

Synthèse et distribution tissulaire chez le rat du Phénylacétate de Diéthylamino-2 éthyle marqué par ^{14}C .

M.F. MOREAU, J. MICHELOT, P. LABARRE, D. PARRY, A. VEYRE.

INSERM U 71, B.P. 184, 63005 Clermont-Ferrand Cedex
et Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine, B.P. 38,
63001 Clermont-Ferrand Cedex.

SUMMARY

2-Diethylaminoethyl phenylacetate was labelled by ^{14}C in two positions :

- on the carboxylic group by means of ^{14}C -phenylacetic acid.
- on the aminoethanol part using ^{14}C ethanolamine as intermediate.

Biodistribution studies were performed in rats for the two labellings after i.v. administration of the compound.

Key words : Carbon-14, 2-diethylaminoethyl phenylacetate, Brain.

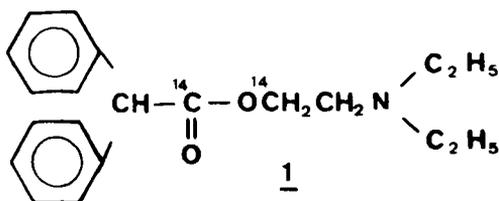
RESUME

Deux marquages du phénylacétate de diéthylamino-2 éthyle par ^{14}C ont été réalisés :

- sur le carboxyle, par l'intermédiaire de l'acide phénylacétique ^{14}C .
- sur le groupement diéthyléthanamine, à partir de l'éthanolamine- ^{14}C .

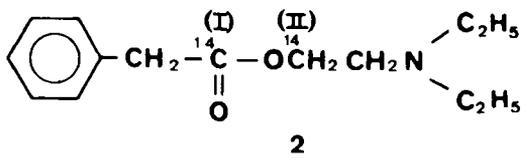
L'étude de la biodisposition a été réalisée chez le rat pour les deux marquages, après administration du composé par voie i.v.

L'étude de biodisposition chez le Rat, d'un atropinique de synthèse l'" Adiphénine" (composé 1) réalisée antérieurement au laboratoire à partir de la molécule marquée par ^{14}C (1) a mis en évidence une concentration importante de la radioactivité au niveau de certaines structures cérébrales (thalamus, cortex, hippocampe, striatum).(2,3).



L'étude métabolique tissulaire a montré que, jusqu'à trente minutes après l'injection, la molécule inchangée est responsable à 80 % du marquage des tissus cibles (4 à 6). Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel d'une telle structure pour des examens fonctionnels et morphologiques du Système Nerveux Central.

Nous avons poursuivi ce travail par l'étude d'analogues de l'Adiphénine afin d'évaluer l'influence de certaines modifications de structure, et notamment le rôle de la liposolubilité, sur la concentration et la cinétique d'épuration au niveau des organes cibles. Il est connu en effet que l'aptitude d'un composé à franchir la barrière hématoencéphalique dépend essentiellement de son degré de lipophilie (7,8). Nous décrivons dans cet article la préparation du phénylacétate de diéthyl-amino-2 éthyle marqué par ^{14}C (composé 2) ainsi que les résultats préliminaires de l'étude de biodisposition chez le rat, comparés à ceux obtenus avec l'Adiphénine.



Deux marquages ont été réalisés :

- sur le carboxyle de la partie phénylacétique (2 I)
- sur un carbone du groupement N,N-diéthyl amino-2 éthyle (2 II).

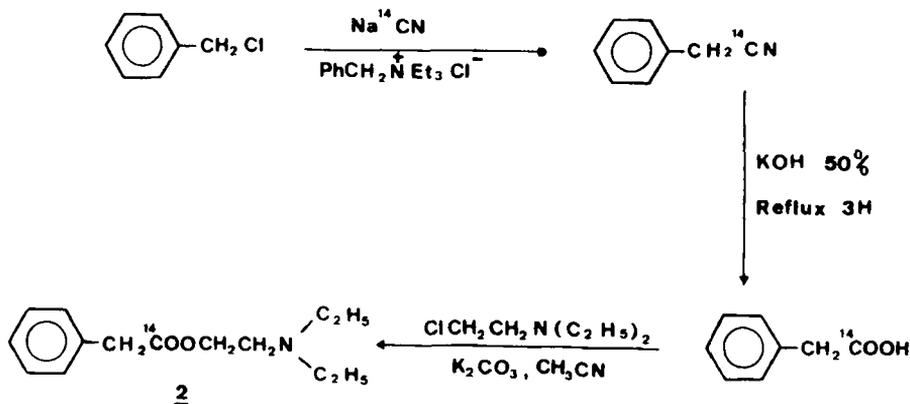
Marquage (I)

Il a été effectué, selon le processus décrit dans le schéma 1, par l'intermédiaire de l'acide phénylacétique ^{-14}C . Nous avons utilisé la méthode de HAYASHI et coll. (9) pour préparer ce précurseur, car elle a conduit à un rendement radiochimique supérieur à celui obtenu par carbonatation du chlorure de benzyle magnésium.

L'action du cyanure de sodium ^{-14}C sur le chlorure de benzyle, en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le chlorure de benzyle triéthylammonium, conduit au phénylacétonitrile- ^{14}C . L'hydrolyse de ce dernier dans la potasse à 50 %, permet d'obtenir l'acide attendu avec un rendement radiochimique de 82 % par rapport à Na^{-14}CN .

L'acide est ensuite traité de façon classique, par le chlorhydrate de N,N-diéthyl chloro-2 éthylamine dans l'acétonitrile à reflux en présence de K₂CO₃ comme base. Nous obtenons le composé 2 avec un rendement de 68 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

Schéma 1



Marquage (II)

Le précurseur utilisé dans ce cas est le chlorhydrate d'éthanolamine-¹⁴C préparé dans le laboratoire à partir du cyanure de sodium-¹⁴C, selon le schéma précédemment décrit par MADELMONT et coll. (10). Il est traité par un excès de bromure d'éthyle dans le THF à reflux, avec K₂CO₃ comme base (schéma 2). La N,N-diéthyl éthanolamine-¹⁴C ainsi obtenue est isolée sous forme chlorhydrate, après traitement par une solution HCl-éther, avec un rendement radiochimique de 56 % par rapport à Na-¹⁴CN. L'action ultérieure de SOCl₂ conduit au chlorhydrate de N,N-diéthyl chloro-2 éthylamine-¹⁴C qui, en présence d'acide phénylacétique dans les conditions indiquées précédemment, permet d'obtenir le composé 2 marqué par ¹⁴C sur le groupement aminoéthanol.

Schéma 2

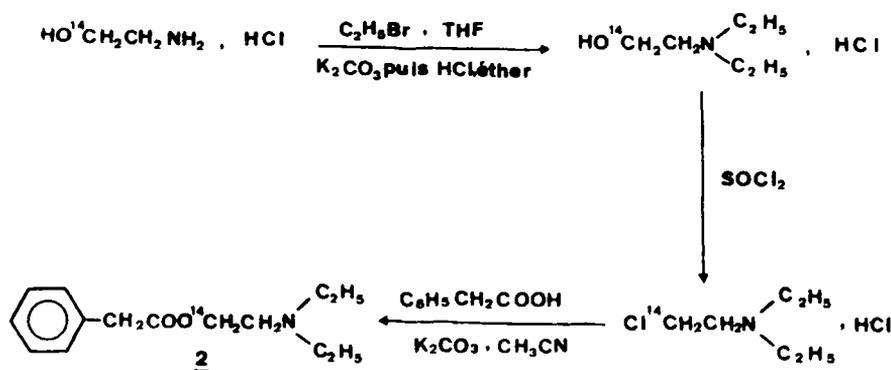


Tableau 1
Distribution tissulaire de 2 (I) chez le rat

Tissu	Minutes après administration				
	2	15	60	180	360
Sang	0,60 ± 0,04	0,35 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,000
Cerveau	* 1,03 ± 0,13 ** 1,70 ± 0,31	0,25 ± 0,04 0,75 ± 0,07	0,02 ± 0,01 0,70 ± 0,20	0,005 ± 0,002 0,80 ± 0,33	0,004 ± 0,000 0,60 ± 0,05
Poumon	0,93 ± 0,21 1,60 ± 0,43	0,37 ± 0,09 1,05 ± 0,17	0,07 ± 0,01 2,80 ± 0,43	0,03 ± 0,01 4,50 ± 2,01	0,02 ± 0,00 2,70 ± 0,72
Rein	5,21 ± 0,80 8,61 ± 1,80	5,30 ± 2,38 14,80 ± 5,38	0,30 ± 0,08 11,30 ± 2,38	0,05 ± 0,01 7,60 ± 1,58	0,05 ± 0,00 7,40 ± 1,19
Foie	0,94 ± 0,22 2,10 ± 0,35	0,94 ± 0,30 2,70 ± 0,67	0,17 ± 0,01 6,80 ± 1,99	0,05 ± 0,00 7,31 ± 1,33	0,05 ± 0,01 6,91 ± 0,74

* Résultats exprimés :

* en pourcentage de la dose injectée fixé par g de tissu

** sous forme du rapport $\frac{\text{radioactivité tissulaire}}{\text{radioactivité sanguine}}$

moyenne (3 rats par temps) ± déviation standard (D.S.)

Tableau 2
Distribution tissulaire de 2 (III) chez le rat

Tissu	Minutes après administration				
	2	15	60	180	360
Sang	0,260 ± 0,006	0,084 ± 0,011	0,027 ± 0,002	0,021 ± 0,004	0,019 ± 0,003
Cerveau	* 1,78 ± 0,17 ** 6,75 ± 0,65	1,26 ± 0,19 15,30 ± 3,94	1,07 ± 0,02 39,71 ± 2,15	1,01 ± 0,15 49,80 ± 10,01	0,95 ± 0,08 49,20 ± 3,11
Poumon	1,61 ± 0,17 6,10 ± 0,68	1,25 ± 0,22 15,31 ± 4,16	1,34 ± 0,15 50 ± 9	1,30 ± 0,11 64 ± 12	0,98 ± 0,00 52 ± 11
Rein	3,80 ± 0,24 14,4 ± 0,6	3,21 ± 0,35 38 ± 1	3,60 ± 0,57 133 ± 30	3,01 ± 0,97 150 ± 22	3,20 ± 1,14 162 ± 47
Foie	1,24 ± 0,05 4,7 ± 0,2	2,70 ± 0,26 32,4 ± 2,8	2,61 ± 0,34 97 ± 8	2,60 ± 0,28 130 ± 30	3,01 ± 0,28 156 ± 30

Résultats exprimés :
 * en pourcentage de la dose injectée fixé par g de tissu
 ** sous forme du rapport radioactivité tissulaire / radioactivité sanguine
 moyenne (3 rats par temps) ± déviation standard (D.S.)

Etude expérimentale chez le rat :

La répartition tissulaire chez le rat des deux espèces marquées 2 (I) et 2 (II) a été évaluée à des intervalles de temps variant de 2 minutes à 24 heures après l'administration par voie i.v. du composé sous forme de chlorhydrate. Dans ce travail, seules la répartition et l'élimination de la radioactivité totale ont été déterminées, l'aspect métabolique n'a pas été abordé.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux 1 et 2 pour les principaux organes. L'examen de ces tableaux montre des concentrations intratissulaires et des cinétiques d'élimination de la radioactivité différentes selon les espèces marquées. En ce qui concerne les organes de métabolisme, l'espèce 2 (I) objective un maximum de radioactivité de 2 à 15 minutes après l'injection, suivi d'une décroissance rapide des concentrations radioactives, tandis que 2 (II) présente des concentrations hépatiques et rénales en plateau pendant les 6 heures qui suivent l'injection.

On note une localisation rapide de la radioactivité dans le cerveau à partir des deux marquages, avec toutefois, pour les temps courts après l'injection, des valeurs inférieures à celles observées avec l'Adiphénine(3): au temps deux minutes, les concentrations radioactives sont respectivement de 1,0 et 1,8 pour les espèces 2 (I) et 2 (II) alors que pour l'Adiphénine marquée par ^{14}C sur les groupes correspondants, elles sont de 3,0 et 3,7. Cette différence peut s'expliquer par le caractère lipophile plus élevé de l'Adiphénine qui faciliterait le passage de la barrière hématoencéphalique. Son coefficient de partage est voisin de 30 à pH = 7,0, mesuré dans le mélange octanol-tampon phosphate 0,1 M selon la méthodologie décrite par Kung (11) alors que celui du composé 2 est de 2,2.

L'espèce marquée 2 (I) ne présente au niveau cérébral qu'un phénomène de "wash-out" : 60 minutes après l'injection, 0,02 % de la dose injectée sont fixés par g de cerveau et le rapport C/S (radioactivité cérébrale/radioactivité sanguine) est inférieur à l'unité.

Par contre la concentration radioactive cérébrale de l'espèce 2 (II) de 1,8 %, 2 minutes après l'injection est encore supérieure à l'unité 1 heure plus tard avec un rapport C/S de 39. Cette concentration reste sensiblement en plateau jusqu'au temps 6 h avec un rapport C/S \approx 50. Les valeurs observées avec l'Adiphénine ^{14}C correspondante sont de 0,22 %, C/S = 4 à 1 h et 0,15 %, C/S = 5 6 h après l'injection.

La différence de cinétique et de distribution intra-cérébrale entre les deux espèces marquées objective un métabolisme rapide de la molécule 2 par coupure de la liaison ester.

Une étude du métabolisme tissulaire cérébral est actuellement en cours et doit nous permettre d'identifier l'entité responsable du marquage cérébral. En effet une concentration en plateau pendant environ 6 h et un rapport C/S qui augmente jusqu'à 50 sont des éléments très favorables à une utilisation en imagerie médicale pour des études fonctionnelles cérébrales.

PARTIE EXPERIMENTALE

Indications Générales

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler. Les spectres I.R. sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 398. Les spectres RMN du proton sont effectués sur un appareil JEOL C 60 HL (solvant CDCl₃); les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS utilisé comme référence interne (s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet ou massif).

L'évolution des réactions, la pureté des échantillons, sont déterminées en chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice Merck 60 F 254. Les CCM des produits radioactifs sont analysées sur un lecteur Berthold LB 2832. La radioactivité des échantillons tissulaires est mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide PACKARD TRI-CARB 4530.

Le précurseur radioactif Na ¹⁴CN a été fourni par le service des molécules marquées CEN, Saclay, France.

Préparation de 2 (I)* Acide Phénylacétique-¹⁴C :

A une solution agitée de 3 mM de Na ¹⁴CN (15,7 mCi) dans 3 ml d'eau, on ajoute 3,75 mM de chlorure de benzyle et 0,3 mM de catalyseur de transfert de phase. Après 2 heures à 100°, on additionne 5 ml d'eau glacée et on extrait le milieu réactionnel à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée. Le résidu est repris par 10 ml de KOH à 50 % et maintenu 3 heures à reflux. On extrait la solution alcaline à l'éther (3 x 10 ml) puis traite la phase aqueuse par HCl jusqu'à pH acide et extrait à l'éther. La phase organique est séchée, évaporée à sec, sous pression réduite. L'acide phénylacétique-¹⁴C ainsi obtenu (2,46 mM - Rdt 82 %) est utilisé sans purification ultérieure.

F = 73 - 75°C (Litt (11) F = 76 - 77°C)

Activité spécifique : 5,2 mCi/mM ; 19,2.10⁷ Bq/mM.

* Phénylacétate de diéthylamino-2 éthyle-¹⁴C (II) :

A la solution de 2,46 mM d'acide phénylacétique-¹⁴C dans 20 ml d'acétonitrile, on ajoute 2,96 mM de chlorhydrate de N,N-diéthylchloro-2 éthylamine et 3 mM de K₂CO₃, et maintient à reflux pendant 12 heures. On évapore le solvant sous pression réduite, hydrolyse, extrait au chloroforme, et sèche la phase organique sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (Merck, 230400 mesh), éluant : CHCl₃ - EtOH 2 % v/v.

Rendement : 68 % par rapport à l'acide phénylacétique- ^{14}C

CCM (CHCl_3 -EtOH 10 % v/v) : $R_f = 0,40$ (pureté > 98 %)

IR : 1740 cm^{-1} ($-\text{C}-$)
 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array}$

RMN δ ppm : 0,98 (t, 6H, CH_3) ; 2,32-2,78 (m, 6H, CH_2 en α de l'azote) ; 3,57 (s, 2H, CH_2 benzylique) ; 4,10 (t, 2H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-$) ; 7,08-7,35 (m, 5H, aromatiques)

Chlorhydrate : $F = 100-102^\circ\text{C}$; activité spécifique : 5,2 mCi/mM.

Préparation de 2 (II)

* Chlorhydrate de N,N-diéthyl chloro-2 éthylamine- ^{14}C :

A une solution de 2 mM de chlorhydrate d'éthanolamine- ^{14}C (10) (10 mCi) dans 10 ml de THF, on ajoute 10 mM de bromure d'éthyle et 9 mM de K_2CO_3 . On chauffe 12 heures à reflux, puis filtre le THF, et traite le filtrat par HCl dans l'éther jusqu'à précipitation totale du chlorhydrate de diéthyléthanolamine. Celui-ci est isolé, après évaporation du solvant, avec un rendement quantitatif (1,98 mM). Après traitement par 2 ml de SOCl_2 et évaporation du chlorure de thionyle, on isole 1,95 mM (Rdt 98,5 %) de chlorhydrate de N,N-diéthylchloro-2 éthylamine- ^{14}C . $F = 209 - 210^\circ\text{C}$ (Litt (1) $F = 210^\circ\text{C}$). Activité spécifique : 5 mCi/mM. $18,5 \cdot 10^7$ Bq/mM.

* Phénylacétate de diéthylamino-2 éthyle- ^{14}C (III) :

Le processus utilisé est le même que celui décrit pour le marquage (I), en utilisant les quantités suivantes : 1,9 mM d'acide phénylacétique, 2 mM de K_2CO_3 et 1,95 mM de chlorhydrate de N,N-diéthyl chloro-2 éthylamine- ^{14}C . Rdt : 63 % par rapport à ce dernier .

Chlorhydrate : Activité spécifique : 5 mCi/mM. (pureté > 98 %)

Etude de la biodistribution chez le rat.

Des rats mâles de souche Wistar (180-200 g) Etablissements Depré reçoivent une injection dans une veine caudale, de 3 μmoles de composé- ^{14}C sous forme de chlorhydrate en solution saline. Les animaux sont sacrifiés à des intervalles de temps différents après l'injection. Le sang est prélevé par ponction cardiaque et différents organes sont excisés. Des aliquotes sont pesées et soumises à combustion dans un PACKARD OXIDIZER 306.

La quantité de radioactivité présente dans chaque tissu est exprimée en pourcentage de la dose injectée fixé par g de tissu et sous forme des rapports % de dose injectée/g de tissu qui reflètent plus précisément la sélectivité d'une % de dose injectée/g sang

molécule pour un organe.

Remerciements :

Nous remercions Mesdames GALLAIS, PAPON et RAPP pour leur collaboration technique, ainsi que Mesdames LEFRANCOIS et BAYLE pour leur participation à la préparation du manuscrit.

Ce travail a bénéficié d'une aide de la Ligue Nationale Française contre le Cancer (Comité du Puy-de-Dôme).

BIBLIOGRAPHIE

1. MADELMONT J.C. et MICHELOT J. - *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **16** : 877 (1979).
2. MICHELOT J., MADELMONT J.C., JORDAN D., MORNEX R., and MEYNIEL G. - *Xenobiotica* **11** :123 (1981).
3. MICHELOT J., MADELMONT J.C., ROUSSET B., LABARRE P., MORNEX R. and MEYNIEL G. - *Xenobiotica* **12** : 457 (1982).
4. MICHELOT J., MOREAU M.F., MADELMONT J.C., LABARRE P., and MEYNIEL G. - *J. Chromatogr.* **257** : 395 (1983).
5. MICHELOT J., MOREAU M.F., VEYRE A., LABARRE P., and MEYNIEL G. - *Eur. J. Drug. Metab. and Pharm.* **10** : 273 (1985).
6. MICHELOT J., MOREAU M.F., VEYRE A., LABARRE P., and MEYNIEL G. - *Biopharm. and Drug Disp.* **7** : 197 (1986).
7. RAPAPORT S.I., OHNOK, and PETTIGREW K.D. - *Brain Res.* **172** :354 (1979).
8. OLDENDORF W.H. - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **147** : 813 (1974).
9. HAYASHI N., TOGA T., TADA N., and AZUMA T. - *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **15** : 489 (1978).
10. MADELMONT J.C., PARRY D., GODENECHÉ D., DUPRAT J. - *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **22** : 851 (1985).
11. KUNG H.F. and BLAU M. - *J. Nucl. Med.* **21** : 147 (1980).
12. VOGEL A.I. - *Practical Organic Chemistry (IIIe Edition)*, Longman, London (1956).