

UTILISATION DE L'ETHANOLAMINE ^{14}C COMME PRECURSEUR
1^{ère} PARTIE : MARQUAGE DE LA N'-(CHLORO-2 ETHYL) N-[(METHYL
SULFINYL)-2 ETHYL] N'-NITROSOUREE ET DE LA N'-(CHLORO-2 ETHYL)
N-[(METHYL SULFONYL)-2 ETHYL] N'-NITROSOUREE PAR ^{14}C

J.C. MADELMONT, D. PARRY, D. GODENECHÉ, J. DUPRAT

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 Cedex.

S U M M A R Y

Two new 2 chloroethyl nitrosoureas were labelled on two positions by ^{14}C starting from Na^{14}CN and using ^{14}C ethanolamine as intermediate :

- on the carbon 2 of the 2 chloro ethyl group.
- on the carbon 2 of the cysteamine part.

R E S U M E

Deux nouvelles chloro 2 ethyl nitrosourées ont été marquées en deux positions par le ^{14}C à partir de Na^{14}CN en utilisant l'éthanolamine ^{14}C comme intermédiaire :

- sur le carbone 2 du groupe chloro 2 ethyl
- sur le carbone 2 de la partie cystéamine.

La CNCC dont la formule est rappelée ci-après est une bis chloro 2 ethyl nitrosourée qui a été préparée par IMBACH et OIRY (1)

composés présentent une efficacité supérieure à la CNCC sur le gliome 26, le mélanome B 16 et le carcinome de Lewis. Ils sont de plus facilement utilisables en thérapeutique en raison de leur hydrosolubilité. Les propriétés remarquables de ces deux substances nous ont conduit à les marquer par ^{14}C afin d'en étudier la biodisposition et le métabolisme.

Compte tenu de la structure de ces dérivés nous avons envisagé deux positions de marquage

- sur le carbone 2 de la fonction chloro-2 éthyle
- sur le carbone 2 du groupe S methyl cysteamine

Le schéma 3 indique les différentes étapes de synthèse.

Les précurseurs utilisés sont soit la ^{14}C N Benzyloxy-carbonyl ethanol amine soit le chlorhydrate de ^{14}C ethanol amine.

Ces deux dérivés ont été préparés selon la technique modifiée de KOLTAI (7).

La réaction du cyanure de sodium ^{14}C sur le N chloro methyl phtalimide 1 permet d'accéder au nitrile correspondant 2. L'hydrolyse du nitrile 2 en milieu acide ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$) conduit à la glycine ^{14}C 3. Nous avons préféré préparer l'ester éthylique de la glycine 4 avant de bloquer la fonction amine par le chlorure de benzyloxycarbonyle en raison de sa mauvaise stabilité en milieu basique. La réduction de l'ester bloqué 5 par NaBH_4 permet d'atteindre la benzyloxy carbonyl ethanolamine 6 qui est l'un des précurseurs recherchés. L'éthanolamine est obtenue après coupure du groupe protecteur par hydrogénation catalytique. Le traitement de l'amine par l'acide chlorhydrique conduit au chlorhydrate 7.

Marquage des nitrosourées

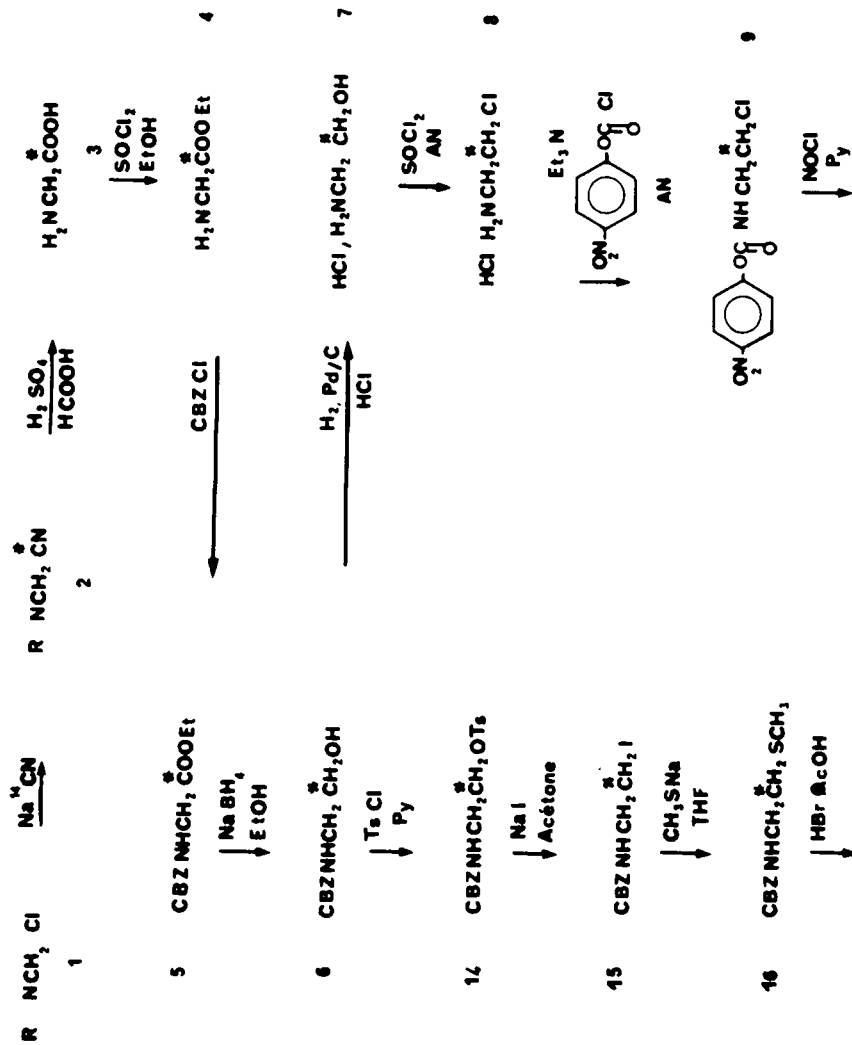
Le principal problème de cette synthèse concerne la mise au point d'une méthode sélective de nitrosation. Nous avons choisi pour cela d'introduire le groupe N nitroso chloro-2 éthyle par la méthode des carbamates activés.

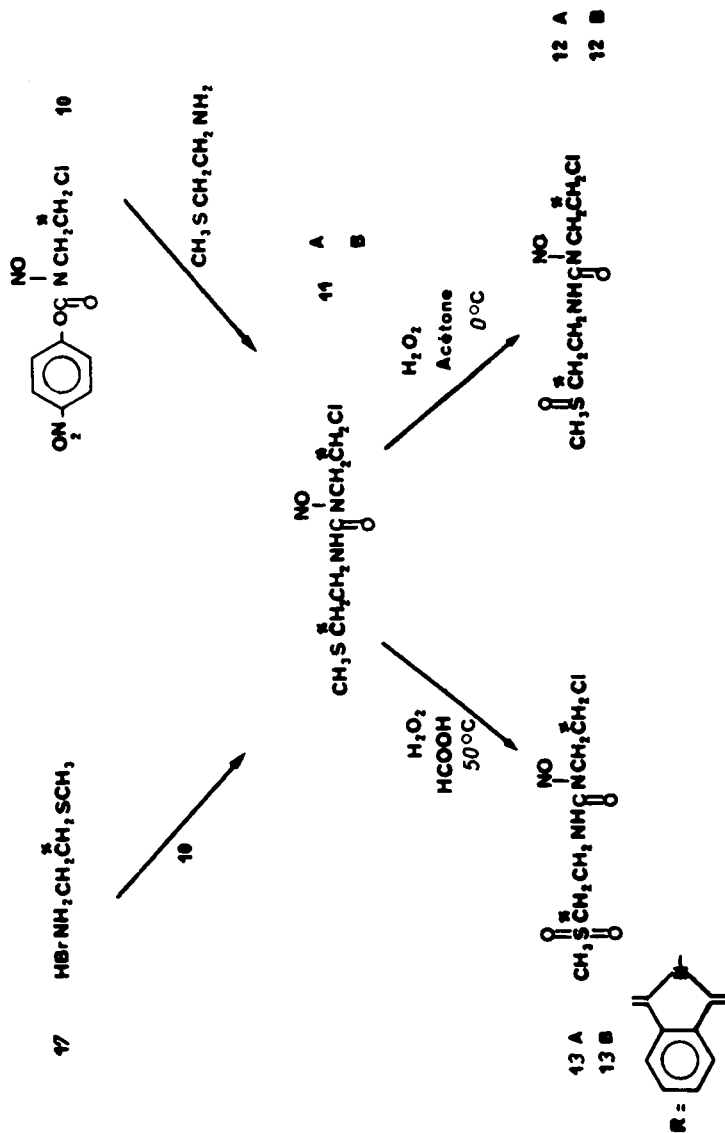
Marquage du groupe chloro-2 éthyle

Le chlorhydrate de ^{14}C éthanolamine est transformé en chlorhydrate de chloro-2 éthylamine par action du chlorure de thionyle dans l'acétonitrile.

L'action du para nitrophenyl chloroformiate sur la chloro-2 éthylamine dans l'acétonitrile en présence de triéthylamine permet d'obtenir avec un bon rendement (70 %) le carbamate

SCHEMA (3)





A - Marquage sur le carbone 2 du groupe chloro 2 ethyl
 B - Marquage sur le carbone 2 du groupe cysteamine

activé 9.

La nitrosation par le chlorure de nitrosyle dans la pyridine est quantitative, et permet d'atteindre le nitroso carbamate 10 .

Le couplage avec la S methyl thio ethylamine dans le THF conduit à la nitrosourée 11 A marquée sur le groupe chloro-2 éthyle avec un rendement radiochimique de 35 % par rapport au cyanure de sodium ^{14}C .

Enfin les oxydations menées soit dans l'acétone à 0°C soit dans l'acide formique à 50°C permettent d'isoler le sulfoxyde 12 A et la sulfone 13 A. Les rendements radiochimiques sont respectivement de 11,5 % (12 A) et 8,7 % (13 A) soit au total 20,2 % calculés par rapport au précurseur (Na^{14}CN)

Marquage des nitrosourées sur les groupes cysteamines

Le précurseur utilisé par cette voie de synthèse est la ^{14}C benzyloxy carbonyl ethanolamine 6.

Le tosylate 13 est facilement préparé par action du chlorure de Tosyle sur le dérivé 6 dans la pyridine. Le composé iodé 14 est obtenu quantitativement par substitution nucléophile en présence de NaI dans l'acétone.

L'action du thiomethylate de soude sur le dérivé halogéné 14 dans le THF permet d'atteindre la benzocarboxy S methyl cysteamine 15.

Enfin le déblocage de 15 réalisé par une solution d'acide bromhydrique (33 %) dans l'acide acétique conduit au bromhydrate de S methyl cysteamine ^{14}C .

Le couplage de ce bromhydrate et du paranitrophenyl chloroformiate s'effectue avec un rendement de 40 % dans l'acéto-nitrile. Cette réaction est la principale étape limitante de ce processus, elle permet tout de même d'obtenir la chloro-2 nitrosourée 11 B avec un rendement radiochimique de 17 % par rapport au Na^{14}CN .

Les oxydations menées dans les mêmes conditions que dans le schéma précédent conduisent au sulfoxyde 12 B et à la sulfone 13 B.

Les rendements radiochimiques sont respectivement 5,6 % (12 B) et 4,2 % (13 B) soit environ 10 % par rapport au précurseur (Na^{14}CN).

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

I-Indications générales

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler.

Les spectres IR ont été réalisés sur un spectre photomètre Perkin Elmer 398.

Les spectres de RMN ont été effectués sur un appareil JEOL PMX 60 en utilisant le TMS en référence interne. La position des bandes est donnée en valeur de δ . Les mesures de radioactivité sont réalisées dans un spectromètre à scintillation liquide Packard modèle 4530.

Les chromatographies sur couches minces des produits radioactifs sont analysées sur un lecteur Berthold LB 2832.

Les précurseurs radioactifs Na^{14}CN ont été fournis par le service des molécules marquées CEN, Saclay, France

II-Préparation des précurseurs1) ^{14}C chlorhydrate de glycine 3.

Il a été préparé selon KOLTAI (7) à partir de 20 mM de NaCN et 24 mM de chlorométhyl phtalimide.

2) ^{14}C chlorhydrate de glycine ester éthylique 4.

Le chlorhydrate de glycine 3 est repris par 150 ml d'éthanol et refroidi à 0°C . On ajoute ensuite 15 ml de chlorure de thionyle. Après 4 heures de chauffage à reflux la solution est évaporée à sec sous vide. Le résidu est traité par 150 ml de méthanol puis filtré. La phase organique est évaporée, et le solide obtenu traité par le chloroforme. Le précipité restant est l'ester éthylique de chlorhydrate de glycine.

3) ^{14}C Ester éthylique de carbobenzoxy glycine 5.

On solubilise la suspension de l'ester 4 dans 100 ml d'acetonitrile en ajoutant 3 ml de triéthylamine. On ajoute à cette solution refroidie ($0^\circ\text{-}5^\circ\text{C}$) 7 ml de chlorure de benzyl oxycarbonyle puis 3 ml de triéthylamine et porte à reflux pendant 20 heures. Le solvant est ensuite distillé sous vide et le résidu chromatographié sur colonne de silice. L'élution menée par l'hexane puis le chloroforme stabilisé à l'amylène permet d'obtenir le produit 5.

4) ^{14}C Carbobenzoxy ethanolamine 6

Ce composé est obtenu selon KOLTAI (7) après réduction de l'éthyl ester 5 par le borohydrure de sodium dans l'éthanol.

5) ^{14}C ethanolamine 7.

Cette amine est obtenue selon KOLTAI (7) après hydrogénation catalytique.

Ce mode opératoire permet d'obtenir les précurseurs 6 et 7 avec des rendements radiochimiques respectifs de 60 % et 56 % par rapport au Na^{14}CN .

III-Marquage par ^{14}C sur le groupe chloro 2 ethyle1/ Chlorhydrate de chloro-2 ethylamine 8

Il a été marqué selon la littérature (2) sur les quantités suivantes 11 mM de ^{14}C (55 mCi) chlorhydrate d'éthanolamine, 130 mM de chlorure de thionyle 30 ml d'acetonitrile.

Rdt : 90 % F = 145,147°C Activité spécifique : 5 mCi/mM - $18,5 \cdot 10^7$ Bq/mM.

2/ Nitro 4 phenyl N(chloro-2 ethyl) carbamate 9.

A une solution agitée de 10 mM de paranitrochloroformiate dans 50 ml d'acetonitrile, on ajoute 9,9 mM de chlorhydrate de chloro 2 ethylamine. On additionne ensuite goutte à goutte 20 mM de triethylamine et laisse une nuit sous agitation.

On jette sur glace et filtre sur fritté le précipité obtenu puis lave à l'eau froide et sèche sous vide au dessiccateur sur P_2O_5 .

Rdt : 90 % F = 80°C

CCM : Silice (Si 60 Merck F 254) éluant CHCl_3 Rf 0,1
EtOH CHCl_3 5% Rf 0,6

3/ Nitro-4 phenyl-N (chloro-2 ethyl) nitroso carbamate 9.

8,9 mM de carbamate 9 sont solubilisés dans 30 ml de pyridine et refroidis à - 20°C. On ajoute sous agitation 1,5 ml de chlorure de nitrosyle et poursuit la réaction pendant une heure à cette température. Le milieu est jeté sur glace et le précipité filtré puis séché sous vide au dessiccateur sur P_2O_5 .

Rdt : 90 % F = 120°C

CCM : Silice (Si 60 Merck F 254) éluant CHCl_3 Rf : 0,5

4/ N' chloro-2 ethyl-N[(méthyl thio)-2 éthyl]- N' nitrosourée 11 A.

A une solution agitée de 10 mM de methyl thioethyl amine dans 30 ml de THF, on additionne 8 mM de nitrosocarbamate 10. On suit l'avancement de la réaction en CCM, après 1 h 30 elle est terminée. On évapore le solvant sous pression réduite. La

purification du résidu est effectuée par chromatographie liquide basse pression (eluant, chloroforme amylène). Le composé 11 A est une huile qui élue avec les premières fractions.

Rdt : 95 %

CCM : Silice (Si 60 Merck F 254) CHCl₃ Rf : 0,4

IR : Fenêtre KBr (ν cm) : 3350 (NH), 2900 à 3000 (CH) 1715 (CO) ;
1520 (NH-CO), 1480 (N-NO)

RMN (CDCl₃) ; [2,13 s (3) CH₃ S] , [2,73 t (2) S CH₂CH₂NH] ,
[3,43 m (2) N CH₂CH₂Cl] , [3,70 m (2) S CH₂CH₂NH],
[4,10 t (2) N NO CH CH₂Cl] , [7 à 7,50 m (1) S CH₂
CH₂ NH échangeable]

5/ N'(chloro-2 ethyl)-N [(methyl sulfinyl)-2 ethyl]
-N' nitrosurée 12 A

3,8 mM de nitrosurée 11 A sont solubilisées dans 15 ml d'acétone et la solution est refroidie à -5°C. On ajoute 5 ml de peroxyde d'hydrogène à la solution bien agitée et suit l'avancement de la réaction par CCM. Après 1 heure la réaction est terminée. On ajoute 15 ml d'eau glacée et extrait le milieu réactionnel par le chloroforme (4 x 100 ml). La phase organique est rapidement séchée (Mg SO₄ ou Na₂SO₄) et évaporée. La purification est réalisée par chromatographie liquide basse pression sur colonne de silice élue par un gradient EtOH/CHCl₃ variant de 0 à 2 %.

On isole des traces de sulfone 13 A et le sulfoxyde

12 A.

Rdt : 66 % F = 107°C Activité spécifique : 5 mCi/mM.18.5.10⁷Bq/mM

CCM : Silice (Si 60 Merck F 254) Eluant : EtOH-CHCl₃ 5 % (v/v)

Rf : 0,25

IR : (KBr) ν cm⁻¹ : 3220 (NH), 2900-3000 (CH), 1700 (CO),
1520 (NH-CO), 1480 (N-NO), 1045 (SO)

RMN (CDCl₃) [2,60 s (3) CH₃ S] , [3,00 t (2) S CH₂CH₂N] ,
[3,40 t (2) N-CH₂CH₂Cl] , [3,86 m (2) S-CH₂CH₂NH]
[4,10 t (2) N-CH₂CH₂Cl] , [7,40 à 7,60 m (1)
S CH₂CH₂NH échangeable]

6/ N'(chloro-2 ethyl)-N [(methyl sulfonyl)-2 ethyl]
N' nitrosurée 13 A

3,8 mM de nitrosurée 11 A sont solubilisées dans 15 ml d'acide formique et la solution est refroidie à 0°C. On ajoute en agitant 5 ml de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 110 v) à la solution acide. La température s'élève à 20°C, on porte 5

minutes à 50°C puis refroidit en ajoutant 20 à 30 ml d'eau glacée. On extrait par le chloroforme (4 x 150 ml). La phase organique est rapidement séchée ($MgSO_4$ ou Na_2SO_4) et évaporée sous pression réduite. La purification est réalisée par chromatographie liquide basse pression sur colonne de silice. L'élution effectuée par un gradient d'éthanol dans le chloroforme de 0 à 1 % permet d'isoler le composé **13 A**.

Rdt : 50 % F = 94.97°C Activité spécifique : $5 \text{ mCi/mM} \cdot 18.5 \cdot 10^7 \text{ Bq/mM}$
CCM Silice (Si 60 Merck F 254) Eluant EtOH- $CHCl_3$ 5 % (v/v)

Rf : 0,5

I.R. (KBr) $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3350 (NH), 2910 à 3000 (CH), 1715 (CO)
1525 (NH-CO), 1420 (N-NO), 1125 (SO_2)

RMN ($CDCl_3$) : [3,00 s (3) $\underline{CH_3}$ -S], [3,26 à 3,66 m (4) S- $\underline{CH_2CH_2NH}$ et N NO $\underline{CH_2CH_2Cl}$], [3,83 à 4,23 m (4) S $\underline{CH_2CH_2NH}$ et N NO $\underline{CH_2CH_2Cl}$], [7,33 à 7,66 m (1) \underline{NH} échangeable]

IV-Marquage par ^{14}C sur le groupe cystéamine.

1/ Tosylate de ^{14}C benzyloxy carbonyl éthanolamine **14**

20 mM de ^{14}C benzyloxy carbonyl ethanolamine sont solubilisés dans 40 ml de pyridine et la solution refroidie à 0°C. On ajoute par petites portions 22 mM de chlorure de Tosyle fraîchement recristallisé en contrôlant la température (0-5°C) à la solution bien agitée. On maintient une nuit à 4°C puis jette sur glace. Le précipité de tosylate est filtré puis lavé par l'eau froide et conservé sous vide (dessiccateur P_2O_5). Le produit obtenu : Rdt : 75 %, est directement utilisable pour la suite.

F = 80°C

CCM Silice (Si 60 Merck F 254) éluant $CHCl_3$ Rf : 0,3

IR : (KBr): $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3280 (NH), 3000-3100 (CH aromatique)
2800-3000 (CH), 1680 et 1550 (CONH)-
1350 (SO_3)

RMN : ($CDCl_3$) δ : 2,48 s (3) [$\underline{CH_3}$], 3,23 à 3,60 m (2) [$\underline{NHCH_2}$]
4,10 t (3) [$\underline{CH_2SO_3}$], 4,9 à 5,43 m (3) [$\underline{OCH_2}$, \underline{NH}]
7 à 8 m (9) [$\underline{C_6H_5}$ et $\underline{C_6H_4}$]

2/ ^{14}C N benzocarboxy iodo-2 ethyl amine **15**

A la solution de 15 mM de tosylate **14** dans 100 ml d'acétone, on ajoute 20 mM d'iodure de sodium et porte 6 heures

à reflux. Un abondant précipité de tosylate de sodium se forme. On filtre le précipité et rince le solide par l'acétone. On évapore le filtrat et obtient presque quantitativement le dérivé halogéné 15.

Rdt : 96.97 % F = 65°C

CCM Silice (Si 60 Merck F 254) éluant CHCl_3 Rf = 0,5

IR (KBr) $\nu \text{ cm}^{-1}$: 3300 (NH), 3060 (CH aromatique) 2900 à 3000 (CH)
1670 (NHCO)

RMN : (CDCl_3) : 3,10 à 3,73 m (4) $[\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{I}]$, 5 à 5,40 m (3)
[$\emptyset \text{CH}_2$, NH], 7,10 à 7,56 m (5) $[\text{C}_6\text{H}_5]$

3/ ^{14}C N benzo carboxy (methyl thio)-2 ethylamine 16

Une solution de 20 mM de thiomethylate de soude dans 20 ml de THF est placée dans un ballon à 2 tubulures, équipé d'une alimentation d'argon, d'un septum et d'une agitation magnétique. On ajoute à la seringue 14,5 mM de dérivé iodé 15 en solution dans le THF et maintient l'agitation pendant 3 heures à température ordinaire. On évapore le solvant sous pression réduite et dépose le résidu sur colonne de silice. L'élution menée par le chloroforme permet d'isoler le composé 16 sous forme d'huile.

Rdt : 96 %

I R (Fenêtre KBr) $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3320 (NH), 3000 à 3100 (CH aromatiques),
2900 à 3000 (CH), 1700 (CO), 1540 (NHCO)

RMN : (CDCl_3) δ 2,03 s (3) $[\text{S CH}_3]$, 2,53 t (2) $[\text{S CH}_2\text{CH}_2\text{NH}]$,
3,13 à 3,73 m (2) $[\text{S CH}_2\text{CH}_2\text{NH}]$, 5,03 s (2) $[\emptyset \text{CH}_2]$,
5,16 à 5,73 m (1) $[\text{NH}]$ 7,2 à 7,56 m (5) $[\text{C}_6\text{H}_5]$

4/ ^{14}C Bromhydrate de methyl thio 2 ethylamine 17

On solubilise à 5°C 14 mM de dérivé 16 dans 12 ml d'une solution HBr/ CH_2COOH acide acétique (33 %) et agite 4 heures à température ordinaire. Le milieu réactionnel est traité par l'éther anhydre 100 ml, le bromhydrate précipite. On filtre le précipité, rince à l'éther et conserve au dessiccateur (P_2O_5).

Le produit obtenu a les mêmes caractéristiques physico-chimiques que celui obtenu en traitant la methyl thio 2 ethylamine par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique.

Rdt : 98 %

5/ ^{14}C N' chloro-2 ethyl-N[(methyl thio)-2 ethyl] N' nitrosourée 11 B

A la suspension bien agitée de 14 mM du bromhydrate 17 dans 50 ml d'acétonitrile on ajoute 15 mM de triethylamine. Après

1 heure de contact, on additionne 15 mM de nitro-4 phenyl N (chloro-2 ethyl) nitroso carbamate et suit l'évolution de la réaction par CCM (Silice, CHCl_3). Après 6 heures on évapore le solvant, dépose sur colonne de silice et élue par le chloroforme. On isole 5,6 mM de nitrosourée 11 B Rdt = 40 %. Les caractéristiques physico-chimiques sont les mêmes que celles obtenues pour 11 A.

6/ ^{14}C chloro-2 ethyl -N (methyl sulfinyl)-2 ethyl N' nitrosourée 12 B et ^{14}C chloro-2 ethyl-N [(methyl sulfonyl)-2 ethyl] N' nitrosourée 13 B

Ces deux composés sont obtenus de la même façon que les composés 12 A et 13 A.

Les activités spécifiques sont 5 mCi/mM. $18,5 \cdot 10^7$ Bq/mM.

Remerciements : Ce travail a été réalisé grâce à une aide de la Fédération Nationale des Centres Anticancéreux. Nous remercions Madame GALLAIS pour sa collaboration technique et Mesdames LEFRANCOIS et MONTJOTIN pour la préparation de l'article.

BIBLIOGRAPHIE

1. IMBACH J.L., MARTINEZ J., OIRY J., BOURUT C., CHENU E., MARAL E., 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., DUPRAT J., MEYNIÉL G., OIRY J. et IMBACH J.L.
J. Lab. Comp., 1983, XX, 1, 7.
3. MADELMONT J.C., GODENECHÉ D., OIRY J., IMBACH J.L., MOREAU M.F., PARRY D., MEYNIÉL G.
Brevet n° 8405733 déposé le 11 Avril 1984.
4. MADELMONT J.C., GODENECHÉ D., PARRY D., DUPRAT J., CHABARD J.L., PLAGNE R., MATHE G., and MEYNIÉL G.
J. Med. Chem. (sous presse).
5. GODENECHÉ D., MADELMONT J.C., MOREAU M.F., DUPRAT J., PLAGNE R., MEYNIÉL G.
Drug. Metab. and Disp. (sous presse).
6. GODENECHÉ D., MADELMONT J.C., MOREAU M.F., DUPRAT J., PLAGNE R., MEYNIÉL G.
Drug. Metab. and Disp. (soumise à avis).
7. KOLTAI E., HORVATH B., and BANFI D.
J. Lab. Comp., 1982, XIX, 1, 7.