

Marquages par [^{14}C] et [^{13}C] de la N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide et de la N-(3-diméthylaminopropyl)-4-iodobenzamide, traceurs du mélanome

M.F. Moreau^{*1}, D. Parry¹, M. Bayle¹, J. Papon¹, P. Labarre¹, A. Veyre^{1,2}

¹ INSERM U 71, Rue Montalembert, B.P. 184, 63005 Clermont-Ferrand Cedex

² Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine, 28, Place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand Cedex

Summary

N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide (I) and N-(3-diméthylaminopropyl)-4-iodobenzamide (II), recently developed in our laboratory, are promising agents for metastatic melanoma detection in nuclear medicine. In order to study their "in vivo" metabolism, we labelled them with carbon-14 and carbon-13 on two sites : on the carbonyl group (Ia, IIa), and on the dialkylaminoalkyl moiety (Ib, IIb). The overall yields calculated from sodium [^{14}C] or [^{13}C] cyanide used as precursor are in the range of 55 % for Ia, IIa, IIb, and 21 % for Ib.

Keywords : carbon-14 and carbon-13 labellings, benzamides, melanoma tracers

Introduction

Nous avons récemment mis au point au laboratoire une série de molécules radioiodées (Fig.1) marqueurs du mélanome et de ses métastases (1) pour des applications diagnostiques en Médecine Nucléaire.

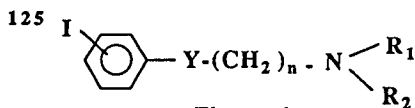


Figure 1

L'une de ces molécules, la N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide (I) a franchi toutes les étapes précliniques (2,3) avant la validation chez l'homme. Les essais scintigraphiques de Phase II portant sur 110 patients(4), ont montré l'intérêt de la Benzamide (I) marquée par ^{123}I pour le diagnostic du mélanome primaire oculaire et le bilan d'extension et de surveillance des mélanomes oculaires et cutanés. Un autre composé appartenant à la série, la N-(3-diméthylaminopropyl)-4-iodobenzamide (II), susceptible d'après les données expérimentales, de permettre des examens scintigraphiques à des temps plus précoces (5,6), est en cours d'évaluation chez l'homme.

réalisée avec un rendement quantitatif, par hydrogénation catalytique en présence de Palladium 10 % sur charbon activé. L'acide p-iodobenzoïque **3** est préparé à partir de **2** par diazotation classique de Sandmeyer. Le rendement chimique et radiochimique de ces trois étapes est de 74,5 % par rapport aux cyanures. L'acide **3** est ensuite traité par le chlorure de thionyle en présence d'une quantité catalytique de diméthylformamide. L'action sur le chlorure d'acide ainsi formé, de la N-diéthyléthylène diamine ou de la N-diméthylpropylène diamine, permet d'atteindre respectivement les Benzamides (**Ia**) et (**Ila**) avec de bons rendements après purification par chromatographie sur colonne basse pression.

Synthèse de la Benzamide (**I b**) marquée par ¹⁴C et ¹³C en α du groupe N-diéthylamine

La synthèse, décrite dans le schéma 2, est développée à partir de la N-benzyloxycarbonyl éthanolamine -¹⁴C ou ¹³C préparée précédemment au laboratoire en utilisant comme précurseur le cyanure de sodium-¹⁴C ou ¹³C(8). Le dérivé iodé **5** est obtenu à partir du tosylate de la CBz éthanolamine **4** par substitution nucléophile en présence d'iodure de sodium dans l'acétone à reflux. L'action de la diéthylamine en excès sur le dérivé **5** dans le tétrahydrofurane, permet d'atteindre la N-benzyloxycarbonyl N'-diéthyl éthylène diamine **6** avec un excellent rendement. La coupure du groupe protecteur est réalisée par une solution d'acide bromhydrique à 33 % dans l'acide acétique, et conduit au dibromhydrate **7**. Le rendement chimique et radiochimique de ces quatre étapes est de 43 % par rapport à la CBz-éthanolamine -¹⁴C ou ¹³C (26 % par rapport à NaCN). La Benzamide (**Ib**) est obtenue par action du p-iodo benzoate du p-nitrophénol sur le dibromhydrate **7** préalablement traité par une quantité stoechiométrique de triéthylamine. La réaction s'effectue dans l'acétonitrile à température ambiante, avec un rendement de 81 % après purification par simple passage acide-base.

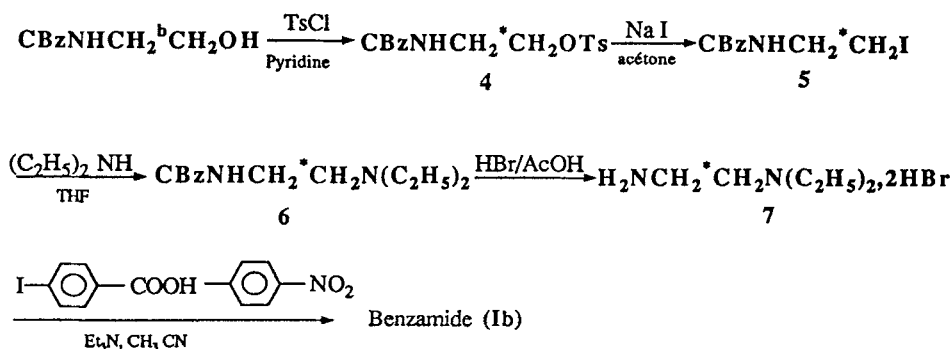


Schéma 2 - b = ¹⁴C ou ¹³C

Synthèse de la Benzamide (**II b**) marquée par ¹⁴C et ¹³C en α de la fonction amide.

Le procédé utilisé est résumé sur le schéma 3. La première étape consiste à préparer le 3-diméthylaminopropionitrile -¹⁴C ou ¹³C **8**, obtenu avec un rendement quantitatif par substitution nucléophile à partir du dérivé chloré correspondant en présence de cyanure de sodium-¹⁴C ou ¹³C, dans l'acétonitrile. Les deux étapes suivantes,

réduction puis benzylation, ont été réalisées d'après les conditions décrites par White et Chen (9) : le nitrile **8** est réduit par l'hydruure double de lithium et d'aluminium dans l'éther; la diamine formée n'est pas isolée, mais traitée directement après hydrolyse du milieu réactionnel, par le chlorure de l'acide 4-iodobenzoïque. La réaction a lieu en milieu hétérogène à température ambiante et conduit à la Benzamide (**IIb**) avec un rendement de 54 % après purification par chromatographie sur colonne basse pression.

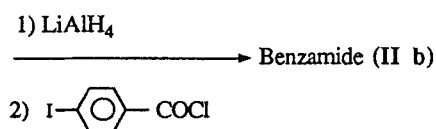
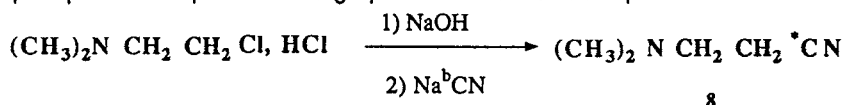


Schéma 3 - b = ^{14}C ou ^{13}C

Partie expérimentale

Indications générales

Les points de fusion sont pris sur un banc Kofler. La pureté des échantillons est déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM) (plaques de gel de silice ou d'Alumine neutre, Merck 60 F 254 ; les radiochromatogrammes sont analysés avec un détecteur multicanaux Berthold modèle LB 2832) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (appareil Hewlett-Packard HP 1090 muni d'un détecteur UV à barrette de diodes et d'un détecteur de radioactivité en ligne Flo-one A 200). Les composés sont purifiés par chromatographie sur colonne de silice (Kieselgel 60, 230-400 mesh, Merck). Les mesures de la radioactivité sont effectuées avec un spectromètre à scintillation liquide Packard modèle 4530. Les spectres I.R. sont enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer 398. Les spectres RMN sont réalisés sur un appareil Brüker AM 200 WB, les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS utilisé comme référence interne.

Les cyanures de sodium ^{14}C et ^{13}C ont été fournis par les Sociétés Dositek et Eurisotope.

Synthèse des Benzamides (**Ia**) et (**Ila**) marquées par ^{14}C et ^{13}C sur le carbonyle

Acide 4-nitrobenzoïque- ^{14}C et ^{13}C **1** (7)

A une solution de 7 mmoles (343 mg) de cyanure de sodium - ^{14}C (50 mCi, $18,5 \times 10^2$ MBq) ou ^{13}C , et 2,3 mmoles (207 mg) de cyanure cuivreux dans 7 ml d'eau, on ajoute une solution du sel de diazonium préparé à partir de 10 mmoles (1,38 g) de 4-nitroaniline (la solution est préalablement neutralisée avec du carbonate de calcium puis filtrée). On chauffe à 40°C pendant 1 h, sous forte agitation. Le p-nitrobenzonitrile est ensuite

hydrolysé en chauffant 2 h à reflux avec 20 ml d'une solution de potasse 3,5 N. On acidifie le milieu par addition d'acide chlorhydrique concentré, extrait par l'éther, sèche la phase organique (MgSO₄) puis évapore le solvant sous vide. On obtient 1,3 g (7,8 mmoles, Rdt 84 % par rapport aux cyanures) d'acide 1 utilisable sans purification. F = 240-241°C. CCM : Silice, éluant EtOH-CH₂Cl₂ 10 % v/v, Rf identique à celui d'un échantillon de référence.

Acide 4-aminobenzoïque-¹⁴C et ¹³C 2

7,8 mmoles (1,3 g) d'acide 1 sont hydrogénées dans 150 ml de méthanol, à température ambiante, en présence de Palladium (10 % Pd/C) comme catalyseur. A la fin de la réaction, le catalyseur est filtré sur Célite. Après évaporation du solvant sous vide, on obtient 1,06 g (7,73 mmoles, Rdt 99 %) d'acide 2 utilisable sans purification. F = 188-189°C. CCM : Silice, éluant EtOH-CH₂Cl₂ 10 % v/v, Rf identique à celui d'un échantillon de référence.

Acide 4-iodobenzoïque-¹⁴C et ¹³C 3

A une solution fortement agitée et refroidie à 0°C, de 7,73 mmoles (1,06 g) d'acide 2 dans 10 ml d'acide sulfurique concentré et 10 ml d'eau, on ajoute goutte à goutte 10 mmoles (690 mg) de nitrite de sodium en solution dans 2 ml d'eau. On laisse 15 min à 0°C puis 1 h à 40°C. On extrait à l'éther, sèche la phase organique sur Mg SO₄, évapore le solvant sous vide. On obtient 1,72 g (6,93 mmoles, Rdt 90 %) d'acide 3 utilisable sans purification. F = 272-274°C. CCM : Silice, éluant EtOH-CH₂Cl₂ 5 % v/v, Rf identique à celui d'un échantillon de référence- CLHP : colonne Lichrospher SGX RP18, 7 µm, 3 mm x 15 cm ; phase mobile constituée par un mélange de deux solvants : A (eau - ammoniacale 0,2 %) et B (méthanol) ; l'analyse est effectuée à partir du mélange 60 % A-40 % B v/v jusqu'à 100 % B en 8 min ; débit d'élution 0,4 ml/min (t_R = 1,48 min).

N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide-¹⁴C et ¹³C (I a)

A une solution de 3,47 mmoles (860 mg) d'acide 3 dans 20 ml de chloroforme, on ajoute 8 ml de chlorure de thionyle et quelques gouttes de diméthylformamide, puis on porte à reflux pendant 2 h. On évapore sous vide l'excès de chlorure de thionyle, dissout le résidu dans 20 ml de chloroforme, puis ajoute goutte à goutte 6,94 mmoles (805 mg) de *N*-diéthyléthylène diamine. On maintient sous agitation une nuit à température ambiante. On hydrolyse, sépare les deux phases, réextrait la phase aqueuse avec 2 x 100 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé sous vide, et le résidu est purifié sur colonne de silice, élue avec un gradient de 0 à 20 % d'éthanol dans le dichlorométhane. On obtient 934 mg (2,7 mmoles, Rdt 78 %, 58 % par rapport aux cyanures) de Benzamide (I a).

Activité spécifique : 15,52 µCi/mg (574 kBq/mg) soit 5,37 mCi/mmmole (198 MBq/mmmole)

CCM : Silice, éluant : méthanol-eau-ammoniacale 80-15-5 v/v (Rf = 0,79) ; Alumine, éluant: méthanol-acétate d'éthyle 20-80 v/v (Rf = 0,78).

CLHP : mêmes conditions que pour l'acide 3 (t_R = 11, 19 min)

I.R. (KBr) 1635 cm⁻¹ (CO) . ¹H RMN (CDCl₃) (I a) -¹⁴C : 1,06 (t, 6H, CH₃) ; 2,25 - 2,70 (m,

6H, NCH₂) ; 3,49 (m, 2H, CONHCH₂, t après add. de D₂O) ; 7,10 (large s, 1H, NH, échangeable avec D₂O) ; 7,50-7,54 (d, 2H, aromatiques) ; 7,76-7,80 (d, 2H, aromatiques).

(I a) - ¹³C : on observe les mêmes bandes caractéristiques sauf pour les 2H en ortho du carbonyle, qui donnent deux multiplets entre 7,48 et 7,54 ppm.

Chlorhydrate : F = 184-185°C

N-(3-diméthylaminopropyl)-4-iodobenzamide-¹⁴C et ¹³C (II a)

La synthèse est réalisée selon le mode opératoire décrit pour (I a), en utilisant 3,45 mmoles (856 mg) d'acide p-iodobenzoïque **3** et 6,90 mmoles (704 mg) de N-diméthylamino propylène diamine. Après purification sur colonne de silice éluée avec un gradient de 0 à 20 % d'éthanol dans le dichlorométhane, on obtient 823 mg (2,48 mmoles, Rdt 72 %, 54 % par rapport aux cyanures) de Benzamide (II a).

Activité spécifique : 16,20 µCi/mg (599 kBq/mg) soit 5,37 mCi/mmmole (198 MBq/mmmole).

CCM : Silice, éluant : méthanol - eau - ammoniacque 80-15-5 v/v (R_f = 0,66) ; Alumine, éluant : méthanol - acétate d'éthyle 20-80 v/v (R_f = 0,51).

CLHP : colonne Lichrospher SGX RP 18, 7 µm, 3 mm x 15 cm ; phase mobile méthanol-ammoniacque 0,2 % v/v, débit d'élution 0,4 ml/min. (t_R = 4,05 min).

I.R. (KBr) 1630 cm⁻¹ (CO)- ¹H RMN (CDCl₃) (IIa)-¹⁴C : 1,79 (m, 2H, CH₂) ; 2,34 (s, 6H, CH₃) ; 2,56 (t, 2H, N-CH₂) ; 3,55 (m, 2H, CONHCH₂, t, après addition de D₂O) ; 7,49-7,53 (d, 2H, aromatiques) ; 7,75-7,79 (d, 2H, aromatiques) ; 8,68 (large s, 1H, NH, échangeable avec D₂O). (IIa) - ¹³C : on observe les mêmes bandes caractéristiques sauf pour les 2H en ortho du carbonyle, qui donnent deux multiplets entre 7,46 et 7,52 ppm.

Chlorhydrate : F = 164-165°C

Synthèse de la Benzamide (Ib) marquée par ¹⁴C et ¹³C en α du groupe N-diéthylamine

Tosylate de la N-Benzyloxycarbonyl éthanolamine-¹⁴C et ¹³C **4**

A une solution refroidie à 0°C de 8,22 mmoles (1,6 g) de benzyloxycarbonyl éthanolamine-¹⁴C (55 mCi, 20,3 x 10² MBq) ou ¹³C (**8**) dans 10 ml de pyridine, on ajoute par petites portions 8,22 mmoles (1,56 g) de chlorure de tosylo fraîchement recristallisé, et laisse une nuit à 4°C. On jette sur glace, extrait au dichlorométhane, lave la phase organique avec HCl 2N, puis avec de l'eau et sèche sur MgSO₄. On filtre, puis évapore le solvant sous vide. On obtient 2,24 g (6,41 mmoles, Rdt 78 %) de tosylate **4** directement utilisable pour l'étape suivante. F = 79-80°C. CCM : Silice, éluant CH₂Cl₂-Hexane 20 % v/v, R_f identique à celui d'un échantillon de référence.

N-Benzyloxycarbonyl 2-iodoéthylamine-¹⁴C et ¹³C **5**

A une solution de 6,41 mmoles (2,24 g) de tosylate **4** dans 20 ml d'acétone, on ajoute 7,69 mmoles (1,15 g) d'iodure de sodium et laisse une nuit à reflux. On filtre le précipité de tosylate de sodium, rince le solide à l'acétone, puis évapore le filtrat sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂ - Hexane 20 % v/v). On obtient 1,19 g (3,91 mmoles, Rdt 61 %) de dérivé iodé **5** pur. F = 64-65°C. CCM : Silice, éluant EtOH - CH₂Cl₂ 2 % v/v, R_f identique à celui d'un échantillon de référence

N-Benzoyloxycarbonyl N'-diéthyléthylène diamine -¹⁴C et ¹³C 6

A une solution de 3,91 mmoles (1,19 g) de dérivé iodé 5 dans 15 ml de THF, on ajoute 8 mmoles (584 mg) de diéthylamine et laisse une nuit à reflux. On filtre, puis évapore le filtrat. Le résidu est repris par le dichlorométhane, et lavé avec une solution molaire de carbonate de sodium, puis à l'eau. On sèche la phase organique (MgSO₄), puis filtre et évapore le solvant sous vide. On obtient 927 mg (3,71 mmoles, Rdt 95 %) de composé 6 utilisé directement sans purification. CCM : Silice, éluant MeOH-CHCl₃ 10 % v/v, Rf identique à celui d'un échantillon de référence.

Dibromhydrate de 2-diéthylaminoéthylamine -¹⁴C et ¹³C 7

3,71 mmoles (927 mg) de composé 6 sont traitées par 10 ml d'une solution d'acide bromhydrique 33 % dans l'acide acétique 1 h à 0°C puis 1 h à température ambiante. On précipite le dibromhydrate par addition d'éther anhydre. On filtre, lave le précipité à l'éther et sèche sous vide. On recueille 990 mg (3,56 mmoles, Rdt 96 %) de composé 7.

N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide-¹⁴C et ¹³C (I b)

A une solution de 3,56 mmoles (990 mg) de dibromhydrate 7 dans 20 ml d'acétonitrile, on ajoute 7,2 mmoles (728 mg) de triéthylamine et laisse sous agitation pendant 2 h à température ambiante. On ajoute ensuite une solution de 3,56 mmoles (1,31 g) de p-iodobenzoate de p-nitrophénol dans 5 ml d'acétonitrile, et laisse une nuit à température ambiante. On évapore le solvant, puis extrait au dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution normale de soude, puis séchée (MgSO₄). On filtre, concentre le filtrat sous vide, et traite par 5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 2N dans l'éther. Le chlorhydrate de la Benzamide (I b) ainsi formé est dissous dans 100 ml d'eau puis traité par une solution de carbonate de sodium jusqu'à pH basique. On extrait au chloroforme, sèche sur MgSO₄, filtre et concentre sous vide. On obtient 996 mg (2,88 mmoles, Rdt 81%, 21 % par rapport à NaCN) de Benzamide (I b) pure en CCM et CLHP (mêmes conditions que pour I a).

Activité spécifique : 19,40 µCi/mg (718 kBq/mg) soit 6,71 mCi/mmmole (248 MBq/mmmole).

I.R. (KBr) 1635 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃) (I b) - ¹⁴C : spectre identique à celui de (I a) -

(I b)-¹³C : on observe les mêmes bandes caractéristiques sauf pour les protons ¹³CH₂ (CONHCH₂) pour lesquels le couplage ¹H ¹³C donne 2 multiplets centrés à 2,20 et 2,80 ppm.

Chlorhydrate : F = 184-185°C

Synthèse de la Benzamide (II b) marquée par ¹⁴C et ¹³C en α de la fonction amide**3-(Diméthylamino) propionitrile - ¹⁴C et ¹³C 8**

A une suspension de 20 mmoles (2,88 g) de chlorhydrate de 1-chloro-2-diméthylaminoéthane dans 50 ml d'éther, on ajoute 10 ml d'une solution de soude 2 N et laisse sous forte agitation pendant 15 min. On sépare les deux phases, évapore le solvant, puis dissout le résidu dans 10 ml d'acétonitrile et ajoute 10 mmoles (490 mg) de cyanure de sodium-¹⁴C (50 mCi, 18,5 x 10² MBq) ou ¹³C. Le milieu hétérogène, fortement agité, est laissé 4 h à température ambiante. Après filtration puis évaporation du solvant sous vide,

on obtient 980 mg (10 mmoles, Rdt quantitatif par rapport à NaCN) de nitrile **8** utilisé directement pour l'étape suivante. CCM : Silice, éluant EtOH-CH₂Cl₂ 20 % v/v, Rf identique à celui d'un échantillon de référence.

N-(3-diméthylaminopropyl)-4-iodobenzamide-¹⁴C et ¹³C (**II b**)

A une suspension de 25 mmoles (950 mg) d'hydruure double de lithium et d'aluminium dans 25 ml d'éther anhydre, on ajoute sur une période de 10 min, une solution de 10 mmoles (980 mg) de nitrile **8** dans 5 ml d'éther. Le milieu réactionnel est agité à 0°C sous azote, pendant 5 h. On additionne ensuite, sous forte agitation, 50 ml d'eau glacée, puis une solution de 14 mmoles (3,75 g) de chlorure d'acide p-iodobenzoïque dans 20 ml d'éther. On laisse revenir le milieu réactionnel à température ambiante et maintient sous agitation pendant 12 h. On hydrolyse, filtre les résidus solides sur Célite, lave le précipité par 3 fois 20 ml de méthanol. Le filtrat est évaporé à sec sous vide, repris par 50 ml d'eau, et extrait au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluee avec un gradient de 0 à 20 % d'éthanol dans le dichlorométhane. On obtient 1,8 g (5,42 mmoles, Rdt 54 % par rapport à NaCN) de Benzamide (**II b**).

Activité spécifique : 15 mCi/mg (555 kBq/mg) soit 5 mCi/mmmole (185 MBq/mmmole).

CCM, CLHP identiques à (**II a**)

I.R. (KBr) 1630 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃) (**II b**)-¹⁴C : spectre identique à celui de (**II a**).

(**II b**)-¹³C : on observe les mêmes bandes caractéristiques sauf pour les protons ¹³CH₂ (CONHCH₂) pour lesquels le couplage ¹H ¹³C donne 2 multiplets (2 t après add. de D₂O) centrés à 3,19 et 3,88 ppm.

Chlorhydrate : F = 164-165°C.

Remerciements

Nous remercions Madame Lefrançois et Monsieur Azim pour leur participation à la réalisation de ce manuscrit.

Références

- 1) Moreau M.F., Michelot J., Veyre A., Madelmont J.C., Godenèche D., Labarre P., Parry D., Meyniel G. - Brevet Français n° P.V. 890 1898 (1989) en cours d'extension en Europe et aux Etats-Unis.
- 2) Meyniel G., Michelot J., Moreau M.F., Veyre A. - C.R. Acad Sci. Paris, **311** (série III) : 13 (1984).
- 3) Michelot J., Moreau M.F., Labarre P., Madelmont J.C., Veyre A., Papon J., Parry D., Bonafous J., Boire J.Y., Desplanches G., Bertrand S., Meyniel G. - J. Nucl. Med. **32** : 1573 (1991).

- 4) Michelot J., Moreau M.F., Veyre A., Bonafous J., Bacin F., Madelmont J.C., Bussière F., Souteyrand P., Mauclore L., Chossart F., Papon J., Labarre P., Kauffmann P., Plagne R. - J. Nucl. Med. 34 : 1260 (1993).
- 5) Moreau M.F., Madelmont J.C., Labarre P., Papon J., Bayle M., Michelot J., Mauclore L., Veyre A. - J. Labelled Compd. Radiopharm. 32 : 506 (1993) (abstract).
- 6) Moreau M.F., Michelot J., Papon J., Bayle M., Labarre P., Madelmont J.C., Parry D., Boire J.Y., Moins N., Seguin H., Veyre A., Mauclore L. - Nucl. Med. Biol. : soumise à avis.
- 7) Wacker A., Grisebach H., Trebot A., Weygand F. - Angew. Chem. 66 : 326 (1954).
- 8) Madelmont J.C., Parry D., Godenèche D., Duprat J. - J. Labelled Compd. Radiopharm. 22 : 851 (1985).
- 9) White E.H., Chen Y. - J. Labelled Compd. Radiopharm. 33 : 97 (1993).