

SYNTHESE DE LA PENTAMETHYLMELAMINE (noyau ^{14}C -4,6), un nouvel agent antitumoral. *

DO-CAO-THANG, NGUYEN-HOANG-NAM, H. HOELLINGER et
L. PICHA^{**}

INSERM-Unité de Recherche de Toxicologie Expérimentale
Hôpital F. Widal, 200 rue du Faubourg Saint-Denis
75475 PARIS Cedex 10, France.

** Service des Molécules Marquées - CEN-Saclay
BP N°2 - 91190 Gif-sur-Yvette, France.

SUMMARY

(ring-4,6- ^{14}C) Pentamethylmelamine ($^{14}\text{C-PMM}$), a new antitumor agent, was prepared from barium (^{14}C) carbonate by a 6 step synthesis. (^{14}CN) Dimethylcyanamide, prepared from sodium (^{14}C) cyanide with 71% yield and treated with phosgene in the presence of hydrogen chloride, was cyclized to (ring-4,6- ^{14}C)-2-chloro-4,6-bis (dimethylamino)-s-triazine. The latter was purified by silicagel low pressure liquid chromatography (15% yield based on nitrile) and condensed with monomethylamine to give $^{14}\text{C-PMM}$. After purification $^{14}\text{C-PMM}$ was obtained with 91% yield, specific activity ■ 38 mCi/mMole. The mechanism of the reaction of nitrile with phosgene was discussed.

Key Words : (^{14}CN)Dimethylcyanamide, (ring-4,6- ^{14}C) pentamethylmelamine, antitumoral agent.

La pentaméthylmélamine '(PMM) ou méthylamino-2 bis-(diméthylamino-4,6)-s-triazine, analogue hydrosoluble de l'hexaméthylmélamine qui est un agent antitumoral, a été soumise aux essais cliniques (1).

Dans le cadre de nos recherches cancérologiques sur les dérivés de la mélamine (2) et pour approfondir son mécanisme d'action, nous avons été amenés à préparer la PMM marquée au carbone 14 sur le noyau.

A notre connaissance, la PMM (noyau ^{14}C) n'est pas décrite dans la littérature.

La PMM 6 a été préparée (3) par l'action de la monométhylamine sur le chloro-2 bis-(diméthylamino-4,6)-s-triazine 5, lequel est obtenu à partir du chlorure de cyanuryle 7 (4) (Schéma I, voie A).

* Ce travail a fait l'objet d'un Contrat de recherche international N°77.5.046.2 de l'INSERM. Il a été effectué au Service des Molécules Marquées, CEN-Saclay.

Comme la méthode classique de préparation de ce dernier par chloration de l'acide cyanurique n'est pas commode pour une microsynthèse radioactive, nous avons conçu une nouvelle voie de synthèse pour accéder au dérivé 5 sans passer par 7.

Yanagida et al. (5) ont préparé les chloro-2 diaryl-4,6-s-triazines par cyclisation d'arylnitriles avec le phosgène en présence d'acide chlorhydrique. En adaptant cette méthode et en remplaçant l'arylnitrile par la diméthylcyanamide nous avons pu synthétiser le chloro-2 bis-(diméthylamino-4,6)-s-triazine 5.

Le schéma réactionnel (Schéma I, voie C) de préparation de PMM (noyau ^{14}C) en 6 étapes à partir de carbonate de barium ^{14}C a été alors adopté.

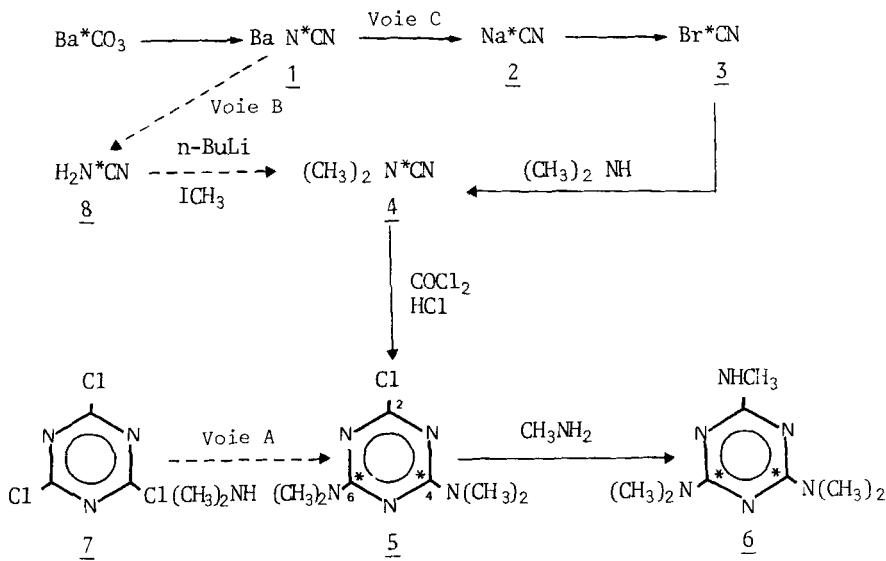


Schéma I

La diméthylcyanamide (^{14}CN) 4 n'étant pas décrite dans la littérature, nous avons d'abord essayé de la préparer à partir de la cyanamide ^{14}C 8 obtenue selon (6) (Schéma I, voie B). La lithiation de 8 par le n-butyllithium dans le THF à -10° C, suivie de méthylation par l'iodyure de méthyle en présence de HMPT à 60° C, a donné la diméthylcyanamide (^{14}CN) 4, identifiée par chromatographie en phase gazeuse. Seulement, la cyclisation de cette dernière selon (5) conduit à des résultats non reproductibles. Nous en avons conclu que le produit 4 ainsi obtenu contient des impuretés gênant l'étape suivante, malgré une purification par distillation.

Le nitrile 4 a été alors préparé à partir de cyanure de sodium ^{14}C , par adaptation de la méthode de White et Burns (7) avec un bon rendement (Schéma I, voie C).

Pour la cyclisation du benzonitrile, Yanigida et al. (5) en variant les proportions de phosgène et d'acide chlorhydrique ont trouvé que le rapport benzonitrile - phosgène - acide chlorhydrique 3 : 1 : 2 donne le meilleur rendement. Pour notre travail, le rapport chlorhydrate de diméthylcyanamide (^{14}CN) 4 - phosgène - acide chlorhydrique 1 : 1 : 1,5 a donné le meilleur résultat. Pour expliquer le mécanisme de cette réaction ces auteurs ont utilisé le phosgène ^{14}C et trouvé que le triazine formé est marqué. Ils en ont déduit que dans le noyau triazine le carbone 2 lié au chlore est marqué et provient donc du phosgène. Ce mécanisme a été confirmé par notre synthèse car la PMM ^{14}C obtenue a une activité spécifique (38 mCi/mMole) qui est le double de celle de la diméthylcyanamide (^{14}CN) (19 mCi/mMole). Le triazine 5 comporte donc deux atomes de carbone en positions 4 et 6 marqués et il en résulte que le carbone 2 étant non marqué provient du phosgène.

Le dérivé chloré 5, condensé avec la monométhylmélamine, conduit aisément à la PMM (noyau $^{14}\text{C}-4,6$) avec une activité spécifique : 38 mCi/mMole.

Les puretés chimique et radiochimique ont été contrôlées par chromatographie en couche mince, par spectrométrie ultraviolette et de masse.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur W.C.J. Ross du Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research (Londres) qui nous a fait don des échantillons servant de témoins.

PARTIE EXPERIMENTALE

La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée sur des plaques fines gel de silice Merck 60 F 254. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été réalisée sur un appareil Microtek MT 220 avec détection à ionisation de flamme et détection de la radioactivité par scintillation ; colonne Chromosorb imprégné à 20% de Carbowax 20 M, température : 165° C. Les spectres ultraviolets (UV) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Beckman DK 2A et les spectres de masse (SM), sur un appareil Varian CH 7 par introduction directe de l'échantillon dans la source.

Tableau I

CCM - Révélateur : UV

Produit	Solvants - Rf		
	(a)	(b)	(c)
<u>5</u>	0,76	0,83	
<u>6</u>		0,49	0,38
(a) C ₆ H ₆ -AcEt-AcOH		70:28:2	
(b) n-BuOH-AcOH-H ₂ O		50:25:25	
(c) C ₆ H ₆ -MeOH		90:10	

Diméthylcyanamide (¹⁴CN) 4

A une solution de 2 mMoles (76 mCi) de cyanure de sodium ¹⁴C dans 1 ml d'eau refroidie à 0°C sont ajoutés goutte à goutte, en 5 mn et sous agitation, 320 mg de brome. La solution est agitée à 0-5° C pendant 2 h.

2 mMoles de chlorhydrate de diméthylamine dans 0,5 ml d'eau, neutralisées avec 1 ml de NaOH 2 N, sont ajoutées goutte à goutte en 10 mn à la solution précédente de bromure de cyanogène ¹⁴C. Le mélange est agité à 0-5° C pendant 1 h, puis à la température ambiante pendant 30 mn. L'extraction en continu à l'éther donne 54 mCi de diméthylcyanamide (¹⁴CN) 4 (rendement radiochimique : 71%). Par CPG on ne détecte qu'un seul pic radioactif identique au témoin.

La solution éthérée est concentrée puis traitée avec de l'éther chlorhydrique. Après évaporation à sec on obtient le chlorhydrate de 4.

Chloro-2 bis-(diméthylamino-4,6)-s-triazine (noyau ^{14}C -4,6) 5

On introduit dans un tube les solutions éthanoliques de chlorhydrate 4 radioactif (0,29 mMole, 11 mCi) et inactif (0,29 mMole) pour diluer à environ 19 mCi/mMole et évapore à sec. Puis on ajoute 1 mMole d'acide chlorhydrique, 0,6 mMole de phosgène, scelle le tube sous vide et on chauffe le mélange à 100-105° C en agitant magnétiquement pendant 200 h. On ouvre le tube, le résidu brun clair est repris par de l'eau glacée et la suspension est alcalinisée avec de la soude à 10%. L'extraction en continu à l'éther fournit 3,4 mCi de 5 qui, analysé par CCM (Tableau I), contient environ 45% d'impuretés radioactives.

On purifie par chromatographie liquide sur colonne à basse pression : gel de silice H 60 Merck, élution sous 2 kg de pression avec comme solvants : benzène-acétate d'éthyle-acide acétique (70 : 28 : 2). On recueille 1,65 mCi de 5 (rendement radiochimique : 15%) ayant une pureté supérieure à 98%.

Pentaméthylmélamine (noyau ^{14}C -4,6) 6

Le dérivé chloré 5 est dissous dans 0,5 ml de benzène anhydre dans un tube et on y introduit 1 mMole de monométhylamine. On scelle le tube sous vide et l'agit pendant 96 h à la température ambiante.

La PMM (noyau ^{14}C -4,6) obtenue quantitativement contient environ 4% d'impureté radioactive. Elle est purifiée comme précédemment en éluant avec les solvants : benzène-méthanol (90 : 10). On obtient 1,5 mCi de 6 (rendement : 91%), activité spécifique : 38 mCi/mMole.

Contrôle de la pureté chimique et radiochimique :

La pureté radiochimique contrôlée par CCM (Tableau I) est supérieure à 99%.

La pureté chimique est déterminée par :

a) UV dans l'éthanol, λ_{max} : 220,5

b) SM : ^{12}C m/e : 196 (M^+)

^{14}C m/e : 198 (M^+), 200 (M^+)

L'activité spécifique est calculée à partir du spectre UV et du spectre de masse.

REFERENCES

- D'Incacci M., Sessa C., Belloni C., Morasca L. et Garattini S. - American Association for Cancer Research Abstracts n° 185 (1979).
- Rutty J.C., Connors T.A., Nguyen-Hoang-Nam, Do-Cao-Thang et Hoellinger H. - Europ. J. Cancer, 14, 713 (1978).
- Cumber A.J. et Ross W.C.J. - Chem.Biol. Interactions, 17, 349 (1977) ; Borkovec A.B. et De Milo A.B. - J. Med. Chem. 10, 457 (1967).

4. Pearlman W.M. et Banks C.K. - J. Am. Chem. Soc., 70, 3726 (1948).
5. Yanagida S., Hayama H., Yokoe M. et Komori S. - J. Org. Chem., 34, 4125 (1969).
6. Nguyen-Hoang-Nam, Nguyen-Dat-Xuong, Herbert M. et Pichat L. - J. Labelled Compounds, 2, 57 (1966).
7. White D.F. et Burns J. - J. Labelled Compounds, 11, 171 (1975).