

✓ CS 8312 006

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

192239

(11) B1

(b1)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 27 05 77
(21) PV 3517-77

(51) Int. Cl.² C 07 H 19/10

(40) Zveřejněno 30 11 78
(45) Vydáno 25 09 81

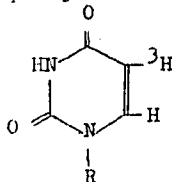
(73)
Autor vynálezu

PILIP JIŘÍ, PRAHA a
BOHÁČEK LUBOŠ, LIPČICE NAD VLTAVOU

(54) Způsob přípravy nukleotidů [5-³H]uracilu o vysoké molové aktivitě

1

Předmětem vynálezu je způsob přípravy nukleotidů [5-³H]uracilu obecného vzorce I,



(I)

kde R je β -D-ribofuranosyl-5'-monofosfát nebo β -D-ribofuranosyl-5'-trifosfát o vysoké molové aktivitě katalytickou redukcí dehalogenací plynným tritiem bez nosiče.

Dosud známé metody přípravy [5-³H]uridin-5'-monofosfátu a [5-³H]uridin-5'-trifosfátu používají katalytické dehalogenace 5-joduracilu pro přípravu [5-³H]uracilu /FILIP J., VYŠATA F., FARKAŠ J.: Čs. patent č. 137984; EVANS E. A.: Tritium and its Compounds, Butterworths, London 1974/, který je pak pomocí enzymového preparátu z *Brevibacterium ammoniagenes* CCEB 364 převeden na [5-³H]uridin-5'-monofosfát /FILIP J., BOHÁČEK L.: Radioizotopy 12, 343 /1971//. [5-³H]Uridin-5'-monofosfát je v dalším stupni částečně purifikovaným enzymovým preparátem z *Escherichia coli* B převeden na [5-³H]uridin-5'-trifosfát /CANELLAKIS E. S., GOTTESMAN M. E., KAMMEN H. O.: Biochim. Biophys. Acta 39, 82 /1968//. Ve srovnání s obvyklými postupy chemické syntézy je použití enzymové syntézy pro přípravu organických sloučenin radioizotopy obecně výhodné, neboť chemické syntézy jsou v mikroměřítku obtížně proveditelné a poskytují nižší výtěžky /FILIP J., BOHÁČEK L., VESELÝ J., ČIHÁK A.: J. Labelled Compounds 10, 489 /1974//. Při přípravě nukleotidů uracilu značených tritiem o vy-

soké molové aktivitě však představují nutnost dalších reakčních stupňů. Separace z reakčních směsí je spojena se ztrátou radioaktivních meziproduktů a produktů.

Byly proto hledány možnosti nové efektivní přípravy $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-monofosfátu a $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-trifosfátu. Při přípravě pyrimidinových bází a nukleotidů značených tritiem byla použita již dříve katalytická redukční dehalogenace. V neaktivních pokusech a pokusech s nízkými aktivitami $[^3\text{H}]$ -vodíku byla studována katalytická redukční dehalogenace 5-bromuridin-5'-monofosfátu a 5'-bromuridin-5'-trifosfátu. Nalezené reakční podmínky umožňují přípravu $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-monofosfátu a $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-trifosfátu o vysoké molové aktivitě. Pro dosažení vysoké molové aktivity (> 370 GBq/mmol) je nezbytné, aby redukční dehalogenace probíhala rychle a izotopová výměna vodíku s prostředím byla omezena. Vzhledem k nízké chemické stabilitě je dále nutno použít reakční prostředí, ve kterém neprobíhá degradace uridin-5'-trifosfátu na odpovídající di-, resp. monofosfát. Oba požadavky splňuje 0,1 N vodný hydroxid draselný. V tomto prostředí za katalýzy 5 % palladia na síranu barnatém byl redukční dehalogenací plyným tritiem bez nosiče připraven $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-monofosfát a $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-trifosfát o molové aktivitě nad 370 GBq.

Radioaktivní nukleotidy uracilu jsou používány pro řešení rostoucího počtu problémů základního biochemického a biologického výzkumu. Charakterizují primární strukturu ribonukleové kyseliny, jejíž jsou specifickou komponentou. Studium problémů na molekulární úrovni je umožněno použitím nukleotidů $[5-^3\text{H}]$ uracilu o vysoké molové aktivitě.

Přínosem vynálezu je nalezení takového postupu, který umožňuje efektivně připravit v mikroměřítku $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-monofosfát a $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-trifosfát v jediném reakčním stupni s vyšším chemickým a radiochemickým výtěžkem. Po odstranění tritia z labilních vazeb se z reakčních směsí produkty izolují s výhodou preparativní papírovou chromatografií.

Vyšší účinek podle vynálezu ve srovnání se známými postupy přípravy nukleotidů $[5-^3\text{H}]$ uracilu je dosažen nalezením postupu umožňujícího zavedení tritia do molekuly odpovídajícího bromovaného nukleotidu katalytickou redukční dehalogenací. Celkový radiochemický výtěžek ve srovnání s enzymovými postupy se významně zvýší. Vyšší účinek je dosažen i zvýšením produktivity práce.

Využití postupu podle vynálezu umožňuje připravit $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-monofosfát a $[5-^3\text{H}]$ uridin-5'-trifosfát o molové aktivitě 370 - 740 GBq/mmol a radiochemické čistotě lepší než 95 %.

Příklad 1:

Do reakční baňky objemu 1,2 ml se umístí 60 mg 5-bromuridin-5'-monofosfátu (0,149 mmol), 70 mg 5 % palladia na síranu barnatém a 0,6 ml 1 N hydroxidu draselného. Reakční baňka se připojí k tritiační aparatuře /FILIP J., ŠTĀSTNÝ J., VEŘMIŘOVSKÝ J.: Jáderná energie 13, 432 /1967// a po odplynění reakční směsí se ze zásobníku převede 185 GBq tritia bez nosiče. Reakční směs se míchá elektromagneticky při teplotě místnosti. Reakce se přerušuje po 120 minutách a nezreagované tritium se převede do zásobníku. Z reakční směsí se odstraní rozpouštědlo odpařením za vakua v uzavřeném systému. Odparek se rozpustí v 1 až 2 ml vody a voda se odstraní mrazovou sublimací. Tento postup se opakuje celkem třikrát. $[5-^3\text{H}]$ Uridin-5'-monofosfát se izoluje preparativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol-kyselina octová-voda (5 : 2 : 3).

Výtěžek: 15,4 mg [5-³H] uridin-5'-monofosfátu (tj. 53,6 %) o celkové aktivitě 27,54 GBq (tj. 14,6 % na použité tritium).

Molová aktivita [5-³H] uridin-5'-monofosfátu je: 166,1 GBq/mmol a radiochemická čistota je lepší než 95 %.

Příklad 2:

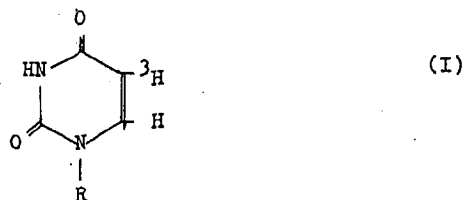
Do reakční banky objemu 1,1 ml se umístí 25 mg lithné soli 5-bromuridin-5'-trifosfátu, 50 mg 5 % palladia na síranu barnatém a 0,5 ml 0,1 N hydroxidu draselného. Banka se připojí k tritlační aparatuře a po odplynění reakční směsi se do banky převede 185 GBq tritia. Reakce se přeruší po 180 minutách a nezreagované tritium se převede do zásobníku tritia. Zpracování reakční směsi se provede stejným postupem jako v příkladě 1. [5-³H] Uridin-5'-trifosfát se z reakční směsi izoluje papírovou chromatografií v soustavě kyselina isomáselná - 25 % vodný hydroxid amonný - voda (66 : 1,5 : 33).

Výtěžek: 15,8 mg [5-³H] uridin-5'-trifosfátu (tj. 76,5 %) o celkové aktivitě 23,89 GBq (tj. 12,7 % na použité tritium).

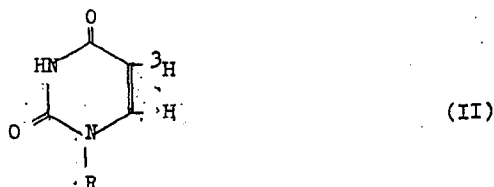
Molová aktivita [5-³H] uridin-5'-trifosfátu je 725 GBq/mmol a radiochemická čistota je lepší než 95 %.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy nukleotidů [5-³H] uracilu obecného vzorce I,



kde R je β -D-ribofuranosyl-5-monofosfát nebo β -D-ribofuranosyl-5-trifosfát o vysoké molové aktivitě vyznačený tím, že se na výchozí bromderivát nukleotidů uracilu obecného vzorce II,



kde R je β -D-ribofuranosyl-5-monofosfát nebo β -D-ribofuranosyl-5-trifosfát rozpuštěný v 0,1 N až 1,0 N vodném hydroxidu draselném, působí plyným tritiem bez nosiče, za přítomnosti palladia na nosiči, s výhodou palladia na síranu barnatém při teplotě místnosti.