



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216 563

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 06 81
(21) PV 4159-81

(51) Int. Cl.³

C 07 D 473/34

(40) Zveřejněno 31 12 81
(45) Vydáno 01 07 84

(75)

Autor vynálezu HOLÝ ANTONÍN RNDr.CSo., VOTRUBA IVAN RNDr.CSc., PRAHA

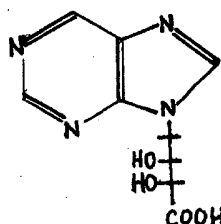
(54) Způsob přípravy D-eritadeninu specificky i nespecificky značeného radionuklidem ^{14}C v adeninovém kruhu

Vynález se týká způsobu přípravy D-eritadeninu specificky i nespecificky značeného radionuklidem ^{14}C v adeninovém kruhu.

Látka se připraví reakcí adeninu značeného radionuklidem ^{14}C s 2,3-O'-cyklohexylem-D-erythronolaktonem v přítomnosti uhličitanu sodného nebo draselného a v dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla a kyselou hydrolysou. Produkt se čistí papírovou chromatografií a elektroforesou.

Látka má význam při biochemickém studiu D-eritadeninu, který má hypolipidemický a enzymově inhibiční účinek.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy D-eritadeninu vzorce I

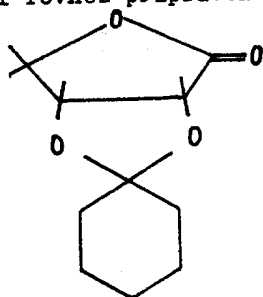


(I)

specificky i nespecificky značeného radionuklidem ^{14}C v adeninovém kruhu.

D-Eritadenin (I) ((2R,3R)-(4-adenin-9-yl)-2,3-dihydroxymásečná kyselina) byl izolován z jedlé dřevokazné houby *Lentinus edodes shiitake* (Chibata I., Okumura K., Takeyama S., Kotera K., *Experientia* 25, 1237 (1969)). Tato látka silně snižuje hladinu cholesterolu v žrevní plasmě (Japonský patent 7247398, 7221435, 5013799, 7208548, 7202259, 7204078), a je účinným inhibi-torem S-adenosyl-L-homocysteinhydrolasy, enzymu zúčastněného regulace methylačních procesů v živé hmotě (Votruba I., Holý A.: *Collection Czechoslov.Chem.Communs.*, 45, 3039 (1980)). Pro studium mechanického účinku této látky a její farmakokinetické a metabolické studie je nezbytné používat D-eritadenin vhodně značený radionuklidy. Dosavadní syntesy D-eritadeninu (I) spočívají v oxidaci 5-(adenin-9-yl)-5-deoxy-D-ribosy nebo D-arabinosy elementárním kyslíkem v alkalickém prostředí (viz uvedené japonské patenty a Kawazu M., Kanno T., Yamamura S., Mizoguchi T., Saito S.: *J.Org. Chem.* 38, 2687 (1973) nebo v oxidaci 2,2-dimethyl-5-(adenin-9-yl)-1,3-dioxolan-4-methanolu (autorské osvědčení č. 216562). Tyto metody nejsou vhodné pro přípravu značené látky, protože vyžadují víceústupňové reakční postupy s izolací meziproduktů. Dosud jediná popsaná syntéza D-eritadeninu značeného radionuklidem ^{14}C spočívá v reakci kyseliny 4-(4,5-diaminopyrimidin-6-yl) amino-2,3-dihydroxymásečné s ^{14}C -kyselinou mravenčí (Kamiya T., Saito Y., Hashimoto M., Seki H., *Tetrahedron Letters* 1969, 4729). Touto metodou však lze připravit výhradně 8- ^{14}C -D-eritadenin s nízkou specifickou aktivitou.

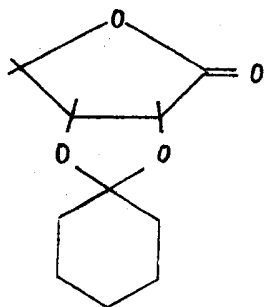
D-eritadenin (I) byl rovněž připraven kondensací 2,3-O'-cyklohexyliden-D-erythronolaktanu vzorce II



(II)

se sodnou solí adeninu v dimethylformamidu (Okumura K. a další, *J.Org.Chem.* 36,1573 (1971)). Ani tato varianta není výhodná pro efektivní přípravu značeného D-eritadeninu, protože dodržení reakčních podmínek (ekvimolarita adeninu a sodných iontů, vysoká koncentrace reakčních komponent) je při práci v mikroměřítku obtížné a celkový výtěžek vzhledem k adeninu není příliš vysoký.

Tyto nedostatky odstraňuje předmětný vynález, jehož podstatou je, že se adenin značený radionuklidem ^{14}C nechá reagovat s 10 až 20 ekvivalenty 2,3-O'-cyklohexyliden-D-erythronolaktanu vzorce II



(II)

a práškovým uhlíčitánem sodným nebo draselným v množství 25 až 50 % hmot. počítáno na sloučeninu vzorce II v dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla při teplotách 80 až 140 °C, načež se směs podrobí elektroforese v alkalickém prostředí s výhodou v triethylaminbikarbonátu a získaný intermediát se nechá reagovat s anorganickou nebo organickou kyselinou a poté se čistí postupně papírovou chromatografií v soustavě 2-propanol-konzentrovaný vodný amoniak-voda v objemovém poměru 7:1:2, papírovou elektroforesou v kyselině octové nebo mravenčí a posléze papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol-kyselina octová-voda v objemovém poměru 10:1:3.

Provedení reakce je jednoduché a nevyžaduje speciálního zařízení. Z hlediska manipulace a s ohledem na kontaminaci okolí je důležitým význakem postupu podle vynálezu skutečnost, že se reakce provádí v jediné nádobě a celá směs se přímo a beze ztrát podrobí čistícím operacím. Použití uhlíčitánu sodného nebo draselného místo sodné soli adeninu v heterogenní reakci s látkou vzorce II umožňuje zvýšit nadbytek tohoto činidla bez nebezpečí jeho rozkladu a tím podstatně zvýšit celkovou konverzi adeninu. Podstatným význakem je rovněž použití dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla, které umožňuje práci v nízké absolutní koncentraci reakčních složek a použití vyšší teploty bez nebezpečí úniku radioaktivních látek odparem. Při reakci vzniká jako vedlejší produkt 3-isomer látky vzorce I; i jeho relativní zastoupení je nižší při práci v dimethylsulfoxidu.

Důležitým význakem vynálezu je také postup čištění látky vzorce I: celá reakční směs se nejprve elektroforesou v alkalickém prostředí (nejlépe v těkavém triethylaminbikarbonátu) zbaví nezreagovaného značeného adeninu, který lze regenerovat a izolují se látky kyselého charakteru. Působením kyseliny (nejlépe těkavé kyseliny mravenčí) se odštěpí chránicí cyklohexylidenová skupina a téměř čistý D-eritadenin kontaminovaný 3-isomerem se izoluje papírovou chromatografií v alkalické soustavě. Další čištění od 3-isomeru látky vzorce I se provede elektroforesou v kyselém prostředí a papírovou chromatografií v kyselé soustavě. Sled dvou posledních stupňů lze vyměnit. Pro použití k biologickým účelům je vhodné zařadit jako poslední stupeň opět chromatografii v amoniakální soustavě, která zbaví produkt kyseliny octové a jejích esterů. Tímto postupem se získá D-eritadenin vzorce I o vysoké (více než 99 %) radiochemické čistotě s konečným výtěžkem 55 až 70 % (vztaženo na použitý ^{14}C -adenin).

Způsob podle vynálezu může být se stejným výsledkem použit pro adenin značený specificky na jednotlivých uhlíkových atomech nebo pro adenin nespecificky značený. Z toho vyplývá možnost přípravy ^{14}C -D-eritadeninu s vysokou specifickou aktivitou dostatečnou pro biologické použití in vivo i in vitro. Postup může být stejně použit i pro přípravu enantiomerního L-eritadeninu tak, že se derivát D-erythronolaktonu vzorce II nahradí enantiomerní sloučeninou odvozenou od L-erythronolaktonu. Právě tak je možné použít uvedený postup i pro přípravu D-eritadeninu značeného nuklidem ^{13}C .

Výchozí sloučenina vzorce II se s výhodou použije proto, že ji lze poměrně snadno připravit a získat v krystalickém stavu. Je ji však možné nahradit i jinými substituovanými deriváty D-erythronolaktónu, v polohách 2,3 chráněného jinými cyklickými acetalovými nebo ketálovými skupinami (isopropyliden, benzyliden, ethoxymethylen apod.). Rovněž je možné při použití látky vzorce II značené radionuklidem ^{14}C připravit D-eritadenin totálně značený nebo značený specificky na postranním řetězci.

V dalším je vynález osvětlen na příkladech provedení, aniž se tím jakkoliv omezuje.

Příklad 1

$[\text{U-}^{14}\text{C}\text{-Adenin}]$ -D-eritadenin

Směs 10 MBq $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -adeninu (814 MBq/mmol, 12,25 μmol), 20 mg 2,3-O'-cyklohexyliden-D-erythronolaktónu, 5 mg uhličitany draselného a 250 μl dimethylsulfoxidu se zahřívá 7 hodin na 140 $^{\circ}\text{C}$ v silnostěnné, zábrusem uzavřené zkumavce. Směs se nanese na 16 cm pruh chromatografického papíru (Whatman No 3 MM) a provede se papírová elektroforesa při 20 V/cm v 0,1 M triethylamoniumkarbonátu, pH 7,5 po dobu 70 min. Pohyblivý UV-absorbující pás produktu (78 % na adenin) se eluuje vodou (3 až 5 ml), odpaří se vakuu dosucha a zbytek se rozpustí ve 2 ml kyseliny mravenčí a zahřívá 48 h na 37 $^{\circ}\text{C}$. Směs se odpaří ve vakuu, zbytek odpaří opakovaně s 3x5 ml vody ve vakuu a odparek v 0,5 ml 10% amoniaku se inkubuje 60 min při teplotě místnosti. Směs se nanese na pruh 2 cm na chromatografickém papíře (Whatman No 3 MM) a chromatografuje se 16 h v soustavě 2-propanol-koncentrovaný amoniak-voda (7:1:2). Skvrna produktu (R_F 0,30-0,35) se eluuje vodou (2 až 3 ml), odpaří se vakuu a čistí papírovou elektroforesou (15V/cm, 60 min) na pruhu 20x36 cm chromatografického papíru (Whatman No 3 MM) v 0,01 M kyselině mravenčí. Skvrna produktu se eluuje vodou (2 až 3 ml), zahustí ve vakuu a chromatografuje na 2 cm pruhu na papíře (Whatman No 3 MM) v soustavě 1-butanol-kyselina octová-voda (10:1:3). Skvrna D-eritadeninu (I) (78%) (R_F =0,50) a jeho 3-isomeru (R_F =0,40, 22%) se eluuje vodou (2 ml) a lyofilisuje. Eluát látky vzorce I se znovu chromatografuje v soustavě 2-propanol-koncentrovaný vodný amoniak-voda (7:1:2), pruh produktu se eluuje vodou a lyofilisuje. Získá se 56 až 65 % produktu s radiochemickou čistotou vyšší než 99%.

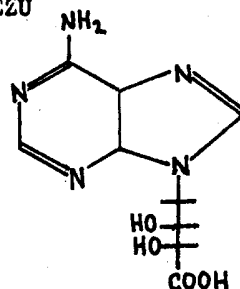
Příklad 2

$[\text{8-}^{14}\text{C}]$ -D-Eritadenin

Směs 2,3 MBq 8- ^{14}C -adeninu (specifická aktivita 174 MBq/mmol, 12,25 μmol), 5 mg uhličitany sodného, 20 mg 2,3-O'-cyklohexyliden-D-erythronolaktónu a 250 μl dimethylsulfoxidu se zahřívá 16 h na 120 $^{\circ}\text{C}$ a směs se zpracuje stejně jako je uvedeno v příkladu 1. Získá se 70 až 72 % produktu s radiochemickou čistotou vyšší než 99% o chromatografických a elektroforetických vlastnostech identických s neradioaktivním materiálem.

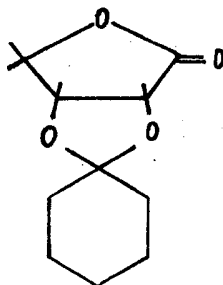
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy D-eritadeninu vzorce I



(I)

specificky i nespecificky značeného radionuklidem ^{14}C v adeninovém kruhu, vyznačený tím, že se adenin značený radionuklidem ^{14}C nechá reagovat s 10 až 20 ekvivalenty 2,3-O'-cyklohexyliden-D-erythronolaktonu vzorce II



(II)

s práškovitým uhličitanem sodným nebo draselným v množství 25 až 50% hmot. počítáno na sloučeninu vzorce II v dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla při teplotách 80 až 140 °C, načež se směs podrobí elektroforese v alkalickém prostředí, s výhodou v triethylaminbikarbonátu a získaný intermediát se nechá reagovat s anorganickou nebo organickou kyselinou a poté se čistí postupně papírovou chromatografií v soustavě 2-propanol-konzentrovaný vodný amoniak-voda v objemovém poměru 7:1:2, papírovou elektroforesou v kyselině octové nebo mravenčí a posléze papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol-kyselina octová-voda v objemovém poměru 10:1:3.