

SYNTHESES DU S 9490-3 : SEL DE TERBUTYLAMINE DE L'ACIDE {[CARBETHOXY-1 (1S) BUTYL AMINO] OXO-1 (2S) PROPYL } (2S, 3aS, 7aS) PERHYDRO INDOLE - CARBOXYLIQUE-2 [CYCLOHEXYL -¹⁴C-U] ,DU S 9780 : ACIDE { [CARBOXY-1 (1S) BUTYL AMINO] OXO-1 (2S) PROPYL } (2S, 3aS, 7aS) PERHYDRO INDOLE-CARBOXYLIQUE-2 [CYCLOHEXYL- ¹⁴C-U] , DU S 9490-3 [BUTYL-(3H-3,4) AMINO] ET DU S 9780 [BUTYL-(3H-3,4)-AMINO] A HAUTES RADIOACTIVITES SPECIFIQUES.

L. Pichat*, J. Tostain, J.M. Gomis, M. Coppo, A.M. Moustier.CEN Saclay 91191 Gif sur Yvette Cédex France

M. Vincent, G. Remond, B. Portevin, M. Laubie. Institut de Recherches SERVIER 11 rue des Moulineaux 92150 Suresnes France

SUMMARY

Synthesis of S 9490-3 [U-¹⁴C-cyclohexyl] 1- {[(2S) 2 - [(1S) 1 - carbethoxybutyl] amino] 1- oxopropyl} (2S, 3aS, 7aS) perhydroindole-2-carboxylic acid terbutylamine salt 1 and S 9780 [U-¹⁴C-cyclohexyl]1- {[(2S) 2 - [(1S)1- carbethoxybutyl] amino]1- oxopropyl} (2S, 3aS, 7aS) perhydroindole-2-carboxylic acid and of [3,4-³H-butylamino] S 9490-3 and [(3,4-³H-) butylamino] S 9780, potent inhibitors of angiotensin converting enzyme at very high specific radioactivities.

[U-¹⁴C] Aniline 3 with a specific activity of 120 mCi / mM was converted in a one pot reaction into the [U-¹⁴C] phenyl hydrazone of ethyl pyruvate 6 via [U-¹⁴C] phenyl diazonium chloride 4 in a 66 % overall yield. Cyclization of 6 with PPA in xylene gave [U-¹⁴C] phenyl 2-carbethoxy indole 7 in a 39.5 % yield. Catalytic hydrogenation of 7 in the presence of platinum gave [U-¹⁴C-cyclohexyl] (RS) - 2- carbethoxy perhydroindole

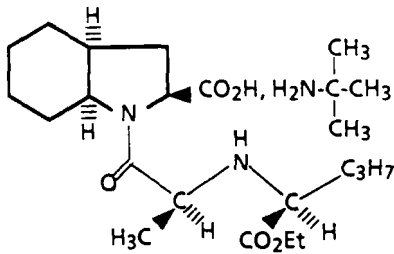
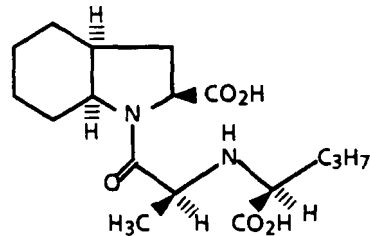
8 which was saponified to the corresponding acid 10 which was reesterified to the benzyl ester 11. Racemic 11 was condensed with N - [(S) 1 - carbethoxybutyl] (S) alanine in presence of DCC and 1 - hydroxy - 1 benzotriazole. The resulting 12 was separated from the mixture of isomers by a silicagel column chromatography. [U-¹⁴C - Cyclohexyl] S 9490-3 1 was obtained from 12 by hydrogenolysis in a 1.7 % overall yield from [U-¹⁴C] aniline. [U-¹⁴C Cyclohexyl] - S 9780 2 was made in a 50 % yield by mild saponification of : 1.

Cyanoborohydride reductive amination of pyruvic acid with ethyl (S) C - allylglycinate gave a mixture of epimers 15 and 16 from which [N - [(S) 1 - ethoxycarbonyl - 3 - butenyl] - (S) alanine 15 was isolated. The latter condensed with 2 - t - butyloxycarbonyl (2S, 3aS, 7aS) perhydroindole 17 gave 18, which on hydrochloric acid hydrolysis gave 1 - {[(2S) 2 - [(1S) 1 - carbethoxy - 3 - butenyl] amino } - 1 - oxopropyl } (2S, 3aS, 7aS) perhydroindole - 2 - carboxylic acid 13 a dehydro analog of S 9490. Tritiation of 13 with tritium gas in the presence of Pd/C in THF gave [3,4 - ³H - butylamino] (S) 9490-3 with a specific activity of 52 Curies /mM. Saponification of a fraction of [³H] S 9490-3 gave [3,4 - ³H - butylamino] S 9780 with a specific activity of 52 Curies / mM in low yield.

Key words : ¹⁴C Fischer Indole synthesis, Perhydroindoles, Chromatographic Separations of Diastereoisomers, Tritiations.

Le composé S 9490-3 1, sel de terbutylamine de l'acide {[carbéthoxy-1 (1S) butylamino] oxo-1 (2S) propyl } (2S,3aS,7aS) perhydroindole carboxylique-2, abrégé (imparfaitement) en sel de terbutylamine de l'acide N-(éthoxycarbonyl)-1 butylalanyl perhydroindole carboxylique, appartient à la classe des antihypertenseurs agissant principalement par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (EC. 3.4. 15-1). L'angiotensine II étant douée de propriétés vasoconstrictrices puissantes, l'inhibition de sa formation entraîne une baisse de tension artérielle observée chez les malades hypertendus. Le composé S 9490-3 est très actif par voie orale à faible dose chez différentes espèces animales (rat, chien, cobaye) et chez l'homme. Son action est prolongée. Par exemple, une heure après administration par voie orale au chien éveillé de 1 mg /kg de S 9490-3, 90 % de

l'activité de l'enzyme de conversion sont inhibés. Après 24 à 30 heures, cette inhibition est encore de 40 %, (2). En fait, le S 9490-3 est une "prodrogue", la forme biologiquement active est le diacide dicarboxylique S 9780 2 formé in vivo par action d'estérases.

S 9490-3 : 1S 9780 : 2

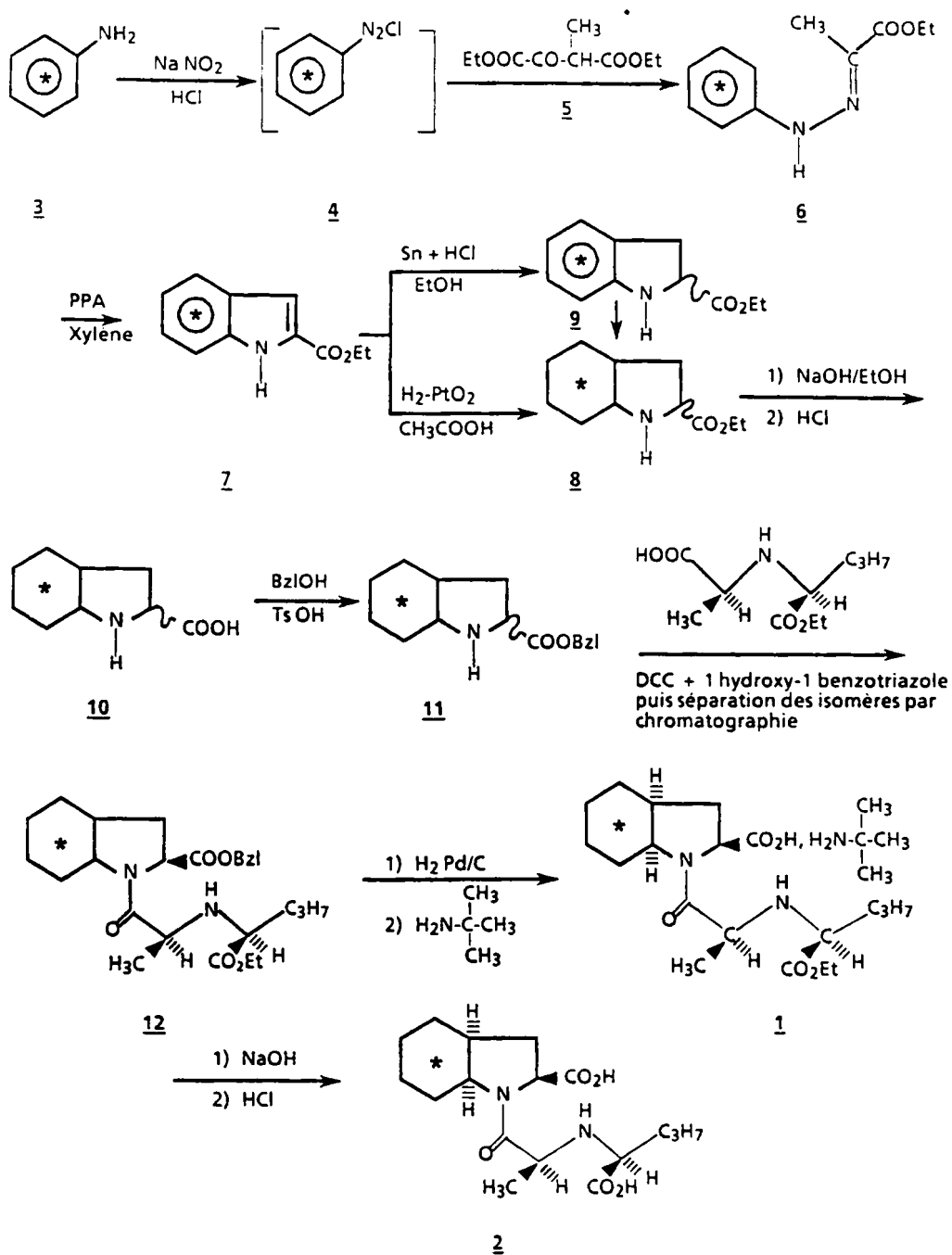
Afin de réaliser les études de pharmacocinétique et de biodisponibilité du S 9490-3, nous avons synthétisé quatre composés radioactifs : le S 9490-3 et le S 9780 marqués respectivement au carbone 14 et au tritium.

S 9490-3 [cyclohexyl-¹⁴C - U] et S 9780 [cyclohexyl-¹⁴C - U]

Le S 9490-3 marqué au ¹⁴C étant destiné à des études de pharmacocinétique, de biodisponibilité et de métabolisme, il importait que le marquage soit dans des positions de la molécule peu sensibles au catabolisme. D'autre part, la grande activité biologique de ce composé, à très faibles doses, imposait une radioactivité spécifique aussi élevée que possible, de l'ordre de 100 mCi / mmol. D'où la nécessité de marquer plusieurs atomes de carbone. Compte tenu de ces nécessités d'utilisation et des difficultés de synthèse, notre choix s'est porté sur le marquage uniforme au ¹⁴C du noyau cyclohexyle du groupe perhydroindole.

Les diverses étapes de la synthèse sont rapportées dans le schéma 1.

L'aniline (¹⁴C-U) 3 (4) (5) (6) est transformée en chlorure de phényl (¹⁴C-U) diazonium 4 qui est ensuite condensé in situ (7) avec l'éthoxalyl propionate d'éthyle 5 (8) pour donner la phényl hydrazone [¹⁴C - U] du pyruvate d'éthyle 6 avec un rendement global



SCHEMA 1

de 66 %. La cyclisation de cette dernière par l'acide polyphosphorique, en présence de xylène comme solvant (9), fournit l'éthoxycarbonyl-2-indole [phényl ^{14}C -U] 7 avec un rendement radioactif de 39,5 %. Cette technique nous a donné de meilleurs résultats que celle (10) utilisant le mélange acides acétique-sulfurique comme réactif de cyclisation.

Initialement nous avons prévu de préparer le (RS) éthoxycarbonyl-2 perhydroindole 8 en deux étapes (3). La réduction de 7 par l'étain et l'acide chlorhydrique (18) conduit à la (RS) - éthoxycarbonyl - 2 - indoline [phényl ^{14}C - U] 9 avec un rendement radioactif de 60 %. L'hydrogénation catalytique de cette indoline 9 en présence de palladium donne 8 avec un rendement de 50 %. De meilleurs résultats ont été obtenus par l'hydrogénation catalytique de 7, en une seule étape en présence de platine pour donner l'éthoxycarbonyl-2-perhydroindole [cyclohexyl- ^{14}C - U] 8 avec un rendement radioactif de 70 %.

En 1987 des chercheurs américains (17) ont préparé 8 non radioactif par l'hydrogénation de 7 en présence de rhodium / C dans l'acide acétique.

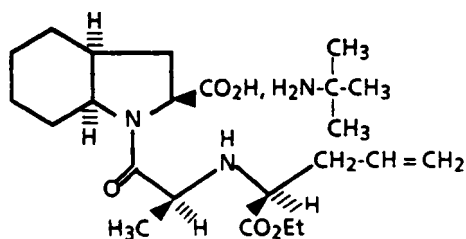
L'ester 8 a ensuite été saponifié en acide 10 qui a été réestérifié par l'alcool benzylique en présence d'acide p. toluènesulfonique pour donner 11. Plutôt que de tenter la séparation des énantiomères de 8, ou 10, ou 11 nous avons préféré utiliser dans la suite de la synthèse le benzyloxy-carbonyl-2 perhydroindole racémique 11 condensé avec la N - [(S) carbéthoxy - 1 butyl (S)] alanine puis effectuer la séparation des diastéréoisomères de l'ester benzylique du S 9490 ainsi formé. Le S 9490-3 est un "pseudotripeptide", or la littérature rapporte (12) (13) (14) des exemples de séparations faciles de diastéréoisomères de dipeptides par CCM, ce qui faisait penser que par analogie la séparation des diastéréoisomères de l'ester benzylique de S 9490 par CCM ou chromatographie colonne pouvait être possible. Les diastéréoisomères de l'ester benzylique du S 9490 ont été séparés par chromatographie sur colonne de silice. L'acide 1 a été obtenu par hydrogénéolyse de 12 et isolé sous forme de sel de t-butylamine S 9490-3 (15 mCi), avec une radioactivité spécifique de 120 mCi / mmol, et une pureté radiochimique supérieure à 99 %, soit un rendement global de 1,7 % par rapport à l'aniline [^{14}C - U] mise en oeuvre.

Une fraction de 1 a été saponifiée en S 9780 2 avec un rendement de 50 %, une radioactivité spécifique de 120 mCi / mmol et une pureté radiochimique supérieure à 99 %.

S 9490-3 [butyl (3H-3,4) amino] et S 9780 [butyl (3H-3,4) amino]

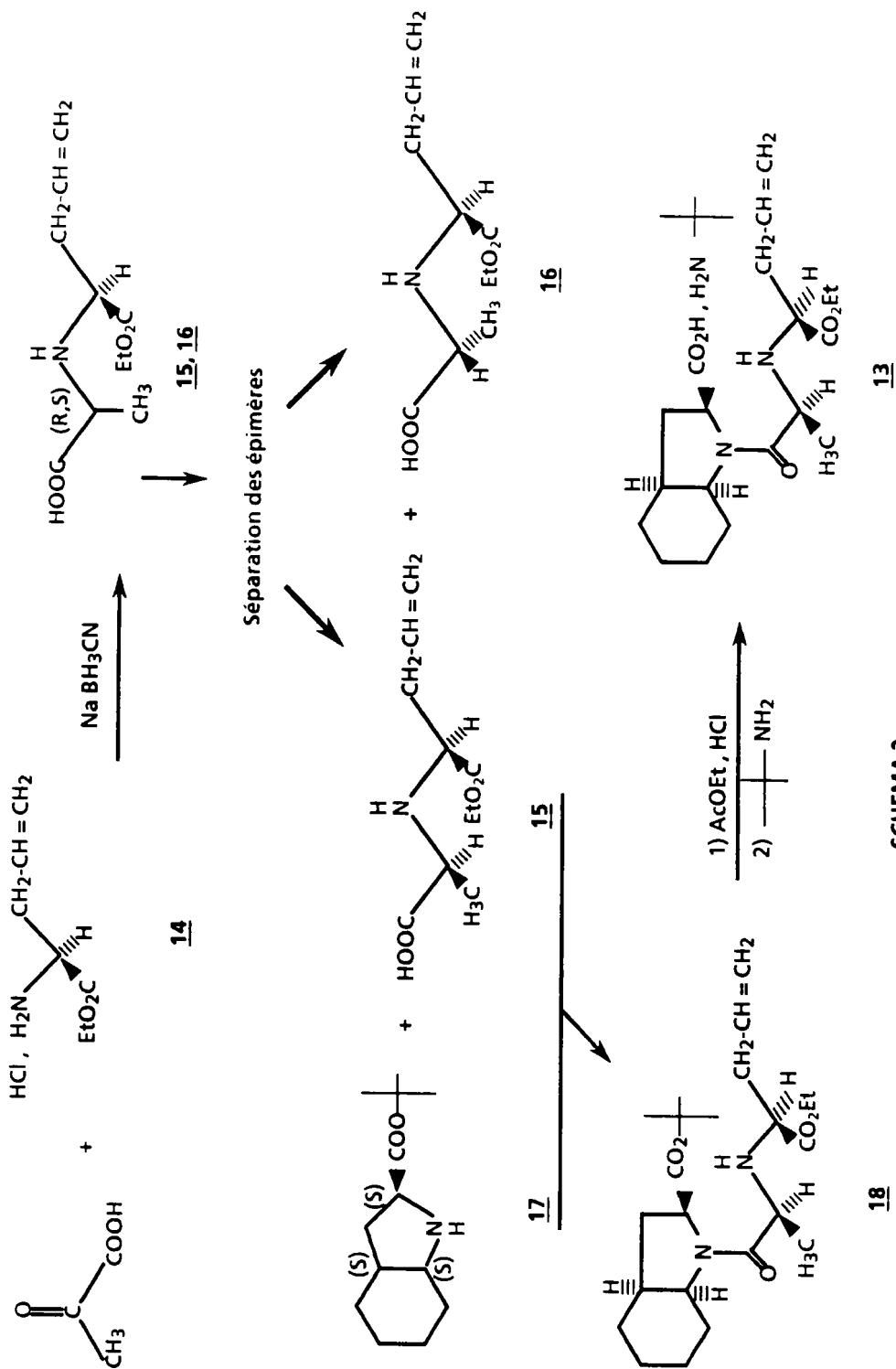
La préparation des composés S 9490-3 et S 9780 tritiés avait pour objectif la mise au point de dosages radioimmunologiques. De plus, ces composés étaient destinés à des études de pharmacocinétique, complémentaires de celles effectuées avec le S 9490-3 et le S 9780 marqués au ¹⁴C dans le noyau perhydroindole. Il convenait donc de marquer, en des positions chimiquement et biologiquement non labiles, la chaîne carbéthoxy butylamino-oxopropyle avec le tritium à une radioactivité spécifique de l'ordre de 50 Ci / mmol. Une méthode idéale de préparation des composés tritiés consiste en la réduction catalytique par le tritium d'un précurseur éthylénique (ou acétylénique) approprié dans lequel toutes les autres fonctions, avec la stéréochimie souhaitée, sont présentes, de manière à ce que la synthèse radioactive ne comporte plus que l'opération d'hydrogénation catalytique avec le tritium (15).

Le précurseur : (2S, 3aS, 7aS) [N - (S) éthoxycarbonyl - 1 butène - 3 yl -] - (S) alanyl-1 carboxy-2 perhydroindole, sel de terbutylamine 13 remplit ces conditions.



13

Ce produit a été synthétisé (schéma 2), à partir de (S) C-allylglycine commerciale par une route similaire à celle décrite pour le S 9490-3 (3). L'amination réductive selon Borch du produit de condensation de l'acide pyruvique avec le (S) C-allylglycinate d'éthyle 14 utilisant le cyanoborohydrure de sodium donne un mélange d'épimères [N - (S) éthoxycarbonyl - 1 butène - 3 yl -] - (S) alanine 15 et N - [(S) éthoxycarbonyl - 1 butène - 3 yl -] - (R) alanine 16.



SCHEMA 2

Le composé 15 est isolé par cristallisation des chlorhydrates. La configuration de 15 a été attribuée par hydrogénation catalytique d'une fraction de chacun des épimères et comparaison avec les épimères (S,R) et (S,S) de la N - [(S) éthoxycarbonyl - 1 butyl - (S) alanine que nous avons antérieurement décrite (3). L'épimère (S,S) pur est ensuite condensé avec le (2S, 3aS, 7aS) t-butyloxycarbonyl -2 perhydroindole 17 en présence d'hydroxybenzotriazole et de dicyclohexylcarbodiimide pour donner 18 avec un rendement de 82 %. Ce dernier est ensuite hydrolysé sélectivement en 13 et isolé sous forme de sel de t-butylamine avec un rendement de 60 %. Nous avons vérifié par des méthodes physicochimiques et biologiques (3) que l'hydrogénation catalytique d'un échantillon de 13 fournit bien le S 9490-3 identique en tous points au S 9490-3 préparé comme décrit dans (3).

L'hydrogénation catalytique (Pd/C) avec le tritium, dans le THF, a fourni le S 9490-3 [butyl(3H-3,4)amino] avec une radioactivité spécifique 52 Ci/mmol mesurée par spectrométrie de masse. La R.M.N. a permis de déterminer que 30 % de tritium est en position 3 et 70 % en position 4 du groupe butylamino. La pureté radiochimique contrôlée par CLHP et CCM est supérieure à 99 %. La saponification d'une fraction de S 9490-3-(³H) conduit au S 9780 [butyl (³H-3,4) amino] avec un rendement de 2,8 % après plusieurs purifications.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres I.R. ont été réalisés sur un appareil PERKIN-ELMER 682. Les spectres RMN du proton ont été réalisés sur un appareil PERKIN-ELMER R 12 B et ceux de RMN-³H ont été obtenus (16) sur un appareil FT-80 VARIAN 80 MHz. Les spectres de masse ont été obtenus sur un appareil Varian CH7. Les analyses par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ont été effectuées sur un appareil Waters, ou sur un appareil Dupont.

S 9490-3 [cyclohexyl -¹⁴C-U] et S 9780 [cyclohexyl -¹⁴C-U].

- Phényl hydrazone (¹⁴C-U) du pyruvate d'éthyle 6.

A 1400mCi d'aniline (¹⁴C-U) (11,7 mmol, radioactivité spécifique 120 mCi / mmol) en solution dans 3 ml de HCl 6N, on ajoute goutte à goutte une solution de 840 mg de nitrite de sodium dans 1,5 ml d'eau distillée, en maintenant la température à + 5°. On

agite pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite tamponné par addition d'une solution de 8 g d'acétate de sodium dans un mélange d'eau (11 ml), -éthanol (1,5 ml). On ajoute ensuite 2,5 g d'éthoxalyl propionate d'éthyle (8). On laisse cristalliser pendant 15 heures à 5°C. Les cristaux sont essorés, lavés à l'eau, au pentane, puis de nouveau à l'eau pour fournir 920 mCi de 6. La pureté radiochimique contrôlée par CCM est supérieure à 99 % (silice Schleicher et Schüll F 1500 LS254 - solvant : dichlorométhane ; R_F : 0,56).

- (Ethoxycarbonyl-2 indole [phényl (¹⁴C-U)] 7.

On chauffe à 110°C pendant une heure le produit précédent 6 avec 12 g d'acide polyphosphorique en solution dans 40 ml de xylène anhydre. On hydrolyse, extrait à l'éther, lave à l'eau l'extrait étheré. L'éther est évaporé sous vide. On purifie 7 par chromatographie sur colonne de silice LiChroprep Si 60 (MERCK-DARMSTADT R.F.A.) (solvant : cyclohexane : 50 dichlorométhane : 50). La pureté radiochimique contrôlée par CCM (Silice Schleicher et Schüll F 1500 LS254 - solvant : cyclohexane : 50 dichlorométhane : 50 - R_F : 0,31) est de 99 %.

On a obtenu 362 mCi de 7.

Ethoxycarbonyl-2-indoline [cyclohexyl -¹⁴C-U] 9.

On opère selon (18) en faisant réagir une solution éthanolique saturée d'acide chlorhydrique de 7 sur de l'étain en granulés pendant 36 heures. Le produit 9 est purifié par chromatographie sur colonne de silice LiChroprep Si60 (MERCK-DARMSTADT-R.F.A.) solvant : dichlorométhane. Rendement 60 %.

(RS) - Ethoxycarbonyl - 2 perhydroindole [cyclohexyl -¹⁴C-U] 8

A - L'indoline 9 en solution dans l'éthanol est hydrogénée sous une pression de 1 bar, à température ambiante, en présence de Pd (5%) sur charbon comme catalyseur pendant 3 jours. Rendement 50 %.

B - L'éthoxycarbonyl-2 indole 7 en solution dans 20 ml d'acide acétique est hydrogéné à 60°C en présence de 200 mg d'oxyde de platine et sous une pression de 1 bar pendant 15 heures. Après filtration du catalyseur une CCM sur SiO₂ - solvant : dichlorométhane:90, méthanol:10-R_F:0,73 indique une pureté radiochimique de 70%.

(RS)-carboxy-2-perhydroindole [cyclohexyl -¹⁴C-U] 11

Le brut réactionnel précédent (procédé B) est repris par 10 ml de soude N et 10 ml d'éthanol. On agite à la température ambiante et on suit l'avancement de la saponification par CCM sur SiO₂ (- solvant : dichlorométhane : 90, méthanol : 10). Quand 8 a été entièrement saponifié on neutralise par HCl N et évapore à sec sous vide. On obtient 10 qui est utilisé sans purification.

Benzyloxycarbonyl - 2 - perhydroindole [cyclohexyl -¹⁴C-U] 11

Le produit précédent 10, est dissous dans 30 ml de toluène. On ajoute 1,5 g d'alcool benzylique et 1 g d'acide p.toluènesulfonique. L'eau est éliminée par distillation azeotropique selon Dean Stark. On évapore ensuite sous vide. On reprend par l'eau, extrait la solution aqueuse à l'éther. La phase aqueuse est neutralisée au bicarbonate de sodium, l'ester benzylique 11 est extrait à l'éther. La solution étherée est évaporée, le résidu séché(153 mCi).

{ [Carbéthoxy-1 (1S) butylamino] oxo-1(2S) propyl } (2S,3aS,7aS) benzyloxycarbonyl -2 perhydroindole [cyclohexyl -¹⁴C-U] 12.

Le produit 11 ainsi obtenu est dissous dans 5 ml de DMF fraîchement distillé sur anhydride phosphorique. On ajoute une solution de 333 mg de N - (S) carbéthoxy-1 butyl (S) alanine dans 7 ml de DMF, puis 223 mg d'hydroxy-1 benzotriazole dans 7 ml de DMF anhydre et enfin 315 mg de dicyclohexylcarbodiimide dans 5 ml de chloroforme anhydre. On agite le mélange sous atmosphère d'azote, à température ambiante pendant 24 heures. On évapore à sec sous vide, reprend par 30 ml d'éther, filtre la dicyclohexylurée formée. Le filtrat est lavé par 10 ml d'eau distillée, puis par 2 fois 10 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium et de nouveau à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

La séparation des isomères est réalisée sur colonne de silice Si 60 (MERCK, DARMSTADT) solvant : chloroforme : 95, acétone : 5.

La pureté radiochimique (≥ 99 %) de l'isomère :(2S, 3aS, 7aS) 12 est contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silice.(Solvant : chloroforme : 95,

acétone : 5 - R_f : 0,64). Dans les mêmes conditions de CCM l'isomère :(2R, 3aR, 7aR) a un R_f : 0,51.

La pureté radiochimique est également contrôlée (≥ 99 %) par CLHP colonne ZORBAX SIL (5-7 μ) (Dupont - USA) - Solvant : isooctane : 95, éthanol : 5, eau : 0,2 - Débit : 2 ml / min. Temps de rétention de l'isomère :(2S, 3aS, 7aS) 12 : 8,4 min.

Radioactivité totale : 35 mCi.

S 9490-3 [cyclohexyl -¹⁴C-U] 1

Le produit précédent 12 est mis en solution dans 20 ml d'éthanol anhydre. On ajoute 30 mg de catalyseur Pd (10 %) sur charbon puis hydrogène pendant 2 heures à la température ambiante sous une pression de 1 bar. On filtre le catalyseur et au filtrat on ajoute 4 gouttes de t-butylamine. La solution est concentrée à environ 0,5 ml sous vide ; on ajoute 10 ml d'acétonitrile et laisse cristalliser à + 5°C pendant 15 heures. On essore les cristaux formés et les lave avec 0,5 ml d'acétonitrile à + 5°C.

La pureté radiochimique ≥ 99 % est contrôlée par radiochromatographie en CCM - solvants : a) chloroforme : 80,; méthanol : 20 , acide acétique : 2 - b) chloroforme : 75, éthanol : 25.

Le produit 1 (15 mCi) est obtenu.

La radioactivité spécifique, mesurée par spectrométrie de masse, est de 120 mCi / mmol.

S 9780 [cyclohexyl -¹⁴C-U] 2

Une fraction de S 9490-3 [cyclohexyl -¹⁴C-U] :5 mCi (0,042 mmol) est traitée par 1,5 ml de soude N pendant 15 heures à la température ambiante. On concentre ensuite sous vide afin d'éliminer la t-butylamine et neutralise par l'acide chlorhydrique 0,1 N ; 2 est alors purifié sur une colonne de Séphadex G10 en éluant à l'eau.

On obtient 2,50 mCi de 2 de pureté radiochimique ≥ 99 % contrôlée :

a) par CCM sur silice - solvants :

- 1 - chloroforme : 60, méthanol : 30, acide acétique : 10.
- 2 - dioxanne : 80, eau : 20, acide acétique : 2.
- 3 - n - butanol : 60, acide acétique : 20, eau : 20.

- b) par CLHP sur colonne ZORBAX ODS (Dupont - USA) solvant : méthanol + acide méthane sulfonique 5 % : 65, eau + acide méthane sulfonique 5 % : 35.

S 9490-3 [butyl (3H-3,4) amino] et S 9780 - [butyl (3H-3,4) amino]

N - [(S) ethoxycarbonyl-1 butène-3 yl] - (S) alanine 15

A 22 g (0,25 mol) d'acide pyruvique fraîchement distillé dissous dans 100 ml d'une solution tampon phosphate à pH 7 on ajoute 7,7 g (43,4 mmol) de chlorhydrate de (S)-C-allylglycinate d'éthyle et on ajuste à pH = 7 par de la soude 10N. On introduit en 10 minutes 6,1 g (97 mmol) de cyanoborohydrure de sodium puis on agite 18 heures en maintenant le pH à 7 par addition d'une solution tampon pH 4. On acidifie à pH 1 par de l'acide chlorhydrique 4N et agite 1 heure (dégagement d'HCN : accepteur KOH et hotte ventilée). Après chromatographie sur résine DOWEX 50 H⁺ (élution eau - pyridine 90 - 10) et évaporation sous-vide des éluats on recueille 7 g du mélange des épimères 15 et 16 (rendement 75 %). Ce mélange est agité 1 heure avec 100 ml d'acétate d'éthyle chlorhydrique 3N puis on laisse reposer 15 minutes. On filtre et récupère 2,9 g de chlorhydrate de l'épimère (S,R). Le filtrat est évaporé. On repasse à la base sur résine DOWEX 50 H⁺, élution eau-pyridine (90-10) et on évapore les éluats. On reprend le résidu par 10 ml d'éther, essore les cristaux et lave 3 fois par 30 ml d'acétonitrile; on recueille 2,6 g de N - [(S) éthoxycarbonyl-1 butène-3 yl] - (S) alanine. Dans l'éther et l'acétonitrile on récupère un mélange très enrichi en épimère (S,S). La pureté des épimères est contrôlée par CPV sur OV17 2m 5 % après silylation au BSA. [(@ 150°C). TR épimère (R,S): 5.40 ; (S,S): 6.10].

(2S,3aS,7aS) N - [(S) ethoxycarbonyl-1 butène-3 yl - (S) alanyl] - 1 terbutyloxycarbonyl-2 perhydroindole 18.

On additionne successivement et sous agitation en refroidissant par un bain eau-glace des solutions équimolaires dans 20 ml de DMF anhydre de 1,2 g (4,65 mmol) de N-(S) éthoxycarbonyl-1 butène-3 yl - (S) alanine, 1,06 g de (2S, 3aS,7aS) terbutyloxycarbonyl - 2 perhydroindole 17, 0,63 g d'hydroxybenzotriazole et 0,97 g de dicyclohexylcarbodiimide. On agite 24 heures en laissant remonter à température ambiante, filtre

la dicyclohexylurée (DCU) et on évapore. On reprend par 150 ml d'acétate d'éthyle, on filtre de nouveau la DCU, on lave 2 fois par 80 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium puis à l'eau jusqu'à neutralité. On sèche sur Drierite et évapore. Par chromatographie sur silice (éluant : chlorure de méthylène - éthanol 90-10) on recueille 1,6 g du produit utilisé tel que dans l'étape suivante (Rt : 82 %).

(2S,3aS,7aS) N-[(S) éthoxycarbonyl-1 butène-3 yl-(S)alanyl]-1 carboxy-2 perhydroindole - Sel de terbutylamine 13

On agite 18 heures à température ambiante une solution de 1,6 g (3,8 mmol) de (2S,3aS,7aS) N-[(S) éthoxycarbonyl-1 butène-3 yl-(S) alanyl] - 1 terbutyloxycarbonyl-2 perhydroindole 18, dans 25 ml d'acétate d'éthyle chlorhydrique 4N. On évapore, dissout dans 100 ml d'eau et extrait les insolubles par 50 ml d'éther éthylique. La phase aqueuse est amenée à pH = 4,5 par de la soude 1N et est extraite 3 fois par 80 ml de chlorure de méthylène. Les extraits organiques sont réunis, séchés sur Drierite et évaporés, on obtient une laque (0,9 g) que l'on redissout dans 30 ml d'acétonitrile. Par addition de 0,5 g de terbutylamine le sel précipite immédiatement, on filtre et lave à l'acétonitrile. On recueille 1 g du produit 13 (rendement = 60 %).

| | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|-------|---|------|---|------|
| Analyse élémentaire | : calculé % | C | 62,84 | H | 9,40 | N | 9,55 |
| | trouvé % | | 62,93 | | 9,32 | | 9,50 |

RMN (CDCl₃) : 1-2,6 ppm (m ; 12 H, CH₂ ; 6 H, CH₃ ; 1 H, CH ; 1 H, NH) .1,35 ppm (S ; 9 H, CH₃) - 4,25 ppm (Q ; 2 H, COOCH₂ CH₃) .3-4,5 ppm (m ; 4 H, CON-CH-CO, CONCH, NCH, NCOCH).4,9-5,4 ppm (m ; 2 H, C = CH₂) ; 5,4-6,1 ppm (m ; 1 H, CH =).6,2 ppm (m ; 3 H, NH₃ +).

IR (Suspension Nujol) : 3500-2000 cm⁻¹ (bande large NH₃ + et NH). 1730 cm⁻¹ (CO ester) 1640 cm⁻¹ (CO amide). 1570 cm⁻¹ (COO⁻).

S 9490-3 [butyl (3H-3,4) amino] 1

On utilise l'appareillage brièvement décrit dans (16) et (19). Le composé 13 (15,6 mg) en solution dans 3 ml de THF (fraîchement distillé) et 8,7 mg de Pd (10 %) sur charbon absorbent 5,2 ml de tritium(enrichissement isotopique 97 %). Au bout de 2 heures de

violente agitation, la catalyseur est filtré, rincé par 20 ml de THF. La solution THF est évaporée à sec sous vide. Le résidu est repris immédiatement par 10 ml d'eau distillée ; on évapore sous vide afin d'éliminer les tritium labiles. Cette opération est effectuée deux fois. On obtient environ 2 curies de 1 brut. La pureté radiochimique contrôlée par CCM sur plaque de SiO₂ est de 80 % avec le système de solvant A : CHCl₃ : 94, EtOH : 4, CH₃COOH : 2, et de 85 % avec le système B : CHCl₃ : 90, EtOH : 10, CH₃COOH : 2. Le produit brut 1 (500 mCi) est purifié par CCM sur une plaque analytique de SiO₂ avec le système de solvant A. Après autoradiographie, la bande correspondant au produit 1 pur est isolée et le produit désabsorbé de la silice par l'éthanol pour fournir le produit 1.

Contrôles de pureté radiochimique :

- La pureté radiochimique contrôlée par CCM sur Silicagel Merck F254 avec les systèmes de solvants A et B est supérieure à 99 %.
 - La pureté radiochimique mesurée par CLHP sur colonne Zorbax C8 avec le solvant : CH₃CN : 35, eau : 65, HClO₄ : 0,05 est de 99 %.
 - L'analyse par CLHP, après traitement au diazométhane de 1 montre la présence de 5 % d'isomère - colonne : Partisil-PX5-10/50- solvant : isooctane : 90, ethanol : 10.
- La radioactivité spécifique mesurée par spectrométrie de masse est de 52 Ci/mmol en bon accord avec la valeur mesurée : 51 Ci/mmol par détermination UV et mesure de la radioactivité par scintillation liquide.

S 9780 [butyl (3H-3,4) amino] 2

On dissout 250 mCi de S 9490-3 tritié (pureté radiochimique 99 %) dans 2 ml de soude 0,1 N et garde la solution à température ambiante pendant 72 heures. On évapore à sec sous vide et reprend immédiatement par HCl 0,1 N jusqu'à neutralité. Une radiochromatographie sur plaque de silice (- solvant A : dioxanne : 80, eau : 20, acide acétique : 2) montre une pureté de 60 %. Le S 9780 (3H) est purifié successivement :

- a) sur une colonne de DOWEX 50 W X 8 H⁺ (h = 600 mm, Ø = 15 mm), lavage de la colonne avec de l'eau jusqu'à pH 3 puis élution par un mélange eau : 90, pyridine : 10. Pureté radiochimique : 70 % (CCM-SiO₂ - solvant : A).

- b) par CCM préparative sur SiO₂ - solvant A.
- c) par CLHP - colonne Zorbax-SiL-solvant B: eau:90, acétonitrile:10, acide trifluoroacétique : 0,025 et obtient 7 mCi de S 9780 (3H).

Contrôles de pureté radiochimique :

- La pureté radiochimique contrôlée par CCM sur Silicagel Merck F 254 avec le système de solvant A ainsi qu'avec les systèmes de solvants C : (n - butanol : 60, acide acétique : 20), eau : 20 ; D : (chloroforme : 60, méthanol : 30 acide acétique : 10) est de 99 %.
- En CLHP - colonne Zorbax-SiL. Solvant B la pureté radiochimique est de 95 %.

REFERENCES

- 1 - Ondetti M.A. et Cushman D.W. in *Biochemical Regulation of Blood Pressure*- Editor R.L. Soffer, John Wiley and Sons, New York 1981, p. 165-206.
- 2 - Laubie M., Schiavi P., Vincent M. et Schmitt H. - *J. Cardiovascular Pharmacology* **6**, 1076-1081 (1984)
- 3 - Vincent M., Remond G., Portevin B., Serkiz B. et Laubie M.- *Tetrahedron Letters* **23**, 1677-1680 (1982)
- 4 - Noel J.P. et Pichat L.- *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **13**: 87 (1977)
- 5 - Noel J.P. et Pichat L.- *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **17**:833 (1980)
- 6 - Noel J.P., Pichat L., Rinbau V. et Forn J.- *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **19**:373 (1982)
- 7 - Gannon W.F., Benigni J.D., Dickson D.E. et Minnis L.- *J. Org. Chem.* **34**: 3002-3006 (1969)
- 8 - *Organic Syntheses Ed., Blatt A.H., John Wiley Sons, New York 1943, coll. Vol. II, 272*
- 9 - Guy A., Guette J.P. et Lang G. - *Synthesis* 222-223 (1980)
- 10 - Elks J., Elliott .D.F. et Hems A.- *J. Chem.Soc.* 629 (1944)
- 11 - Bricas E. et Nicot Cl.- *J. Chromatog.* **13** : 273-275 (1964)
- 12 - Van Heijenoort J. et Bricas E.- *Bull. Soc. Chim. France* 2828 (1968)
- 13 - Barooskian A.V., Lautenschleger M.J., Greenwood J.M. et Harris W.G. - *Anal. Biochemistry* **49** : 602-606 (1972)

- 14 - Wieland Th. et Bende H. - Chem. Ber. 98 : 504-515 (1965)
- 15 - Pichat L., In Synthesis and applications of isotopically labeled compounds 1985 - R.R. Muccino Editor, Elsevier, Amsterdam 133-138 (1986)
- 16 - Guillaumet G., Coudert G., Clement R., Ponchant P. et Pichat L. - J. Lab. Comp. Radiopharm. 23 : 825-835 (1986)
- 17 - Blankley C.J., Kaltenbronn J.S., Dejohn D.E., Werner A. Bennet L.R., Bobowski G., Krolls V., Johnson D.R., Pearlman W.M., Hoefle M.L., Essemburg A.D., Cohen D.M. et Kaplan H.R. - J. Med. Chem. 30 : 992-998 (1987)
- 18 - Corey E.J., Mc Cully et Sachdev H.S. - J. Am. Chem. Soc. 92 : 2476 (1970)
- 19 - Pichat L., Audinot M. et Lasceve G. - Bull. Soc. Chim. France, 1986 (1961)