kokonaissaanto), sp. 237 - 240 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): 0,6 - 0,71 (m, 4, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,03 (br s, 1, CHNH); 7,73 (d, 1, NH), 8,05 (s, 1, CH), 8,18 (s, 1, CH), 12,7, (br, 1, NH).

Analyysi, laskettu C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>:lle:

laskettu: C 54,85 H 5,18 N 39,97

saatu: C 54,69 H 5,22 N 39,87

**6-(syklopropyyliamino)-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriini**

6-(syklopropyyliamino)-9H-puriinia (0,2 g, 1,1 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasii-  
lia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Suspension pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla. tymidinifosforylaasia (2000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (5540 I.U.) T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Viidentenä päivänä lisättiin 0,2 g 6-(syklopropyyliamino)puriinia ja 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 5540 I.U. puriininukleosidifosforylaasia. Yhdeksäntenä päivänä 0,2 g 6-(syklopropyyliamino)puriinia lisättiin ja reaktioseoksen pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla. Tymidiinifosforylaasia (2000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (5540 I.U.) lisättiin. 20. päivänä reaktioseoksen pH säädettiin 9,4:ksi NH<sub>4</sub>OH:lla ja reaktioseos laitettiin 2,5 x 8,5 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Vedellä pesun jälkeen tuote eluoitiin vesi/metanolilla (7/3). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,4-hydraattina.

Sp. 207 - 208 °C UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 264 (19,1); pH 7, 268 (18,2); 0,1 N NaOH, 268 (18,6).

Analyysi, laskettu  $C_{13}H_{16}FN_5O_3 \cdot 0,4 H_2O$ :lle:

laskettu: C 49,33 H 5,35 N 22,13 F 6,00

5 saatu: C 49,33 H 5,33 N 22,11 F 6,14

$^1H$ -NMR (200 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,35 ja 8,24 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 7,98 (bd, 1H, 6-NH,  $J = 4,10$  Hz), 6,23 (dd, 1H, H-1',  $JF,1' = 16,8$  Hz,  $J = 2,9$  Hz); 5,68 (d, 1H, 3'-OH,  $J = 5,9$  Hz); 5,42 (ddd, 1H, H-2',  $JF,2 = 53,0$  Hz,  $J1',2' = 4,6$  Hz), 5,20 (t, 1H, 5-OH,  $J = 5,6$  Hz), 4,46 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H,  $H_a-5'$ ); 3,55 (m, 1H,  $H_b-5'$ ); 3,04 (m, 1H, N-CH); 0,66 (m, 4H,  $CH_2CH_2$ ).

#### Esimerkki 14

15 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-etoksi-9H-puriini

2-amino-6-etoksipuriinia (0,8 g, 4,5 mmol), joka voidaan valmistaa R. W. Balsiger'n ja J. A. Montgomery'n (J. Org. Chem. 25:1573, 1960) mukaisesti, ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,5 g, 2,1 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 50 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Suspension pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla. tymidiinifosforylaasia (4000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (14000 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patent-tijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja reaktioseosta sekoitettiin 37 °C:ssa. Neljäntenä päivänä 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 6980 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin ja reaktioseos laimennettiin 250 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. 14. päivänä liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös suspendoitiin veteen ja metanolia lisättiin proteiinin saostamiseksi. Sen jälkeen kun suspensio oli suodatettu, suodos haihdutettiin. Jäännös

liuotettiin kuumaan veteen ja laitettiin 1,5 x 15 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (1/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,7-hydraattina.

Sp. 85 °C (osittainen sulaminen 50 °C:ssa) UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 288 (8,78), 244,5 (7,19); pH 7, 280 (8,96), 247,5 (9,55); 0,1 N NaOH, 280 (9,25), 249 (9,15).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{O}_4 \cdot 0,7 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:

laskettu: C 44,23 H 5,38 N 21,49 F 5,83

saatu: C 44,30 H 5,43 N 21,39 F 5,81

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,09 (s, 1H, H-8); 6,49 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,08 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,4 Hz, J = 2,7 Hz); 5,67 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,42 (m, 0,5 H, 0,5 (H-2')); 5,15 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 5'-OH); 4,44 (q, 2H, 6-OCH<sub>2</sub>, J = 7,0 Hz); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5); 3,56 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5'); 1,34 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 7,0 Hz).

#### Esimerkki 15

#### 2-amino-6-kloori-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

Reaktio 1: 2-amino-6-klooripuriinia (Sigma Chemical Company, 0,8 g, 4,7 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 50 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Suspension pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla. Tymidiinifosforylaasia (3850 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (6500 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 444) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin

37 °C:ssa. 22. päivänä reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 1270 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 2180 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 32. päivänä reaktioseos laimennettiin 200 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 2540 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 4360 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 61. päivänä reaktioseosta suodatettiin. suodos haihdutettiin ja jäännös varastoitiin 4 °C:ssa.

**Reaktio 2:** 2-amino-6-klooripuriinia (Sigma Chemical Company, 0,8 g, 4,7 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol) suspendoitiin 25 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (4000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (6500 I.U.) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. 10. päivänä reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. 20. päivänä reaktioseos laimennettiin 200 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 2640 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 4360 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 53. päivänä reaktioseos suodatettiin. Suodos haihdutettiin ja jäännös varastoitiin 4 °C:ssa. Jäännökset reaktioista 1 ja 2 suspendoitiin veteen ja yhdistettiin. Suspensio lämmitettiin ja sen jälkeen suodatettiin. Tuote, jonka suodos sisälsi, puhdistettiin kromatografisesti 7,5 x 90 cm:n Biogel P-2-kolonnilla (Bio-Rad) n-propanoli/vedellä (3/7) liuottimena, jota seurasi kromatografointi 5 x 90 cm:n Sephadex G-10-kolonnilla (Pharmacia LKB) n-propanoli/vedellä (3/7) liuottimena. Vain tuotetta sisältävät fraktiot kerättiin yhteen ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös suspendoitiin ve-



teen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen tuote (erä 1). Fraktiot, jotka sisälsivät tuotetta ja epäpuhtauksia, jotka eluoituivat Sephadex G-10-kolonnin läpi, yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös  
 5 liuotettiin vesi/MeCN:iin (49/1) ja tuote puhdistettiin edelleen käänteisfaasikromatografialla C18-piidioksidilla (Hi-Chrom Prep-40-ODS, Regis Chemical Co.) vesi/MeCN:lla (49/1) liuottimena. Tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja suodatettiin 0,2 µm-huokoisen nailonsuodattimen  
 10 läpi jäännöspiidioksidin poistamiseksi. Sen jälkeen kun liuotin oli poistettu vakuuissa, jäännös liuotettiin veteen ja suodatettiin 0,22 µm-huokoisen membraanisuodattimen läpi (Millipore GS). Suodoksen lyofilisointi antoi otsikon mukaisen yhdisteen (erä 2), joka analysoitui 0,5-hydraattina.  
 15

#### Tulokset erälle 1:

Sp. 212 °C (osittain sulaminen 205 °C:ssa) UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 309 (6,00), 247 (5,60); pH 7, 307,5 (6,30), 2,47 (5,80); 0,1 N NaOH, 307 (6,40), 247 (5,30).  
 20 Analyysi, laskettu  $C_{10}H_{11}Cl F_{n_5}O_3$ :lle:  
 laskettu: C 39,55 H 3,65 N 23,06 Cl 11,67 F 6,26  
 saatu: C 39,69 H 3,28 N 22,84 Cl 11,64 F 6,14  
 $^1H$ -NMR (300 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,37 (s, 1H, H-8); 7,07 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,12 (dd, 1H, H-1',  $J_{F,1'} = 16,6$  Hz,  $J = 2,0$  Hz); 5,72 (d, 1H, 3'-OH,  $J = 6,4$  Hz); 5,34 (ddd, 1H, H-2',  $J_{F,2'} = 52,9$  Hz,  $J_{1',2'} = 2,0$  Hz,  $J_{2',3'} = 4,2$  Hz); 5,19 (t, 1H, 5'-OH,  $J = 5,3$  Hz); 4,42 (m, 1H, H-3'); 3,96 (m, 1H, H-4'); 3,76 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,61 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').  
 25

#### Tulokset erälle 2:

30 Sp. 215 °C UV  $\lambda_{\max}$  nm: 0,1 N HCl, 309,5, 246,5; pH 7, 307,5, 247; 0,1 N NaOH, 307,5, 247.  
 Analyysi, laskettu  $C_{10}H_{11}Cl F_{n_5}O_3 \cdot 0,5 H_2O$ :lle:  
 laskettu: C 38,41 H 3,87 N 22,40 Cl 11,34 F 6,08  
 saatu: C 38,73 H 3,79 N 22,14 Cl 11,16 F 6,10

<sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): 8,36 (s, 1H, H-8); 7,03 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 3,2 Hz), 5,68 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 3'-OH); 5,15 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 5'-OH); 4,35 (m, 1H, H-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 2H, H<sub>a</sub>-5' ja H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 16

#### 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-6-metyyliamino-9H-puriini

2-amino-6-metyyliaminopuriinia (J. A. Montgomery ja L. B. Holum, J. A. C. S. 80:404, 1958; 0,51 g, 3,1 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,52 g, 2,1 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 50 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymi-  
diinifosforylaasia (4000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (14000 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Kuudentena päivänä reaktioseos laimennettiin 250 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 0,49 g 2-amino-6-metyyliaminopuriinia ja 4000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 14000 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 14. päivänä reaktioseos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin metanoli/veteen ja suspensio suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin veteen ja laitettiin 2,5 x 13 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AGIX2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (1/1). Sen jälkeen kun liuotin oli poistettu vakuumissa, jäännös liuotettiin veteen ja suodatettiin 0,22 µm-huokoisen membraanisuodattimen läpi. Suodoksen lyofilisointi antoi otsikon mukaisen tuotteen, joka analysoitui 0,5-hydraattina.

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): 8,36 (s, 1H, H-8); 7,03 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 3,2 Hz); 5,68 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 3'-OH); 5,15 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 5'-OH); 4,35 (m, 1H, H-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 2H, H<sub>a</sub>-5' ja H<sub>b</sub>-5').

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FN}_6\text{O}_3$  0,5  $\text{H}_2\text{O}$ :lle:

laskettu: C 43,00 H 5,25 N 27,35 F 6,18

saatu: C 42,99 H 5,28 N 27,33 F 6,16

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): 8 7,92 (s, 1H, H-8); 7,28 (bs, 1H, 6-NH); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,3 Hz, J = 3,3 Hz); 5,91 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 5,64 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,8 Hz); 5,29 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 5,30 Hz, J1',2' = 3,3 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,27 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,5 Hz); 4,37 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,60 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5'); 2,86 (bs, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

#### Esimerkki 17

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)hypoksaantiini

6-amino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriinia (0,29 g, 1,0 mmol), joka oli valmistettu kuten esimerkissä 8, liuotettiin 100 ml:aan vettä. Vasikan suolen adenosinideaminaasia (4 I.U., Boehringer Mannheim) lisättiin ja liuosta inkuboitiin 37 °C:ssa 24 tuntia. Liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin vesi/n-propanoliin (7/3) ja kromatografioitiin 5 x 90 cm:n Sephadex G-10-kolonnilla (Pharmacia LKB) vesi/n-propanolilla (7/3) liuottimena. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin ot-sikon mukainen tuote, joka analysoitiin hydraattina.

Sp. 175 °C (osittainen sulaminen 125 °C:ssa) UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 249 (11,8); pH 7, 248,5 (12,0); 0,1 N NaOH, 253 (13,0).

Analyysi, laskettu  $C_{10}H_{11}FN_4O_4 \cdot H_2O$ :lle

laskettu: C 41,67 H 4,55 N 19,44 F 6,59

saatu: C 41,72 H 4,58 N 19,46 F 6,37

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,33 ja 8,09 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 6,21 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 2,4 Hz); 5,74 (bs, 1H, 3'-OH), 5,36 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 52,7 Hz, J1',2' = 2,4 Hz, J1',3' = 4,4 Hz); 5,20 (bs, 1H, 5'-OH); 4,43 (ilmeinen d m, 1H, H-3', JF,3' = 18,9 Hz); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,59 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 18

#### 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-propoksi-9H-puriini

2-amino-6-propoksipuriinia (0,3 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa R. W. Balsiger'n ja J. A. Montgomery'n (J. Org. Chem. 25:1573, 1960) mukaisesti, ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,52 g, 2,1 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 50 ml:aan 2 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Suspension pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla. Tymidiinifosforylaasia (4000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (14000 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja reaktioseosta sekoitettiin 37 °C:ssa. Kuudentena päivänä reaktioseos laimennettiin 250 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 4000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 14000 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 14. päivänä liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös suspendoitiin metanoli/veteen ja suspensio suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin kuumaan veteen ja laitettiin 2,5 x 13 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty

vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (1/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 5 0,9-hydraattina.

Sp. 93 °C (osittainen sulaminen 65 °C:ssa) UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 289 (9,05), 245 (7,37); pH 7, 280 (9,28), 248 (9,82); 0,1 N NaOH, 280,5 (9,67), 249,5 (9,55).

Analyysi, laskettu  $C_{13}H_{18}FN_5O_4 \cdot 0,9 H_2O$ :lle:

10 laskettu: C 45,69 H 5,78 N 20,49 F 5,56  
saatu: C 45,75 H 5,61 N 20,51 F 5,60

$^1H$ -NMR (200 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,09 (s, 1H, H-8); 6,49 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,08 (dd, 1H, H<sup>1</sup>, JF, 1' = 16,4 Hz, J = 2,7 Hz); 5,65 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,0 Hz); 5,42 (ilmeinen t, 0,5 H, 0,5 (H-2'), J = 3,5 Hz); 5,14 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 5'-OH); 4,36 (m, 3H, H-3'; ja 6-OCH<sub>2</sub>); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,69 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,60 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5'); 1,75 (ilmeinen sekstetti, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 7,1 Hz); 0,95 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 7,4 Hz).

## 20 Esimerkki 19

### 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-jodi-9H-puriini

2-amino-6-jodipuriinia (0,8 g, 3,1 mmol), joka voidaan valmistaa R. T. Koda et al:n (J. Pharm. Sci. 57:2056, 25 1968) mukaisesti, ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,39 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) 30 kaliumatsidia. Suspension pH säädettiin 7,2:ksi KOH:lla. Tymidiinifosforylaasia (2000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (3250 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 35 37 °C:ssa. 12. päivänä reaktioseoksen pH säädettiin

6,8:ksi etikkahapolla, ja 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 3250 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 26. päivänä reaktioseos laimennettiin 500 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 3250 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 40. päivänä reaktioseos suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin vesi/n-propanoliin (7/3) ja suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin metanolin ja sen jälkeen se suodatettiin. Tuote, jonka suodos sisälsi, puhdistettiin kromatografisesti 5 x 90 cm:n Biogel P-2-kolonnissa (Bio-Rad) vesi/n-propanolin (7/3) ollessa liuottimena, mitä seurasi kromatografointi 5 x 90 cm:n Sephadex G-10-kolonnilla (Pharmacia LKB) vesi/n-propanolin (7/3) ollessa liuottimena. Sen jälkeen kun liuotin oli poistettu vakuumissa, jäännös suspendoitiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,6-hydraattina.

Sp. 135 °C (osittainen sulaminen 108 - 110 °C:ssa) UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 318 (7,94); pH 7, 315 (8,30); 0,1 N NaOH, 315 (8,36).

Analyysi, laskettu  $C_{10}H_{11}FN_5O_3 \cdot 0,6 H_2O$ :lle:  
 laskettu: C 29,59 H 3,03 N 17,25 F 4,68 I 31,26  
 saatu: C 26,69 H 3,06 N 17,22 F 4,44 I 31,47

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,33 (s, 1H, H-8); 6,96 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,09 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,7 Hz, J = 2,4 Hz); 5,69 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,3 Hz); 5,33 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 52,8 Hz, J1',2' = 2,4 Hz, J2'3' = 4,2 Hz); 5,16 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,3 Hz); 4,42 (m, 1H, H-3'); 3,95 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,60 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 20

9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-metyyliamino-9H-puriini  
 6-metyyliaminopuriinia (Sigma Chemical Company,  
 0,8 g, 5,4 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofurano-

syyli)urasiilia (0,39 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (2400 I.U.) ja puriinukleosidifosforylaasia (3900 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Kuudentena päivänä reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. 17. päivä reaktioseos suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin metanoliin ja sen jälkeen suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin veteen ja laitettiin 2,5 x 7 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Tuote eluoitiin vedellä. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin µm-huokoisen membraanisuodattimen läpi. Suodoksen lyofilisointi antoi otsikon mukaisen yhdisteen.

Sp. 140 °C (kutistuu 65 °C:ssa, osittainen sulaminen 110 °C:ssa) UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 261,5 (16,2); pH 7, 265,5 (15,0); 0,1 N NaOH, 266 (15,3).

Analyysi, laskettu  $C_{11}H_{14}FN_5O_3$ :lle:

|    |           |         |        |         |        |
|----|-----------|---------|--------|---------|--------|
| 25 | laskettu: | C 46,64 | H 4,98 | N 24,72 | F 6,71 |
|    | saatu:    | C 46,48 | H 5,07 | N 24,63 | F 6,93 |

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ):  $\delta$  8,37 ja 8,25 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 7,86 (bs, 1H, 6-NH); 6,24 (dd, 1H, H-1',  $J_{F,1'} = 16,8$  Hz,  $J = 3,2$  Hz); 5,74 (d, 1H, 3'-OH,  $J = 6,1$  Hz); 5,44 (ddd, 1H, H-2',  $J_{F,2'} = 53,0$  Hz,  $J_{1',2'} = 3,2$  Hz,  $J_{2',3'} = 4,4$  Hz); 5,28 (t, 1H, 5'-OH,  $J = 5,6$  Hz); 4,49 (m, 1H, H-3'); 3,99 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H,  $H_a$ -5'); 3,58 (m, 1H,  $H_b$ -5'); 2,95 (bs, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

## Esimerkki 21

## 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-6-etoksi-9H-puriini

6-etoksipuriinia (Sigma Chemical Company, 0,2 g, 1,2 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-urasiilia (0,4 g, 1,6 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia.

Suspension pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla ja tymidiinifosforylaasia (2000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (5540 I.U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. Viidentenä päivänä lisättiin lisäksi 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 2770 I.U. puriininukleosidifosforylaasia. Yhdeksäntenä päivänä lisättiin 0,2 g 6-etoksipuriinia. Reaktioseoksen pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla ja 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 5540 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 28. päivänä suspensio suodatettiin. Suodos laitettiin 2,5 x 8,5 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Vedellä pesun jälkeen tuote eluoiitiin metanoli/vedellä (3/7). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännöksessä oleva tuote puhdistettiin edelleen kromatografisesti 2,5 x 90 cm:n Biogel P-2-kolonnissa (Bio-Rad) vesi/metanolin (8/2) ollessa liuottimena, mitä seurasi kromatografiointi 2,5 x 50 cm:n piidioksidigeelikolonnilla asetonitriili/veden (49/1) ollessa liuottimena. Tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,5-hydraattina.



Sp. 85 - 87 °C (osittainen sulaminen 60 °C:ssa) UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 249 (11,4); pH 7, 248 (11,7); 0,1 N NaOH; 249 (12,0).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_4 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:

5 laskettu: C 46,91 H 5,25 N 18,23 F 6,18

saatu: C 46,80 H 5,23 N 18,21 F 6,65

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,59 ja 8,53 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 6,31 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 17,0 Hz, J = 2,5 Hz); 5,70 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,3 Hz); 5,43 (ddd, 1H, H-2', JF,1' = 52,9 Hz, J1'2' = 2,5 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,12 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,4 Hz); 4,59 (q, 2H, 6-OCH<sub>2</sub>, J = 7,0 Hz); 4,51 (m, 1H, H-3'); 3,98 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H<sub>a</sub>-4'); 3,61 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5'); 1,40 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 7,0 Hz).

#### 15 Esimerkki 22

2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-metyyllitio-9H-puriini

2-amino-6-metyyllitiopuriinia (Sigma Chemical Company, 0,6 g, 3,3 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,3 g, 1,2 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 200 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (4000 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (6500 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 444) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. 14. päivänä reaktioseos laimennettiin 400 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 8000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 6500 I.U. Puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 25. päivänä reaktioseoksen pH säädettiin 6,9:ksi KOH:lla. 39. päivänä reaktioseos suodatettiin. Suodos laitettiin 2,5 x 13 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuo-

to) ja tuote eluoitiin metanoli/vedellä (3/7). Sen jälkeen kun liuotin oli poistettu vakuuissa, jäännös suspendoitiin veteen ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste, joka analysoitui 0,5-hydraattina.

5 Sp. 85 - 87 °C UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 327 (11,6), 250 (11,2), 263 (sh); pH 7, 311 (12,8), 257 (sh), 246 (15,1); 0,1 N NaOH, 311 (13,3), 257 (sh), 246 (14,8).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{O}_3\text{S}$  0,5  $\text{H}_2\text{O}$ :lle:

laskettu: C 40,74 H 4,66 N 21,59 F 5,80 S 9,89

10 saatu: C 40,79 H 4,66 N 21,55 F 5,89 S 9,84

$^1\text{H}$ -NMR (80 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,17 (s, 1H, H-8); 6,57 (bs, 2H, 2-NH<sub>2</sub>j); 6,14 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,4 Hz, J = 3,2 Hz); 5,64 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') ja 3'-OH); 5,11 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 5'OH); 4,40 (m 1H, H-3'); 3,95 (m, 15 1H, H-4'); 3,65 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5' ja H<sub>B</sub>-5'); 2,58 (s, 3H, 6-SCH<sub>3</sub>).

#### Esimerkki 23

9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-jodi-9H-puriini

20 6-jodipuriinia (Sigma Chemical Company, 0,7 g, 2,7 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-urasiilia (0,4 g, 1,7 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH  
25 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (2640 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (4360 I.U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. 21. päi-  
30 vänä reaktioseos laimennettiin 50 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 4000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 6500 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 43. päivänä reaktioseos laimennettiin 250 ml:ksi vedellä ja  
35 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 3250 I.U. puriininuk-

leosidifosforylaasia lisättiin. 57. päivänä reaktioseos suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös suspendoitiin lämpimään metanoliin ja suodatettiin. Suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin vesi/n-propanoliin (7/3) ja laitettiin 7,5 x 90 cm:n Biogel P-2-kolonneihin (Bio-Rad) vesi/n-propanolin (7/3) ollessa liuottimena. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin kuumaan metanoliin ja vettä lisättiin, kunnes muodostui saostuma. Metanoli poistettiin vakuumissa. Suspension annettiin seisoa yön yli, jonka jälkeen se suodatettiin. Suodatinkakku sisälsi tuotteen massan. Suodos haihdutettiin ja edellämainittu menetelmä toistettiin jäljellä olevan tuotteen saostamiseksi. Suodatinkakut yhdistettiin ja suspendoitiin veteen. Lyofilisointi antoi otsikon mukaisen yhdisteen.

Sp. 198 - 200 °C (haj.).

UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 275 (11,1), 257 (sh); pH 7, 275 (11,1), 258 (sh); 0,1 N NaOH, 276 (9,98), 257 (sh), 303 (sh).

20 Analyysi, laskettu  $C_{10}H_{10}F_1N_4O_3$ :lle

laskettu: C 31,60 H 2,65 N 14,74 F 5,00 I 33,39

saatu: C 31,70 H 2,70 N 14,69 F 4,96 I 33,48

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,87 ja 8,66 (2s, 2H, H-8 ja H-2); 6,35 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 17,0 Hz, J = 2,0 Hz); 5,76 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 3'-OH); 5,14 (m, 1,5 H, 0,5 (H-2') ja 5'-OH); 4,51 (m, 1H, H-3'); 3,99 (m, 1H, H-4'); 3,70 (m, 2H,  $\text{H}_a$ -5' ja  $\text{H}_\beta$ 5').

#### Esimerkki 24

30 9-(2-deoksi-2-fluori-5-O-L-valinyyli- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-adeniinin ja sen bisvetykloridisuolan valmistus

9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniinin (500 mg, 1,86 mmol), FMOC-L-valiinin (820 mg, 1,3 ekv.) ja DMAP:n (10 mg) liuokseen kuivassa DMF:ssa (14 ml) 0 °C:ssa lisättiin DCC:n (disykloheksyylikarbodi-imidi)

(520 mg, 1,35 ekv.) liuosta  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ :ssa (2 ml) sekoittaen. Seoksen annettiin saavuttaa huoneenlämpötila, sitä sekoitettiin 90 minuuttia ja sen jälkeen se haihdutettiin tyhjössä. Sen jälkeen kun jäännös oli haihdutettu yhdessä etanolin kanssa, se siirrettiin  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ :iin (9:1) ja suodatettiin. Suodos haihdutettiin sitten ja kromatografioitiin  $\text{SiO}_2$ :lla käyttäen liekkitekniikkaa, eluoimalla EtOH:n  $\text{CHCl}_3$ :ssa gradientilla (5 % - 10 %).

Ensimmäiseksi eluoitunut fraktio oli 3',5'-bises-  
teri (230 mg), joka sisälsi hiukan disykloheksyyliureaa. Toinen fraktio oli 3'-monoesteri ja kolmas fraktio oli 5'-monoesteri (190 mg).

5'-Fmoc-suojattu valinaattiesteri käsiteltiin sitten piperidiinin (1 ml) liuoksella DMF:ssa (4 ml) huoneen-  
lämpötilassa 5 minuuttia, haihdutettiin tyhjössä, liuotet-  
tiin veteen (25 ml) ja pestiin  $\text{CHCl}_3$ :lla (30 ml). Vesi  
haihdutettiin, jolloin muodostui väritön kumimainen aine,  
joka siirrettiin vesipitoiseen etikkahappoon, haihdutet-  
tiin, ja haihdutettiin yhdessä etanolin ja eetterin kans-  
sa, jolloin saatiin 5'-O-valinaattiesteri hygroskooppisena  
amorfisena kiinteänä aineena (100 mg).

Analyysi  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_4 \cdot 1,5 \text{ CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$

vaatii: C 44,53 H 6,23 N 17,32

saatu: C 44,38 H 6,32 N 16,94

Sp. hajoaa 150 °C:n yläpuolella.

Bisvetykloridisuola valmistettiin liuottamalla 5'-  
O-valinaattiesteri isopropanoliin, mitä seurasi isopropa-  
nolin, joka oli aikaisemmin kyllästetty vetykloridikaasul-  
la, lisäys ja liuottimen haihduttaminen. Valkoinen kiinteä  
aine siirrettiin sitten MeOH:iin ja saostettiin eetterillä  
0 °C:ssa. Suodattaminen antoi bisvetykloridisuolan.

Analyysi  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_4 \cdot 2 \text{ HCl} \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$

vaatii: C 40,00 H 5,37 N 18,67

saatu: C 40,26 H 5,19 N 18,74

Sp. 210 - 213 °C (haj.).

## Esimerkki 25

2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-  
9H-puriinibisvetykloridi

2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-  
5 9H-puriiniin (300 mg, 1,11 mmol) MeOH:ssa (20 ml) lisät-  
tiin isopropanolia (2,5 ml), joka oli aikaisemmin kylläs-  
tetty vetykloridi(HCl)kaasulla. Asetonia (15 ml) lisättiin  
ja liuos haihdutettiin melkein kuivaksi vakuumissa huone-  
neenlämpötilassa. Triturointi etyyliasetaatilla (15 ml)  
10 antoi valkoista kiinteää ainetta, joka suodatettiin ja  
pestiin eetterillä.

Sp. 160 - 163 °C (haj.).

Analyysi  $C_{10}H_{12}FN_5 \cdot 2 HCl$

|           |         |        |         |        |
|-----------|---------|--------|---------|--------|
| vaatii:   | C 35,01 | H 4,12 | N 20,42 | F 5,55 |
| 15 saatu: | C 34,79 | H 4,23 | N 20,32 | F 5,66 |

## Esimerkki 26

2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyy-  
li)-9H-puriinibisvetykloridi

2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyy-  
20 li)-9H-puriinin (300 mg, 1,06 mmol) liuokseen MeOH:ssa  
(30 ml) lisättiin isopropanoli (2 ml), joka oli aikaisem-  
min kyllästetty HCl-kaasulla. Liuos haihdutettiin pieneen  
tilavuuteen (5 ml) huoneenlämpötilassa ja EtOH:a (15 ml)  
lisättiin saostamaan bisvetykloridi valkoisena kiinteänä  
25 aineena.

Sp. 165 - 168 °C (haj.).

Analyysi  $C_{10}H_{13}FN_6O_3 \cdot 2 HCl$

|           |         |        |         |        |
|-----------|---------|--------|---------|--------|
| vaatii:   | C 33,62 | H 4,23 | N 23,53 | F 5,32 |
| 30 saatu: | C 33,53 | H 4,24 | N 22,98 | F 5,33 |

## Esimerkki 27

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniinin  
natriumsuola

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniiniin  
(50 mg, 0,175 mmol) lisättiin NaOH:n (7 mg) liuos vedessä  
35 (2 ml) ja seosta lämmitettiin varovasti, kunnes saatiin

kirkas liuos. Liuos lyofilisoitiin sitten, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste valkoisena kiinteänä aineena.

Sp. 185 - 190 °C (haj.).

Analyysi  $C_{10}H_{11}FN_5O_4 \cdot 1,75 H_2O$

|   |         |         |        |         |
|---|---------|---------|--------|---------|
| 5 | vaatii: | C 35,45 | H 4,31 | N 20,67 |
|   | saatu:  | C 35,59 | H 4,33 | N 20,64 |

#### Esimerkki 28

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniini-vetykloridi

- 10 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniinin (300 mg, 1,05 mmol) liuokseen MeOH:ssa (200 ml) lisättiin isopropanolin liuosta (2 ml), joka oli aikaisemmin kyllästetty HCl-kaasulla, jota seurasi asetoni (50 ml). Liuos haihdutettiin pieneen tilavuuteen (30 ml), asetonia 15 (150 ml) lisättiin, ja seos pienennettiin uudelleen pieneen tilavuuteen. Tämä toistettiin, lopullisen tilavuuden ollessa 10 ml. EtOH:a (20 ml) lisättiin, jota seurasi EtOAc (40 ml). Seisotettaessa tuote saostui valkoisena kiinteänä aineena.

- 20 Sp. 192 - 193 °C (haj.).

Analyysi  $C_{10}H_{12}FN_5O_4 \cdot HCl \cdot 0,4 H_2O$

|         |         |        |         |         |
|---------|---------|--------|---------|---------|
| vaatii: | C 36,51 | H 4,23 | N 21,29 | N 10,77 |
| saatu:  | C 36,50 | H 4,54 | N 21,56 | N 10,90 |

#### Esimerkki 29

- 25 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-vetykloridi

- 30 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniinin (500 mg, 1,86 mmol) liuokseen MeOH:ssa (40 ml) ja vedessä (10 ml) lisättiin isopropanoliliuosta (15 ml), joka oli aikaisemmin kyllästetty HCl-kaasulla. Liuos haihdutettiin vakuumissa huoneenlämpötilassa ja trituroitiin EtOH:lla (25 ml), jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste valkoisena kiinteänä aineena.

Sp. 205 - 210 °C (haj.).

Analyysi  $C_{10}H_{12}FN_5O_3 \cdot HCl$

vaatii: C 39,29 H 4,29 N 22,91 Cl 11,60

saatu: C 39,36 H 4,34 N 22,89 Cl 11,52

### Esimerkki 30

#### 5 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaatti

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniinia (esimerkistä 8, 0,47 g, 1,7 mmol) liuotettiin 7 ml:aan 1,3-dimetyyli-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinonia. Tämän liuoksen jäädyttämisen jälkeen -8 °C:seen jää/metanolilihauteessa lisättiin 0,64 ml fosforioksikloridia (7 mmol) voimakkaasti sekoittaen. Kolmen minuutin kuluttua reaktio lopetettiin lisäämällä 10 ml kylmää vettä. tämä reaktioseos pidettiin jäissä 15 minuuttia, jonka jälkeen se neutraloitiin pH 8:aan ammoniumhydroksidilla.

Reaktiotuotteiden erottaminen suoritettiin käyttämällä anioninvaihtokromatografiaa DEAE-Sephadex A-25:lla. Reaktioseos laimennettiin 600 ml:aan vedellä ja laitettiin kromatografiakolonnein, joka sisälsi noin 80 ml DEAE-Sephadex A-25:tä, joka oli aikaisemmin tasapainotettu 50 mM:ssa ammoniumbikarbonaatissa. Kolonni pestiin 2,5 l:lla 50 mM:sta ammoniumbikarbonaattia epäorgaanisen fosfaatin poistamiseksi. Nukleotidit eluoitiin 2 l 50 - 500 mM ammoniumbikarbonaatin lineaarisella gradientilla.

25 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaatti eluoitui ensin ja sitä seurasi 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-3',5'-bisfosfaatti. Kutakin nukleotidia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja kuivattiin vakuuissa veden ja ammoniumbikarbonaatin poistamiseksi.

30 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaatti saatiin ammoniumsuolana edellä esitetystä kaaviosta, mutta natriumsuola oli farmakologisesti haluttu suola tässä tapauksessa. Ammoniumsuola muutettiin natriumsuolaksi käyttäen Dowex 50-ioninvaihtohartsia. 9-(2-deok-

si-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaattia (1,3 mmol) 10 ml:ssa vettä laitettiin kolonniin, joka sisälsi noin 10 ml Bio-Rad AG50W-X8:aa (natriummuoto), joka oli aikaisemmin tasapainotettu vedellä. Nukleotidi eluoi-  
 5 tiin vedellä. Fraktiot, jotka sisälsivät 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaattia yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 0,49 g (1,2 mmol, 72 % saanto).

$^1\text{H-NMR}$  d ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  8,0 (1H, s,  $\underline{\text{H2}}$ ), 7,7 (1H, s,  $\underline{\text{H8}}$ ), 5,7  
 10 ja 5,9 (1H, dd,  $\underline{\text{H1'}}$ , lohkaistu  $\underline{\text{H2':lla}}$ ,F), 4,8 ja 5,0 (1H dd,  $\underline{\text{H2'}}$ , lohkaistu  $\underline{\text{H1':lla}}$ ,F), 4,1 (1H, m,  $\underline{\text{H3'}}$ ), 3,9 (1H, m,  $\underline{\text{H4'}}$ ), 3,6 (2H, m,  $\underline{\text{H5'}}$ )

$^1\text{H-nmr}$  d ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 8,5 (1H, s,  $\underline{\text{H2}}$ ), 8,2 (1H, s,  $\underline{\text{H8}}$ ), 6,3 ja 6,5  
 15 (1H, d,  $\underline{\text{H1'}}$ , lohkaistu  $\underline{\text{H2:lla}}$ ,F), 5,3 ja 5,6 (1H, d,  $\underline{\text{H2'}}$ , lohkaistu  $\underline{\text{H1':lla}}$ ,F), 4,7 (1H, m,  $\underline{\text{H3'}}$ ), 4,4 (1H, m,  $\underline{\text{H4'}}$ ), 4,1 (2H, m,  $\underline{\text{H5'}}$ )

$^{31}\text{P}$  NMR  $\delta$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 1,46 (s)

UV-spektri: 0,1 M HCl:ssa  $\lambda_{\text{max}}$  256 nm:ssä; 400 mM ammoniumfosfaatissa, pH 5,5,  $\lambda_{\text{max}}$  259 nm:ssä, 50 mM kaliumfosfaatissa, pH 7,0, max 259 nm:ssä; 0,1 M NaOH:ssa  $\lambda_{\text{max}}$  259 nm:ssä.

Massaspektri antoi kaksi päähuippua molekulaarisissa ionifragmenttipainoissa 270 ja 136 vastaten 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniinia mainitussa jär-  
 25 jestyksessä.

Täydellinen lohkeaminen nukleosidiksi havaittiin 5'-nukleotidaasilla (Sigma) inkuboinnin jälkeen.

Emäs/fosfaattisuhde = 1,00/1,03. Kokonaisfosfaatin pitoisuus määritettiin Ames, B.N:n menetelmän mukaisesti,  
 30 Methods in Enzymology, vol. 8, ss. 115 - 118, 1966. Nukleoemäksen pitoisuus määritettiin käyttäen nukleosidin UV-absorptiokerrointa.



**Esimerkki 31****9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaatti (FMAP)**

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniinia  
 5 (esimerkistä 8, 1,2 mg, 4,3 μmol), 22 μmol p-nitrofenyyli-  
 fosfaatti (1 M kantaliuos, joka oli säädetty pH 5,4:ksi  
 etikkahapolla) ja 0,05 ml nukleosidifosfotransferaasia  
 Serratia marcescens'ista (A. Fyfe et al., J. Biol. Chem.  
 253, 8721 - 8727 (1978) ja US-patenttijulkaisu 4 136 175,  
 10 13,1.1979) yhdistettiin veden kanssa, jolloin saatiin  
 0,22 ml:n lopputilavuus. Inkubointi suoritettiin 37 °C:ssa  
 yön yli. Koko reaktioseos täplitettiin preparatiiviselle  
 selluloosa-ohut kerros-kromatografialevyille ja sen jälkeen  
 se kehitettiin n-propanoli/15 M NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O:lla: 6/3/1. Levyn  
 15 kuivauksen jälkeen alue, joka sisälsi nukleotidin, raapu-  
 tettiin pois ja nukleotidi eluoitiin selluloosasta vedel-  
 lä. 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-  
 monofosfaatti saatiin 25 %:n saannolla, 1,1 μmol.  
 UV-spektri: vedessä λ<sub>max</sub> 257 nm:ssä.

20 Tämä yhdiste lohkaistiin täydellisesti alkaalisella  
 fosfataasilla ja 5'-nukleotidaasilla, jolloin saatiin nuk-  
 leosidi 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini.

Emäs/fosfaattisuhde = 1/8, joka osoittaa kontami-  
 noitumisen epäorgaanisella fosfaatilla.

25 **Esimerkki 32**

**9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-3',5'-bisfosfaatti**

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)adeniini-3',5'-bisfosfaatti saatiin ammoniumsuolana ioninvaihtoko-  
 30 lonnista saatujen fraktioiden (esimerkistä 30) (0,35 mmol,  
 20 % saanto) haihduttamisen jälkeen.

Se karakterisoitiin täpläkuvion mukaan, joka ha-  
 vaittiin TLC:lla sen jälkeen kun oli inkuboitu nukleaasi  
 P1:llä (Boehringer Mannheim), alkaalisella fosfataasilla  
 35 (Boehringer Mannheim), 3-nukleotidaasilla (Sigma) ja 5'-

nukleotidaasilla. Alkaalinen fosfataasi katkaisi 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniini-3',3'-bisfosfaatin täydellisesti emänukleosidiksi; nukleaasi P1 ja 3-nukleotidaasi katkaisivat sen 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)adeniini-5'-monofosfaatiksi ja 5'-nukleotidaasi ei katkaissut sitä. Nämä tulokset olivat yhtäpitäviä sen kanssa, mitä tiedetään näille entsyymeille ja muille tunnetuille nukleosidifosfaattianalogeille.

UV-spektri: 400 mM ammoniumfosfaatissa, pH 5,5 maksimi 259 nm:ssä.

#### Esimerkki 33

9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-monofosfaatti

9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniinia (esimerkistä 7, 0,9 mg, 2,9  $\mu$ mol), 15  $\mu$ mol p-nitrofenyyli-fosfaattia (1 M kantaliuos, joka on säädetty pH 5,4:ksi etikkahapolla) ja 0,04 ml nukleosidifosfotransferaasia *Serratia marcescens*'stä (Fyfe et al., J. Biol. Chem. 253, 8721 - 8727 (1978) ja US-patenttijulkaisu 4 136 175, 23.1.1979) yhdistettiin veden kanssa, jolloin saatiin 0,15 ml:n lopputilavuus. Inkubointi suoritettiin 37 °C:ssa yön yli. Koko reaktioseos täplitettiin preparatiiviselle selluloosa-ohut kerros-kromatografialevyille ja sen jälkeen se kehitettiin n-propanoli/15 M  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ :lla: 6/3/1. Levyn kuivaamisen jälkeen alue, joka sisälsi nukleotidin, raaputettiin pois ja sen jälkeen nukleotidi eluoitiin selluloosasta vedellä. 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-monofosfaattia saatiin 11 %:n saannolla, 0,33  $\mu$ mol. UV-spektri: vedessä maksimi 248 nm:ssä, ulkonema 267 nm:ssä.

Tämä tuote katkaistiin täydellisesti alkaalisella fosfataasilla ja 5'-nukleotidaasilla, jolloin saatiin nukleosidi 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini.

Emäs/fosfaattisuhde = 1/30, joka osoittaa kontaminoitumisen epäorgaanisella fosfaatilla.

**Esimerkki 34**

**9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-monofosfaatti (FGMP)**

9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniinia  
 5 (0,0158 g,  $5,2 \times 10^{-5}$  mol) liuotettiin 0,2 ml:aan trietyylifosfaattia ja jäädytettiin -8 °C:seen. Fosforioksikloridia (0,015 ml,  $1,6 \times 10^{-4}$  mol) lisättiin, kaikki kerralla, sekoittaen ja reaktioastia peitettiin alumiinifoliolla reaktanttien suojaamiseksi valolta. Lämpötilan annettiin  
 10 nousta 0 °C:seen, ja sekoitettiin 4 tuntia. Reaktio tukahdutettiin lisäämällä jäätä ja sitten pH-arvo säädettiin pH 7:ksi 1 N NaOH:lla. Tämä vesipitoinen liuos uutettiin  $\text{CHCl}_3$ :lla 2 x 2 ml. Vesipitoisen liuoksen pH-arvo säädettiin uudelleen pH 7,5:ksi.

15 Tämä tuote puhdistettiin DEAE-Sephadex-kromatografialla samalla tavalla kuin 2'-FAMP esimerkissä 30, mutta käyttäen 50 - 600 mM ammoniumbikarbonaattigradienttia. Diammoniumsuolan saanto oli 40 %, 9 mg, 0,02 mmol.

20 UV-spektri: 0,1 M HCl:ssa  $\lambda_{\text{max}}$  254 nm:ssä, ulkonema 275 nm:ssä.

Tämä tuote katkaistiin täydellisesti alkaalisella fosfataasilla ja 5'-nukleotidaasilla, jolloin saatiin nukleosidi 9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniini.

Emäs/fosfaattisuhde = 1,0/0,90.

25 **Esimerkki 35**

**9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-trifosfaatti (FGTP)**

Trifosfaatti syntetisoitiin entsymaattisesti 5'-monofosfaatista. 5 mg (12 μmol) 2'-FGMP:tä esimerkistä 34  
 30 inkuboitiin 37 °C:ssa 2 ml:n lopputilavuudessa (lopullinen pitoisuus) 10 mM adenosiniitrifosfaatin, 50 mM kaliumin PIPES, pH 6,8, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ :n, 12,5 mM fosfoenolipyruvaatin, 4 IU/ml nukleosididifosfaattikinaasin (Boehringer Mannheim), 0,77 IU/ml guanylaattikinaasin (Boehringer  
 35 Mannheim) ja 20 IU/ml pyruvaattikinaasin (Boehringer

Mannheim) kanssa. Pieniä määriä 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-difosfaattia (FGDP) havaittiin analyttisellä ioninvaihto-HPLC:lla, mutta vallitseva tuote oli 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-trifosfaatti. Tämä eristettiin käyttäen pereparatiivista ioninvaihto-HPLC:aa Whatman Partisil SAX Magnum 9-kolonnissa, jota eluoiitiin 10 mM - 1 M kaliumfosfaatin, pH 3,5, gradientilla. Fraktiot, jotka sisälsivät 2'-FGTP:tä, puhdistettiin edelleen DEAE-Sephadex:lla, kuten esimerkiksi 30 on kuvattu. Fraktioiden kuivaamisen jälkeen saatiin 7 mg 2'-FGTP:tä diammoniumsuolana (80 %, 10  $\mu$ mol). UV-spektri: 0,1 M HCl:ssa  $\lambda_{\max}$  254 nm:ssä, ulkonema 275 nm:ssä; 0,1 M NaOH:ssa  $\lambda_{\max}$  255 - 262 nm:ssä. Emäs/fosfaattisuhde = 1,0/2,5.

#### 15 Esimerkki 36

##### 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-trifosfaatti

50 mg (120  $\mu$ mol) 2'-FGMP:tä, joka oli valmistettu tavalla, joka oli analoginen esimerkille 34, inkuboitiin 37 °C:ssa 20 ml:n lopputilavuudessa (lopullinen konsentraatio) 10 mM adenosiinitrifosfaatin, 50 mM kaliumin PIPES, pH 6,8, 10 mM  $MgCl_2$ :n, 12,5 mM fosfoenolipyruvaatin, 4 IU/ml nukleosididifosfaattikinaasin (Boehringer Mannheim), 0,77 IU/ml guanylaattikinaasin (Boehringer Mannheim) ja 20 IU/ml pyruvaattikinaasin (Boehringer Mannheim) kanssa. Pieniä määriä 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)guaniini-5'-difosfaattia havaittiin analyttisellä ioninvaihto-HPLC:lla, mutta vallitseva tuote oli 9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -ribofuranosyyli)guaniini-5'-trifosfaatti. Tämä eristettiin käyttäen preparatiivista ioninvaihto-HPLC:aa Whatman Partisil SAX Magnum 9-kolonnissa, jota eluoiitiin 10 mM - 1 M kaliumfosfaatin, pH 3,5, gradientilla. Fraktiot, jotka sisälsivät 2'-FGTP:tä puhdistettiin edelleen DEAE-Sephadex:lla, kuten esimerkissä 30 on kuvattu. Fraktioiden kuivaamisen jälkeen saatiin

50 mg 2'-FGTP:tä diammoniumsuolana, mutta se oli kontaminoitunut adenosiinidifosfaatilla, 2'-FGDP:llä ja adenosinitrifosfaatilla. Toistettu puhdistaminen preparatiivisella HPLC:lla, jota seurasi DEAE-Sephadex, suoritettiin.

5 Saatiin triammoniumsuola (36 mg, 63  $\mu$ mol, 50 % saanto).

UV-spektri: 0,1 M HCl:ssa  $\lambda_{\max}$  254 nm:ssä, ulkonema 275 nm:ssä.

Emäs/fosfaattisuhde = 1,0/2,9.

Esimerkki 37

10 2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-3,5-di-O-pivaloyyli- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini ja 2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-5-O-pivaloyyli- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

15 2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriinin (100 mg, 0,35 mmol) liuokseen DMF- (3 ml) ja Et<sub>3</sub>N-liuoksessa (0,3 ml) lisättiin trimetyylietikkahapon anhydridiä (78  $\mu$ l) ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. 80  $\mu$ l trimetyylietikkahapon anhydridiä lisää lisättiin sitten ja sekoitusta jatkettiin kolme päivää. Seos haihdutettiin sitten MeOH:lla, haihdutettiin tyhjössä ja liekkikromatografioitiin SiO<sub>2</sub>:lla, eluoitiin w/ CHCl<sub>3</sub>:lla, CHCl<sub>3</sub>/MeOH:lla (30:1), (20:1), (10:1), (6:1), (4:1) ja lopuksi (3:1). Tämä antoi bisesterin (74 mg) värittömänä puolikiinteänä aineena eetterillä trituroinnin

20 jälkeen.

25

Sp. 143 - 145 °C (haj).

Korkean resoluution massaspektri (E.I.):

saatu: 368,1612 C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, vaatii 368,1608.

30 Sopivien fraktioiden kerääminen ja haihduttaminen antoi myös mono-5'-pivalaattiesterin (16 mg).

Sp. 123 - 125 °C.

Korkean resoluution massaspektri (E.I.):

saatu: 452,2181 C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>, vaatii 452,2183.

**Esimerkki 38****2-amino-6-bentsyyliamino-9-(2'-deoksi-2'-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriini**

2-amino-6-bentsyyliaminopuriinia (0,2 g, 0,83 mmol)

- 5 ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,244 g, 1 mmol) yhdistettiin 10 ml:n kanssa 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 6,8. 8200 yksikköä tymidiinifosforylaasia ja 7850 yksikköä puriininukleosidifosforylaasia (Krenitsky et al., Biochemistry, 20, 3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 444) lisättiin ja seosta sekoitettiin 10 45 °C:ssa 40 tuntia. Tuotteen eristäminen suoritettiin lisäämällä metanolia (15 ml), poistamalla kiinteät aineet suodattamalla ja haihduttamalla metanoli 10 ml:n piidioksidigeeliä läsnä ollessa. Kuiva geeli laitettiin piidioksidigeelikolonnin (5 x 23 cm) päälle ja tuote eluoitiin 15 kloroformi:metanolilla (99:1). Vain tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin, liuotin poistettiin vakuumissa, jolloin saatiin 0,087 g 2-amino-6-bentsyyliamino-9-(2'-deoksi-2'-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriinia.
- 20 <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz): δ 7,95 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7,85 (b, 1H, NH), 7,2 - 7,5 (m, 5H, fenyylili), 6,04 (dd, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 16,4 Hz, J = 3,1 Hz), 5,93 (b, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,64 (d, 1H, OH, J = 5,9 Hz), 5,44, 5,17 (dt, 1H, H<sub>2</sub>), 5,26 (t, 1H, OH<sub>5'</sub>), 4,64 (b, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,38 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 3,9 (b, 1H, H<sub>4'</sub>), 3,5 - 25 3,75 (m, 2H, H<sub>5'</sub>).

Edellä esitetyn yhdisteen pelkistys voidaan suorittaa V. du Vigneaud'n ja O. K. Behrens'n, J. Biol. Chem. 117, 27 (1937) menetelmien mukaisesti.

**Esimerkki 39**

- 30 **2-amino-6-bentsyyliitio-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriini**

2-amino-6-bentsyyliitiopuriinia (Sigma Chemical Company, 0,8 g, 3,1 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,4 g, 1,7 mmol), joka voidaan 35 valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558,

1964) mukaisesti, suspendoitiin 20 ml:aan 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (2640 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (4360 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344) lisättiin ja suspensiota sekoitettiin 37 °C:ssa. 21. päivänä reaktioseos laimennettiin 15 ml:ksi 5 mM kaliumfosfaattipuskurilla, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia, ja 4000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 6500 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 43. päivänä reaktioseos laimennettiin 250 ml:ksi vedellä, ja 2000 I.U. tymidiinifosforylaasia ja 3250 I.U. puriininukleosidifosforylaasia lisättiin. 69. päivänä reaktioseoksen pH säädettiin 7,1:ksi KOH:lla. 77. päivänä reaktioseos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin kuumaan metanoli/veteen ja laitettiin 2,5 x 7 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto) ja tuote eluoitiin metanoli/vedellä (9/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin asetoni-triili/veteen (49/1) ja laitettiin 2,5 x 20 cm:n piidioksidigeeli-60-kolonniin (EM Science). Tuote eluoitiin asetoni-triili/vedellä (49/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös suspendoitiin veteen ja lyofilisointi antoi 0,201 g otiskon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 0,1-hydraattina. Sp. 180 °C.

UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): 0,1 N HCl, 322,5 (11,8), 250 (10,6); pH 7, 311,5 (14,2), 247 (14,3); 0,1 N NaOH, 312 (14,0), 247 (13,5).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_3\text{S} \cdot 0,1 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:  
 laskettu: C 51,93 H 4,66 N 17,81 F 4,83 S 8,15  
 saatu: C 51,96 H 4,66 N 17,86 F 4,68 S 8,15

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,19 (s, 1H, H-8), 7,47 (ilmeinen d, 2H, Ar,  $J = 7,6$  Hz), 7,28 (m, 3H, Ar), 6,74 (bs,

2H, 2-NH<sub>2</sub>), 6,10 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,6 Hz, J = 2,4 Hz), 5,68 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,4 Hz), 5,32 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 53,0 Hz, J<sub>1',2'</sub> = 2,4 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 4,4 Hz, 5,15 (t, 1H, 5'-OH, J = 6,0 Hz, 4,55 (ab kvartsi, 2H, 6-SCH<sub>2</sub>, kemikaali J = 1,37 Hz), 4,41 (m, 1H, H-3'), 3,94 (m, 1H, H-4'), 3,74 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'), 3,58 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

#### Esimerkki 40

#### 2,6-diamino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

10 2,6-diaminopuriinia (Pacific Chemical Laboratories, 2,0 g, 12,7 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasilia (0,8 g, 3,3 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 500 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (41700 I.U.) ja puriininukleosidifosforylaasia (83300 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344), jotka oli absorboitu 10,5 g:aan DEAE-sellulosaan (25 ml), lisättiin ja suspensiota ravisteltiin 37 °C:ssa. 24 tunnin kuluttua 2,0 g 1,6-diaminopuriinia lisättiin ja lämpötila nostettiin 50 °C:seen. Toisten 24 tunnin kuluttua reaktioseos suodatettiin. Suodatinkakku pestiin vedellä ja suodokset yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin kuumaan veteen ja pH säädettiin 9,4:ksi NH<sub>4</sub>OH:lla. Liuos laitettiin 2,5 x 13 cm:n kolonniin, jossa oli anioninvaihtoharts (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (9/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös käsiteltiin kuten edellä. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuumissa. Jäännös liuotettiin veteen ja lyofilisoiminen antoi 0,89 g otsikon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 0,5-hydraattina.



Sp. 125 - 127 °C.

UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): pH 7, 279,5 (9,52, 256 (9,06).

Analyysi, laskettu  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_6\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ :lle:

laskettu: C 40,96 H 4,81 N 28,66 F 6,48

5 saatu: C 41,03 H 4,80 N 28,69 F 6,50

Rakenne vahvistettiin edelleen  $^1\text{H}$ -NMR:lla.

#### Esimerkki 41

#### 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriini

10 2-aminopuriniinia (Pacific Chemical Laboratories, 3,0 g, 22,2 mmol) ja 1-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,5 g, 2,0 mmol), joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 25 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % (paino/tilavuus) kaliumatsidia. Tymidiinifosforylaasia (417000 I.U.) ja puriini-nukleosidifosforylaasia (83300 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344), jotka oli absorboitu 10,5 a:aan DEAE-selluloosaa (25 ml), lisättiin ja suspensiota ravisteltiin 37 °C:ssa. 24 tunnin kuluttua lisättiin 3,0 g 2,6-diaminopuriinia ja lämpötila nostettiin 50 °C:seen. Toisten 24 tunnin kuluttua reaktioseos suodatettiin. Suodatinkakku pestiin vedellä ja suodokset yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös suspendoitiin veteen ja suodatettiin. Suodatinkakku uutettiin vedellä (25 °C), kunnes suodatinkakkuun ei jäänyt tuotetta. Suodokset yhdistettiin, pH säädettiin pH 9,4:ksi  $\text{NH}_4\text{OH}$ :lla ja liuos laitettiin 2,5 x 20 cm:n kolonniin, joka sisälsi anioninvaihtohartsin (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (9/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin kloroformi/metanoli/veteen (75:25:4) ja laitettiin 5 x 25 cm:n silikageeli-60-kolonniin. Tuote eluoitiin kloroformi/meta-

15

20

25

30

35

noli/vedellä (75:25:4). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuuissa. Jäännös liuotettiin kuumaan veteen ja suodatettiin 0,22 µm-huokois-  
 5 antoi 0,50 g otsikon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 0,5-hydraattina.

Sp. 153 - 155 °C.

UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): pH 7, 304 (6,35), 243,5 (5,95).

Analyysi laskettu  $C_{10}H_{12}FN_5O_3 \cdot 0,5 H_2O$ :lle

10 laskettu: C 43,17 H 4,71 N 25,17 F 6,83  
 saatu: C 43,08 H 4,74 N 25,11 F 6,89

Rakenne vahvistettiin edelleen  $^1H$ -NMR:lla.

#### Esimerkki 42

15 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-  
 6-metoksi-9H-puriini

2-amino-6-metoksimpuriinia (2,0 g, 12 mmol), joka voidaan valmistaa R. W. Balsiger'n ja J. A. Montgomery'n (J. Org. Chem. 20:1573, 1960) mukaisesti, ja 1-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)urasiilia (0,88 g, 3,6 mmol),  
 20 joka voidaan valmistaa J. F. Codington et al:n (J. Org. Chem. 29:558, 1964) mukaisesti, suspendoitiin 250 ml:aan 5 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,04 % kaliumatsidia. Suspension pH säädettiin 7,0:ksi KOH:lla. Tymidiinifosforylaasia (41700 I.U.) ja puriininukleo-  
 25 sidifosforylaasia (83300 I.U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20:3615, 1981 ja US-patenttijulkaisu 4 381 344), jotka oli absorboitu 10,5 g:aan DEAE-selluloosaa (25 ml), lisättiin ja suspensiota ravisteltiin 37 °C:ssa. 24 tunnin kuluttua 1,0 g 2-amino-6-metoksi-  
 30 puriinia ja 250 ml edellä esitettyä puskuria lisättiin ja lämpötila nostettiin 50 °C:seen. Toisten 24 tunnin kuluttua reaktioseos suodatettiin. Suodatinkakku pestiin vedellä ja suodokset yhdistettiin ja liuotin poistettiin vakuu-  
 35 tiin pH 9,4:ksi  $NH_4OH$ :lla. Liuos laitettiin 2,5 x 15 cm:n

- kolonniin, jossa oli anioninvaihtoharts (Bio-Rad AG1X2-hydroksidimuoto). Sen jälkeen kun kolonni oli pesty vedellä, tuote eluoitiin metanoli/vedellä (9/1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin va-
- 5 kuumissa. Jäännös liuotettiin lämpimään vesi/metanoliin ja suodatettiin 0,22 µm-huokoisen nailonmembraanisuodattimen läpi. Suodoksen lyofilisoiminen antoi 0,91 g otsikon mukaista yhdistettä, joka analysoitui 0,5-hydraattina. Sp. 200 °C.
- 10 UV  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): pH 7, 279,5 (9,24), 247,5 (9,99).  
Analyysi, laskettu  $C_{11}H_{14}FN_5O_4 \cdot 0,5 H_2O$ :lle:  
laskettu: C 42,86 H 4,90 N 22,72 F 6,16  
saatu: C 42,93 H 4,90 N 22,73 F 6,15  
Rakenne vahvistettiin edelleen  $^1H$ -NMR:lla.
- 15 **Esimerkki 43**  
**2-amino-6-bentsyylioksi-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriini**  
2-amino-6-bentsyylioksipuriinia (2,5 g, 10,3 mmol) ja 2'-deoksi-2'-fluoripuridiinia (2,64 g, 10,8 mmol) yh-
- 20 distettiin 50 ml:n kanssa 10 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH 6,8. 8000 yksikköä tymidiinifosforylaasia ja 21600 yksikköä puriininukleosidifosforylaasia lisättiin ja seosta sekoitettiin 45 °C:ssa. Viiden päivän kuluttua lisättiin vielä 16000 yksikköä tymidiinifosforylaasia ja 21600 yk-
- 25 sikköä puriininukleosidifosforylaasia ja reaktioseosta sekoitettiin 48 tuntia 45 °C:ssa. Tuotteen pääosa oli sakassa, joka poistettiin suodattamalla ja liuotettiin metanoliin. Tuote eristettiin kromatografisesti piidioksidilla etyyliasetaatti:kloroformi:metanoli (8:1:1) ollessa
- 30 liikkuvana faasina. Vain tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin, jolloin saatiin 1,44 g 2-amino-6-bentsyylioksi-9-(2-deoksi-2-fluori-β-D-ribofuranosyyli)-9H-puriinia.
- $^1H$ -NMR (200 MHz DMSO:ssa): δ 8,11 (s, 1H,  $H_8$ ), 7,3 - 7,5
- 35 (m, 5H, fenyyli), 6,59 (b, 2H,  $NH_2$ ), 6,09 (dd, 1H,  $H_{1'}$ ,

$J_{F,1} = 16,5 \text{ Hz}$ ,  $J = 2,6 \text{ Hz}$ ), 5,66 (d, 1H, OH,  $J = 6,1 \text{ Hz}$ ), 5,48 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,25, 5,53 (bd, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5,20 (m, 1H,  $\text{OH}_5$ ), 4,3 - 4,5) (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 3,9 (b, 1H,  $\text{H}_4$ ), 3,5 - 3,8 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ).

- 5 Esimerkin 7 mukaisen yhdisteen valmistaminen 2-amino-6-bentsyylioksi-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriinista suoritetaan El Amin et al:n, J. Org. Chem. 44, 3442 (1979) menetelmän mukaisesti.

#### Farmaseuttiset formulaatiot

- 10 Seuraavissa formulaatioesimerkeissä "aktiivinen aineosa" voi olla mikä tahansa kaavan (I) mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksytty suola, esimerkiksi esimerkkien 6, 7, 9 ja 12 yhdisteet.

#### Esimerkki 44

- 15 **Tablettiformulaatiot**

Seuraavat formulaatiot A, B ja C valmistetaan aineosien märkägranuloinnilla povidoniliuoksen kanssa, mitä seuraa magnesiumstearaatin lisäys ja puristus.

#### Formulaatio A

|    |                                 | mg/tabletti | mg/tabletti |
|----|---------------------------------|-------------|-------------|
| 20 | (a) aktiivinen aineosa          | 250         | 250         |
|    | (b) laktoosi B.P.               | 210         | 26          |
|    | (c) Povidone B.P.               | 15          | 9           |
|    | (d) natriumtärkkelysglykolaatti | 20          | 12          |
| 25 | (e) magnesiumstearaatti         | <u>5</u>    | <u>3</u>    |
|    |                                 | 500         | 300         |

#### Formulaatio B

|    |                                 | mg/tabletti | mg/tabletti |
|----|---------------------------------|-------------|-------------|
| 30 | (a) aktiivinen aineosa          | 250         | 250         |
|    | (b) laktoosi                    | 150         | -           |
|    | (c) Avicel PH 101 60            | 26          |             |
|    | (d) Povidone B.P.               | 15          | 9           |
|    | (e) natriumtärkkelysglykolaatti | 20          | 12          |
| 35 | (f) magnesiumstearaatti         | <u>5</u>    | <u>3</u>    |
|    |                                 | 500         | 500         |

**Formulaatio C**

|                     | mg/tabletti |
|---------------------|-------------|
| aktiivinen aineosa  | 100         |
| laktoosi            | 200         |
| 5 tärkkelys         | 50          |
| Povidone            | 5           |
| magnesiumstearaatti | <u>4</u>    |
|                     | 359         |

- 10 Seuraavat formulaatiot D ja E valmistetaan sekoi-  
tettujen aineosien suoralla puristamisella.

**Formulaatio D**

|                                   | mg/kapseli |
|-----------------------------------|------------|
| aktiivinen aineosa                | 250        |
| 15 esigelatinoitu tärkkelys NF 15 | <u>150</u> |
|                                   | 400        |

**Formulaatio E**

|                       | mg/kapseli |
|-----------------------|------------|
| 20 aktiivinen aineosa | 250        |
| laktoosi              | 150        |
| Avicel                | <u>100</u> |
|                       | 500        |

- 25 **Formulaatio F (formulaatio kontrolloidulle vapau-  
tumiselle)**

Formulaatio valmistetaan seuraavien aineosien märkägranu-  
loinnilla povidoniliuoksen kanssa, ja tämän jälkeen lisää-  
mällä magnesiumstearaattia ja puristamalla.

|                                                                 | mg/tabletti |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| 30 (a) aktiivinen aineosa                                       | 500         |
| (b) hydroksipropyylimetyyliselluloosa<br>(Methocel K4M Prenium) | 112         |
| (c) laktoosi B.P.                                               | 53          |
| 35 (d) Povidone B.P.C.                                          | 28          |
| (e) magnesiumstearaatti                                         | <u>7</u>    |
|                                                                 | 700         |

Lääkkeen vapautuminen tapahtuu noin 6 - 8 tunnin ajanjakson aikana ja se on tapahtunut 12 tunnin kuluttua.

#### Esimerkki 45

#### Kapseliformulaatiot

##### 5 Formulaatio A

Kapseliformulaatio valmistetaan sekoittamalla formulaation D, esimerkissä 4 edellä, aineosat ja täyttämällä sillä kaksiosainen kova gelatiinikapseli.

##### Formulaatio B

|    |                                 |            |
|----|---------------------------------|------------|
| 10 |                                 | mg/kapseli |
|    | (a) aktiivinen aineosa          | 250        |
|    | (b) laktoosi B.P.               | 143        |
|    | (c) natriumtärkkelysglykolaatti | 25         |
|    | (d) magnesiumstearaatti         | <u>2</u>   |
| 15 |                                 | 420        |

Kapselit valmistetaan sekoittamalla edellä esitetyt aineosat ja täyttämällä sillä kaksiosainen kova gelatiinikapseli.

##### Formulaatio C

|    |                        |            |
|----|------------------------|------------|
| 20 |                        | mg/kapseli |
|    | (a) aktiivinen aineosa | 250        |
|    | (b) Macrogol 4000 BP   | <u>350</u> |
|    |                        | 600        |

25 Kapselit valmistetaan sulattamalla Macrogol 4000 BP, dispergoimalla aktiivinen aineosa sulaan ja täyttämällä kaksiosainen kova gelatiinikapseli sulalla.

##### Formulaatio D

|    |                    |            |
|----|--------------------|------------|
|    |                    | mg/kapseli |
|    | aktiivinen aineosa | 250        |
| 30 | lesitiini          | 100        |
|    | arakkisöljy        | <u>100</u> |
|    |                    | 450        |

35 Kapselit valmistetaan dispergoimalla aktiivinen aineosa lesitiiniin ja arakkisöljyyn ja täyttämällä pehmeät, elastiset gelatiinikapselit dispersiolla.

**Formulaatio E (kapseli kontrolloidulle vapautumiselle)**

Seuraava kapseliformulaatio kontrolloidulle vapautumiselle valmistetaan ekstrudoimalla aineosat (a), (b) ja (c) käyttäen ekstruuderia ja tämän jälkeen pyörittämällä ekstrudaatti ja kuivaamalla. Kuivatut pelletit päällystetään sitten vapautumista kontrolloivalla membraanilla (d) ja kaksiosainen kova gelatiinikapseli täytetään niillä.

|    |                              | mg/kapseli |
|----|------------------------------|------------|
| 10 | (a) aktiivinen aineosa       | 250        |
|    | (b) mikrokiteinen selluloosa | 125        |
|    | (c) laktoosi BP              | 125        |
|    | (d) etyyliiselluloosa        | <u>13</u>  |
|    |                              | 513        |

15           **Esimerkki 46**  
               **Injektioformulaatio**  
               **Formulaatio A**

|    |                               |                       |
|----|-------------------------------|-----------------------|
|    | aktiivinen aineosa            | 0,200 g               |
|    | vetykloorihappoliuos, 0,1 M   | q.s. pH:hon 4,0 - 7,0 |
| 20 | natriumhydroksidiliuos, 0,1 M | q.s. pH:hon 4,0 - 7,0 |
|    | steriili vesi                 | q.s. 10 ml:aan        |

25           Aktiivinen aineosa liuotetaan suurimpaan osaan vedestä (35 - 40 °C) ja pH säädetään välille 4,0 - 7,0 vetykloorihapolla tai natriumhydroksidilla tarkoituksenmukaisesti. Erä täytetään sitten tilavuuteensa vedellä ja suodatetaan steriilin mikrohuokossuodattimen läpi steriiliin 10 ml:n meripihkalasipulloon (tyyppi 1) ja hartsataan steriileillä sulkimilla ja tiivisteillä.

**Formulaatio B**

|    |                                                       |            |
|----|-------------------------------------------------------|------------|
| 30 | Aktiivinen aineosa                                    | 0,125 g    |
|    | steriili, pyrogeenivapaa, pH 7 fosfaattipuskuri, q.s. | 25 ml:aan. |

**Esimerkki 47****intramuskulaarinen injektio**

|   |                    |                  |
|---|--------------------|------------------|
|   | aktiivinen aineosa | 0,20 g           |
|   | bentsyylialkoholi  | 1,10 g           |
| 5 | Glycofurool 75     | 1,45 g           |
|   | injektiovesi       | q.s. 3,00 ml:aan |

10 Aktiivinen aineosa liuotetaan glykofuroliin. Bentsyylialkoholi lisätään sitten ja liuotetaan ja vettä lisätään 3 ml:aan. Seos suodatetaan sitten steriilin mikrohuokossuodattimen läpi ja suljetaan steriileihin 3 ml:n meripihkalasipulloihin (tyyppi 1).

**Esimerkki 48****Siirappi**

|    |                              |                  |
|----|------------------------------|------------------|
|    | aktiivinen aineosa           | 0,25 g           |
| 15 | sorbitoliliuos               | 1,50 g           |
|    | glyseroli                    | 2,00 g           |
|    | natriumbentsoaatti           | 0,005 g          |
|    | flavori, persikka 17.42.3169 | 0,0125 ml        |
|    | puhdistettu vesi             | q.s. 5,00 ml:aan |

20 Aktiivinen aineosa liuotetaan seokseen, jossa on glyseroli ja suurin osa puhdistettua vettä. Natriumbentsoatin vesipitoinen liuos lisätään sitten liuokseen ja sen jälkeen lisätään sorbitoliliuos ja lopuksi flavori. Tilavuus täytetään puhdistetulla vedellä ja sekoitetaan hyvin.

25

**Esimerkki 49****Jauhekapselit sisäänhengitettäväksi**

|  |                                        |         |
|--|----------------------------------------|---------|
|  | aktiivinen aineosa (0,5 - 70 µm jauhe) | 4 mg    |
|  | laktoosi (30 - 90 µm jauhe)            | 46,0 mg |

30 Jauhetta sekoitettiin, kunnes ne olivat homogeenisiä ja niillä täytettiin sopivan kokoiset, kovat gelatiinikapselit, 50 mg seosta kapselia kohti.



**Esimerkki 50****Sisäänhengitysaerosoli**

|   |                                         |           |
|---|-----------------------------------------|-----------|
|   | aktiivinen aineosa (0,5 - 7,0 µm jauhe) | 200 mg    |
|   | sorbitaanitrioleaatti                   | 100 mg    |
| 5 | sakkariininatium (0,5 - 7,0 µm jauhe)   | 5 mg      |
|   | metanoli                                | 2 mg      |
|   | trikloorifluorimetaani                  | 4,2 g     |
|   | diklooridifluorimetaani                 | 10 ml:aan |

10 Sorbitaanitrioleaatti ja metanoli liuotettiin trikloorifluorimetaaniin. Sakkariininatium ja aktiivinen aineosa dispergoitiin seokseen, joka siirrettiin sitten sopivaan aerosolikanisteriin ja dikloorifluorimetaani injektoitiin venttiilijärjestelmän läpi. Tämä koostumus tarjoaa 2 mg aktiivista aineosaa jokaisessa 100 µl:n annoksessa.

**Virusvastainen aktiivisuus**

Influenssa A- ja B-suvut tutkittiin primaarisilla kananpojan sikiön solujen yksinkertaisilla kerroksilla monikuoppaisilla tarjottimilla. Yhdisteiden aktiivisuus 20 määritettiin saannon vähenemis- tai täplien vähenemiskokeella, jossa solujen yksinkertainen kerros infektoitiin influenssaviruksen suspensiolla ja sitten päällystettiin nestemäisellä väliaineella (saannon väheneminen) tai ravintoagaroosilla geelimuodossa sen varmistamiseksi, ettei 25 viljelmän läpi tapahdu virusten leviämistä (täplien väheneminen). Joukko sellaisen yhdisteen konsentraatioita, jonka molaarisuus tunnettiin, tuotiin väliaineeseen/ravintoagaroosipäällykseen. Virus- tai täplälukumäärien saanto jokaisessa konsentraatiossa ilmaistaan prosentteina kontrollista ja vastinkäyrä piirretään. Tältä käyrältä arvioi- 30 daan 50 % estokonsentraatio (IC50). Respiratory Syncytial Virus (RSV) tutkitaan BS-C-1-soluissa (African Green Monkey munuaissolut) samanlaisella täplä/pesäke-vehenemiskokeella. Tulokset esitetään taulukoissa I ja II alla.

Influenssa A- ja B-sukujen in vivo estoaktiivisuus  
tutkittiin hiiren nenänsisäinen/keuhko-mallilla. Hiiret  
infektoitiin viruksella aerosolilla suljetussa laatikossa  
ja sen jälkeen ne käsiteltiin koeyhdisteillä eri aikoina  
5 infektion jälkeen erilaisilla tavoilla, käsittäen oraali-  
sen, intraperitoneaalisen tavan ja aerosolilla. Hiiret  
tapettiin 24 tunnin kuluttua ja 10 % keuhkosuspensiot val-  
mistettiin ja titrattiin viruksen läsnäolon osoittamiseksi.  
Tulokset rekisteröitiin viruksen kasvun vähenemisenä  
10 verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin.

#### Viitteet

- Appleyard, G. ja Maber, H. B., Plaque Formation by  
Influenza Viruses in the presence of Trypsin. J. Gen.  
Virol. 25, 351 - 357. (1974). Collins, P. ja Bauer, D. J.,  
15 Relative Potencies of Anti-Herpes Compounds. Ann. N. Y.  
Acad. Sci. 284, 49 - 59, (1977). Hayden, F. G., Cotek, M.  
ja Douglas, R. G., Plaque Inhibition Assay for Drug  
Susceptibility Testing of Influenza Viruses. Antimicro  
Agents and Chemo. 17, 865 - 870 (1980). Tisdale, M. ja  
20 Bauer, D. J. A. Comparison of Test Methods in Influenza  
Chemotherapy. J. Antimicrobio. Chemother. 1 suppl. 55 -  
62 (1975).

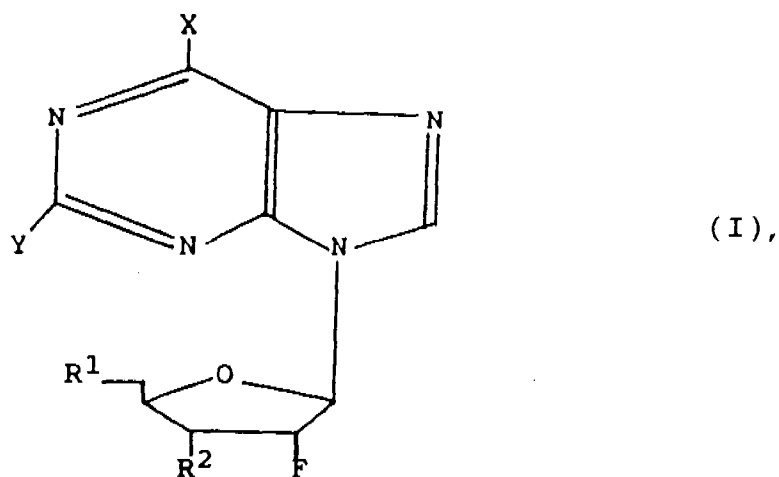
TAULUKKO I

| Koe | Yhdiste                                       | Influenssanvastainen aktiivisuus      |              |
|-----|-----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
|     |                                               | CE-solut                              | Hiiri log10  |
| 5   |                                               | IC50, μM                              | Vähenneminen |
|     | $R^1 R^2 \times Y$                            |                                       | virus-       |
|     | $\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$ |                                       | tiitterissä  |
| 10  |                                               |                                       | (viiden      |
|     |                                               |                                       | hiiren       |
|     |                                               |                                       | keskiarvo)   |
|     | 6                                             | OH OH NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> | 0,6          |
|     | 7                                             | OH OH OH NH <sub>2</sub>              | 0,8 - 2      |
|     | 8                                             | OH OH NH <sub>2</sub> H               | 4            |
|     | 9                                             | OH OH H NH <sub>2</sub>               | -            |
| 15  | 12                                            | OH OH OMe NH <sub>2</sub>             | 0,4          |
|     |                                               |                                       | + (2,1)      |
|     |                                               |                                       | + (2,4)      |
|     |                                               |                                       | + (2,3)      |
|     |                                               |                                       | + (1,6)      |
|     |                                               |                                       | + (1,9)      |

| Koe<br>nro | Yhdiste | Respiratory syncytial-<br>viruksen vastaisuus<br>BS-C-1-solut<br>IC50 $\mu$ M |
|------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 20         | 7       | OH OH OH NH <sub>2</sub><br>26,2                                              |
|            | 12      | OH OH OMe NH <sub>2</sub><br>6,3                                              |

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kaavan (I) mukaisen terapeuttisesti  
käyttökelpoisen yhdisteen valmistamiseksi



jossa

Y on H tai  $\text{NH}_2$ ;

X on  $-\text{NR}^3\text{R}^4$ -ryhmä,

jossa ryhmät  $\text{R}^3$  ja  $\text{R}^4$  voivat olla samanlaisia  
tai erilaisia, ja merkitsevät

vetyä,  $\text{C}_{1-6}$ -alkyyliä,  $\text{C}_{2-6}$ -alkenyylä,  $\text{C}_{3-7}$ -syklo-  
alkyyliä, joista jokainen ryhmä voi olla sub-  
stituoitu yhdellä tai useammalla halogeenilla,

tai X on  $\text{Z-R}^5$ -ryhmä,

jossa Z on happi tai rikki ja  $\text{R}^5$  merkitsee  
samaa kuin  $\text{R}^3$ ,

tai X on halogeeni tai vety; ja

$\text{R}^1$  ja  $\text{R}^2$ , jotka voivat olla samanlaisia tai erilai-  
sia, merkitsevät

hydroksyyliä, ryhmää,

$-\text{OCOR}^6\text{H}$ -ryhmää,

jossa  $\text{R}^6$  on divalenttinen ryhmä, joka merkitsee  
suoraketjuista tai haaroittunutta  $\text{C}_{1-6}$ -alky-

- leeniä,  $C_{2-6}$ -alkenyleeniä tai  $C_{3-7}$ -sykloalkyleeniä, joista jokainen voi olla substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä,
- 5       $-OCO_2R^7H$ -ryhmää,  
jossa  $R^7$  merkitsee kovalenttista sidosta tai samaa kuin  $R^6$ ,
- 10       $-OCOR^6-COOR^8$ -ryhmää,  
jossa  $R^6$  merkitsee samaa kuin edellä ja  $R^8$  on vety, suoraketjuinen tai haarautunut  $C_{1-6}$ -alkyyli tai  $C_{1-6}$ -alkenyyli, joista jokainen voi olla substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä,
- 15       $-OCOR^7-Z-Ar$ -ryhmää,  
jossa  $R^7$  merkitsee samaa kuin edellä on määriteltä,  $Z$  on joko kovalenttinen sidos tai happi ja  $Ar$  on aromaattinen rengas, joka on substituoinaton tai substituoitu yhdellä tai useammalla halogeenilla,  $C_{1-6}$ -alkyyllillä tai  $C_{1-6}$ -alkoksilla,
- 20       $-OR^6H$ -ryhmää,  
jossa  $R^6$  merkitsee samaa kuin edellä on määriteltä,
- 25       $-OR^6-Z-Ar$ -ryhmää,  
jossa  $R^6$ ,  $Z$  ja  $Ar$  merkitsevät samaa kuin edellä on määriteltä,
- 30       $-OCOCHR^9NR^{10}R^{11}$ -ryhmää,  
jossa  $R^{10}$  ja  $R^{11}$  merkitsevät samaa kuin edellä  $R^8$ :lle on määriteltä  
ja  $R^9$  on vety, suoraketjuinen tai haarautunut  $C_{1-4}$ -alkyyli, joka voi olla substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksi-, merkapto-,  $C_{1-3}$ -alkoksi- tai  $C_{1-3}$ -alkyyli-ryhmällä,  $R^{12}-A$ -ryhmä,  
jossa  $R^{12}$  on  $C_{1-4}$ -alkyleeniryhmä, joka on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla
- 35      hydroksiryhmällä ja  $A$  on  $-COOH-$ ,  $-CONH_2-$ ,  $-NH_2-$

tai  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ -ryhmä tai A on 4 - 11-jäseninen aromaattinen tai ei-aromaattinen syklinen tai heterosyklinen rengassysteemi, joka sisältää 3 - 10 hiiliatomia ja 0, 1, 2 tai 3 typpiatomia renkaassa, renkaan hiiliatomien ja/tai typpiatomien ollessa mahdollisesti substituoituja yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä;

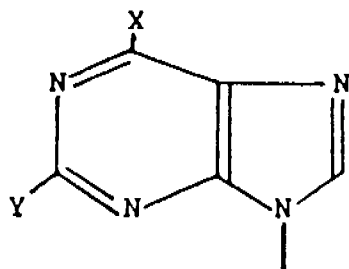
$-\text{OCO}-\text{R}^{13}$ -ryhmää,

jossa  $\text{R}^{13}$  on 4 - 7-jäseninen heterosyklinen rengas, jossa on 3 - 6 hiiliatomia ja 0, 1 tai 2 typpiatomia, renkaan hiiliatomien ja/tai typpiatomien ollessa mahdollisesti substituoituja yhdellä tai useammalla hydroksiryhmällä,

tai

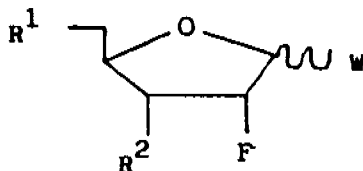
mono-, di- tai trifosfaattiesteryhmää tai sen farmaseuttisesti hyväksyttyä suolaa;

lukuunottamatta yhdisteitä, joissa ryhmät  $\text{R}^1$  ja  $\text{R}^2$  merkitsevät kumpikin hydroksia tai  $\text{R}^1$  merkitsee mono-, di- tai trisfosfaatin 5'-esteriä ja  $\text{R}^2$  merkitsee hydroksia ja joko (a) X on OH ja Y on  $\text{NH}_2$  tai H tai (b) X on  $\text{NH}_2$  ja Y on H t u n n e t t u siitä, että saatetaan kaavan PuH mukainen puriiniemäs, jossa kaavassa Pu on puriinijäännös



(Pu)

(jossa kaavassa X ja Y ovat kuten edellä on kuvattu) tai sen suola reagoimaan kaavan (II) mukaisen yhdisteen kanssa



(II),

jossa kaavassa  $R^1$  ja  $R^2$  merkitsevät samaa kuin edellä on määriteltä ja W on joko fosfaattiesteri tai sen suola tai puriini- tai pyrimidiiniosa (muu kuin Pu), jolloin muodostuu kaavan (I) mukainen yhdiste; ja tämän jälkeen tai samanaikaisesti saatetaan mahdollisesti

(i) kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa vähintään toinen  $R^1$ :stä ja  $R^2$ :sta on hydroksiryhmä, reagoimaan sopivan aineen kanssa, joka muuntaa mainitun hydroksiryhmän toiseksi ryhmäksi  $R^1$  ja/tai  $R^2$  tai

(ii) kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa  $R^1$  ja/tai  $R^2$  eivät ole hydroksi, reagoimaan aineen kanssa, joka muuntaa mainitun  $R^1$  - ja/tai  $R^2$ -ryhmän hydroksiryhmäksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaavan (I) mukaisen yhdisteen tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, jossa  $R^1$  ja  $R^2$  merkitsevät joko molemmat hydroksia tai  $R^1$  on monofosfaatti ja  $R^2$  on OH, Y on H tai  $NH_2$  ja X on  $-NR^3R^4$ -ryhmä, jossa  $R^3$  ja  $R^4$  voivat olla samanlaisia tai erilaisia, ja merkitsevät vetyä tai  $C_{1-4}$ -alkyyliä, sillä edellytyksellä, että  $R^3$  ja  $R^4$  eivät voi samanaikaisesti merkitä vetyä, tai X on  $Z-R^5$ -ryhmä, jossa Z on O tai S ja  $R^5$  on  $C_{1-6}$ -alkyyli, tai X on halogeeni tai vety.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaavan (I) mukaisen yhdisteen tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, jossa  $R^1$  ja  $R^2$  ovat kumpikin OH, Y on  $NH_2$  ja X on H,  $NH_2$  tai  $Z-R^5$ , jossa Z on O ja  $R^5$  on  $C_{1-6}$ -alkyyli.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä 2,6-diamino-9-(2-deoksifluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriinin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-9H-puriinin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä 2-amino-9-(2-deoksi-2-fluori- $\beta$ -D-ribofuranosyyli)-6-metoksi-9H-puriinin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.



**PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS  
PATENTTIOSASTO**

## TUTKIMUSRAPORTTI

|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| PATENTTIHAK.NRO<br><br>904445                                                                                       | LUOKKA<br><br>C07H 19/16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | TUTKIJA<br><br>NH | TUTKIMUSTUL. SAATU<br><table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">EP</td> <td style="width: 10%;">US</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> </table> | EP | US |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| EP                                                                                                                  | US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| TUTKITUT LUOKAT                                                                                                     | TUTKITUT MAAT<br>FI SE NO DK CH DE WO EP GB US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                   | TUTK. KESK. *)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C07H 19/04<br>19/16                                                                                                 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%;">X</td> <td style="width: 5%;">X</td> <td style="width: 5%;">X</td> <td style="width: 5%;">X</td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%;"></td> </tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table> |                   | X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | X  | X  | X |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| X                                                                                                                   | X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | X                 | X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT                                                                                        | LUOKKA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | HUOM!             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1) US-A-4145531                                                                                                     | C07H 19/16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 6)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9)                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| *) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA<br><div style="text-align: right; font-weight: bold;">KÄÄNNÄ!</div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

| PATENTTIVIRASTOJEN<br>JULKAISUT | LUOKKA | HUOM! |
|---------------------------------|--------|-------|
| 10)                             |        |       |
| 11)                             |        |       |
| 12)                             |        |       |
| 13)                             |        |       |
| 14)                             |        |       |
| 15)                             |        |       |
| 16)                             |        |       |
| 17)                             |        |       |
| 18)                             |        |       |
| 19)                             |        |       |

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA,  
HAKUSANAT YM.)

(A) Chemical Abstracts, vol. 95 (1981),  
115 911 b : Chem. Pharm. Bull. 1981,  
29 (4), 1034-8.

(B) Chemical Abstracts, vol. 97 (1982), 87640 h :  
Biochem. Pharmacol. 1982, 31 (9),  
1723-8.

(C) Chemical Abstracts, vol. 100 (1984),  
139 542 e : Nucleosides Nucleotides  
1983, 2 (4), 373-85.

HELSINKI

15. 12. 1994

PÄIVÄYS

*Ulla Harto*

ALLEKIRJOITUS