

SYNTHÈSE DU PHOSPHATE D'ISOPROPYLAMINO-2 PYRIMIDINE ($^{14}\text{C}_2$ -4,6) A TRÈS FORTE ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE

J.M. PABIOT, L. PICHAT*

Service des Molécules Marquées
CEN-SACLAY - 91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX (FRANCE)

A. ESANU, J. POMMIER, J.P. LAURENT
INSTITUT HENRI BEAUFOUR - 92350 LE PLESSIS ROBINSON (FRANCE)

ABSTRACT

Synthesis of very high specific activity (4,6- $^{14}\text{C}_2$)
2-isopropylaminopyrimidine phosphate (I.A.P.P.)²

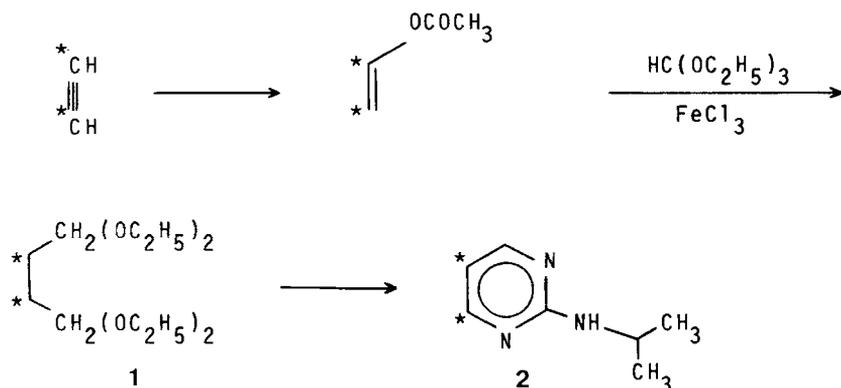
(1- ^{14}C) Sodium acetate (specific activity :
57 mCi/mMole) was transformed into ethyl (1- ^{14}C)
acetate with a 76 % yield. The latter was lithiated
with lithiodiisopropylamide. The intermediate ethyl
(1- ^{14}C) lithioacetate was carbonated with $^{14}\text{C}_2$
(specific activity : 57 mCi/mMole) to give monoethyl
(1,3- $^{14}\text{C}_2$) malonate which was esterified into diethyl
(1,3- $^{14}\text{C}_2$) malonate. The latter was condensed with
N-isopropylguanidine to give 4,6-dihydroxy 2-iso-
propylamino (4,6- $^{14}\text{C}_2$) pyrimidine. Treatment with
POBr₂ gave 4,6-dibromo 2-isopropylamino (4,6- $^{14}\text{C}_2$)
pyrimidine the hydrogenation of which under control-
led conditions gave 2-isopropylamino (4,6- $^{14}\text{C}_2$)
pyrimidine isolated as the phosphate. Specific acti-
vity was 114 mCi/mMole, radiochemical purity (TLC
and HPLC) was 99 % - overall yield was 7 % based on
(^{14}C) carbon dioxide.

L'isopropylamino-2 pyrimidine 2 (IAP), sous forme de phos-
phate (IAPP) a des propriétés pharmacologiques intéressantes (1a,
1b). C'est une substance neurotrope qui exerce une action stimulan-
te sur la vitesse de régénération du nerf.

Pour continuer les études biologiques, il a été nécessaire
de synthétiser de l'IAPP à très haute activité spécifique. Un
marquage au tritium n'a pas été envisagé car un doute aurait pu
subsister sur la stabilité de la liaison carbone-tritium dans les
milieux physiologiques. Le marquage au carbone 14 était indispensa-
ble. L'activité spécifique requise - ≥ 100 mCi/mMole pour avoir une
sensibilité suffisante dans l'expérimentation biologique - a néces-
sité l'incorporation de deux atomes de carbone 14 dans le noyau
pyrimidine.

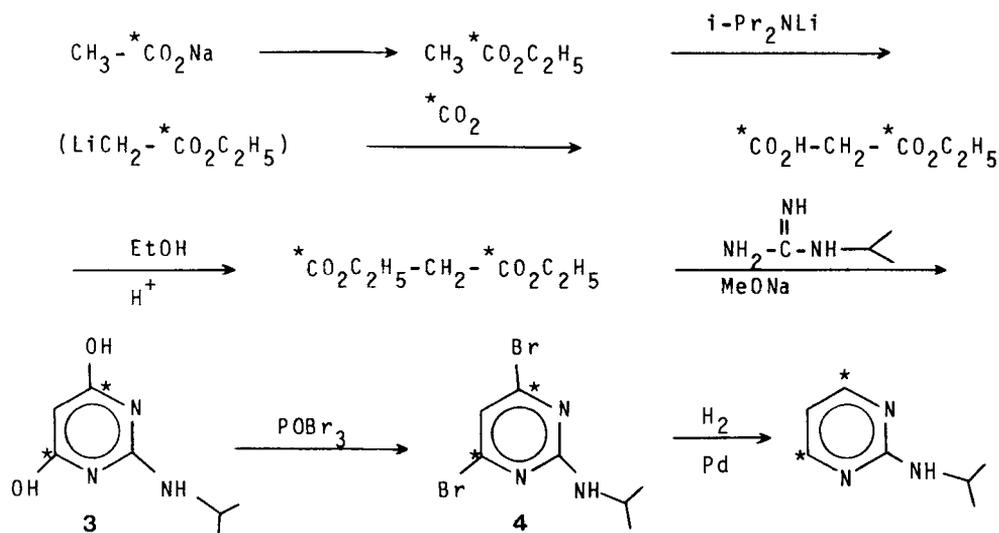
* To whom correspondence should be addressed.

Dans ce but, nous avons d'abord exploré la synthèse de l'IAPP $^{14}\text{C}_{2-5,6}$ selon le schéma I :



L'acétylène ($^{14}\text{C}_2$) a été transformé en acétate de vinyle ($^{14}\text{C}_2$) selon (2) avec des rendements satisfaisants dans des "essais à blanc" ou à faible radioactivité spécifique et également avec de l'acétylène enrichi à 90 % en carbone 13. L'acétate de vinyle condensé sur l'orthoformiate d'éthyle en présence de FeCl_3 selon (3) a fourni le tétraéthoxy-1,1,3,3 propane 1 avec un rendement de 27 % par rapport à l'acétate de vinyle. 1 et le sulfate d'isopropylaminoguanidine (9) en présence d'acide chlorhydrique ont conduit à l'IAP avec un rendement de 20 %. Cette méthode a dû être abandonnée car nous avons constaté que l'acétate de vinyle $^{14}\text{C}_{1,2}$ de très faible activité spécifique (1 mCi/mole) se polymérise sous l'influence du rayonnement bêta du carbone 14.

Le schéma II a alors été adopté :



L'acétate de sodium $^{14}\text{C}-1$ (activité spécifique : 57,5 mCi/mole) (7) a été transformé en acétate d'éthyle ($^{14}\text{C}-1$) par action du phosphate d'éthyle selon (4). La lithiation par le diisopropylamide de lithium selon (5) dans l'éther a donné un dérivé lithié qui a été carbonaté avec $^{14}\text{CO}_2$ (activité spécifique : 57 mCi/mole) et a donné le monoester éthylique du malonate d'éthyle ($^{14}\text{C}_2-1,3$) dont l'estérification par l'éthanol a conduit au malonate d'éthyle ($^{14}\text{C}_2-1,3$). Ce dernier condensé avec la N-isopropylguanidine en présence de méthylate de sodium, a fourni avec un rendement de 70 % la dihydroxy-4,6 isopropylamino-2 pyrimidine ($^{14}\text{C}-4,6$) **3** selon une méthode générale de préparation d'alcoylamino-2 dihydroxy-4,6 pyrimidines décrite par W.R. BOON dès 1952 (6). La dihydroxy-4,6 pyrimidine (**3**) traitée par POBr_3 a conduit à la dibromo-4,6 isopropylamino-2 pyrimidine ($^{14}\text{C}_2-4,6$): **4** de pureté radiochimique 60 % qui a été utilisée sans purification dans la dernière étape. **4** a été hydrogéné, à la pression atmosphérique, dans l'éthanol absolu en présence de palladium (10 %) sur charbon et de soude, en IAP : **2**. Il a été nécessaire de contrôler l'avancement de l'hydrogénation, qui est achevée en 20 minutes, par des chromatographies en couche mince. L'IAP ($^{14}\text{C}_2-4,6$) a été purifié par chromatographie sur colonne de silice. Le rendement global par rapport au carbonate de baryum ^{14}C est de 7 %. La pureté radiochimique contrôlée par chromatographie en couche mince (CCM) et par HPLC est de 99 %. La radioactivité spécifique déduite de la mesure de la radioactivité par scintillation liquide et de la masse mesurée par le spectre d'absorption UV est de 114 mCi/mole. L'identité de l'IAP ($^{14}\text{C}_2-4,6$) a été également confirmée par le spectre de masse mesuré sur le chlorhydrate. Ce dernier a permis aussi de mesurer l'activité spécifique : 114 mCi/mole.

Une méthode plus directe de préparation d'acide malonique ($^{14}\text{C}_2-1,3$), par carbonatation de l'iodure de méthylène dimagnésium selon (8) a été brièvement étudiée. Néanmoins, les rendements obtenus ne nous ont pas encouragés à poursuivre dans cette voie.

PARTIE EXPERIMENTALE

Acétate de sodium ($^{14}\text{C}-1$)

On emploie la méthode de C. BARET et L. PICHAT (7). Le gaz carbonique ^{14}C obtenu par réaction de H_2SO_4 concentré avec $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (1 Curie = 17,5 mmole, activité spécifique : 57,1 mCi/mole) est mis à réagir à -20°C pendant 30 mn avec 60 mmoles d'iodure de méthylmagnésium en solution 0,6 M dans l'éther. Après les traitements habituels, on obtient 970 mCi d'acétate de sodium ($^{14}\text{C}-1$).

Acétate d'éthyle ($^{14}\text{C}-1$) 4

L'acétate de sodium précédent est séché sous vide à 130°C pendant 4 heures dans un ballon de 50 ml. On ajoute 10 ml de phosphate d'éthyle anhydre, place un réfrigérant ascendant sur ce ballon et adapte l'appareillage sur une rampe à vide. Après mise en marche du réfrigérant, on chauffe à $140-150^\circ\text{C}$ sous 40 mmHg de vide pendant 5 heures. Après refroidissement, on transfère l'acétate d'éthyle $^{14}\text{C}-1$ dans un by-pass plongé dans la carbo-glace à -80°C , un deuxième by-pass à -180°C (azote liquide) permet de transférer le produit sous un bon vide sans trace de phosphate d'éthyle. L'acétate d'éthyle obtenu est séché sur P_2O_5 et est transféré dans deux ampoules à queue de cochon. On obtient deux fractions contenant respectivement 372,4 mCi et 367,3 mCi soit un total de 739,7 mCi - Rendement : 76 %.

Malonate d'éthyle $^{14}\text{C}-1,3$

a) Lithiation de l'acétate d'éthyle ($^{14}\text{C}-1$) 5

Sur une rampe à vide, on place un ballon de 100 ml muni d'une pastille à injection autoscellante et d'un barreau aimanté contenant 10 ml d'éther anhydre, 1 ml = 13,7 mmoles de diisopropylamine fraîchement distillée. On refroidit le ballon à -23°C , ajoute 7 mmoles de n-BuLi, puis agite pendant une heure. On transfère l'acétate d'éthyle 372,4 mCi = 6,53 mmoles dans le ballon refroidi avec de l'azote liquide puis on maintient la température à -80°C tout en agitant magnétiquement pendant 15 minutes.

b) Monoester éthylique de l'acide malonique ($^{14}\text{C}-1,3$)

On prépare 370 mCi de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de 6,6 mmoles de carbonate de baryum ^{14}C (activité spécifique = 57 mCi/mmmole) puis le sèche sur P_2O_5 et transfère sur le lithien précédent. On agite 30 mn à -80°C . La solution est hydrolysée avec 10 ml d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. On extrait avec 3 x 20 ml d'éther, puis acidifie avec H_2SO_4 6N, extrait à nouveau avec 4 x 50 ml d'éther. La solution incolore contient 500 mCi d'ester monoéthylique de l'acide malonique ($^{14}\text{C}_2-1,3$).
Rendement = 67 %.

c) Malonate d'éthyle ($^{14}\text{C}_2-1,3$)

La solution étherée précédente est évaporée à sec. Le résidu est repris dans 200 ml de dichlorométhane. Par codistillation, on sèche le produit et concentre. On ajoute 2,5 ml de benzène anhydre, 5 ml d'éthanol absolu et 2,7 ml d'acide sulfurique. La solution est maintenue à 0°C . On chauffe et agite pendant 15 heures à 70°C sous courant d'azote sec. On extrait le produit avec 3 x 50 ml de benzène, la solution est distillée puis concentrée sous vide.

d) Purification

On introduit le malonate d'éthyle ($^{14}\text{C}_2-1,3$) sur une colonne Si 60 lozar "Merck" et élue avec du dichlorométhane. On récupère le malonate d'éthyle radiochimiquement pur : 490 mCi - 4,3 mmoles - Rendement = 98 %.

La pureté radiochimique est contrôlée en CCM (silicagel - dichlorométhane) et en CPV sur silicone OV 17 à 210° C.

Dihydroxy-4,6 isopropylamino-2 pyrimidine ($^{14}\text{C}_2-4,6$)

Dans un ballon de 10 ml, on introduit 3 ml de méthanol anhydre, 108 mg = 4,7 mmoles de sodium, 434 mg = 4,3 mmoles d'isopropylguanidine. On porte à reflux pendant 30 minutes sous forte agitation. On ajoute 490 mCi de malonate d'éthyle ^{14}C -1,3 (4,3 mmoles) dilués dans 3 ml de méthanol anhydre puis maintient à reflux 6 heures sous agitation. Il se forme un précipité blanc. On refroidit et ajoute 8 ml d'eau, filtre et acidifie le filtrat avec de l'acide acétique. Le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau, séché en dessiccateur. On obtient 520 mg (343 mCi) d'un produit blanc **3**. Rendement = 70 %.

Dibromo-4,6 isopropylamino-2 pyrimidine ($^{14}\text{C}_2-4,6$) 4

Dans un ballon de 10 ml contenant 228 mCi = 2 mmoles de dihydroxy-4,6 isopropylamino-2 pyrimidine ($^{14}\text{C}_2-4,6$) : **3**, on ajoute 5 ml de toluène sec et 1,146 g = 4 mmoles d'oxybromure de phosphore. On porte à reflux 1 heure 30 et suit la progression de la réaction en chromatographie sur couche mince (silicagel-benzène: 30, méthanol : 10), **3** : Rf = 0,24 ; **4** : Rf = 0,87. Le mélange réactionnel est versé goutte à goutte dans un mélange eau + glace. On ajoute un excès de soude d = 1,38 pour alcaliniser le mélange, décante et lave quatre fois à l'eau. La solution toluénique jaune contient 170 mCi dont 40 % d'impuretés soit un rendement de 50 %.

Isopropylamino-2 pyrimidine ($^{14}\text{C}_2-4,6$)

On hydrogène le produit précédent **4** qui est mis en solution dans 10 ml d'éthanol absolu, contenant 60 mg de soude en pastilles. Après avoir purgé à l'azote, on ajoute 100 mg de palladium (10 %) sur charbon et hydrogène sous agitation à la pression atmosphérique en contrôlant toutes les 5 mn la réaction en CCM (silicagel-chloroforme : 90, acétone : 10). Au bout de 20 mn la réaction est arrêtée. Après filtration sur "Millipore" 5 μ , on évapore la solution et obtient une huile jaune.

Purification

L'huile jaune précédente en solution dans 1 ml de chloroforme est placée sur une colonne de silice Si 60 Lozar "Merck".

L'IAP base est élué avec un mélange chloroforme : 90, acétone : 10. On isole 20 mCi d'un produit incolore que l'on transforme en phosphate par addition de la quantité stoechiométrique d'acide phosphorique à 85 %.

Contrôles de pureté et d'identité

Le contrôle de la pureté radiochimique est effectué en CCM = support : silicagel Merck ; solvants : chloroforme - acétone (90 - 10), benzène - méthanol (30 - 10)

CLHP = Microporasil, chloroforme - acétone (85 - 15)

La pureté chimique est déterminée par spectrophotométrie UV dans le méthanol RP et par spectrométrie de masse.

L'activité spécifique déterminée par ces deux méthodes est de 114 mCi/mMole.

Spectre UV :

$$\begin{aligned} \lambda_{\max 1} &= 308 \text{ nm} ; & \lambda_{\min 1} &= 260 \text{ nm} ; & \epsilon_1 &= 2667 \\ \lambda_{\max 2} &= 237 \text{ nm} ; & \lambda_{\min 2} &= 208 \text{ nm} ; & \epsilon_2 &= 29783 \end{aligned}$$

Spectre de masse : introduction directe du chlorhydrate, température : 250° C

EI ("electron impact") 70 E.V.

Pics parents presents : 137 - 139 - 141

m/e = 122 - 124 - 126 = M⁺ - 15 (CH₃)

m/e = 95 - 97 - 99 = M⁺ - 42 (C(CH₃)₂)

m/e = 79 - 81 - 83 = M⁺ - 58 (NH - CH(CH₃)₂)

BIBLIOGRAPHIE

- 1a - A. ESANU - Belg. 788,648 (1973)
Brit. Appl. 47,130 (1971)
US 4.073.895 (1978)
- 1b - A. HUGELIN, T. TARRADE, M. ISTIN
C.R.Acad. Sc. Ser. D - 285 (1977) 1339-41
- 2 - J.D. ROBERTS, C.C. LEE, W.H. SAUNDERS Jr.
J. Am. Chem. Soc. - 76 (1954) 4501
- 3 - R. JUSTONI, R. PESSINA
Gazz. Chim. Ital. - 85 (1955) 34
- 4 - G.A. ROPP
J. Am. Chem. Soc. - 72 (1950) 2299
- 5 - R.A. ELLISON, P.K. BHATNAGAR
Synthesis - (1974) 719

- 6 - W.R. BOON
J. Chem. Soc. - (1952) 1532
- 7 - C. BARET, L. PICHAT
Bull. Soc. Chim. France - 18 (1951) 580
- 8 - F. BERTINI, P. GRASSELLI, G. ZUBIANI, G. CAINELLI
Tetrahedron - 26 (1970) 1281
- 9 - B.C. PRESSMAN
J. Biol. Chem. - 1 (1963) 401