Eur J Med Chem (1991) 26, 461–467
© Elsevier, Paris

Communication préliminaire

Synthèse et activité biologique de prodrogues de l'acide oxolinique

B Loubinoux[1], JL Colin, V Thomas[2]

[1]*Laboratoire de chimie organique IV, URA CNRS 486, Université Nancy I, Faculté des Sciences BP 239, 54046 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex;*
[2]*Vétoquinol, BP 189, 70204 Lure Cedex, France*

(Reçu le 19 février 1990; accepté le 3 décembre 1990)

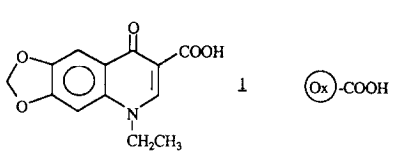
Résumé — Des phénols antiseptiques, des acides anti-inflammatoires et des motifs polyéthylèneglycol sont associés à l'acide oxolinique par une liaison fragile afin d'obtenir des prodrogues d'activité antibactérienne. Comparées au principe actif, certaines d'entre elles sont plus solubles dans l'eau, ont une durée d'action accrue et donnent des concentrations tissulaires et plasmatiques plus importantes.

Summary — Synthesis and biological activities of oxolinic acid pro-drugs. *Antiseptic phenols, anti-inflammatory acids and polyethyleneglycol moieties have been attached by labile bonds to oxolinic acid giving pro-drugs with anti-bacterial activities. Some of them are more soluble in water, exhibit a more sustained action in the time and give higher plasma and tissue concentrations compared with the free drug.*

oxolinic acid / pro-drugs / anti-bacterial activity / pharmacokinetic

Introduction

Les quinolones sont des antibactériens de synthèse bien connus [1]. L'acide oxolinique **1** qui appartient à la première génération de la famille et présente un spectre d'activité orienté vers les bactéries à Gram négatif et les staphylocoques, est une des quinolones les mieux implantées sur le marché vétérinaire. Nous sommes intéressés par la mise en œuvre de prodrogues de cet acide qui pourraient apporter au principe actif une meilleure solubilité, améliorer sa distribution et sa durée d'action dans l'organisme.



En premier lieu, cet article décrit la synthèse et quelques propriétés biologiques de composés susceptibles de conférer à l'acide oxolinique une meilleure biodisponibilité et une meilleure diffusion tissulaire, donc de le rendre plus performant dans le cas d'infections systémiques. Plutôt que d'associer à l'acide oxolinique des motifs sans intérêt biologique, nous lui avons adjoint des motifs possédant eux-mêmes une valeur thérapeutique (antiseptiques et anti-inflammatoires).

L'acide oxolinique possède une faible acidité et ses solutions aqueuses ne sont stables qu'à pH élevé ; il est de ce fait difficile de formuler celui-ci en solutions injectables. Dans une deuxième partie de notre travail, en nous appuyant sur les données de la littérature, nous avons introduit sur le substrat un motif polyéthylèneglycol (PEG) afin d'obtenir une bonne solubilité dans l'eau et les excipients pharmaceutiques classiques, tout en améliorant les concentrations tissulaires et la durée d'action.

Chimie

Synthèse associant acide oxolinique et phénols antiseptiques par une fonction O-acylhémiacétal

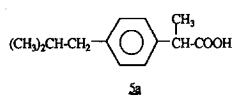
Comme les acylals, les *O*-acylhémiacétals sont des exemples types de prodrogues d'acides carboxyliques [2, 3]. Ils restituent à l'hydrolyse acide, alcool ou phénol et formaldéhyde. Nous avons associé à l'acide oxolinique le gaïacol, le thymol et le parahydroxybenzoate de méthyle par réaction entre les éthers chlorométhyliques de ces phénols **2** et l'oxolinate de sodium. La réaction est menée dans des conditions de

transfert de phase que nous avons utilisées et décrites précédemment pour d'autres substrats [4] (schéma 1); parallèlement, pour servir de référence lors des essais biologiques, l'ester de gaïacol **4** a été préparé selon le mode opératoire décrit ci-dessous, pour les esters de PEG (schéma 1).

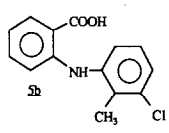
Les éthers chlorométhyliques aromatiques préparés selon Benneche et Undheim [5] sont utilisés sans purification, en mélange avec le sous-produit soufré **2'** qui se forme lors du piégeage de $Cl\text{-}C_6H_4\text{-}S\text{-}Cl$ par le cyclohexène.

Synthèse associant acide oxolinique et anti-inflammatoires (A.I-COOH)

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'association de l'acide oxolinique avec l'ibuprofène **5a** et l'acide tolfénamique **5b** dans le but de profiter de la diffusion tissulaire importante et de la bonne fixation protéique de ces anti-inflammatoires couramment utilisés en thérapeutique.



5a



5b

Plutôt que d'impliquer une liaison acylal entre les deux acides, liaison étudiée et brevetée avec d'autres substrats [6], nous avons utilisé l'acide parahydroxybenzoïque comme bras de liaison (schéma 2).

Parmi les méthodes décrites de chlorométhylation des acides [7–14], nous avons utilisé celle de Binderup afin de chlorométhyler les acides anti-inflammatoires (schéma 3).

Synthèses associant acide oxolinique et PEG

Nous avons choisi trois liaisons différentes pour effectuer le couplage: ester, amide, hydroxamate. Nous avons par ailleurs fait varier le nombre de maillons éthoxyde du PEG de 2 à 40.

Esters d'acide oxolinique et de PEG

Les esters **11a–e** ont été préparés à 25°C dans le chlorure de méthylène en présence de pyridine, par réaction entre un monoéther de PEG et un équivalent de chlorure de l'acide oxolinique **12**, obtenu à l'aide de chlorure de thionyle dans le benzène à reflux [15] (la même méthode nous a permis d'obtenir avec 60% de rendement l'oxolinate de gaïacol **4**). Seuls les PEG les plus légers (**11a**, **b**) conduisent au produit pur. Dans les autres cas, nous n'avons pu purifier totalement les esters. Après avoir vérifié l'absence d'acide oxolinique libre nous avons effectué une saponification du

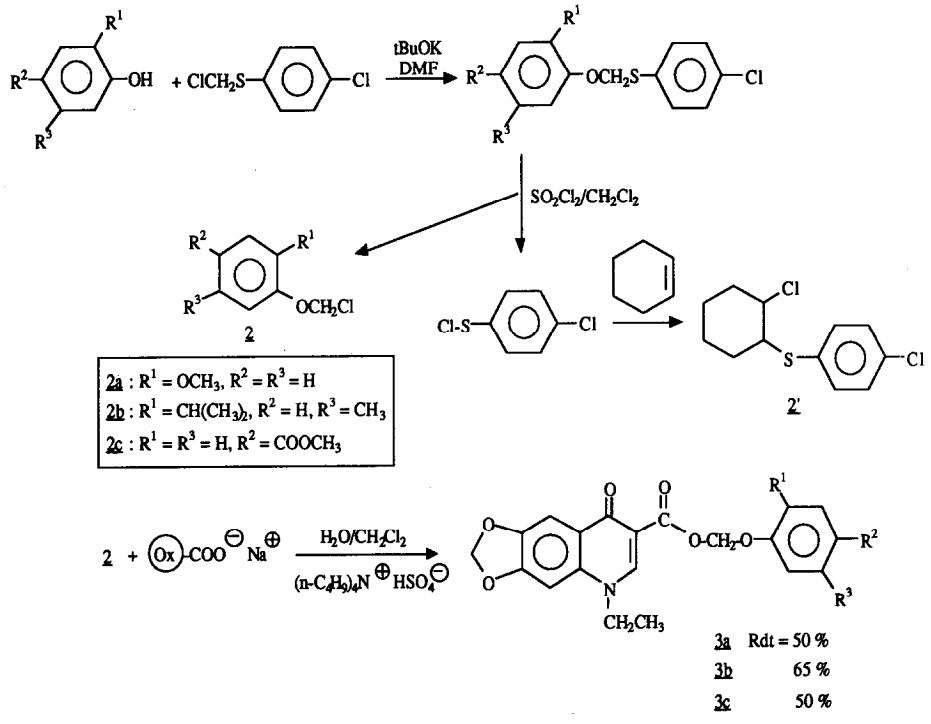


Schéma 1.

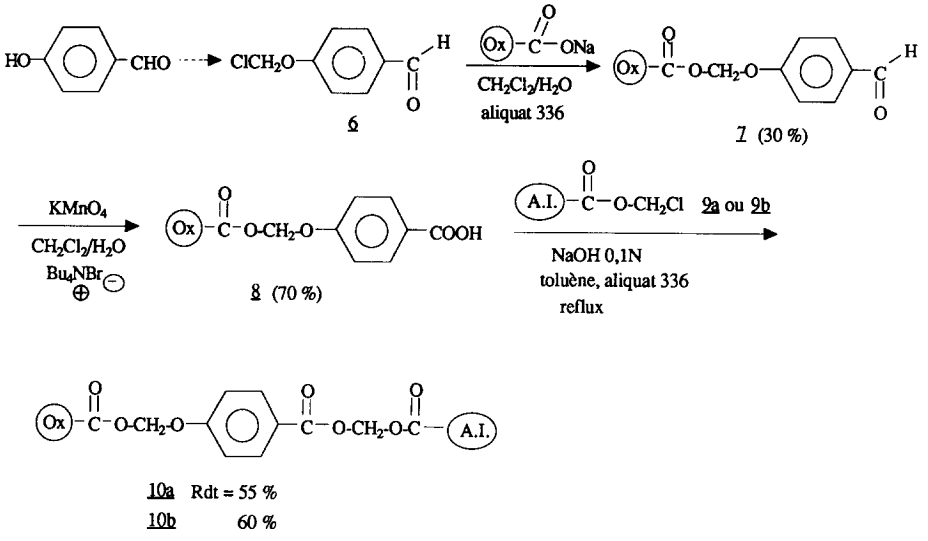


Schéma 2.

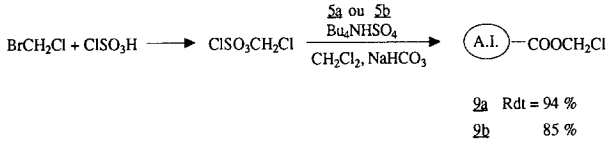


Schéma 3.

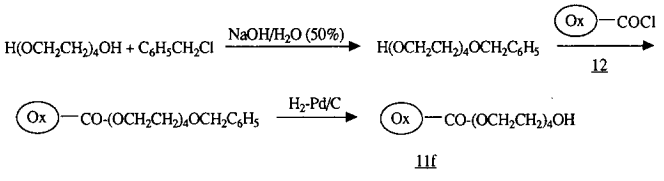


Schéma 4.

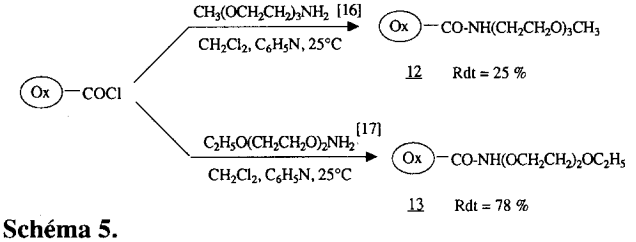
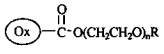


Schéma 5.

Tableau I.

Oxolinates de PEG 11 

	Masse molaire	PEG n	R	Rdt %	Taux de substitution S %
11a	134,2	2	CH_3CH_2	85	100
11b	164,2	3	CH_3	25	100
11c	"tétraglycol"	1<n<5		45	40
11d	~ 350	~ 7,2	CH_3	75	80
11e	~ 1900	~ 42,4	CH_3	70	80
11f		4	H	68	100
11g	~ 300	~ 6,4		70	85
11h	~ 1500	~ 33,7		65	63

produit et déterminé le taux de substitution par spectrométrie UV à 254 nm (tableau I).

Les esters **11g–h** ont été obtenus par réaction entre le chlorure de l'acide oxolinique et 0,5 équivalent de polyéthylèneglycol alors que **11f** a été préparé selon le schéma 4.

Amide et hydroxamate d'acide oxolinique et de PEG

Du fait de la fragilité de la liaison ester dans l'organisme, nous avons préparé d'autre part, une prodrogue à liaison amide (**12**) et une à liaison hydroxamate (**13**), ces deux liaisons étant plus résistantes à l'hydrolyse *in vivo*.

Tableau II. Solubilités de quelques dérivés de l'acide oxolinique dans des solvants usuels (mg/ml).

Solvant / Produit	Eau	Méthanol	DMF	DMSO	Chloroforme
3a	0,01	0,8	110	-	15
3b	0,01	20	230	-	70
3c	0,01	1	18	-	10
10b	0,25	0,25	80	250	250
11a	1	-	-	200	-
11b	1000	-	-	200	-
12	500	-	-	200	-

Solubilité des dérivés de l'acide oxolinique

Le tableau II rassemble quelques valeurs de solubilité que nous avons obtenues. Il apparaît, en particulier, que la présence de trois unités éthoxy suffit à conférer au produit une bonne solubilité dans l'eau. Ce résultat est intéressant car il devrait permettre une formulation aisée en solutions injectables ou une administration dans l'eau de boisson. Cette dernière est difficilement réalisable avec l'acide oxolinique lui-même du fait de son pK_a élevé et de son aptitude à former des complexes insolubles avec les cations.

Biologie

Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats décrits dans le tableau III montrent que les dérivés préparés sont des prodrogues devant être hydrolysées pour qu'une activité antimicrobienne se manifeste.

Études pharmacocinétiques

Pour apprécier le comportement cinétique des prodrogues préparées, nous avons mesuré les taux plasmatiques du principe actif à différents temps après une injection intramusculaire d'une dose correspondant à 20 mg/kg d'acide oxolinique (tableau IV). Une estimation rapide de la pénétration tissulaire de quelques produits, après une injection identique, nous a permis de constater qu'elle est très supérieure à celle de l'acide oxolinique pour les produits **3a** et **11a**.

La trop grande stabilité des liaisons amides et hydroxamate conduit à des taux plasmatiques très faibles pour **12** et **13**. L'intérêt des esters de PEG diminue lorsque le nombre d'unités éthoxy augmente.

À la suite de ces résultats, nous avons effectué des études pharmacocinétiques complémentaires du composé **11a** sur diverses espèces animales. Nous rapportons à titre d'exemple, un résultat obtenu chez le chien après administration par voie orale d'acide oxolinique et de la prodrogue **11a** avec laquelle la biodisponibilité du principe actif est sensiblement améliorée (schéma **6**).

Tableau III. Concentrations minimales inhibitrices de dérivés de l'acide oxolinique vis-à-vis de quelques bactéries (µg/ml).

Bactérie n°	Esch. Coli 10536	Staph. Aur. 6538	Salm. Gallinarum	Salm. 1204	Salm. 1461
3a	0,78	12,5	-	3,12	-
3b	3,12	25	-	25	-
3c	0,78	12,5	-	12,5	-
4	6,25	100	100	50	50
10a	3,12	50	100	50	50
11a	25	50	50	50	50
11b	6,25	100	100	25	25
Acide oxolinique	0,097	1,56	3,12	0,78	0,78

Tableau IV. Concentrations plasmatiques en acide oxolinique (µg/ml) chez le rat après injection intramusculaire unique d'une dose équivalente à 20 mg/kg d'acide oxolinique (sensibilité 0,20 µg/ml).

Temps (h)	1	3	6	24
n°				
3a	7,14	6,89	2,98	0,2
4	0,5	0,75	0,435	0,2
10b	0,2	0,2	0,2	0,2
11a	15,67	8,78	3,42	0,2
11c	9,43	4,3	2,63	0,2
11d	5,18	1,49	0,2	0,2
11e	7,62	0,3	0,2	0,2
Acide oxolinique	0,785	0,225	0,2	0,2

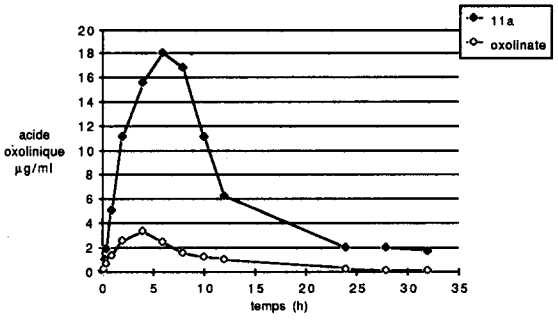


Schéma 6. Concentration en acide oxolinique dans le plasma après absorption de **11a** et d'oxolinate par voie orale à la dose de 15 mg/kg en équivalent acide oxolinique.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Synthèse des O*-acylhémiacétals* ***3a, b, c et 7***

Préparation du chloro-4 chlorométhylthiobenzène. 7,5 g de paraformaldéhyde et 50 ml de benzène sont agités à 25°C; 100 ml d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutés en 5 min. Après 10 min le mélange est porté à 30°C. 28,9 g de chloro-4 thiophénol sont alors additionnés goutte à goutte, la température étant maintenue à 40°C. Finalement, le mélange est agité pendant 2 h à 50°C. La phase organique est ensuite lavée à l'eau froide, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le produit ainsi obtenu est utilisé brut dans l'étape suivante.

Préparation des chloro-4 aryloxyméthylthiobenzènes. 100 mM du phénol considéré dans 30 ml de diméthylformamide sont ajoutés goutte à goutte à 100 mM de *t*–butylate de potassium dans 20 ml du même solvant. Lorsque tout est dissous, on ajoute 120 mM du produit chloré précédemment préparé. Le mélange est ensuite chauffé à 80°C pendant 3 h. Après retour à la température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. On ajoute alors de l'eau et on extrait à l'éther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite.

Préparation des éthers chlorométhyliques **2a**, **b**, **c** et **6**. 10 mM de chlorure de sulfuryle dissous dans 10 ml de dichlorométhane sont ajoutés goutte à goutte à 10 mM de l'*O,S*-acétal préparé précédemment, dissous dans 35 ml de dichlorométhane. Le mélange est ensuite agité pendant 10 min à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu a été utilisé dans l'étape suivante sans purification préalable.

Condensation de l'oxolinate de sodium sur les éthers chlorométhyliques. 12 mM d'oxolinate de sodium sont dissoutes dans 40 ml d'eau. 10 mM d'éther chlorométhylique et 10 mM d'aliquat 336 dans 40 ml de dichlorométhane sont ensuite ajoutés en une seule fois. Le mélange est maintenu sous forte agitation pendant 1 h à température ambiante. Les phases sont séparées. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le produit précipite après ajout d'éther. Il est essoré et séché au dessiccateur.

Produit ***3a***. M = 397,4; Rdt = 50%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,4 (t, 3 H, *J* = 6,7 Hz); 3,8 (s), 4,05 (q, *J* = 6,7 Hz), 5 H; 5,95 (s), 6,05 (s), 4 H; 6,8 (s, 1 H); 6,9–7,4 (m, 4 H); 7,25 (s, 1 H); 8,3 (s, 1 H). Analyse $C_{21}H_{19}NO_7$ (C, H, N).

Produit ***3b***. M = 423,5; Rdt = 65%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,1 (d, *J* = 6,7 Hz), 1,35 (t, *J* = 6,7 Hz), 9 H; 2,25 (s, 3 H); 3,3 (sept, 1 H, *J* = 6,7 Hz); 4,05 (q, 2 H, *J* = 6,7 Hz), 6,0 (s), 6,05 (s), 4 H; 6,7 (s, 1 H); 6,8–7,2 (m, 3 H); 7,8 (s, 1 H); 8,3 (s, 1 H). Analyse $C_{24}H_{25}NO_6$ (C, H, N).

Produit ***3c***. M = 425,4; Rdt = 50%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,4 (t, 3 H, *J* = 6,7 Hz); 3,85 (s), 4,15 (q, *J* = 6,7 Hz), 5 H; 6,0 (s), 6,05 (s), 4 H; 6,8 (s, 1 H); 7,2 (d, 2 H, *J* = 9,3 Hz); 7,9 (d, 2 H, *J* = 9,3 Hz); 8,1 (s, 1 H); 8,3 (s, 1 H). Analyse $C_{22}H_{19}NO_8$ (C, H, N).

Produit ***7***. M = 395,4; Rdt = 47% (3 étapes). RMN ($CDCl_3$) δ: 1,5 (t, 3 H, *J* = 6,7 Hz); 4,2 (q, 2 H, *J* = 6,7 Hz); 6,1 (s), 6,15 (s), 4 H; 6,9 (s, 1 H); 7,4 (d, 2 H, *J* = 8 Hz); 7,9 (s), 7,95 (d, *J* = 8 Hz), 3 H; 8,5 (s, 1 H); 10 (s, 1 H).

Synthèse des prodrogues ***10a et 10b***

Préparation du chlorométhylchlorosulfate. Un mélange d'acide chlorosulfonique (3 mM) et de bromochlorométhane (1,5 M) est chauffé à reflux pendant 3 h. Il est ensuite versé prudemment sur de la glace. Après extraction avec 100 ml de dichlorométhane, la phase organique est lavée avec 100 ml d'eau, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le produit pur est obtenu après distillation sous pression réduite. M = 165; Rdt = 30%; Eb = 45–50°C (9–10 mm Hg). RMN ($CDCl_3$) δ:5,96 (s).

Condensation des acides anti-inflammatoires sur le chlorométhylchlorosulfate. Un mélange de l'acide carboxylique (25 mM), d'eau (30 ml), de dichlorométhane (30 ml), de bicarbonate de sodium (75 mM) et d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium (2,5 mM) est agité à 20°C. Une solution de chlorométhylchlorosulfate (28 mM) dans du dichlorométhane (10 ml) est ensuite ajoutée goutte à goutte, la température étant maintenue inférieure à 30°C. Le mélange est agité pendant 30 min. La phase organique est alors séparée, lavée à la soude 0,1 N, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite.

Le produit ainsi obtenu est repris à l'éther, ce qui permet de précipiter l'agent de transfert de phase. Après évaporation de l'éther, on obtient le produit attendu, qui ne nécessite pas d'autre purification.

Produit ***9a***. M = 254,8; Rdt = 94%. RMN (CCl_4) δ: 0,90 (d, 6 H, *J* = 6,7 Hz); 1,5 (d, *J* = 6,7 Hz), 1,7 (sept, *J* = 6,7 Hz), 4 H; 2,45 (d, 2 H, *J* = 6,7 Hz); 3,75 (q, 1 H, *J* = 6,7 Hz); 5,7 (s, 2 H); 7,2 (s, 4 H).

Produit ***9b***. M = 310,2; Rdt = 85%. RMN (CCl_4) δ: 2,3 (s, 3 H); 5,9 (s, 2 H); 6,6–6,9 (m, 2 H); 7,0–7,5 (m, 4 H); 7,8–8,1 (m, 1 H); 9,2 (s, 1 H).

Oxydation de l'aldéhyde **7** en acide **8**. Une solution de l'aldéhyde **7** (14 mM) et de bromure de tétrabutylammonium (4,2 mM) dans 50 ml de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte sous forte agitation à une solution de permanganate de potassium (42 mM) dans 50 ml d'eau. Après 3 h d'agitation à température ambiante, on ajoute une solution de bisulfite de sodium de façon à dissoudre le dioxyde de manganèse formé. Les phases sont ensuite séparées. Un solide précipite après acidification de la phase aqueuse. Il est essoré et séché sous pression réduite.

Produit ***8***. M = 411,4; Rdt = 70%. RMN (DMSO D_6) δ: 1,3 (t, 3 H, *J* = 6,7 Hz); 4,3 (q, 2 H, *J* = 6,7 Hz); 6,0 (s, 2 H); 6,2 (s, 2 H); 7,1–8,1 (m, 6 H); 8,65 (s, 1 H).

Condensation du produit **8** sur les anti-inflammatoires chlorométhylés. L'acide chlorométhylé (5 mM) et l'aliquat 336 (1,25 mM) dissous dans 30 ml de toluène sont ajoutés en une seule fois à une solution de l'acide **8** dans 25 ml de soude 0,1 N. Le mélange est chauffé à reflux sous forte agitation pendant 4 h. Après refroidissement et filtration, les phases sont séparées. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous pression réduite. Le produit cristallise après ajout d'éther. Il est essoré sous pression réduite.

Produit ***10a***. M = 629,7; F = 119–122°C; Rdt = 55%. RMN ($CDCl_3$) δ: 0,5–1 (m, 6 H); 1,2–1,9 (m, 7 H); 2,3 (d, 2 H, *J* = 6,7 Hz); 3,7 (q, *J* = 6,7 Hz), 4,1 (q, *J* = 6,7 Hz), 3 H; 5,9–6,1 (m, 6 H); 6,8 (s, 1 H); 7–7,4 (m, 6 H); 7,8 (s, 1 H); 7,9–8,1 (m, 2 H); 8,4 (s, 1 H). Analyse $C_{35}H_{35}NO_{10}$ (C, H, N).

Produit ***10b***. M = 685,1; F = 134–136°C; Rdt = 60%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,4 (t, 3 H, *J* = 6,7 Hz); 2,3 (s, 3 H); 4,1 (q, 2 H, *J* = 6,7 Hz); 5,95 (s), 6,0 (s), 4 H; 6,2 (s, 2 H); 6,6–6,9 (m, 3 H); 7,1–7,5 (m, 6 H); 7,7 (s, 1 H); 7,9–8,3 (m, 4 H); 9,1 (s, 1 H). Analyse $C_{36}H_{29}ClN_2O_{10}$ (C, H, N).

Synthèse des esters ***11*** *de l'acide oxolinique*

Préparation du chlorure d'acide **12**. 13,1 g (0,11 M) de chlorure de thionyle sont ajoutés à une suspension de 26,1 g (0,1 M) d'acide oxolinique dans 100 ml de benzène sec. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 h. On ajoute, après refroidissement 250 ml d'éther de pétrole. Après essorage, on obtient 22 g de solide. F = 235–236°C. Le solide brut est mis en suspension

dans 500 ml de dichlorométhane. Le mélange est porté à reflux. Une filtration à chaud permet d'obtenir 24,3 g d'un solide brun. F = 245°C déc.

Condensation du guaiacol sur **12**. Le chlorure d'acide (36 mM) est ajouté en plusieurs fois à une solution de guaiacol (43,2 mM) dans 40 ml de pyridine anhydre. Le mélange est chauffé à 80°C pendant une nuit sous argon. En fin de réaction, le solvant est évaporé et le produit est dissous dans 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, à l'acide chlorhydrique 1 N, puis à l'eau. Elle est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le produit cristallise après ajout d'éther. Il est essoré sous pression réduite et séché au dessiccateur.

Oxolinate de guaiacol ***4***. M = 367,4; F = 250°C; Rdt = 60%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,35 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 3,65 (s, 3 H); 4,05 (q, 2 H, J = 6,7 Hz); 6,0 (s, 2 H); 6,7–7,2 (m, 5 H); 7,65 (s, 1 H); 8,45 (s, 1 H). Analyse $C_{20}H_{17}NO_6$ (C, H, N).

Condensation des polyéthylèneglycols

Le chlorure d'acide (10 mM) est mis en suspension dans 30 ml de dichlorométhane. On ajoute 11 mM de monoalkyléther de polyéthylèneglycol et 10 mM de pyridine. La réaction est exothermique. Le mélange est agité pendant 3 h, puis il est filtré. La phase organique est ensuite lavée successivement avec HCl 0,1 N (2 x 20 ml), H_2O (1 x 30 ml), NaOH 0,1 N (2 x 20 ml), H_2O (20 ml). Elle est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée sous pression réduite. Le produit précipite après addition d'éther. Il est essoré et séché au dessicateur à 25°C sous 1 mm Hg.

Les produits **11a** et **11b** sont obtenus purs après précipitation, essorage et séchage. Les autres esters préparés sont des mélanges du produit attendu et du polyéthylèneglycol de départ. Pour ces derniers nous avons vérifié l'absence d'acide oxolinique libre par chromatographie sur couche mince de silice (éluant: CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1; révélation à l'iode).

Nous avons déterminé le taux de substitution S du polyéthylèneglycol par spectrophotométrie UV à 254 nm après saponification du produit dans la soude aqueuse 0,1 N pendant 2 h à 80°C (tableau I).

Produit ***11a***. M = 377,4; F = 100–102°C (benzène); Rdt = 85%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,2 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 1,05 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 3,3–4,6 (m, 12 H); 6,1 (s, 2 H); 6,8 (s, 1 H); 7,8 (s, 1 H); 8,3 (s, 1 H). Analyse $C_{19}H_{23}NO_7$ (C, H, N).

Produit ***11b***. M = 407,42; F = 58–60°C (benzène); Rdt = 25%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,5 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 3,35 (s, 3 H); 3,5–4,6 (m, 14 H); 6,1 (s, 2 H); 6,85 (s, 1 H); 7,75 (s, 1 H); 8,3 (s, 1 H). Analyse $C_{20}H_{25}NO_8$ (C, H, N).

Synthèse de l'amide ***12***

Préparation de la méthoxyéthoxyéthoxyéthylamine [16]. Le chlorure de thionyle (3 éq) est ajouté lentement, à froid, sur le monoéther méthylique du triéthylèneglycol (1 éq) sous agitation magnétique. Après addition complète, le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après refroidissement, on neutralise à la soude 0,1 N et on extrait à l'éther.

Le produit obtenu (Rdt = 65%) donne une seule tache en chromatographie sur couche mince de silice (éluant AcOEt; révélation à l'iode).

60 mM de celui-ci sont ajoutées à une solution d'azidure de sodium (5 éq) et de chlorure de tétrabutylammonium (0,1 éq) dans 50 ml d'eau. Le mélange est chauffé à reflux, sous agitation, pendant 8 h. Après refroidissement, le produit est extrait à l'éther. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite.

L'azidure brut obtenu est dissous dans 40 ml de méthanol. Après ajout de palladium sur charbon à 10% (0,3 g), la suspension est agitée à température ambiante sous hydrogène. Lorsque la réaction est terminée, le mélange est filtré sur célite et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'amine obtenue est utilisée brute dans la condensation finale.

Condensation de l'amine sur le chlorure de l'acide oxolinique. La méthoxyéthoxyéthoxyéthylamine (30 mM) est dissoute dans 40 ml de pyridine sèche. Le chlorure de l'acide oxolinique (30 mM) est ajouté à la spatule en plusieurs fois. Le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 4 h. En fin de réaction le solvant est évaporé. Le produit est dissous dans 40 ml de dichlorométhane, lavé avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N, de l'eau, de la soude aqueuse 0,1 N et enfin de l'eau. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant CH_2Cl_2/CH_3OH, 95:5).

Produit ***12***. M = 406,44; F = 120–122°C; Rdt = 25%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,5 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 3,35 (s, 3 H); 3,5–3,9 (m, 12 H); 4,2 (q, 2 H, J = 6,7 Hz); 6,1 (s, 2 H); 6,85 (s, 1 H); 7,7 (s, 1 H); 8,55 (s, 1 H); 10,2–10,5 (m, 1 H). Analyse $C_{20}H_{26}N_2O_7$ (C, H, N).

Synthèse de l'hydroxamate ***13***

Préparation de l'éthoxyéthoxyéthylhydroxylamine [17]. Le chlorure de tosyle (110 mM) est ajouté à 0°C à une solution d'éthoxyéthoxyéthanol (100 mM) dans 50 ml de pyridine. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C pendant 1 h 30. Il est ensuite versé sur 100 ml de glace et 100 ml de dichlorométhane. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium, séchée sur Na_2SO_4 et concentrée sous pression réduite.

Le tosylate ainsi obtenu donne une seule tache en chromatographie sur couche mince de silice (éluant CH_2Cl_2/CH_3OH 95:5).

Un mélange du tosylate précédent (40 mM), de *N*-hydroxyphtalimide (40 mM) et de carbonate de sodium (40 mM) dans 50 ml de diméthylformamide anhydre est chauffé à 80°C pendant 15 h. En fin de réaction, le solvant est évaporé et le produit est repris à l'eau et à l'éther. Après trois extractions à l'éther, la phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le solide obtenu est lavé à l'hexane, essoré puis séché au dessicateur. F = 80–82°C; Rdt = 43%.

Il est dissous dans 30 ml d'éthanol contenant 2 équivalents d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est chauffé à reflux pendant 1 h. Après refroidissement, il est filtré et concentré sous pression réduite. On ajoute alors de l'éther, on filtre à nouveau et on concentre pour obtenir finalement un produit liquide présentant une seule tache en chromatographie sur couche mince de silice (éluant CH_2Cl_2/CH_3OH 9:1). Rdt = 100%.

Condensation de l'éthoxyéthoxyéthylhydroxylamine sur le chlorure de l'acide oxolinique. L'*O*-éthoxyéthoxyéthylhydroxylamine (10 mM) est ajoutée à une suspension du chlorure d'acide (10 mM) dans 30 ml de dichlorométhane. Un équivalent de pyridine est alors ajouté goutte à goutte. La température augmente et la dissolution est complète. Le mélange est maintenu sous agitation pendant une heure à température ambiante. Il est ensuite lavé à la soude aqueuse diluée, puis à l'eau. Il est séché sur $MgSO_4$ et concentré sous pression réduite. Le produit attendu cristallise après ajout d'éther. Il est essoré et séché au dessicateur.

Produit ***13***. M = 392,4; F = 136–138°C (benzène); Rdt = 78%. RMN ($CDCl_3$) δ: 1,2 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 1,5 (t, 3 H, J = 6,7 Hz); 3,3–4,5 (m, 12 H); 6,15 (s, 2 H); 6,9 (s, 1 H); 7,7 (s, 1 H); 8,55 (s, 1 H); 11,5 (m, 1 H). Analyse $C_{19}H_{24}N_2O_7$ (C, H, N).

Biologie

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées selon la méthode de dilution en bouillon de Mueller Hinton décrite par Bourdon et Marchal [18]. La gamme de concentrations d'antibiotique suit une progression géométrique de raison 2. Les CMI sont appréciées macroscopiquement après incubation à 37°C pendant 18 h environ.

Des lots de 8 rats de souche OF1 (200 g) ont permis la réalisation de l'étude cinétique. Une dose 20 mg/kg en équivalent acide oxolinique correspondant à un volume de 1 ml/kg a été administrée par voie intramusculaire. Deux animaux ont été sacrifiés à chaque temps de cinétique soit 1, 3, 6, 24 h après l'administration. Le sang, le foie, les poumons et du muscle ont été prélevés sur chacun des animaux sacrifiés. Le dosage des prélèvements a été réalisé par méthode microbiologique selon la technique de diffusion en milieu gélosé préconisée par la FDA avec *Escherichia coli* ATCC 10536 comme microorganisme test [19]. Le dosage plasmatique de l'acide oxolinique est quantitatif avec la réalisation d'une gamme étalon dont les concentrations sont les suivantes : 12,8 - 6,4 - 3,2 - 1,6 - 0,8 - 0,4 - 0,2 - 0,1 µg/ml. Le dosage tissulaire est qualitatif, chaque tissu est découpé en fractions de 10 mm de diamètre directement déposées sur la gélose. La limite de détection de la méthode est de 0,1 µg/ml.

Deux chiens Beagle mâles ont permis la réalisation de l'étude cinétique chez l'espèce canine. L'administration orale des deux produits a consisté à incorporer l'acide oxolonique ou l'ester **11a** dans une boulette de viande de façon à obtenir une posologie de 15 mg/kg en équivalent acide oxolinique. Des prélèvements sanguins ont été effectués à intervalles réguliers à la veine jugulaire. L'acide oxolinique plasmatique a été déterminé par la même méthode que celle décrite pour les rats.

Références

1 Albrecht R (1977) *Prog Drug Res* 21, 9
2 Daehne WV, Frederiksen E, Gundersen E, Lund F, March P, Petersen HJ, Roholt K, Tybring L, Godtfredsen WD (1970) *J Med Chem* 13, 607
3 Bodor N, Zupan J, Selk S (1980) *Int J Pharm* 7, 63
4 Tabbache S, Loubinoux B (1982) *Synthesis* 665
5 Benneche T, Undheim K (1983) *Acta Chem Scand* B37, 93
6 Lee KT (1976), DOS 2.534.869; *CA* (1973) 78, 29750
7 Ulich LH, Adams R (1921) *J Am Chem Soc* 43, 660
8 Neuenschwander M, Bigler P, Christen K, Iseli R, Kyburz R, Muehle H (1978) *Helv Chim Acta* 61(6), 2047
9 Euranto E, Kujanpää T (1961) *Acta Chem Scand* 15, 1209
10 Euranto E, Leppänen O (1963) *Acta Chem Scand* 17, 2765
11 Euranto E, Noponen A, Kujanpää T (1966) *Acta Chem Scand* 20, 1273
12 Daehne WV, Frederiksen EK, Godtfredsen WO, Rachlin S (1971) *Ger Offen* 2112057 , *CA* 76, P 3844
13 Jasys VJ (1982) *Eur Pat Appl* EP 61284, *CA* (1983) 98, P 179085e
14 Binderup E, Hansen ET (1984) *Synth Comm* 14(9), 857
15 Kaminsky D, Meltzer RI (1968) *J Med Chem* 2, 160
16 Gartiser T, Selve C, Mansuy L, Robert A, Delpuech JJ (1984) *J Chem Research* 292
17 Cavalleri B, Volpe G, Perazzi A, Omodei-Sale A (1974) *Il Farmaco Ed Sci* 29, 710
18 Bourdon JL, Marchal N (1973) *Techniques bactériologiques IV. Biologie Appliquée* (A Obre, XR Buttiau, eds) Doin, Paris
19 Carter C (1969) *Antibiotic residues in milk, dairy products and animal tissues: methods reports and protocols. National Center for antibiotic and insulin analysis.* Food and drug administration, Department of health education and welfare, Washington, DC 20204