

MARQUAGE PAR ^{14}C DU (CHLORO-2 ETHYL)-3 NITROSO-3 UREIDO)-1'
O-ISOPROPYLIDENE-2', 3' O-p-NITROBENZOYL-5' α ET β -D-RIBO
FURANNOSE OU RFCNU.

J. C. MADELMONT*, M. F. MOREAU*, D. PARRY*, D. GODENECHÉ*
et J. L. IMBACH**

*INSERM U 71, B. P. 184, Rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand
et Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine, 28, Place
Henri Dunant, B. P. 38, 63001 Clermont-Ferrand.

** Laboratoire de Chimie Bio-Organique, Université des Sciences et
Techniques du Languedoc, 34060 Montpellier.

SUMMARY

RFCNU was labelled by ^{14}C on three positions.

- on the carboxyl of the para nitro benzoic group,
- on urea carbonyl,
- on the carbone 1 of the 2, chloro éthyl group.

RESUME

La RFCNU (α , β) a été marquée par le ^{14}C en trois positions.

- sur le carboxyle du groupement para nitro benzoïque,
- sur le carbonyle uréique,
- sur le carbone 1 du groupement chloro-2 éthyle.

Avec les moutardes à l'azote les nitrosurées constituent une classe
importante de drogues anticancéreuses.

Les marquages par le ^{14}C des moutardes a largement contribué à la
connaissance de leur mécanisme d'action (1, 2). Ils ont permis de montrer

Mots-clés : Ribofurannosyl chloro-2 éthyl nitrosurée, marquage ^{14}C .

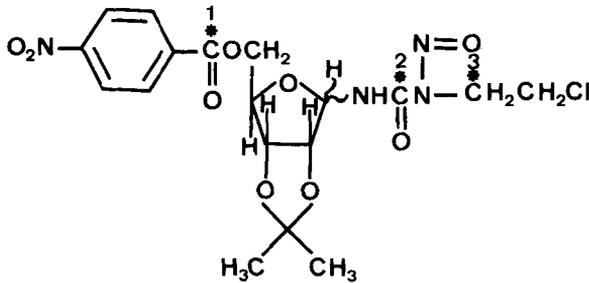
que leur cytotoxicité était due à l'alkylation du DNA par les chaînes chloro-2 éthyle.

Récemment un certain nombre de glycosyl chloro-2 éthyl nitroso urées telles que la chlorozotocine (3) la RFCNU et la RPCNU (4, 5) pour ne citer que les plus importantes, ont pris une importance particulière. Ces drogues associent les cytotoxicités des nitrosourées et du groupement chloro-2 éthyle et sont pharmacomodulées par des résidus glycosylés.

IMBACH et son équipe (4, 5) ont mis au point la synthèse de Ribosyl-chloro-2 éthyl nitrosourées (RFCNU, RPCNU) dont les essais cliniques, réalisés par MATHE (6) sont des plus encourageants.

Afin de mieux connaître le mode d'action des produits "in vivo" chez l'animal nous avons envisagé le marquage par ^{14}C de ces substances.

Dans ce travail, nous publions le marquage de l'une d'entre elles, la (chloro-2 éthyl)-3, nitroso-3, uréido) -1'-O-isopropylidène-2', 3'-O-p-nitrobenzoyl-5' α et β D-ribofurannose ou RFCNU dont la formule est rappelée ci-dessous.



Les résultats obtenus sur la L 1210 à partir des anomères α ou β étant les mêmes, nous avons envisagé le marquage du mélange d'anomères.

Compte tenu de la structure du produit, nous nous sommes proposés d'effectuer trois marquages :

- sur le carbone de la fonction ester du groupement paranitrobenzoyl afin d'évaluer la contribution de ce résidu dans la distribution tissulaire de la drogue.

- sur le carbone 1 du groupement chloroéthyle afin d'apprécier le pouvoir alkylant de ce fragment.

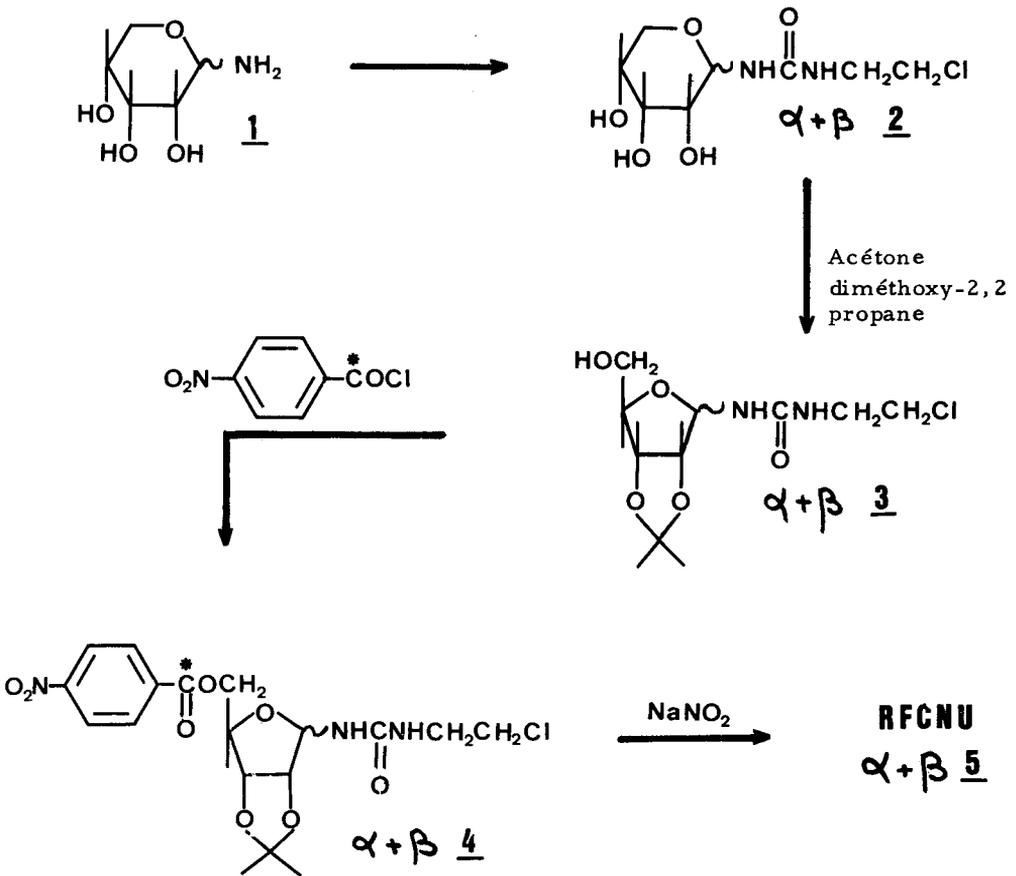
- sur le groupement carbonyle de la fonction uréique afin de connaître le pouvoir carbamoylant de cette substance.

Nous avons pour ce travail utilisé les schémas décrits par IMBACH en les adaptant et en les modifiant en fonction des précurseurs marqués afin d'optimiser les rendements radiochimiques.

1/ Marquage sur le groupement paranitrobenzoate.

Nous utilisons le schéma suivant(n°1)

Schéma 1



L'action du chloroéthyl isocyanate sur la ribopyrannosyl amine 1 conduit à la ribopyrannosyl chloro-2 éthyl urée 2.

La furannisation est ensuite effectuée en milieu acide dans l'acétone en présence de diméthoxypropane.

La ribopyrannosyl chloro-2 éthyl urée 3 constitue l'un des produits de départ pour ce marquage.

L'acide paranitrobenzoïque marqué a été obtenu selon la littérature (7) par action du cyanure de sodium ^{14}C sur le dérivé diazoïque de la 4 nitro-aniline. Cet acide traité par le chlorure de thionyle conduit au pré-curseur radioactif, le chlorure de paranitrobenzoyle.

L'action de ce chlorure d'acide sur le dérivé 3 dans la pyridine permet d'obtenir avec des rendements convenables le (chloro-2 éthyl)-3 uréido-1', O-isopopylidène-2', 3' O-p-nitro-benzoyl-5' α et β -D ribofurannose 4.

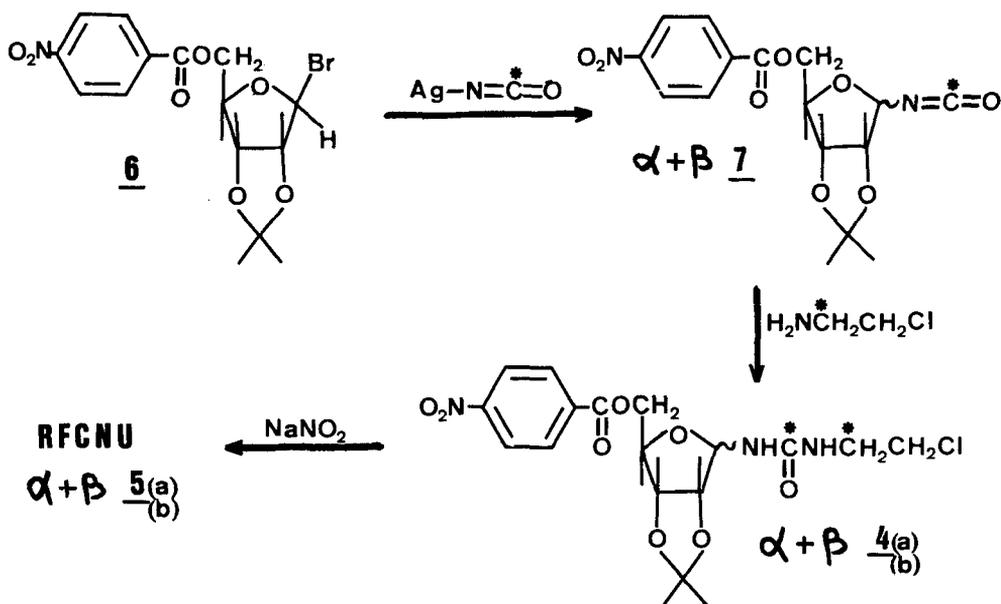
Enfin, la nitrosation par NaNO_2 dans l'acide formique conduit au mélange α et β de RFCNU avec un rendement radiochimique de 25 % calculé par rapport au cyanure de sodium ^{14}C .

2/ Marquage sur les groupements uréique et chloro-2, éthyle.

Le schéma de synthèse n° 1 est difficile à utiliser pour ces deux marquages, en effet, l'introduction de la radioactivité interviendrait dès la première étape par l'intermédiaire du chloro-2 éthyl isocyanate marqué soit sur la fonction carbonyle soit sur le groupement éthyle. Un tel procédé conduirait aux produits recherchés avec de très faibles rendements radiochimiques.

Nous avons donc utilisé un schéma complètement différent où la radioactivité est introduite plus tard dans la synthèse (schéma n° 2).

Schéma n° 2



a) marqué sur le groupement carbonyle

b) marqué sur le carbone 1 du groupe chloro-2 éthyle.

Le bromo-1-O-isopropylidène-2,3 p nitrobenzoyl-5-D-ribofuranose 6 préparé par la méthode de S. De BERNARDO (8) traité par l'isocyanate d'argent conduit au mélange α , β d'isocyanate 7.

L'action de la chloro-2 éthylamine sur ce composé permet d'atteindre le mélange α , β d'urée 4; enfin la nitrosation effectuée dans les mêmes conditions que dans le premier procédé nous conduit à la nitrosurée recherchée 5.

Ce schéma permet d'effectuer deux marquages :

- sur le carbonyle uréique en introduisant la radioactivité par l'intermédiaire de l'isocyanate d'argent ^{14}C préparé sur de petites quantités par action de l'urée ^{14}C sur le nitrate d'argent (9).

La réaction équimoléculaire de ce précurseur sur le dérivé bromé 6

permet d'obtenir la nitrosourée **5a** avec un rendement radiochimique de 28 % par rapport à l'urée ^{14}C .

- sur le carbone 1 du groupe chloro-2 éthyle par l'intermédiaire de la chloro-2 éthyl amine ^{14}C .

Ce précurseur est préparé par chloruration du chlorhydrate d'éthanol amine par SOCl_2 .

A condition de travailler en excès (2/1) d'isocyanate **7** par rapport à la chloro-2 éthyl amine, on obtient la RFCNU **5b** avec un rendement radiochimique de 57 % par rapport à l'éthanol amine-1 ^{14}C de départ.

Nous obtenons dans tous les cas un mélange d'anomères α , β avec une prépondérance de la forme α .

L'identification des produits d'arrivée a été effectuée par leur spectre de RMN. Nous retrouvons les déplacements chimiques ainsi que les couplages caractéristiques notamment entre les protons H_1 et H'_1 (voir partie expérimentale) décrits par IMBACH et coll (4).

PARTIE EXPERIMENTALE

-Indications générales.

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

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été effectués sur un appareil JEOL C 60 HL et PMX 60, en utilisant le TMS en référence interne. La position des bandes est donnée en valeur de δ

Les points de fusion sont pris sur un banc KOFLER.

Les mesures de radioactivité spécifique sont réalisées dans 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 type Geiger-Muller sans fenêtre.

I - Préparation des précurseurs.

1) (Chloro-2 éthyl)-3 uréido-1' O-isopropylidène-2', 3' α et β
D ribofurannose 3.

La substance est préparée selon la littérature (4), on obtient le mélange d'anomères α et β après chromatographie sur colonne de silice (Merk 243-400 mesh) éluant HCCl_3 -EtOH (90-10)

2) Chlorure de paranitrobenzoyle ^{14}C

L'acide para nitrobenzoïque ^{14}C est préparé selon la littérature (7) à partir des quantités suivantes :

14mM du dérivé diazotique de la 4 nitro aniline sont traitées par 10mM de Na^{14}CN (30mCi) et 2,5 mM de CuCN ; après hydrolyse on obtient 7,8 mM d'acide (62 %) Activité spécifique 14,4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

L'acide est traité par 10cm³ de chlorure de thionyle fraîchement distillé pendant 2 heures à reflux. On distille le réactif sous vide, solubilise le résidu dans le chlorure de méthylène, filtre puis évapore le solvant et obtient 6,2 mM (80 %) de chlorure d'acide.

Activité spécifique 12 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

3) Isocyanate d'argent ^{14}C .

L'isocyanate d'argent est préparé selon la littérature (8) sur les quantités suivantes.

Une solution de 6 mM d'urée (12 mCi) et 6mM de nitrate d'argent dans 50 cm³ d'eau est chauffée pendant 3 heures ; on obtient un précipité d'isocyanate d'argent (4mM) qui est filtré, lavé par l'eau froide (10cm³) et l'acétone.

Activité spécifique 12,4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

4) ^{14}C Chloro-2-éthylamine chlorhydrate.

5mM de Chlorhydrate d'éthanolamine (18 mCi) sont traités par 5cm³ de chlorure de thionyle fraîchement distillé, à reflux pendant quatre heures. On refroidit puis relargue ensuite le milieu par 60cm³ de chloroforme. Le précipité formé est filtré, traité par l'éther anhydre puis séché au dessiccateur sur P_2O_5 . On obtient 3,5 mM de chlorhydrate de chloro-2 éthyl-amine- ^{14}C (70 %) F = 144-145°C.

Activité spécifique 31,4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

II - Marquage sur le carboxyle de l'acide para nitrobenzoïque.

A une solution de 8 mM de **3** dans 30 cm³ de pyridine refroidie à 0-5°C, on condense goutte à goutte en contrôlant la température et sous agitation une solution de 6,2 mM, de chlorure de para nitrobenzoyl ¹⁴C dans 15 cm³ de dichlorométhane. On laisse 1 heure à froid puis 24 h à température ambiante. Après hydrolyse par 200 cm³ d'eau glacée, on extrait au chloroforme et lave la phase organique successivement par : l'eau, l'acide chlorhydrique à 10 %, une solution saturée de NaHCO₃, puis l'eau. On sèche la phase organique par MgSO₄, évapore le solvant et chromatographie le résidu sur colonne de silice (Merck 240-400 Mesh) éluant HCCl₃/EtOH (98 : 2). On obtient 4,5 mM (72,5 %) d'urée **4** (α et β) CCM silice Merck 60 F 254 : Rf (0,45-0,40) éluant HCCl₃-EtOH (95 : 5).

On dissout le produit ainsi obtenu dans 35 cm³ d'acide formique, refroidit à 5°C et ajoute par petites portions 935 mg (13,5mM) de nitrite de sodium.

On agite pendant 2 heures à 0,5°C puis hydrolyse par 40 cm³ d'eau glacée, on filtre le précipité obtenu et sèche au dessiccateur sur P₂O₅. On obtient 3 mM (66 %) de ribofurannosyl nitroso-urée (α et β).

CCM (Merk 60 F 254) Rf : (0,7 - 0,6) éluant HCCl₃ - EtOH (99/1)

Activité spécifique 5,2 μ Ci/mg 2,4 mCi/mM.

III - Marquage sur le carbonyle uréique :

A la solution de 3 mM de bromo-1 O-isopropylidène-2, 5 O-p-nitrobenzoyl-5 β -D-ribofurannose **6** (7) dans 20 cm³ de toluène, on ajoute 4mM d'isocyanate d'argent ¹⁴C et porte 1 hl/2 à reflux sous azote à l'abri de la lumière. On filtre à chaud et évapore le filtrat. On reprend le résidu d'isocyanate par 20 cm³ de benzène anhydre : à cette solution refroidie on ajoute 30 mM de chloroéthyl amine base et laisse 12 heures à température ambiante. La solution est distillée sous vide et le résidu chromatographié sur colonne de silice Merck (243-400 Mesh) éluant : HCCl₃EtOH (98.2). Le mélange α β d'urée **4a** est regroupé comme dans le cas précédent Rdt : 2 mM (66 %). La nitrosation est conduite comme dans le cas précédent avec 420 mg de NaNO₂ et 15 cm³ de HCOOH. Après hydrolyse et filtration, on obtient le mélange α et β de RFCNU, Rdt 1,45 mM (72 %).

Activité spécifique : 3,9 μ Ci/mg 1,85 mCi/mM.

IV - Marquage sur le carbone 1 du groupe chloroéthyle.

A la solution refroidie de 4 mM d'isocyanate-1-O-Isopropylidène-2,3-O-p (nitrobenzoyl-5 α et β D ribofurannose 7 dans 30 cm³ de benzène, on ajoute 3,5 mM de chlorhydrate de chloro-2 ^{14}C 1 éthylamine puis lentement 1 cm³ de triéthylamine. On laisse la température remonter à 25°C et évapore le milieu au bout de 12 heures.

Le résidu chromatographié comme précédemment conduit au mélange α et β d'urée 4b Rdt : 3,1 mM (98 %).

Après nitrosation (NaNO_2 650 mg, HCOOH 20 cm³) on obtient le mélange α et β de RFCNU 5 b : Rdt 2,84 mM (90 %)

Activité spécifique : 7,6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 3,6 mCi/mM.

V - Identification et contrôle de pureté.

- Contrôle de pureté : il a été effectué par CCM sur plaque (verre et plastique) de silice Merck 60 F 254 dans les systèmes suivants : HCCl_3 , HCCl_3 -EtOH (99/1 et 97/3). L'analyse est réalisée en fluorescence (254 nm) par l'iode, par radiochromatographie : sur passeur de chromatogramme et par scintillation liquide après découpage des supports plastiques.

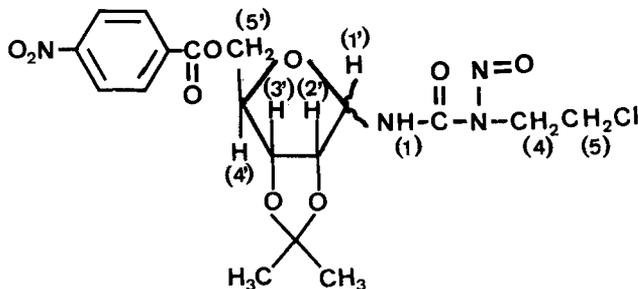
Dans tous les cas, nous repérons les deux anomères avec une grande proportion du dérivé α (de 80 à 85 %).

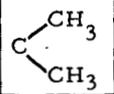
La pureté radiochimique du mélange est toujours supérieure à 95 %

- Identification.

IR : KBr 3400 (NH) 2940 2980 (CH) 1730 (C = O) 1535 (HN-C=O)
1495 (N - NO)

RMN (CDCl_3)



		H ₄	H ₅	H _{2;3;4;5;}	H' ₁	H ₁	∅
δ	1,40 (d) 1,57	3,47 (t)	4,15 (t)	4,47 (s) 4,85 (d)	5,98 J _{1'1} = 9H _z J _{1'2'} = 3H _z	7,98 J _{11'} = 9H _z	8,18 (m)
Intensité	6	3	3	3 2	1	1	4

Remerciements :

Nous remercions Madame GALLAIS pour sa collaboration technique.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer de France et de la D.G.R.S.T., décision d'aide n° 78 7 2653.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) MOREAU J., MADELMONT J.C. : J. Labelled Comp., 10, n°2, 271, (1974).
- 2) MADELMONT J.C., MOREAU M.F., GODENECHÉ D. : J. Labelled Comp, 14, n° 2, 281, (1978)
- 3) JOHNSTON T.P., MC CALEB G.S., MONTGOMERY J.A. : J. Med. Chem., 18, 104 (1975).
- 4) MONTERO J.L., MORUZZI A., OIRY J., IMBACH J.L. : Eur. J. Med. Chem. Chimica Therapeutica, 12, n° 5, 397, (1977).
- 5) MONTERO J.L., RODRIGUEZ M., IMBACH J.L. : Eur. J. Med. Chem.

- Chimica Therapeutica, 12, n° 5, 408, (1977).
- 6) MATHE G., SERROU B., HAYAT M., DE VASSAL F., MISSET J.L., SCHWARZENBERG L., MACHOVER D., RIBAUD P., BÉLPOUME D., JASMIN C., MUSSET M., MONTERO J.L. and IMBACH J.L. - Bio-medecine, 27, n° 8, 294, (1977).
 - 7) MURRAY A., WILLIAMS D.L. : Organic syntheses with Isotopes, 319, Interscience Publishers, INC, New York, (1958).
 - 8) DE BERNARDO S., WEIGELE M. : J. Org. Chem., 41, 287 (1976).
 - 9) DEAN G. : J. Chem. Soc. 1371 (1904)