



Wirtschaftspatent

Teilweise bestaetigt gemaeß § 6 Absatz 1 des
Aenderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

128 847

Int.Cl.³

3(51) C 07 B 23/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 07 B/ 1928 92

(22) 21 09.73

(45) 01.02.84
(44) 14.12.77

- (71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN;DD;
(72) BAERWOLFF, DIETER,DR. DIPL.-CHEM.;MURAWSKI, DETLEF,DR. DIPL.-CHEM.;DD;
(73) siehe (72)
(74) ADW DER DDR, ZI F. MOLEKULARBIOLOGIE, AG PATENT- U. NEUERERW., 1115 BERLIN-BUCH,
LINDENBERGER WEG 70

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TRITIERTEM THYMIDIN

Dr. D. Bärwolff

Dr. D. Murawski

"Verfahren zur Herstellung von tritiiertem Thymidin"

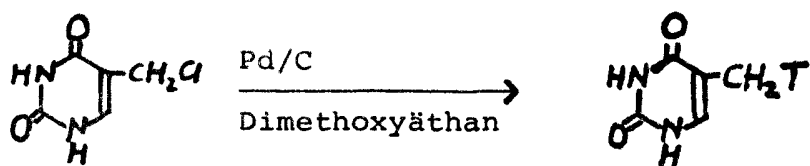
Anwendungsgebiet der Erfindung

Tritiiertes Thymidin ist für biochemische Untersuchungen von großem Interesse, u.a. in der medizinischen Diagnostik. Es wird speziell zur Messung der DNS-Synthese und zur Lösung zellkinetischer Probleme verwendet.

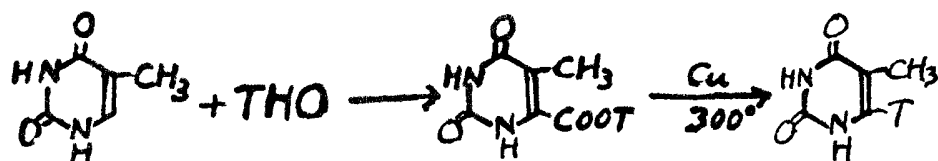
Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei den in den Nucleinsäuren (DNS, RNS) enthaltenen Bausteinen muß man zwischen den zugrundeliegenden Basen (u.a. Thymin, Uracil), den mit Zuckern (Ribose, Desoxyribose) verknüpften Nucleosiden (u.a. Thymidin, Uridin) und den zusätzlich mit ein bis drei Phosphorsäureresten veresterten Nucleotiden (u.a. TTP, UMP) unterscheiden. In der angegebenen Reihenfolge steigt die Temperaturempfindlichkeit und sinkt die Beständigkeit gegenüber jeder Art chemischer Veränderung (siehe dazu: J. Amer. chem. Soc. 81 (1959) S. 2521). Darin liegt die Ursache, daß für die freien Basen eine Reihe von Markierungsmethoden beschrieben werden, z.B.

- M. Winand und L. Gouverneur, Proc. Conf. on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules, Brüssel 1963, S. 1147-1155; vgl. C. A. 63 (1965) 11 910 a):



- C. Parkany und F. Sorm, Coll. Czech. Chem. Commun. 28 (1963) S. 2491):



die trotz scheinbar großer Ähnlichkeit auf die empfindlicheren Nucleoside und Nucleotide nicht übertragbar sind.

Für tritiummarkiertes Thymidin hatte sich daher die enzymatische Synthese aus Desoxyribosendonatoren und vorher markiertem Thymin durchgesetzt (siehe dazu: E.A. Evans "Tritium and its Compounds", London 1966). Als Nachteile dieses Verfahrens erwiesen sich die umständliche Herstellung der Ausgangsverbindung, die zusätzlichen Arbeiten zur Enzympräparation und die bei hohem Arbeitsaufwand geringen Ausbeuten der enzymatischen Synthese.

Eine direkte chemische Synthese des [^3H]-Thymidins ist auch von K.V. Viswanathan et al. (Proc. of the Chemistry Symposium, Vol. I, S. 86-87, Aligarh Muslim University, Aligarh, 21.-23. Dez. 1972) beschrieben worden. Die dabei benötigte Ausgangsverbindung Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin erfordert eine 8-Stufen-Synthese, ist also schwer verfügbar. Ein bereits vorher veröffentlichter Weg, diese Verbindung in einem Schritt zu synthetisieren (J. Amer. chem. Soc. 81 (1959) S. 2521), konnte von uns (offenbar auch von Viswanathan) nicht reproduziert werden.

Dreifach tritiiertes Thymidin war bisher überhaupt nicht zugänglich.

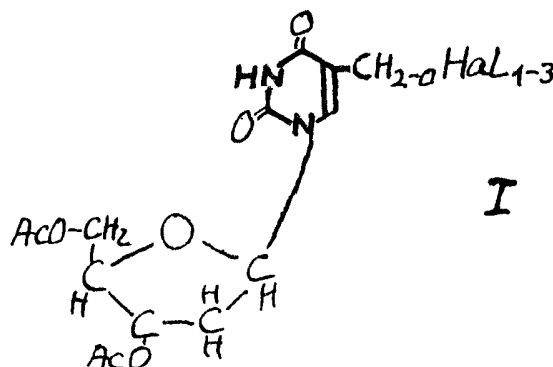
Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein einfaches und technologisch gut zu realisierendes Verfahren zur Herstellung von

tritiiertem Thymidin zu entwickeln und diese Verbindung bequem zugänglich zu machen. Außerdem besteht das Ziel darin, Thymidin mit hoher spezifischer Aktivität herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Tritiiertes Thymidin wird aus halogenierten 5-Methylpyrimidinen der Formel I (hergestellt nach DD-WP 113 361), in welcher Hal = Cl oder Br bedeutet, in Gegenwart von Palladium-Kohle als Tritiierungskatalysator, Dioxan als Lösungsmittel und tertiären Aminen als Säurefänger hergestellt und 2 - 4 Stunden bei gegebenenfalls erhöhten Temperaturen behandelt. Erfindungsgemäß wird Tributylamin als Säurefänger eingesetzt, das sich durch ausreichende Basizität bei starker sterischer Hinderung auszeichnet.



Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird labiles Tritium mittels Methanol rückgetauscht, der Rückstand wird mit Methanol und Ammoniak entacetyliert und über eine Sephadex Chromatographiesäule von inaktiven Verunreinigungen befreit. Mit diesem Verfahren lassen sich 1 - 3 Halogenatome durch Tritium ersetzen, wobei je nach Halogengehalt der Ausgangsverbindung tritiiertes Thymidin unterschiedlicher spezifischer Aktivität (etwa 28 Ci/mMol für jedes Halogen) entsteht.

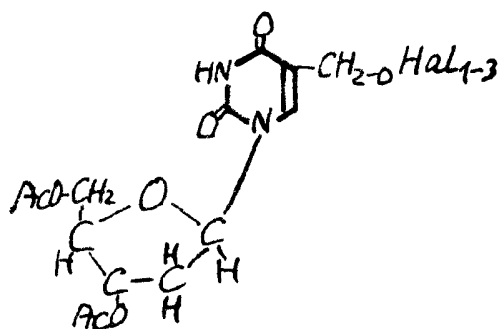
Ausführungsbeispiel

1. 200 mg einer Verbindung I (1 - 3 Chlor- bzw. Bromatome), hergestellt nach DD-WP 113 361,

werden in 10 ml Dioxan gelöst und in Gegenwart von 200 mg 10 % Palladium-Kohle (Hydrierkatalysator) und 0,5 ml Tributylamin mit Tritium bei 40°C tritiiert. Reaktionszeit 2 - 4 Stunden. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird labiles Tritium mit Methanol rückgetauscht, der Rückstand mit Methanol und Ammoniak entacetyliert und über eine Sephadex-Chromatographie-Säule von inaktiven Verunreinigungen befreit. Die spezifischen Aktivitäten sind abhängig vom Halogenierungsgrad der eingesetzten Halogenverbindung. Die bisher besten Ergebnisse lagen bei 60 Ci/mMol.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Herstellung von tritiiertem Thymidin aus halogenierten 5-Methylpyrimidinen der allgemeinen Formel I,



in der Hal = Br oder
Cl bedeutet,

unter Verwendung von Palladium-Kohle als Tritiierungskatalysator, von Dioxan als Lösungsmittel, von tertiären Aminen als Säurefänger, im Verlauf von 2 bis 4 Stunden bei gegebenenfalls erhöhten Temperaturen, dadurch gekennzeichnet, daß Tributylamin als Säurefänger eingesetzt wird.