

SYNTHÈSE DE L'HYDROXY-9 ELLIPTICINE (^{14}C -1) OU
HYDROXY-9 DIMETHYL-5, 11 (6H) PYRIDO [4, 3-b]
CARBAZOLE (^{14}C -1)

Nguyen-Van-Bac, Michel Herbert*, Louis Pichat*, Maurice-Marie
Janot et Nguyen Dat-Xuong
Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. 91190 -
Gif s/Yvette, France.
Received on December 16, 1974.

SUMMARY

9-Hydroxy-ellipticine (^{14}C -1), specific activity: 2,13 mCi/mM, has been synthesized for molecular biology and cancer research, from N-methyl-formanilide (^{14}C -formyl). The radioactive overall yield was 13,5% based on sodium formate ^{14}C .

RESUME

On décrit la préparation de l'hydroxy-9 ellipticine (^{14}C -1), activité spécifique : 2,13 mCi/mM, destinée aux recherches en biologie moléculaire et en cancérologie à partir du N-méthyl-formanilide (^{14}C -formyl). Le rendement radioactif global est de 13,5% par rapport au formiate de sodium ^{14}C .

Selon H. B. Wood jr. (1), 38 substances synthétiques et naturelles — sur 600.000 essayées depuis plus de 20 années — ont été recommandées par l'Institut National de la Santé des USA dans le traitement du cancer chez l'homme.

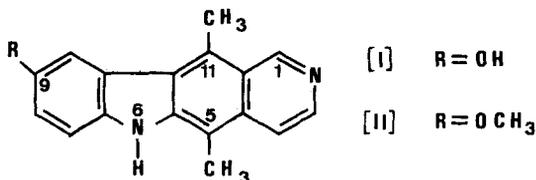
Récemment, a pris une place prépondérante la méthoxy-9 ellipticine [II], extraite des Ochrosia de la famille des Apocynacées, dont l'activité antileucémique murine L 1210 a été découverte par Culvenor et Loder (2). G. Mathé et coll. (3) l'ont utilisée dans des cas de leucémie aiguë myéloblastique, à titre expérimental ; ils ont obtenu des rémissions apparemment complètes mais inconstantes. Ce demi-

Cette synthèse a été effectuée au Service des Molécules Marquées, C.E.N. Saclay.

*Service des Molécules Marquées, C.E.N. Saclay, B.P. n° 2 91190 - Gif s/Yvette.

échec serait dû aux toxicités cardiologique (hypotension) et neuro-cellulaire (lésion des cellules de Purkinje).

La déméthylation de la méthoxy-9 ellipticine [II] par divers agents : acides halogénés, acides Lewis, diborane, surtout chlorure de pyridinium, .. en hydroxy-9 ellipticine [I] rehausse l'intérêt pharmacologique des dérivés de l'ellipticine (4).



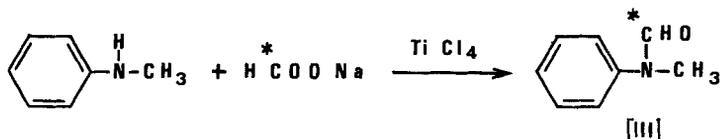
Une étude comparative a fait ressortir la remarquable affinité par intercalation de [I] avec l'ADN. De plus, l'activité anti-leucémique L 1210 de [I] est de 100 à 1000 fois supérieure à celle de [II] (5).

Après étude de toxicités immédiate et différée sur plusieurs espèces d'animaux (6), l'hydroxy-9 ellipticine est en cours d'expérimentation clinique à Villejuif, depuis janvier 1974, sur une quarantaine de cas de leucémies, de tumeurs solides, de maladie de Hodgkin, ..

Les biochimistes ont observé la disparition rapide de [I] dans l'organisme animal, à peine 2mn après son injection par voie intra-veineuse. Pour mieux connaître sa métabolisation et sa distribution dans les différents organes de l'animal, il nous a paru nécessaire de marquer l'hydroxy-9 ellipticine par du carbone 14.

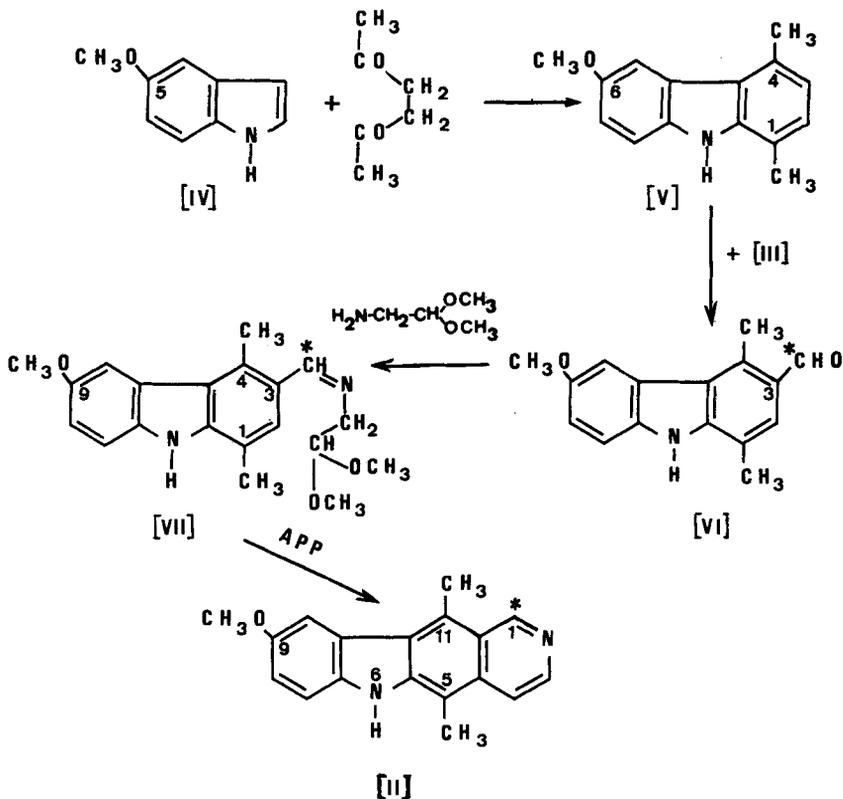
La position 1 est, sinon la plus favorable, du moins la plus facilement accessible. Cette synthèse est basée sur l'utilisation du N-méthyl formanilide (formyl ¹⁴C) [III] obtenu en condensant la N-méthyl aniline avec du formiate de sodium marqué, en présence de catalyseur approprié.

Parmi les nombreuses méthodes d'accès aux amides, nous avons choisi celle de Wilson et Weingarten (7) qui utilise le tétrachlorure de titane comme catalyseur et qui présente l'avantage d'employer le formiate de sodium, forme facile à manipuler de l'acide formique ¹⁴C.



L'étape préliminaire : préparation du diméthyl-1,4 méthoxy-6 carbazole [V] à partir du méthoxy-5 indole [IV] (8) ainsi que les étapes suivantes : formylation [VI], obtention d'azométhine [VII], cyclisation en méthoxy-9 ellipticine [II] sont celles décrites par Cranwell et Saxton (9) et par Dalton et coll. (10) que nous avons notablement améliorées.

Le schéma réactionnel est le suivant :



Cette synthèse marquée n'a présenté aucune difficulté majeure : le rendement global en hydroxy-9 ellipticine est de 13,5% calculé sur le formiate de sodium ¹⁴C.

La formation simultanée du dérivé hydroxylé, lors de la cyclisation de [VII] par l'acide polyphosphorique, n'est pas gênante car, au stade suivant, une déméthylation subséquente a permis de tout transformer en hydroxy-9 ellipticine (¹⁴C-1).

PARTIE EXPERIMENTALE

N-méthylformanilide (formyl ¹⁴C) [III] : Dans un tricol de 50ml, sous un courant d'azote, à la température ambiante, on agite magnétiquement pendant 90mn : 280mg (4,11 mM, AT = 8,79 mCi, AS = 2,13 mCi/mM) de formiate de sodium dans 25ml de THF jusqu'à obtention d'une solution homogène. On introduit ensuite 1,97g (18,46 mM, 2ml) de N-méthylaniline fraîchement rectifiée. (contrôlée par chromatographie en phase vapeur sur colonne de carbowax 20M à 125°C). On ajoute par une seringue 474mg (2,5 mM, 0,27ml)

de tétrachlorure de titane à la masse réactionnelle refroidie à -70°C , en atmosphère d'azote et sous une pression de 150m/m de mercure. Une coloration brune intense apparaît puis s'éclaircit rapidement. Le mélange réactionnel est agité sans discontinuité pendant une semaine à la température ambiante. Le tétrachlorure de titane résiduel est détruit par addition de 0,2ml d'eau distillée. On essore le précipité, lave avec le THF, évapore sous vide le filtrat jusqu'à sec et recueille 6,94 mCi (3,24 mM, 438mg) d'un produit brut. La chromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254, révélateur U.V. (solvant : benzène-acétate d'éthyle 80 : 20) montre la présence à côté du pic radioactif de N-méthylformanilide de Rf : 0,39 de petits pics non identifiés.

Purification : La bonne séparation des produits formés au cours de cette réaction sur le chromatogramme suggère d'isoler [III] par chromatographie sur couche mince préparative de silicagel Merck F 254 (20cm x 40cm). Après migration du solvant, la plaque est séchée à l'air libre pendant une nuit. On localise le produit par autoradiographie, la zone intéressante de la plaque est grattée et éluee par 200ml d'éther ; la solution étherée est séchée sur sulfate de sodium, filtrée sur "Millipore" et évaporée jusqu'à siccité. On obtient - à partir de 6,94 mCi de [III] brut - 5,18 mCi (327mg, 2,42 mM) d'un produit radiochimiquement pur avec un rendement radioactif de 58,9%.

Contrôle de la pureté : La pureté radiochimique est contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254, révélateur U.V.

Solvants : chlorure de méthylène	Rf : 0,25
benzène-acétate d'éthyle 80:20	Rf : 0,44

Formyl-3 méthoxy-6 diméthyl-1,4 carbazole (formyl ^{14}C) [VI]

A une solution de 407mg (1,81 mM) de carbazole [V] et de 327mg (2,42 mM 5,18 mCi) de [III] dans 2ml d'o.-dichlorobenzène, on ajoute sous agitation magnétique 334mg (2,17 mM) d'oxychlorure de phosphore fraîchement rectifié. Une coloration rouge foncé se développe. On chauffe ensuite la masse réactionnelle pendant 2h.30 au bain-marie bouillant. On refroidit, reprend par 1g d'acétate de sodium, entraîne à la vapeur pour éliminer l'o.-dichlorobenzène. On décante la solution aqueuse, et recueille 447mg (1,77 mM) de [VI] activité totale : 3,80 mCi, soit un rendement radioactif en produit brut de 73,4 %. Par chromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254 (solvant : benzène-acétate d'éthyle 80:20, révélateur : U.V.) on détecte la présence de 2 pics radioactifs dont le plus important (95% d'activité totale) a un Rf : 0,48 identique à celui du témoin.

(β , β -diméthoxyéthyliminométhyl)-3 méthoxy-6 diméthyl-1,4 carbazole (^{14}C -1) [VII]

On chauffe au bain-marie bouillant pendant 2h. un mélange de 447mg (1,77 mM AT = 3,80 mCi de [VI] et 416mg (3,96 mM) de β , β -diméthoxyéthylamine. L'eau formée est éliminée par distilla-

tion azéotropique avec 40ml de benzène anhydre. Le résidu concentré, séché sous vide sur potasse donne 597mg (1,75 mM 3,75 mCi Rdt = 98%) d'un précipité verdâtre qui, par chromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254 imprégné d'une solution de nitrate d'argent à 10%. (solvant = benzène-acétate d'éthyle-éthanol 18:6:6 révélateur : MnO_4K , révèle des impuretés non identifiées et un pic radioactif de Rf : 0,55 correspondant à celui d'un témoin.

Méthoxy-9 diméthyl-5, 11 (6H) pyrido [4,3-b] carbazole ou méthoxy-9 ellipticine (^{14}C -1) [II]

Un mélange de 21g (220 mM) d'acide orthophosphorique (85%) et 5,4g (38mM) d'anhydride phosphorique porté à la température de 150°C est additionné à 597mg (1,75 mM 3,75 mCi) de [VII]. On maintient cette température tout en continuant l'agitation magnétique pendant 30mn. On refroidit, ajoute 20g de glace pilée, alcalinise par l'ammoniaque concentrée jusqu'à pH = 8. On essore le précipité et l'extrait en continu avec l'éthanol pendant 8h. L'évaporation sous vide du solvant laisse un résidu gris d'activité 2,61 mCi (Rdt = 69%). L'analyse par chromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254 (solvant = benzène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque 21:6:4:0,5 révélateurs : iode, U. V.) montre la présence de 3 pics (fig. 1) ayant respectivement pour Rf :

0,36	correspondant à l'hydroxy-9 ellipticine témoin.
	(16% d'activité totale)
0,58	" au méthoxy-9 ellipticine témoin.
	(78% d'activité totale)
0,80	" à l'azométhine de départ
	(5% d'activité totale)

et des impuretés non identifiées.

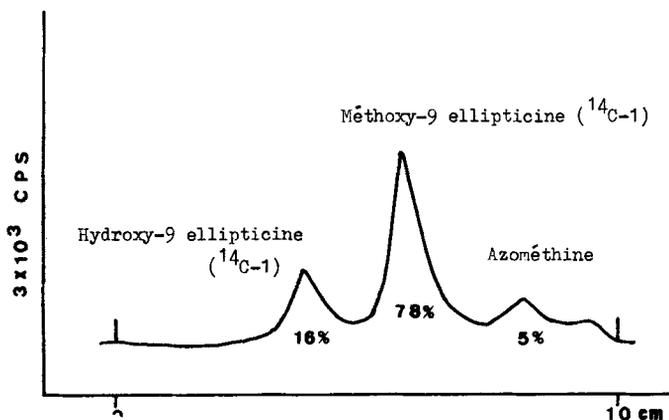


Fig. 1 Radiochromatogramme de la formation d'hydroxy-9 ellipticine dans la cyclisation du méthoxy-9 ellipticine.

Hydroxy-9 ellipticine (^{14}C -1) [I]

On porte à l'ébullition pendant 1h. un mélange de 336mg (1,22 mM AT = 2,61 mCi) de méthoxy-9 ellipticine et 3,5g (30 mM) de chlorure de pyridinium distillé et recristallisé. Le résidu est repris par 5ml d'eau et alcalinisé jusqu'à pH = 10. Le précipité formé est extrait en continu par le méthanol durant 5h. Après élimination du solvant, on recueille 227mg (0,86 mM 1,85 mCi Rdt : 70%) d'un produit brut qui, par chromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254 (solvant = benzène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque 20:6:4:0,5 révélateur : iode) présente une tache rouge brique de Rf : 0,36 correspondant à celui de l'hydroxy-9 ellipticine témoin (80% environ), une tache brune de Rf : 0,58 correspondant à [VII] résiduel (14% environ) et des impuretés non identifiées (5% environ).

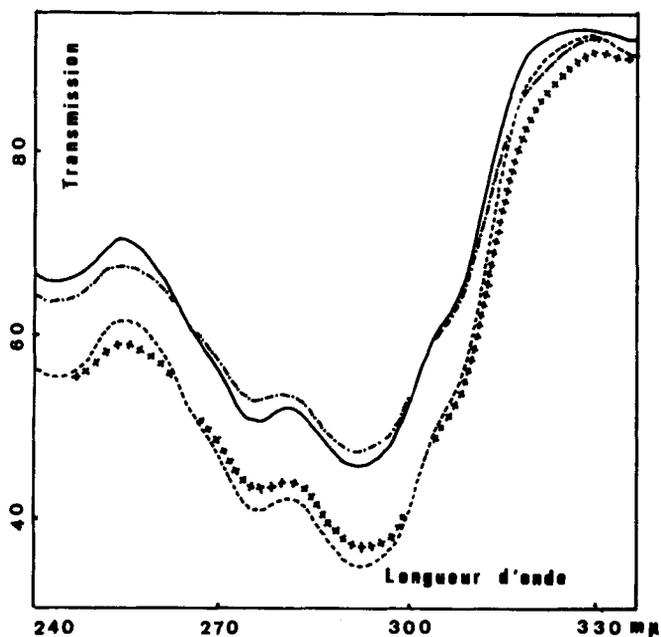


Fig. 2 Spectre UV de l'hydroxy-9 ellipticine (^{14}C -1)

— témoin - - - - produit de synthèse
 - - - - témoin à pH=8 ♦♦♦♦ prod. de synt. à pH=8

Purification : Par chromatographie sur plaque préparative de silicagel Merck F 254 (20cm x 40cm). Après migration du solvant : benzène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque 21:6:4:0,5, on localise le produit par autoradiographie. La zone intéressante de la plaque est éluée par le méthanol, évaporée jusqu'à sec. On obtient finale-

ment 1,18 mCi (144mg 0,55 mM) de [I], soit un rendement radioactif global de 13,5% par rapport au formiate de sodium ^{14}C , et une activité spécifique de : 2,13 mCi/mM.

Contrôle de la pureté chimique et radiochimique de [I]

1°) La pureté chimique, contrôlée par spectrométrie UV dans le méthanol à 291 m μ , est supérieure à 99% (Fig. 2).

2°) La pureté radiochimique est contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254, révélateurs : iode U.V. On ne détecte aucune impureté radiochimique:

Solvants : benzène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque :
21:6:4:0,5 Rf : 0,36
benzène-éthanol 80:20 Rf : 0,26

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - WOOD H. B. Jr., Cancer Chemother. Reports, 1971, 2, 9.
- 2 - CULVENOR C. C. J. et LODER J. W., 152nd Meeting Amer. Chem. Soc., New-York, 1966, p. 29
- 3 - MATHE G., HAYAT M., VASSAL F., de SCHWARZENBERG L., SCHNEIDER M., JASMIN C., SCHLUMBERGER J. R. et ROSENFELD C., Rev. europ. Etud. Clin. biol., 1970, 15, 541.
- 4 - DAT-XUONG N., ADELIN M. T., LECOINTE J. et JANOT M.-M., Comptes rendus, 1975, série D,
- 5 - LE PECQ J. B., GOSSE Ch., DAT-XUONG N., PAOLETTI C., Comptes rendus, 1973, 277, série D, 2289.
- 6 - PAOLETTI C., CROS S., SORBARA R., TOLLON Y. et MOISAND C., Comptes rendus, 1974, 278, série D, 1437.
PHAM-HUU-CHANH, SORBARA R., DAT-XUONG N., LE PECQ J. B. et PAOLETTI C., Comptes rendus, 1974, 279, série D, 1039.
- 7 - WILSON J. D. et WEINGARTEN H., Canad. J. Chem., 1970, 48, 983.
- 8 - HEATH-BROWN B. et PHILPOT P. G., J. Chem. Soc., 1965, p. 7185.
- 9 - CRANWELL P. A. et SAXTON J. E., J. Chem. Soc., 1962, p. 3482.
- 10 - DALTON L. K., DEMERAC S., ELMES B. C., LODER J. W., SWAN J. M. et TEITEI T., Aust. J. Chem., 1967, 20, 2715.