

**MARQUAGE PAR  $^{14}\text{C}$  DU S-ACETYL, N-GLYCYLCYSTEAMINE (I 102)**

J.C. MADELMONT<sup>\*</sup>, D. PARRY<sup>\*\*</sup>, M.F. MOREAU<sup>\*</sup>, D. GODENECHÉ<sup>\*</sup>,  
J. OIRY<sup>\*\*\*</sup>, J.L. IMBACH<sup>\*\*\*</sup>.

<sup>\*</sup>INSERM U 71, B.P. 184, Rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand et

<sup>\*\*</sup>Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine, 28, Place  
Henri Dunant, B.P. 38 - 63001 Clermont-Ferrand.

<sup>\*\*\*</sup>Laboratoire de Chimie Bio-Organique, Université des Sciences et  
Techniques du Languedoc, 34060 Montpellier.

**Summary**

S-Acetyl-N-glycylcysteamine trifluoroacetate (I 102) was labelled by  $^{14}\text{C}$  in three positions

- On the cysteamine group using  $^{14}\text{C}$  benzyloxycarbonyl ethanolamine as precursor
- On the peptidic carbonyl using  $^{14}\text{C}$  BOC glycine as intermediate.
- On the acetyl residue by means of  $^{14}\text{C}$  acetic anhydride.

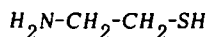
**Résumé**

Le trifluoroacetate de S Acetyl N glycyl cystéamine a été marqué par  $^{14}\text{C}$  en trois positions

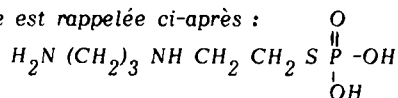
- Sur le groupe cystéamine par l'intermédiaire de la  $^{14}\text{C}$  1 benzyloxycarbonyl éthanolamine.
- Sur le carbonyl peptidique par l'intermédiaire de la  $^{14}\text{C}$  1 BOC glycine.
- Sur le groupe acétyle en utilisant l'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$ .

Les substances radioprotectrices occupent une place importante dans la littérature. Elles sont caractérisées pour la plupart par la présence d'un atome de soufre dans leur structure, bon nombre d'entre elles sont susceptibles de libérer un groupe thiol "in vivo" dont le rôle de piège à radicaux libres est bien connu en particulier au niveau des structures membranaires des cellules irradiées.

Les dérivés les plus étudiés contiennent la séquence cystéamine ou thioéthyl amine (1)



Le radioprotecteur dont le développement est le plus avancé est le W.R. 2721 (2-5) ; sa formule est rappelée ci-après :



C'est un phosphorothioate contenant la séquence thioéthylamine. Ce composé semble posséder la propriété de protéger sélectivement les tissus sains par rapport aux tissus tumoraux vis à vis des radiations ionisantes.

Récemment OIRY et IMBACH (6) ont préparé et testé une série de composés à visée radioprotectrice. Parmi ces dérivés le trifluoroacétate de S Acetyl N glycyl cystéamine ou I 102 dont la formule est indiquée ci-dessous :



paraît posséder des propriétés radioprotectrices légèrement inférieures à celles du W R 2721 (7) mais surtout une toxicité moindre laissant entrevoir une utilisation possible plus facile de ce produit chez l'homme.

Le marquage de ce composé a été entrepris dans le but d'établir une pharmacocinétique rigoureuse, de réaliser une étude précise de métabolisme et de mettre en évidence sa sélectivité pour les tissus normaux par rapport aux tissus tumoraux.

Compte tenu de la structure du produit, trois marquages ont été réalisés :

- A. Sur le carbone 2 du groupe thioéthyl amine.
- B. Sur le carbonyle du groupe acétyle.
- C. Sur le carbonyle peptidique.

Dans le schéma de synthèse le processus n° I permet d'atteindre les marquages A et B tandis que la voie II permet d'obtenir le marquage C.

### I - Marquages sur le carbone 1 des groupes thioéthyl amine (13 A) et acétyle (13 B).

La synthèse et le marquage des composés 2 à 8 ont déjà été décrits. (8).

La substitution de l'iode par le groupe SH permet d'atteindre la  $^{14}\text{C}$  Benzocarboxythioéthylamine 9. Ce composé traité "in situ" par l'anhydride acétique en présence de triéthylamine conduit au thio ester 10A. Cette dernière réaction autorise également le marquage sur le groupe acétyle et l'obtention du composé 10B.

La déprotection réalisée par HBr/AcOH (33 %) conduit quantitativement au bromhydrate de S acétyl cystéamine 11 A,B.

Le couplage au BOC glycine réalisé selon J. MARTINEZ et coll. (8) en utilisant l'hexachlorocyclotriphosphatriazène  $(\text{PNCl}_2)_3$  dans l'acétate d'éthyle est l'étape limitante de ce processus ; les rendements en BOC glycyl N (S acétyl)

cystéamine **12 A,B** ne dépassent pas 50 %.

Le déblocage effectué par l'acide trifluoroacétique amène quantitativement au trifluoroacétate de glycyl N (S acetyl) cystéamine **13 A,B**.

Les rendements radiochimiques sont :

15 % pour **13A** calculés par rapport à  $\text{Na}^{14}\text{CN}$

21 % pour **13B** calculés par rapport à l'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$ .

## II. Marquage sur le carbonyle peptidique (13 C).

Pour réaliser ce marquage, il est nécessaire de disposer de  $^{14}\text{C}$  1 BOC glycine.

Pour préparer ce précurseur le tert butoxy carboxyimino phenyl-2 acetonitrile (BOC-ON) (10) a été préféré au tert butylazido formate. Cette technique conduit au BOC glycine avec un bon rendement (~ 90 %) en outre, la purification est très facile.

Le couplage à la S acétyl cystéamine ainsi que le déblocage du composé sont réalisés comme dans le schéma précédent.

Le composé **13C** est obtenu avec un rendement radiochimique de 28 % par rapport au précurseur  $\text{Na}^{14}\text{CN}$ .

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### I. Indications Générales.

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler. Les spectres RMN ont été effectués sur un appareil JEOL PMX 60 en utilisant le TMS ou le DSS en référence interne. La position des bandes est donnée en valeur de  $\delta$ . Les mesures de radioactivité sont réalisées avec un spectromètre à scintillation liquide Packard modèle 4530.

Les chromatographies sur couche mince des produits radioactifs sont analysées sur un lecteur Berthold LB 2832.

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

### II. Préparation des Précurseurs.

#### 1) $^{14}\text{C}$ chlorhydrate de glycine. 3

Il a été préparé selon KOLTAL (11) à partir de 60 mM de  $^{14}\text{NaCN}$  (300 mCi) et 65 mM de chloroethyl phtalimide avec un rendement radiochimique de 69 % par rapport à  $\text{Na}^{14}\text{CN}$ .

#### 2) $^{14}\text{C}$ N benzo carboxy iodo-2 ethyl amine 8

Ce composé a été préparé selon une technique déjà décrite à partir de  $^{14}\text{C}$  N benzocarboxyethanolamine **6** (14 mM) via le tosylate correspondant **7** (10,5 mM) avec un rendement radiochimique de 36 % par rapport au  $\text{Na}^{14}\text{CN}$  de départ.

### 3) Préparation du $^{14}\text{C}$ BOC glycine 14

8 mM de chlorhydrate de glycine  $^{14}\text{C}$  et 20 mM de triethyl amine sont solubilisés dans 12 ml d'un mélange eau/dioxane 50/50 (v/v). On ajoute à cette solution bien agitée 10 mM de tert butoxy carboxy imino phenyl-2 acetonitrile (BOC-ON). Après deux heures de réaction le milieu réactionnel est dilué à l'eau (15 ml) et lavé par l'acétate d'éthyle.

La phase aqueuse est traitée par une solution glacée d'acide citrique 1 N (40 ml) puis extraite par l'éther (3 x 50 ml).

Le solide est purifié de ses impuretés par chromatographie liquide liquide basse pression sur colonne de silice. L'élution est menée par un gradient d'éthanol dans le chloroforme de 0 à 5 %. On isole 7 mM de BOC glycine.

Rdt 87 % par rapport au chlorhydrate de glycine ;

Le rendement radiochimique est 60 % par rapport au  $\text{Na}^{14}\text{CN}$ .

$F = 87^\circ\text{C}$  Litt (12)  $F = 86.88^\circ\text{C}$

### III. Marquage sur le carbone du groupe thioethyl amine.

#### 1) $^{14}\text{C}$ N Benzo carboxy S acetyl cysteamine 10.

Dans un ballon de 100 ml équipé d'une réserve d'argon, d'un barreau magnétique, d'une tubulure latérale obturable par un septum et contenant une suspension de 12 mM de NaSH dans 30 ml de THF, on ajoute à la seringue une solution de 10,5 mM  $^{14}\text{C}$  N Benzocarboxyiodo-2 amino ethyl amine dans 30 ml de THF. Après deux heures d'agitation à température ambiante, la substitution de l'iode par le thiol est terminée. On ajoute alors 12 mM d'anhydride acétique puis 12 mM de triethylamine et laisse réagir deux heures sous agitation.

Le THF est évaporé sous pression réduite, et le résidu est traité par une solution glacée d'acide chlorhydrique 1 N et extrait par le chloroforme (100 ml). Après lavage, par l'eau distillée la phase chloroformique est traitée par 50 ml d'une solution 1 N de  $\text{NaHCO}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{Mg SO}_4$  puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est pur à 95 %. Le produit très pur peut être obtenu après chromatographie liquide liquide basse pression sur colonne de silice. L'élution est menée par le chloroforme. On isole dans ces conditions le composé 10A (9,45 mM) sous forme d'une huile.

CCM (Silice Merck Si 60 HF 254) éluant  $\text{CHCl}_3$  Rf : 0,3

IR : fenêtre KBr  $\nu \text{ cm}^{-1}$  3320 (NH), 3000-3050 (CH aromatiques) 2860-2960 (CH alkyl), 1710 et 1680 (C=O)

RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) [2,26-s-(3)  $\text{CH}_3$ ], [2,76 à 2,56 m (4)  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ], [4,93 à 5,53 m (3)  $\text{CH}_2$ , NH], [7,10 à 7,50 m (5)  $\text{C}_6\text{H}_5$ ]

#### 2) Bromhydrate de S Acetyl cysteamine 11A.

On traite 9,45 mM de  $^{14}\text{C}$  N Benzocarboxy S acetylcysteamine 10A par 10 ml d'une solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique (33 %) pendant une nuit à température ordinaire.

Le milieu réactionnel est dilué par 100 ml d'éther anhydre et le précipité

de bromhydrate de S acetyl cystéamine **11A** filtré sur fritté puis lavé par l'éther.

Le produit ainsi obtenu (9,45 mM) est utilisé sans autre purification pour la suite des réactions.

### 3) S Acetyl N BOC glycyl cysteamine 12A.

A la solution refroidie ( $0^\circ\text{C}$ ) de 12 mM de BOC glycine dans 120 ml d'acétate d'éthyle on ajoute 12 mM de  $(\text{PNCl}_2)_3$  et agite le milieu pendant 30 minutes. On ajoute ensuite à  $0^\circ\text{C}$  12 mM de triéthylamine et laisse 30 minutes à cette température. Enfin, on ajoute successivement le Bromhydrate **11A** puis goutte à goutte 24 mM de triéthylamine.

Le milieu réactionnel est agité pendant 1 nuit à température ordinaire puis hydrolysé par une solution de  $\text{NaHCO}_3$  1 N (50 ml).

La phase organique est séchée. Après distillation sous pression réduite on obtient un résidu qui est chromatographié sur colonne de silice. L'éluion est menée par un gradient d'éthanol dans le chloroforme de 0 à 5 %. On obtient 4,44 mM de composé **12A** sous forme d'une huile qui cristallise de l'éther de pétrole

$$F = 59.60^\circ\text{C}$$

$$\text{CCM} = (\text{Silice Merck Si 60 HF 254}) \text{ éluant EtOH CHCl}_3 \text{ 10 \% (v/v)}$$

$$R_f = 0,75$$

IR : fenêtre KBr  $\nu \text{ cm}^{-1}$ : 3300 (NH), 2800 à 3000 (CH), 1750 à 1630 bande très intense  $[\text{C} = \text{O} (\text{OC NH}, \text{CONH}, \text{S} \overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}} \text{CH}_3)]$  1590 (NHCO)

RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) [1,43 s (9)  $(\text{CH}_3)_3 \text{C}$ ], [2,33 s (3)  $\text{CH}_3 \text{CO}$ ], [3,00 t (2) S  $\text{CH}_2$ ], [3,20 à 3,66 m (2) NH  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ] [3,80 d (2)  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ], [5,23 à 5,76 m (1) NH], [6,60 à 7 m (1) NH].

### 4) Trifluoroacétate de $^{14}\text{C}$ S Acetyl N glycyl cysteamine 13A.

4,44 mM de dérivé **12A** sont solubilisés dans 10 ml d'acide trifluoroacétique à  $0^\circ\text{C}$ , on agite une nuit à température ordinaire puis évapore l'acide trifluoroacétique sous pression réduite.

Le résidu est repris par 4 ml d'acétate d'éthyle et la précipitation du sel est réalisée par addition lente d'hexane. Le composé **13A** (4,4 mM) est isolé par filtration.

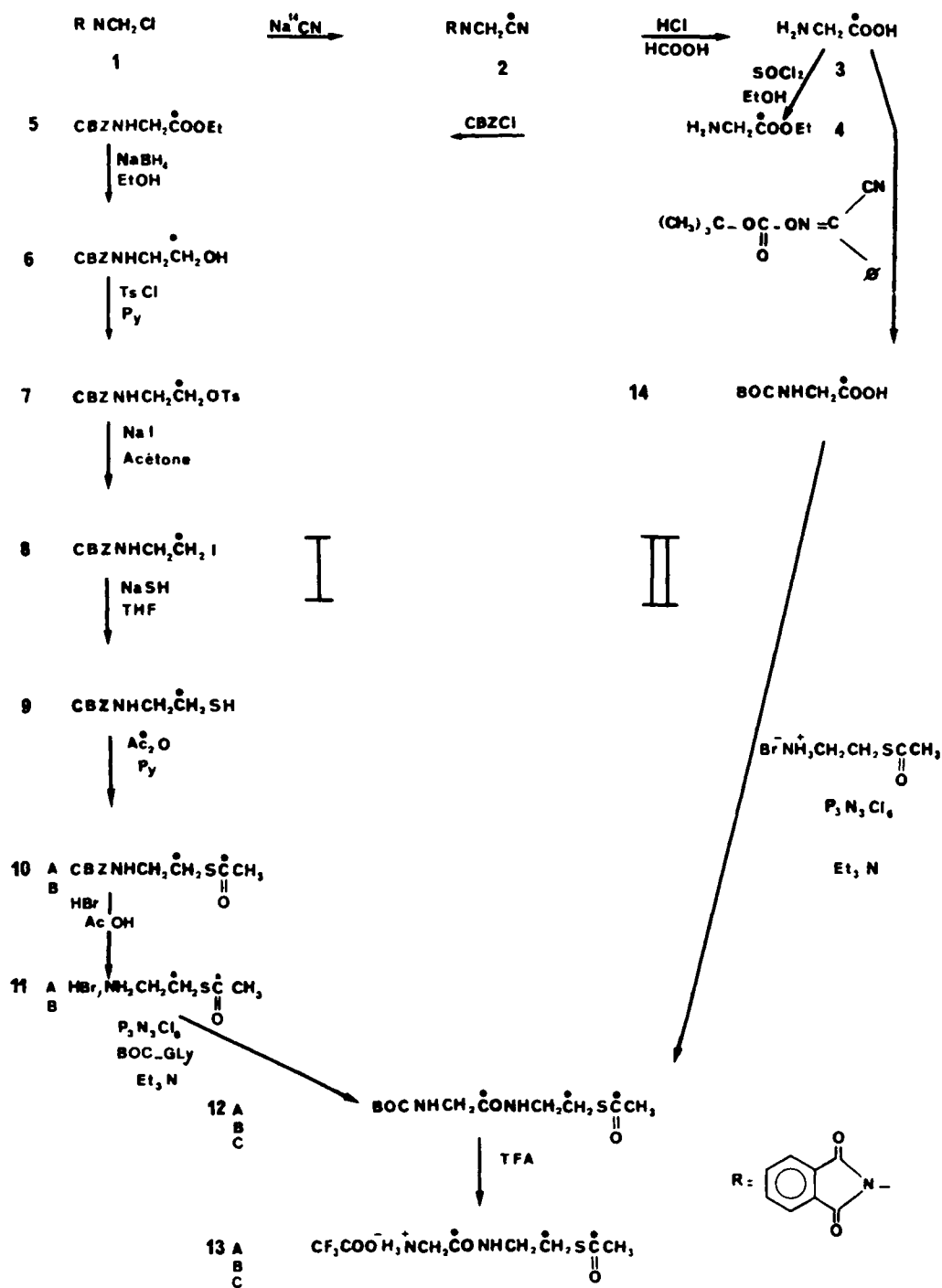
$$F = 92-94^\circ\text{C}$$

$$\text{CCM} : (\text{Silice Merck Si 60 HF 254}) \text{ éluant BuOH-AcOH-H}_2\text{O 6/2/2 - (v/v)} R_f = 0,5$$

IR : KBr  $\nu \text{ cm}^{-1}$ : 3340-3320 (NH), 2960-2995 (CH), 1700, 1670 C=O (COS, CO-NH) 1590 (NHCO).

RMN  $\text{D}_2\text{O}$  (DSS) [2,40 s (3)  $\text{CH}_3$ ], [3,06 t (2) S  $\text{CH}_2$ ], [3,46 t (2) NH  $\text{CH}_2 \text{CH}_2$ ], [3,80 s (2) NH  $\text{CH}_2\text{CO}$ ]

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



**IV. Marquage sur le carbone 1 du groupe acétyle. 13B.**

Le mode opératoire décrit pour le marquage sur le carbone 1 du groupe thioéthylamine a été utilisé pour réaliser cette radiosynthèse.

Les processus ont été adaptés aux quantités des composés suivantes : 5 mM de N-benzocarboxy iodo-2 ethyl amine **9**, 5 mM d'anhydride acétique  $^{14}\text{C}$  (4 mCi).

On obtient le composé **13B** avec une activité spécifique de 0,4 mCi/mM.  
 $1,48 \times 10^7$  Bq/mM.

**V. Marquage sur le carbonyle peptidique 13C.**

Il est conduit dans les conditions déjà décrites à partir de 7 mM de  $^{14}\text{C}$  BOC glycine.

On obtient le dérivé **13C** avec une activité spécifique de 5 mCi/mM.  
 $18,5 \times 10^7$  Bq/mM.

**Remerciements :**

Ce travail a été réalisé grâce à un support financier de la D.R.E.T. Contrat n° 84219.

Nous remercions Madame GALLAIS pour sa collaboration technique et Mesdames LEFRANCOIS et MONTJOTIN pour la réalisation de ce manuscrit.

**Bibliographie**

1. Akerfeldt. S, Acta. Radiol. 1 : 465 (1963)
2. Yuhas. J.M. and Staer J.B., J. Natl. Cancer Inst, 42, 331 (1969)
3. Yuhas. J.M, Proctor. J.O. and Smith. L.H, Radiat. Res. 54 : 222 (1973)
4. Yuhas. J.M, Phillips. T.L, Radioprotector and Anticarcinogens edited by O.F. Nygaard and M.G. Simic. Academic Press (1983) p. 639.
5. Tanaka. Y. Modification of radiosensitivity in Cancer Treatment edited by T. Sugahara. Academic Press. Inc. (1984) p. 61
6. Oiry. J, Imbach. J.L, Nouveaux agents radioprotecteurs ayant une structure Amino-Thioalkyle et procédés pour leur préparation. Brevet Français n° 83 10318, 22.06.1983.
7. Lespinasse. F, Oiry. J, Fatome. M, Ardoin. P, Imbach. J.L, Malaise. E.P, Guichard. M. Int. Journal. Radiation. Oncology. Biol. Phys. (1985) 11, 1035.
8. Madelmont. J.C, Parry. D, Godeneche. D, Duprat. J. J. Lab. Comp. (sous presse).
9. Martinez. J et Winternitz. F. Bull. Soc. Chim. Fr. (1972) 12, 4707.
10. Itoh. M, Hagiwara. D and Kamiya. T. Tet. Lett. (1975) 49, 4393
11. Koltai. E, Harvath. B and Banfi. D. J. Lab. Comp. (1982) XIX 1, 7.
12. Nagasawa. T, Kuroiwa. K, Varta. K, Isona. Y. Bull. Chem. Soc. Japan (1973) 46, 1269.