

# СИНТЕЗ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ НЕПРИРОДНЫХ АНАЛОГОВ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

© 2020 г. Г. В. Сидоров\*, Н. Ф. Мясоедов

*Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, д. 2*

*\*e-mail: sidgv@img.ras.ru*

Получена 24.12.2018; после доработки 13.03.2019; принята к публикации 14.03.2019

Разработаны удобные препаративные пути синтеза меченных тритием неприродных производных, содержащих цитозинового и гуанинового фрагменты. Главное отличие этих соединений от уже известных заключается в том, что они содержат хиральный центр. Для синтеза меченного тритием 2'-дезоксидезокси-3'-оксациитидина использовали реакцию каталитического дегалогенирования в растворе соответствующего 5-бромзамещенного соединения, для 6-аминоциклопропил-2'-дезоксидезокси-3'-оксагуанозина – реакцию каталитического гетерогенного изотопного обмена в растворе, для остальных соединений применяли реакцию твердофазной каталитической гидрогенизации (ТКГ).

**Ключевые слова:** тритий, изотопный обмен, пурины, пиримидины

**DOI:** 10.31857/S0033831120020094

## ВВЕДЕНИЕ

Неприродные аналоги пуринов и пиримидинов представляют интерес исследователей в качестве терминаторов синтеза ДНК. Для изучения механизма действия этих соединений на молекулярном уровне необходимы их аналоги, меченные радиоактивным изотопом, в частности меченные тритием. Для введения трития в подобные соединения применяют различные реакции изотопного обмена и химического синтеза. Препаратом, широко применяемым до настоящего времени для лечения больных СПИДом и инфицированных, является азидотимидин. Описан химический синтез меченного тритием азидотимидина исходя из [метил-<sup>3</sup>H]тимидина [1] и восстановление меченным тритием боргидридом натрия соответствующего 5'-альдегидного производного [2]. В работе [3] изучали новые пути синтеза меченного тритием 3'-азидо-3'-дезокситимидина с высокой молярной радиоактивностью и локализацией тритиевой метки в азотистом гетероциклическом основании. Для соединений другой структуры описано применение каталитических реакций восстановления и изотопного обмена в растворе [4, 5] с участием газообразного трития. Количество соединений, представляющих интерес в качестве терминаторов синтеза ДНК, так же как и их строение, весьма разнообразно. Это, в свою очередь,

требует применения разнообразных подходов к синтезу подобных соединений, меченных тритием. С нашей точки зрения универсальным подходом к решению задачи введения трития в эти и подобные соединения является реакция твердофазной каталитической гидрогенизации тритием. С помощью этого метода были получены меченные тритием азидотимидин (30 Ки/ммоль), азидотимидинфосфонат (6.3 Ки/ммоль), ацикло-вир (124 Ки/ммоль), ацикло-вирфосфонат (56.5 Ки/ммоль) [5] и 5'-О-фосфонилметилтимидин (71 Ки/ммоль) [6].

Задачей настоящей работы являлось разработка удобных препаративных путей синтеза меченных тритием неприродных производных, содержащих цитозинового (схема 1) и гуанинового (схема 2) фрагменты. Главное отличие соединений, структура которых приведена на схемах 1 и 2, от уже известных заключается в том, что они содержат хиральный центр у N<sup>1</sup> (схема 1) и N<sup>9</sup> (схема 2). Для синтеза меченных тритием соединений I–IV и VI (схемы 1 и 2) применяли реакцию твердофазной каталитической гидрогенизации (ТКГ). Ранее нами было показано, что побочными процессами в условиях реакции ТКГ помимо термической деструкции исходных соединений являются гидрирование 5,6-двойной связи пиримидинов [7] и изомеризация при 100°C 3',5'-АрАрА с образованием

Схема 1.

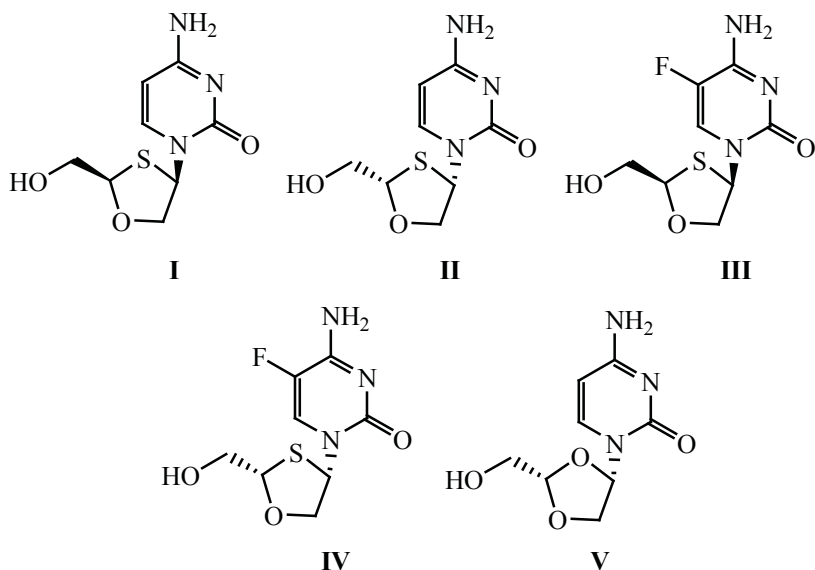
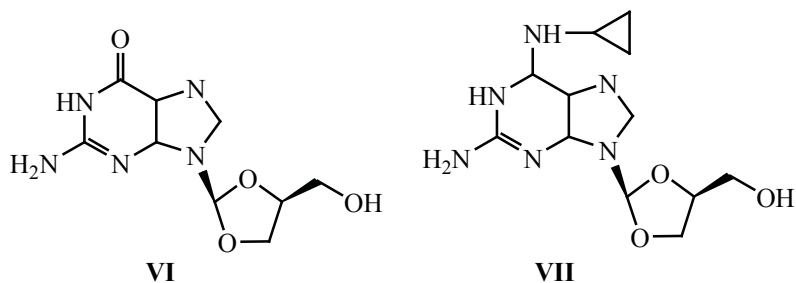


Схема 2.



2',5'-АрАрА [8]. Изомеризацию пентоз в реакции ТКГ наблюдали в работе [9]. При проведении реакций изотопного обмена с тритием (особенно в твердой фазе, протекающих в довольно жестких условиях) возможна рацемизация хирального центра исследуемых соединений. В литературе отсутствуют данные о рацемизации подобных соединений при проведении различных реакций изотопного обмена с тритием.

Для синтеза меченного тритием соединения **V** применяли реакцию каталитического дегалогенирования соответствующего 5-иодзамещенного соединения, а в случае **VII** – реакцию каталитического гетерогенного изотопного обмена с газообразным тритием в растворе.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

После проведения реакции ТКГ продукты смывали с катализатора водой, отделяли катализатор центрифугированием. После проведения реакции в растворе отделяли катализатор центрифугирова-

нием. Во всех случаях проводили очистку от лабильного трития двукратной отгонкой растворителя в вакууме при 37°C, сухой остаток растворяли в подвижной фазе и проводили очистку целевого соединения.

Все соединения были производства фирмы Biochem Pharma. Применяли катализаторы 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (Aldrich) и 5% PdO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (РНЦ ГИПХ). Использовали жидкостную колоночную хроматографию на Sephadex G-10. (20×900 мм), элюция водой 100 мл/ч, и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на колонке YMC ODS-A 5 мкм 20×500 мм. Насосы высокого давления Gilson 806, УФ детектор с переменной длиной волны Spectra-Physics 8480. Колонку уравнивали 250 мл подвижной фазы [20% ацетонитрила в 0.01%-ной трифторуксусной кислоте (ТФУ)]. Скорость элюции 2.0 мл/мин, давление 53 атм.

Хиральную чистоту препаратов определяли на колонке Cyclobond I RSP 4.6×250 мм. Для соедине-

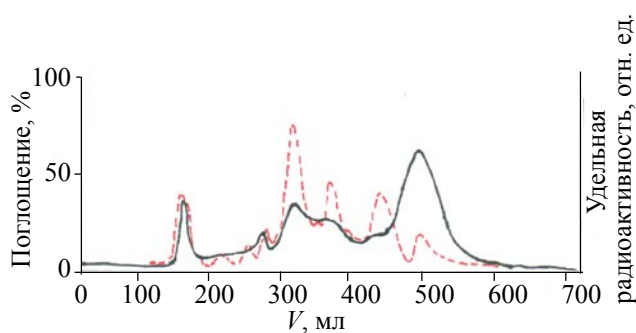


Рис. 1. Очистка меченного тритием соединения I на Sephadex G-10.

ний I–IV подвижная фаза – 0.05%-ный триэтиламмонийацетат (ТЭАА), pH 6.86, 0.25 мл/мин; для V – 1%-ный раствор ацетонитрила в 0.25%-ном ТЭАА, pH 5.86, 0.15 мл/мин; для VII – 0.02 моль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 5 моль/л тетра-*n*-бутиламмонийбромида (ТБАБ), pH 6,77, 0.15 мл/мин; для VI – элюент А: 0.01 моль/л  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH 6.0, элюент В – ацетонитрил, градиент 10% → 20% В/А за 20 мин, 1.0 мл/мин.

Оптическую плотность УФ поглощения измеряли на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экрос, Санкт-Петербург). Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Triathler (Финляндия), используя сцинтилляционную жидкость EcoLM TM (ICN).

Радиохимическую чистоту определяли методом тонкослойной радиохроматографии на ПЭИ-целлюлозе в воде и на пластинках Silufol в системе растворителей бутанол–уксусная кислота–вода (2 : 1 : 1).

**Синтез меченного тритием соединения I.** В реакцию ТКГ брали 35 мг катализатора 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>, на который наносили 10 мкмоль соединения I. Реакцию с газообразным тритием вели при 160°C 15 мин. После хроматографии на колонке Sephadex G-10 было получено 47.5 мКи (4.6 мкмоль) сырого продукта. После хроматографии на YMC ODS-A выделили 11.7 мКи соединения с молярной радиоактивностью 2.3 Ки/ммоль. Выход составил 50.9% по веществу и 6.72% по радиоактивности.

**Синтез меченного тритием соединения II.** В реакцию ТКГ брали 11.7 мг (50 мкмоль) соединения, нанесенного на 150 мг катализатора 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>. Реакцию изотопного обмена с газообразным тритием проводили при 150°C 15 мин. После хроматографии на Sephadex G-10 получили 125 мКи (27.6 мкмоль) сырого продукта. После

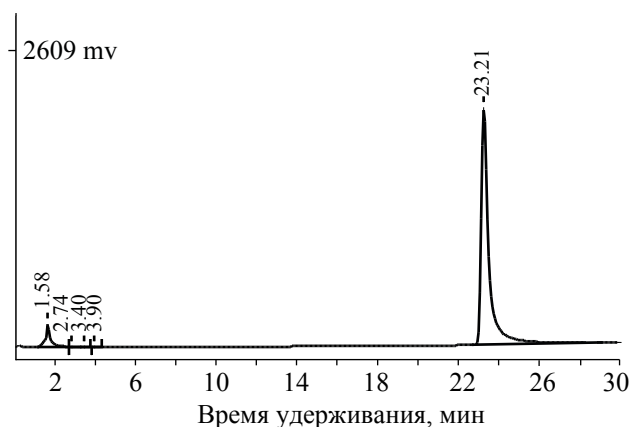


Рис. 2. Хиральная чистота [G-<sup>3</sup>H] I на Cyclobond I RPS 4.6×250 мм, температура 20°C; 0.05% ТЭАА, pH 6.86, 0.25 мл/мин, λ 254 нм.

хроматографии на YMC ODS-A было выделено 28.1 мКи соединения с молярной радиоактивностью 2.3 Ки/ммоль.

**Синтез меченного тритием соединения III.** В реакцию ТКГ брали 3.1 мг (12.5 мкмоль) соединения, нанесенного на 35.5 мг катализатора 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>. Реакцию изотопного обмена с газообразным тритием проводили при 160°C 20 мин. После очистки на Sephadex G-10 получили 52 мКи (4.2 мкмоль) сырого продукта. После очистки на колонке YMC ODS-A получили 12.2 мКи соединения (2.26 мкмоль, 5.4 Ки/ммоль).

**Синтез меченного тритием соединения IV.** В реакцию ТКГ брали 3.1 мг (12.5 мкмоль) соединения, нанесенного на 40 мг катализатора 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>. Реакцию изотопного обмена с газообразным тритием проводили при 150°C 15 мин. После очистки на Sephadex G-10 получили 33 мКи (6.8 мкмоль) сырого продукта. После очистки на колонке YMC ODS-A получили 11.8 мКи соединения (5.6 мкмоль, 2.1 Ки/ммоль).

**Синтез меченного тритием соединения V.** В реакционную ампулу из стекла объемом 5.0 мл помещали раствор 5-бромзамещенного соединения V в 1.0 мл метанольного раствора 0.1 моль/л NaOH и 25 мг катализатора 5% PdO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Реакцию вели в атмосфере газообразного трития (4.1 Ки) 16 ч. Меченное тритием соединение V выделяли на колонке с Sephadex G-10. Получили 26.3 мКи (1.14 мкмоль, 23 Ки/ммоль) меченого соединения.

**Синтез меченного тритием соединения VI.** В реакцию ТКГ брали 1.28 мг (5.0 мкмоль) соединения, нанесенного на 25 мг катализатора 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>. Реакцию с газообразным тритием проводили при 200°C 20 мин. После очистки на

**Таблица 1.** Влияние температуры на реакцию твердофазного каталитического гетерогенного изотопного обмена соединений **I** и **III** с тритий-противею (1 : 1000) смесью. Катализатор 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (Aldrich)

T, °C	A <sub>мол</sub> , Ки/моль		Выход, %	
	<b>I</b>	<b>III</b>	<b>I</b>	<b>III</b>
140	14	15	95	95
150	22	23	95	95
160	21	65	63	61

**Таблица 2.** Результаты анализа оптической чистоты меченных тритием препаратов

Соединение	Оптическая (хиральная) чистота, %					
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>
Исходное	95.3	92.8	98.0	98.0	99.0	98.0
Меченное тритием	95.2	92.8	97.8	97.7	99.8	97.5

Sephadex G-10 получили 82.5 мКи (4.12 мкмоль, 20.0 Ки/ммоль) продукта. Дальнейшую очистку не проводили, так как хиральная и ахиральная радиохимическая чистота препарата были более 99%.

**Синтез меченного тритием соединения VII.** В реакционную ампулу из стекла объемом 5.0 мл помещали раствор соединения **VII** (3.0 мг, 10 мкмоль) в 0.3 мл 1 моль/л NH<sub>4</sub>OH и 50 мг катализатора 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>. Реакцию изотопного обмена с газообразным тритием проводили при комнатной температуре 16 ч. После очистки на колонке YMC ODS-A получили 53 мКи соединения (6.65 мкмоль, 8.0 Ки/ммоль).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены данные по влиянию температуры на выход и молярную радиоактивность (A<sub>мол</sub>) соединений **I** и **III** в реакции ТКГ тритием. Полученные данные говорят о том, что реакцию ТКГ предпочтительнее проводить при 150–160°C. Наличие сильного электроноакцепторного атома фтора в молекуле **III** заметно изменяет распределение электронной плотности, что, в свою очередь, влияет на подвижность протонов в реакции ТКГ. Этот эффект особенно заметен при увеличении температуры со 150 до 160°C. Анализ реакционной смеси методом ВЭЖХ показал, что продукты реакции содержат большой набор соединений, близких по хроматографическим свойствам, что затрудняло получение достаточно чистого продукта при проведении очистки в одну стадию. Поэтому на первой стадии очистки применяли хроматографию на Sephadex G-10. В работе [10] было установлено, что хроматография «неиони-

зирующихся» соединений, таких как пуриновые и пиримидиновые основания, протекает на Sephadex G-10 по адсорбционному механизму при линейной изотерме сорбции.

Как следует из данных, представленных на рис. 1, хроматография на Sephadex G-10 позволяет сбросить до 80–90% примесей по радиоактивности. Это существенно облегчило очистку методом ВЭЖХ на второй стадии.

На рис. 2 приведены результаты анализа оптической чистоты меченного тритием соединения **I** (детекция при 254 нм). Время удерживания 23.21 мин соответствует целевому соединению. Время удерживания оптического изомера соединения **I** – 24.4 мин. В табл. 2 суммированы результаты анализа оптической чистоты всех полученных препаратов. Из полученных данных видно, что в ходе реакции ТКГ не происходит изменения конфигурации асимметрического центра. Все соединения имели высокую (более 97%) радиохимическую ахиральную чистоту, определенную методом тонкослойной радиохроматографии.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aggarwal S.K., Shalinsky D.R., Agrawal K.C. // J. Label. Compd. Radiopharm. 1988. Vol. 25, N 10. P. 1055.
2. Hill J.A., Freeman G.A. // J. Label. Compd. Radiopharm. 1988. Vol. 25, N 3. P. 277.
3. Sidorov G.V., Zverkov Yu.B., Myasoedov N.F. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2003. Vol. 46, N 7. P. 669.
4. Taylor G.F., Kepler J.A. // J. Label. Compd. Radiopharm. 1989. Vol. 27, N 6. P. 683.
5. Sidorov G.V., Myasoedov N.F., Yasko M.V. // J. Label. Compd. Radiopharm. 1994. Vol. 34, N 4. P. 339.
6. Ясько М.В., Сидоров Г.В., Кондратов Р.В., Прасолов В.С., Мясоедов Н.Ф., Краевский А.А. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24, № 1. С. 21.
7. Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22, № 4. С. 291.
8. Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 1995. Т. 37, № 3. С. 270.
9. Баитов А.А., Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2007. Т. 49, N 1. С. 91.
10. Яковлева Л.А., Каминский Ю.Л., Соснова Л.П., Нагорский А.И. // Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. М., 1982. Ч. 2. С. 255.