

SYNTHESE DE LA LETOSTEINE : MARQUEE AU  $^{14}\text{C}$  ET AU  $^{35}\text{S}$

Colette NICOLAS, Françoise GACHON<sup>\*\*</sup> et Michel FAURIE<sup>\*\*\*</sup>

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

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

<sup>\*\*</sup>Laboratoire de Physique Pharmaceutique, Faculté de  
Pharmacie, 28, Place Henri Dunant,  
63001 Clermont-Ferrand Cedex.

<sup>\*\*\*</sup>Laboratoires TRANSPHYTO S.A., 24, Avenue Jean Mermoz,  
63000 Clermont-Ferrand.

S U M M A R Y

LETOSTEINE, 2-[1(ethoxy carbonyl methylthio)-ethyl]  
4-hydroxycarbonyl thiazolidine is labelled with either carbon-14  
or Sulfur-35 on the following positions :

- the carboxylic carbon of the ester function by means  
of chloro (1- $^{14}\text{C}$ )-acetic acid.
- the thiazolidinyl group by means of L-( $^{35}\text{S}$ )-cysteine.

Specific activities are 0,373 mCi/mMole or 13,8 MBq/mMole  
for  $^{14}\text{C}$ -LETOSTEINE and 9,90 mCi/mMole or 366 MBq/mMole for  
 $^{35}\text{S}$ -LETOSTEINE.

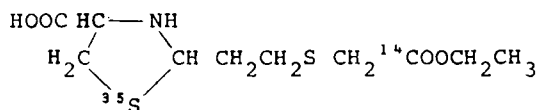
Key Words :  $^{35}\text{S}$ - and  $^{14}\text{C}$ -Thiazolidinyl derivatives,  
 $^{14}\text{C}$ -thioglycolic acid, mercapto-(1- $^{14}\text{C}$ ) acetic acid,  
 $^{14}\text{C}$ -letosteine.

La LETOSTEINE (1) est un principe actif soufré à activité  
mucolytique actif par voie orale dans les affections broncho-  
pulmonaires (2,3,4,5). Son action s'exerce dans un délai relative-  
ment court par fluidification du mucus qui obstrue les voies aé-

riennes supérieures, atténuant les symptômes d'inflammation respiratoire, rétablissant les échanges gazeux normaux et les mécanismes de défense naturels du poumon.

Pour permettre d'effectuer les études de pharmacocinétique, de métabolisme, et de dosage quantitatif dans les urines et le plasma, nous avons préparé la létostéine marquée avec du Carbone-14 ou avec du Soufre-35 dans les deux positions suivantes :

- le carbone carboxylique de la fonction ester portée par la chaîne latérale.
- le soufre du noyau thiazolidinyle.



La synthèse de la létostéine- $^{14}\text{C}$ , nécessite l'utilisation du précurseur radioactif : l'acide chloro-acétique- $^{14}\text{C}$  à partir duquel l'acide thioglycolique- $^{14}\text{C}$  puis le thioglycolate d'éthyle- $^{14}\text{C}$  ont pu être préparés.

L'étude bibliographique de la synthèse de l'acide thioglycolique à partir de l'acide chloroacétique nous a permis de sélectionner plusieurs synthèses possibles : l'introduction du groupement thiol dans la molécule pouvant se faire par réaction soit de la thiourée (6,7,8), soit du disulfure de sodium (9,10), soit de l'hydrogénosulfure de sodium (11,12), d'ammonium ou de potassium (13), soit du trithiocarbonate de sodium (14,15) et enfin du thiosulfate de sodium (16,17). Après des essais préliminaires effectués selon ces différentes méthodes, nous avons obtenu l'acide thioglycolique par la méthode au thiosulfate de sodium (18) avec des rendements reproductibles et supérieurs à 95 %, sous deux conditions : effectuer les réactions sous atmosphère inerte et ne purifier ni l'acide thioglycolique, ni le thioglycolate d'éthyle par distillation.





L'aldehyde 7 (oxo-3-propyl-thioglycolate d'éthyle) est obtenu par réaction de l'acroléine sur le thioglycolate d'éthyle 6, puis traité par une quantité équimolaire de chlorhydrate de l-cystéine ( $^{35}\text{S}$ ) et d'ammoniaque, il se forme la létostéine- $^{35}\text{S}$  avec un rendement radiochimique de 85 % (calculé à partir du chlorhydrate de l-cystéine- $^{35}\text{S}$ ) et une activité spécifique de 9,90 mCi/mMole soit 366 MBq/mMole.

P A R T I E   E X P E R I M E N T A L E

Les radiochromatographies sur couche mince (C.C.M.) sont effectuées sur gel de Silice Merck 60 F 254 (Référence 5719) et analysées avec un appareil multicanaux BERTHOLD LB 2821:

Tableau des Rf

| Composé | Solvants  | Rf          | Révélateur            |
|---------|---|-------------|-----------------------|
| 4       | Toluène/Dioxanne/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ -88/12/3 | 0,44        | Iode                  |
| 5       | Toluène/Dioxanne/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ -88/12/3 | 0,16        | Iode                  |
| 6       | Toluène/Dioxanne/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ -88/12/3 | 0,68        | Iode                  |
| 7       | Toluène/Dioxanne/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ -88/12/3 | 0,60        | Iode                  |
|         | n-BuOH/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ /Eau               | 4/1 /1 0,88 |                       |
| 8       | n-BuOH/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ /Eau               | 4/1 /1 0,58 | Iode ou<br>Ninhydrine |

Les spectres IR sont réalisés sur un spectrophotomètre PERKIN ELMER 398. Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un appareil JEOL C 60H à 60 MHz : les déplacements chimiques sont donnés en ppm (TMS = 0).

Les précurseurs radioactifs  $\text{ClCH}_2\text{COOH}$ -( $^{14}\text{C}$ ) et la l-cystéine- $^{35}\text{S}$  ont été fournis respectivement par le Centre Radiochimique d'Amersham et le Service des Molécules Marquées du CEN de Saclay.

## 1. Marquage de la létostéine- $^{14}\text{C}$

### 1.1. Acide thioglycolique ( $^{14}\text{C}$ ) : 4 (18)

Dans un ballon purgé à l'argon, on introduit l'acide chloroacétique ( $^{14}\text{C}$ ) (9 mCi) et l'acide chloroacétique inactif (20 mM : 1,89 g) en solution dans 4 ml d'eau, on ajoute peu à peu l'hydrogénocarbonate de sodium (20 mM : 1,68 g) et agite pendant 30 minutes. Tout en poursuivant l'agitation, le thiosulfate de sodium (20 mM : 3,50 g) est additionné puis la solution est chauffée à 85°C pendant 1,5 heure et à 100°C pendant 30 minutes, le reflux s'effectuant par l'intermédiaire d'un réfrigérant à boules qui permet aussi l'introduction d'argon.

La solution du sel de Bunt  $\text{NaOSO}_2\text{S-CH}_2\text{-}^{14}\text{COONa}$  est refroidie à température ambiante, puis traitée par 3,2 ml d'acide sulfurique à 70 %, et chauffée à 85°C-90°C pendant 2 heures, ce qui libère l'acide thioglycolique 4 accompagné du disulfure 5 malgré les précautions prises pour éviter l'oxydation de 4 ; le contrôle radiochromatographique permet de mesurer les pourcentages de 4 et 5 qui sont respectivement de 35 et 65.

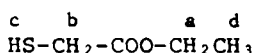
La disparition de toute trace de radioactivité au point de dépôt sur le radiochromatogramme indique l'hydrolyse complète du sel de Bunt. Les produits 4 et 5 étant miscibles à l'eau, et le milieu fortement acide nous ajoutons en 1 heure du zinc en poudre (11 mA : 720 mg), chauffons une demi-heure à 50°C puis laissons refroidir à température ambiante. Le contrôle radiochromatographique permet de vérifier la disparition de 5, la solution aqueuse est alors extraite 3 fois avec chaque fois 15 ml d'éther éthylique séché sur sodium, les phases étherées sont décantées, concentrées de moitié sous argon, 25 ml de benzène (séché sur sodium et distillé sous gaz inerte) sont ajoutés puis la solution est évaporée à l'aide d'un appareil de "DEAN STARK" pour éliminer les traces d'eau par entraînement azeotropique jusqu'à un volume réduit d'environ 15 ml, le bain d'huile s'élevant progressivement à 90°C.

L'acide thioglycolique- $^{14}\text{C}$  n'est pas isolé, sa pureté radiochimique est de 95 % (C.C.M.), l'impureté est constituée par 5.

R.M.N.  $\text{CDCl}_3$  :  $\delta$  (ppm) 8,05 (s, 1 p, COOH) ; 3,3 (d, J = 8 Hz, 2 p,  $\text{CH}_2$ ) ; 2,05 (t, J = 8 Hz, 1 p, SH).

1.2. Thioglycolate( $^{14}\text{C}$ ) d'éthyle : 6

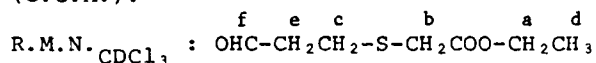
La solution de l'acide thioglycolique ( $1-^{14}\text{C}$ ) 4 est additionnée de 15 ml de benzène sec et 10 ml d'éthanol absolu (séché sur sodium et distillé sous courant d'azote). Le mélange réactionnel est progressivement chauffé à  $80^\circ\text{C}$ , tout en éliminant l'azeotrope benzène-eau. Le thioglycolate ( $^{14}\text{C}$ ) d'éthyle obtenu en solution benzène-éthanol n'est pas isolé, l'évaporation des solvants s'accompagnant d'une perte importante de l'ester due à sa tension de vapeur élevée malgré un point d'ébullition de  $156-158^\circ\text{C}$ . L'ester 6 est pur à 97,5 % (C.C.M.) l'impureté radioactive correspond à l'acide thioglycolique ( $1-^{14}\text{C}$ ) 4.



RMN  $\text{CDCl}_3$  :  $\delta$ (ppm) 4,20 (q, J = 7 Hz, 2 p, a) ; 3,45-3,15 (m, 2 p, b) ; 2,0 (t, J = 8 Hz, 1 p, c) ; 1,30 (t, J = 7 Hz, 3 p, d).

1.3. Oxo-3-propyl-thioglycolate( $^{14}\text{C}$ ) d'éthyle : 7

La solution de thioglycolate( $^{14}\text{C}$ ) d'éthyle 6 est neutralisée par 300  $\mu\text{l}$  de triéthylamine, puis une aliquote de 200  $\mu\text{l}$  de triéthylamine est ajoutée pour catalyser la réaction de condensation de l'acroléine (23 mM : 1,33 ml) ajoutée goutte à goutte. On constate un léger échauffement, l'agitation est maintenue sous argon pendant 1,5 heure. La solution est filtrée, le précipité rincé avec du benzène, le filtrat évaporé à  $40^\circ\text{C}$  au rotavapor, l'excès d'acroléine est éliminé, l'aldéhyde 7 est pur à 98,5 % (C.C.M.).



(ppm) : 9,7 (s, 1 p, f) ; 4,17 (q, J = 7 Hz, 2 p, a) ; 3,23 (s, 2 p, b) ; 2,85 (t, J = 4 Hz, 4 p, c + e) ; 1,3 (t, J = 7 Hz, 3 p, d).

1.4. Létostéine- $^{14}\text{C}_2$  [(Ethoxycarbonyl( $^{14}\text{C}$ ) méthyl thio)-1 éthyl]-2 hydroxy-carbonyl-4 thiazolidine : 8

L'aldéhyde 7, repris par 1 ml d'éthanol est additionné de chlorhydrate de l-cystéine monohydratée (20 mM : 3,79 g) en solution dans 2 ml d'eau. On agite 1 heure à température ambiante puis on coule 2 ml d'une solution d'ammoniaque à 25 %. On observe l'apparition d'un précipité blanc, on laisse au repos une nuit au réfrigérateur.





laisse au repos une nuit au réfrigérateur.

Le précipité blanc de létostéine- $^{35}\text{S}$  est filtré, lavé à l'eau glacée, séché sous vide et sur  $\text{P}_2\text{O}_5$  puis recristallisé dans l'alcool absolu. 17 mCi de létostéine- $^{35}\text{S}$  sont obtenus avec une activité spécifique de 9,90 mCi/mMole ou 366 MBq/mMole. Le rendement radiochimique global de la synthèse calculé à partir de la l-cystéine- $^{35}\text{S}$  est de 85 %.

Les données physiques de ce composé sont identiques à celles de la létostéine.

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

1. Ferlux Chimie S.A.-Brevet Français 73/10.266 du 9 Avril 1976. Demande Allemande 2.410.307 du 26 Septembre 1974.
2. Blaive B., Lapalus P., Lemoigne F.-Sem.Hôp. Paris, 8-15 Octobre 1978.
3. Puchelle E., Zahm J.M., Polu J.M., Sadoul P.-European Journal of Respiratory Diseases. Supplement n°110, 61 : (1980).
4. Danon-"Annales d'Oto-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-faciale" Septembre 1984 (éditions MASSON)-France.
5. Boissière-"MEDECINE ET ENFANCE", Septembre 1984/Editions et communications Médicales, France.
6. Elso Industria Ktsz (Imre Cserey, Geza Demjen, Balazs Fckete)-Brevet Hongrois 150.660, demande du 4 Mai 1962. [Chem. Abst. 50 : 6928 e (1984)].
7. Spolzielnia Pracy chemikow "Xenon"-Brevet Polonais 50.264, 1 décembre 1965, dem. 13 Mai 1964, [Chem. Abst. 65 : 200 15 c (1966)].
8. Pereira de Almeida M., Pereira de Aranjó M., Wal E.-Trib. Farm. 42 (1-2) : 43-5, (1974).
9. Pereira de Almeida M., Pereira de Aranjó M., Wal E.-Trib. Farm. 42 (1-2) : 40-2, (1974).
10. Pereira de Almeida M., Pereira de Aranjó M., Wal E.-Trib. Farm. 42 (1-2) : 46-7, (1974).
11. Denki Kagaku Kogyo K.K.-Brevet Japonais Tokkyo Koho 80/34.794 du 9 septembre 1980, [Chem. Abst. 94 : 83618 x (1981)].

12. Denki Kagaku Kogyo K.K.-Brevet Japonais Kokai Tokkyo Koho JP, 80/145.663 du 13 Novembre 1980,  
[Chem. Abstr. 96 : 54288 a (1982)].
13. Otsuka Chemical Pharmaceutical Co., Ltd - Brevet Japonais 68/17.564 du 25 Juillet 1968.  
[Chem. Abstr. 70 : 57163 e (1969)].
14. Dr. Spiess G.m.b.H.-Demande Hollandaise 6.510.637 du 14 Février 1967.  
[Chem. Abstr. 67 : 53674 n (1967)].
15. Greco G.C. (Stauffer Chemical Co.)-Brevet Américain 3.595.903 du 27 Juillet 1971.  
[Chem. Abstr. 75 : 88.105 v (1971)].
16. Michou-Saucet Ch., Merlin, J.C.-Bull. Soc. Chim. France 1184-5 (1962).
17. Polyanskii, E.I., Malii, V.A., Gnatyuk P.P., Butova, S.A., Fomicheva, N.T. - Brevet Russe 1.014.829 du 30 Avril 1983  
Otkrytiya Izobret, Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki 16 : 73, (1983).
18. Coons R.J., Todaro C.A., (Gillette Safety Razor Co.) - Brevet américain 2.594.030 du 22 Avril 1952.