



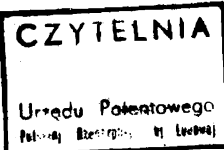
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 03.11.76 (P. 193481)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 08.05.78

Opis patentowy opublikowano: 15.01.1982



Int. Cl.² C07F 9/65
C07B 23/00

Twórca wynalazku: Tadeusz Gałamon

Uprawniony z patentu: Akademia Medyczna, Łódź (Polska)

Sposób wytwarzania trójfosforanowych związków organicznych znaczonych izotopem ³²P w pozycji alfa

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania trójfosforanowych związków organicznychznaczonych izotopem ³²P w pozycji alfa, o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza ugrupowanie o wzorze 2 pochodzące od adenozyiny lub ugrupowanie o wzorze 3 pochodzące od guanozyiny, mających zastosowanie do badań nad kwasami nukleinowymi i do oznaczania aktywności cykazy adenylowej i fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów, przy regulacji hormonalnej oraz przy działaniu niektórych enzymów w organizmach żywych.

Znany sposób otrzymywania tych związków jest opisany przez W. E. Wehrli, D. L. M. Verheyden, J. G. Moffat w Journal of the American Chemical Society 87,2265 (1965) i polega na fosforylacji 2',3'-o-izopropylideno-adenozyny lub guanozyiny za pomocą 2-cyanoetylo-/³²P/-fosforanu, prowadzącej do otrzymania adenozyino- lub guanozyino-5'-monofosforanu znaczonego izotopem ³²P, a następnie usuwaniu grupy izopropylidenoowej i zamienieniu w morfolidat, a po tym na kondensowaniu otrzymanego związku z pirofosforanem w bezwodnym dwumetylosulfotlenku.

Niedogodność tego sposobu stanowi duże zanieczyszczenie produktu w ilości 10,5% nieprzereagowanym 2-cyjanometylo-/³²P/-fosforanem i dwumetylosulfotlenkiem.

Inny znany sposób jest opisany przez R. H. Symonsa w Biochimica et Biophysica Acta 155, 609 (1968) i polega na działaniu kwasem ortofosforowym

2

znaczonym izotopem ³²P na adenozyino- lub guanozyino-5'-monofosforan i zadaniu całości 2',3'-o-izopropylidenoadenozyną lub guanozyną w środowisku acetonitrylu lub trójetyloaminy albo też trójchloroacetonitrylu lub dwumetyloformamidu. Usuwanie grupy izopropylidenoowej następuje poprzez działanie na otrzymany związek dwumolowym kwasem octowym w temperaturze 100°C przez 40 minut, co doprowadza następnie do częściowego odłączenia izotopu ³²P i pozostania w masie reakcyjnej częściowo nieprzereagowanego związku wyjściowego.

Niedogodnością tego sposobu jest to, że otrzymuje się produkt zanieczyszczony izotopem ³²P.

Poza tym znany jeszcze sposób opisany przez R. H. Symonsa w Biochimica et Biophysica Acta 320, 535 (1973), polega na sprzęganiu kwasu ortofosforowego znaczonego izotopem ³²P z 40—50-krotnym nadmiarem 2',3'-o-izopropylidenoadenozyny, przy użyciu trójchloroacetonitrylu jako czynnika kondensującego w obecności rozpuszczalnika trójetyloaminy lub dwumetylenosulfotlenku. Masę reakcyjną następnie ogrzewa się, zadaje wodorotlenkiem sodowym, po czym otrzymuje się krystaliczny produkt adenozyino-5'-monofosforanu znaczonego izotopem ³²P. Tak samo się otrzymuje guanozyino-5'-monofosforan.

Niedogodnością tego procesu jest zanieczyszczenie produktu nieprzereagowanym kwasem ortofosforowym znaczonego izotopem ³²P, oraz wolną lub 2',3'-o-izopropylidenoadenozyną albo guanozyną.

Wszystkie te sposoby charakteryzują się skompli-

kowanym i długotrwałym procesem wytwarzania związków radioaktywnych, wymagającym najpierw przyłączenia do grup hydroksylowych grupy izopropylidenowej, a następnie wyodrębnienia półproduktu przejściowego, po czym drogą odrębnej syntezy przy udziale kwasu ortofosforowego znaczonego izotopem ^{32}P otrzymuje się drugi półprodukt przejściowy i z nich dopiero się tworzy trzeci półprodukt z którego po usunięciu grupy cyjanoetylowej przez zadanie wodorotlenkiem sodowym otrzymuje się trójfosforanowy produkt finalny. Poza tym we wszystkich rodzajach syntezy występują odpady radioaktywne, nieprzydatne do przerobu i kłopotliwe w niszczeniu.

Celem sposobu według wynalazku jest usunięcie niedogodności znanych rozwiązań, poprzez skrócenie i uproszczenie procesu wytwarzania wskutek bezpośredniego napromieniowywania związku wyjściowego. Istota jego polega na tym, że sól wapniową adenozy-5'- lub guanozy-5'-monofosforanu poddaje się bezpośredniemu napromieniowaniu wiązką neutronów w temperaturze niższej lub równej 180°C . Następnie na otrzymany jeden ze związków działa się solą cykloheksyloamoniową-2-cyjanoetylopirofosfoimidazolu, po czym z otrzymanego związku usuwa się w znany sposób grupę cyjanoetylową przez ogrzewanie z dwumetyloformamidem, a następnie zaleje się całość wodorotlenkiem sodu w temp. 0°C .

Zaletą sposobu według wynalazku jest skrócony i uproszczony cykl wytwarzania przy zachowaniu zawsze tej samej grupy fosforanowej, wskutek bezpośredniego napromieniowania wiązką neutronów związków nukleozydo-5'-monofosforowych, z których się otrzymuje inne związki nukleozydo-5'-trójfosforanowe znaczone izotopem ^{32}P w pozycji alfa. Poza tym proces przebiega bez występowania odpadów radioaktywnych.

Sposób według wynalazku jest opisany w przykładach wykonania, a wzory chemiczne przedstawiające związki otrzymane tym sposobem są uwidocznione na rysunku.

Przykład I. 694 części wagowych kwasu lub soli wapniowej adenozy-5'-monofosforowej suszy się w 105°C do stałej masy celem uniknięcia radiolizy wody. Następnie kwas lub sól wprowadza się do ampułki kwarcowej, którą po zatopieniu umieszcza się w zasobniku, a ten z kolei w kanale reakcyjnym reaktora jądrowego. Całość się poddaje napromieniowaniu wiązką neutronów najkorzystniej o gęstości 10^{12} — 10^{14} n/cm 2 S w temperaturze 160 — 180°C , najlepiej w sposób ciągły przez 20—21 dni.

Do otrzymanego znaczonego izotopem ^{32}P kwasu lub soli adenozy-5'-monofosforowej przyłącza się

resztę pirofosforanową dodając 10—15 mikromoli soli cykloheksyloamoniowej-2-cyjanoetylopirofosfoimidazolu i po wymieszaniu całość suszy się przez dodanie porcjami acetonitrylu, a następnie masę reakcyjną poddaje się odparowaniu pod próżnią. Do całości dodaje się w znany sposób suchego dwumetyloformamidu i w szczelnym naczyniu poddaje się ją ogrzewaniu w temperaturze 37°C w czasie 4 godzin. Po usunięciu pod próżnią rozpuszczalnika, do całości się dodaje dwumolowego roztworu wodorotlenku sodowego i ją się utrzymuje w temperaturze 0°C przez 50—70 minut celem usunięcia grupy cyjanoetylowej. Po tym do masy reakcyjnej dodaje się węgla aktywowanego i całość poddaje się oczyszczeniu w kolumnie chromatograficznej.

Otrzymany krystaliczny proszek adenozy-5'-trójfosforanu znaczonego izotopem ^{32}P w pozycji alfa ma aktywność właściwą 2,5—3,5 mCi/mikromol.

Wydajność procesu wynosi 75—80%.

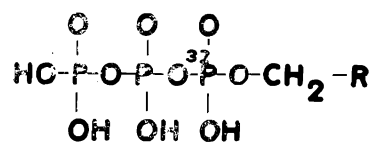
Przykład II. 720 części wagowych suchego kwasu lub soli wapniowej guanozy-5'-monofosforowej napromieniowuje się wiązką neutronów o dowolnej gęstości w przedziale 10^{12} — 10^{14} n/cm 2 S w temperaturze dowolnej między 160 — 180°C , najlepiej w sposób ciągły dowolnie przez 20—21 dni. Całość poddaje się działaniu dowolnej ilości w przedziale 10—15 mikromoli soli cykloheksyloamoniowej-2-cyjanoetylopirofosfoimidazolu. Następnie suszenie masy oraz jej inkubowanie i oczyszczenie odbywa się według przykładu I.

Otrzymany krystaliczny proszek guanozy-5'-trójfosforanu znaczonego izotopem ^{32}P w pozycji alfa ma aktywność właściwą 2,7—2,7 mCi/mikromol.

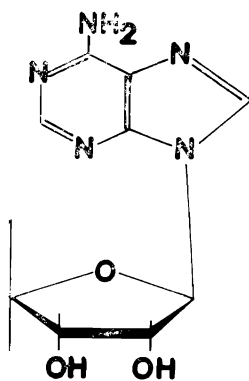
Wydajność procesu wynosi 70—75%.

Zastrzeżenie patentowe

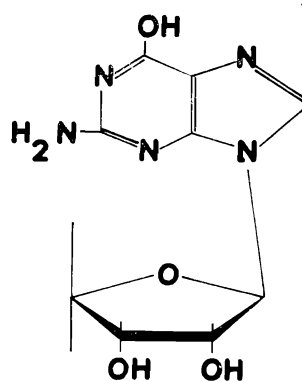
Sposób wytwarzania trójfosforanowych związków organicznych znaczonych izotopem ^{32}P w pozycji alfa, o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza ugrupowanie o wzorze 2 pochodzące od adenozy lub ugrupowanie o wzorze 3 pochodzące od guanozy, znamienny tym, że sól wapniową adenozy-5'- lub guanozy-5'-monofosforanu poddaje się bezpośredniemu napromieniowaniu wiązką neutronów w temperaturze niższej lub równej 180°C i na otrzymane związki działa się solą cykloheksyloamoniową-2-cyjanoetylopirofosfoimidazolu, po czym z otrzymanego związku usuwa się w znany sposób grupę cyjanoetylową przez ogrzewanie z dwumetyloformamidem, a następnie przez zadanie całości wodorotlenkiem sodowym w temperaturze 0°C .



WZÓR 1



WZÓR 2



WZÓR 3