

SYNTHESE ET MARQUAGE AU  $^{14}\text{C}$  DE LA p- [ bis (CHLORO-2-ETHYL)  
AMINO ] L-PHENYLALANINE OU MELPHALAN

NICOLAS Colette, GODENECHÉ Denise  
INSERM. Unité de Recherche U 71, Etude métabolique  
des molécules marquées. B.P. 184  
63005 Clermont-Ferrand Cedex - France  
et Service de Biophysique - Faculté de Médecine  
Received February 4, 1977

SUMMARY

p- [ bis (2-chloroéthyl)amino ] l-phenylalanine or melphalan has been labelled on the four carbons of the dichloroethyl group by means of uniformly labelled ethylene oxide  $^{14}\text{C}$  (specific activity : 4,5  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) for pharmacokinetic study.

RESUME

La p- [ bis (chloro-2-éthyl)amino ] l-phenylalanine ou melphalan a été marquée sur les quatre carbones du groupement dichloro éthyle par l'oxyde d'éthylène  $^{14}\text{C}$  uniformément marqué (activité spécifique : 4,5  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) en vue de l'étude pharmacocinétique.

INTRODUCTION

Administré par voie orale, ce composé est largement utilisé en clinique, dans les myélomes, les cancers de l'ovaire et du sein ; les thymomes et réticulo-sarcomes et dans certains mélanomes en perfusion artérielle et circulation extracorporelle (1).

Les principales études pharmacocinétiques ont été faites avec le melphalan racémique appelé : la DL-sarcosine (2)(3). Ces auteurs ont utilisé la molécule marquée au  $^{14}\text{C}$  sur le carbone  $\beta$  de la chaîne alanine. Plus récemment MILNER et coll. (4) ont étudié la distribution du melphalan marqué par  $^3\text{H}$  chez le rat porteur de tumeurs. De leur côté, KLATT et coll. (5) ont suivi l'élimination du produit tritié chez des malades porteurs de mélanome malin.

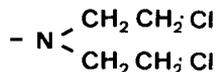
Ces données bibliographiques nous permettent d'utiliser comparativement les résultats obtenus par différents auteurs avec la molécule marquée par  $^{14}\text{C}$  sur la chaîne alanine. Dans ces conditions et compte-tenu du prix très élevé du marquage, nous avons seulement marqué le melphalan sur les quatre carbones du groupement dichloroéthyle.

Nos propres données fondamentales sur le plan pharmacocinétique comparées aux données bibliographiques précitées, nous ont permis de préciser chez l'animal, le mécanisme d'action de ce composé.

Le melphalan présente la formule chimique suivante :



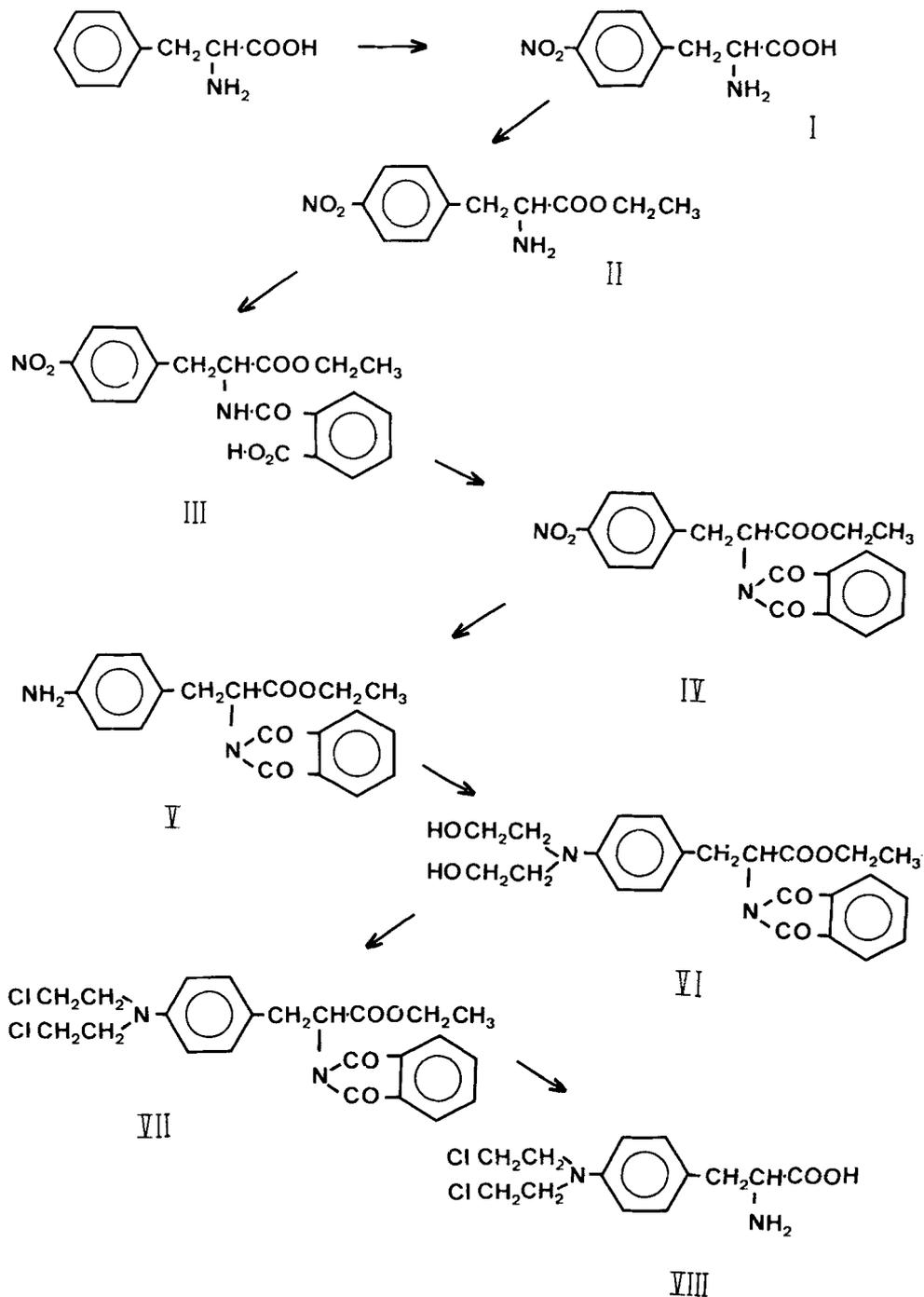
Ce composé est le dérivé p [bis(chloro-2-éthyl)amino] -l-phénylalanine, il entre dans la catégorie des moutardes d'azote dont le groupement alkylant est :



Ce composé présente d'une part un caractère amphotère dû à la présence du groupement amino-acide et d'autre part la stéréospécificité optique de ce composé, liée à la forme lévogyre, dextrogyre ou racémique de l'acide aminé est primordiale quant à ses effets cliniques (6, 7). Il est essentiel d'éviter toute racémisation au cours de la synthèse, la forme lévogyre étant de loin la plus active.

#### Marquage du melphalan par l'oxyde d'éthylène $^{14}\text{C}$

La synthèse du melphalan a été réalisée par BERGEL et coll. (8,9) et le marquage en position N-bis (chloro-2-éthyl) avec l'oxyde d'éthylène  $^{14}\text{C}$  par SOLOWAY et NYILAS (10) selon le schéma réactionnel suivant :



Ces auteurs ont travaillé à partir de la l-phénylalanine, en bloquant la fonction amino-acide, respectivement par le groupement phtaloyle et par la fonction ester, de façon à pouvoir effectuer la réduction du groupement nitro, l'hydroxy-éthylation, la chloruration et l'hydrolyse conduisant au melphalan avec des rendements chimiques de 23 % (9) 37 % (8) et 43 % (10) et des angles de rotation respectivement de  $-19,5^\circ$  ( $c = 0,67$  MeOH),  $-31,5^\circ$  ( $c = 0,67$  MeOH) et  $+9,5^\circ$  ( $c = 0,93$  g/100 ml HCl 1 N).

De la même façon, nous avons envisagé le marquage du melphalan optiquement actif sur le groupement N-bis(chloro-2-éthyle) en procédant à la nitration de la l-phénylalanine (I), puis en estérifiant (II). Le blocage de la fonction amine a été réalisé au moyen du tert butyloxycarbonylazide (III) de façon à obtenir l'acide aminé bloqué et pouvoir synthétiser le melphalan par réduction (IV), hydroxyéthylation (V), chloruration (VI) et enfin libération de la fonction amino-acide (VII) sans risque de racémisation au cours de ces différentes étapes que nous avons réunies dans le schéma réactionnel ci-après.

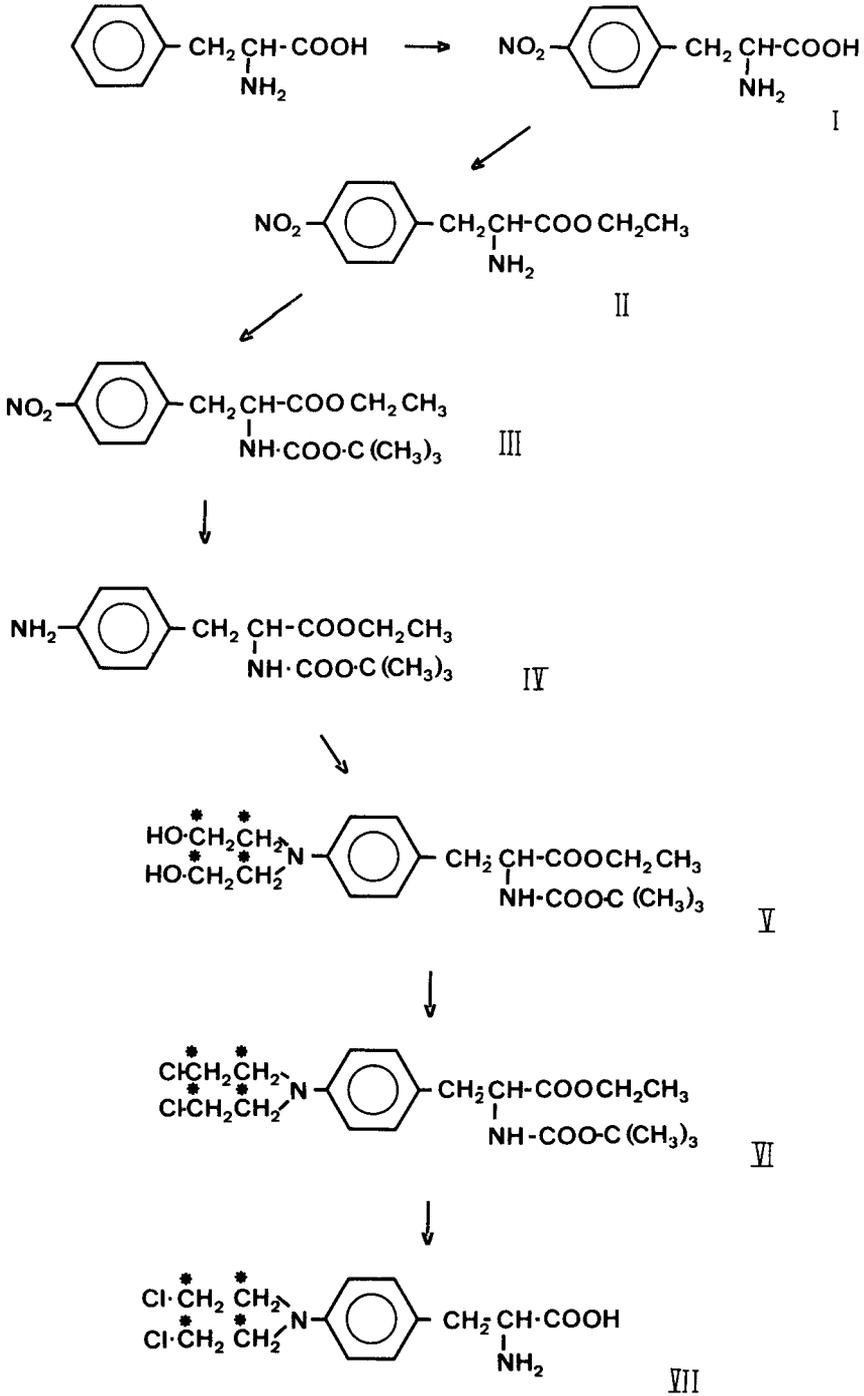
Notre étude nous a permis de vérifier que les chlorurants  $\text{SOCl}_2$  ou  $\text{POCl}_3$  ne racémisent pas le dérivé bis (hydroxy-2-éthylé) lorsqu'il est bloqué par le groupement tertio-butyloxy-carbonyle ou phtaloyle.

La chloruration par  $\text{POCl}_3$  du dérivé V permet d'atteindre le melphalan avec un rendement de 50 à 55 % (calculé à partir de la réaction 5 (hydroxy-éthylation) et un angle de rotation  $\alpha_D^{25} = -27^\circ$  à  $30^\circ$  ( $c = 0,7$  -  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

Le choix du groupement tert-butyloxycarbonyle comme agent bloquant l'amine présente plusieurs avantages :

- la suppression d'une étape dans le schéma réactionnel
- la chloruration par  $\text{SOCl}_2$  ou  $\text{POCl}_3$  sans risque de racémisation
- le déblocage par hydrolyse acide plus facile et complet
- un rendement de marquage très satisfaisant

Cette méthode nous a permis de marquer le melphalan optiquement actif avec un rendement radiochimique de 36 % et une activité spécifique de 4,5  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .



## PARTIE EXPERIMENTALE

Indications Générales :

Les spectres I.R. ont été réalisés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 257.

Les spectres de R.M.N. ont été effectués sur un appareil JEOL C 60 H.L., en utilisant le TMS en référence interne. La position des bandes est donnée en valeur de  $\delta$

Les angles de rotation ont été mesurés dans des tubes de 50 mm sur un polarimètre électronique (POLARTRONIC I de SCHMIDT-HAENSCH).

Les points de fusion sont pris sur un appareil Mettler F P 1.

Les mesures de radioactivité spécifique sont effectuées au moyen d'un scintillateur liquide modèle MARK II Nuclear Chicago par la méthode du standard externe.

Les chromatographies de produits radioactifs sont analysées sur un dérouleur de chromatogramme PANAX équipé d'un détecteur Geiger-Muller sans fenêtre.

1 - Préparation de la p-nitro-l-phénylalanine (I),(II) (8)

66 g (1 p.) de l-phénylalanine sont mis en solution dans 108 ml (3 p.) d'acide sulfurique concentré à une température variant de 30 à 40°C. Dans la solution refroidie à 0°C au moyen d'eau et de glace, on ajoute goutte à goutte 17 ml d'acide nitrique (d = 1,52) tout en agitant.

Après 10 à 15 minutes de repos, on coule le produit de la réaction dans 2 litres d'eau, puis neutralise la solution avec de l'ammoniaque 6 N. Le précipité obtenu est dilué à froid, la solution mère est concentrée pour obtenir un deuxième jet de cristallisation.

Le produit est recristallisé dans l'eau.

Rendement pratique = 70 %    F = 242° (litt    F = 238-241°)

2 - Préparation de l'ester éthylique de la p-nitro-l-phénylalanine (II)

Par addition de 5 ml de chlorure de thionyle à 7 g de p-nitro-phénylalanine en solution dans 75 ml d'alcool éthylique absolu, on obtient 7 g d'ester chlorhydrique recristallisé dans l'alcool.

Rendement pratique = 90 %    F = 207-208° (dec.)

3 - Préparation du p-nitro, N-tertiobutyloxy-carbonyle, l-phénylalaninate d'éthyle (III)

Cette réaction consiste à préparer d'abord le réactif : t-Butyl carboxyazide à partir du carbazate t-butylque (12)

Le produit III a été préparé selon la méthode de Schwyzer (13)

- 20 g de chlorhydrate de p-nitro phénylalaninate d'éthyle sont neutralisés par 10 ml de diéthylamine dans 160 ml de benzène sec. On obtient 16 g d'ester libre qui sont additionnés de 100 ml de dioxanne, à cette solution, on ajoute une suspension de 8 g de MgO dans 100 ml d'eau puis on coule une solution de 100 ml de dioxanne et 24 g de t-butyloxy carbonyl-azide. On agite 20 heures à 45-50°. On refroidit à 0°C. On reprend par 100 ml d'eau et 200 ml d'acétate d'éthyle. On acidifie par de l'acide citrique - on observe un dégagement gazeux - on décante - on sèche sur MgSO<sub>4</sub> et évapore le solvant.

On recristallise dans de l'hexane.

Rendement pratique = 80 %      F = 67°

4 - Préparation du p-amino-l-phénylalaninate d'éthyle, N-tertiobutyloxy-carbonyle (IV)

Dans une solution de méthanol bidistillé (150 ml) on solubilise à froid 5 g de dérivé nitré, on ajoute 0,5 g de Palladium sur charbon actif à 10 %, la réduction se fait par absorption d'H<sub>2</sub> sous agitation et à température ambiante.

L'absorption d'H<sub>2</sub> est terminée au bout de 3 heures.

- On filtre la solution, lave le catalyseur d'abord au méthanol puis à l'acétate d'éthyle et évapore la solution.

Le produit aminé IV est obtenu avec un rendement pratique de 91 % et se présente sous la forme d'un liquide jaunâtre visqueux.

5 - Préparation du p-(bis(2-hydroxy, <sup>14</sup>C-éthyl) amino)l-phénylalaninate d'éthyle, N-tertiobutyloxy-carbonyle (V)

On refroidit dans l'azote liquide le ballon fond rond dans lequel on a mis 15 ml d'acide acétique et 1 g de p-amino, l-phénylalaninate d'éthyle, N-tertiobutyloxy-carbonyle (IV) qui se dissout, on fait le vide dans le ballon, puis on introduit à l'aide d'une rampe à vide l'oxyde d'éthylène -<sup>14</sup>C (0,02 ml, 8 mCi) dilué avec 0,25 ml d'oxyde d'éthylène stable

de manière à se mettre en léger défaut d'oxyde d'éthylène par rapport à la quantité stoechiométrique qui est de 0,325 ml. On agite la solution à température ambiante toute la nuit. Le lendemain on ajoute 2 ml d'oxyde d'éthylène stable en excès. On agite à nouveau à température ambiante pendant 24 heures. La réaction d'addition étant terminée et complète, la solution est évaporée à sec, séchée par 2 distillations azéotropes successives de benzène anhydre. Le produit V obtenu est utilisé sous cette forme pour l'étape suivante.

6 - Préparation du p-[bis (2-chloro, <sup>14</sup>C-éthyl) amino] 1-phénylalaninate d'éthyle, N-tertio-butyloxy-carbonyle (VI)

Au produit V, on ajoute 10 ml de chloroforme, puis coule goutte à goutte à 20°C, une solution de 2 ml de chlorure de thionyle fraîchement distillée dans 6 ml de chloroforme. On met à reflux 4 minutes. On évapore à sec. On ajoute 30 ml de CHCl<sub>3</sub> et évapore à sec.

7 - Préparation du p-[bis-(2-chloro, <sup>14</sup>C-éthyl) amino] 1-phénylalanine ou Melphalan (VII)

Le produit VI obtenu ci-dessus est traité par 20 ml d'HCl 6 N toute la nuit à reflux (100°C). On filtre, évapore, dilue dans 2 ml d'eau et ajoute lentement cette solution à une solution saturée froide (10 ml) d'acétate de sodium.

Un précipité blanc se forme, il est filtré, lavé à l'eau glacée et séché sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Rendement brut : 69,5 %

Le produit brut sec est dissout dans du méthanol, traité au noir animal, filtré, évaporé et lavé à l'éther.

Poids de Melphalan <sup>14</sup>C obtenu = 650 mg

Rendement pratique pur : 65 %

Identification - Contrôle de pureté

Point de fusion : F = 183,6° C (dec.)

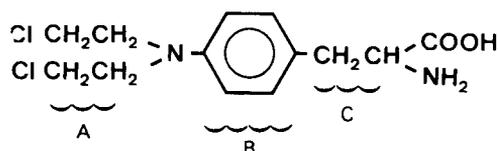
Angle de rotation :  $\alpha_D^{25} = -25^\circ$  (c = 0,6 - CH<sub>3</sub>OH)

Infra-rouge (pastille KBr)

bande (cm <sup>-1</sup> )	groupements fonctionnels
3300 - 3500	- NH <sub>2</sub>
2500 - 3500	- OH lié
1730	- C = O
1610	- C = C - conjugué
1580	amino-acide

Analyse élémentaireValeurs trouvées (calculées avec 1 H<sub>2</sub>O)

C = 48,79	(48,30)
H = 5,90	( 6,19)
N = 8,83	( 8,66)

RMN (DMSO deutérié)

(ppm)	signal	Rapport d'intensité	
6,60 - 7,30	m	4	B
3,60 - 3,80	m	8	A
3,0	m	2	C

Analyse radiochromatographique

Homogène dans les systèmes suivants :

Silice éluant : CH<sub>3</sub>OH - CHCl<sub>3</sub> (1/1) R<sub>f</sub> = 0,31Silice éluant : CH<sub>3</sub>OH - CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (6/2) R<sub>f</sub> = 0,42

Révélation à la ninhydrine

Lecture par radiochromatographie

Rendement radiochimique et radioactivité spécifique ou R.A.S.Rendement radiochimique : 36,5 % par rapport à l'oxyde d'éthylène  
<sup>14</sup>C - U.

R.A.S. = 4,5 μCi/mg

R.A.S. = 1,37 mCi/mM

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - MATHE G. et KENIS Y. - La chimiothérapie des cancers, Expansion Scientifique Française, Paris (1975)
- 2 - COHN P. - Brit. J. Cancer, 11: 258 (1957)
- 3 - NOVIKOVA M.A. - Voprosy Onkol. 7 : 48 (1961)
- 4 - MILNER A.N., KLATT O., YOUNG S.E., STEHLIN J.S. - Cancer Research 25 : 259 (1965)
- 5 - KLATT O., MILNER A.N., STEHLIN J.S. - Proc. Am. Assoc. Cancer Research 3 : 334 (1962)
- 6 - BERGEL F. - Optical Stéréospecificity of Anti-Cancer Agents, Farmaco, Ed. Sci., 19 : 99-109 (1964)
- 7 - ROSS W.C.J. - Hand. Exp. Pharmacol. XXXVIII/1 (1974)
- 8 - BERGEL F., STOCK J.A. - J. Chem. Soc. 2409 (1954)
- 9 - BERGEL F., BURNOP V.C.E., STOCK J.A. - J. Chem. Soc. 1223, (1955)
- 10 - SOLOWAY A.H., NYILAS E. - J. Org. Chem. 1091-94 (1961)
- 11 - ERLLENMEYER, LIPP - Annalen 210-213 (1883)
- 12 - CARPINO L.A. - J. Am. Chem. Soc. 79 : 98-101 (1957)
- 13 - SCHWYZER R., SIEBER P., KAPPELER H., - Helv. Chim. Acta, 42 : 2622-24 (1959)