

MARQUAGE PAR ^{14}C ET ^{13}C DE LA N ACÉTYL O₆ BENZYL GUANOSINE

J.C. MADELMONT¹, C. CUSSAC², J.M. DUPUY³, M. RAPP¹,
P. LABARRE¹, J.L. CHABARD⁴, J.C. MAURIZIS¹, J. SAUZIERES⁵,
J.P. BAUDRY², D.GODENECHÉ¹ et A.VEYRE⁶

¹INSERM U 71, Rue Montalembert, 63005 CLERMONT-FERRAND

²C.S.P. , Avenue du Midi, 63800 COURNON

³Centre Jean Perrin, Place Henri Dunant, 63011 CLERMONT-FERRAND

⁴Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, 28, Place Henri
Dunant, 63001 CLERMONT-FERRAND

⁵I.B.F. , 81, rue de Paris, 78470 SAINT REMY LES CHEVREUSE

⁶Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine, 28, Place
Henri Dunant, 63001 CLERMONT-FERRAND

SUMMARY

O₆ Benzyl N acetyl guanosine a new inhibitor of O₆ Alkyl Guanine transferase (O₆AGT) was labelled by ^{14}C and ^{13}C on the benzyl methylen group in order to realize a pharmacokinetic study on nude mice grafted with human tumors.

The labelling yield calculated from the precursor (Ba 14 or $^{13}\text{CO}_3$) is in the range of 15 %.

RESUME

La O₆Benzyl N Acétyl guanosine, nouvel inhibiteur de la O₆ Alkyl Guanine transférase (O₆AGT) , a été marquée par ^{14}C et ^{13}C en position α du groupe benzyle afin de réaliser des études pharmacocinétiques in vivo sur des souris nudes porteuses de tumeurs humaines greffées.

Le rendement de marquage calculé par rapport au précurseur (Ba 14 ou $^{13}\text{CO}_3$) est de l'ordre de 15 %.

INTRODUCTION

L'efficacité antitumorale des CNUEs (chloro-2 éthyl nitrosourées) est fortement dépendant de l'expression de la O₆ alkyl guanine transférase (1) dans la cellule cancéreuse.

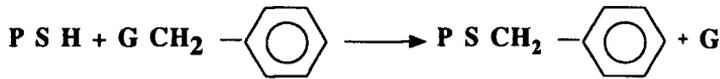
Lorsque cette expression est importante (lignée Mer⁺) la réparation de la lésion de l'ADN tumoral provoquée par le carbocation chloro-2 éthyle est rapide et l'efficacité de la CNUE est très faible. (2, 3)

Il est possible de sensibiliser la cellule tumorale aux CNUEs à condition de leurrer l'enzyme par une molécule appropriée (4, 5, 6).

La O₆-benzyl N-acétyl guanosine récemment préparée au laboratoire répond à cet objectif aussi bien in vitro sur culture de cellules mélaniques humaines exprimant une importante activité alkyltransférase, qu'in vivo sur le modèle de souris nude porteuse de tumeurs mélaniques humaines dérivées des cellules précitées.

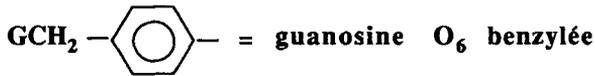
La bonne utilisation de ces composés associés aux CNUEs passe par la connaissance de leur pharmacocinétique et de leur métabolisme in vivo c'est la raison pour laquelle nous avons réalisé le marquage de cette molécule.

L'alkyltransférase de mammifère est une protéine de 29 KD réparant spécifiquement les alkylations en O₆ de la guanine par intermédiaire des groupements thiols des résidus cystéines qui se transforment en sulfure entraînant l'inactivation de l'enzyme. Le mécanisme d'action du leurre devrait être le suivant :

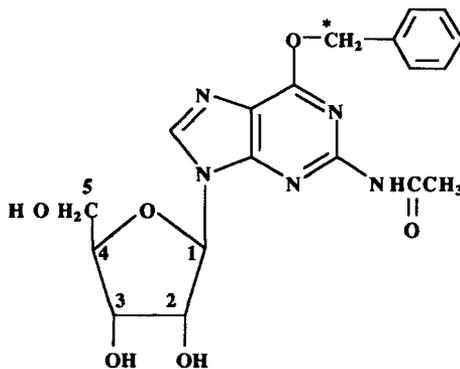


P = (Protéine O₆ AGT)

G = Guanosine



Compte tenu de ce mécanisme nous avons choisi de marquer le groupe partant qui permet de suivre le composé inchangé et la protéine. La formule du composé et la position de marquage sont indiquées ci-après :



Le schéma de marquage utilisé est le suivant (schéma 2), c'est un compromis de deux modes opératoires décrits par B.L. GAFFNEY, L.A. MARRY et R.A. JONES (7) et B.F. Li et P.F Swann (8).

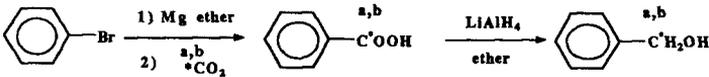


Schéma 1

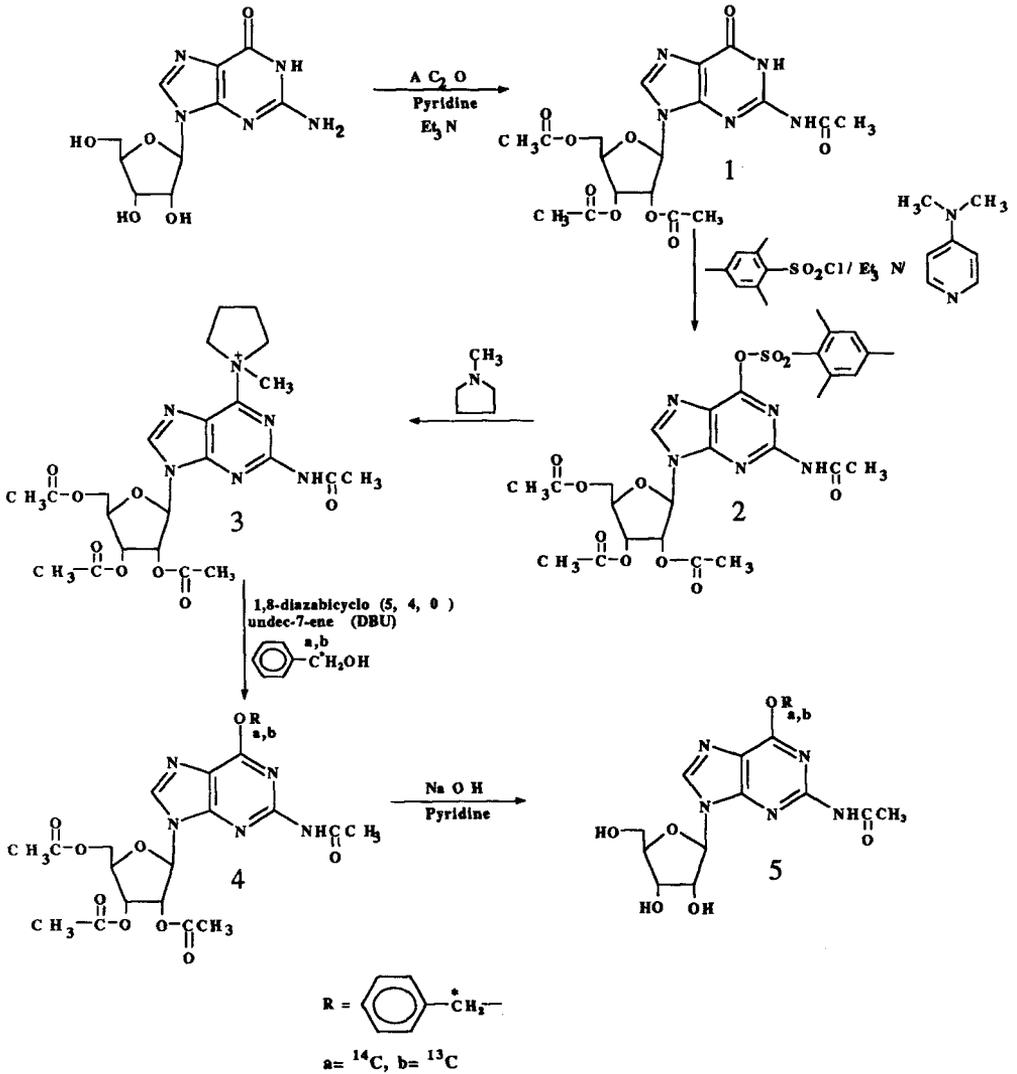


Schéma 2

La peracétyl guanosine est préparée avec de bons rendements (80 %) par action de l'anhydride acétique sur la guanosine dans la pyridine en présence de triéthylamine (7). L'activation du groupe carbonyle de la guanosine [O₆] s'effectue en deux temps in situ. On prépare d'abord le mésitylène-2 sulfonate en présence de triéthylamine et de NN diméthyl amino pyridine dans le dichlorométhane que l'on déplace par la N méthyl pyrrolidine en excès à 0°C en créant l'ammonium quaternaire. L'avancement de ces deux réactions est facilement suivi par CCM. La substitution de l'ammonium quaternaire 3 est en principe réalisée avec un gros excès d'alcool (6/1).

Compte tenu des faibles rendements radiochimiques et isotopiques prévisibles nous avons étudié les conditions de réaction : en travaillant dans les proportions alcool/dérivé de guanosine (2/1) pendant 24 heures, le rendement obtenu en peracétyl O₆ benzyl guanosine 4 est de l'ordre de 45 à 50 %. C'est le mode opératoire que nous avons retenu pour le traitement par l'alcool benzylique marqué sur le carbone α . Les marquages de l'alcool benzylique par ¹⁴C et ¹³C en position α ont été réalisés par une réduction dans l'éther par l'hydrure de Lithium aluminium de l'acide benzoïque marqué au laboratoire selon Murray et Williams (9) (schéma 1). L'activité spécifique de l'alcool benzylique ¹⁴C est 4 mCi/mmole, 148 MBq/mmole et l'enrichissement en ¹³C est 90 %.

Le déblocage des hydroxyles osidiques est réalisé presque quantitativement par action de la soude dans la pyridine. La O₆ ¹⁴C α benzyl N-acétyl guanosine est obtenue avec un rendement chimique de 34 % par rapport à l'ammonium quaternaire 3 et radiochimique de 17 % par rapport à l'alcool ¹⁴C α benzylique (A.S 2 mCi/mmole, 74 MBq/mmole) L'enrichissement isotopique évalué par spectrométrie de masse est de 90 %.

PARTIE EXPERIMENTALE

INDICATIONS GENERALES

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler. Les radiochromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur gel de silice Merck 60 F 254 et analysées avec un détecteur multicanaux LB 2821.

Les mesures de radioactivité sont effectuées avec un spectromètre à scintillation liquide Packard modèle 4530.

Les spectres IR sont enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer 398, les spectres de RMN sur des appareils Jeol PMX 60 et Brüker AM 200 WB : la position des bandes est donnée en valeur de δ par rapport au TMS comme référence interne. La détermination des masses a été réalisée en introduction directe sur un appareil HP 5958 B.

Les carbonates de baryum ¹⁴C et ¹³C ont été fournis par les Sociétés Dositek et Eurisotope.

PREPARATION DE L'ALCOOL BENZYLIQUE MARQUE (¹⁴C α et ¹³C α)

L'acide benzoïque α ¹⁴C est préparé selon la littérature (10) en carbonatant 12 mM de bromure de phényl magnésium par 10,5 mM de

¹⁴C O₂ (42 mCi, 1554 MBq). On obtient 10 mM d'acide : activité 40 mCi, 1480 MBq, Rdt 95 %.

L'acide benzoïque α¹³C est préparé selon cette technique à partir de ¹³C O₂ mais sur des quantités doubles. Les rendements obtenus sont identiques.

¹⁴C α alcool benzylique

A la solution de 10 mM d'acide benzoïque (1,22 g, 40 mCi) ¹⁴C dans 30 ml de THF on ajoute 12 ml d'une solution normale de LiAlH₄ dans le THF à 0°C et laisse sous argon 18 heures à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM de silice (éluant EtOH/CHCl₃ 5 % v/v). On hydrolyse le milieu par 10 ml d'une solution de H₂SO₄ (6N) extrait par l'éther (5 x 60 ml). La phase étherée lavée par la soude 1 N (10 ml) puis à l'eau est séchée sur MgSO₄. Après évaporation de l'éther sous pression réduite on isole l'alcool benzylique 1,03 g soit 9,5 mM. L'activité spécifique est 4 mCi/mM, 148 MBq/mM. Rendement chimique et radiochimique 95 % par rapport à l'acide benzoïque et 90 % par rapport au ¹⁴C O₂.

¹³C α alcool benzylique

Il est obtenu selon le même mode opératoire mais sur des quantités doubles. Il est obtenu avec un enrichissement isotopique de 90 %.

PREPARATION DE LA PER ACETYL GUANOSINE 1

La peracétyl guanosine est préparée selon la littérature (7).

PREPARATION DE LA O₆ ¹⁴C α BENZYL PER ACETYL GUANOSINE 4a

A la solution de 7 mM (3,15 g) de peracétyl guanosine dans 40 ml de dichlorométhane on ajoute successivement 14,2 mM (3,1 g) de chlorure de mésitylène-2, sulfonyle, 28 mM (4 ml) de triéthylamine et 0,3 mM (0,035 g) de N,N diméthyl amino pyridine à température ordinaire. Après 1 h 30 de réaction le dérivé peracétylé (1) est transformé en composé O₆ sulfone (2). L'avancement de la réaction est suivi par CCM de silice (Eluant : EtOH/CHCl₃ 5 % v/v Rf 0,5). Au milieu réactionnel refroidi à 0°C on ajoute 65 mM (5,6 g, 7 ml) de N-méthyl pyrrolidine et laisse la réaction se poursuivre pendant 2 heures. La substitution du tosylate est complète. La réaction est suivie par CCM (dans les conditions précédentes le composé 3 présente un Rf = 0). On ajoute ensuite à 0°C 14 mM (1,5 g soit 1,5 ml) d'alcool ¹⁴C α benzylique (mélange 1/1 du composé marqué et non marqué, 28 mCi, 1036 MBq, 2 mCi/mM, 74 MBq/mM) puis 20 mM (3,16 g) de diazo 1,8 bicyclo (5.4.0) undecène-7 (DBU) et laisse remonter à température ambiante. Après une nuit de réaction, on hydrolyse par une solution aqueuse (100 ml) de KH₂PO₄ 1 M, extrait 3 fois par 50 ml de dichlorométhane et sèche la phase organique sur Na₂SO₄. Après évaporation du solvant sous pression réduite on purifie le composé par chromatographie liquide basse pression sur colonne de silice éluee par un gradient 0 à 5 % d'éthanol dans le dichlorométhane. La O₆ ¹⁴C α benzylic peracétyl guanosine 4 qui élue à 2 % est obtenue avec un

rendement chimique de 45 % (1.8 g) et radiochimique de 20 % calculé par rapport au $Ba^{14}CO_3$.

L'activité spécifique est 3,7 $\mu Ci/mg$ 136 Bq/mg soit 2 mCi/mM 74 MBq/mMole.

Identification

F ~ 55 en ramollissant

CCM silice Merck Si 60 HF 254 : éluant EtOH/CH₂ Cl₂ 5 % v/v , R_f = 0,58

IR (KBr, ν cm⁻¹), 1660 (CONH) ; 3300 (NH), 3080 (CH), 2840-2980 (CH), 1740 (CO,ester),

¹H RMN, CDCl₃ : 2,06 à 2,13 [3 s(2,06; 2,07; 2,13) 9, OCOH₍₃₎] ; 2,48 [s, 3 (NHCOCH₍₃₎)] ; 4,30 à 4,50 [m, 3 (H_(55'), H₍₄₎)] ; 5,58 [s, 2 (CH₍₂₎-Ø)] ; 5,60 à 5,72 [m, 1(H₍₃₎)] ; 5,86 à 5,92 [m, 1 (H₍₂₎)] ; 6,03 à 6,05 [d, 1 , (H₍₁₎)] ; 7,27 à 7,50 [m, 5, (aromatiques)] ; 7,91 (s, 1, (H₍₈₎)] ; 7,99 [s, 1, (NH)]

S.M. La fragmentation en impact électronique de la O₆ benzyl N-acétyl guanosine est conforme aux résultats de la littérature concernant l'ouverture des sucres des nucléosides (10,11).

Si M = pic moléculaire et B = O₆ benzyl N acétyl guanine, on observe les pics et fragments suivants : 541 (M), 326 (B + H + CH₂CHO)⁺, 312 (B + H + CHO)⁺, 284 (B + 2H)⁺, 283 (B + H)⁺, 241 (B + H - CH₂CO)⁺, 240 (B + H - CH₃CO)⁺, 91 (C₇H₇)⁺.

PREPARATION DE LA O₆ ¹³C BENZYL PER ACETYL GUANOSINE 4b

Le composé est obtenu avec les mêmes rendements chimique et isotopique que le dérivé ¹⁴C calculé par rapport au Ba¹³CO₃.

¹H RMN CDCl₃. On observe les mêmes bandes caractéristiques sauf pour le CH₂ benzylique où le couplage ¹H¹³C donne un doublet à 5,22 et 5,96 centré sur 5,59 avec un J (¹³C H) = 0,74 ppm.

S.M. On retrouve les mêmes ions avec une unité de masse supplémentaire : 542 (M), 327, 313, 285, 284, 242, 241, 92.

PREPARATION DE LA O₆ ¹⁴C α BENZYL N-ACETYL GUANOSINE 5a

A la solution de 3,3 mM (1,8 g) de composé 4 dans 10 ml de pyridine on ajoute 4 ml de soude 2,5 M et laisse agiter 10 minutes à température ambiante. On additionne ensuite 20 ml de résine échangeuse de cation DOWEX 50 sous forme H⁺ et filtre sur fritté et rince par 2 fois 5 ml de pyridine. On évapore le filtrat sous pression réduite sans chauffer, solubilise le résidu par le minimum de méthanol et relargue le composé 5 par l'éther anhydre. Le précipité est essoré, lavé par l'éther. On obtient ainsi 1,05 g soit 76 % de rendement de O₆¹⁴C α benzyl N acétyl guanosine utilisable sans purification ultérieure : Le rendement chimique global de la réaction est 34 %. Les rendements radiochimique et isotopique sont de l'ordre de 15 % calculés par rapport au Ba¹⁴CO₃.

L'activité spécifique est de 4,8 μ Ci /mg, 178,3 Bq/mg , 2 mCi/mM 74 MBq/mMole.

Identification

Solide blanc F = 148 (dec 117°C)

CCM Silice Merck Si 60 HF 254 éluant : EtOH/CHCl₃ ,5 % v/v ,Rf = 0,28

I R (KBr v cm-1) : 3300 (NH), 3080 CH (Ar), 2840-2950 (CH), 1655 (CONH)

RMN ¹H, 2D COSY (DMSO + D₂O) 2,22 [s, 3, COCH₃] ; 3,56 à 3,62 [m, 2, H_(5,5')] ; 3,89 à 3,94 [m, 1, H₍₄₎] ; 4,12 à 4,20 [m, 1, H₍₃₎] ; 4,52 à 4,61 [m, 1, H₍₂₎] , 5,61 [s, 2, CH₂-Ø] 5,87 à 5,90 [d, 1, H₍₁₎] ; 7,30 à 7,60 [m, s, Ø] ; 8,45 [s,1,H₍₈₎] 10,49 [S, partiellement échangé, NH]

S.M. 415 (M), 326, 312, 284, 283, 241, 240, 91

PREPARATION DE LA O₆¹³C α BENZYL N ACETYL GUANOSINE 5b

Le composé est obtenu avec les mêmes rendements chimique et isotopique que le composé ¹³C calculé par rapport au Ba¹³CO₂.

RMN¹H 2D COSY (DMSO + D₂O) même spectre sauf pour CH₂-Ø qui donne un doublet à 5,97 et 5,23 centre sur 5,60 J (C₁₃H) = 0,74 ppm

S.M. 416 (M), 327, 313, 285, 284, 242, 241, 92

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Ligue Régionale de Lutte contre le Cancer pour le soutien apporté à ce travail et Madame LEFRANCOIS pour sa participation à la réalisation de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) D'INCALCI M., CITTI L., TAVERNA P. and CAPAJANO C.V.
Cancer Treat. Rev; 1988, 15, 279-292.
- 2) DOMORADZKI J., PEGG A.E., DOLAN M.E., MAHER V.M., and Mc CORMICK J.J.
Carcinogenesis 1984, 5 (12), 1641-1647.
- 3) GODENECHÉ D., RAPP M., THIERRY A., LAVAL F., MADELMONT J.C., CHOLLET P. and VEYRE A.
Cancer Res., 1990, 50, 5898-5903.
- 4) DOLAN M.E., YOUNG G.S. and PEGG A.E.
Cancer Res., 1988, 46, 4500-4504.
- 5) DOLAN M.E., PEGG A.E., HORA N.K. and ERICKSON L.C.
Cancer Res., 1988, 48, 3603-3606.

- 6) DOLAN M.E., MITCHELL R.B., MUMMERT C., MOSCHEL R.. and PEGG A.E.
Cancer Res., 1991, 51 (13), 3367-3372.
- 7) GAFFNEY B.L., MARRY L.A. and JONES R;A.
Biochemistry, 1984, 23, 5686-5691.
- 8) LI B. F.L. and SWANN P.F.
Biochemistry, 1989, 28, 5779-5786.
- 9) MURRAY A., WILLIAMS D.L., Interscience Publishers INC New-York,
Organic synthesis with isotopes. Part I. Compounds of Isotopic Carbon,
1958, p.88
- 10) SHAW S.J., DESIDERIO D.M., TSUBOYAMA K., and Mc CLOSKEY J.A.
J. Am. Chem Soc., 1970, 92, 2510.
- 11) WALLER G.R., and DERMER O.C.
Biochemical applications of mass spectrometry, 1980, John Wiley and
Sons, New-York, p. 535.