

Синтез меченных тритием биологически важных диазинов

Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов

Институт молекулярной генетики Российской академии наук
123182 Москва, пл. И.В.Курчатова, 46, факс (095) 196–0221

Рассмотрены основные способы введения трития (путем химического синтеза и изотопного обмена в растворе и в твердой фазе) в биологически важные диазины — компоненты нуклеиновых кислот (гетероциклические основания, нуклеозиды, нуклеотиды), терминаторы синтеза ДНК, цитокинины.

Библиография — 178 ссылок.

Оглавление

I. Введение	254
II. Реакции дегалогенирования в растворе	255
III. Каталитическое дегалогенирование без растворителя	257
IV. Реакции изотопного обмена	258
V. Реакции восстановления и гидрирования	260
VI. Твердофазная каталитическая гидрогенизация	262
VII. Другие методы введения тритиевой метки	263
VIII. Заключение	263

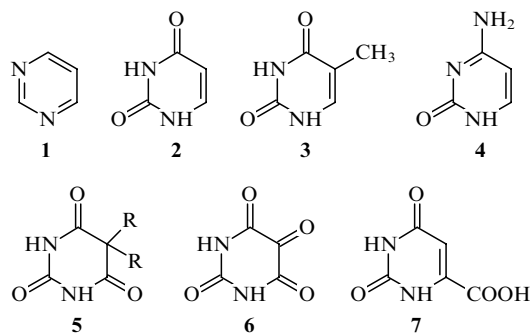
I. Введение

Современные достижения молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики, экспериментальной медицины в значительной мере обусловлены возможностью широкого использования различных препаратов с радиоактивной меткой. Применение подобных препаратов позволило непосредственно изучать механизмы химических и биохимических реакций, пути обмена веществ в живых организмах (*in vivo*) и в открытых системах (*in vitro*). Определение количественных характеристик биохимических процессов с помощью меченых препаратов важно для понимания существа процессов, протекающих в живых клетках и выяснения механизмов регуляции, лежащих в основе метаболизма.

Интерес исследователей к меченым тритием соединениям не ослабевает уже более 30 лет. Это обусловлено ценными физическими свойствами трития: его период полураспада достаточно велик для проведения экспериментов практически любой продолжительности; малая энергия β -частиц трития ($E_{\max} = 18.6$ кэВ) определяет низкую радиотоксичность тритийсодержащих препаратов, поэтому можно работать с относительно большим количеством изотопа без специальных мер защиты. При замене одного атома водорода тритием получается препарат с молярной радиоактив-

ностью ($A_{\text{мол}}$) $29.12 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$. Использование таких препаратов и современных сцинтилляционных счетчиков трития позволяет зарегистрировать менее 10^{-14} моля меченого соединения.

Среди биологически важных диазинов наибольшего внимания заслуживает пиримидин (1), поскольку его производные — урацил (2), тимин (3) и цитозин (4) — входят в состав нуклеиновых кислот. К производным пиримидина, также не содержащим конденсированных колец, относятся барбитураты 5, аллоксан (6) и оротовая кислота (7). Значительную роль в ряде биологически активных соединений играют птеридин (8), пурин (9) и его производные — аденин (10) и гуанин (11), которые относятся к азотистым основаниям, входящим в состав рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот. Другие производные пурина, например, гипоксантин (12), ксантин (13), теобромин (14), теofilлин (15), кофеин (16) и мочевая кислота (17), — биологически активные природные соединения. Рибоза и 2'-дезоксирибоза присоединяются к азотистым основаниям через N-гликозидную связь. Эти соединения называют соответственно дезоксирибо- 18a и рибонуклеозидами 18b. Фосфорные эфиры нуклеозидов называются нуклеотидами 18c–18e. Таким образом, перечислены практически все соединения, являющиеся компонентами нуклеиновых кислот. Таких соединений для главных оснований 2–4, 10, 11 нуклеиновых кислот более 40.



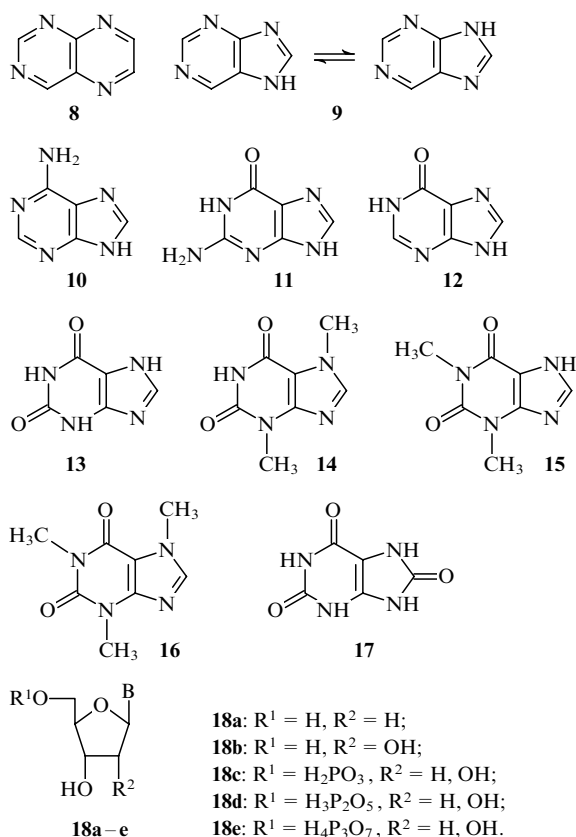
Г.В.Сидоров. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник ИМГ РАН. Телефон: (095)196–0213, e-mail: img@img.ras.ru

Область научных интересов: синтез меченных тритием диазинов.

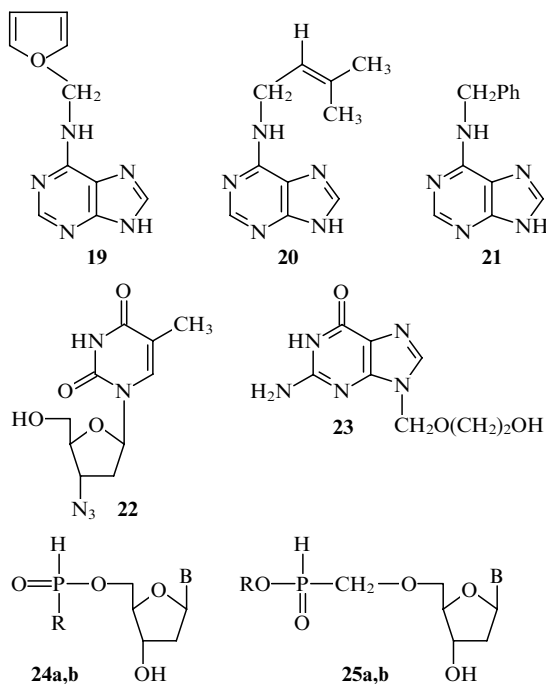
Н.Ф.Мясоедов. Член-корреспондент РАН, заведующий отделом химии физиологически активных веществ того же института. Телефон: (095)195–0001.

Область научных интересов: биоорганическая химия; синтез физиологически активных веществ, включая меченные изотопами; исследования пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов.

Дата поступления 2 июля 1998 г.



Значительное внимание в последние годы уделяется так называемым цитокинам — производным 6-аминопурина, открытым в 1950-х годах. Цитокинины — природные соединения, ускоряющие прорастание и цветение, а также задерживающие увядание растений. В концентрациях 10^{-3} – 10^{-5} моль · л⁻¹ они стимулируют клеточное деление. К основным цитокинам относятся кинетин (19), зеатин (20), бензиламинопури (21) и ряд других соединений.



24a: R = H;
 24b: R = Me

25a: R = H;
 25b: R = H₂PO₃

Важными соединениями, относящимися к диазидам, являются терминаторы синтеза ДНК. Чаще всего это аналоги компонентов нуклеиновых кислот с измененной гликозидной и/или фосфорной частью молекулы. В качестве примера можно привести азидотимидин (22), ацикловир (23), нуклеозидфосфинаты 24a и нуклеозидметилфосфинаты 24b, 5'-O-фосфонилметил-2'-дезоксинуклеозиды 25a и соответствующие нуклеотиды 25b. Они являются потенциальными ингибиторами ретровирусов, в том числе вируса иммунодефицита человека.^{1,2}

В обзоре рассмотрены способы получения указанных выше соединений, меченных тритием. Основное внимание уделено общим методам, позволяющим синтезировать наибольшее количество соединений с максимальной молярной радиоактивностью.

II. Реакции дегалогенирования в растворе

Реакция каталитического обмена галогена на водород (гидрогенолиз) известна давно,³ однако для получения соединений, меченных тритием, ее стали применять сравнительно недавно.^{4,5} Реакцию каталитического дегалогенирования обычно проводят в герметичных реакционных сосудах при интенсивном перемешивании суспензии катализатора в растворе галогензамещенного соединения в атмосфере газообразного трития. Применяют полярные и неполярные растворители. Образующийся в ходе реакции галогенид трития необходимо нейтрализовать, так как он отравляет катализатор, что ведет к снижению скорости реакции.⁶ Механизм включения трития в растворитель в

Таблица 1. Результаты каталитического обмена галоген – тритий в пуринах и пиримидинах.

Предшественник	Целевое соединение	A _{мол} (см. ^а)	Ссылки
5-Иодцитидин	[5- ³ H]Цитидин	17.4	10
8-Бромаденин	[8- ³ H]Аденин	15–20	11
2-Хлораденин	[2- ³ H]Аденин	20–25	12
2,8-Дихлораденин	[2,8- ³ H ₂]Аденин	25–50	13
5-Иодоротовая кислота	[5- ³ H]Оротовая кислота	15.6	13
5-Иоддеоксиуридин	[5- ³ H]Дезоксиуридин	26.4	13
5-Иодурацил	[5- ³ H]Урацил	15–20	14
5-Иодуридин	[5- ³ H]Уридин	15–20	14
5-Иод-6-азаурацил	[5- ³ H]6-Азаурацил	15–20	15
5-Иод-6-азауридин	[5- ³ H]6-Азауридин	15–20	15
8-Бромаденозин	[8- ³ H]Аденозин	11.6–19	16, 17
8-Бромгуанозин	[8- ³ H]Гуанозин	5.4–8	16, 17
8-Броминуозин	[8- ³ H]Инозин	15	17
8-Бром-АМФ	[8- ³ H]АМФ	10	18, 19
8-Бром-ГМФ	[8- ³ H]ГМФ	15	20
5-Бром-УМФ	[5- ³ H]УМФ	10	21
8-Бром-цАМФ	[5- ³ H]цАМФ	17	22
5,6-Дибромурацил	[5,6- ³ H ₂]Урацил	45–50	23, 24
5-Бромурацил	[5- ³ H]Урацил	20–30	25
6-Хлорурацил	[6- ³ H]Урацил	20–30	25
5-Бромцитозин	[5- ³ H]Цитозин	20–30	25
8-Бромзамещенные пуриновые нуклеотиды	[8- ³ H]Пуриновые нуклеотиды	20–30	25
5-Бромзамещенные пиримидиновые нуклеотиды	[5- ³ H]Пиримидиновые нуклеотиды	20–30	25

Примечание. Приняты следующие обозначения: АМФ — аденозин-5'-монофосфат, ГМФ — гуанозин-5'-монофосфат, УМФ — уридин-5'-монофосфат, цАМФ — аденозин-3',5'-цикломонофосфат.

^а Размерность Ки · ммоль⁻¹.

условиях каталитического дегалогенирования (катализаторы PdO, Pd/BaSO₄, никель Ренея) рассмотрен в работе ⁷.

В процессах дегалогенирования используют катализаторы гидрирования (в основном палладий на носителе). Условия проведения каталитического дегалогенирования для получения соединений, меченных тритием, рассмотрены в работах ^{8,9}. В качестве примера в табл. 1 приведены предшественники и целевые соединения, полученные с применением реакции дегалогенирования.

При получении соединения **10**, меченного тритием, было установлено,¹¹ что дегалогенирование в апротонных растворителях (диметилформамиде, диметилсульфоксиде, диоксане) в присутствии катализаторов (палладиевая чернь, палладий на угле и сульфате бария) не имеет преимуществ перед реакцией в протонном растворителе (водно-спиртовой раствор): максимальная молярная радиоактивность в обоих случаях не достигается. При введении тритиевой метки в аденозин и гуанозин скорость каталитического дегалогенирования соответствующих 8-бромзамещенных соединений в 1 М КОН и 0.1 М HCl выше, чем в воде; однако выходы меченых соединений и их молярная радиоактивность больше в щелочном растворе.¹⁶ Данные, приведенные в табл. 1, относятся к синтезу конкретных соединений. Эта реакция не была изучена как метод синтеза меченных тритием диазинов. В частности, не было выявлено влияния изотопных эффектов водорода, соотношения компонентов реакционной смеси, природы исходных соединений и активности катализаторов на выход и молярную радиоактивность целевых соединений. Авторы работ ^{26–31} рассмотрели гидрогенолиз как метод введения тритиевой метки в диазины. Гидрогенолиз различных

соединений проводили в одинаковых растворителях в условиях равенства таких параметров, как давление газобразного трития, растворитель, температура, концентрация галогензамещенного соединения и продолжительность реакции. Основные характеристики гидрогенолиза тритием бромзамещенных пуриновых²⁶ и пиримидиновых²⁷ соединений приведены в табл. 2.

Процессы, протекающие с участием изотопов водорода (протия и трития) в системе водород – палладий – вода, и их влияние на $A_{\text{мол}}$ продуктов гидрогенолиза подробно рассмотрены в работе ²⁷. Отмечено, что одной из основных причин снижения молярной радиоактивности целевых соединений является разбавление трития протием за счет реакции изотопного обмена с протонами растворителя, а также большие значения коэффициентов разделения протия и трития ($\alpha_{\text{H-T}}$ достигает 12). Ниже проанализированы процессы с различной кинетикой.

1. Скорость основной реакции (дегалогенирование, гидрирование, изотопный обмен) много больше скорости изотопного обмена трития с растворителем (при этом тритий практически не разбавляется протием). Возможны два крайних случая: а) если вкладом реакции гомомолекулярного изотопного обмена можно пренебречь, то молярная радиоактивность продукта реакции будет равна молярной радиоактивности исходного трития с учетом изотопных эффектов водорода при растворении и адсорбции на палладии (для этого процесса $\alpha_{\text{H-T}} = 2.5$); б) если на палладии устанавливается изотопное равновесие, то нужно учитывать реакцию гомомолекулярного изотопного обмена ($\alpha_{\text{H-T}} = 4.7$ или 3.6 для 50%-ного трития).

2. Скорость основной реакции сравнима или меньше скорости изотопного обмена трития с растворителем, т.е. происходит непрерывное разбавление трития протием. При рассмотрении этого процесса необходимо учитывать изотопное равновесие в системе водород – палладий – вода ($\alpha_{\text{H-T}} = 12$). Данные, представленные в табл. 3, иллюстрируют влияние концентрации трития на молярную активность меченых продуктов, получаемых при проведении реакции в водном растворе для различных значений коэффициентов разделения протий – тритий. Крайние значения молярной радиоактивности (2.2 и 28.3 Ки · ммоль⁻¹) рассчитаны для предельных случаев. Таким образом, увеличение молярной радиоактивности пуриновых и пиримидиновых соединений связано с минимизацией эффекта разделения изотопов водорода на палладии на ход каталитического дегалогенирования в растворе.

Одним из способов минимизации является увеличение скорости основной реакции дегалогенирования за счет использования более активных палладиевых катализаторов. При увеличении отношения палладий/бромзамещенное соединение может повыситься $A_{\text{мол}}$. Это характерно в основном для пуриновых соединений.

В работе ³¹ предлагается другой способ повышения молярной радиоактивности — применение катализаторов с низким

Таблица 2. Основные характеристики реакции каталитического дегалогенирования тритием 8-бромзамещенных пуриновых и 5-бромзамещенных пиримидиновых соединений (катализатор — палладий на носителе).^{26,27}

Меченое соединение	Концентрация трития, %	Выход, %	$A_{\text{мол}}$, Ки · ммоль ⁻¹
[8- ³ H]Аденозин	85	19.5	9.8
[8- ³ H]АМФ	85	49.0	6.2
[8- ³ H]АМФ – ТОА ^a	98	28.0	16.7
[8- ³ H]цАМФ	95	26.7	21.6
[8- ³ H]дАМФ	75	61.0	7.3
[8- ³ H]Гуанозин	98	45.4	12.7
[8- ³ H]ГМФ	80	46.2	11.0
[8- ³ H]ГМФ – ТОА ^a	98	4.1	0.8
[8- ³ H]цГМФ	70	55.0	5.5
[8- ³ H]дГМФ	98	29.0	14.0
[5- ³ H]Урацил	80	79.0	18.0
[5- ³ H]Уридин	90	21.0	21.0
[5- ³ H]Уридин	70	65.0	13.0
[5- ³ H]УМФ	90	96.0	3.7
[5- ³ H]УМФ – ТОА ^a	98	80.0	19.0
[5- ³ H]2'-Дезоксиуридин	85	92.0	21.2
[5- ³ H]дУМФ	75	43.0	8.6
[5- ³ H]цУМФ	95	61.0	12.2
[5- ³ H]ЦМФ	70	34.0	1.1
[5- ³ H]ЦМФ – ТОА ^a	70	89.0	9.3
[5- ³ H]ЦМФ – ТОА ^a	98	74.0	25.1
[5- ³ H]дЦМФ	95	74.0	18.0
[5- ³ H]цЦМФ	95	54.0	18.1

Примечание. Приняты следующие обозначения: дАМФ — 2'-дезоксиаденозин-5'-монофосфат, цГМФ — гуанозин-3',5'-цикломонофосфат, дГМФ — 2'-дезоксигуанозин-5'-монофосфат, дУМФ — 2'-дезоксиуридин-5'-монофосфат, цУМФ — уридин-3',5'-цикломонофосфат, ЦМФ — цитидин-5'-монофосфат, дЦМФ — 2'-дезоксидитидин-5'-монофосфат, цЦМФ — цитидин-3',5'-цикломонофосфат. ^a Соль с триэтиламин (ТОА).

Таблица 3. Влияние изотопии на молярную радиоактивность меченых продуктов реакции гидрогенолиза в водном растворе.

[³ H], %	$A_{\text{мол}}$ (Ки · ммоль ⁻¹) для различных значений $\alpha_{\text{H-T}}$			
	2.5	3.6	4.7	12
99	28.3	—	27.8	26.0
95	25.4	—	23.3	17.8
90	22.2	—	19.1	12.5
85	19.5	—	15.9	9.3
80	17.1	—	13.4	7.3
75	15.1	13.2	—	5.8
70	13.3	11.5	—	4.7
60	10.2	8.6	—	3.2
50	7.7	6.3	—	2.2

Таблица 4. Результаты каталитического дегалогенирования бромзамещенных нуклеозид-5'-трифосфатов газообразным тритием.³²

Исходное соединение	Катализатор	$A_{\text{мол}}, \text{Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$
8-Бром-АТФ	5% Pd/BaSO ₄	17
8-Бром-дАТФ	5% Pd/BaSO ₄	15
	α -Pd	18
8-Бром-ГТФ	5% Pd/BaSO ₄	11
	α -Pd	19
8-Бром-дГТФ	5% Pd/BaSO ₄	5
	α -Pd	18
5-Бром-УТФ	5% Pd/BaSO ₄	17
	α -Pd	23
5-Бром-дУТФ	5% Pd/BaSO ₄	12
	α -Pd	14
5-Бром-ЦТФ	5% Pd/BaSO ₄	21
5-Бром-дЦТФ	5% Pd/BaSO ₄	18

Примечание. Приняты следующие обозначения: АТФ — аденозин-5'-трифосфат, дАТФ — 2'-дезоксаденозин-5'-трифосфат, ГТФ — гуанозин-5'-трифосфат, дГТФ — 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат, УТФ — уридин-5'-трифосфат, дУТФ — 2'-дезоксидиридин-5'-трифосфат, ЦТФ — цитидин-5'-трифосфат, дЦТФ — 2'-дезоксидитидин-5'-трифосфат.

(0.01–0.05%) содержанием палладия на носителе. В подобных катализаторах изотопы водорода практически не растворяются и гидридная форма отсутствует. С учетом коэффициента разделения протий–тритий при фазовом и адсорбционном равновесии на палладии, равном 2.5, молярная радиоактивность продукта дегалогенирования 95%-ным тритием должна составлять 25.4 Ки·ммоль⁻¹, что соответствует экспериментальным данным.³¹ На практике катализаторы с низким содержанием палладия на носителе используют редко, так как удовлетворительные выходы целевых продуктов достигаются при определенных соотношениях предшественника и катализатора в реакционной смеси (примерно 1 г катализатора на 1 мг предшественника). Это приводит к увеличению объема растворителя и, как следствие, к увеличению объема реакционной ампулы, повышенному расходу газообразного трития, затруднению перемешивания реакционной смеси и т.п.

Описан синтез нуклеозид-5'-трифосфатов, меченных тритием в положении 5 пиримидинового и положении 8 пуринового кольца, методом каталитического дегалогенирования соответствующих бромпроизводных предшественников.³² Значения $A_{\text{мол}}$ полученных соединений приведены в табл. 4. Меченные тритием нуклеозид-5'-трифосфаты, как правило, имеют более высокие молярные радиоактивности, чем полученные в аналогичных условиях нуклеозид-5'-монофосфаты. Эти данные согласуются с предположением³⁰ о связи таких величин, как степень сорбируемости на катализаторе исходных соединений и молярная радиоактивность, а также о влиянии на последнюю соотношения скоростей дегалогенирования и гетерогенного изотопного обмена газообразного трития с водой.

С использованием каталитического дегалогенирования соответствующих бромзамещенных предшественников синтезированы следующие соединения:^{33–40}

Соединение	$A_{\text{мол}}, \text{Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$
[5- ³ H]2',3'-Дидезоксицитидин	—
[8- ³ H]АТФ	—
[2- ³ H]АТФ	26.2
[5- ³ H]дЦТФ	15.0
[6- ³ H]Тимин	—
[2- ³ H]Аденин	12.7
[2- ³ H]Аденозин	—
[8- ³ H]9-[(2-Гидроксиэтокси)метил]гуанин	25.0

Соединение	$A_{\text{мол}}, \text{Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$
[5- ³ H]1-β-D-Арабинофуранозилцитозин	20.0
1-[(3- ³ H)Тетрагидрофурил-2]-5-фторурацил	29.7
[8- ³ H]9-β-D-Арабинофуранозиладенин	20.0
5-Амино-7-(2[2',3',5'- ³ H ₂]фенилэтил)-2-(2-фурил)пиразоло[4,3- <i>e</i>]-1,2,4-триазоло[1,5- <i>c</i>]пиримидин	68.6

Меченные тритием пуриновые и пиримидиновые нуклеозидфосфаты были получены каталитическим дегалогенированием соответствующих бромзамещенных предшественников газообразным тритием.⁴¹

Описан⁴² синтез трех тритированных ингибиторов обратной транскриптазы гидрогенолизом бромбензооксазоловых предшественников. Молярная радиоактивность соединений составляла 3–10 Ки·ммоль⁻¹.

В процессе дегалогенирования тритий можно вводить не только в гетероциклическое основание, но и в углеводную часть молекулы. Так, дегалогенированием соответствующего предшественника был синтезирован [2',3'-³H]2',3'-дидезокситимидин-5'-фосфат.⁴³

Эксперимент по проведению реакции каталитического дегалогенирования в растворе относительно прост, продукты имеют довольно высокие значения молярной радиоактивности. Как правило, получаются препараты с определенным положением метки, обусловленным замещением атома галогена тритием. При наличии набора галогензамещенных предшественников эту реакцию удобно использовать для получения серий меченных тритием препаратов, необходимых исследователям. К недостаткам можно отнести необходимость синтеза специальных галогензамещенных предшественников. Например, для получения [2-³H]АТФ был приготовлен 2-бром-АТФ шестистадийным синтезом из гуанозина.³⁵

III. Каталитическое дегалогенирование без растворителя

Метод каталитического дегалогенирования без растворителя был предложен для получения меченного тритием урацила.⁴⁴ Для этого 5-иодурацил, нанесенный на палладиевый катализатор, обрабатывали газообразным тритием в условиях высоковольтного высокочастотного разряда. В результате образовался [5-³H]урацил ($A_{\text{мол}} = 16.1 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$). Тимин, меченный тритием, был получен в результате дегалогенирования 5-галогенметилурацила газообразным тритием над палладиевым катализатором при 100°C.⁴⁵ Детально этот метод изучен на примере синтеза меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот и назван твердофазным каталитическим восстановительным дегалогенированием (ТКВД).⁴⁶ Иницирование реакции ТКВД осуществляется двумя способами — высоковольтным высокочастотным электрическим разрядом⁴⁷ и нагреванием от 50 до 150°C.⁴⁸ Изучена кинетика реакции ТКВД и предложена ее математическая модель, в которой

Таблица 5. Кинетические характеристики ТКВД бромзамещенных компонентов РНК.⁴⁶

Исходное соединение	Константа скорости реакции (мин ⁻¹ ·ммоль ⁻²) при различных температурах (°C)					E , кал·ммоль ⁻¹
	100	78	56	35	23	
8-Бром-АМФ	30.45	20.62	14.03	10.42	8.06	3380
8-Бром-гуанозин	30.43	25.20	15.18	11.25	9.09	3670
5-Бром-УМФ	24.00	17.15	10.80	6.55	4.74	4760
5-Бром-ЦМФ	33.25	16.15	10.29	4.89	1.76	6470

катализатор рассматривается как расходующий компонент реакции. Предложенная модель хорошо объясняет зависимость выхода и $A_{\text{мол}}$ целевых соединений от соотношения вещества и катализатора, а также от содержания палладия на носителе. Некоторые кинетические характеристики ТКВД представлены в табл. 5. С использованием ТКВД получены следующие меченные тритием соединения:⁴⁶

Соединение	$A_{\text{мол}},$ Ки · ммоль ⁻¹	Соединение	$A_{\text{мол}},$ Ки · ммоль ⁻¹
[5- ³ H]Урацил	16.1	[8- ³ H]2'-Дезокси-	16.4
[Метил- ³ H]тимин	3.1	аденозин	
[8- ³ H]Гуанин	12.4	[8- ³ H]АМФ	4.9
[5- ³ H]Цитидин ^a	16.3	[8- ³ H]ГМФ	5.2
[8- ³ H]Гуанозин	6.7	[5- ³ H]УМФ	2.8
[8- ³ H]Аденозин ^a	10.6	[5- ³ H]ЦМФ	5.9
[5- ³ H]Уридин ^a	11.5	[8- ³ H]дАМФ	2.1
[5- ³ H]2'-Дезокси-	18.5	[8- ³ H]дГМФ	1.6
уридин ^a		[8- ³ H]дЦМФ	1.7
[5- ³ H]Дезоксици-	33.0		
тидин ^a			

^a Продукты деструкции соответствующих нуклеотидов.

Если ТКВД проводить при повышенных температурах, то наряду с целевым соединением образуются побочные продукты за счет разрыва фосфозфирной и N-гликозидной связей. Молярная радиоактивность продуктов деструкции выше, чем у целевого продукта, что связано, по-видимому, с возбуждением молекулы при разрыве этих связей. Как видно из полученных данных, $A_{\text{мол}}$ соединений не достигает теоретического значения при замене одного атома галогена тритием (29.12 Ки · ммоль⁻¹). Авторы работы⁴⁶ объясняют этот эффект разбавлением исходного газообразного трития подвижным водородом, находящимся в системе вещество – катализатор (водород способен к быстрому изотопному обмену). Лабильный водород в твердой фазе имеется в маркируемом соединении и, как установлено,⁴⁶ в самом катализаторе. Экспериментально определено, что в 100 мг катализатора 5% Pd/C содержится 0.21 ммоль водорода, способного к изотопному обмену с тритием.

Процесс ТКВД не нашел широкого практического применения для синтеза меченных тритием диазинов, поскольку проведение реакции в растворе экспериментально проще, позволяет получить сравнимые, а зачастую и более высокие величины $A_{\text{мол}}$ продуктов. Однако появление метода ТКВД можно считать важным этапом в развитии твердофазных реакций с участием газообразного трития.

IV. Реакции изотопного обмена

Различают реакции изотопного обмена с тритийсодержащим растворителем (в том числе с тритиевой водой) и каталитические реакции с газообразным тритием. Для реакций каталитического изотопного обмена чаще всего используют гетерогенные палладиевые катализаторы,⁴⁹ гомогенные катализаторы, такие как трифторметансульфоновая кислота,⁵⁰ трихлорид родия и ацетилацетонат рутения,⁵¹ а также катализаторы на основе полимеров^{52,53} и металлов (Pt, Ni, Rh), нанесенных на гидрофобные (тефлон, полиэтилен, полистирол) носители.⁵⁴ Изотопный обмен активированных ароматических протонов в среде $\text{AsO}_3\text{H} - ^3\text{HCl}$ рассмотрен в работе⁵⁵. Каталитическая роль металлов и водородных ионов в тритиевом обмене гетероциклических субстратов обсуждена в статье⁵⁶.

1. Реакции с тритийсодержащим растворителем

Реакции с тритийсодержащим растворителем, которым чаще всего является тритиевая вода, проводят обычно в водном растворе в сильнощелочной среде.⁵⁷ В работе⁵⁸ предложен препаративный метод специфического введения изотопов водорода в конденсированные бензогетероциклы. В основе метода лежит процесс изотопного обмена с дейтериевой и тритиевой водой при температуре выше 145°C. Методы получения гетероциклических и гетероароматических соединений, содержащих изотопы водорода, рассмотрены соответственно в работах^{59,60}.

В компонентах нуклеиновых кислот наиболее легко обменивается протон, связанный с атомом C(8) пуриновых оснований. Водород, связанный с атомом C(2), обменивается намного труднее. Например, в работе⁶¹ с помощью метода ЯМР ¹H (pD 6–7, 100°C) показано, что скорость изотопного обмена водорода у атома C(8) аденина в ~1000 раз выше, чем у атома C(2).

В работе⁶² наблюдали обмен протона, связанного с атомом C(8) аденина, в присутствии восстановленного платинового катализатора. Изотопный обмен происходит и при нагревании (> 90°C) пурина и аденозина в D₂O.^{63,64} Вследствие такого обмена в спектре ЯМР ¹H соединений исчезает пик, отвечающий сигналам протонов у атома C(8). Результаты ИК-спектроскопических исследований изотопного обмена в остатках пуриновых оснований в макромолекуле ДНК также указывают на предпочтительный обмен водорода, связанного с атомом C(8).⁶⁵

Шелтон и Кларк⁶⁶ использовали реакцию изотопного обмена для введения тритиевой метки в пуриновые соединения. Реакцию проводили в щелочной среде при нагревании с тритиевой водой до 100°C. Установлено, что гуаниновые соединения метятся быстрее адениновых. Скорость обмена для соединений обоих оснований повышается с увеличением pH от 2 до 11. Условия введения метки довольно мягкие. Это позволило распространить их на получение меченных тритием нуклеозидов (аденозина, дезоксиаденозина и нуклеотидов) аденозин-3',5'-цикломонофосфата⁶⁷ и АТФ.⁶⁸

Кинетику изотопного обмена с водой и зависимость константы скорости изотопного обмена АТФ и ГТФ от pH исследовали в работе⁶⁹. Кинетика включения трития, связанного с атомом C(8) пуринов поли(А), поли(А)-поли(У)-дуплекса, РНК, т-РНК и ДНК, рассмотрена в статье⁷⁰. С использованием реакции тритий-водородного обмена была введена метка в олигонуклеотиды,⁷¹ олигодезоксирибонуклеотиды,⁷² полирибонуклеотиды,⁷³ ДНК,^{74–77} т-РНК^{илей} и т-РНК^{тип} из дрожжей.⁷⁸ В работе⁷⁹ предложены оптимальные условия введения тритиевой метки в олигодезоксирибонуклеотиды: 2–4 ч при 60°C в тритиевой воде в растворе 0.3 М NaOH. Изотопным обменом с тритиевой водой на платиновом катализаторе получен ингибитор 5-липоксигенирования арахидоновой кислоты — антипротастический агент ($A_{\text{мол}} = 19.8$ Ки · ммоль⁻¹).⁸⁰ Изотопный обмен водорода, связанного с атомом C(2) в этил-5-амино-1-(2,3-О-изопропилиден-β-D-рибофуранозил)имидазол-4-карбоксилате (pH 1.77–12.0, 65°C), изучен в работе⁸¹.

Анализ изменения скорости изотопного обмена протонов C(8) пуриновых остатков позволяет получать информацию о конформационных изменениях природных биополимеров, таких как полинуклеотиды^{82–85} и РНК.^{70,86,87} Установлено,⁸⁸ что скорость обмена водорода у атома C(8) в аденине, гуанине и гипоксантине в составе нуклеиновых кислот, сравнима с соответствующими скоростями в нуклеозидмонофосфатах.⁸⁸ В ДНК против-третий обмен замедлен по сравнению с дезоксинуклеозидмонофосфатами примерно в 2.4–2.8 раза.⁸⁹

Изучение механизма реакции изотопного обмена с водой в C(8)Н-группах пуринов показало,^{87,90,91} что обмен происходит по так называемому илдинному механизму — не в

нейтральных молекулах, а в протонированных по атому N(7) формах производных пуринов и в цвиттер-ионах с положительным зарядом на атоме N(7). Авторами работы⁹² исследована кинетика протий-тритиевого обмена между водой и C(8)Н-группами пуриновых оснований, моно- и полинуклеотидов при различных удельных радиоактивностях среды в широком интервале температур (от 4 до 80°C) и при разных значениях pH. Показано, что при высокой удельной радиоактивности среды в изученном интервале температур протекают одновременно две не конкурирующие параллельные реакции обмена: одна — по илйдному механизму, а другая — с участием высокоактивных радикалов, образующихся в результате радиолиза воды под воздействием β -излучения трития. Относительный вклад радикального обмена в наблюдаемую скорость реакции уменьшается по мере повышения температуры и уменьшения удельной радиоактивности среды. В случае полинуклеотидов и ДНК изотопный обмен протекает в основном по илйдному механизму при температуре выше 25°C, а в случае нуклеотида **18c** — выше 37°C (при удельной радиоактивности среды 1 Ки·мл⁻¹ и pH 7). Увеличение кислотности среды до pH 1 существенно ускоряет радикальную реакцию обмена, тогда как присутствие β -меркаптоэтанола резко тормозит ее. Изменение наблюдаемой скорости обмена водорода в C(8)Н-группах пурина позволяет определить изменения pK_a полинуклеотидов и нуклеиновых кислот, обусловленное изменением конформации макромолекулы.⁹³

Протоны, связанные с атомом C(5) в пиримидинах, довольно легко обмениваются с тритийсодержащей водой в фотогидратах урацила. В процессе изотопного обмена 5,6-дигидро-6-гидроксиуридин-5'-фосфата с тритиевой водой при нагревании образуется 5-тритийзамещенный уридин-5'-фосфат.⁹⁴ В работе⁹⁵ описано получение меченного тритием 5,6-дигидро-6-гидроксиуридин-5'-фосфата при нагревании с тритиевой водой. Аналогичный обмен наблюдается в фотогидратах производных цитозина.⁹⁵ Реакция изотопного обмена водорода в урациле с использованием тритиевой и дейтериевой воды протекает только в присутствии платинового и палладиевого катализаторов.^{96,97} В отсутствие катализатора реакция идет лишь в очень жестких условиях.^{98–100} Водород, связанный с атомом C(5), обменивается значительно легче, чем водород, связанный с атомом C(6). В работе¹⁰¹ предложены условия реакции изотопного обмена, позволяющие избирательно метить дейтерием положение 6 пиримидиновых нуклеозидов. Метод заключается в синтезе 5,6-дидейтеросоединений и в реобмене дейтерия из положения 5 в специальных условиях. Аналогичный метод предложен и в статье¹⁰². Реакция изотопного обмена водорода, связанного с атомом C(5) в пиримидинах, ускоряется в присутствии цитратного буфера¹⁰³ и таких соединений, как 2-меркаптоэтиламин, этиламин, этаноламин, едкий натр,¹⁰⁴ анион бисульфита,^{105,106} бисульфиты метил-, диметил- и триметиламина, этил- и диэтиламина, а также имидазола,¹⁰⁷ цистеина и других соединений, содержащих серу, например 2-меркаптоэтанолamina и 2-меркаптоэтанола.^{108,109} В работе¹⁰⁶ отмечено, что при определенных условиях проведения реакции нуклеиновых кислот с бисульфитом в присутствии тритиевой воды цитидиновые фрагменты превращаются в уридиновые. Во всех случаях изотопный обмен проводят в мягких условиях. Введение метки в производные урацила осуществляется в щелочной среде, а цитозина — в кислой. Эти реакции могут использоваться для синтеза меченных тритием пиримидиновых производных.

В работе⁵¹ описан гомогенный изотопный обмен водорода в среде диметилформамида под действием $RhCl_3$ при 110°C, позволяющий с высокой региоселективностью вводить тритий в *орто*-положение различных ароматических кислот, амидов, аминов, а также гетероциклических соединений. В этой работе показано также, что другим эффективным

катализатором обмена в *орто*-положение бензойных кислот помимо $RhCl_3$ является ацетилацетонат рутения.

Реакции с тритийсодержащим растворителем — универсальный способ получения меченных тритием соединений, в частности диазинов. Метод не требует синтеза специальных предшественников, а условия введения тритиевой метки достаточно мягкие, что позволяет использовать его для введения такой метки в соединения довольно сложного строения, например в нуклеиновые кислоты. При использовании этой реакции основное внимание необходимо уделить выбору эффективных гомогенных или гетерогенных катализаторов и растворителей (источников трития). Недостатком метода является относительно низкие значения молекулярных радиоактивностей получаемых соединений. Эти значения определяются главным образом удельной радиоактивностью применяемой тритиевой воды, которая обычно не превышает 100–200 Ки·мл⁻¹ (3–6% от теоретически возможной). Тритиевая вода с более высокой удельной активностью неустойчива из-за саморадиолиза. В реакциях изотопного обмена можно использовать тритиевую воду с очень высокой удельной радиоактивностью, если ее смешать с инертным безводным органическим растворителем.¹¹⁰ На примере реакции изотопного обмена со стероидами показано,¹¹⁰ что максимальная величина $A_{\text{мол}}$ достигается при использовании раствора тритиевой воды (2–3%) в инертном растворителе. Это соответствует объемной радиоактивности раствора 65–100 Ки·мл⁻¹. Раствор высокоактивной тритиевой воды получали окислением газообразного трития над оксидом палладия в безводном органическом растворителе. С использованием раствора высокоактивной тритиевой воды был получен меченный тритием бензиламинопуридин ($A_{\text{мол}} = 24$ Ки·ммоль⁻¹).¹¹¹ Предложенный прием трудоемкий, а такие недостатки, как сравнительно невысокие значения молярной радиоактивности (несколько десятков Ки·ммоль⁻¹) получаемых соединений и необходимость утилизации больших количеств тритиевой воды, не способствовали его широкому распространению для синтеза меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот. Однако для соединений, содержащих легковосстанавливаемые и/или гидрируемые группы (например, таких как стероиды, фармацевтические препараты¹¹²), этот метод является практически единственным.

2. Каталитический жидкофазный гетерогенный изотопный обмен с газообразным тритием

В литературе одновременно появились два сообщения^{113,114} о применении метода введения тритиевой метки в органические соединения, основанного на реакции изотопного обмена газообразного трития с водородом маркируемого соединения, растворенного в соответствующем растворителе, в присутствии гетерогенного катализатора. В работе¹¹³ предлагается метод неспецифического тритирования органических молекул в процессе изотопного обмена с газообразным тритием в присутствии активированного платинового катализатора. Катализатор PtO_2 в реакции изотопного обмена более активен, чем PdO .¹¹⁵ Авторы работы¹¹⁴ реакцию изотопного обмена проводили в фосфатном буфере в присутствии катализатора $PdO/BaSO_4$. Тритий вводили в углеводы, алифатические и ароматические аминокислоты, в компоненты нуклеиновых кислот. В табл. 6 приведены условия реакций изотопного обмена при введении тритиевой метки в пуриновые и пиримидиновые соединения с помощью этого метода. Метод имеет большое практическое значение для синтеза меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот. Авторы предполагают, что обмен идет по свободно-радикальному механизму и облегчен для подвижных атомов водорода, таких как ароматические протоны и водород, связанный с атомом C(8) пуринов. Трудно ожидать высоких значений молярных радиоактивностей для соединений с

Таблица 6. Пуриновые и пиримидиновые соединения, полученные методом каталитического гетерогенного изотопного обмена с газообразным тритием.¹¹⁴

Соединение	Условия реакции		$A_{\text{мол}},$ Ки · ммоль ⁻¹
	pH	t, мин	
Аденозинарабинозид	8.2	240	5.6
Аденозин	8.2	120	12.0
цАМФ	10.0	60	25.0
АМФ	10.0	960	11.0
АТФ	8.2	60	20.0
2'-Дезоксиаденозин	8.2	210	17.0
2'-дАТФ	10.0	60	18.1
N ⁶ ,O ² -Дибутирил-цАМФ	10.0	60	19.5
Гуанозин	8.0	120	0.42
цГМФ	8.0	20	0.88
ГТФ	8.2	30	1.5
ИМФ	8.0	5	1.2
	8.0	20	3.9
	8.0	60	2.7
	8.0	20	2.7
Никотинамид	8.0	120	—
НАД	8.0	120	—
Пуромидин	8.2	120	3.7
Пуромидинаминонуклеозид	8.2	120	13.7
Тимидин	8.0	60	5.0
	8.0	60	7.0
Урацил	8.0	60	9.0
	8.0	60	2.5

Примечание. Приняты следующие обозначения: ИМФ — инозин-5'-монофосфат, НАД — никотинамиддинуклеотид.

алифатическими протонами и, по-видимому, для протонов, связанных с атомами С(5) и С(6) пиримидинов.

Процесс внедрения трития в молекулы растворителя (диоксана, тетрагидрофурана, этилацетата, диметилформамида, диметилацетамида, диметилсульфоксида и уксусного ангидрида) в присутствии гетерогенных катализаторов (PdO, PtO₂, Pd/BaSO₄) изучен в работе¹¹⁶. Показано, что доля трития, внедренного в результате непосредственного взаимодействия с растворителем пренебрежимо мала по сравнению с долей трития, внедренного в присутствии катализаторов. Степень внедрения трития зависит от чистоты растворителя. В предельно чистых растворителях тритий присутствует в виде тяжелой воды.

Методом каталитического гетерогенного обмена с газообразным тритием удалось синтезировать [³H]ацикловир,³⁹ а также следующие меченные тритием соединения:^{117–120}

Соединение	$A_{\text{мол}}, \text{Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$
5-Азацитидин	17.4
5-Аза-2'-дезокситидин	19.5
N ⁴ -(5-Аминопентил)цитидин	3.0
5-Метилцитидин	1.9
5-Метилцитозин	4.2
Арабинозил-5-азацитозин	12.5
5-Гидрокси[6- ³ H]урацил	0.35
5-Амино[6- ³ H]урацил	2.4
1-β-D-Арабинофуранозил[5,6- ³ H]цитозин	12.0
9-[(2-Гидроксиэтокси)метил][8- ³ H]гуанин	8.8
9-β-D-Арабинофуранозил[8- ³ H]аденин	1.0

В работе³⁸ показано, что использование в качестве предшественника 1-N-оксида АМФ существенно облегчает изотопный обмен трития у С(2) аденинового ядра. Описано

введение трития в динуклеозидфосфаты аденина¹²¹ и в группировку Р—Н 2'-дезоксиаденозин-5'-Н-фосфоната.¹²²

Измерены константы скорости жидкофазного каталитического гетерогенного протий-тритевого обмена [³H]-нуклеотидов аденинового ряда с водородом¹²³ (методика эксперимента приведена в работе¹²⁴). Установлено,¹²⁵ что скорость обмена уменьшается в следующем ряду: цАМФ > АТФ > АДФ > АМФ. Выведено уравнение зависимости константы скорости изотопного обмена от pH. В области низких концентраций нуклеотида в растворе порядок реакции по нуклеотиду равен 1, а при более высоких — близок к нулю.

Описан¹²⁶ общий метод специфического введения тритиевой метки в карбаматы бензимидазола (КБИ), включающий каталитический изотопный обмен в диоксане при 60°C в атмосфере трития. Выходы меченых КБИ составляют от 8 до 70%, молярная радиоактивность — от 0.44 до 13.4 Ки · ммоль⁻¹. При использовании газообразного трития в присутствии катализатора на основе комплексов иридия получены высокие значения молярной радиоактивности для бензофенонов, хинолинов, 2-аминопиридина и производных 2-аминобензооксазола, амидов бензоазепинона, сложных бензамидов.¹²⁷

Следует отметить, что реакции каталитического дегалогенирования и каталитического гетерогенного изотопного обмена протекают в схожих условиях. Это надо учитывать при проведении каталитических реакций гидрирования, дегалогенирования и т.п. Метка может вводиться как за счет химической реакции, так и за счет реакции изотопного обмена. Например, при дегалогенировании монобромпапаверина на палладиевом катализаторе получился продукт с $A_{\text{мол}} = 43 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$ (см.¹²⁸). При этом доля метки, обусловленная замещением брома на тритий, составила 49%, доля метки, обусловленная изотопным обменом протона метиленовой группы с тритием, — 46%, 5% распределено в других положениях. Аналогичный процесс происходит и при дегалогенировании 2-галогензамещенных пуринов: тритий замещает положение 2 за счет реакции дегалогенирования, а положение 8 — за счет реакции изотопного обмена.³⁸

Описанная реакция лежит в основе наиболее универсальных методов получения меченных тритием соединений. По универсальности метод сравним с методом изотопного обмена с тритийсодержащим растворителем. Основное преимущество метода — высокие значения молярных радиоактивностей получаемых соединений. Это связано с тем, что в качестве источника изотопа используют высокопроцентный (>95%) газообразный тритий, молярная радиоактивность которого выше, чем у любого тритийсодержащего растворителя. К недостаткам метода можно отнести тот факт, что в данных реакционных условиях могут протекать процессы дегалогенирования, гидрирования, восстановления различных функциональных групп.

V. Реакции восстановления и гидрирования

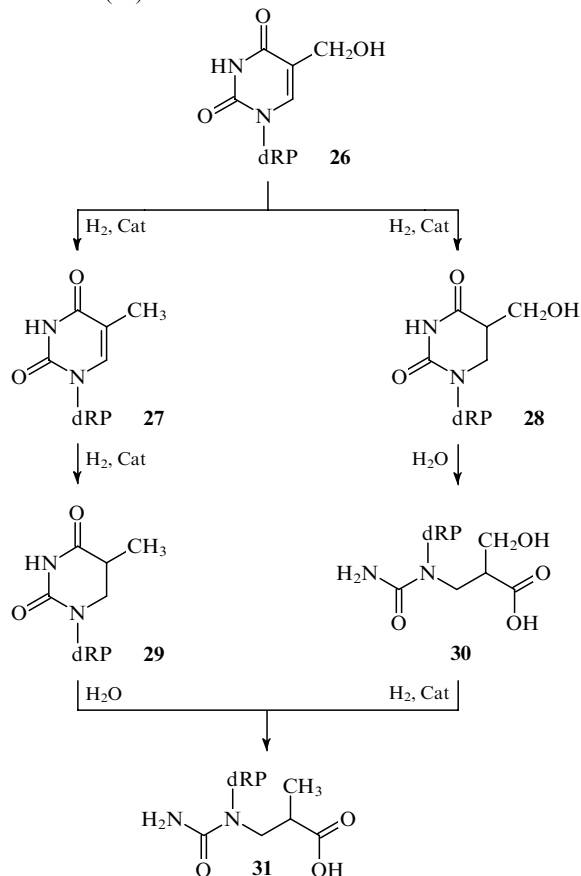
Процессы восстановления и гидрирования используются главным образом для введения тритиевой метки в метильную группу тимина и его производных, а также в углеводную часть нуклеозидов. Для восстановления используют обычно каталитические реакции с участием газообразного трития, меченные тритием NaBH₄ и LiAlH₄. В работе¹²⁹ триэтилбортретид лития (супер-третид), который получают при взаимодействии LiT и Et₃B, предложен для введения трития в соединения восстановлением некоторых функциональных групп.

Меченный тритием тимидин ($A_{\text{мол}} = 27.5 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$) был получен восстановлением 5-гидроксиметил-2'-дезоксидеоксиуридина в присутствии катализатора (родий на оксиде алюминия).¹³⁰ Восстановлением 5-формил-2'-дезоксидеоксиуридина

NaB^3H_4 в фосфатном буфере синтезирован меченный тритием 5-гидроксиметил-2'-дезокситуридин.¹³¹

Гидрированием в присутствии палладиевого катализатора 5-гидроксиметил- и 5-формилурацила получены^{132,133} препараты тимина с кратностью метки в метильной группе до двух. Описано¹³⁴ применение никеля Ренея для восстановления 5-формилурацила до 5-гидроксиметилурацила. В процессе гидрирования в воде 5-формилурацила газообразным тритием над катализатором 1.5% Pd/BaSO₄ образуется 5-гидроксиметил[гидроксиметил-³H]урацил ($A_{\text{мол}} = 64.8 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹³⁵ При дальнейшем восстановлении последнего тритием над палладием в сухом диоксане получается [метил-³H]тимин.¹³⁶ В работе¹³⁷ для получения тимина, полностью замещенного тритием в метильной группе, проводили каталитическое восстановление 5-цианурацила до альдимины, затем гидролиз последнего до 5-формилурацила с последующим каталитическим восстановлением газообразным тритием. При восстановлении этилендитиоацетата 5-формилурацила тритием в диоксане над никелем Ренея также образовывался¹³⁸ [метил-³H]тимин ($A_{\text{мол}} = 11.6 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$). Каталитическое восстановление газообразным тритием 5-формилурацила описано в работе¹³⁹.

Одностадийные методы получения меченного тритием тимидин-5'-монофосфата (ТМФ, 27) рассмотрены в работе¹⁴⁰. В качестве предшественников использовали 5-гидроксиметил-дУМФ (26) и 5-формил-дУМФ. Установлено, что в определенных условиях (природа применяемого катализатора, реакционная среда) гидрирование может затрагивать 5,6-двойную связь пиримидинового ядра. При этом образуются 5-гидроксиметил-5,6-дигидро-дУМФ (28), 5,6-дигидро-ТМФ (29), 2'-гидрокси-3-(N¹-2'-дезоксип-5'-фосфо-β-D-рибофуранозил)уреидоизомасляная кислота (30) и 3-(N¹-2'-дезоксип-5'-фосфо-β-D-рибофуранозил)уреидоизомасляная кислота (31).

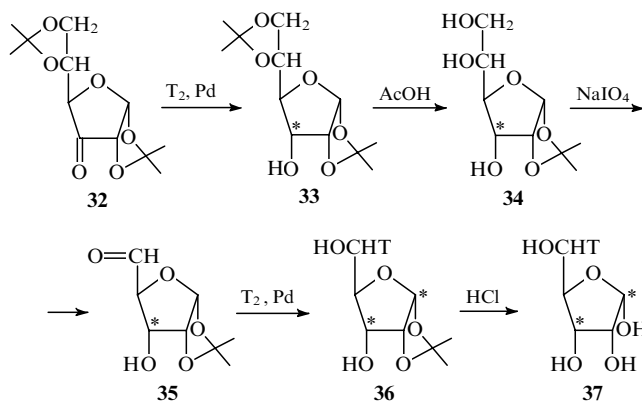


В основе общего метода синтеза нуклеозидов, меченных тритием при 5'-атоме углеводного остатка, лежит реакция восстановления β-D-рибопентдиальдо-1,4-фуранозидов со-

ответствующих нуклеиновых оснований газообразным тритием или бор[³H]гидридом натрия. Таким методом были, например, получены меченные по 5'-положению 9-β-арабинофуранозиладенин,¹⁴¹ тимидин,¹³⁸ 2',3'-O-изопропилиден-аденозин.¹⁴² Авторы работы¹⁴³ для синтеза меченных тритием в положении 5' углеводных остатков аденозина, гуанозина и уридина осуществляли восстановление газообразным тритием в присутствии катализатора, а также бор[³H]гидридом натрия. Окислением предшественника до 5'-альдегида с последующим восстановлением NaB^3H_4 был синтезирован [5'-³H]3'-азидо-3'-дезокситимидин ($A_{\text{мол}} = 14 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹⁴⁴

Дейтерирование и тритирование 2'-дезоксинуклеозидов в положения 5' и 4' описано в работе¹⁴⁵. Для этого из дезоксигуанозина, дезоксицитидина и тимидина по методу Моффата получали соответствующие 5'-альдегиды, при восстановлении которых NaBD_4 образовывались 5'-дейтеронуклеозиды. Нагревание 5'-альдегидов в смеси D_2O —Ru (1:1) с последующим восстановлением дает 4'-дейтеронуклеозиды. Отмечается, что применение подобной методики для введения трития приводит к соединениям с низкой молярной радиоактивностью. Описан способ¹⁴⁶ введения трития в олигодезоксирибонуклеотиды, заключающийся в том, что олигонуклеотид на носителе, имеющий свободную 5'-гидроксильную группу, окисляют подходящим окисляющим агентом до альдегида, затем восстанавливают, например NaB^3H_4 , при этом образуется 5'-гидроксиметильная группа с тритиевой меткой. Рибофлавин (витамин В₂), селективно меченный тритием по водороду в положении 5', получен¹⁴⁷ при восстановлении 5'-альдегидной группы бор[³H]гидридом натрия. Каталитическим гидрированием соответствующих ненасыщенных аналогов газообразным тритием были синтезированы [рибоза-2,3-³H]2',3'-дидезоксицитидинфосфонат,⁴³ [рибоза-2,3-³H]2',3'-дидезоксиаденозин и [рибоза-2,3-³H]2',3'-дидезоксиинозин.³³

Ключевым соединением в синтезе меченных тритием нуклеотидов и нуклеозидов является D-рибоза. Используя меченную тритием D-рибозу и гетероциклические основания в ферментативных реакциях,^{12, 24, 148, 149} можно синтезировать нуклеозиды и нуклеотиды с меткой в рибозной и гетероциклической частях молекул нуклеозидов и нуклеотидов. Нами предложена следующая схема получения меченной тритием D-рибозы: восстановление тритием кетона 1,2:5,6-ди-O-изопропилиден-α-D-рибогексоз-3-улозы (32) до 1,2:5,6-ди-O-изопропилиден-α-D-аллофуранозы (33), окисление 1,2-O-изопропилиден-α-D-аллофуранозы (34) до 1,2-O-изопропилиден-α-D-рибопентдиальдофуранозы (35) и восстановление последней до 1,2-O-изопропилиден-α-D-рибофуранозы (36), совмещенное с изотопным обменом водорода у атома C(1).



(Звездочкой отмечено место включения трития.)

Осуществление цепочки реакций по этой схеме дает возможность синтезировать меченную тритием D-рибозу (37) с кратностью метки до трех.

VI. Твердофазная каталитическая гидрогенизация

Метод твердофазной каталитической гидрогенизации (ТКГ) предложен в 1967 г. Реакцию дегалогенирования 5-иодурацила можно рассматривать как пример реакции ТКГ. В последующих работах показано, что в аналогичных условиях успешно протекают реакции гидрирования¹⁵⁰ и изотопного обмена.¹⁵¹ Сущность метода состоит в обработке газообразным тритием твердой смеси исходного соединения и катализатора. Для интенсификации процесса использовали внешний подвод энергии. Оптимальным оказался вариант инициирования реакции нагреванием реакционной смеси. В работе¹⁵² твердофазные реакции изотопного обмена получили дальнейшее развитие. Применение катализаторов значительно увеличивает степень включения метки, а также ее селективность. Авторы работ^{150, 151}, исследовавшие ТКГ при проведении реакций гидрирования, восстановления и изотопного обмена, пришли к выводу, что во всех случаях имел место новый процесс. В исследованиях^{153, 154} показано, что в основе ТКГ лежит спилловер водорода, активированного на катализаторе и его диффузия в слой органического соединения. Диффузионная модель этого процесса предложена в работе¹⁵⁵. Применимость модели была продемонстрирована на примере твердофазного изотопного обмена тимина, сопровождающегося гидрированием 5,6-двойной связи.¹⁵⁶ Степень изотопного замещения в реакции ТКГ зависит от природы металла-катализатора (Pd, Pt, Rh, Ru), природы носителя (BaSO₄, CaCO₃, Al₂O₃, SiO₂, C), соотношения катализатор–соединение, а также от температуры реакции.

Использование метода ТКГ в синтезе меченных тритием биологически важных диазинов дает хорошие результаты. В процессе ТКГ 5-формилурацила образуется тимин с молярной активностью, отвечающей включению трех атомов трития в метильную группу.^{132, 133} Изучение кинетики гидрирования 5-формилурацила показало,¹⁵⁷ что начиная с определенной температуры включение трития в тимин становится больше стехиометрического, отвечающего восстановлению формильной группы. Это объясняется тем, что в выбранных условиях наряду с реакцией восстановления протекает параллельная реакция изотопного обмена водорода формильной группы на тритий. В результате синтезируется тимин с практически полным замещением водорода на тритий в метильной группе ($A_{\text{мол}} \approx 87 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$). С использованием другого предшественника, а именно 5-гидроксиметилурацила, специально подобранного катализатора и более жестких реакционных условий был синтезирован¹⁵⁷ тимин, замещенный тритием по всем связям C–H ($A_{\text{мол}} > 100 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$), а с использованием в качестве предшественника 5-гидроксиметилдезоксигуанидина — тимидин ($A_{\text{мол}} = 76 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹⁵⁸

Рассмотрим основные закономерности введения тритиевой метки методом ТКГ на примере синтеза конкретных соединений. В работе¹⁵⁷ было показано, что в реакции ТКГ трития с пуриновыми основаниями в интервале температур 150–170°C наблюдается резкое увеличение скорости изотопного обмена. Это приводит практически к полному изотопному замещению водорода на тритий.

Результаты синтеза одиннадцати тритированных алкилксантинов в реакции ТКГ тритием приведены в статье¹⁵⁹. Анализ методом ЯМР ³H меченных соединений показал, что метка включается не только в положение C(8), но также и в алкильные группы. Зависимости выхода соединения **22**, полученного методом ТКГ тритием, и его молярной радиоактивности от температуры и весового соотношения катализатор–соединение рассмотрены в работе¹⁶⁰. Такие же зависимости для соединений **19** и **21** исследованы в работе¹⁶¹. Практически для всех изученных веществ с повышением температуры и отношения катализатор/соединение выход целевого соединения падает, но увеличивается его

молярная радиоактивность. Таким образом, варьирование условий реакции (температура, катализатор, весовое соотношение катализатор–соединение, продолжительность реакции) дает широкие возможности для синтеза меченных соединений.

Основным побочным процессом ТКГ является деградация (термолиз) исходного соединения. При синтезе меченного тритием 2',5'-олигоаденилата в продуктах реакции обнаружен продукт изомеризации, а именно 3',5'-изомер, который был отделен хроматографическим методом.¹⁶² В случае ТКГ пиримидинов, возможно протекание параллельной реакции гидрирования 5,6-двойной связи гетероциклического кольца с образованием соединений типа **28–31**.

Метод ТКГ использовался для введения тритиевой метки в соединения более сложного строения, такие как полинуклеотиды и природные биополимеры,¹⁶² например 15S РНК. Жидкофазный и твердофазный каталитический изотопный обмен с газообразным тритием 5'-Н-фосфонатов тимидина, 2'-дезоксаденозина, 2'-дезоксигидроксиметилуридина описан в работе¹⁶³. Методом ЯМР ³H показано, что тритий включается в группу Р–Н. Твердофазный метод получения ряда меченных тритием терминаторов синтеза ДНК (**22**, **23**, азидотимидинфосфонат, ацикловирфосфонат, 3'-дезокситимидин) описан в работе⁴³. Меченный тритием 5'-О-фосфонилметилтимидин ($A_{\text{мол}} = 71 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$) получен в твердофазной реакции изотопного обмена при 150°C.¹⁶⁴

В табл. 7 приведены значения $A_{\text{мол}}$ меченных тритием пуриновых и пиримидиновых соединений, полученных методом ТКГ. Данные значения выше значений молярной радиоактивности этих и аналогичных соединений, меченных другими методами. Для соединений относительно простого

Таблица 7. Значения молярных радиоактивностей для диазинов, полученных в реакциях ТКГ.

Соединение	<i>T</i> , °C	<i>A</i> _{мол} , Ки · ммоль ^{–1}
Аденин	170	54.2
Гуанин	210	24.9
Ксантин	180	25.1
Гипоксантин	200	51.1
Тимин ^a	140	85.0
Тимин ^b	170	110.0
Тимин ^c	170	115.0
Алкилксантины (11 наименований)	170	17–203
Урацил	170	49.0
Бензиладенин	190	180.0
Теofilлин	160	24.8
Фурфуриладенин	160	160.0
Аденозин	210	120.0
2'-Дезоксиаденозин	190	84.0
Гуанозин	210	69.0
2'-Дезоксигуанозин	200	35.0
Тимидин ^d	160	76.0
3'-Азидотимидин	120	30.0
Ацикловир	210	125.0
2',3'-Дидезокситимидин	120	66.0
3'-Азидотимидинфосфонат	120	63.0
Ацикловирфосфонат	120	56.0
2',5'-АрАрАр	200	58.0
3',5'-АрА	110	9.2
3',5'-АрАрА	110	50.0
3',5'-рАрАрАр	110	27.0
Поли-А (7–8 S)	180	10.2 ^e
Поли-У (12 S)	180	12.0 ^e
15 S РНК	180	12.1 ^e

^a Из 5-формилурацила. ^b Из 5-оксиметилурацила. ^c Из тимина. ^d Из 5-гидроксиметил-2'-дезоксигуанидина. ^e Удельная радиоактивность в Ки · г^{–1}.

Таблица 8. Характеристики различных методов синтеза меченных тритием биологически важных диазинов.

Реакция	Условия проведения реакции	$A_{\text{мол}}, \text{Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$
<i>Способ введения трития — химический синтез</i>		
Дегалогенирование	В растворе	15–45
	В твердой фазе	5–20
Гидрирование, восстановление	В растворе	15–40
	В твердой фазе	40–90
<i>Способ введения трития — изотопный обмен</i>		
Изотопный обмен с		
^3H -растворителем	В растворе	5–10
высокорadioактивной водой	»	до 25
газообразным тритием	»	5–25
	В твердой фазе	20–120, до 250

строения, таких как **2, 3, 10–13, 21**, удалось осуществить практически полное изотопное замещение водорода тритием. Варьируя состав твердой фазы и температуру, можно целенаправленно изменять выходы и молярные радиоактивности целевых соединений. Метод ТКГ не требует синтеза специальных предшественников, а возможности более полного изотопного замещения водорода тритием у него существенно выше, чем у других методов. К недостаткам ТКГ можно отнести деградацию термически лабильных соединений, протекание параллельных реакций гидрирования, дегалогенирования и восстановления различных функциональных групп. Однако в ряде случаев эти недостатки не являются решающими, так как тщательный выбор условий проведения реакции позволяет свести к минимуму (насколько это возможно) влияние побочных реакций и синтезировать соединения, содержащие гидрируемые группы (5,6-двойная связь пиримидинов), и даже термически нестойкие соединения (олиго-, полинуклеотиды, РНК).

Таким образом, метод ТКГ можно считать одним из наиболее перспективных для синтеза меченных тритием диазинов, в частности, входящих в биологически важные соединения.

Сравнительные характеристики различных методов синтеза меченных тритием биологически важных диазинов приведены в табл. 8.

VII. Другие методы введения тритиевой метки

Существует ряд методов, которые не нашли широкого распространения в синтезе меченных тритием природных диазинов. Некоторые производные пиримидина, меченные тритием в положении 5, были получены нагреванием соответствующих иодзамещенных соединений в среде ДМСО с тритированной водой при 160°C .¹⁶⁵ Молярная радиоактивность урацила, уридина, цитозина, цитидина и оротовой кислоты, полученных таким образом, составляла 30% от $A_{\text{мол}}$ взятой тритиевой воды.¹⁶⁶ Электролитическим восстановлением 5-бромурацила в тритиевой воде (ртутный катод, платиновый анод) синтезирован $[5\text{-}^3\text{H}]\text{урацил}$.¹⁶⁷

Реакцией декарбоксилирования над медным катализатором меченных тритием в карбоксильной группе 5-замещенных производных оротовой кислоты были получены $[6\text{-}^3\text{H}]\text{тимин}$ ¹⁶⁸ из 5-метилоротовой кислоты, 5-фтор- $[6\text{-}^3\text{H}]\text{урацил}$ ¹⁶⁹ и 5-бромурацил¹⁷⁰ из соответствующих 5-галогензамещенных оротовой кислоты. Молярная радиоактивность полученных соединений не превышала $1 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$. При нагревании в атмосфере газообразного трития оротовой кислоты, нанесенной на частично окисленный на воздухе катализатор Cu/BaSO_4 , был получен

$[6\text{-}^3\text{H}]\text{урацил}$ ($23 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹⁷¹ $\beta\text{-D-Арабинофуранозил-аденозин}$ ($A_{\text{мол}} = 0.43 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$) был получен в реакции изотопного обмена с газообразным тритием, активированным УФ-светом.¹⁷² Алкилированием $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]\text{аденозина}$ 4-бром-2-метил-2-бутеном в диметилформамиде синтезирован $N^6\text{-(2-изопентил)}[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{аденозин}$, который в результате аллильного окисления превращался в *транс*- $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{зеатин-рибозид}$ ($A_{\text{мол}} = 22 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹⁷³ При нагревании (60°C , 2 ч) $N^6\text{-(3-иодбензил)-}N^9\text{-[метил-(2,3-ди-}O\text{-ацетил-}\beta\text{-D-рибофуранозил)уронат]-2-хлораденозина}$ с меченным тритием метиламином в метаноле образовался $N^6\text{-(3-иодбензил)-}N^9\text{-[N-метил(}\beta\text{-D-рибофуранозил)-уронамид]}$ ($A_{\text{мол}} = 29 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹⁷⁴ Синтезом из меченного тритием тимидина получен азидотимидин.¹⁷⁵ Дезаминирование $[5\text{-}^3\text{H}]\text{1-}\beta\text{-D-арабинофуранозилцитозина}$ привело к образованию $[5\text{-}^3\text{H}]\text{1-}\beta\text{-D-арабинофуранозилурацила}$ ($A_{\text{мол}} = 20 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).³⁹ $[8\text{-}^3\text{H}]\text{9-}\beta\text{-D-Арабинофуранозил-аденин}$ ($A_{\text{мол}} = 10 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$),³⁹ $[2\text{-}^3\text{H}]\text{аденин}$ и $[2\text{-}^3\text{H}]\text{аденозин}$ ³⁸ являются продуктами каталитического восстановления десульфирования газообразным тритием соответствующих SH-производных. Процессы включения трития из газовой фазы в тимидин и дезоксиуридин в водном растворе рассматривались в работе¹⁷⁶. Тритий включался в эти соединения главным образом в результате атаки частицы $^3\text{HeT}^+$, а не в результате радиолиза β -частицами.

VIII. Заключение

В настоящее время синтез меченных тритием физиологически важных соединений можно считать самостоятельной областью прикладной радиохимии, в которой используются подходы и методы биоорганической химии, биохимии, энзимологии. Для исследований в этой области характерны разработка эффективных способов введения трития и организация выпуска меченой продукции. На основе изложенного в настоящем обзоре можно сделать ряд выводов о состоянии проблемы синтеза меченных тритием диазинов.

В 1970-х годах в связи с бурным развитием молекулярной биологии и молекулярной генетики резко возросла потребность в меченных тритием компонентах нуклеиновых кислот. Это инициировало разработку новых и совершенствование известных способов их синтеза. Соединения, меченные тритием, сыграли важную роль в изучении структуры и функций нуклеиновых кислот. Общим методом синтеза меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот можно назвать реакцию каталитического дегалогенирования в растворе. Развитие этого метода дало возможность получать соединения с определенным положением метки и относительно высокой ($20\text{--}30 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$) молярной радиоактивностью. Необходимость иметь в ряде биологических экспериментов компоненты нуклеиновых кислот, обладающие высокой и сверхвысокой молярной радиоактивностью, стимулировала разработку способов получения кратно-меченых пуриновых и пиримидиновых оснований. К этим способам относятся реакции каталитического дегалогенирования (например, 2,8-дихлораденина и 5-бром-, 6-хлорурацила) и твердофазной каталитической гидрогенизации (например, синтез $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{аденина}$ и $[\text{метил-}6\text{-}^3\text{H}]\text{тимина}$ из соответствующих немеченых предшественников). Использование ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма открыло простой и надежный путь получения практически всего набора кратно меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот.

В последнее время возрастает интерес к фармацевтическим препаратам, меченным тритием, — соединениям довольно сложной структуры. Для диазинов это главным образом различные терминаторы синтеза ДНК, лекарственные препараты на стадии фармакологических испытаний, коферменты. Для синтеза этих и подобных соединений, меченных тритием, чаще всего используются каталитичес-

кие реакции изотопного обмена, в частности изотопный обмен с газообразным тритием в растворе и без растворителя (в твердой фазе). Такие реакции можно рассматривать как экспресс-методы, не требующие синтеза специальных предшественников. В твердофазных реакциях изотопного обмена с газообразным тритием были получены, например, меченные никотинамидадениндинуклеотид ($111 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$) и кофермент А ($3.9 \text{ Ки} \cdot \text{ммоль}^{-1}$).¹⁷⁷ Ограничением применения реакций изотопного обмена с участием газообразного трития является наличие в исходном соединении легко восстанавливаемых или гидрируемых групп, которые могут модифицироваться или замещаться на тритий. В этом случае перспективным методом можно назвать реакцию изотопного обмена с высокоактивной тритиевой водой. Возможности применения этого метода для синтеза меченных тритием биологически активных соединений, в том числе диазинов, рассмотрены в работе¹⁷⁸.

Литература

1. А.А.Краевский, Р.Ш.Библашвили. В кн. *Иммунология. СПИД (Фундаментальные биомедицинские исследования)*. Т. 29. (Итоги науки и техники). Изд-во ВИНТИ, Москва, 1992. С.123
2. М.К.Куханова, А.А.Краевский. В кн. *Иммунология. СПИД (Фундаментальные биомедицинские исследования)*. Т. 29. (Итоги науки и техники). Изд-во ВИНТИ, Москва, 1992. С.163
3. K.W.Rosenmund. *Berichte*, **51**, 585 (1918)
4. T.Andre, S.Ulberg. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 494 (1957)
5. M.Gut, M.Uskokovic. *Naturwissenschaften*, **40**, 40 (1960)
6. E.A.Evans. *Tritium and Its Compounds*. Butterworths, London, 1974
7. B.Cerny, J.Hanus. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **28**, 947 (1990)
8. J.Filip. *Radioisotopy*, **11**, 61 (1970)
9. J.Filip. *Radioisotopy*, **19**, 225 (1978)
10. W.Vaalburg, B.van Zanten, C.Buijze. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **87**, 827 (1968)
11. J.Roemer, M.Kiessling. *Isotopenpraxis*, **11**, 150 (1975)
12. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров, О.Б.Кузнецова, В.М.Минов, Е.К.Иванькова, М.Д.Франк-Каменецкая, Т.Ю.Лазуркина, В.А.Орлова. *Радиохимия*, **23**, 607 (1981)
13. J.Filip. *Radioisotopy*, **11**, 203 (1970)
14. J.Filip, J.Havlicek. *Yad. Energ.*, **15**, 388 (1969)
15. J.Filip, H.Skoda, H.Hradec. *J. Labelled Compd.*, **10**, 59 (1974)
16. J.Filip, L.Bohacek. *Radioisotopy*, **12**, 949 (1971)
17. В.М.Вдовенко, В.Н.Боброва, Э.Г.Айрапетянц, А.В.Жарков. В кн. *Производство изотопов*. Атомиздат, Москва, 1973. С. 180
18. В.М.Вдовенко, В.Н.Боброва, Л.С.Гордеева, В.К.Дедова. *Радиохимия*, **14**, 457 (1972)
19. L.Bohacek, J.Filip. *Radioisotopy*, **14**, 783 (1973)
20. В.М.Вдовенко, В.Н.Боброва, Э.Г.Айрапетянц, Л.С.Гордеева, В.К.Дедова, Н.А.Патокина. *Радиохимия*, **15**, 726 (1973)
21. W.H.Sheng, Y.S.Hsueh, W.L.Wu, P.Hsueh. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **9**, 201 (1977); *Chem. Abstr.*, **88**, 191316 (1978)
22. J.Filip, H.Hradec. *Radioisotopy*, **29**, 52 (1988)
23. И.Филипп, Л.Богачек. В кн. *Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Ч. 1. (Материалы II Симп. стран-членов СЭВ)*. ЦНИИАтоминформ, Москва, 1982. С. 102
24. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров, О.Б.Кузнецова, М.Д.Франк-Каменецкая, Т.Ю.Лазуркина, В.А.Орлова. *Радиохимия*, **26**, 341 (1984)
25. Н.М.Аникеев, В.В.Иванов, В.Н.Крамеров, Ф.В.Татаркина, Л.Б.Кудрявцева, В.И.Мишин, Н.А.Игнатьева, Л.Н.Каклюшкина. В кн. *Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Ч. 1. Материалы II Симп. стран-членов СЭВ*. ЦНИИАтоминформ, Москва, 1982. С. 137
26. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров. *Радиохимия*, **22**, 574 (1980)
27. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров. *Радиохимия*, **22**, 579 (1980)
28. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров. *Радиохимия*, **22**, 911 (1980)
29. Н.Ф.Мясоедов, Ю.Г.Квятковский, Г.В.Сидоров. *Радиохимия*, **23**, 122 (1981)
30. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров. *Радиохимия*, **23**, 281 (1981)
31. Н.Ф.Мясоедов, Г.В.Сидоров. *Радиохимия*, **23**, 288 (1981)
32. Л.С.Гордеева, Н.А.Патокина, Н.А.Корсакова, Л.Н.Румянцева, В.К.Дедова, Л.Ф.Чернышова, А.Г.Неопиханова, Ю.Л.Каминский. В кн. *Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Ч. 1. Материалы II Симп. стран-членов СЭВ*. ЦНИИАтоминформ, Москва, 1982. С. 127
33. G.F.Taylor, J.A.Kepler. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **27**, 683 (1989)
34. Л.С.Гордеева, Ю.Л.Каминский, Л.Н.Румянцева, Н.А.Патокина, Н.А.Корсакова, Л.Ф.Чернышова, В.К.Дедова, В.Л.Ефимова, А.Г.Неопиханова. *Химия природ. соединений*, **6**, 771 (1984)
35. D.K.Jaiswal, H.Morimoto, E.L.Trump, P.G.Williams, D.E.Wemmer. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **38**, 743 (1996)
36. F.Lin, D.Shen. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*, **52**, 79 (1983); *Chem. Abstr.*, **99**, 172150 (1983)
37. Пат. 255180 СССР; *Chem. Abstr.*, **111**, 174116 (1989)
38. Ю.Л.Каминский, Л.С.Гордеева, Г.П.Акулов, Н.А.Патокина, Л.Л.Щербакова. *Радиохимия*, **29**, 670 (1987)
39. Л.А.Яковлева, Г.П.Акулов, А.И.Нагорский, Н.А.Патокина, Ю.Л.Каминский, Р.А.Жук. *Химия гетероцикл. соединений*, **1**, 95 (1988)
40. Пат. 159547 ГДР; *Chem. Abstr.*, **99**, 195357 (1983)
41. T.G.Hamil, N.J.Brenner, W.Eng, H.D.Burns. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **41**, 319 (1998)
42. P.G.Baraldi, B.Cacciari, S.Dionisotti, J.Egan, G.Spalluto, C.Zocchi. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **38**, 725 (1996)
43. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **19**, 1215 (1993)
44. А.с. 243621 СССР; *Бюл. изобрет.*, (39), 159, (1976)
45. А.с. 498823 СССР; *Бюл. изобрет.*, (39), 159 (1976)
46. Н.Ф.Мясоедов, Н.С.Марченков, К.С.Михайлов. В кн. *Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. (Сборник докл.)*. Чехословацкая комиссия по атомной энергии, Прага, 1977. С. 275
47. А.с. 404348 СССР; *Бюл. изобрет.*, (39), 159 (1976)
48. А.с. 462467 СССР; *Бюл. изобрет.*, (39), 159 (1976)
49. N.F.Myasoev. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **33**, 391 (1993)
50. J.R.Brewer, J.R.Jones, K.W.M.Lawrie, D.Saunders, A.Simmonds. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1566 (1990)
51. D.Hesk, J.R.Jones, W.J.S.Lockley. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **28**, 1427 (1990)
52. J.R.Brewer, J.R.Jones, K.W.M.Lawrie. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **34**, 391 (1994)
53. J.R.Brewer, J.R.Jones, K.W.M.Lawrie. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **34**, 787 (1994)
54. T.Cato. *Shokubai Catalyst*, **18**, 92 (1976); *РЖХим.*, 4 Б 1275 (1977)
55. R.R.Muccino, L.Serio. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **15**, 529 (1978)
56. E.Buncel, J.R.Jones, H.A.Joly, I.Onyido. In *Proceedings of the Third International Symposium on Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*. (Eds T.A.Baillie, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1989. P. 219
57. J.R.Jones. *J. Labelled Compd.*, **4**, 197 (1968)
58. N.H.Werstiuk, C.Ju. *Can. J. Chem.*, **67**, 812 (1989)
59. G.E.Calf, J.L.Garnet. *Adv. Heterocycl. Chem.*, **15**, 137 (1973)
60. Н.Н.Зацепина, И.Ф.Тупицын. *Химия гетероцикл. соединений*, **12**, 1587 (1974)
61. J.L.Wong, J.H.Keck Jr. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 125 (1975)
62. M.L.Eidinoff, J.E.Knoll. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1992 (1953)
63. F.J.Bullock, O.Jardetzky. *J. Org. Chem.*, **29**, 1988 (1964)
64. M.P.Schweizer, S.I.Chan, G.K.Helmkamp, P.O.P.Ts'o. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 696 (1964)
65. H.Fritzche. *Biochem. Biophys. Acta*, **149**, 173 (1967)
66. K.R.Shelton, J.M.Clark. *Biochemistry*, **6**, 2735 (1967)
67. Н.А.Федоров, Н.Н.Котов, Э.Ф.Тихонова. *Вопр. мед. химии*, **16**, 441 (1970)
68. Л.А.Остерман, В.В.Адлер, Р.Ш.Библашвили. *Вопр. мед. химии*, **13**, 200 (1967)
69. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **16**, 922 (1974)
70. R.C.Gamble, H.J.P.Schoemaker, E.Ejekowsky, P.R.Schimmel. *Biochemistry*, **15**, 2791 (1976)

71. M.J.Graham, E.A.Lesnik, S.M.Freier, R.M.Crooke, D.J.Ecker, R.N.Maslova. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3737 (1993)
72. В.Л.Друца, Н.И.Соколова, З.А.Шабарова. *Мол. биол.*, **8**, 921 (1974)
73. V.Lauschke, E.Lodemann, A.Wacker. *J. Labelled Compd.*, **7**, 441 (1971)
74. Л.А.Остерман, В.В.Адлер, Р.Ш.Библашвили, Л.П.Савочкина, Я.М.Варшавский. *Биохимия*, **31**, 398 (1966)
75. F.Doppler-Bernardi, G.Felsenfeld. *Biopolymers*, **8**, 733 (1969)
76. K.R.Shelton, J.M.Clark. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 850, (1968)
77. K.A.Patillon, A.M.Michelson. *Biochimie*, **58**, 743 (1976)
78. H.J.P.Schoemaker, R.C.Gamble, G.P.Budzik, P.R.Schimmel. *Biochemistry*, **15**, 2800 (1976)
79. V.L.Drutsa. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **9**, 259 (1981); *Chem. Abstr.*, **96**, 35683 (1982)
80. D.Hesk, T.Duelfert, S.Hickey, D.Hochman, D.Koharski. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **34**, 681 (1994)
81. G.Mackenzie, A.E.Platt, H.A.Wilson, G.Shaw. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2055 (1985)
82. R.N.Maslova, E.A.Lesnik, Ya.M.Varshavskii. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 260 (1969)
83. Р.Н.Маслова, Е.А.Лесник, Ф.А.Сафин, Я.М.Варшавский. В кн. 7-ой Международный симпозиум по химии природных соединений. Зинатне, Рига, 1970. С. 736
84. Е.А.Лесник, Р.Н.Маслова, Я.М.Варшавский. *Мол. биол.*, **10**, 144 (1976)
85. R.N.Maslova, E.A.Lesnik, Ya.M.Varshavskii. *FEBS Lett.*, **3**, 211 (1969)
86. E.A.Lesnik, R.N.Maslova, T.G.Samsonidze, Ya.M.Varshavskii. *FEBS Lett.*, **33**, 7 (1973)
87. J.J.Englander, N.R.Kallenbach, S.W.Englander. *J. Mol. Biol.*, **63**, 153 (1972)
88. J.M.Benevides, G.J.Thomas Jr. *Biopolymers*, **24**, 667 (1985)
89. G.N.Lapiashvili, E.A.Lesnik, R.N.Maslova, Ya.M.Varshavskii. *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2181 (1977)
90. M.Tomasz, J.Olson, C.M.Mercado. *Biochemistry*, **11**, 1235 (1972)
91. Р.Н.Маслова, Е.А.Лесник, Я.М.Варшавский. *Мол. биол.*, **9**, 310 (1975)
92. И.М.Агранович, Е.А.Лесник, Р.Н.Маслова. *Мол. биол.*, **20**, 200 (1986)
93. R.N.Maslova, E.A.Lesnik, Ya.M.Varshavskii. *FEBS Lett.*, **49**, 181 (1974)
94. R.W.Chambers. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2192 (1968)
95. G.De Boer, H.E.Johns. *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 18 (1970)
96. T.Ido, M.Tatora, V.Kasida. *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.*, **24**, 81 (1973)
97. L.Cheong, M.A.Rich, M.L.Eidnoff. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1441 (1960)
98. R.M.Fink, K.Fink. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2889 (1962)
99. R.M.Fink. *J. Biol. Chem.*, **238**, 1764 (1963)
100. R.M.Fink. *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 493 (1964)
101. W.J.Wechter. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **35**, 2003 (1970)
102. J.A.Rabi, J.J.Fox. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1628 (1973)
103. R.Shapiro, R.S.Klein. *Biochemistry*, **6**, 3576 (1967)
104. S.R.Heller. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 998 (1968)
105. K.Kai, Y.Wataya, H.Hayatsu. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2089 (1971)
106. V.Sh.Scheiker. *Nucl. Acids Res.*, **3**, 809 (1976)
107. Y.Wataya, H.Hayatsu. *Biochemistry*, **11**, 3583 (1972)
108. Y.Wataya, H.Hayatsu, Y.Kawazoe. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8927 (1972)
109. Y.Wataya, H.Hayatsu, Y.Kawazoe. *J. Biochem.*, **73**, 871 (1973)
110. G.V.Sidorov, O.V.Lushkina, N.F.Myasoedov, V.N.Kramarov, V.I.Mishin. In *Proceedings of the Forth International Symposium on Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*. (Eds E.Buncel, G.W.Kabalka). Elsevier, Amsterdam, 1992. P. 456
111. Х.К.Авлянов, О.Н.Вешкурова, А.А.Таканаев, Ш.И.Салихов. *Химия природ. соединений*, **5**, 684 (1988)
112. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **40**, 70 (1998)
113. O.Buchman, I.Pri-Bar, M.Shimoni, L.Smoskowitz. *J. Labelled Compd.*, **10**, 345 (1974)
114. E.A.Evans, H.C.Sheppart, J.C.Turner, D.C.Warrell. *J. Labelled Compd.*, **10**, 569 (1974)
115. O.Buchman, I.Pri-Bar, M.Shimoni. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **14**, 155 (1978)
116. J.Hanus, B.Cerny, J.Benes. *J. Labelled Compd.*, **10**, 523 (1974)
117. B.Cerny, J.Hanus, J.Benes. *Radiochem. Radioanal. Lett.*, **35**, 211 (1978)
118. B.Cerny, J.Hanus, J.Machej. *Radiochem. Radioanal. Lett.*, **37**, 281 (1979)
119. G.F.Taylor, K.Zamani, J.A.Kepler. *J. Labelled Compd.*, **25**, 1073 (1988)
120. M.Kiessling, K.H.Heise. *Isotopenpraxis*, **13**, 324 (1977)
121. Г.П.Акулов, Н.А.Патокина. *Радиохимия*, **31** (4), 132 (1989)
122. Ю.Л.Каминский, О.И.Козырева, Л.А.Яковлева, Н.Б.Тарусова, М.В.Ясько. *Журн. общ. химии*, **61**, 1037 (1991)
123. Г.П.Акулов, Ю.Л.Каминский, Н.А.Патокина. *Журн. общ. химии*, **59**, 2555 (1989)
124. Ю.Л.Каминский, Г.П.Акулов, В.Г.Каюмов, Э.А.Гутина. *Журн. общ. химии*, **59**, 2401 (1989)
125. Г.П.Акулов, Ю.Л.Каминский, Н.А.Патокина. *Radioisotopy*, **29**, 119 (1988)
126. E.Lacey, M.Dawson, M.A.Long, C.Than. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **27**, 1415 (1989)
127. W.Chen, K.T.Garnes, S.H.Levinson, D.Saunders, S.G.Senderoff, A.Y.L.Shu, A.J.Villani, J.R.Heys. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **39**, 291 (1997)
128. J.Devillers, M.Winnand, B.Bettens. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **12**, 219 (1976)
129. R.M.Coates, S.Hegle, C.J.Pearce. In *Proceedings of the International Symposium on Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*. (Eds W.P.Duncan, A.B.Susan). Elsevier, New York, 1983. P. 429
130. K.V.Viswanathan, A.U.Garana, R.Lakshmy, B.R.Sarkar. *Proc. Chem. Symp. Aligarh*, **1**, 85 (1972); *Chem. Abstr.*, **81**, 120919 (1974)
131. J.S.Park, C.F.Bigge, M.E.Hassan, L.Maggiore, M.P.Merter. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **8**, 553 (1984)
132. Е.К.Иванькова, Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **23**, 296 (1981)
133. G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **121**, 461 (1988)
134. U.Pleiss. In *Proceedings of the Third International Symposium on Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds*. (Eds T.A.Bailie, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1989. P. 521
135. E.Mittag, S.Noll. *Isotopenpraxis*, **26**, 138 (1990)
136. U.Pleiss, J.Roemer. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **20**, 1355 (1983)
137. Л.А.Яковлева, Ю.Л.Каминский, О.И.Козырева, Л.П.Соснова. *Radioisotopy*, **29**, 110 (1988)
138. U.Pleiss. *Radiochem. Radioanal. Lett.*, **51**, 363 (1982)
139. H.-C.Chang, S.-K.Chiang, Y.-F.Yeh. *Nucl. Tech.*, (1), 59 (1981); *Chem. Abstr.*, **95**, 151091 (1981)
140. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **22**, 291 (1996)
141. D.C.Baker, T.H.Haskell. *J. Med. Chem.*, **18**, 1041 (1975)
142. G.Guillerm, M.C.Galas, F.Le Goffic. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **23**, 845 (1986)
143. Г.П.Акулов, Ю.Л.Каминский, А.Д.Шестаков, В.Г.Каюмов, Л.Ф.Чернышова, Н.А.Патокина. *Биоорг. химия*, **14**, 37 (1988)
144. J.A.Hill, G.A.Freeman. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **25**, 277 (1988)
145. M.Berger, A.Shaw, J.Cadet, J.R.Jones. *Nucleosides Nucleotides*, **6**, 395 (1987)
146. Пат. 485112 США; *Chem. Abstr.*, **126**, 104369 (1996)
147. T.N.Kekelidze, D.E.Edmondson, D.B.McCormick. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **36**, 953 (1995)
148. P.Pumpen, E.Gren. *J. Labelled Compd.*, **8**, 193 (1972)
149. П.П.Пумпен, В.Э.Тауринь, Э.Я.Грен. *Биохимия*, **39**, 504 (1974)
150. Yu.A.Zolotarev, V.S.Kozic, E.M.Dorokhova, N.F.Myasoedov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **29**, 997 (1991)
151. Yu.A.Zolotarev, V.S.Kozic, E.M.Dorokhova, D.A.Zaitsev, N.F.Myasoedov, S.G.Rosenberg. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Articles*, **162**, 3 (1992)
152. T.Meshi, T.Takahashi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **35**, 1510 (1962)
153. A.V.Filikov, N.F.Myasoedov. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, **85**, 373 (1984)
154. A.V.Filikov, N.F.Myasoedov. *J. Catal.*, **130**, 355 (1991)
155. A.V.Filikov, N.F.Myasoedov. *J. Phys. Chem.*, **90**, 4915 (1986)

156. A.V.Filikov, N.F.Myasoedov. *J. Catal.*, **130**, 569 (1991)
157. G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **34**, 353 (1994)
158. N.F.Myasoedov, G.V.Sidorov, O.V.Lushkina. In *Proceedings of the Forth International Symposium on Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*. Elsevier, Amsterdam, 1992. P. 460
159. Yu.L.Kaminskii, G.P.Akulov, N.A.Patokina, S.G.Rosenberg. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **31**, 759 (1992)
160. G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov, M.V.Yasko. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **34**, 339 (1994)
161. О.В.Лушкина, Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **19**, 113 (1993)
162. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **37**, 270 (1995)
163. Ю.Л.Каминский, Л.А.Яковлева, О.И.Козырева, В.А.Бабаин, Н.Б.Тарусова, М.В.Ясько, С.Г.Розенберг. *Биоорг. химия*, **17**, 1510 (1991)
164. М.В.Ясько, Г.В.Сидоров, Р.В.Кондратов, В.С.Прасолов, Н.Ф.Мясоедов, А.А.Краевский. *Биоорг. химия*, **24**, 21 (1998)
165. J.J.Kopecky, B.Pavlu. *Radioisotopy*, **12**, 967 (1971)
166. J.J.Kopecky, B.Pavlu. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 2039 (1972)
167. C.Bratu. *J. Labelled Compd.*, **7**, 161 (1971)
168. C.Parkanyi, F.Sorm. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 2491 (1963)
169. J.Filip, F.Vysata. *J. Labelled Compd.*, **5**, 295 (1969)
170. J.Moravek, J.Filip. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **25**, 2697 (1960)
171. А. с. 899552 СССР; *Бюл. изобрет.*, (3), 48 (1982)
172. R.Luo, J.Wang, Z.Lin, Z.Fang, G.Huang. *Fenxi Ceshi Tongbao*, **8**, 40 (1989); *Chem. Abstr.* **112**, 198954 (1990)
173. M.Laloue, J.E.Fox. *Phytochemistry*, **26**, 987 (1987)
174. H.O.Kim, C.Hawes, P.Towers, K.A.Jacobson. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **38**, 547 (1996)
175. S.K.Aggarwal, D.R.Shalinsky, K.C.Aggarwal. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **25**, 1055 (1988)
176. F.Cacae, G.Stocklin. *Curr. Top. Radiat. Res. Q.*, **12**, 103 (1978)
177. Г.В.Сидоров, Ю.Б.Зверков, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, (1999) (в печати)
178. N.F.Myasoedov, G.V.Sidorov, V.N.Kramerov, V.I.Mishin. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, (1999) (in the press)

SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED BIOLOGICALLY IMPORTANT DIAZINES

G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences

46, Pl. I.V.Kurchatova, 123182 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)196-0221

The methods of the introduction of tritium (by chemical synthesis and isotope exchange both in solution and the solid state) into biologically active diazines — nucleic acid components (heterocyclic bases, nucleosides, nucleotides), DNA synthesis terminators and cytokinins are considered.

Bibliography — 178 references.

Received 2nd July 1998