

MARQUAGE PAR  $^{14}\text{C}$  DU [(CHLORO-2-ETHYL)-3 NITROSO-3 UREIDO]-1',  
TRI-O-ACETYL-2', 3', 4'  $\alpha, \beta$  D-RIBOPYRANNOSE OU R. P. C. N. U.

M. F. MOREAU, J. C. MADELMONT, D. GODENECHÉ  
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.

#### SUMMARY

RPCNU was labelled with  $^{14}\text{C}$  on three positions :

- on the carboxyl of the acetyl groups
- on the carbone 1 of the 2-chloroethyl group
- on the urea carbonyl

#### RESUME

La RPCNU a été marquée par le  $^{14}\text{C}$  en trois positions :

- sur le carboxyle des groupements acétyles
- sur le carbone 1 du groupement chloro-2 éthyle
- sur le carbonyle uréique.

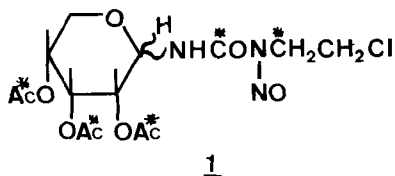
Mots-clés : Ribopyrannosyl chloro-2 éthyl nitrosourée, marquage  $^{14}\text{C}$

Les nitrosourées sont des composés largement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Parmi les chloro-2 éthyl nitrosourées, les dérivés du ribose, en particulier la RPCNU et la RFCNU (1, 2) présentent un grand intérêt, en raison de leur large spectre d'action sur les tumeurs expérimentales et leur faible myélotoxicité aux doses utilisées. Afin de réaliser une étude comparative complète de la distribution et du métabolisme de ces deux substances, nous avons envisagé leur marquage par le  $^{14}\text{C}$ .

Nous avons décrit précédemment (3) trois marquages de la RFCNU : sur le carboxyle du groupement paranitrobenzoyle afin d'évaluer le rôle joué par ce groupement dans la cinétique métabolique ; sur la chaîne

chloroéthyle et sur le carbonyle de l'urée afin d'apprécier le pouvoir alkylant et le pouvoir carbamoylant de cette substance.

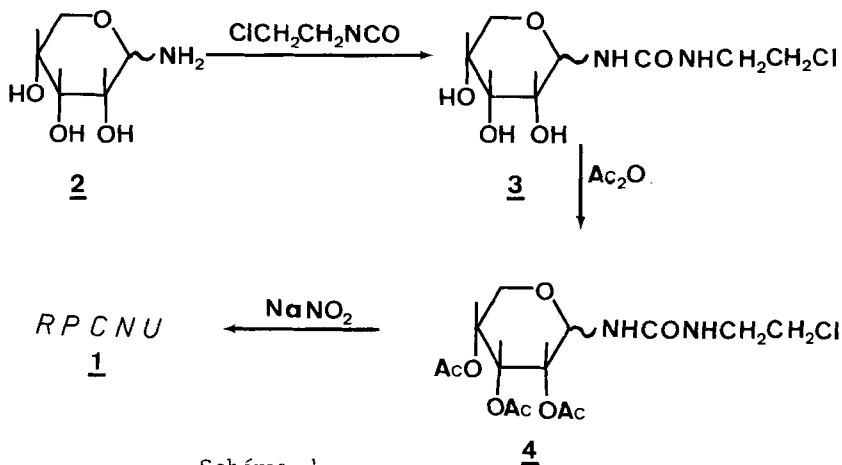
Dans le présent travail, nous rapportons le marquage du [(chloro-2-éthyl)-3 nitroso-3 uréido] - 1' tri-O-acétyl-2', 3', 4' D-ribopyranose (RPCNU) dont nous indiquons la formule ci-dessous :



Notre objectif étant de comparer le mode d'action de la RFCNU et de la RPCNU chez l'animal, nous avons réalisé également trois marquages de la RPCNU :

- sur le carboxyle des groupements acétyles (marquage I)
- sur le carbone 1 de la chaîne chloroéthyle (marquage II)
- sur le carbonyle de la fonction uréique (marquage III)

La RPCNU a été préparée récemment par MONTERO et coll. (4) à partir de la ribosylamine (schéma 1).



Nous avons utilisé ce processus pour réaliser le marquage I, car il permet d'introduire la radioactivité à l'avant-dernière étape de la synthèse

par l'intermédiaire de l'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$ .

Pour les marquages II et III, nous avons mis au point une nouvelle méthode de préparation à partir du Bromo-1 tri-O-acétyl-2', 3', 4'-D-ribofuranose.

### 1) Marquage (I)-sur le carbonyle des groupements acétyles.

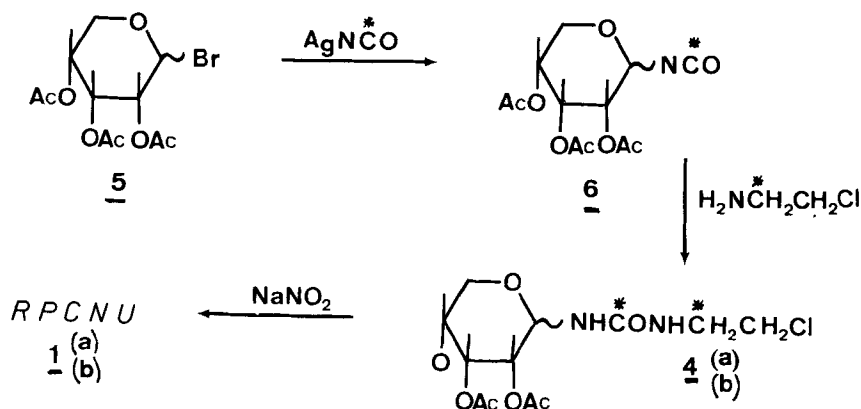
L'isocyanate de chloro-2 éthyl réagit avec la ribofuranosyl amine pour conduire à l'urée correspondante **3**. Pour obtenir le dérivé acétylé **4**  $^{14}\text{C}$ , nous avons deux possibilités en ce qui concerne le précurseur : l'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$  et le chlorure d'acétyle  $^{14}\text{C}$ . A priori, l'anhydride acétique devait conduire à un plus mauvais rendement radiochimique, étant donné qu'il perd la moitié de la radioactivité sous forme d'acide acétique  $^{14}\text{C}$  lors de la réaction, alors que ce n'est pas le cas avec le chlorure d'acétyle. Nous avons effectué des essais avec ces deux précurseurs : l'action de l'anhydride acétique sur le dérivé **3** dans la pyridine permet d'obtenir le [(chloro-2 éthyl)-3 uréido]-1' tri-O-acétyl-2', 3', 4'  $\beta$  D-ribofuranose **4** avec un rendement de 68 % par rapport à  $\text{Ac}_2\text{O}$  (le rendement radiochimique est de 34 %) alors qu'avec le chlorure d'acétyle, dans les mêmes conditions, le rendement n'est que de 12 %.

Le composé **4** est nitrosé par le nitrite de sodium dans l'acide formique, pour conduire au mélange  $\alpha, \beta$  de RPCNU **1**, avec un rendement radiochimique de 22 % calculé par rapport à l'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$ .

### 2) Marquages sur le carbonyle de l'urée (II) et sur la chaîne chloroéthyle (III).

Pour effectuer ces deux marquages, nous ne pouvions envisager d'utiliser le processus décrit dans le schéma 1, en effet le précurseur aurait été dans ce cas le chloro-2 éthyl isocyanate marqué soit sur le carbonyle, soit sur la chaîne chloroéthyle ; la radioactivité aurait donc été introduite dès la première étape, ce qui aurait conduit au produit final avec un rendement radiochimique très faible.

Nous avons donc mis au point une nouvelle voie d'accès à la RPCNU, à partir du Bromo-1 tri-O-acétyl-2', 3', 4'  $\beta$  -D ribofuranose **5** (schéma 2) préparé par la méthode de HELFERICH (5).



(a) marqué sur le carbonyle de l'urée

(b) marqué sur le carbone 1 de la chaîne chloroéthyle

#### Schéma 2

- Marquage sur le carbonyle uréique :

Il est réalisé par l'intermédiaire de l'isocyanate d'argent  $^{14}\text{C}$  préparé à partir de l'urée  $^{14}\text{C}$  et du nitrate d'argent (6).

L'action d'un léger excès de  $\text{AgNCO}^{14}\text{C}$  sur le dérivé bromé 5 1,2 / 1 dans le toluène à reflux conduit à l'isocyanate 6. Celui-ci réagit avec un excès de chloro-2 éthylamine pour donner l'urée 4(a)  $\beta$ . Enfin, la nitrosation effectuée dans les mêmes conditions que pour le marquage I permet d'obtenir la RPCNU 1(a)  $\alpha, \beta$  avec un rendement radiochimique de 26 % par rapport à l'urée  $^{14}\text{C}$ .

- Marquage sur le carbone 1 de la chaîne chloro-2 éthyle.

Le précurseur est alors la chloro-2 éthylamine  $^{14}\text{C}$ , préparée par chloruration du chlorhydrate d'éthanol amine par  $\text{SOCl}_2$ . En utilisant un excès d'isocyanate 6 par rapport à la chloro-2 éthylamine (2/1) on obtient l'urée 4(b)  $\beta$  puis la nitrosurée 1(b)  $\alpha, \beta$  avec un rendement radiochimique de 33 % par rapport à l'éthanolamine-1  $^{14}\text{C}$ .

L'identification des intermédiaires de synthèse a été réalisée par RMN. Ainsi, nous avons pu montrer que seul l'anomère  $\beta$  de l'urée 4 était isolé au cours des deux schémas de synthèse utilisés, et que la nitrosation conduit au mélange  $\alpha, \beta$  de nitrosurée 1, avec une grande prépondérance de la forme  $\beta$  (85 à 90 %).

Nous retrouvons les déplacements chimiques ainsi que les constantes de couplage caractéristiques précisés par MONTERO (4) pour les dérivés 4 et 1.

### PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres I R sont effectués sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 257.

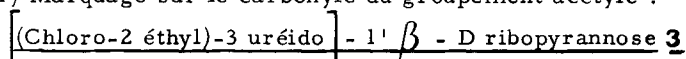
Les spectres RMN sont enregistrés sur un appareil JEOL PMX 60 MHz, en utilisant le TMS en référence interne. La position des bandes est donnée en valeur de  $\delta$ .

Les points de fusion sont pris sur banc Kofler.

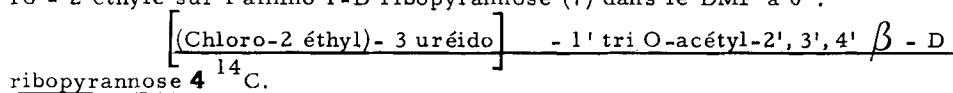
Les chromatographies de produits radioactifs sont analysées sur un dérouleur de chromatogramme PANAX équipé d'un détecteur type Geiger-Müller sans fenêtre.

Les mesures de radioactivité spécifique sont réalisées dans un scintillateur liquide Modèle Mark II Nuclear Chicago, par la méthode du standard externe.

1) Marquage sur le carbonyle du groupement acétyle :

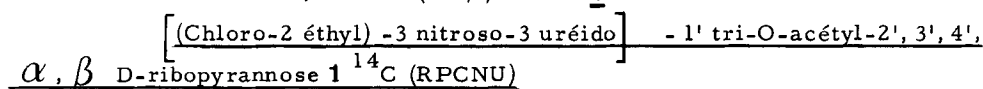


Il est préparé selon Montero (4) par action de l'isocyanate de chloro - 2 éthyle sur l'amino 1-D ribopyrannose (7) dans le DMF à  $0^\circ$ .



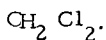
A une solution de 5 mM de 3 dans  $15 \text{ cm}^3$  de pyridine maintenue à  $0^\circ$ , on ajoute goutte à goutte 20 mM (40 mCi) d'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$ . Après 24 heures à température ambiante, on traite par  $100 \text{ cm}^3$  d'eau glacée, acidifie avec HCl 10 % extrait au chloroforme, lave la phase organique par une solution de  $\text{NaHCO}_3$ , puis par l'eau, et sèche sur  $\text{MgSO}_4$ . On évapore le solvant, lave le précipité à l'éther.

On obtient 4, 38 mM (88 %) d'urée 4.



4, 38 mM d'urée 4 sont dissoutes dans  $20 \text{ cm}^3$  d'acide formique. La solution est maintenue entre  $0^\circ$  et  $5^\circ$ , et 13 mM de  $\text{NaNO}_2$  sont ajoutées par petites fractions. Après avoir laissé 2 heures à  $0^\circ$ , on hydrolyse, extrait au chloroforme, sèche sur  $\text{MgSO}_4$ , puis évapore sous vide. Le résidu est

chromatographié sur colonne de silice (Merck-230-400 mesh) éluant :



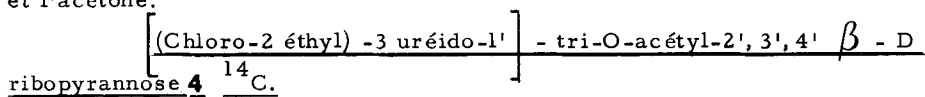
On obtient 3,1 mM (71 %) de RPCNU  $\alpha$ ,  $\beta$   $^{14}\text{C}$ .

Activité spécifique : 7,10  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  2,9 mCi/mM

2) Marquage sur le carbonyle uréique :

Isocyanate d'argent  $^{14}\text{C}$ .

AgNCO  $^{14}\text{C}$  est préparé selon la littérature (6) sur les quantités suivantes : Une solution de 9,65 mM d'urée  $^{14}\text{C}$  (30 mCi) et 9,7 mM de nitrate d'argent dans 50 cm<sup>3</sup> d'eau, est chauffée pendant 3 heures. Le précipité d'isocyanate d'argent  $^{14}\text{C}$  (5mM ; 52 %) est filtré, lavé à l'eau et l'acétone.



A une solution de 6 mM de Bromo-1 tri-O-acétyl-2', 3', 4',  $\beta$  - D ribopyranose 5 (5) dans 30 cm<sup>3</sup> de toluène anhydre, on ajoute 7 mM d'isocyanate d'argent  $^{14}\text{C}$  (5 mM de dérivé marqué + 2 mM de dérivé stable), puis on porte 2 heures à reflux sous un courant d'azote, à l'abri de la lumière. On filtre à chaud le bromure d'argent formé, et évapore le filtrat à sec.

Le résidu est repris par 20 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. A cette solution refroidie, on ajoute 30 mM de chloroéthylamine base, et laisse 24 heures à température ambiante. On évapore le solvant sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice Merck (230-400 mesh) éluant :  $\text{CHCl}_3$  - EtOH 98/2.

On obtient 3,9 mM (65 %) d'urée 4 $\beta$   $^{14}\text{C}$ .  
RPCNU 1  $^{14}\text{C}$ .

La nitrosation de 4 est conduite comme précédemment, avec 12 mM de  $\text{NaNO}_2$  et 20 cm<sup>3</sup> d'acide formique.

Après traitement, puis chromatographie sur silice dans les mêmes conditions que pour le précédent marquage, on obtient 2,8 mM (72 %) de RPCNU  $\alpha$ ,  $\beta$   $^{14}\text{C}$ .

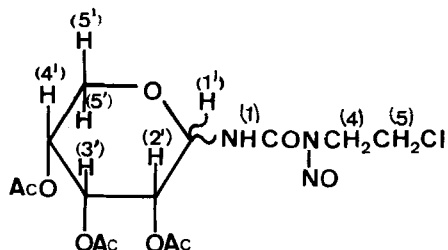
Activité spécifique : 5,4  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ , 2,2 mCi/mM

3) Marquage sur le carbone-1 de la chaîne chloroéthyle.

Chlorhydrate de chloro-2 éthylamine  $^{14}\text{C}$ -1.

Il est préparé de la même façon que pour le marquage de la RFCNU (3). A partir de 5 mM de chlorhydrate d'éthanolamine (15 mCi), on obtient 3,3 mM (66 %) de chlorhydrate de chloro-2 éthylamine  $^{14}\text{C}$ .



RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

Dérivé 4 :  $\underline{\text{H-1}}$  : 6,06 (d)  $J_{1-1'} = 9$  Hz ;  $\underline{\text{H-3}}$  : 5,86 (t) ;  $\underline{\text{H-1'}}$  : 5,31 (t)  
 $J_{1-1'} = J_{1'-2'} = 9$  Hz ;  $\underline{\text{H-2'}}$  : 4,93 (m) ;  $\underline{\text{H-3'}}$  : 5,61 (t)  
 $J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 2$  Hz ;  $\underline{\text{H-4'}}$  : 4,93 (m) ;  $\underline{\text{H-5'}}$  : 3,83 (m)  
 $\underline{\text{H-4}}$ ,  $\underline{\text{H-5}}$  : 3,58 (d) ; ester : 2,01 (s) 2,03 (s) 2,18 (s)

Dérivé 1 :  $\underline{\text{H-1}}$  ( $\alpha$ ) : 8,46 (d)  $J_{1-1'} = 9$  Hz ;  $\underline{\text{H-1'}}$  ( $\alpha$ ) : 5,83  $J_{1'-2'} = 5$  Hz ;  
 $(\beta)$  : 7,90 (d)  $(\beta)$  : 5,56 (t)  $J_{1'-1} = J_{1'-2'} = 9$  Hz  
 $\underline{\text{H-2'}}$  : 5,13 (m) ;  $\underline{\text{H-3'}}$  : 5,73 (t)  $J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 2$  Hz ;  $\underline{\text{H-4'}}$  : 5,13 (m) ;  
 $\underline{\text{H-5'}}$  : 3,91 (d) ;  $\underline{\text{H-4}}$  : 3,50 (t) ;  $\underline{\text{H-5}}$  : 4,16 (t) ester : 2,03 (s) 2,21 (s)

## Remerciements

Nous remercions Madame GALLAIS pour sa collaboration technique. Ce travail a bénéficié de l'aide de la DGRST, décision d'aide n°7872653.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) IMBACH J. L., MONTERO J. L., MORUZZI A., SERROU B., CHENU E., HAYAT M., MATHE G. - *Biomédecine* 23, 410 (1975).
- (2) LARNICOL N., AUGERY Y., JASMIN C., MONTERO J. L., IMBACH J. L. - *Biomédecine* 26, 176 (1977).
- (3) MADELMONT J. C., MOREAU M. F., PARRY D., GODENECHÉ D., IMBACH J. L., *J. Labelled comp.*, soumise à avis
- (4) MONTERO J. L., RODRIGUEZ M., IMBACH J. L., *Eur. J. Med. Chem., Chimica Therapeutica* 12, n° 5, 397 (1977).
- (5) HELFERICH B. et ECKSTEIN F., *Chem. Ber.* 93, 2467 (1960).
- (6) DEAN G., *J. Chem. Soc.* 1371 (1904).
- (7) TIPSON R. S., *J. Org. Chem.* 26, 2462 (1961).