

SYNTHÈSE ET MARQUAGE RADIOACTIF DE STILBÈNES TRIAZINIQUES SUBSTITUÉS À CARACTÈRE LYMPHOTROPE.

J.C. Madelmont et A. Veyre.

INSERM. Unité de Recherche U 71

Etude métabolique des molécules marquées.

63005 Clermont-Ferrand Cedex. B.P.184.

Received on March 5, 1973.

SUMMARY

The ^{125}I and ^{131}I labelling of lymphotropic triazinic stilbenes is carried out by the introduction of labelled 5-iodo, 2-amino, benzoic acid during the synthesis. These compounds allow the dynamic exploration of the lymphatic system and the easy obtention of indirect lymphographies.

RESUME

Le marquage par ^{125}I et ^{131}I de stilbènes triaziniques à caractère lymphotrope a été réalisé par fixation de l'acide iodo-5, amino-2, benzoïque au cours de la synthèse. Les substances préparées permettent de réaliser l'exploration dynamique du système lymphatique et d'obtenir de manière simple des lymphographies indirectes.

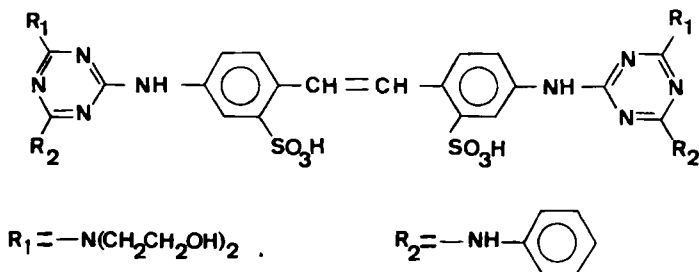
Dès 1964, GOUAZE, CASTAING et SOUTOUL ont utilisé la propriété d'émission de fluorescence des stilbènes triaziniques excités par la lumière ultra-violettes ($\lambda = 340 \text{ nm}$) pour visualiser le système lymphatique au cours d'une intervention chirurgicale (1).

Etant donné le tropisme sélectif de ces molécules pour ce système lymphatique, il nous a paru intéressant de préparer et de marquer ces composés par des émetteurs α et β afin de suivre par détection externe leur devenir dans l'organisme, d'étudier leur métabolisme et d'obtenir des lymphographies indirectes.

Les nouvelles possibilités offertes par certains de ces composés marqués ont été soulignées dans une récente note à l'Académie des Sciences (2).

Dans ce travail nous nous proposons de rapporter nos essais sur le stilbène triazinique précité et de décrire la synthèse et le marquage de composés nouveaux possédant un lymphotropisme important.

Le triazinyl stilbène utilisé a la structure suivante :



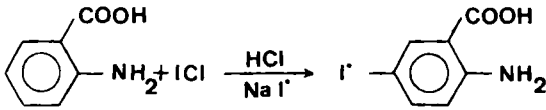
Nous avons essayé dans un premier temps d'halogéner cette molécule par action de l'iode moléculaire ou du monochlorure d'iode dans différents milieux : $NH_4 OH$, HCl , CH_3COOH . Nous espérons fixer l'iode par substitution électrophile sur les groupements "anilino" du produit. Ces méthodes ne nous ont pas donné les résultats escomptés en raison : d'une part, de la fixation anarchique de l'iode et d'autre part, de la forte diminution de solubilité dans l'eau du stilbène due au caractère hydrophobe de l'iode. Cette perte de solubilité dans l'eau donc dans les milieux biologiques ne modifie pas forcément le tropisme du composé mais empêche certainement sa diffusion et rend très aléatoire l'obtention d'une lymphographie indirecte.

Afin de ne pas gêner les applications biologiques nous avons dû étudier en priorité le paramètre hydrosolubilité.

Nous avons été amenés parallèlement à concevoir le marquage le plus univoque possible.

Nous avons pensé résoudre cette double difficulté en introduisant au cours de la synthèse un vecteur d'iode possédant un groupement hydrosolubilisant : l'acide iodo-5 amino-2, benzoïque.

La préparation et le marquage s'effectuent à partir de l'acide anthranilique (3) selon le schéma suivant :



La synthèse du stilbène triazinique s'effectue selon le schéma indiqué sur la figure 1.

L'acide stilbène diamino-4, 4' disulfonique -2, 2' est préparé par la méthode de HUANG-MINLON (4).

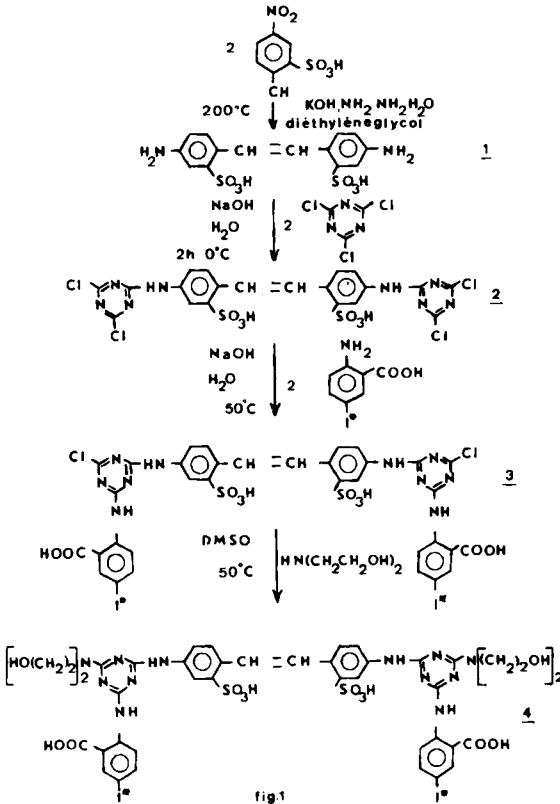


fig 1

Nous fixons ensuite le cycle triazinique, pour cela nous utilisons le chlorure de cyanuryle et nous employons la technique de DUDLEY, SCHAEFFER, coll (5). Ces auteurs ont montré que les amines primaires et secondaires substituent les chlores de la triazine.

La première substitution s'effectue à 0° C, la seconde à 50°C et la troisième la plus difficile à réaliser, entre 90° et 100° C, en milieu aqueux.

Nous avons utilisé cette technique pour préparer les dérivés 2 et 3.

La troisième substitution n'étant pas toujours quantitative et étant thermiquement contraignante (plusieurs heures à 90, 100° C) nous avons cherché des conditions plus douces de température.

Des travaux effectués dans notre laboratoire par CAUBERE et PARRY (6) ont montré qu'il était possible de préparer les dérivés trisubstitués des dianilino -2,4 chloro-6, s triazines dans les solvants aprotiques dipolaires tels que le diméthyl sulfoxyde (D M S O), le diméthyl formamide (D M F) et l'acétonitrile (A N).

Dans notre cas, c'est le D M S O qui a donné les meilleurs résultats, il permet de réaliser la condensation en deux heures à 50° C et d'aboutir au dérivé trisubstitué 4.

Les produits 3 et 4 ont été marqués par ^{125}I et ^{131}I , nous avons obtenu respectivement des activités spécifiques de 8,2 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ et 7,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

Ces composés sont solubles dans l'eau sous leur forme sel, de plus ils sont stables, en effet : une étude en chromatographie sur papier nous a montré qu'au bout de trois mois les produits n'étaient pas déshalogénés.

L'échec de marquage direct du stilbène triazinique nous a conduit à préparer des molécules de structure voisine, présentant toujours un tropisme marqué pour le système lymphatique, facilement hydrosolubilisables, permettant donc de réaliser des lymphographies indirectes non traumatisantes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités :

Les spectres infrarouges ont été effectués sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 257.

Les spectres ultraviolets ont été réalisés sur un appareil Leres 357
D M S.

Les mesures de radioactivité sont effectuées avec un compteur à cristal puits INa (T1) relié à un sélecteur d'amplitude et à une échelle de comptage. La largeur de la bande utilisée est de 10 Volts. Elle est centrée sur le pic d'absorption totale de ^{125}I (27 Kev) ou de ^{131}I (364 kev).

Les chromatographies sur couches minces ont été analysées sur un dérouleur de chromatographie équipé d'une sonde à cristal plat INa (T1)(27 mm)

- Les échantillons d'iodure de sodium marqué, sont fournis par le C E A.
- Les dosages d'iode sur les produits non actifs sont effectués par la méthode de Schoeninger.

Préparation de l'acide amino-2, iodo-5, benzoïque :

A une solution bien agitée de 6 mM d'acide amino-2, benzoïque dans 0,6 cm³ d'acide chlorhydrique concentré (d = 1,18) et 7,5 cm³ d'eau, on additionne une solution froide (0 - 5° C) contenant 1,05 cm³ d'acide chlorhydrique concentré 6 mM de chlorure d'iode et 5 cm³ d'eau, laisse une heure à température ambiante, puis filtre le précipité et purifie par plusieurs passages acide-base.

On laisse sécher à l'air et obtient 1,1 g de produit : Rdt = 70 %

F = 208° C

Litt₍₇₎ F = 210° C

IR : 3495 cm⁻¹ et 3380 cm⁻¹

NH₂

3300 2500 cm⁻¹

OH (COOH)

1660 cm⁻¹

C = O (COOH)

Le marquage par ^{125}I et ^{131}I s'effectue en sorbonne blindée par l'adjonction d'une solution de ^{131}I Na sans entraîneur et sans réducteur à la solution de monochlorure d'iode. Le reste de la préparation est le même que ci-dessus.

A partir d'un échantillon de 30 mCi de ^{125}I nous avons obtenu, dans ces conditions, une activité spécifique de 17,8 $\mu\text{Ci/mg}$.

La chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 2 élué par NH₄OH (NH₃ = 0,07 N) n'a pas décelé la présence d'iodure.

Nous obtenons des résultats similaires à partir de ^{131}I Na

II Préparation de l'acide stilbène diamino-4, 4' disulfonique -2, 2'

Le mélange de 220 mM d'acide nitro -5 méthyl-2, sulfonique, 400 cm³ de diéthylèneglycol, 50 cm³ d'hydrazine hydratée, 60 g de potasse est chauffé pendant 30 minutes à 110° C, puis porté lentement à 200° C et maintenu à cette température pendant 4 heures.

Après refroidissement et dilution on traite par l'acide chlorhydrique concentré et chaud ; un abondant précipité brun-vert apparaît. On filtre, solubilise dans la lessive de soude ; on filtre et reprécipite à chaud par l'acide chlorhydrique. Le rendement en produit sec est de 30 %.

Analyse :

M = C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₆ S ₂	C	H	N	S
	Calc % : 45,40	3,78	7,56	17,29
	Tr % : 45,13	3,74	7,39	17,07

I R 3200 à 2600 cm⁻¹ (OH) .
 3080 cm⁻¹ (NH₃⁺)
 1200 cm⁻¹ et 1080 cm⁻¹ (SO₃)

UV λ_{max} (m μ) 210, 250, 327

Bandes caractéristiques des stilbènes (8)

III Préparation de l'acide stilbène -4, 4' bis[Chloro -2, (iodo-5, amino-2, benzoïque) -4, s triazinyl amino-6]disulfonique -2, 2'. 3

A une suspension fortement agitée de 3,8 mM de chlorure de cyanurie dans l'eau on ajoute goutte à goutte en 20 minutes à 0° C une solution aqueuse de 1,9 mM du disel de sodium de l'acide stilbène diamino-4, 4' disulfonique -2, 2'. On additionne ensuite une solution aqueuse de 3,8 mM de soude toujours à 0° C et on laisse réagir pendant une heure.

Après avoir chauffé à 50° C, on condense une solution de 3,8 mM de iodo-5, amino 2, benzoate de sodium dans l'eau puis on ajoute une solution aqueuse de 3,8 mM de soude.

Après deux heures de contact à 50° C, on précipité le produit en milieu acide, lave à l'eau et traite par l'acétone. Le rendement en produit sec est de 95 %.

Dosage d'iode du produit non marqué :	Calc % : 22,70
	Tr % : 21,70



Activité spécifique du produit marqué

par ^{125}I

Calc : 8,4 $\mu\text{Ci/mg}$

Tr : 8,2 $\mu\text{Ci/mg}$

IR

3400 à 2500 cm^{-1} (OH)

1240 à 1170 cm^{-1}

et 1050 cm^{-1} (SO_3)

UV λ max (m μ) : 209, 220, 325.

On retrouve les bandes caractéristiques des stilbènes.

La chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 2 élué par HCl 0,5 N ne décèle pas la présence d'iodure.

La chromatographie sur couche mince (CCM) de silice, éluants : Pyridine-eau (4-6) et D M S O-eau-ammoniac, (4-5-1) montre que le produit est homogène.

IV Préparation de l'acide stilbène -4,4' bis [diéthanol amino -2, (iodo-5, amino -2, benzofque) -4, s -triazinyl-amino-6.] disulfonique -2,2', 4

A la solution fortement agitée du produit 3 sous forme acide dans le D M S O anhydre, on ajoute à 50 °C 20 mM de diéthanolamine.

Après deux heures de contact à cette température on précipite le produit substitué sous sa forme acide, filtre, purifie par plusieurs passages acide-base et traite le résidu par l'acétone.

Le rendement en produit sec est 90 %.

Dosage d'iode sur le produit non actif :

Calc % : 20,22

Tr % : 19,75

Activités spécifiques du produit marqué

par ^{125}I

Calc : 7,5 $\mu\text{Ci/mg}$

Tr : 7,3 $\mu\text{Ci/mg}$

IR

3500 à 2500 cm^{-1} (OH)

1240 cm^{-1} et 1050 cm^{-1} (SO_3)

UV λ max (m μ) 212, 223, 330.

Le contrôle de pureté radiochimique s'effectue de la même façon que précédemment et donne les mêmes résultats.

Nous obtenons les mêmes résultats lors des marquages par ¹³¹I.

Après trois mois de stockage les contrôles chromatographiques (Papier Wathman n° 2, éluant HCl 0,5 N) effectués sur les produits 3 et 4 n'ont pas mis en évidence la présence d'iodure.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) GOUAZE A. ; CASTAING J. et SOUTOUL J.H. CR ; Soc. Biol. 158, (12) 2430 (1964)
- 2) MADELMONT. J.C., VEYRE, A., PLAGNE. R., MEYNIEL. G., C.R. Soc. Acad. Sc. Paris. 275, Série D, 263. (1972)
- 3) WALLINGFORD V.H. et KRUEGER. P.A. Org. Syn. Coll. 2, 349 (1943)
- 4) HUANG-MINLON J. amer. Chem. Soc. 70, 2802. (1948)
- 5) SCHAEFFER. F, THURSTON. T., DUDLEY. R., J.amer. Chem. Soc, 73 2982. (1951)
- 6) CAUBERE. P., et PARRY. D., à paraître.
- 7) WHEELER. A., JOHNS. B., J. amer. Chem. Soc, 43, 403. (1910)
- 8) VESCHAMBRE. H., et KERGOMARD. A., Bull. Soc. Chim. 339; (1966).