

METHODES DE SYNTHESES DE L'IDAZOXAN - RX : 781094 [(IMIDAZOLINYL-2)-2-BENZODIOXANNE-1,4] MARQUE AU TRITIUM A HAUTE ACTIVITE SPECIFIQUE: UN LIGAND RADIOACTIF ANTAGONISTE SELECTIF DES  $\alpha_2$ -ADRENORECEPTEURS PRESYNAPTIQUES.

G. GUILLAUMET<sup>+</sup>, G. COUDERT<sup>++</sup>, R. CLEMENT<sup>§</sup>, P. PONCHANT<sup>§</sup>, L. PICHAT<sup>§§\*</sup>

<sup>+</sup> Université ORLEANS, U.F.R. Sciences Fondamentales et Appliquées, Laboratoire de Chimie Organique, B.P. 6759, F 45067 ORLEANS CEDEX 2

<sup>++</sup> Université NANCY I, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Biochimie Pharmacologique-UA CNRS 597, 30, rue Lionnois, F 54000 NANCY

<sup>§</sup> Service Molécules Marquées, C.E.N. - Saclay, F 91191 GIF/YVETTE CEDEX

<sup>§§</sup> Directeur de Recherches au C.E.A., C.E.N. - Saclay, F 91191 GIF/YVETTE CEDEX

SUMMARY

Four methods of syntheses of IDAZOXAN (RX 781094): |2-(2-imidazoliny1)-1,4-benzodioxane| labelled with tritium: 1 at high specific activity, a selective radioligand presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoreceptor antagonist are described. 2-carbethoxy-1,4-benzodioxine 5 was treated with tritium in benzene in presence of Wilkinson's catalyst leading to 2-carbethoxy [2,3-<sup>3</sup>H]-1,4-benzodioxane: 6 spec. act. 60 Ci/m which was then condensed in toluene with a reagent made from trimethylaluminium and ethylenediamine giving rise to 1 specific activity 44 Ci/mMole.

2-(carbamido N-cyanomethyl)1,4-benzodioxine: 7 was prepared from 2-chloro-carbonyl-1,4-benzodioxine: 10 and 2-aminoacetonitrile. 7 was reduced with tritium in trifluoroacetic acid in presence of Pd/C giving 8 which, without purification was ring closed into 1 by trimethylaluminium treatment. Spec. act. 35.5 Ci/mMole. When reduced with tritium in presence of Wilkinson's catalyst, 7 gave 9 spect.act. 55 Ci/mMole. After purification 9 was again reduced with

\* Adress any correspondence to this author.

## SYNTHESES DU RX 781094 TRITIE

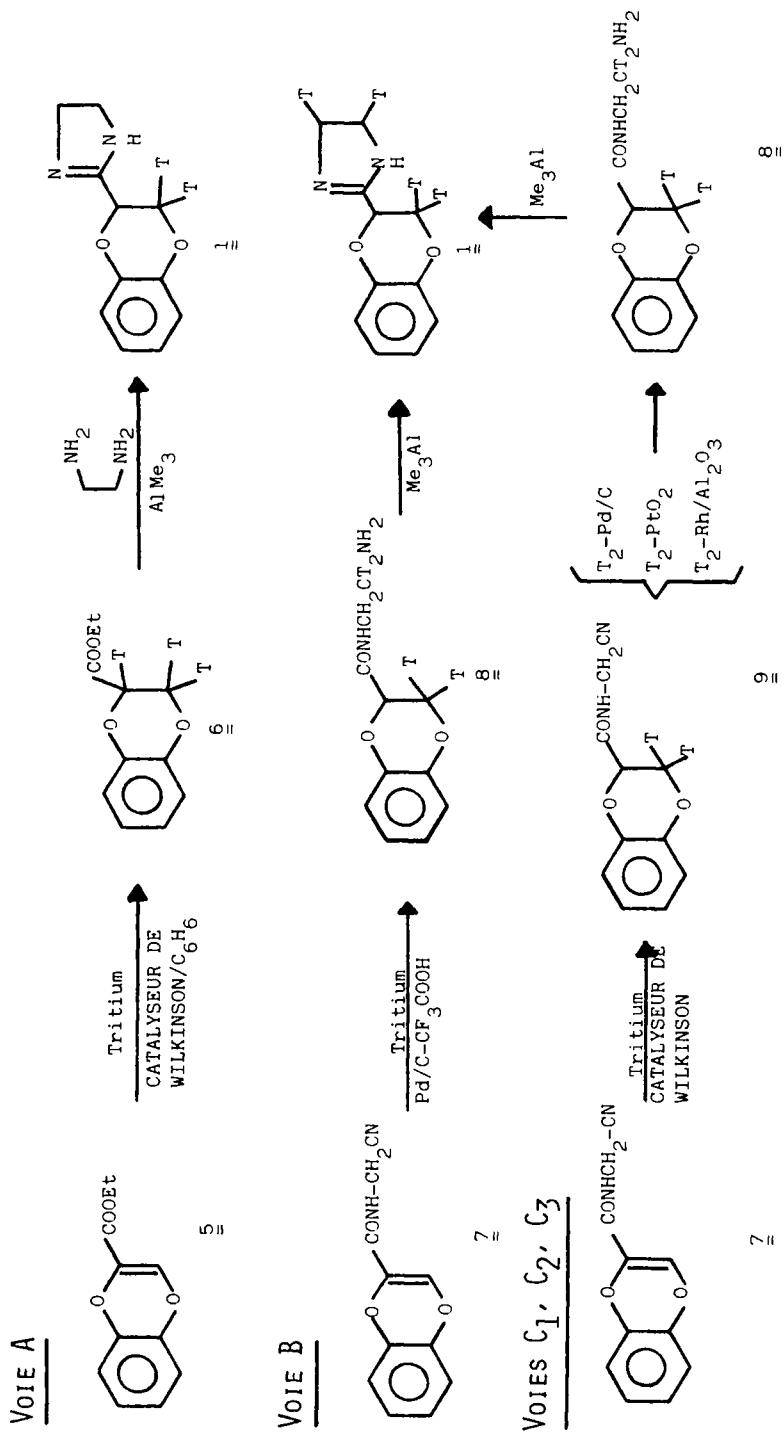


Figure 1

tritium in trifluoroacetic acid in presence of Pd/C, or PtO<sub>2</sub>, or Rh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> giving 8 which was cyclised into 1 by trimethylaluminium treatment in toluene. spec. act. of 1 was 41.5 - 39 Curies/mMole. 1 was purified by successive preparative thin layer chromatography. The radiochemical purity checked by TLC and PLC was better than 99%. Some observations on the rate of self radiolysis of 1 are reported.

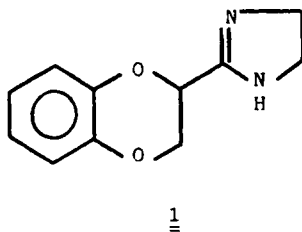
## KEY WORDS

Tritium labeling; IDAZOXAN; RX 781094; 2-(2-imidazoliny)-1,4 benzodioxane;  $\alpha_2$ -adrenoreceptor antagonist.

Les  $\alpha_2$  adrénorécepteurs ont probablement une grande importance physiologique. Ils sont des cibles pour diverses drogues utiles en thérapeutique. Une revue récente (1) a fait le point sur la classification, localisation et les mécanismes d'actions de substances agissant sur ces récepteurs.

Des études de liaisons à l'aide de divers radioligands ont permis la quantification des affinités de diverses drogues et de composés expérimentaux pour les récepteurs  $\alpha_2$  adrénorécepteurs (1). La clonidine ( $^3\text{H}$ ) a été largement utilisée pour identifier les sites  $\alpha_2$  adrénorécepteurs mais sa spécificité et son affinité d'agoniste pour ces récepteurs sont inférieures à celles de la p-aminoclonidine ( $^3\text{H}$ ). La Yohimbine ( $^3\text{H}$ ) et la Rauwolscine ( $^3\text{H}$ ) antagonistes  $\alpha_2$  adrénorécepteurs sont très spécifiques et servent à la caractérisation de ces récepteurs (1).

Le composé RX 781094: (imidazoliny-2)-2-benzodioxane-1,4: 1 (IDAZOXAN) est un antagoniste qui a, selon Chapleo et al. (2)(3), un rapport de sélectivité  $\alpha_2/\alpha_1$  pour les adrénorécepteurs bien supérieur à celui de la Yohimbine ou de la Rauwolscine.



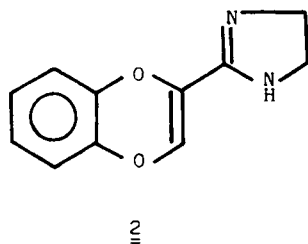
L'influence sur les propriétés biologiques de divers substituants du noyau benzénique et imidazolinique a été examinée (4)(5). Le composé RX 781094 : 1 est le plus efficace et le plus spécifique de tous les produits étudiés. L'IDAZOXAN représente peut être une nouvelle classe d'antidépresseurs potentiels. En fait, le composé: 1 a été décrit dès 1961 dans un brevet américain par Krapcho et Lott (6) comme ayant des propriétés d'hypotenseur. En 1980, Schmitt et al. (7) ont

montré que le composé: 1 auquel ces auteurs ont attribué le numéro de code: 170.150, est un agent  $\alpha$ -adréno-lytique agissant sur les  $\alpha$ -adrénorécepteurs pré et postsynaptiques.

Ces données de la littérature nous ont fait penser que le RX 781094 marqué au tritium à haute activité spécifique devrait se révéler un bon radioligand pour l'étude des sites  $\alpha_2$  adrénorécepteurs. Dès 1982, nous mettions à la disposition des chercheurs le RX 781094 ( $^3\text{H}$ )(activité spécifique  $\neq$  40 Ci/mMole) qui servit à Langer et al. (8) de ligand antagoniste pour marquer les sites  $\alpha_2$  adrénorécepteurs dans le cortex du cerveau de rat.

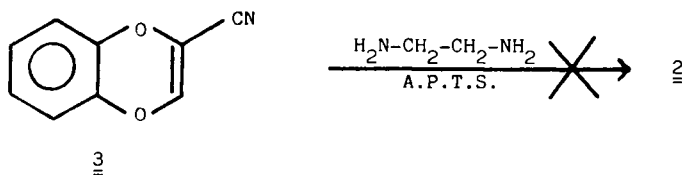
Nous décrivons ici, en détail les synthèses de 1 marqué au tritium qui ont fait l'objet de communications préliminaires (9)(10)(11).

Nous nous sommes tout d'abord efforcés de préparer le précurseur éthyléni-que: 2 (imidazodinyl-2)-2-benzodioxine-1,4:

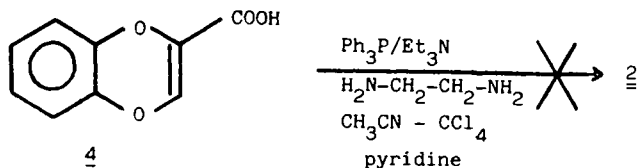


dont la saturation avec le tritium gaz en présence de divers catalyseurs aurait constitué une méthode idéale de préparation en une seule étape du RX 781094 [benzodioxanyl-1,4-( $^3\text{H}$ -2,3)]. Nous avons antérieurement utilisé avec succès la tritiation catalytique d'une benzodioxine-1,4 pour la préparation du WB 4101 tritié à forte activité spécifique (12).

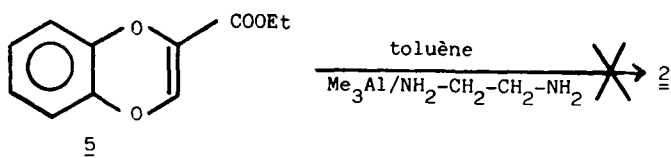
Le traitement de la cyano-2 benzodioxine-1,4: 3 (12) par l'éthylènediamine en présence d'acide p-toluènesulfonique (13) dans diverses conditions de température pendant des temps variables a conduit à une grande majorité de produits polymérisés.



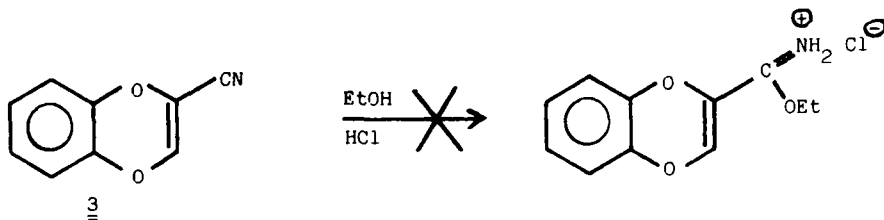
L'acide carboxy-2-benzodioxine-1,4: 4 obtenu par saponification de l'ester éthylique correspondant (14) traité selon (15) a conduit à un mélange complexe de produits non identifiés.



De même la carbéthoxy-2-benzodioxine-1,4: 5 (14) traitée au sein du toluène à reflux par un réactif résultant de l'action de  $\text{Me}_3\text{Al}$  sur l'éthylène-diamine selon (16) a conduit à un mélange complexe ne contenant pas le composé 2.



De plus, la cyano-2 benzodioxine-1,4: 3 traitée par l'éthanol chlorhydrique (réaction de Pinner) selon (2) n'a pas donné l'imidate correspondant.



Nos essais de synthèse du précurseur: 2 n'ayant pas abouti nous avons dû envisager d'autres voies moins directes pour obtenir le RX 781094 ( $^3\text{H}$ )(fig.1).

Dans la voie A (fig.1) la carbéthoxy-2-benzodioxine-1,4: 5 est réduite par le tritium en présence du catalyseur de Wilkinson dans le benzène conduisant au carbéthoxy-2-benzodioxane-1,4 ( $^3\text{H-2,3}$ ): 6 lequel traité par un réactif obtenu par action de  $\text{Me}_3\text{Al}$  sur l'éthylènediamine dans le toluène, à reflux fournit 1.

Les voies B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> utilisent le précurseur 7 qui est synthétisé selon le schéma 1:

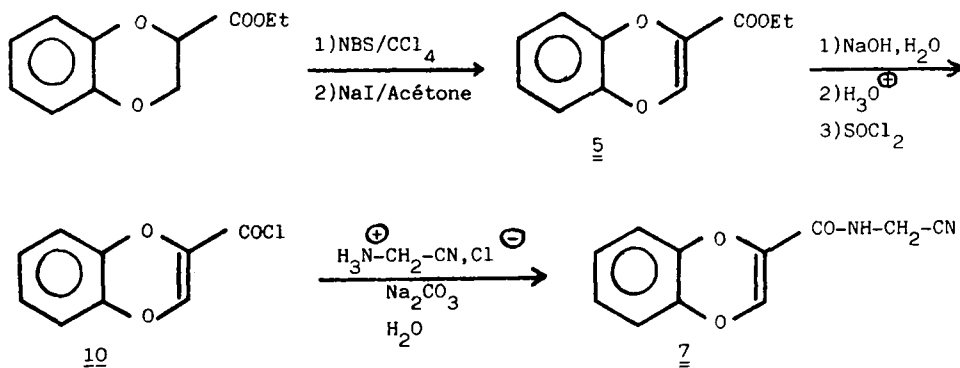


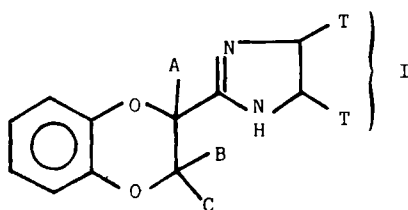
Schéma 1

La chlorocarbonyl-2-benzodioxine-1,4: 10 est préparée selon un procédé développé dans un de nos laboratoires (14)(18) avec des rendements quantitatifs. La condensation du chlorure d'acide 10 avec l'aminocétonitrile selon Goldberg et Kelly (19) donne le précurseur: 7 avec un rendement de 95 % par rapport à l'aminocétonitrile.

Dans la voie B (fig.1) le motif benzodioxine-1,4 et la fonction nitrile sont réduites catalytiquement (Pd/C) par le tritium dans l'acide trifluoroacétique en composé 8 qui est cyclisé par traitement avec le triméthylaluminium selon (2). Les voies C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> (fig.1) impliquent la réduction préliminaire de la double liaison de la benzodioxine-1,4 avec le tritium en présence du catalyseur de Wilkinson en composé 9. Ce dernier est ensuite réduit catalytiquement en présence de Pd/C ou PtO<sub>2</sub>, ou Rh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, en composé 8 lequel est cyclisé en 1 par action du triméthylaluminium.

Le RX 781094 (<sup>3</sup>H) a été purifié successivement par chromatographie sur colonne de Sephadex 610 suivie de deux chromatographies en couche mince préparative. La pureté radiochimique, contrôlée par CCM et par HPLC, est supérieure à 99 %.

Tableau 1: Spectres de RMN-<sup>3</sup>H et Activités Spécifiques de l'Idazoxan marqué au tritium.



Voies de synthèse	A	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
Activité spécifique Ci/mMole moyenne. Valeurs obtenues par SM et UV/scintillation liquide.	44	35,5	41,5	39	39
RMN- <sup>3</sup> H. Répartition de <sup>3</sup> H sur les positions A,B,C,I, (20) (12).	B: 50% C: 50%	B: 17,5% C: 17,5% I: 65%	B: 31% C: 31% I: 38%	B: 38% C: 38% I: 24%	B: 40% C: 40% I: 20%

Les résultats comparatifs des routes A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> sont résumés dans le tableau 1. Les voies B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> introduisent 4 atomes de tritium, mais les activités spécifiques obtenues (35,5 - 41,5 Ci/mMole) n'atteignent que 30 à 35% de l'activité spécifique théorique. Lors de la cyclisation de 8 et/ou

de la réduction de 9 interviennent des échanges avec les protons des solvants utilisés. La voie B fournit un marquage prépondérant sur le noyau imidazoline. La route A donne une activité spécifique de 44 Ci/mMole correspondant à 76% de la théorie pour deux atomes de tritium. Toutefois cette voie est expérimentalement plus délicate car la formation du cycle imidazolinique est difficile à maîtriser.

Quelques essais de conservation du RX 781094 dans diverses conditions sont rapportés dans la partie expérimentale.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les Docteurs S.Z. Langer (Synthélabo) et M.Malen (Laboratoires Servier) pour des échantillons de RX 781094 et S 170150.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion sont non corrigés. Les spectres I.R. ont été enregistrés sur un appareil Perkin Elmer 257. Les spectres R.M.N. du proton ont été réalisés sur un appareil Perkin Elmer R12. Les déplacements chimiques sont donnés en p.p.m. (tétraméthylsilane comme référence interne), les couplages sont en Hertz.

Les spectres R.M.N. du tritium ont été obtenus (20) sur un spectromètre Bruker WP 100 opérant selon le mode pulsé à un champ nominal de 106 MHz équipé d'une sonde tritium et de 16 K mémoires.

Les analyses par chromatographie liquide à haute performance ont été effectuées sur un appareil Waters.

Les spectres de masse sont obtenus sur un appareil LKB 2091 par introduction directe et impact électronique (12 et 70 eV).

#### Carbethoxy-1-benzodioxane-1,4: 6.

Préparé à partir du catéchol et du dibromo-2,3-propionate d'éthyle selon (17).

#### Carbethoxy-1-benzodioxine-1,4: 5 chlorocarbonyl-1-benzodioxine-1,4: 10.

Préparés selon (14) et (18).

#### (Carboxamido-N-cyanométhyl)-2-benzodioxine-1,4: 7

On met en solution dans 10 ml d'eau, 10 mmoles de chlorhydrate d' $\alpha$ -amino-acétonitrile et 22 mmoles de bicarbonate de sodium. La température étant maintenue au dessous de + 10°C, on ajoute sous forte agitation par petites fractions

11 mMoles du chlorure d'acide: 10 fraîchement préparé. L'agitation est ensuite poursuivie pendant 6 heures à la température ambiante. Les cristaux formés sont filtrés, lavés à l'eau puis dissous dans le chlorure de méthylène. Après séchage sur sulfate de magnésium, filtration et évaporation du solvant, on isole: 7.

F = 148-149°C (benzène-éthanol)

RMN (Acétone D<sub>6</sub>): 4,35(d, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 6 Hz);

6,7 - 7,15(m, 5H, protons éthyléniques et aromatiques); 8,10 (massif, 1H, NH)

I.R.(Nujol): 3310 cm<sup>-1</sup>(NH); 2230 cm<sup>-1</sup>(CN); 1690 cm<sup>-1</sup>(C=C)

1660 cm<sup>-1</sup>(CO)

S.M.: m/e 216 (P)

(Carboxamido -N-cyanométhyl)-2-benzodioxane-1,4.

On opère comme dans le cas du composé 7

F = 141-142°C(benzène)

RMN(acétone D<sub>6</sub>): 4,15-4,50(m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>); 4,75-5,00(m, 1H, CH)

6,80 - 7,10 (forte résonance à 6,92)(massif, 4H, protons aromatiques); 8,30(massif, 1H, NH).

IR(Nujol): 3310 cm<sup>-1</sup>(NH); 2220 cm<sup>-1</sup>(CN); 1685 cm<sup>-1</sup>(CO)

S.M. : m/e: 218(P)

RX 781094 (3H): 1

Tritiations

On utilise une version améliorée de l'appareillage décrit antérieurement (19), à savoir une pompe Toepler pour transférer à la pression atmosphérique le tritium (enrichissement isotopique 97 %) nécessaire à la réduction des précurseurs: 5 ou 7 en solution dans un solvant. Une violente agitation magnétique est indispensable ; les réactions de tritiation conduites à la température ambiante en présence de divers catalyseurs sont arrêtées après l'absorption du volume théorique de tritium.

Les solutions réactionnelles sont filtrées puis évaporées à sec sous vide. Les résidus sont repris immédiatement par le méthanol; celui-ci est évaporé sous vide afin d'éliminer le tritium labile. Après reprise dans un solvant on purifie comme il est indiqué plus loin.

Voie A - 10 mg (0,0485 mMole) de 5 et 29 mg de catalyseur de Wilkinson en solution dans 7 ml de benzène anhydre absorbent en 22 heures, la quantité théorique de tritium. On obtient, après purification 3 curies de composé: 6 (activité spécifique ~ 60 Ci/mMole).



Voie B - 19 mg (0,088 mMole) de: 7, 35 mg de Pd/C (10 %) et 8 ml d'acide trifluoroacétique absorbent en 4 heures la quantité théorique de tritium. On isole 3,6 curies d'intermédiaire: 8 de pureté radiochimique 50 %.

Voies C - 33 mg (0,153 mMole) de: 7, 42 mg de catalyseur de Wilkinson en solution dans 8 ml de benzène anhydre absorbent en 22h30 la quantité théorique de tritium. Après purification on isole 7 curies d'intermédiaire: 9 (activité spécifique  $\sim$  55 Ci/mMole).

Voie C<sub>1</sub> - 5,55 mg (1,4 Ci - 0,025 mMole) de: 9, 12,2 mg de Pd/C (10%), 8 ml d'éthanol et 0,5 ml de HCl concentré absorbent la quantité théorique de tritium en 4 heures. On obtient 1,67 curies de: 8 de pureté radiochimique 85%.

Voie C<sub>2</sub> - 5,55 mg (1,4 Ci-0,025 mMole) de: 9 en solution dans un mélange de 8 ml de EtOH, DMF,  $\text{CHCl}_3$  et 14,5 mg de  $\text{PtO}_2$  absorbent en 4 heures la quantité théorique de tritium. On obtient 1,2 curies de: 8 de pureté radiochimique 80%.

Voie C<sub>3</sub> - 5,55 mg (1,4 Ci-0,025 mMole) de: 9 en solution dans 8 ml de EtOH et 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentré et 18,4 mg de  $\text{Rh/Al}_2\text{O}_3$  (5%) absorbent la quantité théorique de tritium en 24 heures. On obtient 1,6 curies de: 8 de pureté radiochimique 85%.

#### Condensations et cyclisation en RX 781094 ( $^3\text{H}$ ): 1

Voie A - On prépare une solution toluénique de complexe ethylènediamine- $\text{Me}_3\text{Al}$ , en boîte à gants, atmosphère d'azote à partir de 29 ml de solution toluénique 2M commerciale de  $\text{Me}_3\text{Al}$ , diluée par 20 ml de toluène anhydre. Sous agitation et refroidissement on ajoute lentement 58 mMoles d'éthylènediamine (séchée sur tamis moléculaire) à une température inférieure à  $+10^\circ\text{C}$ . 1 ml de la solution de complexe (1,18 mMole/ml) est ajoutée à: 6 ( $\neq$  0,02 mMoles); on agite à la température ambiante pendant 15 minutes puis porte à reflux pendant 30 minutes. On hydrolyse sous refroidissement par le mélange: méthanol: 10, chloroforme: 10, eau: 3. Après décantation du surnageant on filtre sur Millipore.

Voies B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> - L'intermédiaire: 8 radioactif de pureté radiochimique 50-85% est traité par 1 ml de  $\text{Me}_3\text{Al}$  en solution toluénique 2M à la température ambiante en boîte à gants sous atmosphère d'argon puis on porte à reflux pendant 2 heures, le progrès de la cyclisation étant suivi par CCM.

#### Purifications.

L'intermédiaire: 6 est purifié par chromatographie préparative sur couche mince (CPCM): Silicagel MERCK F 254, solvant: chloroforme. L'intermédiaire 9 est purifié par chromatographie sur colonne Merck: Lobar type B, en phase inverse, solvant: eau: 50, méthanol: 50, ce qui permet la séparation facile de 7 et 9.

Le RX 781094 ( $^3\text{H}$ ): 1 est purifié en trois étapes.

a) chromatographie sur colonne Sephadex 610 avec élution par  $\text{HCl } 10^{-3}\text{M}$ .

- b) chromatographie préparative sur couche mince (CPCM) silice MERCK F 254 ;  
solvant: chloroforme: 70, méthanol: 30 -  $R_F \sim 0,15$ .
- c) CPCM silice Merck F 254 - solvant: isopropanol: 80, acide acétique: 10,  
eau: 10 -  $R_F \sim 0,19$ .

Contrôles de la pureté radiochimique du RX 781094: 1.

La pureté radiochimique contrôlée par chromatographie en couche mince de Silicagel Merck F 254 avec les systèmes de solvants b) et c) est supérieure à 99%.

La HPLC sur colonne ZORBAX TMS, élution par MeOH: 70 eau: 30 + PIC B7 donne également une pureté de 99%.

Conservation du RX 781094 ( $^3\text{H}$ ): 1.

Voie A - Solution aqueuse stérile (2 mCi/ml) à + 5°C - 60% de décomposition en 6 mois.

Voie B - Solution méthanolique (2 mCi/ml) à - 30°C - 1 à 20% de décomposition en 6 mois.

Voies C - Solution méthanolique (2 mCi/ml) à - 30°C - 1 à 20% de décomposition les deux premiers mois.

Spectres RMN- $^3\text{H}$ .

Les spectres ont été mesurés (20) comme il a été dit à propos du WB 4101 ( $^3\text{H}$ ) (11). Les fréquences de résonance ont été attribuées en se basant sur les données de la littérature (12)(2).

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 - TIMMERMANS P.B.M.W.M., Van ZWIETEN P.A. - J. Med. Chem. 25: 1389 (1982).
- 2 - CHAPLEO C.B., MYERS P.L. - UK Patent Appl. G.B. 2.068.376 A (1981).
- 3 - CHAPLEO C.B., DOXEY J.C., MYERS P.L., ROACH A.G., Brit. J. Pharmacol. 74 : 842 P (1981).
- 4 - CHAPLEO C.B., MYERS P.L., BUTLER R.C.M., DOXEY J.C., ROACH A.G., SMITH C.F., J. Med. Chem. 26: 823 (1983).
- 5 - STILLINGS M.R., CHAPLEO C.B., BUTLER R.C.M., DAVIS J.A., ENGLAND C.D., MYERS M., MYERS P.L., TWEDDLE N., WELBOURN A.P., DOXEY J.C., SMITH C.F., J. Med. Chem. 28: 1054 (1985).
- 6 - KRAPCHO J., LOTT W.A. (Olin Mathieson Chem. Corp.) U.S. 2,979.511 - 11 Avril 1961.
- 7 - MOUILLE P., DABIRE H., ANDREJAK M., SCHMITT H. - C.R. Acad. Sc. Paris 290 D: 1553 (1980).
- 8 - PIMOULE C., SCATTON B., LANGER S.Z. - Eur. J. Pharmacol. 95: 79 (1983).

- 9 - PICHAT L. - 50<sup>e</sup> Anniversaire Découverte Radioactivité artificielle - PARIS 23 Mars 1984 - Synthèses de Molécules Marquées à activités thérapeutiques.
- 10 - COUDERT G., GUILLAUMET G., PICHAT L. - Journées du Centre d'Etude des Interférences des Médicaments et autres Xénobiotiques sur les Membranes et les Systèmes Biologiques. Janvier 1985 - NANCY.
- 11 - PICHAT L. - 2<sup>d</sup> International Symp. on the synthesis and application of isotopically labelled compounds - Sept. 3-6, 1985-KANSAS CITY.
- 12 - GUILLAUMET G., COUDERT G., PONCHANT M., BEAUCOURT J.P., PICHAT L.- J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 21: 161 (1984).
- 13 - LUU DUC C., PERA M.H., FILLION H., AGNIUS DELORD C. - Bull. Soc. Chim. France 555 (1976).
- 14 - COUDERT G., GUILLAUMET G., LOUBINOX B. - Tetrahedron Letters, 1059 (1978).
- 15 - VORBRUGGEN H., KROLIKIEWICZ K. - Tetrahedron Letters, 1059 (1978).
- 16 - NEEF G., EDER V., SAUER G. - J. Org. Chem. 46: 2824 (1981).
- 17 - KOO J., AVAKIAN S., MARTIN G.J. - J. Am. Chem. Soc. 77: 5373 (1955).
- 18 - LALLOZ L., LOPPINET V.; COUDERT G., GUILLAUMET G., LOUBINOX B., LABRID C., BEAUGHARD M., DURENG G., LAMAR J.C. - J. Med. Chem. 24: 994 (1981).
- 19 - PICHAT L., AUDINOT M., LASCEVE G., - Bull. Soc. Chim. France 1986 (1961).
- 20 - SERGENT L., BEAUCOURT J.P. - Non publié.