

# SYNTHÈSE DE TRIS-(DIMETHYLAMINO-2,4,6) TRIAZINE-1,3,5 $^{14}\text{C}$ -2-4-6 (HEXAMETHYLMELAMINE (NOYAU) $^{14}\text{C}$ -2-4-6), UN NOUVEL AGENT ANTITUMORAL. \*

Nguyen-Hoang-Nam, Henri Hoellinger et Louis Pichat\*\*

I.N.S.E.R.M. - Unité de Recherche de Toxicologie Expérimentale  
Hôpital Fernand Widal - 200 rue du Faubourg Saint Denis  
75475 PARIS Cedex 10 - FRANCE

Received on March 8, 1976

## SUMMARY

(Ring-2,4,6- $^{14}\text{C}$ ) Hexamethylmelamine ( $^{14}\text{C}$ -HMM), a new antitumor agent, has been prepared from  $^{14}\text{C}$ -urea by a 2 step synthesis.  $^{14}\text{C}$ -Urea is cyclized in o-dichlorobenzene to (2,4,6- $^{14}\text{C}$ ) cyanuric acid, purified by chromatography on an ion exchange resin column Sephadex SP C-25. Direct amination of acid in presence of HMPT and dimethylamine gives  $^{14}\text{C}$ -HMM. After purification by silicagel-adsorption column chromatography  $^{14}\text{C}$ -HMM is obtained with a radioactive overall yield of 18 % based on  $^{14}\text{C}$ -urea, specific activity = 32 mCi/mMol.

Key words : Carbon-14, Hexamethylmelamine, Cyanuric acid.

## RESUME

L'hexaméthylmélamine (noyau)  $^{14}\text{C}$ -2-4-6 (HMM  $^{14}\text{C}$ ), un nouvel agent antitumoral, a été synthétisée à partir de l'urée  $^{14}\text{C}$  en 2 stades. L'urée  $^{14}\text{C}$  est cyclisée dans l'o-dichlorobenzène en acide cyanurique  $^{14}\text{C}$ -2-4-6, purifié par chromatographie sur colonne d'échangeur d'ions Séphadex SP C-25. L'amination directe de l'acide en présence de HMPT et de diméthylamine donne l'HMM  $^{14}\text{C}$ . Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice d'adsorption, on obtient l'HMM  $^{14}\text{C}$  avec un rendement radioactif global de 18 % par rapport à l'urée  $^{14}\text{C}$ , activité spécifique : 32 mCi/mMole.

\* Travail effectué au Service des Molécules Marquées, C.E.N.-SACLAY

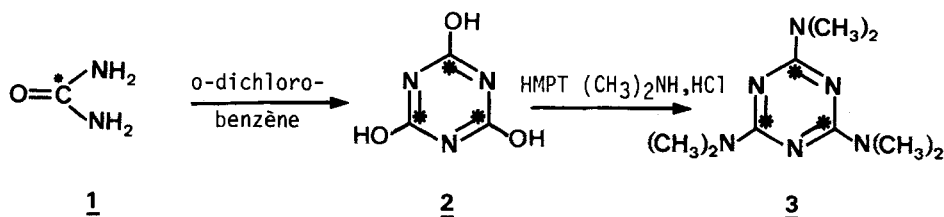
\*\* Service des Molécules Marquées - C.E.N.-SACLAY, B.P. N° 2  
91190 Gif sur Yvette - FRANCE

Pour nos recherches cancérologiques <sup>(1)</sup> nous avons été amenés à préparer l'hexaméthylmélamine (HMM), un nouvel agent antitumoral <sup>(2)</sup>, marquée au carbone 14.

A notre connaissance, une seule méthode de préparation de l'HMM marquée au <sup>14</sup>C sur les méthyles a été mentionnée <sup>(3)</sup>. Or, pour une étude in vivo de la distribution et du métabolisme de l'HMM, il est indispensable d'utiliser le produit marqué dans le noyau.

L'HMM est préparée par l'action de la diméthylamine sur le chlorure de cyanuryle <sup>(4)</sup>, lequel est obtenu à partir de l'acide cyanurique.

Pour la synthèse radioactive, parmi les nombreuses méthodes de préparation de l'acide cyanurique, nous avons choisi d'adopter celle <sup>(5)</sup> qui utilise la trimérisation de l'urée <sup>14</sup>C, disponible au service des molécules marquées.



Dans ce procédé, l'urée <sup>14</sup>C 1 est cyclisée en acide cyanurique <sup>14</sup>C-2-4-6 2, par chauffage à 180° en tube scellé en présence d'ortho-dichlorobenzène <sup>(5)</sup>. L'acide 2 brut, analysé par chromatographie en couche mince contient environ 20% d'urée <sup>14</sup>C résiduelle et 10% d'une impureté radioactive non identifiée. Il est purifié par chromatographie sur colonne d'échangeur d'ions Séphadex SP C-25 ; rendement par rapport à l'urée <sup>14</sup>C : 45,8%.

Comme la préparation du chlorure de cyanuryle qui permet d'accéder à l'HMM <sup>(4)</sup> n'est pas commode pour une microsynthèse radioactive, nous avons procédé à une amination directe de l'acide 2 en présence de l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPT) et de diméthylamine à 230-235°C <sup>(6)</sup>. Ce qui nous a permis d'obtenir l'hexaméthylmélamine (noyau) <sup>14</sup>C-2-4-6 3 sans passer par le dérivé chloré de l'acide 2.

Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice d'adsorption, la pureté chimique et radiochimique de l'HMM <sup>14</sup>C 3 est contrôlée par radio-chromatographie en couche mince (CCM), par spectrométrie ultraviolette (UV), par résonnance magnétique nucléaire du proton (RMN) et par spectrométrie de masse (SM).

Le rendement radioactif global en HMM  $^{14}\text{C}$  3, d'activité spécifique : 32 mCi/mMole, est de 18% par rapport à l'urée  $^{14}\text{C}$ .

## PARTIE EXPERIMENTALE

Le spectre UV a été enregistré sur un spectromètre Beckman DK-2A. Le spectre de RMN, effectué avec l'HMM provenant d'essai "à blanc", a été réalisé sur un appareil Jeol C 60 HL. Le déplacement chimique est exprimé en ppm par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence interne ( $\delta = 0$ ). Le spectre de masse a été effectué par introduction directe du produit dans la source d'un spectromètre Varian CH 7.

Tableau I

CCM - Plaques gel de silice 60 F 254 Merck

PRODUITS	Rf PRODUITS X 100 SOLVANTS			REVELATEURS
	(a)	(b)	(c)	
<u>1</u>		44	60	selon (7)
<u>2</u>		24	73	-id-
<u>3</u>	76	81	51	UV

(a)  $\text{C}_6\text{H}_6$  - MeOH

95 : 5

(b) n - PrOH -  $\text{NH}_4\text{OH}$

80 : 20

(c) n - BuOH - AcOH -  $\text{H}_2\text{O}$

50 : 25 : 25

ACIDE CYANURIQUE  $^{14}\text{C}$ -2-4-6 2 :

On introduit 3 mM d'urée  $^{14}\text{C}$  (120 mCi) et 1 ml d'ortho-dichlorobenzène fraîchement distillé dans un tube ( $\varnothing$  ext. : 20 mm l : 16 cm), scelle le tube sous vide et on chauffe le mélange à  $180^\circ\text{C}$  en agitant pendant 8 h. On ouvre le tube et dissout le précipité dans de l'eau bouillante. On obtient ainsi 97 mCi d'acide 2 qui, analysé par CCM (tableau I), enregistre un pic radioactif principal de Rf correspondant à celui du témoin et 2 autres pics représentant environ 20% d'urée  $^{14}\text{C}$  résiduelle et 10% d'une impureté non identifiée.

PURIFICATION DE 2 :

Le produit en suspension dans l'eau est placé sur une colonne ( $\varnothing$  ext. :

15 mm, h : 75 cm) de résine échangeuse d'ions Séphadex SP C-25 préalablement traitée avec HCl 0,2 N et lavée avec de l'eau jusqu'à pH neutre. On élue avec de l'eau et recueille 55 mCi d'acide 2 pur (rendement : 45,8 %).

#### HEXAMETHYLMELAMINE (NOYAU) $^{14}\text{C}$ -2-4-6 3 :

A 26 mCi d'acide 2 dilué à une activité spécifique d'environ 32,5 mCi/mMole (0,8 mM) dans un ballon forme poire de 10 ml sont ajoutés 1 ml HMPT et 45 mg (0,55 mM) de chlorhydrate de diméthylamine. Le mélange est chauffé au bain métallique à 230-235° C pendant 1 h. On ajoute du chloroforme, 30 ml d'une solution de soude à 5% et agite pendant 15 mn. L'extraction en continu de la solution alcaline par du chloroforme fournit 22,7 mCi d'HMM $^{14}\text{C}$  contenant environ 35 % d'impuretés.

#### PURIFICATION DE 3 :

Le produit en solution dans du benzène est placé sur une colonne ( $\emptyset$  ext. 15 mm, h : 75 cm) de gel de silice d'adsorption Woelm équilibré avec le mélange benzène-méthanol 95 : 5. Le gradient d'élution est obtenu en ajoutant progressivement un mélange de benzène-méthanol 90-10 au mélange benzène méthanol 95-5. On détecte simultanément la radioactivité de l'éluat et les produits absorbants dans l'UV, et collecte les fractions de 3 ml environ toutes les 15 minutes. Les fractions 13-17 fournissent 68 mg (10,4 mCi) d'HMM $^{14}\text{C}$  pure (rendement = 40 %). Le rendement radioactif global en HMM $^{14}\text{C}$  est de 18 % par rapport à l'urée  $^{14}\text{C}$ , activité spécifique = 32 mCi/mMole.

#### CONTROLE DE LA PURETE CHIMIQUE ET RADIOCHIMIQUE DE 3 :

CCM : Tableau I.

UV(EtOH):  $\lambda$  max = 226,5 nm.

RMN ( $\text{CCl}_4$ ) : 6  $\text{CH}_3\text{-N}$ , (s), 3, 15 (8).

SM = pics à m/e 216 ( $\text{M}^+$ ) (14%), 214 ( $\text{M}^+$ ) (12%), 212 ( $\text{M}^+$ ) (9%), 211 ( $\text{M}^+$ ) (15%), 210 ( $\text{M}^+$ ) (97%), 195 (100%), 181 (31%), 167 (53%), 152 (47%).

## REFERENCES

1. En collaboration avec le Docteur CONNORS T.A. (Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research - Royal Cancer Hospital, London), dans le cadre de l'Organisation Européenne de Recherche sur le Traitement du Cancer (OERTC).
2. BLUM R.H., LIVINGSTON R.B. et CARTER S.K. - Europ. J. Cancer. 9 : 195 (1973); MITCHLEY B.C.V., CLARKE S.A., CONNORS T.A. et NEVILLE A.M. - Cancer Res. 35 : 1099 (1975).
3. WORZALLA J.F., RAMIREZ G., MACKMAN S. et BRYAN G.T. - Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 12 : 3 (1971).

4. GÜNDÜZ T.- Commun. Fac. Sci. Univ. Ankara, Ser. B. 15 B : 69 (1968) ;  
WÖRLE R. et LINDINGER H. - Liebigs Ann. Chem. , 1430 (1973).
5. ONOE K. et SHIBUTA M. - Chem Abstr., 75 : 36142 K (1971).
6. ARUTYUNYAN E. A., GUNAR V.I. et ZAV'YALOV S.I. - Izvest. Akad. Nauk.  
S.S.S.R., Ser. Khimicheskaya, 4 : 904 (1970) ; traduction Bull. Acad.  
Sci. U.S.S.R., 848 (1970).
7. QEE A. et GASPARIC J. - J. Chromatogr. 54 : 436 (1971).
8. BESSIERE-CHRETIEN Y. et SERNE H. - Bull. Soc. Chim., 2039 (1973).