

## SYNTHÈSE DE L'ACIDE NN DICHLORO-2, ETHYL, P AMINO PHENYL-4, BUTYRIQUE (CHLORAMINOPHÈNE) MARQUE AU $^{14}\text{C}$ .

Jean Moreau et Jean-Claude Madelmont.

INSERM. Unité de Recherche U 71, Etude métabolique des molécules marquées. 63005 Clermont-Ferrand Cedex-B.P.184.

Chaire de Thérapeutique, 30, Place Henri-Dunant 63003 Clermont-Ferrand Cedex.

Received on January 9th 1974.

### SUMMARY

*NN, di-2, chloroethyl, p.amino-4, phenyl butyric acid is labelled with  $^{14}\text{C}$  on three different positions:*

*-On the carbon bearing the carboxylic fonction by means of  $\text{K}^{14}\text{CN}$ .*

*-Uniformely on the four carbons of the dichloro ethyl group by means of ethylen oxyde.*

*-On the vicinal carbon of the carboxylic fonction by means of  $\text{K}^{14}\text{CN}$ .*

### RESUME

*L'acide NN dichloro-2, ethyl p amino phényl-4, butyrique est marqué par  $^{14}\text{C}$  en trois positions différentes:*

*-sur le carbone portant la fonction carboxylique à partir de  $\text{K}^{14}\text{CN}$ .*

*-uniformément sur les quatre carbones du groupement dichloro-éthyl à partir d'oxyde d'éthylène radioactif.*

*-sur le carbone placé en  $\alpha$  de la fonction carboxylique à partir de  $\text{K}^{14}\text{CN}$ .*

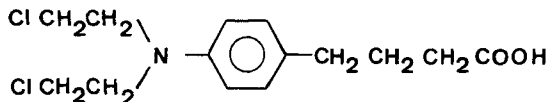
### I Introduction

L'efficacité thérapeutique du chloraminophène dans la polyarthrite rhumatoïde est actuellement bien établie (1, 2, 3, 4, 5) cependant le

mécanisme d'action comporte encore bien des inconnues. Le marquage du chloraminophène sur divers fragments de la molécule par le  $^{14}\text{C}$  peut en particulier permettre de préciser quel est le fragment actif sur le plan thérapeutique et de déterminer s'il s'agit de la molécule ou d'un métabolite. L'étude pharmacocinétique du chlorambucil marqué permettra de préciser ses modalités d'absorption, de transport plasmatique et d'élimination.

A l'aide de cette molécule marquée, on précisera également par autoradiographie les zones électives de concentration de la molécule ou des métabolites au niveau des différents tissus et organes, et ultérieurement la nature des sites actifs au niveau des récepteurs cellulaires.

Le chloraminophène dont la formule générale est rappelée ci-dessous, a été marqué sur divers fragments.



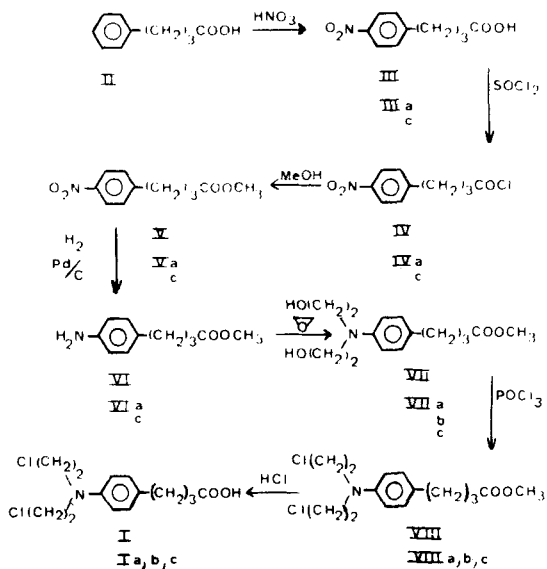
- a) sur le carbone portant la fonction carboxylique (Ia)
- b) uniformément sur les quatre carbones des groupements dichloro-éthyl (I b)
- c) sur le carbone placé en  $\alpha$  de la fonction carboxylique (I c)

## II Marquage sur le carbone portant la fonction carboxylique.

La synthèse du chlorambucil a été réalisée par EVERETT (6) selon la technique suivante (schéma I).

Dans ce procédé, la nitration de l'acide phényl butyrique (II) en acide

## Schéma I

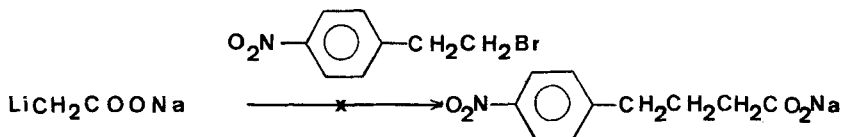


a: marqué par <sup>14</sup>C sur le carbone portant la fonction carboxylique  
 b: uniformément marqué par <sup>14</sup>C sur les groupements dichloroéthyl  
 c: marqué par <sup>14</sup>C sur le carbone en α de la fonction carboxylique

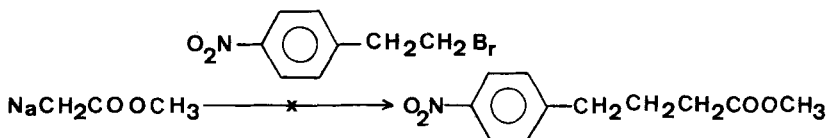
nitro-4, phényl butyrique (III) est effectuée avec un très mauvais rendement (15 %) ; il importe donc pour réaliser le marquage sur le carbone de la fonction acide de créer la fonction carboxylique sur ce composé postérieurement à la fixation du groupement nitro sur le noyau aromatique.

Pour réaliser ceci plusieurs procédés pouvaient être envisagés :

1 - la C; alcoylation, par le bromo-1, p nitro phényl-2, éthane du mono-lithien de l'acétate de sodium marqué obtenu par action du diiso propyl amidure de lithium sur le sel de sodium de l'acide acétique selon la méthode de CREGER (7).

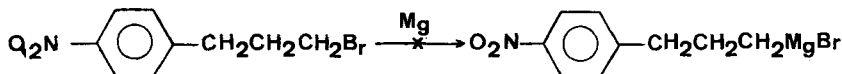


2 - La mono alcoylation de l'acétate d'éthyle ou du malonate d'éthyle par le même dérivé bromé que précédemment.

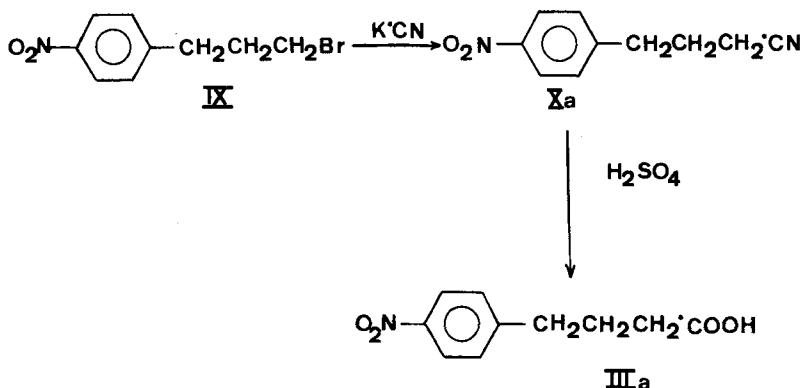


Ces deux procédés ne permettent pas d'isoler le produit recherché. En effet, le bromo-1, p nitrophényl-2, éthane n'est pas stable dans les milieux fortement basiques utilisés pour attaquer les hydrogènes en  $\alpha$  de la fonction carboxylique.

De plus, nous n'avons pu réaliser l'organomagnésien correspondant au bromo-1, p nitrophényl-3, propane et par voie de conséquence, il n'est pas possible de préparer l'acide correspondant par carbonatation du Magnésien.



Seule l'action du bromo-1, p nitro phényl-3, propane sur le KCN radioactif, suivie d'une hydrolyse en milieu acide permet d'isoler l'acide (IIIa) marqué sur le carbone de la fonction carboxylique avec un bon rendement (75 %)



Remarque :

De même dans ce cas, il n'est pas possible de réaliser le passage nitrile-acide par traitement à la soude car la présence du groupement nitro en para rend les hydrogènes trop labiles pour qu'ils puissent résister à l'action de la soude à 100° C.

Ensuite, nous avons utilisé le même schéma réactionnel que celui décrit par EVERETT (6) c'est à dire passage à l'ester méthylique (Va) par action de  $\text{SOCl}_2$  puis traitement du chlorure d'acide obtenu (IVa) par le méthanol.

La réduction du groupement nitro en amine (VIa) est réalisée par hydrogénation sous pression normale avec du palladium sur charbon à 10 %.

L'ester méthylique de l'acide NN dihydroxyéthyl amino-4, phényl butyrique (VIIa) est obtenu par traitement de (VIa) par l'oxyde d'éthylène. L'action de  $\text{POCl}_3$  sur (VIIa) conduit à l'ester méthylique de l'acide NN dichloroéthyl amino-4, phényl butyrique (VIIIa). Enfin, la fonction acide est libérée par hydrolyse en milieu chlorhydrique fort. Une saponification ne peut convenir pour réaliser cette réaction car en milieu basique les atomes de chlore sont substi-

tués par des groupements hydroxy.

Le chloraminophène marqué sur la fonction acide (Ia) est obtenu avec un rendement radiochimique de 50 % par rapport au cyanure de potassium radioactif.

### III Marquage uniforme sur les quatre carbones des groupements chloroethyl (Ib)

Dans ce cas le marquage est réalisé selon le même mode opératoire que précédemment en utilisant de l'oxyde d'éthylène marqué au  $^{14}\text{C}$  pour passer de (VIb) à (VIIb). La différence essentielle, avec la réaction effectuée avec l'oxyde d'éthylène stable réside dans le fait qu'elle doit être réalisée sans grand excès d'oxyde d'éthylène.

En fait, la réaction a été conduite en utilisant les proportions suivantes :



amino-4, phényl butyrate de méthyle

alors que dans la synthèse décrite par EVERETT (6) ce rapport est 9.

Le chloraminophène (Ib) est obtenu avec un rendement radiochimique de 29 %, calculé par rapport, à l'activité de l'échantillon d'oxyde d'éthylène marqué.

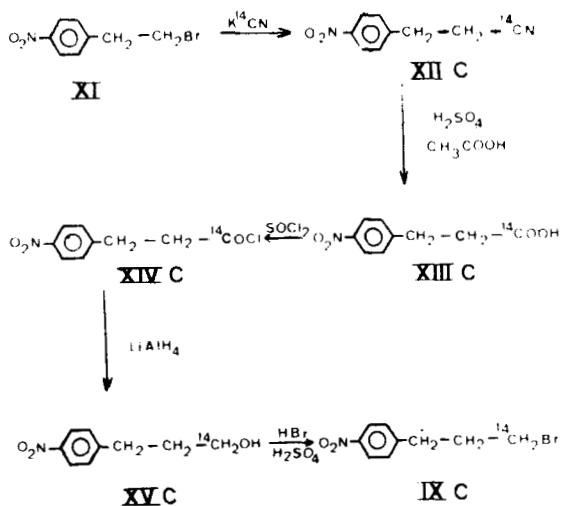
### IV Marquage sur le carbone placé en $\alpha$ de la fonction carboxylique (Ic)

Ce marquage consiste dans un premier temps à préparer le  $^{14}\text{C}$ -1-bromo-1, p nitrophenyl-3, propane (IXc). Nous l'avons obtenu selon le processus suivant (schéma II).

Le passage de (XI) à (XIII) est effectué selon la même technique que celle décrite pour passer de (IX) à (IIIa) par action du KCN marqué au  $^{14}\text{C}$  suivi d'une hydrolyse en milieu acide. Ensuite, le chlorure d'acide (XIVc) obtenu par action de  $\text{SOCl}_2$  est réduit en alcool (XVc) à  $-40^\circ$  par  $\text{LiAlH}_4$  (dans ces conditions, le groupement nitro n'est pas touché).

Enfin, le  $^{14}\text{C}$ -1-bromo-1, p nitrophenyl-3, propane (IXc) est préparé en traitant l'alcool (XVc) par un mélange d'acide bromhydrique et d'acide sulfurique.

## Schéma II



A partir de là, le chloraminophène (Ic) est synthétisé selon la méthode décrite précédemment.

Nous avons préparé le chloraminophène avec un rendement radiochimique de 2,5 % par rapport au cyanure de potassium marqué.

## PARTIE EXPERIMENTALE

I Indications Générales :

Les spectres infrarouges ont été réalisés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 257.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été effectués sur un appareil JEOL C 60 HL, en utilisant le TMS en référence interne. La position des bandes est donnée en valeur de  $\delta$ .

Les points de fusion sont pris sur un banc KOFLER.

Les mesures de radioactivité spécifique sont réalisées sur un scintillateur liquide modèle 6860 Nuclear Chicago muni d'un standard externe de Baryum 133 pour les corrections de Quenching.

Les chromatographies de produits radioactifs sont analysées sur un dérouleur de chromatogramme PANAX équipé d'un détecteur type Geiger Müller sans fenêtre.

## II Préparation de l'acide NN dichloro-2, éthyl p amino phényl-4, butyrique marqué par $^{14}\text{C}$ sur la fonction carboxylique.

### 1) Acide $^{14}\text{C}$ - 1 p nitro phényl-4, butyrique (IIIa)

A 0,02 M de (IX) on additionne 0,02 M de  $\text{K}^{14}\text{CN}$  (5 mci) en solution dans un mélange de 5 ml d'eau et 15 ml de méthanol. On laisse 7 heures à reflux, extrait à l'éther, distille le solvant, reprend le résidu par 15 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $d = 1,84$ ) et 10 ml d'eau, porte à reflux pendant 20 minutes, extrait à l'éther. On lave la phase organique à la soude 4 N, neutralise les eaux de lavage par  $\text{HCl}$  5 N, extrait à l'éther, sèche sur  $\text{MgSO}_4$  et distille le solvant. On obtient 0,015 M de (IIIa).

### 2) $\text{C}^{14}$ - 1 p amino phényl-4, butyrate de méthyle (VIa)

On traite 0,015 M de (IIIa) par 10 ml de  $\text{SOCl}_2$ , laisse 1 heure à reflux, évapore l'excès de  $\text{SOCl}_2$  sous vide, reprend le résidu par 10 ml de méthanol, porte à reflux 1 heure puis distille l'alcool en excès sous pression réduite. L'ester méthylique (Va) ainsi obtenu est hydrogéné sous pression normale en 4 heures dans une suspension de 200 mg de Pd/C (10 %) et 200 ml de méthanol. On filtre, évapore le méthanol et obtient 0,014 M de (VIa).

### 3) acide $^{14}\text{C}$ - 1 N N dichloroéthyl p amino, phényl-4, butyrique (Ia)

On ajoute 0,126 M d'oxyde d'éthylène à une suspension bien agitée de (VIa) dans 15 ml d'acide acétique N à température ambiante. Après 4 heures de contact on évapore l'oxyde d'éthylène en excès, neutralise par une solution de carbonate de sodium N, extrait à l'éther et sèche sur  $\text{MgSO}_4$ . On dissout le résidu obtenu après évaporation de l'éther dans 50 ml de benzène anhydre, concentre par distillation jusqu'à 25 ml, ajoute 5 ml de  $\text{POCl}_3$ , porte à reflux, pendant 1 h 30 mn, évapore sous vide. Le résidu obtenu est traité pendant 1 h 30 mn à reflux par 15 ml d'acide chlorhydrique ( $d = 1,19$ ). On dilue puis



extrait à l'éther et sèche sur  $MgSO_4$ . L'évaporation de la phase étherée conduit à 0,01 M de (Ia).

III Préparation de l'acide NN dichloro-2, éthyl p amino phényl-4, butyrique marqué uniformément par <sup>14</sup>C sur les quatre carbones des groupements dichloroéthyl : (Ib)

A l'aide d'une rampe à vide on transvase 0,02 M d'oxyde d'éthylène marqué (2 mci) sur une suspension de 0,005 M de p amino phényl-4, butyrate de méthyle dans 5 ml d'acide acétique N. On laisse 15 h à température ambiante. La réaction est poursuivie comme précédemment en réduisant proportionnellement la quantité de réactif. On obtient 0,0036 M de (Ib).

IV Préparation de l'acide NN dichloro-2, éthyl p amino phényl-4, butyrique marqué par <sup>14</sup>C sur le carbone en α de la fonction carboxylique.

1) acide <sup>14</sup>C - 1 p nitro phényl-3, propionique (XIIIc)

A 0,04 M de XI on additionne 0,04 M de  $K^{14}CN$  (1 mci) en solution dans 30 ml de méthanol et 5 ml d'eau, on laisse 26 heures à reflux, extrait à l'éther, chasse le solvant, reprend le résidu par un mélange de 10 ml d'acide acétique glacial, 15 ml d'eau et 25 ml d' $H_2SO_4$  (d = 1,84), laisse 1h 45 mn à reflux. On extrait à l'éther, lave la phase organique à la soude 4 N, neutralise les eaux de lavage par HCl 5 N et extrait à l'éther. On sèche sur  $MgSO_4$  et distille le solvant. On obtient 0,012 M de (XIII c).

2) <sup>14</sup>C - 1, p nitro phényl-3, propanol (XVc)

On traite 0,01 M de (XIIIc) par 10 ml de  $SOCl_2$ , laisse à reflux 1heure, chasse le  $SOCl_2$  en excès, reprend par 10 ml de Tétrahydrofuranne (T H F). Ensuite, on additionne cette solution à 0,015 M de  $LiAlH_4$  en suspension dans 20 ml de T H F refroidi à -40° C. On laisse 2 heures à cette température puis hydrolyse. On extrait à l'éther, distille le solvant. On obtient 0,006 M de (XVc).

3) <sup>14</sup>C - 1 Bromo - 1, p nitro phényl - 3, propane (IXc)

On traite 0,006 M de (XVc) par un mélange de 7 ml de  $H_2SO_4$  (d = 1,84) et 3 ml d'HBr à 48 %. On laisse 2 heures à reflux, extrait à l'éther, sèche sur  $MgSO_4$  et chasse le solvant. On obtient 0,004 M de (IXc).

4)  $^{14}\text{C}$  - 2, p nitro phényl - 4, butyrique (IIIc)

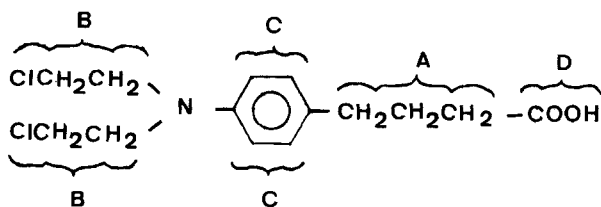
A partir de 0,004 M de (IXc) en utilisant le même mode opératoire que pour réaliser le passage de (IX) à (IIIa) on obtient 0,002 M de (IIIc).

5) acide  $^{14}\text{C}$  - 2, NN dichloroéthyl p amino phényl - 4, butyrique (Ic)

On traite 0,002 M de (IIIc), comme indiqué dans le marquage de (Ia) en réduisant proportionnellement la quantité de réactifs et obtient 0,001 M de (Ic).

V Identification et contrôle de pureté.

- F :	65° C	Litt <sup>(6)</sup>	64-66° C
- IR :	3300 à 2400 $\text{cm}^{-1}$		OH
	1700 $\text{cm}^{-1}$		C = O
	1615 $\text{cm}^{-1}$		C = C (aromatique)



## - RMN

			Rapport d'intensité
1,66 à 2,75	m	A	3
3,60	m	B	4
6,77	m	C	2
11,66 (disparait avec $\text{D}_2\text{O}$ )	s	D	1

## - Chromatographie

Homogène dans le système suivant : silice MeOH -  $\text{CHCl}_3$  (1 - 10). L'analyse est effectuée sur un dérouleur de chro-

matogramme, par auto-radiographie et par chauffage après traitement à l'acide sulfurique.

VI Rendement radiochimique et activité spécifique

	Rendement radiochimique	Activité spécifique
(Ia)	50 % par rapport au K <sup>14</sup> CN	0,80 $\mu$ ci/mg
(Ib)	29 % par rapport à l'oxyde d'éthylène <sup>14</sup> C	0,53 $\mu$ ci/mg
(Ic)	2,5 % par rapport au K <sup>14</sup> CN	0,08 $\mu$ ci/mg

B I B L I O G R A P H I E

-----

- 1) - BEDOISEAU M. - Thèse Paris 1966
- 2) - BONToux D., KAHAN A., BROUILHET H., AMOR B.,  
DELBARRE F., JOUANNEAU M., GNIAZDOWSKA E. - Rev.  
Europ. Etud. Clin. Biol., 1971, 216, 166
- 3) - CURREY H.L.F. - Immunosuppressive drugs in rheumatoid arthritis  
in : Modern Trends in Rheumatology, édit. A.GHILL, Butterword,  
London, 1971
- 4) - RENIER J.C., DESHAYES P., BRESSON J., DELAHAYE D.,  
PREGEON C. - P. Med., 1966, 75, 2329
- 5) - De SEZE S., KHAN M.F. - Rev. Rhum., 1971, 38, 737
- 6) - EVERETT J.L., ROBERTS J.J., ROSS W.C.J. - J. Chem. Soc.  
1953, 2386
- 7) - GREGER - J. Amer. Chem. Soc., 1970, 92, 1397