

SYNTHESE RADIOACTIVE DE SELS D'AMMONIUM QUATERNAIRES D'HYDROXY  
IMINO METHYL-2 OU -4 PYRIDINYLE PAR L'INTERMEDIAIRE  
DE LA N-METHYL FORMANILIDE- $^{14}\text{C}$

II. Marquage par  $^{14}\text{C}$  de l'iodure d'[hydroxyimino methyl-2 methyl-1  
pyridinyle ou 2-PAM Iodure et du diiodure de triméthylène dioxy-3,3' bis  
[hydroxy imino methyl-2 methyl-1, pyridinyle] ou R-665

J.C. MADELMONT<sup>\*</sup>, C. NICOLAS<sup>\*</sup>, J.C. MAURIZIS<sup>\*</sup>, J.M. DUPUY<sup>\*</sup>, H. GARRIGUE<sup>+</sup>,  
J.M. MEYNIEL<sup>\*\*</sup>, P. DEMERSEMAN<sup>§</sup>, H. SENTENAC-ROUMANOU<sup>#</sup> et A. VEYRE<sup>\*</sup>

\* 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

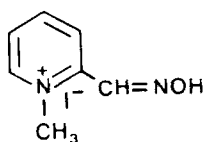
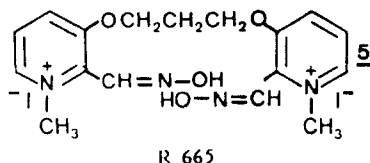
The two compounds were labelled by  $^{14}\text{C}$  on the hydroxyimino methyl group substituted on the 2 positions of the pyridinium ring.

The convenient pyridinium lithiated intermediates were formylated with N-methyl  $^{14}\text{C}$ -formanilide. The hydroxyimino methyl groups were synthesized by reaction of the  $^{14}\text{C}$ -formyl compound with hydroxylamine. For the two species alkylation of pyridine was performed with methyl iodide. Radiochemical yields were 50 % and 20 %.

**Key words :** N-methyl- $^{14}\text{C}$  formanilide  
2-Bromo and 4-Bromo pyridines formylation  
Quaternary Salts of Hydroxyimino methyl ( $^{14}\text{C}$ )-pyridinyl derivatives  
Reactivators of organophosphates-inhibited acetyl cholinesterase  
 $^{14}\text{C}$ -2-PAM iodure,  $^{14}\text{C}$ -R-665.

## INTRODUCTION

Le 2-PAM iodure et le R-665 présentent comme le HI-6, le TMB-4 et le SEBC-1574 des propriétés réactivatrices d'acétylcholinestérase empoisonnée par les organo-phosphorés grâce à la réactivité du groupe oxime vis à vis de ces toxiques. Ces deux substances ont en commun l'ammonium quaternaire sous forme d'iodométhylate de pyridinyle mais diffèrent ainsi que l'indiquent leurs formules par le nombre de résidus oximes présents sur leurs structures.

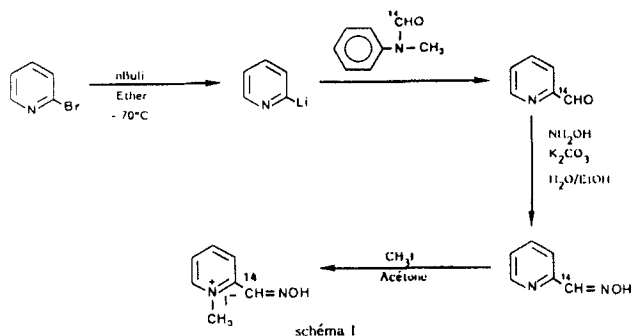


2 PAM iodure

Pour les études de pharmacocinétique nous avons envisagé le marquage par  $^{14}\text{C}$  de la fonction oxime car il s'agit du site actif.

### 1. Iodure d'[hydroxyimino méthyl-2 méthyl-1] pyridinyle ou 2-PAM iodure 6 (schéma 1)

Le marquage s'effectue en 3 étapes (schéma 1) par action du N-méthyl  $^{14}\text{C}$ -formanilide 1 sur le lithien de la bromo-2 pyridine. (1,2)



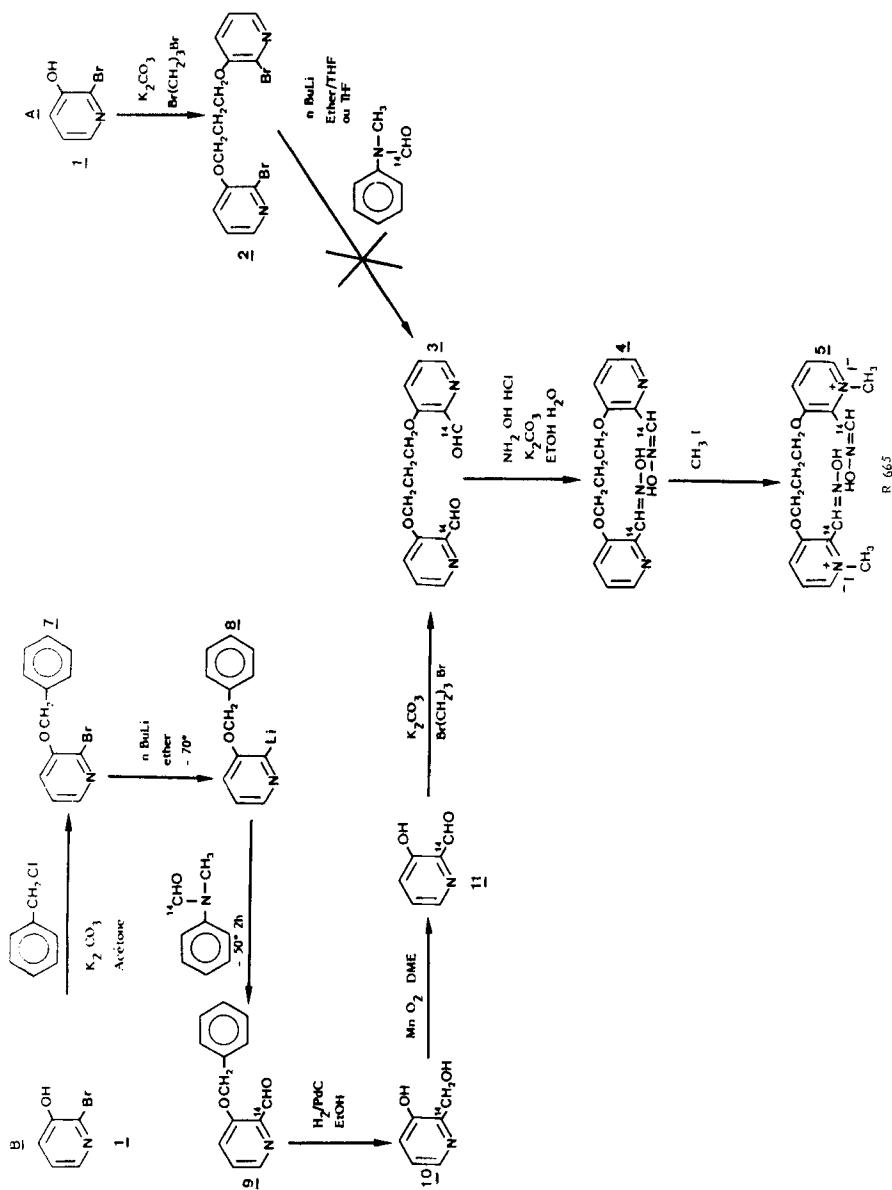


Schéma II

Le passage à l'oxime s'effectue classiquement avec un bon rendement (84 %) par action du chlorhydrate d'hydroxylamine sur le pyridine-carboxaldéhyde-2 **2**. Enfin la quaternization par l'iodure de méthyle permet d'atteindre le 2-PAM iodure **6** avec 81 % de rendement.(3 )

Le rendement radiochimique calculé par rapport au  $^{14}\text{C}$ -formiate de sodium est de 55 %.

## 2. Marquage du diiodure de triméthylène dioxy-3,3' bis [hydroxyimino méthyl-2, méthyl-1 pyridinyle] ou R-665 **5** (schéma 2)

Compte tenu de la structure de ce composé nous avons envisagé plusieurs procédés de synthèse. Nous décrivons ici les deux plus étudiés (schéma 2).

Voie A : A priori elle devrait être plus rentable puisqu'on introduit la radioactivité deux étapes avant la fin de la synthèse. Le (triméthylène dioxy)-3,3' bis (bromo-2, pyridine) **2** est préparé avec un bon rendement par action de la bromo-2, hydroxy-3, pyridine **1** sur le dibromo-1-3 propane. Le dérivé dibromé **2** traité à  $-70^\circ\text{C}$  par le BuLi dans le THF ou un mélange THF/éther (60/40) conduit en principe au dilithien mais la condensation du N-méthyl-formanilide conduit au triméthylène dioxy-3,3' bis [pyridine carboxaldéhyde-2] avec des rendements de l'ordre de 10 %. Ce faible résultat qui s'explique soit par l'encombrement des sites de formylation soit par la faible solubilité du composé dibromé dans l'éther, nous a incité à abandonner ce processus.

Voie B : Pour favoriser la solubilité dans l'éther de la réaction de métallation, nous avons préparé la bromo-2, benzyloxy-3, pyridine **7** par action du chlorure de benzyle sur la bromo-2 hydroxy-3 pyridine. Le dérivé lithien **8** est préparé à  $-70^\circ\text{C}$  dans l'éther, la formylation par le N-méthyl  $^{14}\text{C}$ -formanilide à  $-50^\circ\text{C}$  dans le même solvant conduit à la  $^{14}\text{C}$ -formyl-2 benzyloxy-3 pyridine avec un rendement chimique et radiochimique de 84 %.

La coupure du groupe benzyle O protecteur par hydrogénation catalytique conduit parallèlement à la réduction de l'aldéhyde. Cette technique introduit malheureusement une étape supplémentaire dans le schéma. Cependant la réoxydation de l'hydroxyméthyl-2 hydroxy-3 pyridine **10** effectuée par le dioxyde de manganèse dans l'éther diméthylique (4) avec un rendement acceptable (78 %) n'est pas trop pénalisante. Le triméthylène dioxy-3,3' bis [ $^{14}\text{C}$  carboxaldéhyde-2 pyridine] **3** est préparé dans le DMF en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  avec un rendement chimique et radiochimique de 50 % après purification. Le triméthylène dioxy-3,3' bis [ $^{14}\text{C}$ -hydroxyimino méthyl-2 pyridine] **4** s'obtient dans de bonnes conditions (Rendement radiochimique = 75 %) par action du chlorhydrate d'hydroxylamine sur le dérivé diformylé. Enfin la diquaternization de **4** est réalisée par action de l'iodure de méthyle en excès dans le THF (5). Le diiodure de triméthylène dioxy-3,3' bis [ $^{14}\text{C}$ -hydroxyimino méthyl-2 méthyl-1 pyridinyle] ou R-665 **5** est obtenu avec un rendement radiochimique de 93 %. Le rendement radiochimique global calculé à partir du  $^{14}\text{C}$ -formiate de sodium est voisin de 20 %.

## PARTIE EXPERIMENTALE

## 1. 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 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 I.R. sont réalisés sur un spectromètre Perkin Elmer 398. 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  $\delta$  par rapport au TMS comme référence interne.

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

2. N-méthyl ( $^{14}\text{C}$ )-formanilide ( $^{14}\text{C}$ ) : 1 (schéma) Voir Partie 1.

2 lots d'activités spécifiques différentes ont été utilisés 2,5 mCi.mmol $^{-1}$  soit 92,5 MBq.mmol $^{-1}$  pour le 2-PAM iodure et 2 mCi.mmol $^{-1}$  soit 74 MBq.mmol $^{-1}$  pour le R 665.

3. Pyridine ( $^{14}\text{C}$ )- carboxaldéhyde-2 : 2 (schéma 1) Voir Partie 1

L'activité spécifique du lot est 2,5 mCi.mol $^{-1}$  ou 92,5 MBq.mmol $^{-1}$ .

4. Pyridine( $^{14}\text{C}$ )-aldoxime-2 : 3 (schéma 1) Voir Partie 1.

L'activité spécifique du lot utilisé est 2,5 mCi.mmol $^{-1}$  ou 92,5 MBq.mmol $^{-1}$

5. Iodure d'hydroxyimino méthyl ( $^{14}\text{C}$ )-2 méthyl-1 pyridinyle ou 2-PAM iodure : 4 (schéma 1)

A la solution de 10,6 mmol (1,295 g) de pyridine aldoxime-2 3 dans 40 ml d'acétone, on ajoute 17 mmol (0,835 g) d'iodure de méthyle. On porte une nuit à 70°C dans le réacteur hermétiquement clos sous argon à l'abri de la lumière. Le précipité obtenu est filtré et lavé à l'acétone puis à l'éther. Après séchage on obtient 8,5 mmol (2,24 g) de produit 4.

Activité spécifique = 2,5 mCi.mmol $^{-1}$  92,5 MBq.mmol $^{-1}$

Rendement = 80,8 %

F = 220°C (déc.)

RMN  $^1\text{H}$  200 MHz (DMSO- $\text{D}_6$ ) ; 4,35 (s, 3,  $\text{CH}_3$ ) ; 8,05 (t, 1,  $\text{H}_5$ ) ; 8,37 (d, 1,  $\text{H}_3$ ) ; 8,52 (t, 1,  $\text{H}_4$ ) ; 8,7 (s, 1,  $\text{CH}$ ) ; 8,98 (t, 1,  $\text{H}_6$ ) ; 12,55 (s, 1, N - OH)

6. Bromo-2 benzyloxy-3 pyridine : 7 (schéma 2)

A la solution de 20 mmol (3,48 g) de bromo-2 hydroxy-3 pyridine dans l'acétone (50 ml) on ajoute 20 mmol (2,53 g) de chlorure de benzyle et 20 mmol de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . On agite une nuit à reflux, distille l'acétone sous pression réduite, hydrolyse par

30 ml d'une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  (1 M) et extrait par  $\text{CHCl}_3$ . On sèche, distille le solvant sous pression réduite et purifie par chromatographie liquide sur colonne de silice (Si 60 Merck) sous basse pression. L'élution menée par l'hexane puis l'acétate d'éthyle-hexane (20-80 v/v) permet d'isoler 16 mmol de composé (4,22 g)

Le rendement est 80 %.

RMN : 60 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) 5,03 (s, 2,  $\text{CH}_2$ ) ; 7,03 à 8,03 (m, 8, aromatiques).

### 7. Formyl( $^{14}\text{C}$ )-2 benzyloxy-3 pyridine : 9 (schéma 2)

A la solution refroidie, sous argon, à  $-80^\circ\text{C}$  dans l'éther (100 ml) de bromo 2 benzyloxy-3 pyridine (24 mmol) (6,33 g) on ajoute à la seringue par un septum 24 mmol de  $n\text{BuLi}$  ( $\sim 10$  ml) dans l'hexane fraîchement dosé. La température remonte à  $-70^\circ\text{C}$  on laisse agiter 15 minutes puis ajoute 16 mmol (2,16 g) de réactif de formylation  $^{14}\text{C}$  (32 mCi). On laisse réagir 2 heures à  $-50^\circ\text{C}$  puis hydrolyse. On extrait 4 fois la phase aqueuse par l'éther (50 ml) puis sèche sur  $\text{MgSO}_4$  et concentre sous vide. Le résidu réactionnel est purifié sur colonne de silice (Si 60 Merck) par chromatographie liquide basse pression. L'élution est menée par un gradient d'acétate d'éthyle dans l'hexane de 0 à 30 %. On isole 13,4 mmol (2,85 g) de composé.

Activité spécifique 2 mCi.mmol $^{-1}$ , 74 MBq.mmol $^{-1}$

CCM Silice (60 F 254) Rf 0,3 [éluant Acétate d'éthyle, hexane (30/70 v/v)].

Liquide visqueux

I.R. = (KBr)  $\nu$  cm $^{-1}$  1710 cm $^{-1}$  (CHO)

RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) 5,26 (s, 2,  $\text{CH}_2$ ), 7,37 à 7,46 (m, 6, aromatiques) ; 8,39 à 8,42 (m, 1, aromatique) ; 10,44 (s, 1, CHO)

### 8. Hydroxy méthyl( $^{14}\text{C}$ )-2 hydroxy-3 pyridine : 10 (schéma 2)

13,4 mmol (2,85 g) de composé 9 sont solubilisés dans 200 ml d'éthanol et hydrogénolysés sous pression normale en présence de Pd/C 5 %. Après 3 heures la quantité théorique d'hydrogène est absorbée, le milieu est filtré, puis évaporé. On obtient 12,75 mmol (1,59 g) de composé 10.

Activité spécifique 2 mCi.mmol $^{-1}$ , 74 MBq.mmol $^{-1}$

IR (KBr)  $\nu$  cm $^{-1}$  3300.bande large (OH)

RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) : 4,58 (s, 2,  $\text{CH}_2$ ) ; 4,90 (m, 1,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ) ; 7,15 à 7,16 (m, 2, aromatique) ; 8,01 (m, 1, aromatique) ; 9,90 (m, 1, OH)

### 9. Formyl( $^{14}\text{C}$ )-2 hydroxy-3 pyridine : 11 (schéma 2)

A la solution de 12,75 mmol (1,59 g) de 10 dans 150 ml d'éther diméthylque (DME) on ajoute 10 g de  $\text{MnO}_2$  (Merck) et laisse agiter 24 heures à température ambiante à l'abri de la lumière.

On filtre sur celite, évapore le filtrat et obtient 9,95 mmol (1,22 g) de dérivé 11.

Activité spécifique : 2 mCi.mmol $^{-1}$ , 74 MBq.mmol $^{-1}$

CCM Silice 60 F 254 Rf : 0,5 éluant acétate d'éthyle/hexane (30/70 v/v)

IR cm $^{-1}$  3280 bande large (OH), 1730 (CHO)

RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) 7,34 à 7,49 (m, 2, aromatique) ; 8,34 à 8,37 (m, 1, aromatique) ; 10,07 (s, 1, CHO) ; 10,73 (s, 1, OH)

**10. Triméthylène dioxy-3,3' bis [carboxaldéhyde( $^{14}\text{C}$ )-2 pyridine] : 3 (schéma 2)**

A la solution de 9,95 mmol (1,22 g) de 11 dans 50 ml de DMF on ajoute 4,97 mmol (1,00 g) de 1.3 dibromopropane et 10 mmol (1,40 g) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . On agite 4 h à 60°C puis distille le DMF sous pression réduite, hydrolyse par  $\text{H}_2\text{O}$ , extrait par le dichlorométhane (5 x 50 ml) sèche et distille la phase organique. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice (Si 60 Merck) sous basse pression, l'élution est menée par un gradient d'éthanol dans le dichlorométhane de 0 à 2 %.

On obtient 2,50 mmol (0,715 g) de produit 3 avec le dérivé monosubstitué en sous produit.

Activité spécifique : 4 mCi.mmol $^{-1}$ , 148 MBq.mmol $^{-1}$

F = 109°C Litt 108°C (4)

CCM Si 60 Merck F 254 Rf 0,5 éluant : EtOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5/95, v/v)

IR KBr :  $\nu$  cm $^{-1}$ , 1710 (CHO)

RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) 2,45 (m, 2,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4,41 (t, 4, 2 x  $\text{OCH}_2$ ) ; 7,43 à 7,53 (m, 4, aromatiques) ; 8,37 à 8,41 (m, 2, aromatiques) ; 10,27 (s, 2, 2 x CHO)

**11. Triméthylène dioxy-3,3' bis [hydroxyimino méthyl( $^{14}\text{C}$ )-2 pyridine] : 4 (schéma 2)**

A la solution de 2,5 mmol (0,715 g) de 3 dans 100 ml d'éthanol on ajoute 5,10 mmol de chlorhydrate d'hydroxylamine et 5,50 mmol de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . On porte sous agitation à reflux pendant 4 heures et concentre le milieu sous pression réduite. On dilue à l'eau froide, agite puis filtre le dérivé 4. On sèche sous vide à 50°C et obtient 1,87 mmol (0,590 g) de composé.

Activité spécifique : 4 mCi.mmol $^{-1}$ , 148 MBq.mmol $^{-1}$

F = 251°C litt = 250.252°C (4)

RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 2,23 (m, 2,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) ; 4,24 (t, 4, 2 x  $\text{OCH}_2$ ) ; 7,31 à 7,57 (m, 4, aromatiques) ; 8,14 à 8,16 (m, 2, aromatiques) ; 8,32 (3,2 2 x  $\text{CH=N}$ ) ; 11,5 (s, 2, 2 x N-OH)

**12. Diiodure de triméthylène dioxy- 3,3'bis [hydroxyimino méthyl( $^{14}\text{C}$ )-2 méthyl-1 pyridinyle] ou R 665 : 5 (schéma 2)**

A la solution de 1,87 mmol (0,590 g) de composé 4 dans le THF (50 ml) on ajoute 18,7 mmol d'iode de méthyle. Le ballon équipé d'un agitateur magnétique est hermétiquement fermé, et la suspension est agitée pendant 140 h à l'abri de la lumière.

Le milieu refroidi est filtré et lavé par le THF. Le précipité séché sous vide à 50°C est utilisable sans purification ultérieure. On isole ainsi 1,74 mmol (1,04 g) de composé 5.

Activité spécifique 4 mCi.mmol $^{-1}$ , 148 MBq.mmol $^{-1}$

F = 210°C Litt 210°C (4)

RMN 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) 2,45 (m, 2, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) ; 4,46 (s, 2 x CH<sub>3</sub>) ; 4,55 (t, 4, 2 x O CH<sub>2</sub>) ; 8,04 (m, 2, aromatiques) ; 8,40 (m, 2, aromatiques) ; 8,46 (s, 2, 2 x CH=N) ; 8,77 à 8,80 (m, 2, aromatiques) ; 8,77 à 8,80 (m, 2, aromatiques) ; 12,90 (s, 2, 2 x OH)

### 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. VAN-BAC N., HERBERT M., PICCHAT L., JANOT M.M., DAT-XUONG N., J. Labelled Compd. Radiopharm., XI, 2 : 241-244 (1975).
2. MADELMONT J.C., PARRY D., MAURIZIS J.C., BOISSON J.P., ROYER R., MEYNIEL G., J. Labelled Compd. Radiopharm., XXI, 7 : 639-647 (1984).
3. NICOLAS C., MADELMONT J.C., MAURIZIS J.C., GARRIGUE H., MEYNIEL J.M., DEMERSEMAN P., SENTENAC-ROUMANOU H., VEYRE A., J. Labelled Compd. Radiopharm. (soumise à avis).
4. WEISS C.D., J. Heterocyclic Chem. 54, 29-30 (1978).
5. DEMERSEMAN P., KIFFER D., DEBUSCHE L., LION C., ROYER R., SENTENAC-ROUMANOU H., Eur. J. Med. Chem., 23 : 63-68 (1988).