

SYNTHESE RADIOACTIVE DE SELS D'AMMONIUM QUATERNAIRES D'HYDROXY
IMINO METHYL-2 OU -4 PYRIDINIUM AU MOYEN DE LA
N-METHYL FORMANILIDE- ^{14}C

I - Marquage du dichlorure d'(hydroxyimino méthyl (^{14}C)-2 pyridinyle)-1
(aminocarbonyl-4' pyridinyle)-1' diméthyl éther ou HI-6-(^{14}C) ; du dibromure de
bis [hydroxyimino méthyl (^{14}C)-4 pyridinyle]-1,3 propane ou TMB-4-(^{14}C) et du
dibromure d'(hydroxyimino méthyl (^{14}C)-4 pyridinyle)-1 (méthyl-3' imidazolyle)-3
propane ou pyrimidoxime-(^{14}C)

C. NICOLAS*, J.C. MADELMONT*, J.C. MAURIZIS*, H. GARRIGUE⁺, J.M. MEYNIEL**
P. DEMERSEMAN[§], H. SENTENAC-ROUMANOU[#], et A. VEYRE*

* INSERM U 71 - Rue Montalembert - B.P. 184
63005 Clermont-Ferrand Cedex

⁺ CEB Le Bouchet - B.P. n°3 - 91710 Vert-le-Petit

** Laboratoire de Biophysique Médicale - Faculté de Médecine - 28,
Place Henri Dunant - B.P. 38 - 63001 Clermont-Ferrand Cedex

[§] Laboratoire de Chimie Organique - Fondation Curie - Institut du Radium-
26, rue d'Ulm - 75231 Paris Cedex 05

[#] Délégation Générale pour l'Armement - Direction des Recherches
et Techniques - Boulevard Victor - 75996 Paris Armées

SUMMARY

The ^{14}C labelling of three compounds : HI-6, TMB-4 and pyrimidoxime is described from ^{14}C -formic acid, sodium salt. The compounds were prepared by lithiation and formylation with N-methyl (^{14}C)-formanilide followed by introduction of the hydroxylamine moieties and alkylation of the pyridine. Radiochemical yields were, respectively, 24,5 %, 30 % and 30 %.

Key words : N-methyl ^{14}C -formanilide
2-Bromo and 4-Bromo pyridines formylation
Quaternary Salts of Hydroxyimino methyl(^{14}C)-pyridinyl derivatives
Reactivators of organophosphates-inhibited acetyl cholinesterase
 ^{14}C -HI-6, ^{14}C -TMB-4, ^{14}C -Pyrimidoxime

INTRODUCTION

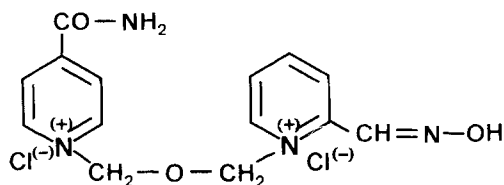
Certaines drogues porteuses de la fonction oxime sont utilisées comme réactivateurs de l'acétylcholinestérase inhibée par les toxiques organophosphorés (1,2). En effet, ces poisons bloquent le site estérasique de l'enzyme par phosphorylation d'un résidu sérine. La fonction oxime déplace l'organophosphoré et régénère le site actif. La liaison de l'enzyme à l'acétylcholine se fait par l'intermédiaire d'un autre site, le site cationique qui fixe le substrat par son groupement ammonium quaternaire.

Compte tenu de ce mécanisme, une famille de drogues, réactivateurs de l'acétylcholinestérase, a été conçue. Ces molécules comportent la fonction oxime qui régénère le site actif et un ammonium quaternaire qui permet une liaison réversible au site cationique de l'enzyme.

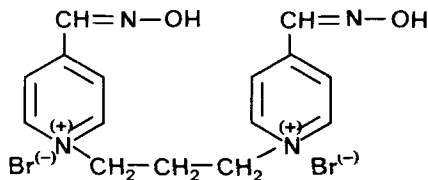
Ainsi, le HI-6, le TMB-4, la Pyrimidoxime, le 2-PAM iodure et le R-665 possèdent *in vitro* des propriétés réactivatrices (1-3). *In vivo*, leur activité a été établie (4-7) mais il n'existe pas de données comparatives concernant leur distribution et leur métabolisme. L'étude de ces paramètres chez l'animal intoxiqué ou non par les organophosphorés nécessite un marquage par ^{14}C .

Dans ce travail, nous décrivons les processus réactionnels utilisés pour les synthèses radioactives de trois molécules : HI6, TMB4 et Pyrimidoxime. (voir Schéma).

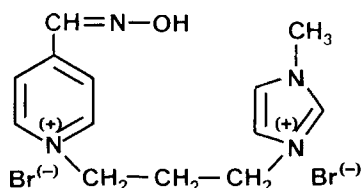
1. HI-6 ou dichlorure d'(hydroxyimino méthyl-2 pyridinyle)-1 (aminocarbonyl-4' pyridinyle)-1' diméthyl éther.



2. TMB-4 ou dibromure de bis [hydroxyimino :méthyl-4 pyridinyle]-1,3 propane.



3. Pyrimidoxime ou dibromure d'(hydroxyimino méthyl-4 pyridinyle)-1, (méthyl-3' imidazole)-3 propane.



Les synthèses de deux entités chimiques étroitement liées : le **2-PAM-iodure** et le **R-665** sont décrites dans la publication suivante.

Le réactif de formylation, le N-méthylformanilide-¹⁴C **1** (8,9) commun à ces 3 molécules, se prépare avec un rendement de 85 % à partir du formiate (¹⁴C) de sodium commercialisé et permet la synthèse des pyridine carboxaldéhydes-(¹⁴C) **2** et **2'** en une seule étape.

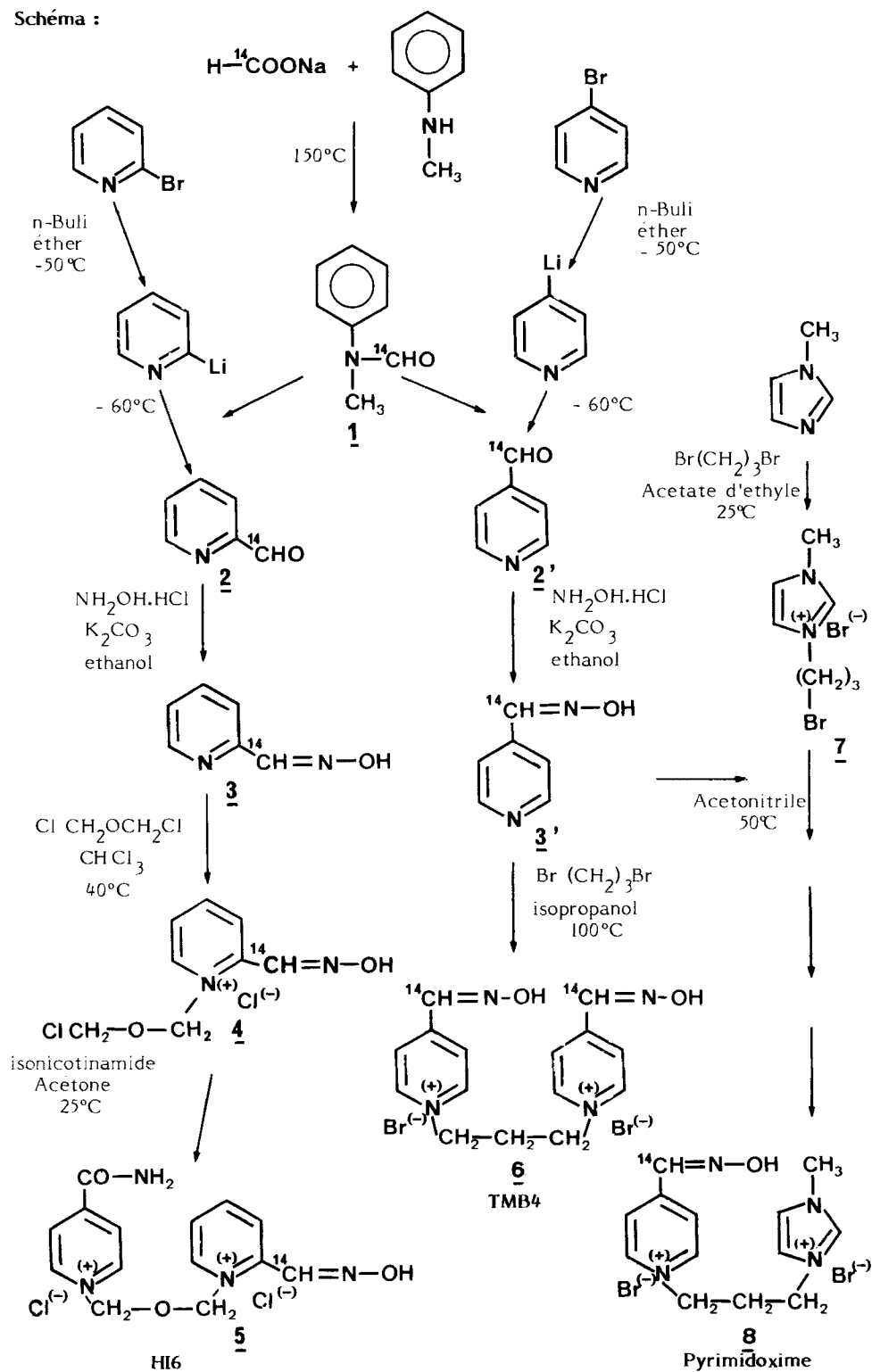
La réaction de formylation du dérivé lithien de la bromo-2 ou bromo-4 pyridine ne donne pas les mêmes résultats dans des conditions identiques de stoechiométrie et de température.

Si la réaction de formylation avec la bromo-4-pyridine donne le pyridine-carboxaldéhyde-4 avec un rendement de 85 % ; avec la bromo-2-pyridine, le rendement ne dépasse pas 30 %, comme pour la réaction de carbonatation du lithien de la bromo-2-pyridine (10). Une étude systématique au laboratoire des différents paramètres de la réaction de formylation a permis d'améliorer le rendement à 80% à condition d'utiliser le lithien en excès par rapport au réactif de formylation **1** (1,25/1). C'est ainsi que les pyridine-carboxaldéhydes-2 et -4 ont pu être préparés avec un rendement pratiquement identique (80-85 %). Les oximes correspondantes **3** et **3'** sont préparées par la réaction classique du chlorhydrate d'hydroxylamine sur l'aldéhyde (90 %) (11).

Le composé **4** est obtenu par action de la pyridine (¹⁴C)-aldoxime-2 **3** sur l'éther bis-chlorométhylque (12) fraîchement préparé au laboratoire, la réaction de l'isonicotinamide avec l'intermédiaire **4** dans l'acétone permet d'obtenir le HI-6-(¹⁴C) **5** avec un rendement radiochimique de 24,5 % par rapport au formiate-(¹⁴C) de sodium.

Le TMB-4 (¹⁴C) **6** est obtenu par réaction de la pyridine (¹⁴C)-aldoxime-4 **3'** et du dibromo-1,3 propane (2/1) avec un rendement radiochimique de 30 % calculé par rapport au formiate-(¹⁴C) de sodium.

Schéma :



La pyrimidoxime-(^{14}C) **8** se prépare en deux temps, dans un premier temps le bromure de (méthyl-3'-imidazolyl)-1 bromo-3 propane **7** est obtenu par action du N-méthyl imidazole sur le dibromo-1,3 propane, puis l'action de la pyridine (^{14}C)-aldoxime-4 **3'** sur le composé **7** dans l'acétonitrile permet de préparer la pyrimidoxime (^{14}C) **8** avec un rendement radiochimique de 30 % calculé par rapport au formiate (^{14}C) de sodium.

PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler. Les radiochromatogrammes sur couche mince sont réalisés sur gel de silice Merck 60 F 254 (référence 5719) et analysés avec un détecteur multicanaux Berthold LB 2821.

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

Les spectres RMN sont enregistrés 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.

Le formiate-(^{14}C) de sodium a été fourni par le service des molécules marquées (CEN de Saclay).

1. Préparation du N-méthyl formanilide-(^{14}C) : **1**

Ce composé a été préparé par chauffage à 150°C, pendant 4 heures, de 30 mmol (2,04 g) de formiate-(^{14}C) de sodium (100 mCi) et 30 mmol (4,3 g) de chlorhydrate de N-méthyl-aniline dans un réacteur hermétiquement clos. La purification sur colonne de silice par un mélange hexane/acétone (3/1 v/v) permet d'isoler le composé avec un rendement radiochimique de 85 %.

Pureté radiochimique 99 % - Activité spécifique : 3,5 mCi/mmol (129,5 MBq/mmol)
CCM : éluant : hexane/acétone (3/1 v/v) ; Rf # 0,3

RMN (^1H) ; 60 MHz (CDCl_3) ; 3,25 (s, 3, CH_3) ; 6,9 à 7,5 (m, 5, aromatiques) ; 8,3 (s, 1, $\text{CH}=\text{O}$)

2. Pyridine (^{14}C)-carboxaldéhyde-2 : **2**

A la solution de 31,5 mmol (5 g) de bromo-2-pyridine dans 50 ml d'éther, agitée magnétiquement sous argon et refroidie à - 50°C, on ajoute goutte à goutte 31,5 mmol de n-BuLi dans l'hexane. On maintient pendant trente minutes cette température, porte à - 60°C et ajoute lentement une solution étherée de 25,2 mmol (3,4 g) de N-méthyl formanilide-(^{14}C) **1** (83 mCi). Après trois heures d'agitation à - 60°C, on hydrolyse par 100 ml d'acide chlorhydrique 1 N. La phase étherée est décantée, puis séparée. La phase aqueuse acide neutralisée par une solution molaire de K_2CO_3 est extraite par l'éther. On obtient le composé **2** avec un rendement de 80 % calculé par rapport au N-méthyl formanilide-(^{14}C) **1** après purification sur colonne de silice, éluant : hexane/acétone (7/3, v/v).

Activité spécifique : 3,5 mCi/mmol (129,5 MBq/mmol)

CCM : éluant : hexane/acétone (7/3, v/v) ; Rf # 0,38

RMN (^1H) ; 60 MHz (CDCl_3) : 7,35 à 8,05 (m, 3, $\text{H}_3\text{H}_4\text{H}_5$) ; 8,75 (d, 1, H_6) ; 10 (s, CHO)

3. Pyridine (^{14}C)-aldoxime-2 : 3

20 mmol (2,14 g) de pyridine (^{14}C)carboxaldéhyde-2 sont traitées en solution hydroalcoolique (1/1) par 38 mmol (2,64 g) de chlorhydrate d'hydroxylamine en présence de 40 mmol (5,5 g) de K_2CO_3 une nuit à température ordinaire. Après concentration de la solution et extraction par le chloroforme ou l'acétate d'éthyle, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : hexane/acétone (7/3, v/v). On obtient la pyridine (^{14}C) aldoxime-2 3 avec un rendement de 90 %.

Activité spécifique : 3,5 mCi/mmol (129,5 MBq/mmol)

F = 110°C

CCM : éluant hexane/acétone (7/3, v/v) ; Rf # 0,25

RMN (^1H) 60 MHz (CDCl_3) : 7,15 à 7,9 (m, 3, $\text{H}_3\text{H}_4\text{H}_5$) ; 8,1 (s, 1, CH) ; 8,6 (d, 1, H_6) ; 10,8 (s, 1, N-OH).

4. Chlorure d' (hydroxyimino méthyl (^{14}C)-2 pyridinyle)-1 chloro-1' diméthyl éther : 4

A la solution de l'oxime 3 (18 mmol ; 2,2 g) dans 40 ml de chloroforme on ajoute 18 mmol (2,07 g) de dichlorométhyl éther préparé au laboratoire (12). Le milieu est agité 4 h à 40°C, sous argon. On filtre le précipité obtenu, lave au chloroforme puis à l'éther et obtient 65,5 % de composé 4, relativement peu stable.

CCM : Eluant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (95/4/1 v/v) ; Rf # 0,35

RMN (^1H), 60 MHz, ($\text{DMSO } \text{D}_6$) : 4,4 à 5,4 (m, 4, 2 x CH_2) ; 7,6 à 9,0 (m, 5, H_3 , H_4 , H_5 , H_6 + CH=N) ; 13 (s, 1, N-OH)

5. Dichlorure d' (hydroxyimino méthyl (^{14}C)-2 pyridinyle)-1 (aminocarbonyl-4', pyridinyle)-1' diméthyl éther ou HI-6 : 5

A la solution de 11,8 mmol (1,44 g) d'isonicotinamide dans 100 ml d'acétone, on ajoute 11,8 mmol (2,8 g) de composé 4 et agite 7 jours à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré, séché puis recristallisé dans un mélange éthanol-HCl 0,1 N comme suit, le composé est repris par 25 ml d'éthanol absolu et solubilisé à chaud par addition d'HCl 0,1 N.

Le HI-6 est isolé par précipitation à froid avec un rendement de 60 % par rapport au composé 4. Le rendement radiochimique est de 24,5 %.

Activité spécifique : 3,5 mCi/mmol (M = 359), (129,5 MBq/mmol)

Le composé 5 est contrôlé par chromatographie liquide haute pression, colonne RP 18 Lichrosorb, éluants : acétonitrile/solution aqueuse d'heptane sulfonate de Na 0,01 M (20/80, v/v) puis acétonitrile/solution aqueuse H_3PO_4 0,05 M (50/50, v/v), 1 ml/minute

pureté : 99 %

RMN (^1H) 200 MHz ($\text{DMSO } \text{D}_6$) : 6,3 à 6,5 (m, 4, 2 x CH_2) 8,15 à 8,53 (m, 3, pyr);

8,55 à 8,6 (m, 2, NH₂, échangeable) ; 8,64 à 9,5 (m, 6, pyr + CH=N) ; 13,4 (s, 1, N-OH échangeable)

6. Pyridine (¹⁴C)-aldoxime-4 : 3'

La réaction du formiate-(¹⁴C) de sodium (50 mCi, 20 mmol, 1,36 g) et du chlorhydrate de N-méthylaniline (20 mmol, 2,9 g) donne le N-méthyl (¹⁴C)-formanilide 1 (2,33 g) avec une activité spécifique de 2,35 mCi/mmol. (Voir § 1.).

La bromo-4 pyridine (20 mmol., 3,16 g) libérée de son chlorhydrate par NaHCO₃, extraite à l'éther, séchée sur MgSO₄ puis filtrée, est traitée à - 50°C pendant 30 minutes par une solution de n-Buli (20 mmol) dans l'hexane à 2,5 mol./l. Le lithien, refroidi à -60°C, est additionné, goutte à goutte, du réactif de formylation 1 (17,25 mmol., 2,33 g, 43 mCi) et agité pendant 3 heures à cette température.

Le mélange réactionnel est traité par HCl 1N (80 ml), la phase organique décantée, et la phase aqueuse chlorhydrique neutralisée par K₂CO₃ ; elle contient la pyridine (¹⁴C)-carboxaldéhyde-4 qui n'est pas isolée mais transformée en pyridine (¹⁴C)-aldoxime-4 par addition de chlorhydrate d'hydroxylamine (neutralisé par K₂CO₃) en milieu hydroalcoolique à 50 %, et agitation toute la nuit à température ambiante. Après évaporation de l'alcool, extraction de la phase aqueuse avec l'acétate d'éthyle, évaporation, purification sur colonne de silice (Voir § 3.), la pyridine (¹⁴C)-aldoxime-4 3' est obtenue avec un rendement radiochimique de 60 à 65 %.

Activité spécifique : 2,35 mCi/mmol.

F = 130°C

CCM. : éluant : hexane/acétone (7/3, v/v) ; Rf # 0,1

RMN (¹H) 60 MHz (CDCl₃) : 7,55 (d, 2, H₃, H₅) ; 8,15 (s, 1, CH) ; 8,60 (d, 2, H₂, H₆) ; 12,1 (s, 1, N-OH)

Remarque : On peut isoler la pyridine carboxaldéhyde-4 2' intermédiaire, les rendements globaux ne sont pas supérieurs.

7. Dibromure de bis [hydroxyimino méthyl (¹⁴C)-4 pyridinyle]-1,3 propane ou TMB-4 : 4'

A une solution de 10 mmol (1,22 g) de pyridine (¹⁴C)-aldoxime-4 3' (2,35 mCi/mmol) dans 10ml d'isopropanol, on ajoute 5 mmol (1 g) de dibromo 1-3 propane et porte 24 heures à reflux. Le précipité formé après refroidissement est filtré, séché et recristallisé dans un mélange éthanol-méthanol. Rendement = 75%.

Activité spécifique : 4,7 mCi/mmol ; (M = 446) (174 MBq/mmol) (la molécule possède deux fonctions oximes marquées)

HPLC : (Colonne Lichrosorb RP 18), éluant : acétonitrile/KH₂PO₄ 0,01 M-H₃PO₄ 0,001, 1 ml/min. pureté : 99 %.

F = 250°C (déc.)

RMN (¹H) 200 MHz (DMSO D₆) : 2,66 (t, 2, CH₂CH₂CH₂) ; 4,75 (t, 4, 2 x CH₂) ; 8,29 (d, 4, 2 x H₃ + H₅ pyr) ; 8,47 (s, 2, 2 x CH=N) ; 9,13 (d, 4, 2 x H₂ + H₆ pyr) ; 12,88 (s, 2, 2 x N-OH)

8. Bromure de (méthyl-3 imidazolyle)-1 bromo-3 propane : 7

A la solution de 50 mmol (4,1 g) de N-méthyl imidazole dans 40 ml d'acétate d'éthyle, on ajoute 50 mmol (10,1 g) de dibromo 1-3 propane et on agite 8 jours à température ordinaire. Le précipité formé est filtré, lavé par l'acétate d'éthyle et séché au dessiccateur sur P_2O_5 . On obtient 27 mmol (7,67 g) de composé 7 utilisable sans purification.

Rendement = 54 %

F = 86°C Litt 83.84°C (13)

CCM : Eluant : MeOH/H₂O/CH₃COOH (95/4/1 - v/v) ; Rf # 0,3

RMN (¹H) 60 MHz (DMSO D₆) : 3,4 (m, 2, CH₂-CH₂ CH₂) ; 3,50 (t, 2, CH₂-Br); 3,90 (s, 3, CH₃-) ; 4,36 (t, 2, CH₂N) ; 7,70 à 7,93 (m, 2, H₄,H₅ imidazole) ; 9,36 (s, 1, H₂ imidazole)

9. Dibromure d' (hydroxyimino méthyl (¹⁴C)-4 pyridinyle)-1 (méthyl-3' imidazolyle)-3 propane ou pyrimidoxime : 8

A la solution de 5 mmol (1,420 g) de précurseur bromé 7 dans 25 ml d'acétone on ajoute 5 mmol (610 mg, 45 mCi) de pyridine (¹⁴C)-aldoxime-4 préparée avec une activité spécifique de 9 mCi/mmol. On maintient sous agitation pendant 1 semaine à 50°C. Le précipité formé est filtré, essoré et lavé par l'acétone. On obtient 1,04 g de produit pur. Rendement (50 %).

Activité spécifique : 9 mCi/mmol (M = 246) (333 MBq/mmol)

F = 182° C Litt 185°C (13)

CCM : Eluant : MeOH/H₂O/HCOOH (85/5/10.v/v) ; Rf # 0,35

RMN (¹H) 200 MHz (DMSO-D₆) : 2,57 (m, 2, CH₂CH₂CH₂) ; 3,90 (s, 3, N-CH₃); 4,36 (t, 2, CH₂-N pyridine) ; 4,74 (t, 2, CH₂-N imidazole) ; 7,79 à 7,88 (m, 2, H₄,H₅ imidazole) ; 8,28 à 8,31 (m, 2, H₃ + H₅ pyridine) ; 8,50 (s, 1, CH=N); 9,18 à 9,22 (m, 2, H₂ + H₆ pyridine) ; 9,35 (s, 1, H₂ imidazole) ; 12,87 (s, 1, NOH)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au support financier de la DRET, contrat n° 87/039.

Nous remercions Madame J. Lefrançois pour sa participation à la réalisation de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

1. HOBBIER F., British Journal of Pharmacology, 10 : 356-362 (1955)
2. HOBBIER F., Biochimica et Biophysica Acta, 25 : 652-654 (1957)
3. KIFFER D., MINARD P., Biochemical Pharmacology, 35 : 2527-2533, (1986)

4. BAY E., KROPS S., YATES L.F., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 98 : 107-109 (1958)
5. USDIN E., in Anticholinesterase agents, Ed. by Karczman A.G., Pergamon Press, Oxford 47, 354-357 (1970)
6. CLEMENT G.H., Biochemical Pharmacology, 31 : 1283-1287 (1982)
7. HARRIS L.W., FLEISHER J.H., INNEREBNER T.A., CLIFF, W.J. and SIM V.M., Toxicology and Applied Pharmacology, 15 : 216-224 (1969)
8. VAN-BAC N., HERBERT M., PICHAT L., JANOT M.M., DAT-XUONG N., J. Labelled Compd Radiopharm., XI, 2 : 241-244 (1975)
9. MADELMONT J.C., PARRY D., MAURIZIS J.C., BUISSON J.P., ROYER R., MEYNIEL G. J. Labelled Compd. Radiopharm., XXI, 7 : 639-647 (1984)
10. MERRILL E.J., VERNICE G.G., J. Labelled Compd. Radiopharm., VIII, 4 : 589-593 (1972)
11. DEMERSEMAN P., KIFFER D., DEBUSSCHE L., LION C., ROYER R., SENTENAC-ROUMANOU H., Eur. J. Med. Chem., 23 : 63-68 (1988)
12. BUC S.R., Organic Synthesis, coll. Vol. IV, 101-103.
13. KIFFER D., GARRIGUE H., Centre d'Etudes du Bouchet, BP 3, F-91710 Vert le Petit. Communication personnelle.