



УДК 577.113.3 + 546.11 '3

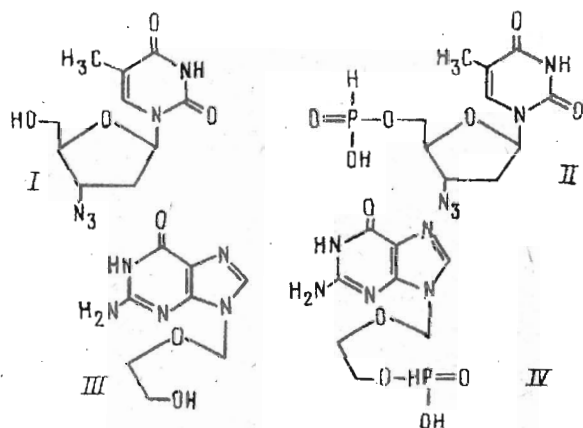
© 1993 Г. В. Сидоров, Н. Ф. Мясоедов

ВВЕДЕНИЕ ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ В ТЕРМИНАТОРЫ СИНТЕЗА ДНК ТВЕРДОФАЗНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ГИДРОГЕНИЗАЦИЕЙ

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Исследовано влияние температуры, катализаторов и соотношения компонентов твердой фазы на включение трития в 3'-азидо-3'-дезокситимидин, азидотимидинфосфонат, ацикловир, ацикловирфосфонат и 3'-дезокситимидин, получаемых в реакции твердофазной каталитической гидрогенизации тритием. Получены меченные тритием соединения с молярной активностью 30—124 Ки/ммоль (1,10—4,59 ПБк/моль).

Интерес к различным терминаторам синтеза ДНК все время возрастает в связи с изысканием возможностей ингибирования или развития ретровирусов, в том числе вируса иммунодефицита человека [1]. Меченные радионуклидами, в частности тритием, различные терминаторы синтеза ДНК являются необходимыми инструментами изучения механизмов подобного ингибирования. В литературе



имеется несколько публикаций, посвященных введению тритиевой метки в терминаторы синтеза ДНК [2—4]. Как правило, в основу синтеза подобных препаратов положено восстановление тритием ненасыщенных предшественников, что требует проведения предварительной довольно сложной синтетической работы. В связи с изложенным нам представляется актуальной разработка единого

Сокращения: ТКГ — твердофазная каталитическая гидрогенизация.

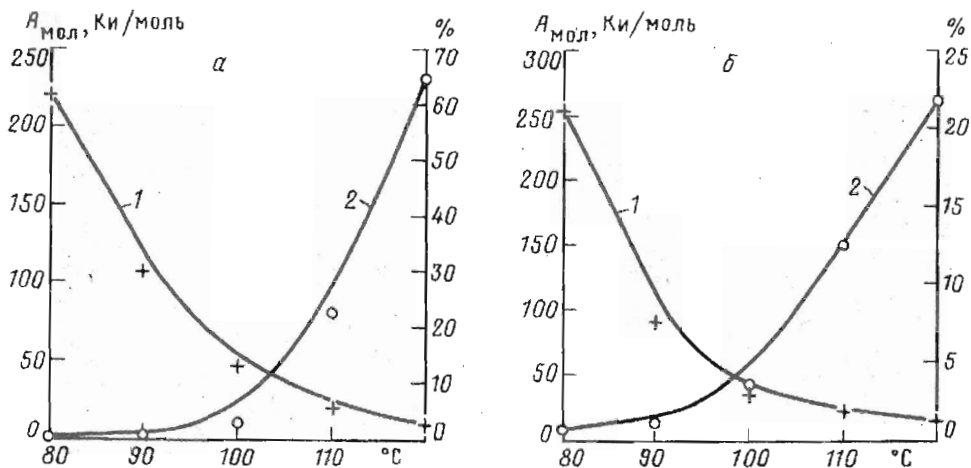


Рис. 1. Зависимость выхода (1) и $A_{\text{мол}}$ (2) $[^3\text{H}]$ -азидотимидина от температуры реакции ТКГ с катализаторами 5% Pd/CaCO₃ (а) и 5% Pd/BaSO₄ (б). Время реакции 30 мин

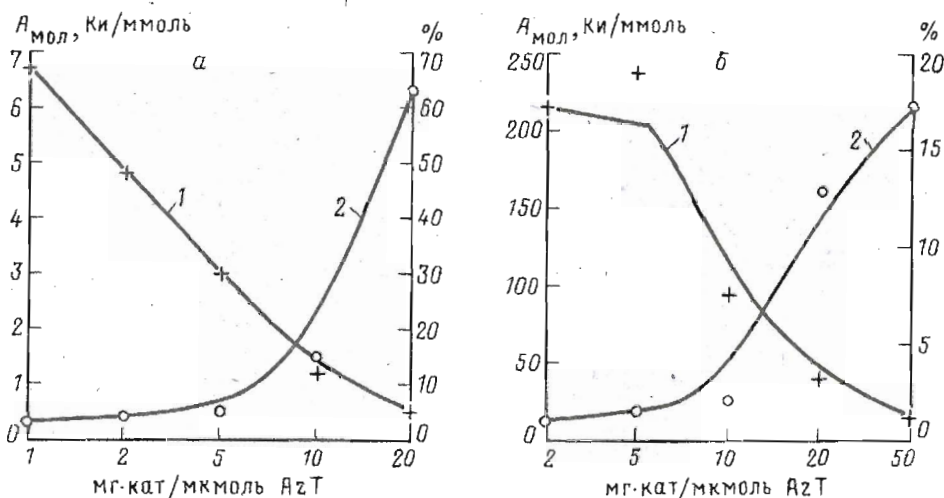


Рис. 2. Зависимость выхода (1) и $A_{\text{мол}}$ (2) $[^3\text{H}]$ -азидотимидина от соотношения компонентов твердой фазы. Условия реакции: а — 5% Pd/CaCO₃, 90° С, 60 мин; б — 5% Pd/BaSO₄, 120° С, 30 мин

подхода к получению меченных тритием терминаторов синтеза ДНК. Ранее нами было показано, что твердофазные реакции эффективны в синтезе меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот [5].

Цель настоящей работы состояла в изучении реакции твердофазной каталитической гидрогенизации (ТКГ) для введения тритиевой метки в ряд соединений, представляющих интерес в качестве терминаторов синтеза ДНК. Объектами для исследования служили азидотимидин (I), азидотимидинфосфонат (II), ацикловир (III) и ацикловирфосфонат (IV), а также 3'-дезоксидезокси-2', 3'-дегидротимидин в синтезе 3'-дезокситимидина. Мы исследовали влияние различных катализаторов, температуры и соотношения компонентов твердой фазы на выход и включение трития в целевое соединение. Эти эксперименты проводили с тритий-протиевой (1:1000) смесью. Синтез меченных тритием препаратов проводили с высокопроцентным (95—97%) тритием.

На рис. 1 показана зависимость от температуры выхода и молярной

Таблица 1

Твердофазная каталитическая гидрогенизация азидотимидинфосфоната на Pd/BaSO₄

<i>t</i> , °С	Выход, %	<i>A</i> _{мол.} Ки/моль
60	53	1,1
80	43	3,2
100	45	3,3
120	49	4,0
140	45	4,7
160	20	19,0
180	—	—

Таблица 2

Твердофазная каталитическая гидрогенизация ацикловира на Pd-катализаторе *

<i>t</i> , °С	Выход, %	<i>A</i> _{мол.} Ки/моль
160	73	47
	71	41
180	67	68
	65	50
200	78	135
	77	120
220	47	210
	52	193
240	7,7	435
	6,2	415

Таблица 3

Твердофазная каталитическая гидрогенизация ацикловирифосфоната на Pd/CaCO₃

<i>t</i> , °С	Выход, %	<i>A</i> _{мол.} Ки/моль
180	27,0	189
200	26,1	197
220	9,8	200

* Для каждой температуры верхняя строка отвечает Pd/CaCO₃, нижняя — Pd/BaSO₄.

Таблица 4

Синтез меченного тритием 3'-дезокситимидина

Катализатор	Условия		Выход, %	<i>A</i> _{мол.} Ки/моль
	°С	мин		
Pd/BaSO ₄	120	30	54	134
Pd/CaCO ₃	120	30	56	144
	130	30	12,5	237
	140	30	7,0	360
	150	30	5,2	434
Pd/Al ₂ O ₃	20	120	90	123

(жидкофазно)

активности (*A*_{мол.}) [³H]азидотимидина, получаемого в реакции ТКГ тритием. Видно, что с ростом температуры падает выход целевого соединения и увеличивается его молярная активность. Более сильная дегградация исходного соединения отмечается на катализаторе Pd/CaCO₃. Увеличение в реакционной смеси массовой доли катализатора (рис. 2) также приводит к росту *A*_{мол.} целевого соединения с одновременным падением его выхода. Из рис. 1 и 2 следует, что варьирование природы палладиевого катализатора, температуры и соотношения компонентов твердой фазы дает широкие возможности синтеза меченого тритием азидотимидина. Для достижения более высоких величин *A*_{мол.} предпочтительнее вести реакции с участием катализаторов на основе сульфата бария. Максимальный выход по радиоактивности с участием этого катализатора достигается при соотношении катализатор — соединение 10 мг/мкмоль.

В реакции ТКГ азидотимидинфосфоната, как и в случае азидотимидина,

Твердофазный синтез меченных тритием терминаторов ДНК

$^{[3]H}$ Терминатор	Условия синтеза		Целевое соединение	
	Катализатор	$t, ^\circ C$	$A_{\text{мол}}$, Ки/ммоль	Выход, %
Азидотимидин	Pd/BaSO ₄	120	30,0	3,2
Азидотимидинфосфонат		160	6,3	69,8
Ацикловир	Pd/CaCO ₃	240	124	8,1
Ацикловирфосфонат		180	56,5	27,6
3'-Дезокситимидин		120	66,2	52

Таблица 6

Распределение трития в молекуле меченого ацикловира (по данным 3H -ЯМР)

δ , м. д.	Положение	Относительное содержание трития, %	Число атомов на молекулу
3,48	2', 3'	74,04	3,15
3,46			
5,34	1'	11,46	0,39
7,82	8	14,47	0,62

наибольший выход целевого соединения наблюдался при использовании катализатора на основе сульфата бария (табл. 1).

Изучение влияния различных катализаторов и температуры на выход и $A_{\text{мол}}$ $^{[3]H}$ ацикловира, получаемого в реакции ТКГ (табл. 2), показало, что природа носителя палладиевого катализатора не оказывает существенного влияния на $A_{\text{мол}}$ и особенно на выход целевого меченого соединения, но, как и в предыдущих экспериментах, с увеличением $A_{\text{мол}}$ снижается выход целевого соединения. Резкое уменьшение выхода при 240 $^\circ C$ сопровождается существенным увеличением включения трития в ацикловир.

Аналогичные исследования были проведены с ацикловирфосфонатом. В табл. 3 представлены данные по влиянию температуры на выход и $A_{\text{мол}}$ продукта, получаемого в реакции ТКГ тритием. В этом случае с ростом температуры включения трития увеличивается незначительно, а выход существенно падает.

Влияние условий реакции на твердофазное каталитическое гидрирование 3'-дезоксидеокси-2', 3'-дегидротимидина до $^{[3]H}$ -3'-дезокситимидина представлено в табл. 4. Для сравнения в последней строке этой таблицы приведены данные реакции жидкофазного гидрирования 3'-дезоксидеокси-2', 3'-дегидротимидина. Видно, что, как правило, увеличение включения трития в целевое соединение сопровождается увеличением его деградации. Проведение реакции гидрогенолиза 3'-дезоксидеокси-2', 3'-дегидротимидина в растворе предпочтительнее, так как при удовлетворительной величине $A_{\text{мол}}$ выход целевого соединения намного выше.

Были получены меченые препараты с участием высокопроцентного трития (табл. 5). При этом выяснилось, что включение трития в исследуемое соединение было довольно высоким и, следовательно, реакция ТКГ тритием открывает широкие возможности для введения тритиевой метки в терминаторы синтеза ДНК. Важно также, что этот метод не требует синтеза специальных предшественников и осуществляется практически по единой методике.

Из данных по изучению распределения трития в молекуле меченого ацикловира, полученных методом тритиевого ЯМР (табл. 6), видно, что более 70% трития включается в концевую метиленовую группу нуклеозидной части молекулы.

ВЭЖХ терминаторов синтеза ДНК

Соединение	Колонка	[CH ₃ CN], % *	Время удерживания, мин
Ацикловир	Seraport SGX C18,	2	7,38
Ацикловир—фосфонат	5 мкм, 3,3 × 150 мм		8,87
Азидотимидин	Seraport SGX C18, 5 мкм, 3,3 × × 150 мм	10	16,12
Азидотимидин—фосфонат	Nucleosil 120-5, C18, 4,6 × × 250 мм	10	8,01
3'-Дезокситимидин	Seraport SGX C18, 5 мкм, 3,3 × × 150 мм	7	9,89

* Приведена концентрация ацетонитрила в элюенте (0,1 М ТЕАВ, pH 7); скорость элюции 0,5 мл/мин.

Экспериментальная часть

Использованы катализаторы 5% Pd/BaSO₄, 5% Pd/CaCO₃ (Fluka), 5% PdO/Al₂O₃ (ГИПХ). Ацикловир и ацикловирфосфонат были предоставлены Институтом вирусологии (лаборатория проф. Г. А. Галегова), остальные препараты — Институтом молекулярной биологии (лаборатория проф. А. А. Краевского). Спектры ЯМР зарегистрированы на спектрометре ЯМР AC250 (Bruker). Радиоактивность определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика с эффективностью регистрации трития около 18% с использованием сцинтиллятора ЖС-8. Целевые меченые соединения выделяли с помощью ВЭЖХ на сорбентах с обращенной фазой (табл. 7).

Реакции ТКГ (типовая методика). В реакционную ампулу из стекла помещали твердую смесь исходного соединения и катализатора. Ампулу присоединяли к установке для работ с газообразным тритием, вакуумировали до давления менее 10⁻³ мм рт. ст. и вводили в ампулу газообразный тритий (95—97%) или тритий-противевую смесь (1 : 1000). Ампулу термостатировали при выбранной температуре, затем охлаждали и удаляли из ампулы избыток трития. Продукты реакции смывали водой, катализатор отделяли фильтрованием. Лабильный тритий удаляли упариванием фильтрата досуха при 37° С. Сухой остаток растворяли в воде и выделяли целевой продукт.

Меченые соединения после хроматографической очистки хранили с радиоактивной концентрацией 1 мКи/мл в 50% этаноле при —20° С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куханова М. К., Краевский А. А. //Итоги науки и техники. Серия «Иммунология». М.: ВИНТИ, 1992. Т. 29. Ч. 1. С. 163—173.
2. Hill J. A., Freeman G. A. //J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1987. V. XXV. № 3. P. 277—280.
3. Aggarwal S. K., Shalinsky D. R., Agrawal K. C. //J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1987. V. XXV. № 10. P. 1055—1060.

4. Taylor G. F., Kepler J. A.//J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1989. V. XXVII. № 6. P. 683—690.
5. Myasoedov N. F., Sidorov G. V., Lushkina O. V.//4th Intern. Symp. Synth. Appl. Isotopes and Isotopically Labell. Comp., Toronto, Collection of abstr. 1991. P. 127.

Поступила в редакцию
17.VII.1992

После доработки
27.V.1993

G. V. Sidorov, N. F. Myasoedov

**SOLID-STATE SYNTHESIS OF TRITIUM LABELLED
TERMINATORS OF THE DNA SYNTHESIS**

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

The influence of various catalysts, temperature and ratio of the solid-state components on the yield and molar activity of 3'-azido-3'-deoxythymidine, azidothymidine phosphonate, acyclovir, acyclovir phosphonate and 3'-deoxythymidine in solid-state catalytic hydrogenation reactions was studied. Specific activity of the compounds obtained was 30—124 Ci/mmol (1.10—4.59 PBq/mol).