



УДК 577.113.3+546.11*3

© 1993 Г. В. Сидоров, Н. Ф. Мясоедов

СИНТЕЗ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ТЕРМИНАТОРОВ СИНТЕЗА ДНК

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Каталитическим восстановлением газообразным тритием соответствующих предшественников синтезированы [2', 3'-³H₂]-3'-дезокситимидин, [2', 3'-³H₂]-2', 3'-дидезоксицитидинфосфонат, [2', 3', 8-³H₃]-2', 3'-дидезоксиаденозин. [2', 3'-³H₂]-2', 3'-Дидезоксиаденозин получен из [2', 3', 8-³H₃]-2', 3'-дидезоксиаденозина реакцией реобмена трития из положения 8 аденина. [8-³H]-3'-Дезоксиаденозин получен реакцией каталитического гетерогенного изотопного обмена с газообразным тритием. [2'-³H] Тимидинфосфонат и тимидин ([³H]метил)фосфонат получены реакциями каталитического дегалоидирования соответствующих галоидозамещенных предшественников.

Терминаторами синтеза ДНК часто оказываются аналоги нуклеозидов с измененным гликозидным фрагментом. Они являются потенциальными ингибиторами ретровирусов, в том числе вируса иммунодефицита человека [1, 2], и для изучения механизма и метаболизма действия таких терминаторов необходимы их меченые аналоги, в частности несущие тритиевую метку.

Получение тритиевых аналогов возможно с помощью обычных методов синтеза ³H-компонентов нуклеиновых кислот, т. е. реакциями каталитического восстановления и изотопного обмена в растворе с участием газообразного трития [3—5]. Эти реакции уже применялись для синтеза некоторых [³H]-2', 3'-дидезоксинуклеозидов [6].

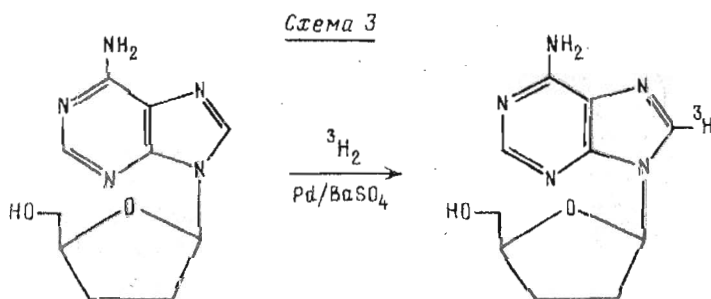
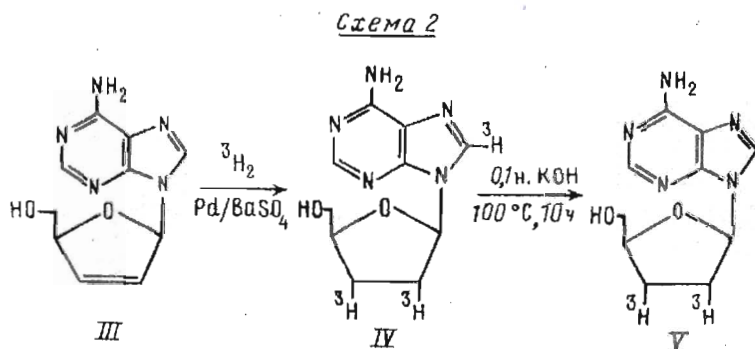
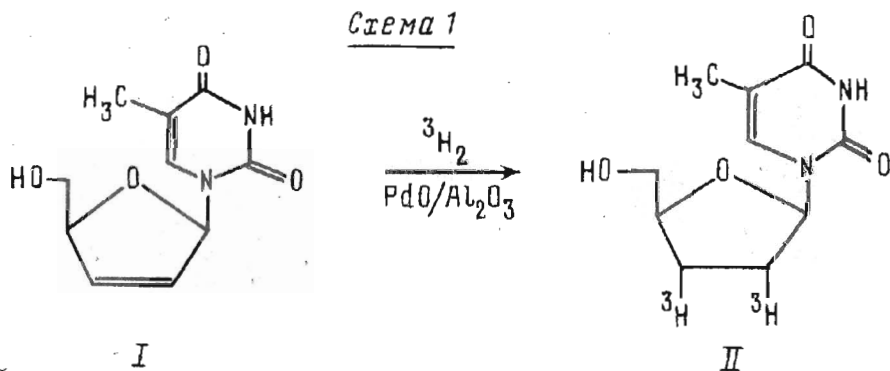
Цель настоящей работы состояла в синтезе меченных тритием терминаторов синтеза ДНК с использованием реакции каталитического восстановления тритием.

Для получения препаратов с меткой в сахарной части молекулы использовали предшественники с ненасыщенной 2', 3'-связью (схемы 1, 2 и 4) или соответствующие галоидозамещенные соединения (схема 5).

Так, восстановление 3'-дезокси-2', 3'-дегидротимидина (I) над оксидом палладия гладко приводило к [2', 3'-³H₂]-3'-дезокситимидину (II) (схема 1).

При проведении реакции каталитического восстановления 2', 3'-дидезокси-2', 3'-дегидроаденозина (III) (схема 2) присоединение трития по 2', 3'-двойной связи сопровождалось изотопным обменом 8-Н на тритий. Это следовало как из аномально высокой молярной активности полученного соединения (IV) (73,2 Ки/ммоль), отвечающей включению около трех атомов трития в молекулу, так и из его спектра ³H-ЯМР, в котором был обнаружен сигнал при 8,25 м. д., отвечающий тритию в положении 8 аденина. После «вымывания» метки из положения 8 был получен препарат (V), содержащий тритий только в дидезоксирибозильном остатке.

Реакцию каталитического гетерогенного изотопного обмена использовали для



введения трития в пуриновый остаток 2', 3'-дидезоксиаденозина (схема 3), при этом в остаток сахара метка практически не включалась.

Все полученные соединения подвергали кислотному гидролизу. Из продуктов гидролиза выделяли гетероциклические основания для определения специфичности включения трития в целевые соединения. Эти эксперименты показали, что в соединениях (II), (V) и (XI) в рибозной части молекулы локализовано 97—98% трития, а в соединении (VII) — около 93%. В последнем случае дополнительно протекает, по-видимому, реакция изотопного обмена 6-Н цитозина на тритий [7].

Таким образом, проведенные эксперименты указывают на то, что как минимум 96% трития содержится в положениях, указанных на схемах 1—3, 5 и 6. Для соединения (VII) (схема 4) эта величина составляет более 90%.

Экспериментальная часть

Спектры УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-16. Спектры ЯМР регистрировали в D₂O на АС250 ЯМР-спектрометре (Bruker). Радиоактивность определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного

Схема 4

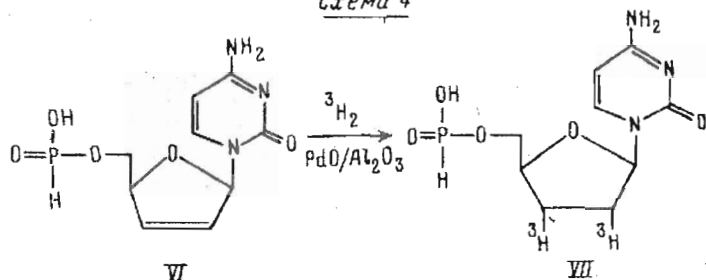


Схема 5

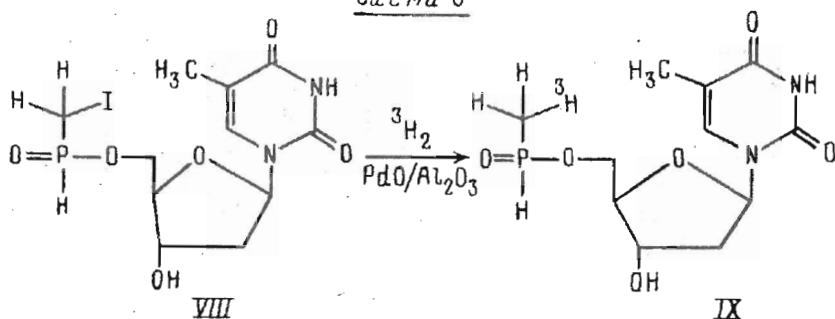
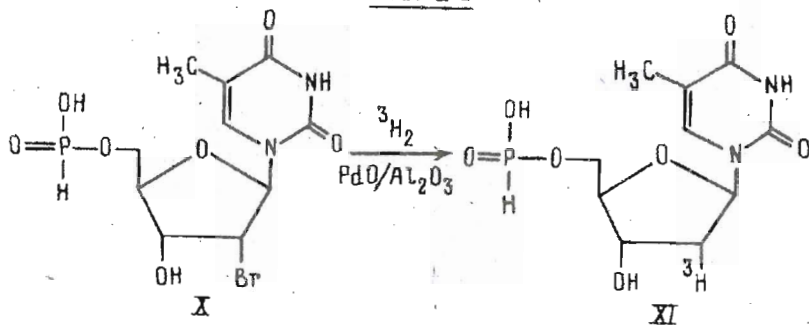


Схема 6



счетчика с эффективностью регистрации трития около 18% при использовании сцинтиллятора ЖС-8. Применяли катализаторы — 5% Pd/BaSO₄ (Fluka) и 5% PdO/Al₂O₃ (ГИПХ). Предшественники для получения меченных тритием терминаторов синтеза ДНК были предоставлены Институтом молекулярной биологии РАН (лаборатория проф. А. А. Краевского).

Реакции восстановления и изотопного обмена (типовая методика). В реакционную ампулу из стекла объемом 5 см³ помещали раствор предшественника, навеску катализатора и магнитную мешалку. Ампулу присоединяли к установке для работ с газообразным тритием, вакуумировали и вводили газообразный тритий (P 300 мм рт. ст). Реакцию проводили при комнатной температуре и перемешивании реакционной смеси на магнитной мешалке. По окончании реакции избыток трития из ампулы удаляли, катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат нейтрализовали 1 н. HCl до pH 7 и лабильный тритий удаляли упариванием при 35—37° С в вакууме водоструйного насоса. Сухой остаток растворяли и выделяли целевое соединение.

Предварительную очистку меченых препаратов осуществляли хроматографией на колонке с сефадексом G-10 (16 × 900 мм), элюент — вода. Скорость

Соединение	Колонка	Элюент	Время удерживания, мин
(I)	Separon SGX C18, 7 мкм, 3,3 × 150 мм	7% ацетонитрила в 0,1 М	8,13
(II)		TEAB, pH 7, 0,5 мл/мин	9,89
(III)	Nucleosil 120-5, C18, 4,6 × 250 мм	5% ацетонитрила в 0,1 М	12,0
(IV), (V)		TEAB, pH 7, 1,0 мл/мин	18,5
(VI)	Separon SGX C18, 7 мкм, 3,3 × 150 мм	2% ацетонитрила в 0,1 М	12,1
(VII)		TEAB, pH 7,	10,9
(XI)		0,5 мл/мин	11,5

элюции 25 мл/ч. Окончательную очистку проводили методом ВЭЖХ на сорбентах с обращенной фазой (см. таблицу).

Кислотный гидролиз. Около 5 мКи тритированного соединения разбавляли 1 мг немеченого аналога. Гидролиз пиримидиновых соединений осуществляли 4 ч при 100° С в 1,0 мл 1 н. HCl, а гидролиз пуринов — 1 ч при 100° С в 1,0 мл 0,1 н. HCl. После гидролиза соляную кислоту удаляли упариванием в вакууме водоструйного насоса при 37° С, а гидролизат анализировали на сефадексе G-10, выделяли пики индивидуальных соединений и определяли их молярную активность.

[2', 3'-³H₂]-3'-Дезокситимидин (II) получали из 2,3 мг (10 мкмоль) предшественника (I) в 0,2 мл 0,4 н. КОН с 50 мг 5% PdO/Al₂O₃. Время реакции 120 мин. После хроматографии на сефадексе G-10 и ВЭЖХ получено 236 мКи (46%) 3'-дезокситимидина с молярной активностью 51,3 Ки/ммоль. Содержание трития в пиримидине около 2,0%.

[2', 3', 8-³H₃]-2', 3'-Дидезоксиаденозин (IV) получали из 4,7 мг (20 мкмоль) предшественника (III) в 0,3 мл 0,1 н. КОН с 100 мг 5% Pd/BaSO₄. Время реакции 3 ч. Молярная активность полученного соединения после проведения хроматографической очистки на сефадексе G-10 и ВЭЖХ составила 73,2 Ки/ммоль. Выход 79,8%.

[2', 3'-³H₂]-2', 3'-Дидезоксиаденозин (V). 100 мКи (1,35 мкмоль) соединения (IV) растворяли в 1 мл 0,1 н. КОН, помещали в герметичную ампулу и термостатировали при 100° С. Через 10 ч ампулу вынимали, охлаждали, нейтрализовали 0,1 н. HCl и целевое соединение выделяли на сефадексе G-10. Молярная активность полученного соединения составила 52,4 Ки/ммоль (выход 80,3%). Было установлено, что в адениновом остатке содержится около 3% трития.

[8-³H]-2', 3'-Дидезоксиаденозин получали из 2,35 мг (10 мкмоль) 2', 3'-дидезоксиаденозина в 0,2 мл 0,1 н. КОН и 60 мг 5% Pd/BaSO₄. Реакцию вели 3 ч. Целевое соединение выделяли на сефадексе G-10 (выход 18%). Полученный продукт с молярной активностью 23,2 Ки/ммоль хроматографически (ВЭЖХ) однороден и по времени удерживания (18,5 мин) идентичен заведомому образцу. Спектр ³H-ЯМР показал, что тритиевая метка локализована в положении 8.

[2', 3'-³H₂]-2', 3'-Дидезоксицитидинфосфонат (VII) получали из 4,6 мг (16,7 мкмоль) предшественника (VI) в 0,3 мл 0,4 н. КОН с 60 мг 5% PdO/Al₂O₃. Время реакции 2 ч. Молярная активность полученного соединения после очистки методом ВЭЖХ составила 59,1 Ки/ммоль. Выход 74,3%. Содержание трития в пиримидиновом остатке около 7,0%.

Тимидин([³H]метил)фосфонат (IX) получали из 5,0 мг (11 мкмоль) предшественника (VIII) в 0,3 мл 1 н. КОН с 50 мг 5% PdO/Al₂O₃. Время реакции 120 мин.

Молярная активность нуклеотида (IX) после очистки методом ВЭЖХ составила 17,2 Ки/ммоль. Выход 70,3%. Содержание трития в пиримидиновом остатке около 2,0%.

[2'-³H]Тимидинфосфонат (XI) получали из 3,85 мг (10 мкмоль) предшественника (X) в 0,2 мл 0,4 н. КОН с 25 мг 5% PdO/Al₂O₃. Время реакции 120 мин. Молярная активность полученного фосфоната (XI) после хроматографической очистки на сефадексе G-10 и ВЭЖХ составила 18,5 Ки/ммоль. Выход 71,5%. Содержание трития в тиминовом остатке менее 3,0%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краевский А. А., Библашвили Р. Ш. //Итоги науки и техники. Серия «Иммунология». М.: ВИНТИ, 1992. Т. 29. Ч. 1. С. 123—162.
2. Куханова М. К., Краевский А. А. //Итоги науки и техники. Серия «Иммунология». М.: ВИНТИ, 1992. Т. 29. Ч. 1. С. 163—173.
3. Мясоедов Н. Ф., Сидоров Г. В. //Радиохимия. 1980. Т. XXII. № 4. С. 574—578.
4. Мясоедов Н. Ф., Сидоров Г. В. //Радиохимия. 1980. Т. XXII. № 4. С. 579—584.
5. Evans E. A., Sheppard H. C., Turner J. C., Warrell D. C. //J. Labelled Compounds. 1974. V. X. № 4. P. 569—587.
6. Taylor G. F., Kepler J. A. //J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1989. V. XXVII. № 6. P. 683—690.
7. Kiritani R., Asano T., Fujita S., Dohmaru T., Kawanishi T. //J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1985. V. XXIII. № 2. P. 207—214.

Поступила в редакцию
17.VI.1992

После доработки
27.V.1993

G. V. Sidorov, N. F. Myasoedov

SYNTHESIS OF TRITIUM LABELLED TERMINATORS OF THE DNA SYNTHESIS

*Institute of Molecular Genetics,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

[2', 3'-³H₂]-2', 3'-Dideoxythymidine, [2', 3', 8-³H₃]-2', 3'-dideoxyadenosine, [8-³H]-2', 3'-dideoxyadenosine and [2', 3'-³H₂]-2', 3'-dideoxycytidine phosphonate were synthesized by hydrogenation of the corresponding precursors with gaseous tritium. [2', 3', 8-³H₃]-2', 3'-dideoxyadenosine was converted into [2', 3'-³H₂]-2', 3'-dideoxyadenosine by the tritium re-exchange at C-8 of adenine. [2'-³H]Thymidine phosphonate and thymidine [methyl-³H]methylphosphonate were obtained by catalytic dehalogenation of the corresponding halogen substituted precursors.