



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239730

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 23 02 84  
(21) PV 1263-84

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

G 21 G 5/00  
C 07 D 239/47

(40) Zveřejněno 13 06 85

(45) Vydáno 15 04 87

(75)

Autor vynálezu

FILIP JIŘÍ ing. CSc.; HRADEC HYNEK ing., PRAHA

(54) Způsob přípravy cytosinu a jeho derivátů značených uhlíkem<sup>14</sup>C

Způsob přípravy cytosinu a jeho derivátů značených <sup>14</sup>C z výchozího uracilu a jeho derivátů značených <sup>14</sup>C, jehož podstata spočívá v tom, že se uracil a jeho deriváty značené <sup>14</sup>C převedou působením sírníku fosforečného v roztoku dioxanu, (obsahujícím 0,1 - 0,3 % vody) při teplotě 370 - 373 K na odpovídající <sup>14</sup>C značený thiouracil a jeho deriváty, na které se působí dále bez izolace hydroxidem amonným ve směsi s dioxanem při teplotě 370 - 373 K.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy cytosinu a jeho derivátů značených uhlíkem  $^{14}\text{C}$ .

Dosud známé metody přípravy cytosinu a jeho derivátů spočívají jednak v přímé syntéze, jednak v konverzi 2-thiouracilu na 2,4-dithiouracil a následující selektivní aminaci a desulfuraci (ZORBACH W. W., TIPSON R. S., eds.: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, Vol. 1., Wiley & Sons, N. Y. 1968).

[1,3- $^{15}\text{N}$ ] Cytosin byl připraven kondensací diethylacetalu kyanacetaldehydu s [1,3- $^{15}\text{N}$ ] močovinou (BENDICH A., Getler H., BROWN G. B.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 565 (1949)). Tento postup pro syntézu cytosinu a jeho derivátů značených  $^{14}\text{C}$  v různých polohách je málo vhodný.

Příprava [U- $^{14}\text{C}$ ] cytosinu biosyntetickými metodami je ekonomicky nevýhodná pro nízké chemické a radiochemické výtěžky (NEJEDLÝ Z., FILIP J.: *Radioisotopy* **6**, 142) (1965).

Podstatně příznivější situace je při přípravě uracilu a jeho derivátů značených isotopem  $^{14}\text{C}$ . Jsou známy metody umožňující zavedení radioisotopu do různých poloh molekuly. (FILIP J.: *Radioisotopy* **12**, 225 (1978)). Kromě velmi dobrých radiochemických a chemických výtěžků jsou popsány i postupy pro syntézu [U- $^{14}\text{C}$ ] uracilu a [U- $^{14}\text{C}$ ] thyminu.

Řešení problémů základního i aplikovaného výzkumu na molekulární úrovni vyžaduje cytosin a jeho deriváty značené v různých polohách radioisotopem  $^{14}\text{C}$ , přičemž se často klade důraz na vysoké molové aktivity.

Tyto sloučeniny jsou dosud obtížně dostupné nebo nedostupné vůbec. Tuto nevýhodu odstraňuje předmětný vynález způsobu přípravy cytosinu a jeho derivátů značených  $^{14}\text{C}$  spočívající v tom, že se uracil (resp. jeho deriváty) značený  $^{14}\text{C}$  převede v dioxanu (s obsahem 0,1 - 0,3 % hmot. vody) působením sirníku fosforečného na odpovídající 4-thiouracil značený  $^{14}\text{C}$ , který pak bez izolace v roztoku dioxanu a vodného hydroxidu amonného při zvýšení teplotě poskytně požadovaný cytosin (resp. jeho deriváty) značený radioisotopem  $^{14}\text{C}$ .

Přínosem vynálezu je nalezení takového postupu, který umožňuje z dostupných sloučenin uracilu a jeho derivátů značených  $^{14}\text{C}$  připravit odpovídajícím způsobem  $^{14}\text{C}$  značený cytosin (resp. jeho deriváty).

Tyto sloučeniny byly připraveny dříve s podstatně nižším radiochemickým výtěžkem nebo dosud jejich příprava nebyla popsána vůbec.

Nalezení optimálních podmínek a provedení celé reakce bez izolace meziproductů umožňuje zpracovat s malými ztrátami i v mikroměřítku. Produkt reakční směsi je izolován preparativní papírovou chromatografií nebo metodou HPLC. Radiochemická čistota je vyšší než 98 %, což je důležité pro další aplikace.

Využití postupu podle vynálezu umožňuje připravit [2- $^{14}\text{C}$ ] cytosin, [2,4,5- $^{14}\text{C}$ ] cytosin, [U- $^{14}\text{C}$ ] cytosin, [U- $^{14}\text{C}$ ] 5-methyl-cytosin a další deriváty o vysokých molových aktivitách (nad 1,85 GBq na miliatom  $^{14}\text{C}$ ) s vysokým chemickým a radiochemickým výtěžkem.

Radiochemická čistota získaného cytosinu i jeho derivátů značených radioisotopem  $^{14}\text{C}$  je vhodná pro enzymovou syntézu dalších biologicky aktivních látek (např. 2'-deoxycytidinu) odpovídajícím způsobem značených  $^{14}\text{C}$ .

#### P ř í k l a d 1

185 MBq [2- $^{14}\text{C}$ ] Uracilu (0,09 mmol) se odpaří v reakční baňce a přidá se 5,0 ml dioxanu (s obsahem 0,1 - 0,3 % vody) a 33 mg sirníku fosforečného. Během jedné hodiny varu pod zpětným chladičem reakční směs obsahuje 90 - 95 % 2- $^{14}\text{C}$  4-thiouracilu. Reakční směs se pře-

pipetuje do ampule, přidá se 5 ml 35% vodného hydroxidu amonného. Ampule se zataví a umístí do ochranného kontajneru, který se zahřívá 20 hodin na 263 - 373 K. Z reakční směsi se preparativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5) izoluje 2-<sup>14</sup>C cytosin. Radiochemická čistota produktu je nad 98 % radiochemický výtěžek 60 - 80 %.

#### Příklad 2

185 MBq [U-<sup>14</sup>C] Uracilu (0,023 mmol) se odpaří v reakční baňce, přidá se 1 ml dioxanu (s obsahem 0,1 - 0,3 % vody) a 6 mg sirníku fosforečného a vaří se pod zpětným chladičem.

Během 45 minut reakční směs zežlutne (kontrolní chromatogram TLC Silufol, soustava: 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5)). Reakční směs obsahuje více než 90 % [U-<sup>14</sup>C]4-thioracilu a přepipetuje se kvantitativně do ampule.

Po přidání 1 ml 25% vodného hydroxidu amonného se ampule zataví a umístí do ochranného kontajneru. Zahřívá se 23 hodin při 368 K. Preparativní chromatografií na papíře Whatmann č. 3 v soustavě 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5) se izoluje malé množství (9 - 18 MBq nezreagovaného [U-<sup>14</sup>C] uracilu (5 - 10 %) a 101 - 138 MBq [U-<sup>14</sup>C] cytosinu. Radiochemická čistota [U-<sup>14</sup>C]cytosinu je vyšší než 98 %, molová aktivita je 8,0 GBq.mmol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 3

Příprava 5-[<sup>14</sup>C]methylcytosinu

74 MBq [methyl-<sup>14</sup>C]Thyminu (0,038 mmol) se odpaří v reakční baňce a přidá se 1,6 ml dioxanu (s obsahem vody 0,1 - 0,3 %) a 10 mg sirníku fosforečného. Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 60 - 80 minut.

Kontrolní chromatogram (Silufol; 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5)) po ukončení reakce ukazuje jen malé množství (5 - 10 %) nezreagovaného výchozího [methyl-<sup>14</sup>C]thyminu.

Reakční směs se ochladí a převede do ampule. Přidá se 1,7 ml koncentrovaného vodného hydroxidu amonného a ampule se zataví. V ochranném kontajneru se zahřívá 24 hodin při 368 - 373 K. 5-[<sup>14</sup>C]Methylcytosin se izoluje preparativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5). Získá se 37 - 44 MBq 5-[<sup>14</sup>C]methylcytosinu (tj. 50 - 70 % vztaženo na výchozí [methyl-<sup>14</sup>C]thyminu. Radiochemická čistota je lepší než 98 %.

### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy cytosinu a jeho derivátů značených uhlíkem <sup>14</sup>C z výchozího uracilu a jeho derivátů značených uhlíkem <sup>14</sup>C, vyznačující se tím, že se uracil a jeho deriváty značené uhlíkem <sup>14</sup>C převedou působením sirníku fosforečného v dioxanovém roztoku obsahujícím 0,1 až 0,3 % hmot. vody při teplotě 370 až 373 K na odpovídající uhlíkem <sup>14</sup>C značený 4-thiouracil a jeho deriváty, na které se působí dále bez izolace hydroxidem amonným ve směsi s dioxanem při teplotě 370 až 373 K.