

MARQUAGE PAR ^{35}S , ^{14}C , ^3H DE LA DI [(CHLORO-2 ETHYL)-2 N-NITROSO N-CARBAMOYL] , N,N-CYSTAMINE OU CNCC.

J.C. MADELMONT^{**}, M.F. MOREAU^{**}, D. PARRY^{**}, D. GODENECHÉ^{**}, J. DUPRAT^{**}
G. MEYNIÉL^{**}

J. OIRY 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. 63000 Clermont-Ferrand

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

SUMMARY

For disposition and metabolic study CNCC was labelled
by ^{35}S , ^{14}C , ^3H on three positions :

- on the two sulfur atom of the cystamine group
- on the urea carbonyl
- on the position 1 of the 2 chloro ethyl group.

RESUME

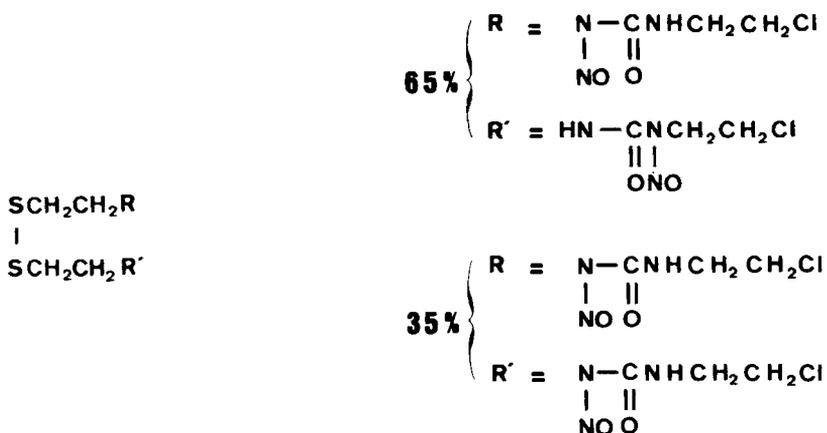
Dans le but de réaliser des études de disposition et de
métabolisme le CNCC a été marqué par ^{35}S , ^{14}C , et ^3H en trois positions :

- sur les atomes de soufre du groupe cystamine
- sur le carbonyle uréique
- en position 1 du groupe chloro-2, éthyle.

Les chloro-2 alkyl nitrosourées (BCNU, CCNU, Me CCNU)
et les chloro-2 éthyl glycosyl nitrosourées (RFCNU, RPCNU, Chlorozotocine) constituent une classe importante d'oncostatiques dont le mécanisme d'action "in vivo" n'est pas toujours bien connu. La sélection de ces composés pour les essais cliniques passe par l'étude de leur

efficacité sur les tumeurs expérimentales implantées chez l'animal. Récemment, IMBACH et coll. (1) ont préparé une bis chloro ethyl nitrosourée, la di [(chloro-2 ethyl)-2 N nitroso N-carbamoyl] N,N-cystamine ou CNCC dont l'efficacité sur les tumeurs murines est supérieure à la plupart de celles observées à partir des substances citées ci-dessus. Ces résultats nous ont conduit à réaliser le marquage en plusieurs positions de cette molécule afin d'en préciser le mode d'action "in vivo" chez l'animal.

La formule du composé est la suivante :



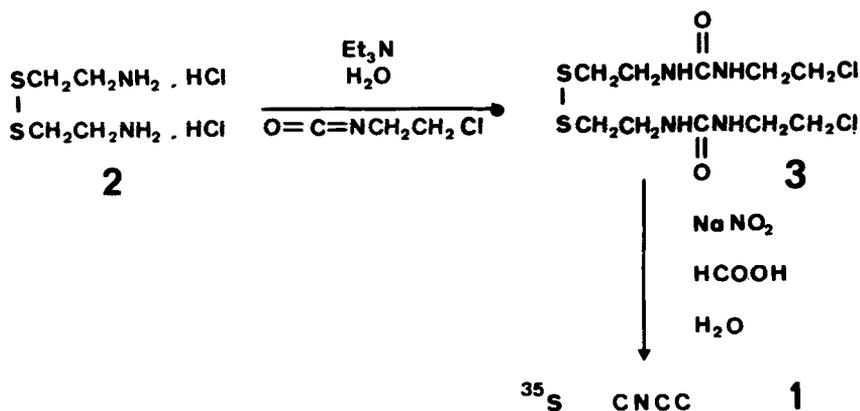
C'est un mélange de deux nitrosourées dans les proportions de 65/35. Nous avons marqué ce mélange car les tests sur les tumeurs expérimentales ont été réalisés à partir de celui-ci.

Compte tenu de l'expérience acquise dans ce domaine sur la fragilité "in vivo" de ce type de substances (2.6) et de la structure du produit nous avons réalisé trois marquages :

- par le ^{35}S sur la partie cystamine
- par le ^{14}C sur les carbonyles uréïques
- par le ^3H sur les groupes chloro-2 ethyle.

Le schéma 1 indique le processus classique de synthèse (1)

Schéma 1



Le chlorhydrate de cystamine (**2**) débloquent dans l'eau par la triéthylamine, traité par l'isocyanate de chloro-2 éthyle conduit à l'urée recherchée (**3**) avec un bon rendement 90 %. La nitrosation peut s'effectuer soit par le chlorure de nitrosyle dans la pyridine, soit par le nitrite de sodium dans l'acide formique pur ou aqueux à 0°C. Nous avons choisi la dernière technique car la réaction est plus facile à contrôler. L'isolement du CNCC est effectué par HPLC semi préparative. Les éluants utilisés doivent être exempts de solvants protiques en raison de l'instabilité de ce produit notamment vis à vis des alcools.

Ce procédé a permis d'obtenir le CNCC ^{35}S (**1**) avec un rendement chimique et radiochimique de 60 %.

Les marquages sur le carbonyle uréique et sur le groupe chloro-2 éthyle ne peuvent que très difficilement être mis en oeuvre à partir de ce schéma, il faudrait en effet marquer le chloro-2 éthyle isocyanate soit par le ^{14}C soit par le ^3H sur de petites quantités. Les tentatives effectuées pour préparer ce produit par la dégradation de Curtius selon le schéma 2 se sont soldées par des échecs.

Schéma 2

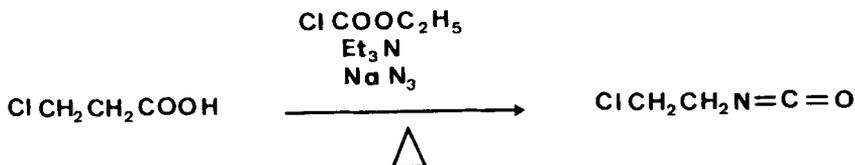
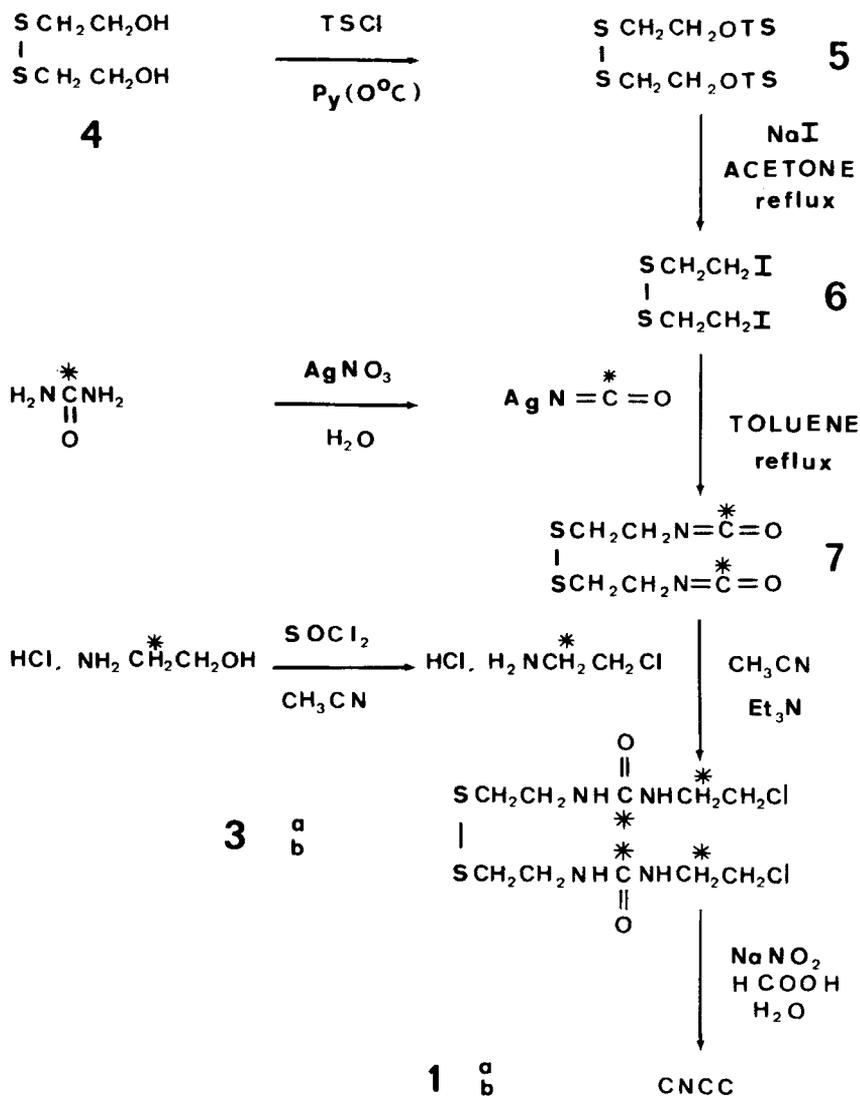


Schéma 3



a) marqué par ^{14}C sur le carbonyle uréique

b) marqué par le ^3H en position 1 du groupe chloro-2 éthyle

Nous avons donc été amenés à concevoir une autre voie de synthèse qui permette d'introduire ^{14}C et ^3H dans des conditions acceptables. Le schéma 3 résume le processus.

Nous devons trouver un réactif facile à isoler qui convienne à la disubstitution par le groupe isocyanate, nous avons pensé à un dérivé dihalogéné. La préparation du dérivé dichloré a été écartée en raison de sa proche parenté avec la moutarde au soufre. Nous nous sommes orientés vers la synthèse des dérivés dibromés et diiodés.

La réaction du chlorure de Tosyle sur le dihydroxy 2,2'-diéthyl disulfure (**4**) dans la pyridine à 0°C conduit quantitativement au ditosylate (**5**). Cet intermédiaire peut être substitué par le brome ou l'iode.

La préparation du dérivé dibromé est longue, par ailleurs les essais ultérieurs ont montré que sa réactivité sur l'isocyanate d'argent est mauvaise, nous l'avons abandonné.

Le diiodo 2,2'-diéthyl disulfure (**6**) est obtenu quantitativement en quatre heures par action de l'iodure de sodium dans l'acétone à chaud sur le ditosylate (**5**). La préparation du diisocyanate 2,2'-diéthyl disulfure (**7**) est plus difficile, elle s'effectue dans le toluène à reflux en présence d'un excès d'isocyanate (3/1 au minimum). Le contrôle RMN de la solution concentrée donne l'état d'avancement de la réaction. Ce contrôle doit impérativement être effectué avant de poursuivre car les purifications du diisocyanate (**7**) sont très difficiles et la présence du produit de départ diiodé (**6**) dans le milieu est préjudiciable au rendement radiochimique des deux marquages envisagés.

Le rendement chimique de la réaction est environ 70% par rapport au dérivé diiodé (**6**).

Le marquage par ^{14}C est réalisé à cette étape par l'intermédiaire de l'isocyanate d'argent ^{14}C .

La réaction du diisocyanate et de la chloro-2 éthyl amine peut être réalisée dans différents solvants. Nous avons essayé le toluène, le diméthylformamide et l'acétonitrile.

Le toluène permet de procéder sans changement de solvant, ce qui évite une perte de diisocyanate (**7**) au cours de la concentration. Dans ce cas, l'addition d'un excès de chloro-2, éthyl amine base (10/1) conduit à l'urée avec un rendement chimique de 90 % par rapport au dérivé (**7**). C'est la technique qui a été utilisée pour le marquage par ^{14}C .

Par contre le marquage par ^3H impliquait d'optimiser cette réaction par rapport à la chloro-2, éthyl amine. La réaction stoechiométrique du chlorhydrate de chloro-2, éthyl amine en présence de triéthylamine sur

le dérivé (7) dans l'acétonitrile permet d'atteindre l'urée avec un rendement chimique de 90 %. Ce procédé a été utilisé pour le marquage par le ^3H [1] chlorhydrate de chloro-2 éthylamine obtenu après chloruration du ^3H [1] chlorhydrate d'éthanol amine. Cette réaction peut s'effectuer soit par le chlorure de thionyle seul soit par le chlorure de thionyle dans l'acétonitrile. Cette dernière technique permet d'isoler plus facilement le chlorhydrate de chloro-2, éthyl-amine.

La nitrosation et l'isolement du CNCC pour ces deux marquages ont été réalisés comme indiqué dans la première partie.

Les rendements radiochimiques des marquages par ^{14}C et ^3H sont respectivement

1a	7 % calculé par rapport à l'urée ^{14}C
1b	44 % calculé par rapport au ^3H [1] chlorhydrate d'éthanol amine.

PARTIE EXPERIMENTALE

I Indications Générales

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler et sur un appareil Mettler.

Les spectres IR ont été réalisés sur des spectrophotomètres Perkin Elmer 257 et 398.

Les spectres de RMN ont été effectués sur un appareil JEOL C 60 HL PMX 60 et VARIAN HA 100 en utilisant le TMS en référence interne.

La position des bandes est donnée en valeur de δ . Les mesures de radioactivité spécifique sont réalisées dans un scintillateur liquide Mark II Nuclear Chicago par la méthode du standard externe.

Les chromatographies sur couches minces des produits radioactifs sont analysées soit sur un dérouleur de chromatogramme PANAX équipé d'un détecteur G.M. sans fenêtre, soit après découpage des plaques, par scintillation liquide.

Les précurseurs radioactifs ^{35}S chlorhydrate de cystamine, ^{14}C urée, ^3H chlorhydrate d'éthanolamine, ont été fournis par le Service des Molécules Marquées CEN Saclay, France.

II Préparation des précurseurs.

1/ Isocyanate d'argent

Il a été préparé selon la littérature (7) sur les quantités suivantes : une solution de 30 mM d'urée ^{14}C (50 mCi) et 35 mM de nitrate

d'argent est chauffée pendant 3 heures à reflux dans 75 ml d'eau. Au cours de la réaction, la solution se concentre au demi et un précipité se forme. On isole 18 mM d'isocyanate d'argent par filtration. On lave à l'eau froide (10 ml) puis à l'acétone. Activité Spécifique : 1,66 mCi/mM. $6,14 \times 10^7$ Bq/mM

2/ Chlorhydrate de chloro-2 éthylamine.

6,5 mM (15 mCi) de chlorhydrate d'éthanol amine en suspension dans 20 ml d'acétonitrile sont traités sous agitation par 65 mM de chlorure de thionyle à température ordinaire. Après 30 heures d'agitation, on relargue la solution jaune clair par 150 ml d'éther anhydre. Le précipité formé est filtré sur fritté, lavé à l'éther et mis au dessiccateur sur P_2O_5 : rendement 6,2 mM (95%).

F = 145.147°C

Activité spécifique : 2.5 mCi/mM.

9.25×10^7 Bq/mM

3/ Préparation du ditosylate 2,2'-diéthyl disulfure (**5**).

100 mM de dihydroxy 2,2'-diéthyl disulfure (**4**) sont traités dans 100 ml de pyridine anhydre par 220 ml de chlorure de tosylate à 0°-5°C. On laisse sous agitation pendant 3 heures à 0°C. On jette sur glace : le produit précipite. On filtre et lave à l'eau. Rendement 90 %.

F = 66.68°C

CCM = Silice (Merck Si 60 F₂₅₄) Rf : 0,5 éluant Hexane

IR = KBr cm^{-1} (CH) 2980 - 2940, (-OSO₂-) 1345 1165

RMN = 60 MHz (acétone d₆) 2,43 s 6 p (CH₃), 2,80 t 4 p (SCH₂)

4,16 t 4 p (CH₂OTS), 7,10 à 7,80 m 4 p (phenyl)

4/ Préparation du diiodo 2,2'-diéthyl disulfure (**6**).

A la solution de 50 mM de ditosylate (**5**) dans 100 ml d'acétone, on ajoute 250 mM d'iodure de sodium et chauffe à reflux pendant 3 heures en agitant. Deux techniques de traitement sont possibles.

- le tosylate de sodium et l'iodure de sodium en excès sont filtrés sur fritté. Le filtrat est concentré sous vide et chromatographié sous basse pression sur colonne de silice (Merck Lobar type C) élué par l'hexane.

- le milieu réactionnel est évaporé à sec, traité par l'eau, extrait au benzène. La phase organique est lavée par une solution de bisulfite jusqu'à décoloration totale, puis séchée sur Mg SO₄ et concentrée sous vide. On obtient le dérivé diiodé dans les deux cas avec un bon rendement (90 %).

F = 45.46°C

CCM = Silice (Merck Si 60 F₂₅₄) Rf : 0,40 Acétate d'éthyle

Hexane (20 : 80)

IR = KBr cm^{-1} (CH) 2950 2910, (CI) 560

RMN = 60 MHz (CDCl₃) 2,80 à 3,66 m (S-CH₂-CH₂ I)

III Marquage par ^{35}S

1/ Préparation de l'urée (**3**).

Une solution de 4 mM de chlorhydrate ^{35}S de cystamine (17 mCi) dans l'eau (20 ml) est traitée goutte à goutte par 8 mM de triéthylamine, à 0°C. On ajoute ensuite goutte à goutte à cette température 8,8 mM de chloro-2 éthyl isocyanate, laisse revenir à température ambiante. On maintient l'agitation une nuit. Le précipité blanc formé est filtré, lavé par l'eau glacée puis par une solution méthanol : éther (1 : 2) puis par l'éther. On conserve le produit au dessiccateur sur P_2O_5 . On obtient 3,6 mM d'urée (3) ^{35}S .

F = 144.145°C

CCM = Silice (Merck Si 60 F₂₅₄) Rf : 0,65 éluant : éthanol
chloroforme (10 : 90)

IR = KBr cm^{-1} : (NH) 3330, (CH) 2960 - 2920, (C = O)
1625, (NHCO) 1570, 1520.

RMN 100 MHz (DMSO D 6). 2,73 t 4 p (S- CH_2), 3,10 à 3,45 m 8 p
(NH- CH_2), 3,56 t 4 p (CH_2Cl), 6,30 t 4 p (NH échangeable par D_2O)

2/ Préparation de ^{35}S CNCC (**1**).

A la solution de 3,6 mM d'urée (**3**) dans 60 ml d'acide formique et 20 ml d'eau on ajoute, en agitant à 0°C, 36 mM de nitrite de sodium (NaNO_2) par petites portions. On agite pendant 2 heures à cette température. On ajoute alors 250 ml d'eau froide et extrait par 3 fois 70 ml de chloroforme stabilisé par l'amylène. On sèche rapidement sur MgSO_4 et distille le solvant sous pression réduite à température ordinaire. Le résidu brut est ensuite chromatographié par HPLC préparative sur colonne de silice Si 100 10 μ (50 cm x 2,4 cm) élué en mode isocratique par : CH_2Cl_2 (amylène 1 %) - Acétone (99,8 : 0,2) fraction A, puis CH_2Cl_2 (amylène 1 %) - Acétone (99,6 : 0,4) fraction B et CH_2Cl_2 -Ethanol (90 : 10) fraction C.

Le produit solide 2,16 mM est isolé de la fraction B puis concentré rapidement sous vide à température ordinaire.

CCM = Silice Merck Si 60 F₂₅₄ Rf : 0,35 CHCl_3 : Ethanol (98 : 2)

IR = KBr cm^{-1} : (NH) 3340, (CH) 2960-2940, (C = O) 1695,

(NHCO) 1530, (N - NO) 1480

RMN 100 MHz (CDCl_3) 2,6 à 3,10 m (t + m) 4 p (S- CH_2), 3,40 à
4 m 8 p (NH- CH_2 , N- CH_2), 4 à 4,30 m 4 p (CH_2Cl), 7,2 à 7,6 2 p
(NH)

Le pourcentage de chaque isomère est déterminé sur le massif S- CH_2 après comparaison des déplacements chimiques du signal des isomères purs (**8**) . Activité spécifique : 4,15 mCi/mM. 15,25 x 10⁷ Bq/mM

IV Marquage par ^{14}C (1 a)

Une solution de 3 mM de diiodo 2,2' diéthyl disulfure bien agitée dans 75 ml de toluène est traitée à 140°C pendant 22 heures par 18 mM d'isocyanate d'argent (29 mCi).

Une aliquote est filtrée et évaporée sous vide pour vérifier la fin de la réaction. La suspension est ensuite filtrée à chaud, le précipité lavé par le benzène (2 x 10 ml). Le filtrat refroidi (0-4°C) bien agité est traité goutte à goutte par une solution de 30 mM de chloro-2 éthylamine base dans le benzène (25 ml). L'agitation est poursuivie pendant 24 heures à température ordinaire. La suspension obtenue est évaporée à sec et déposée sur une colonne de silice (Merck Lobar type B) et chromatographiée sous basse pression. L'élution est menée par un gradient d'éthanol dans le chloroforme de 0 à 10 %. On isole dans ces conditions 2,1 mM d'urée (3 a) F 144.145°C identique à celui obtenu par la première technique (CCM, IR, RMN).

La nitrosation conduite comme indiqué précédemment sur 2 mM d'urée (3 a) avec 20 mM de NaNO_2 dans un mélange $\text{H}_2\text{O} : \text{HCOOH}$ (10 : 30) conduit après HPLC au CNCC ^{14}C 1 mM. Le composé est identique (CCM, IR, RMN) à celui d'un échantillon préparé par la première technique.

Activité spécifique : 3,3 mCi/mM. $12,21 \times 10^7$ Bq/mM.

V Marquage par ^3H (1 b)

Une solution de 8 mM de diiodo 2,2'-diéthyl disulfure dans le toluène (100 ml) est traitée par 64 mM d'isocyanate d'argent dans les conditions déjà décrites. Après le contrôle RMN on concentre la solution toluénique et isole 3,1 mM de diisocyanate 2,2'-diéthyl disulfure (une partie du produit est distillé avec le toluène sous pression réduite). Ce produit est solubilisé dans 40 ml d'acétonitrile et traité avec agitation successivement par 6,2 mM de chlorhydrate de ^3H 1 chloro-2 éthyl amine et 18,6 mM de triéthyl amine pendant une nuit à température ordinaire. On évapore à sec, lave le précipité obtenu par l'eau et sèche sous vide. Le résidu 1,2 g (2 mM équivalent d'urée 3 b) est solubilisé dans HCOOH (60 ml) et de l'eau (20 ml) puis nitrosé à 0°C par NaNO_2 (30 mM) pendant 2 heures. L'extraction et la purification menées comme indiqué précédemment conduisent au ^3H CNCC (1 b) 1,2 mM identique (CCM, IR, RMN) à l'authentique.

Activité spécifique : 5 mCi/mM. $18,5 \times 10^7$ Bq/mM.

Remerciements : Ce travail a bénéficié d'une aide de la Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer et de l'INSERM ATP (N° 119025).

BIBLIOGRAPHIE

- 1/ IMBACH J.L., MARTINEZ J., OIRY J., BOURRUT C., CHENU E., MARAL R., and MATHE G.
INSERM Symposium n°19 (B. SERROU, P.S. SCHEIN and J.L. IMBACH, Eds) Elsevier/North Holland, Biomedical Press, 123, (1981)
- 2/ MADELMONT J.C., MOREAU M.F., PARRY D., GODENECHÉ D., et IMBACH J.L.
J. Lab. Comp., XVII, 2, 203, (1980).
- 3/ MOREAU M.F., MADELMONT J.C., GODENECHÉ D.
J. Lab. Comp., XVII, 6, 825, (1980).
- 4/ GODENECHÉ D., MADELMONT J.C., MOREAU M.F., MONTOLY D., and PLAGNE R.
Cancer Res., 40, 3351, (1980).
- 5/ GODENECHÉ D., MADELMONT J.C., MOREAU M.F., PLAGNE R. and MEYNIÉL G.
INSERM Symposium N°19 (B. SERROU, P.S. SCHEIN and J.L. IMBACH, Eds) Elsevier/North Holland, Biomedical Press, 123 (1981).
- 6/ GODENECHÉ D., MOREAU M.F., MADELMONT J.C., DUPRAT J. and PLAGNE R.
Cancer Res., 42, 525, (1982).
- 7/ DEAN G., J. Chem. Soc., 1371, (1904)
- 8/ MARTINEZ J., OIRY J., IMBACH J.L., and WINTERNIZ F.,
J. Med. Chem., (in press).