

**MARQUAGE PAR ^{14}C DU CHLORO-2 ETHYL ISOCYANATE. APPLICATION AU
MARQUAGE DE CHLOROETHYL TETRAZINONE
ET DE CHLOROETHYLNITROSOUREES**

J.C. MADELMONT, M.F. MOREAU, D. GODENECHÉ, P. LABARRE
et A. VEYRE

INSERM U 71, B.P. 184, 63005 Clermont-Ferrand Cedex
et Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine, B.P. 38,
63001 Clermont-Ferrand Cedex

SUMMARY

The labelling of 2-chloroethyl isocyanate with ^{14}C on the carbonyl group from 3-chloro [carboxyl- ^{14}C] propionic acid is described.

Curtius reaction under phase transfer condition was used.

This isocyanate was used to synthesize 2-chloroethyl tetrazinone and 2-chloroethyl nitrosoarea.

Key words : 3-chloro [carboxyl- ^{14}C] propionic acid, 2-chloroethyl isocyanate, Curtius reaction, 2-chloroethyl, tetrazinone, 2-chloroethyl nitrosoarea.

RESUME

Le chloro-2 éthyl isocyanate a été marqué par ^{14}C sur le groupe carbonyl à partir de l'acide chloropropionique- ^{14}C .

La réaction de Curtius en présence de catalyseur de transfert de phase a été utilisée.

Les marquages de chloro-2 éthyl tetrazinone et de chloro-2 éthyl nitrosourées sont décrits.

Mots clés : acide chloro-3 propionique, chloro-2 éthyl isocyanate, réaction de Curtius, chloro-2 éthyl tetrazinone, chloro-2 éthyl nitrosourées.

Les isocyanates sont des composés utilisés en synthèse dans la préparation d'urées, de carbamates et d'amines primaires. Les haloéthyl isocyanates entrent comme intermédiaires dans la préparation des haloéthyl nitrosourées (1,2) et des

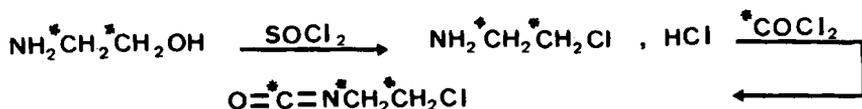
haloéthyl 1,2,3,5 tétrazinones (3,4). Ces substances sont des médicaments anti-cancéreux de la catégorie des alkylants.

Le mécanisme d'action "in vivo" et "in vitro" est généralement étudié après marquage par des isotopes radioactifs ou stables.

Le chloroéthyl isocyanate peut être un intermédiaire utilisable dans le marquage de ces dérivés. Si l'on veut étudier le devenir du carbonyle lié au groupe chloro-2 éthyle, il est nécessaire de préparer le chloro-2 éthyl isocyanate marqué sur le carbone correspondant.

Plusieurs méthodes permettent d'atteindre cet isocyanate marqué par ¹⁴C.

1/ Par le phosgène.



Ce procédé permet d'envisager plusieurs positions de marquage. Le rendement radiochimique varie de 35 à 48 % par rapport à l'éthanolamine (1,5) il chute si on veut marquer le carbonyle via le phosgène.

2/ la réaction de Curtius.

Elle peut être conduite soit en milieu protique soit en milieu aprotique.

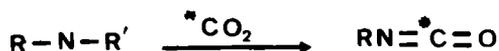


a) En milieu protique (eau), l'azide est généralement préparé par action de l'azidure de sodium sur le chlorure d'acide. Dans notre cas le risque d'hydrolyse du précurseur se double de difficultés à isoler le produit d'arrivée.

b) En milieu aprotique, la synthèse de l'azide peut être réalisée à partir de l'acide par réaction avec le triméthyl-silyl azide (6), le diphenyl phosphoryl azide (7,8) ou le tert butylammonium azide (9).

Le chloroéthyl isocyanate doit être isolé par distillation, le rendement est généralement assez faible.

3/ Par carbonatation.



La carbonatation par $^{14}\text{CO}_2$ de triméthyl silylamine (10) ou de triphényl iminophosphorane (11,12) peut conduire en une étape au précurseur marqué. Cette expérimentation est difficilement envisageable pour le chloro-2 éthyl isocyanate en raison de la difficulté à préparer les précurseurs et les conditions de chauffage imposent l'utilisation d'excès importants de $^{14}\text{CO}_2$.

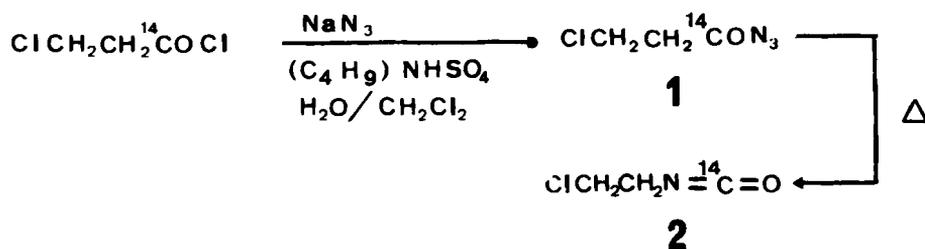
Nous décrivons ici la préparation du chloro-3 propylazide ^{14}C et du chloro-2 éthyl isocyanate marqué sur le carbonyle. Son utilisation dans la synthèse d'une 1, 2, 3, 5-tétrazine, le mitozolomide, et de chloro-2 éthyl nitrosourée est également abordée.

1/ Préparation de l'azide et du chloro-2 éthyl isocyanate ^{14}C .

Nous utilisons la technique modifiée de PFISTER et WYMAN (13).

La préparation de l'azide est réalisée à 0°C en milieu hétérogène (CH_2Cl_2 , eau) en présence de catalyseur de transfert de phase, à partir de chlorure d'acide chloro-3 propionique et d'azide de sodium.

Le réarrangement de Curtius s'effectue par chauffage de la phase organique après décantation et séchage.



Cette technique permet de hauts rendements chimiques et radiochimiques aussi bien en azide qu'en isocyanate (96 %).

2/ Préparation des chloro-2 éthyl nitrosourées.

L'étude métabolique de deux chloro-2 éthyl nitrosourées : la N'(chloro-2 éthyl) N-[(méthyl sulfinyl)-2 éthyl] N'-nitrosourée et la N'(chloro-2 éthyl) N-[(méthyl sulfonyl)-2 éthyl] N'-nitrosourée nécessite le marquage par ^{14}C du carbonyle uréique.

Deux radiomarquages ont déjà été réalisés sur ces dérivés dans le laboratoire (2). La synthèse des composés 4, 5, 6 a b est donc parfaitement codifiée. Le problème consistait à préparer le paranitrophényl carbamate de chloro-2 éthyle marqué sur le carbonyle.

Les deux voies étudiées A et B conduisent au produit recherché. (Voir schéma)

La voie A consiste à faire réagir directement l'azide 1 sur le para nitrophénol dans le chloroforme, elle permet d'atteindre le Carbamate 3 avec 65 % de rendement chimique et radiochimique (la réaction de Curtius s'effectue "in situ").

La voie B utilise le chloroéthyl isocyanate préparé à partir de l'azide dans le dichlorométhane. La réaction menée avec le paranitrophénol dans le chloroforme conduit à un rendement chimique et radiochimique de 78 % calculé par rapport à l'azide. C'est le processus que nous avons utilisé pour réaliser le marquage.

3/ Préparation du mitozolomide.

Le mitozolomide (3) est une chloroéthyl tétrazinsonne, l'étude de sa décarbonylation "in vivo" nécessite le marquage du groupe carbonyle par ¹⁴C.

Ce composé est préparé par action du chloro-2 éthyl isocyanate en excès (10/1) sur le carboxamide-4 diazo-5'imidazole, la réaction s'effectue normalement dans l'éther ou l'acétate d'éthyle.

Après avoir adapté les excès de chloro-2 éthyl isocyanate à 2/1 dans l'éther ou l'acétate d'éthyle, nous avons étudié la possibilité de réaliser la réaction à partir de l'azide 1 dans son solvant de préparation (CH₂Cl₂ ou CHCl₃) en espérant que la dégradation de Curtius s'effectuerait "in situ".

Nous avons finalement choisi le chloroforme comme solvant et l'azide en tant que réactif pour effectuer la synthèse dans la proportion Diazo = 2 (voir schéma)

Azide

Ce marquage s'effectue avec le minimum de manipulation à partir du chlorure d'acide chloro-3 propionique-1 ¹⁴C.

Dans ces conditions nous obtenons le mitozolomide avec un rendement chimique de 90 % et radiochimique de 45 %.

PARTIE EXPERIMENTALE

Indications Générales

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler. Les spectres de RMN sont enregistrés 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 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.

Le cyanure de sodium ¹⁴C a été fourni par le Service des Molécules Marquées, Saclay, France.

I. Préparation du chlorure d'acide chloro-3 propionique.

20 mM d'acide chloro-3 propionique (100 mCi) préparés au laboratoire (14) à partir du cyanure de sodium et de chloro-2 éthanol, sont traités par 25 mMole de trichlorure de phosphore pendant 1/2 heure à reflux. Le composé est ensuite distillé sous pression normale dans un appareil Buchi GKR 50. On isole le chlorure

d'acide avec un rendement chimique et radiochimique de 70 %. A.S. : 5 mCi/mMole $18,5 \times 10^7$ Bq/mM de chlorure d'acide chloro-3 propionique.

II. Préparation du chloro 3 propyl azide (1).

Les réactions peuvent être conduites indifféremment dans le chloroforme ou le dichlorométhane. Le bas point d'ébullition du dichlorométhane permet d'isoler les produits.

A la solution refroidie (0-2°C) et agitée de 20 mM de chlorure d'acide chloro-3 propionique dans 30 ml de dichlorométhane, on ajoute 30 mg de tétrabutyl ammonium sulfate (Bu)₄N SO₄H puis goutte à goutte 15 mMole d'azide de sodium (NaN₃). Après deux heures d'agitation à cette température on décante et lave la phase organique par deux fois 5 ml d'eau. On sèche rapidement le dichlorométhane sur MgSO₄, évapore sous pression réduite à température ordinaire. Le résidu est le produit recherché.

Rdt 19 mM (95 %) A.S. : 5 mCi/mM. $18,5 \times 10^7$ Bq/mM
 IR KBr (ν cm⁻¹) 2800 (CH), 2140 (N₃ forte), 1710 (CO)
 RMN (CDCl₃) 2,79 (T, 3, CH₂-CO) ; 3,69 (T, 3, CH₂Cl)

III. Préparation du chloro-2 éthyl isocyanate. (2)

19 mM de chloro-3 propyl azide sont solubilisés dans 30 ml de dichlorométhane et porté une nuit à reflux. Le solvant chassé sous pression réduite à température ordinaire laisse un résidu de chloro éthyl isocyanate.

Le produit ne nécessite pas de purification.

Rdt 18 mM (95 %) A.S. : 5 mCi/mM. $18,5 \times 10^7$ Bq/mM
 IR KBr (ν cm⁻¹), 2800 (CH), 2280 (N = C = O, forte)
 RMN (CDCl₃) 3,16 à 4,13 m centré sur 3,63.

IV. Préparation du nitro-4 phényl chloro-2 éthyl carbamate (3).

A la solution de 10 mMole de chloro-2 éthyl isocyanate-¹⁴C (50 mCi) préparé selon le processus décrit en II et III dans 30 ml de chloroforme, on ajoute 11 mMole de nitro-4 phénol et porte une nuit à reflux sous agitation.

On évapore le chloroforme sous pression réduite et dépose le produit sur colonne de silice. L'élution menée par un gradient d'éthanol dans le chloroforme permet d'isoler le carbamate avec un rendement chimique et radiochimique de 78%.
 A.S.: 5 mCi/mMole. $18,5 \times 10^7$ Bq/mM.

F : 80°C

IR KBr (ν cm⁻¹) : 3320 (NH) ; 3100-3060 (CH aromatique) ; 2940 (CH aliphatique) ; 1700 (O-C = O)

RMN CDCl₃ 3,40 à 3,83 (m, 4, CH₂ CH₂ Cl) ; 5,33 à 5,93 (m, 1, NH échangeable) ; 7,1 à 7,43 (m, H 2 fois 2, aromatique).

V. Préparation du (chloro-2 éthyl)-3, tétrazine-1,2,3,5 one-4, carboxamido-8, imidazole ou mitozolomide. (7)

10 mMole de chloro-3 propyl azide ¹⁴C (1) (50 mCi) sont préparés dans 30 ml de chloroforme dans les conditions décrites précédemment. On ajoute à cette solution 5 mMole de carboxamide-4 diazo-5 imidazole (15) et laisse à l'obscurité sous agitation pendant 48 h à 45°C.

Le chloroforme est concentré sous pression réduite et la suspension obtenue est déposée sur colonne de silice, l'éluion menée par un gradient d'éthanol dans le chloroforme (0 à 5 % v/v) permet d'isoler le mitozolomide (1,090 mg, 4,5 mM, rendement 90 %). Le rendement radiochimique est de 45 %. A.S. : 5 mCi/mMole $18,5 \times 10^7$ Bq/mMol.

F 167°C Litt (3) : 166-168°C

I R Fenêtre KBr (ν cm⁻¹) : 3440, 3340 (NH₂), 1735 (NCON), 1665 (CONH₂)

RMN (DMSO d₆) 4 (t ; 2 CH₂N) ; 4,63 (t, 2, CH₂ Cl) ; 7,4 à 8 (m, 2, NH₂ échangeable) ; 8,73 (s, 1, CH)

Les dérivés (4), (5), (6 a b) sont préparés et isolés par les techniques déjà décrites dans la littérature (2). Les activités spécifiques sont 5 mCi/mM soit $18,5 \cdot 10^7$ Bq/mMole.

Remerciements :

Ce travail a été effectué grâce au support financier de la Société Rhône-Poulenc.

Nous remercions Monsieur J.M. Dupuy dont la collaboration technique efficace a permis la bonne réalisation de ces marquages.

Nous remercions également Mesdames J. Lefrançois et M. Bayle pour la présentation du manuscrit.

Bibliographie

1. BRUBAKER W.F., PRUSCOFF Jr., PRUSSOFF W.- J. Labelled Compd. Radiopharm. 22 : 47 (1985).
2. MADELMONT J.C., PARRY D., GODENECHÉ D., DUPRAT J.- J. Labelled Compd. Radiopharm. 22 : 147 (1985).
3. STEVENS M.F.G., HICKMAN J.A., STONE R., GIBSON R.S., BAIG G.V., LUNT E., and NEWTON C.G.- J.Med.Chem. 27 : 196 (1984).
4. LUNT E., NEWTON C.G., SMITH C., STEVENS G.P., STEVENS M.F.G., STRAW C.G., WALSH J.A., WARREN P.J., FISAMES C., LAVELLE F., LANGDON S.P. and VICKERS L.M.- J.Med.Chem. 30 : 357 (1987).
5. FAIGLE J.W. and KEBERLE H. J. Labelled Compd. Radiopharm. 5 : 173 (1969).
6. WASHBURNE S.S., PETERSON W.R.- Synth. Commun. 2 : 227 (1972).

7. SHIOIRI T., NIROMIYA K., YAMADA S.- *J. Amer. Chem. Soc.* 94 : 6203 (1972).
8. ARANDA G., HERBERT M., PICCHAT L. J. *Labelled Compd. Radiopharm.* 23 : 257 (1986).
9. BRANDSTROM A., LAMM B., PALMERTZ I.- *Acta. Chem. Scand. B.28* : 699 (1974).
10. BREEDERVELD H.- *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 81 : 276 (1962).
11. MOLINA P., ALAJARDIN M. et ARQUES A.- *Synthesis*, 596, (1982).
12. LASZLO P. et POLLA E.- *Tet. Lett.* 4651 (1984).
13. PFISTER J.R., WYMAN W.E.- *Synthesis* : 38 (1983).
14. MURRAY A. and WILLIAMS D.L.- *Organic syntheses with isotopes, Part I ; Compounds of Isotopic Carbon. Intersciences Publishers INC, New-York, Intersciences Publishers LTD, London p. 731 (1958).*
15. HERTON J.K., STEVENS M.F.G. : *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* : 1483 (1981).