DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **225 696 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 07 H 19/10**
C 07 H 19/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 07 H / 264 203 3	(22)	15.06.84	(44)	07.08.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD
(72) Bauschke, Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Münzenberg, Astrid; Junghans, Christine, DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-5'-di- und triphosphaten hoher spezifischer Aktivität

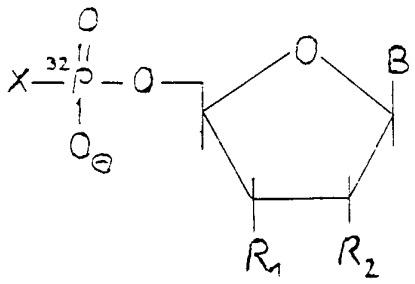
(57) Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-5'-[α-^{32}P-di- oder triphosphaten mit hoher spezifischer Aktivität. Die Erfindung hat das Ziel, ein technisch einfaches, schnelles Verfahren zu entwickeln, das bei guten Ausbeuten Produkte mit maximaler spezifischer Aktivität in einem hohen Aktivitätsniveau liefert. Das durch Umsetzung von trägerfreier $H_3{}^{32}PO_4$ mit Nucleosiden entstandene P-32-markierte Nucleosid-5'- monophosphat wird erfindungsgemäß an Anionenaustauschern gereinigt und direkt im Elutionspuffer mit Substraten und Kinase zum Nucleosid-5'-di- bzw. Triphosphat phosphoryliert. Abschließend erfolgt eine Feinreinigung durch Säulenchromatographie an einem Anionentauscher, dessen Kapazitätsparameter sich von dem der Zwischenreinigung unterscheiden.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-5'-[α^{32}P]di- und triphosphaten hoher spezifischer Aktivität der Formel I,



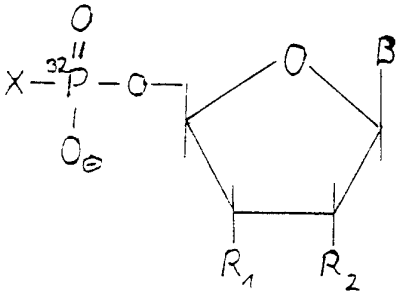
in der x = Phosphat oder Diphosphat
B = Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin, Uracil und deren Derivate
R_1 = OH, R_2 = OH oder H
R_1 = H, R_2 = OH oder H

bedeuten, durch Umsetzung von trägerfreier $H_3{}^{32}PO_4$ mit einem Nucleosid zum [α-^{32}P]-markierten Nucleosid-5'-monophosphat, **dadurch gekennzeichnet,** daß man [α-^{32}P]-markiertes Nucleosid-5'-monophosphat an einem Anionenaustauscher von Verunreinigungen und Radiolyseprodukten reinigt, anschließend im Elutionspuffer direkt nach Zugabe entsprechender Kinasen und Substrate zum Di- bzw. Triphosphat phosphoryliert und diese säulenchromatographisch gewinnt.

2. Verfahren nach Pkt. 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Verunreinigung des [α-^{32}P]-markierten Nucleosid-5'-monophosphats an einem DEAE-Cellulosegel in Bicarbonatform mit Triethylammoniumbicarbonat abgetrennt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-5'[α-^{32}P]-di- und triphosphaten der Formel I.



x = Phosphat oder Diphosphatrest
B = Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin, Uracil und deren Derivate
R_1 = OH, R_2 = OH oder H
R_1 = H, R_2 = OH oder H

Anwendungsgebiet ist die Radiochemische Synthese, Nucleotidchemie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Von Symons wurde 1978 ein einfaches chemisch-enzymatisches Verfahren beschrieben, bei dem die chemischen und enzymatischen Synthesestufen in einem Reaktionsgefäß nacheinander durchgeführt wurden. Bei dieser Synthese wurde markierte und unmarkierte $H_3{}^{32}PO_4$ mit Nucleosiden umgesetzt. Verunreinigungen und Radiolyseprodukte führen dabei zu Ausbeuteverlusten und vor allem zu niedriger spezifischer Produktaktivität. Aus WP C 07 H/2468398 ist ein Eintopfverfahren zur Herstellung von [α-^{32}P]Nucleosid-5'-phosphaten hoher spezifischer Aktivität bekannt. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die als Ausgangsverbindung eingesetzte $H_3{}^{32}PO_4$ für enzymatische Syntheseschritte von großer Reinheit sein muß, was einen hohen technischen Aufwand an Reinigungsverfahren erfordert und ökonomisch ungünstig ist.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein technisch einfaches Verfahren zu entwickeln, das die Herstellung von nmol-Mengen an spezifisch höchstmarkierten Nucleosid-5'[α-^{32}P]di- bzw. triphosphaten in kurzen Reaktionszeiten und guten Ausbeuten ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Verbindungen der Formel I werden hergestellt, indem man trägerfreie $H_3{}^{32}PO_4$ mit einem Nucleosid zum P-32-markierten Nucleosid-5'-monophosphat umsetzt. Erfindungsgemäß wird das [α-^{32}P]-markierte Nucleosid-5'-monophosphat von Verunreinigungen und Radiolyseprodukten an einem Anionenaustauschergel, z. B. DEAE-Cellulose, durch Elution mit einer Salzlösung, z. B. Triethylammoniumbicarbonat, gereinigt.
Anschließend wird im Elutionspuffer die enzymatische Phosphorylierung zum Di- bzw. Triphosphat durchgeführt. Innerhalb von 4–20 h erhält man Ausbeuten, die je nach Enzymart 30 %–80 % sind. Das Nucleosid-5'-[α-^{32}P]-di- bzw. triphosphat wird aus dem Reaktionsgemisch säulenchromatographisch an einem Anionenaustauscher, dessen Kapazitätsparameter sich von dem zur Reinigung des Monophosphats unterscheiden, z. B. DEAE-Sephadex A25, abgetrennt. Die Elution erfolgt nach einem Gradientenprogramm.
Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, daß damit ein technisch einfaches Verfahren zur Herstellung der Di- und Triphosphate mit hoher spezifischer Radioaktivität gegeben ist. Es hat sich als wesentlich ökonomischer erwiesen, die entstandenen Monophosphate zu reinigen, als die als Ausgangsverbindung eingesetzte $H_3{}^{32}PO_4$.
Die folgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung näher.

Ausführungsbeispiel

1. Beispiel

27 mCi trägerfreie $H_3{}^{32}PO_4$ in 25 µl 0.1 NHCl werden mit 0.5 µmol Chelaplex II in einem Plaströhrchen lyophilisiert.
Das Lyophilisat wird in 50 µl Dimethylsulfoxid, das 5 mg 2'-Desoxyadenosin, 2 µl Triethylamin, 2 µl Trichloracetonitril enthält, aufgenommen.

Nach 60 Minuten wird die Reaktion mit 0.5 ml Wasser gestoppt. Das Gemisch wird nun auf eine Säule mit DEAE-Cellulose-Gel in Bicarbonatform (0.3 ml Bettvolumen) gegeben. Die Säule wird dann mit 5 ml Wasser, 0.5 ml 0.02 M Triethylammoniumbicarbonat (TAC) gewaschen und das Produkt mit 4 ml 0.15 M TAC eluiert. Zu dem Eluat von 4 ml werden 4 nmol ATP, 9.8 μmol Phosphoenolpyruvat, 0.8 μmol KCl, 32.5 μmol $Mg(ac)_2$, 100 μg Myokinase und 200 μg Pyruvatkinase gegeben.
Nach Erreichen einer Ausbeute von 60% an 2'-Desoxyadenosin-5'-[α-^{32}P]-triphosphat wird das Gemisch auf eine Säule mit DEAE-Sephadex A 25 in Bicarbonatform gegeben und mit 20 ml Wasser und 20 ml 0.3 M TAC gewaschen. Anschließend wird im kontinuierlichen Gradienten, 25 ml 0.3 M TAC gegen 25 ml 0.7 M TAC, mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min das gewünschte Triphosphat nach ca. 10 ml als 8 ml Fraktion isoliert.
Die radiochemische Reinheit der Fraktion beträgt >99% [α-^{32}P]dATP. Nach Lyophilisation und Aufnehmen des Produktes in 5 mM Mercaptoethanol/Wasser ergibt sich eine Ausbeute an Produktaktivität von 25–30%.
Die Produktcharakterisierung erfolgt dünnschichtchromatographisch mit inaktivem dATP-Vergleich:
R_F = 0.31 auf PEI-Cellulose der Fa. Merck
Laufmittel 0.5 M KH_2PO_4-Puffer, *p*H = 3.5.

2. Beispiel

27 mCi trägerfreier $H_3{}^{32}PO_4$ in 20 μl 0.1 N HCl werden mit 0.5 μmol Chelaplex II in einem Plaströhrchen lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 50 μl Dimethylsulfoxid, das 5 mg 2'-Desoxycytidin, 2 μl Trichloracetonitril und 2 μl Triethylamin enthält, aufgenommen. Nach 60 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml H_2O gestoppt. Das Gemisch wird auf eine Säule, die mit 0.3 ml DEAE-Cellulose-Gel gefüllt ist, gegeben. Das Anionenaustauschergel wird mit 5 ml Wasser, 0.02 M TAC gewaschen und mit 1.5 ml 0.12 m TAC das [α-^{32}P]dCMP vom Gel eluiert. Direkt im Elutionspuffer wird die enzymatische Phosphorylierung zum Triphosphat durch Zugabe von 10.7 μmol Phosphoenolpyruvat, 8.1 μmol $MgSO_4$, 0.4 μmol KCl, 5 μl Mercaptoethanol, 2.2 μmol ATP, 200 μg Pyruvatkinase und 740 μg Nucleotidkinase aus Escherichia coli gestartet.
Nach 18 h wird eine Ausbeute an [α-^{32}P]dCTP von 30% erreicht. Das Gemisch wird auf eine Säule mit DEAE-Sephadex A 25 (3 ml Bettvolumen) gegeben und mit 20 ml Wasser, 20 ml 0.3 M TAC gewaschen und im kontinuierlichen Gradienten, 20 ml 0.3 M TAC, bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min, das gewünschte 2'-Desoxycytidin-5'[α-^{32}P]-triphosphat als 9 ml-Fraktion isoliert. Die radiochemische Reinheit des Produktes ist >95%, die Aktivitätsausbeute der Synthese liegt bei 10%.
Die Produktcharakterisierung erfolgt dünnschichtchromatographisch mit inaktivem dCTP-Vergleich
R_F = 0.5 auf PEI-Cellulose der Fa. Merck
Laufmittel 0.5 M KH_2PO_4-Puffer, *p*H = 3.5.