

SYNTHESE DU METHYL [(CHLORO-2 ETHYL)-3 NITROSO-3 UREIDO]-3
DIDESOXY-2,3 α -D-ARABINO-HEXOPYRANNOSE MARQUE AU CARBONE-14 OU
AU CARBONE-13 (CY 233 - SR 90098)

R. SION*, A. SCHUMER*, E. VAN DURME*, A. GOUYETTE**, M. GESLIN°,
J.P. FOURNIER°, Y. BERGER°°, P. ROGER°⁺

* Sanofi Recherche, Bruxelles, Belgique

** Institut Gustave-Roussy (URA 158 CNRS et U140 INSERM),
Villejuif, France

° Institut CHOAY, SANOFI-RECHERCHE, Montrouge, France

°° Sanofi Recherche, Montpellier, France

Summary

CY 233 (Ecomustine or SR 90098) is a new antitumour nitrosourea : it is characterized by a 2-chloroethylnitrosourea substituent on a dideoxycarbohydrate. It has been labelled with ¹⁴C on a) the carbonyl group of the urea in four stages starting with ¹⁴COCl₂, b) the second carbon of the chloroethyl group in four stages starting with [¹⁴C] ethanolamine, and c) on the methyl group on the anomeric centre of the carbohydrate in three stages starting with ¹⁴CH₃OH. The final position was also labelled with ¹³C starting with ¹³CH₃OH. These differently labelled compounds are suitable for mechanistic studies of antitumour activity.

Key words

Carbon-14 labelling, carbon-13 labelling, nitrosoureido sugar, antitumour, Ecomustine.

⁺ Adresse pour les demandes de tiré-à-part :

Pierre ROGER, Institut CHOAY, SANOFI-RECHERCHE , 10 rue Morel,
92120 MONTROUGE, FRANCE

INTRODUCTION

L'Ecomustine (CY 233) est une nouvelle nitrosourée antitumorale synthétisée par P. ROGER et coll (1).

Elle est caractérisée par un pharmacophore chloro-2 éthyl nitrosourée greffé sur un déoxysucre qui lui confère à la fois une forte hydrosolubilité et une bonne stabilité chimique (2), comparativement aux autres nitrosourées.

Elle présente expérimentalement un large spectre d'action sur les tumeurs murines (leucémie L1210, carcinome de Lewis, mélanome B16, carcinome du colon C38) quelle que soit la voie d'administration (i.p., i.v., per os) et un index chimiothérapeutique favorable (3)(4) qui justifient son étude chez l'homme.

L'intérêt potentiel de ce composé a conduit à synthétiser, en vue des études de pharmacocinétique (bilan métabolique et distribution tissulaire) et de pharmacologie moléculaire (étude du mode d'action, lésions sur l'ADN, ...) :

- la molécule marquée au ^{14}C

- sur le carbone de l'urée 4 ;
- sur le carbone 2 du groupement chloroéthyle 18 ;
- sur le méthyle du centre anomérique 11.

Ces marquages doivent permettre d'étudier son mode d'action en suivant le devenir de la partie alkylante de la molécule (marquage 18), de la partie carbamoylante (marquage 4), ou du vecteur osidique (marquage 11).

- la molécule marquée au ^{13}C

- sur le méthyle du centre anomérique 10.

DISCUSSION

Les positions de marquage ont été choisies en fonction des besoins

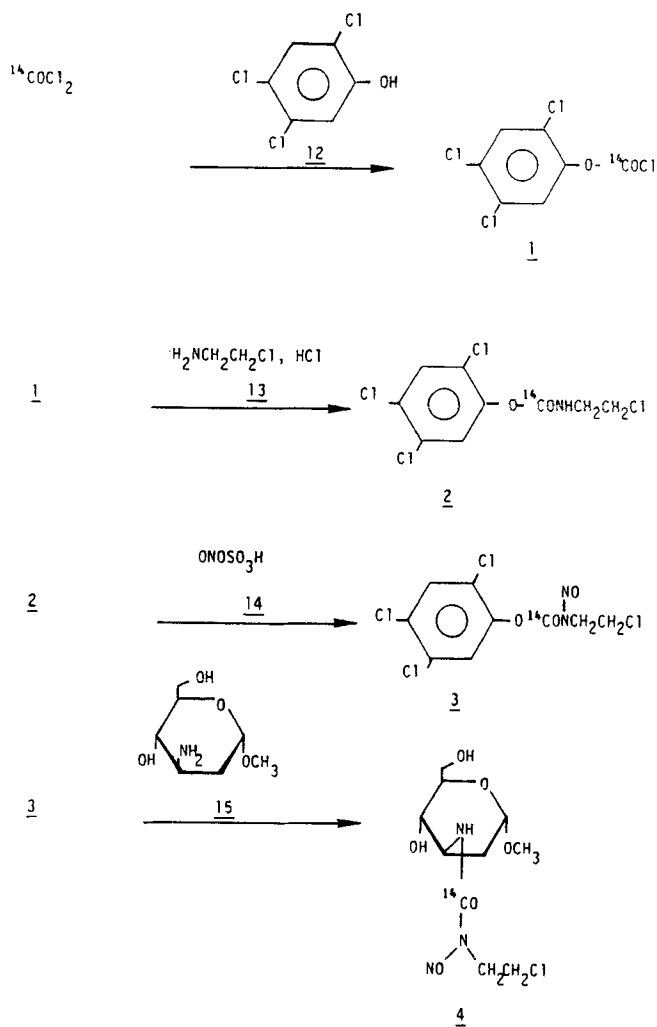
(autoradiographie, pharmacocinétique, métabolisme, etc.) et des précurseurs marqués disponibles. Nous nous sommes largement inspirés des schémas de synthèse élaborés par P. ROGER (1) et des préparations décrites par J.C. MADELMONT (5). Nous avons adapté les méthodes en fonction de la position du marquage au ¹⁴C du CY 233.

1. Marquage sur le carbone de l'urée 4

Nous avons utilisé le schéma 1 au départ de phosgène ¹⁴C (tableau 1) et de trichloro-2,4,5 phénol 12 (6) qui est une voie classique de synthèse.

Tableau 1

Précurseur	Origine	Code	Act. spécifique	Pureté
			MBq mmole ⁻¹	radiochim. %
¹⁴ COCl ₂	Amersham England	CFA-408	270	-
OH ¹⁴ CH ₂ CH ₂ NH ₂ .HCl	CEA Saclay France	CMM-371	980	99,5
¹⁴ CH ₃ OH	Isotopchim France	88008	1850	99,5
¹³ CH ₃ OH	Amersham England	WCM-138	enrich. isotop. 99 %	pureté chim. 98,6

Schéma 1

Après plusieurs tentatives, nous avons légèrement amélioré les activités spécifiques obtenues dans la littérature (5) (6) pour des produits semblables mais nous nous sommes heurtés aux masses critiques réactionnelles (tableau 2).

Tableau 2

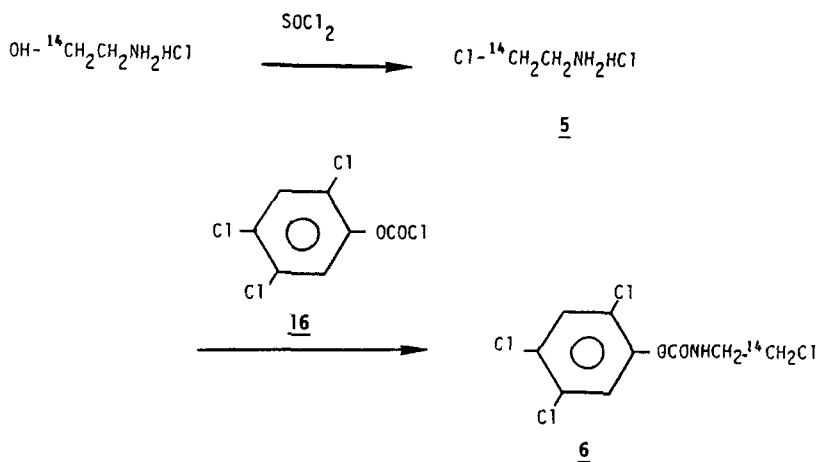
	*Rdt (%)	Pureté chim. (%)	Pureté isotop. (%)	Act. spéc. MBq mmol ⁻¹	Enrich. isotop. %
<u>4</u>	13	> 94	> 99	278	-
<u>10</u>	24	96	> 96	-	> 96
** <u>11</u>	10	> 97	> 97	437	-
<u>18</u>	11	> 99	> 99	242	-

*Rdt calculé sur les précurseurs marqués

** préparé en collaboration avec Isotopchim Ganagobie Peyruis France

2. Marquage sur le carbone 2 du groupement chloroéthyle 18

Cette partie du travail consiste à préparer le N-[chloro-2 éthyl (¹⁴C-2)], carbamate de trichloro-2,4,5 phényle 6 à partir d'éthanolamine ¹⁴C (tableau 1) et de trichloro-2,4,5 phénylchloroformiate 16 (schéma 2) puis utiliser ensuite le schéma 1 précédent pour obtenir le CY 233 marqué sur le carbone en α du groupement chloroéthyle.

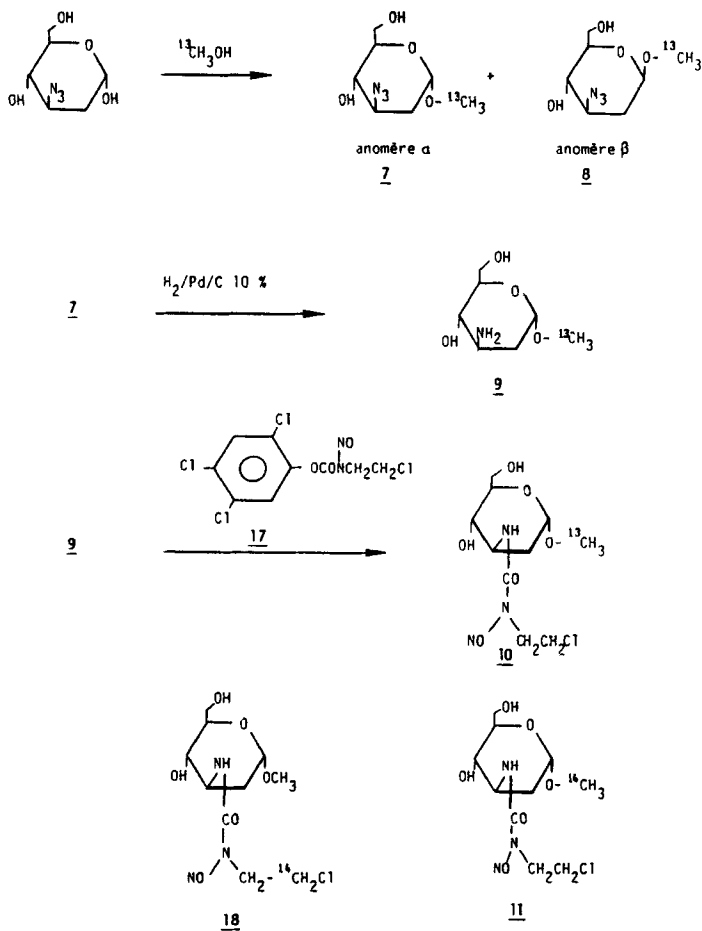
Schéma 2

3. Marquage sur le méthyl du centre anomérique (^{13}C ou ^{14}C)

10 et 11

Dans ce cas, il s'agissait d'adapter un protocole de glycosidation mis au point dans les laboratoires CHOAY (P. ROGER et coll., non publié) et de vérifier l'homogénéité des identités des produits obtenus (schéma 3).

Schéma 3



PARTIE EXPERIMENTALEGénéralités

Les chromatographies sur couche mince (CCM) des produits radioactifs sont analysés sur un appareil analyseur Berthold LB 2820 équipé d'un détecteur linéaire multicanaux.

Les études en chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont réalisées sur un appareil Waters isocratique modèle 510 équipé d'un détecteur UV Lambda-Max modèle 481 et d'un détecteur de radioactivité Berthold LB 506A.

Les mesures de radioactivité spécifique sont estimées à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Berthold modèle BF 5000. Le spectromètre de masse utilisé est un ensemble VG 70-250 (VG Instruments) équipé d'un canon FAB (Fast Atom Bombardment) alimenté en xénon (8 KV ; 1,1 mA). C'est un appareil à double focalisation (champs électrique et magnétique) calibré à l'iodure de césium entre 80 et 1500 μ ma.

Trichloro-2,4,5 phényl chloroformiate ¹⁴CO 1

On ajoute goutte à goutte sous agitation, en maintenant la température à - 10 °C, une solution de ¹⁴COCl₂ (6,85 mmoles, 1850 MBq) dans le toluène (2 ml), à une solution de 12 (5,7 mmoles) dans le toluène (3,5 ml) (6).

Le mélange est ensuite traité avec de la N,N-diméthylaniline (5,9 mmoles) et agité 75 heures à 20 °C à l'abri de la lumière. Le (trichloro-2,4,5 phényl) chloroformiate est séparé par centrifugation. 1 est extrait en milieu acide par 4 ml d'éther diéthylique saturé par HCl gazeux.

Obtenu : 2,83 mmoles de 1 (49 %).

N-(chloro-2 éthyl) carbamate (¹⁴CO) de trichloro-2,4,5 phényle 2

Une solution de 1 (8,4 mmoles) dans le chlorure de méthylène (21 ml) est traitée goutte à goutte pendant 45 minutes, à 0°C et

sous agitation, par un mélange de chlorhydrate de chloro-2 éthylamine (8,4 mmoles) 13 et de triéthylamine (2,10 ml) dans du chlorure de méthylène (24 ml).

L'agitation est poursuivie pendant 18 heures à 20 °C. 2 est isolé par extraction en milieu acide par de l'éther diéthylique et purifié par CLHP : Silicagel Merck Art. 7734

Eluant : Hexane pur/CHCl₃ : 1/1

Obtenu : 1,77 mmoles de 2 (62 %).

N-(chloro-2 éthyl), N-nitroso carbamate (¹⁴CO) de trichloro-2,4,5 phényle 3

On ajoute en 20 minutes, à l'abri de la lumière et de l'humidité, de l'acide nitrosylsulfurique (10,77 mmoles) 14 à une solution de 2 dissous dans de l'acide acétique (20 ml). L'addition se fait à 0 °C et sous agitation. Ensuite, la température est portée à 25 °C et l'agitation est poursuivie pendant 4 heures. Versé dans de l'eau (180 ml), 3 est extrait à l'éther diéthylique et purifié sur colonne de silice 60 Merck (éluant : éther de pétrole 40/60 - ether diéthylique : 2 - 1, v/v).

Obtenu : 1,03 mmoles de 3 (58 %).

Méthyl [(chloro-2 éthyl)-3 nitroso-3 (¹⁴CO) uréido]-3 didésoxy-2,3 α-D-arabino-hexopyrannoside 4

Une solution de 3 (1,97 mmoles) dans du diméthylformamide (5 ml) est ajoutée goutte à goutte, sous agitation et à 0 °C à une solution de méthyl amino-3 didésoxy-2,3 α-D-arabino-hexopyrannoside (1,64 mmoles) 15 dans du diméthylformamide (5 ml). L'agitation est maintenue pendant 3 heures. 4 est isolé par extraction par de l'acétate d'éthyle en milieu aqueux et purifié sur colonne de silice 60 Merck (éluant : chlorure de méthylène - méthanol : 9-1, v/v).

Obtenu : 0,90 mmoles de 4 (84 %).

Rendement global : 13 %.

Pureté chimique : > 94 %.

Pureté isotopique : > 99 %.

Activité spécifique : 278 MBq mmol⁻¹.

Chlorhydrate de chloro-2 éthylamine (¹⁴C-2) 5

5 est obtenu en traitant le chlorhydrate d'éthanolamine (¹⁴C-1) par du chlorure de thionyle en solution acétonitrile (7) (8). Le rendement est quantitatif.

N-[chloro-2 éthyl (¹⁴C-2)], N-nitrosocarbamate de trichloro-2,4,5 phényle 6

6 est préparé suivant le mode opératoire donné pour le composé 2 en utilisant le produit 5 (1,9 mmoles) dilué avec 13 (6,5 mmoles), et 16 (8,4 mmoles).

Obtenu : 4,32 mmoles de 6 (51 %).

Méthyl [(chloro-2 éthyl (¹⁴C-2))-3 nitroso-3 uréido] -3 didésoxy-2,3 α-D-arabino-hexopyrannoside 18

Préparé suivant la méthode et la purification utilisée pour la préparation du composé 4 en utilisant comme produits de départ 6 et 15.

Obtenu : 0,866 mmoles de 18 (44 %).

Rendement global de la synthèse : 11 %.

Pureté chimique : > 99 %.

Pureté isotopique : > 99 %.

Activité spécifique : 242 MBq mmol⁻¹.

Azido-3 didésoxy-2,3 α-D-arabino-hexopyrannoside (méthyl¹³C) 7

Le méthanol (C-13) (0,303 moles) et l'acide p-toluène sulfonique

(0,010 moles) sont ajoutés à une solution d'azido-3 didésoxy-2,3 D-arabino-hexopyrannose (0,053 moles) dans de l'acétonitrile (190 ml).

Le mélange est chauffé à 70 °C pendant 15 minutes sous agitation. Après refroidissement à 35 °C et neutralisation par une solution de bicarbonate de sodium à 6 % (38 ml), on concentre par évaporation jusqu'à volume réduit. Le résidu est traité par du chloroforme à 60 °C pour séparer les sels minéraux par filtration à chaud et 7 après cristallisation à 4 °C.

Obtenu : 0,020 moles de 7 (38 %) anomère α .

Pureté : > 96 % d'anomère α .

Conditions HPLC :

Colonne : Altex O.D.S., longueur 150 mm, diamètre int. 4,6 mm

Phase mobile : acétonitrile/eau : 8/92, v/v

Longueur d'onde : 214 nm

Débit : 1,0 ml min⁻¹

Tr : 2,38 min

Amino-3 didésoxy-2,3 α -D-arabino-hexopyrannoside (méthyl ¹³C) 9

7 (0,020 moles) dissous dans de l'éthanol anhydre (90 ml) est réduit par de l'hydrogène en présence de palladium 10 % fixé sur charbon (90 mg). Le catalyseur est séparé par filtration et le solvant est évaporé.

Obtenu : 0,019 moles de 9 (96 %).

[Méthyl(¹³C)] [(chloro-2 éthyl)-3 nitroso-3 uréido]-3 didésoxy-2,3 α -D-arabino-hexopyrannoside 10

Une solution de 17 (0,019 moles) préparée suivant la méthode utilisée pour la préparation du composé 6 dans le diméthylformamide anhydre (20 ml) est ajoutée à une solution de 9 (0,017

moles) dans le diméthylformamide (30 ml) refroidi à - 10 °C et sous agitation. Ensuite, la température est ramenée à 0 °C et l'agitation est encore poursuivie pendant 3 heures. Le mélange est évaporé, traité à l'acétate d'éthyle et réévaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice 60 Merck (éluant : chlorure de méthylène - méthanol : 95-5, v/v) et précipité par addition d'isopropoxy-2 propane à une solution acétonique concentrée de 10.

Obtenu : 0,011 moles (66 %) de 10.

Rendement global : 24 %.

Pureté chimique : 96 %.

Pureté isotopique : > 96 %.

Enrichissement isotopique : > 96 %.

Conditions HPLC :

Colonne : Altex O.D.S., longueur 150 mm, diamètre int. 4,6 mm

Phase mobile : acétonitrile/eau : 17/83, v/v

Longueur d'onde : 230 nm

Débit : 1,0 ml min⁻¹

[Méthyl(¹⁴C)][(chloro-2 éthyl)-3 nitroso-3 uréido]-3 didésoxy-2,3
α-D-arabino-hexopyrannoside 11

Technique opératoire identique à celle utilisée pour préparer 10, excepté la purification qui est faite par CHLP sur colonne préparative de ZORBAX O.D.S.

Rendement global : 10 %.

Pureté chimique : > 97 %.

Pureté isotopique : > 97 %.

Activité spécifique : 437 MBq mmol⁻¹.

IDENTIFICATION ET PURETE

Le produit de référence non marqué (CY 233) qui a servi à

identifier les produits finaux 4, 10, 11 et 18 a été caractérisé par son spectre RMN (3).

La pureté des intermédiaires de synthèse et des produits 4, 10, 11 et 18 a été estimée par CCM et CHLP dans les conditions suivantes :

CCM 4, 10, 11 et 18 : plaque de SiO₂ avec révélateur F254

solvant : dichlorométhane-méthanol

(9/1, v/v)

CHLP 4, 10 11 et 18 : colonne ALTEX ou ZORBAX avec garnissage C18

solvant : acétonitrile-acide acétique

(17/83, v/v) ou

acétonitrile, eau, acide acétique

(10/70/0,1 ; v/v/v)

détecteur UV à 230 ou 270 μm

Spectrométrie de masse 10 (mode FAB, matrice : glycérol)

Ions quasi-moléculaires MH⁺

m/z : 312 (¹²C, ³⁵Cl) ; m/z = 313 (¹³C, ³⁵Cl)

m/z : 314 (¹²C, ³⁷Cl) ; m/z = 315 (¹³C, ³⁷Cl)

Pureté isotopique ¹³C supérieure à 96 %.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ROGER P., MONNERET C., CHOAY P., FOURNIER J.P.

Eur. Pat., 84, 401743-4

- (2) GOSSE C., EL ABED I., GOUYETTE A., ATASSI G., ARDOUIN P.,
ROGER P.

Preliminary pharmacological Properties and Chemical Stability
of CY 233.

8th International Symposium on Future Trends in Chemotherapy
Tirrenia, 28th-30th March 1988

- (3) ROGER P., MONNERET C., FOURNIER J.P., CHOAY P., GAGNET R.,
GOSSE C., LETOURNEUX Y., ATASSI G., GOUYETTE A.
J. Med. Chem., 32 : 16 (1989)
- (4) GOSSE C., ATASSI G., LETOURNEUX Y., ARDOUIN P., GOUYETTE A.,
FOURNIER J.P., ROGER P.
Anticancer Res., 8 : 1419 (1988)
- (5) MADELMONT J.C., MOREAU M.F., PARRY D., GODENECHÉ D.,
IMBACH J.L.
J. Label. Comp. Radiopharm., 17 : 203 (1980)
- (6) BROADBENT W., MORLAY J.S., STONE B.E.
J. Chem. Soc., (C), 3 : 2632 (1967)
- (7) MADELMONT J.C., MOREAU M.F., PARRY D., GODENECHÉ D.,
DUPRAT J., MEYNIÉL G., OIRY J., IMBACH J.L.
J. Label. Comp. Radiopharm., 20 : 7 (1983)
- (8) MADELMONT J.C., PARRY D., GODENECHÉ D., DUPRAT J.
J. Label. Comp. Radiopharm., 22 : 851 (1985)