



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210513

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 19/06

(22) Přihlášeno 28 03 80
(21) (PV 2178-80)

(40) Zveřejněno 29 05 81

(45) Vydáno 15 07 83

(75)
Autor vynálezu

BOHÁČEK LUBOŠ ing., LIBČICE nad Vltavou, FILIP JIŘÍ ing. CSc.,
HOLÝ ANTONÍN RNDr. CSc., PRAHA

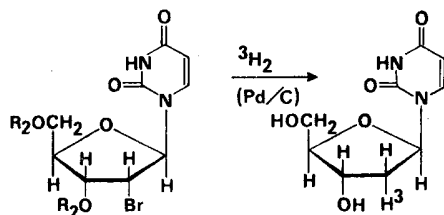
(54) Způsob přípravy 2'-deoxyuridinu značeného tritiem o vysoké molové
aktivitě v poloze 2'

Vynález se týká oboru radiochemie, přípravy organických sloučenin značených radioizotopy, a řeší přípravu 2'-deoxyuridinu značeného tritiem o molové aktivitě nad 0,4 TBq.mmol⁻¹ katalytickou dehalogenací vhodného meziproduktu.

2'-Deoxy[2,5-³H] uridin se připraví dehalogenací 3,5-di-O-propionyl- nebo 3,5-di-O-benzoyl-2-bromuridinu ve vodně alkalickém prostředí za přítomnosti plynného tritia bez nosiče v přítomnosti palladia na nosiči jako katalysátoru.

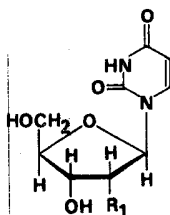
Vynález může být využit v biochemii, biologii a v medicíně, a to v základním i v aplikovaném výzkumu.

Příprava látky podle vynálezu probíhá podle schématu:



kde
R₂ je CH₃CH₂CO
nebo C₆H₅CO.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy 2'-deoxyuridinu značeného tritiem o vysoké molové aktivitě v poloze 2' vzorce I,



(I)

kde R je současně izotop vodíku ^1H a ^3H .

Dosud známé metody přípravy nukleosidů značených tritiem v cukerné části molekuly používají obecných metod syntézy nukleosidů. Tak např. by bylo možno z 2-deoxy-D-[2- ^3H]ribosy přes 3,5-di-p-nitrobenzoylderivát připravit příslušnou halogenosu, která kondensací se solí (např. rtuťnatou) nebo silylderivátem pyrimidinové nebo purinové báze poskytne 2'-deoxy[2'- ^3H]-D-ribonukleosid (DAVID s., EUSTACHE J.: Carbohydr. Res. **20**, 319 /1971/).

Podobně byl připraven 2'-deoxy[2'- ^2H]uridin kondenzací 2,4 bis(trimethylsilyloxy)pyrimidinu s 3,5-di-O-p-nitrobenzoyl-2-deoxy-D-[2- ^2H]arabinofuranosylhalogenidem v přítomnosti chloridu rtuťnatého.

Tento postup, jakož i jeho další modifikace (SATO T., SIMITADE T., ISHIDO Y.: J. Chem. Soc. Jap. **81**, 1440 /1960/; PICHAT L., DUFAY P., LAMORE Y.: C. R. Acad. Sci. **259**, 2 453 /1964/; ISHIDO Y., HOSONO A., FUJII K., KUKUCHI Y., SATO T.: Nippon Kagaku Zasshi **87**, 752 /1966/, Chem. Abstr. **62**, 17 034 /1966/) nejsou však z hlediska izotopové syntézy vhodné z těchto důvodů:

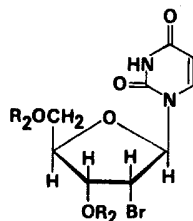
a) výtěžky jsou zpravidla nízké, b) vzniká směs alfa a beta-anomerů, c) jde o více-stupňovou syntézu s radioaktivním materiálem, d) milimolová měřítka pro izotopové značení by byla nerealizovatelná. Pro dosažení vysokých molových aktivit (0,4 až 0,8 TBq.mmol $^{-1}$) je nezbytné pracovat v měřítku 10 až 100 umolu, což odpovídá zpravidla požadovanému množství a umožňuje snížit množství použitého tritia a tím i pracovní riziko.

Příprava 2'-deoxy[2- ^3H]uridinu o molové aktivitě 12,1 GBq.mmol $^{-1}$ byla popsána nedávno (SIGLEROVÁ V.: Dizertační práce, IL BÚ ČSAV, Praha 1978). Snaha dosáhnout vysoké molové aktivity vedla k použití aprotického rozpouštědla. Dehalogenací 3'-benzoyl-2'-brom-2'-deoxyuridinu v prostředí N,N-dimethylacetamidu a katalysy 20% Pd/C však vzniká směs látek. Kromě požadovaného 3'-O-benzoyl-2'-deoxyuridinu vznikal také 2,2'-anhydrouridin, 2',3'-dideoxyuridin a uracil, což významně snížilo chemický výtěžek.

Z uvedených důvodů byla tritace autory provedena v methanolu za přítomnosti uhlíkatého barnatého. Byl získán 3'-O-benzoyl-2'-deoxy[2'- ^3H]uridin, který poskytl po debenzoylaci a přečištění preparativní papírovou chromatografií 2'-deoxy[2- ^3H]uridin o molové aktivitě 12,1 GBq.mmol $^{-1}$.

Základní i aplikovaný výzkum v biochemii, biologii a medicíně vyžaduje pro řešení problémů na molekulární úrovni 2'-deoxyribonukleosidy značené tritiem o vysoké molové aktivitě (>300 GBq.mmol $^{-1}$), jakož i sloučeniny značené specificky na cukerné části molekuly.

Tyto látky byly dosud nesnadno dostupné nebo nedostupné vůbec. Tuto nevýhodu odstraňuje předmětný vynález způsobu přípravy 2'-deoxyuridinu značeného tritiem o vysoké molové aktivitě v poloze 2' vzorce I, spočívající v tom, že se 3',5'-di-O-propionyl- nebo 3',5'-di-O-benzoyl-2'-brom-2'-deoxyuridin obecného vzorce II,



kde R_1 je $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ nebo $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$ skupina, uvede do reakce s plyným tritiem ve vodně alkalickém prostředí v 0,1 až 1,0 N, s výhodou v 0,5 N, vodném hydroxidu sodném nebo draselném a v přítomnosti palladia na nosiči (s výhodou uhlí, síran nebo uhličitán vápenatý nebo barnatý) jako katalyzátoru, a to při teplotě 273 až 303 K, a vzniklý 2'-deoxy[2'- ^3H]uridin vzorce I se po odstranění labilního tritia opakovaným odpařením s vodou ze směsi izoluje preparativní papírovou chromatografií.

Srovnávací pokusy s katalytickou redukční dehalogenací látek obecného vzorce II prokázaly, že reakce v jiných obvykle užívaných rozpouštědlech (methanol, ethanol, dioxan) probíhá pomalu a dosažené molové aktivity jsou značně nižší než při použití vodně alkalického prostředí. Rovněž 2'-chlor-2'-deoxyuridin nebo 2'-jód-2'-deoxyuridin mohou být použity pro přípravu látky vzorce I způsobem podle vynálezu, výtěžek je však nižší a dosažená molová aktivita nepřesahuje $100 \text{ GBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$.

Výchozí látky obecného vzorce II jsou snadno dostupné z uridinu reakcí s propionylbromidem (MAROMUTO R., HONJO M.: Chem. Pharm. Bull. 22, 128 /1974/) nebo postupně reakcí s benzoylkyanidem a bromovodíkem. Reakce je snadno proveditelná v uspořádání obvyklém pro práci s plyným tritiem a zpracování reakční směsi včetně izolace produktu vzorce I je dostatečně jednoduché. Radiochemická čistota takto připraveného 2'-deoxy[2'- ^3H]uridinu je lepší než 96 %, molová aktivita přesahuje $500 \text{ GBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$.

Získaný 2'-deoxy[2'- ^3H]uridin vzorce I je výhodnou výchozí surovinou pro přípravu pyrimidinových a purinových 2'-deoxy[2'- ^3H]ribonukleosidů, popřípadě těchto látek značených tritiem v cukerné části a tritiem nebo radionuklidem uhlíku ^{14}C v části heterocyklické. K tomu účelu lze s výhodou užít dříve vypracovaného postupu (FILIP J., NEJEDLÝ Z., VESELÝ J., ČIHÁK A.: Autorské osvědčení č. 194 013) enzymaticky katalyzované transdeoxyribosylace, která může být provedena v mikroměřítku. Protože tritium v deoxy[2'- ^3H]ribofuranosylové skupině zůstává při enzymové reakci stabilně vázáno, je molová aktivita nově vzniklého 2'-deoxy[2'- ^3H]ribonukleosidu nezměněna, takže lze tímto postupem snadno získat uvedené důležité biochemikálie značené tritiem ve vysokých výtěžcích a s molovou aktivitou převyšující $500 \text{ GBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$.

V dalším je postup podle vynálezu osvětlen na příkladech provedení, aniž se tím jakkoliv omezuje.

P ř í k l a d 1

Do reakční banky objemu 1,2 ml se umístí 40 mg 3',5'-di-O-benzoyl-2'-brom-2'-deoxyuridinu, 8 mg 10% palladia na uhlí a 0,6 ml 1 N hydroxidu draselného. Po připojení banky k tritizační aparatuře (FILIP J., ŠTASTNÝ J., VEŘMIROVSKÝ J.: Jaderná energie 13, 432 /1967/) a po odplynění reakční směsi se ze zásobníku převede 185 GBq tritia bez nosiče. Reakční směs se míchá elektromagneticky při laboratorní teplotě. Po 120 minutách se reakce přeruší a nezreagované tritium se převede do zásobníku. K reakční směsi se přidá 0,3 ml 3 N KOH a míchá se přes noc. Z reakční směsi se odstraní rozpouštědlo odpařením za vakua v uzavřeném systému. Odparek se rozpustí v 1 až 2 ml vody a voda se odstraní mrazovou sublimací. Tento postup se opakuje třikrát.

2'-Deoxy[2'-³H]uridin se izoluje preparativní papírovou chromatografií v soustavách 1-butanol-kyselina octová-voda (4:1:5) a octan ethylnatý nasycený vodou.

Výtěžek: 6,45 mg 2'-deoxy[2'-³H]uridinu (tj. 34,5 % na použitý 3',5'-di-O-benzoyl-2'-brom-2'-deoxyuridin) o celkové aktivitě 19,6 GBq (tj. 10,6 % na použité tritium). Molová aktivita 2'-deoxy[2'-³H]uridinu byla 690 GBq.mmol⁻¹; radiochemická čistota je lepší než 96 %.

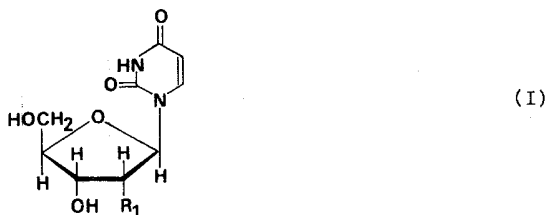
P ř í k l a d 2

Do reakční baňky objemu 1,2 ml se umístí 40 mg 3',5'-di-O-propionyl-2'-brom-2'-deoxyuridinu, 60 mg 5% palladia na síranu barnatém a 0,5 ml 0,5 N hydroxidu sodného. Reakční baňka se připojí k tritiační aparatuře a po odplynění reakční směsi se do baňky převede 185 GBq tritia. Reakční směs se míchá elektromagneticky při laboratorní teplotě. Reakce se přeruší po 150 minutách a nezreagované tritium se převede zpět do zásobníku tritia. Zpracování reakční směsi a izolace 2'-deoxy[2'-³H]uridinu se provede stejným postupem jako v příkladu 1.

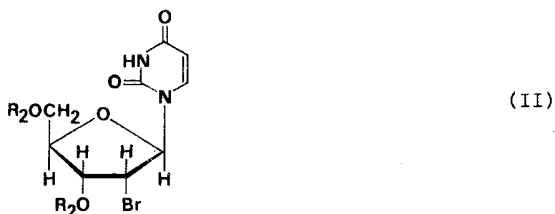
Výtěžek: 6,50 mg 2'-deoxy[2'-³H]uridinu (tj. 29,6 % na použitý 3',5'-di-O-propionyl-2'-brom-2'-deoxyuridin) o celkové aktivitě 20,7 GBq (tj. 11,2 % na použité tritium). Molová aktivita 2'-deoxy[2'-³H]uridinu byla 725 GBq.mmol⁻¹, radiochemická čistota je lepší než 96 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy 2'-deoxyuridinu značeného tritiem o vysoké molové aktivitě v poloze 2' vzorce I,



kde R₁ je současně izotop vodíku ¹H a ³H, vyznačený tím, že se 3',5'-di-O-propionyl - nebo 3',5'-di-O-benzoyl-2'-deoxy-2'-bromuridin obecného vzorce II,



kde R₂ je CH₃CH₂CO nebo C₆H₅CO skupina,

uvede do reakce s plynným tritiem ve vodně alkalickém prostředí, v 0,1 až 1,0 N, s výhodou 0,5 N hydroxidu sodném nebo draselném, a v přítomnosti palladia na nosiči, s výhodou uhlí, síranu nebo uhličitanu vápenatém nebo barnatém, jako katalyzátoru, a to při teplotě 273 až 303 K.