

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTÉ DES SCIENCES

LE NOYAU ARYLTHIADIAZINE 1,1-DIOXYDE EN
CHIMIE MEDICINALE : DEVELOPPEMENTS
ORIGINAUX DE COMPOSES A POTENTIALITES
THERAPEUTIQUES

Pascal de Tullio
Docteur en Sciences
Chercheur qualifié du FNRS

Laboratoire de Chimie Pharmaceutique
Professeur Bernard Pirotte

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur
2007

La plus grande faiblesse de la pensée contemporaine me paraît résider dans la surestimation extravagante du connu par rapport à ce qui reste à connaître.

André Breton

Avant-propos



En guise de préambule à ce travail, nous aimerions tout d'abord avertir le lecteur sur le contenu des pages qui vont suivre et qui ont pour but principal de donner un éclairage tout particulier sur la chimie du noyau 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde. Il y a dans cette phrase déjà deux points qui appellent commentaires; le premier est en relation avec le nom générique donné aux composés qui vont être décrits ici et qui n'a pas de réelle signification en nomenclature IUPAC. Il faut donc comprendre ici par le terme « aryle » qu'il s'agit d'un noyau aromatique hétérocyclique ou non à 5 ou 6 atomes (classiquement un cycle thiophène, benzène ou pyridine). Ce noyau est fusionné par un côté à un

cycle 1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde. Ce problème de nomenclature étant clarifié, il convient de nous attarder quelques instants sur le second point qui est l'angle pharmaceutique que vont prendre les recherches décrites ici. Il ne s'agit pas en effet pour nous de décrire de manière exhaustive l'ensemble des noyaux 1,2,4-arylthiadiazines mais de focaliser notre attention sur ceux qui ont présenté, présentent ou présenteront, à notre avis, un intérêt thérapeutique. A ce stade, peut-être conviendrait-il de faire une petite digression sur la chimie pharmaceutique, d'essayer d'en donner une définition pratique et de voir en quoi cet aspect de la chimie va fondamentalement influencer le choix des structures des composés que nous décrirons.

Il existe bien entendu de très nombreuses définitions de la Chimie Pharmaceutique comme par exemple celle qui la présente comme étant la fabrication, le contrôle et l'analyse des substances utilisables en médecine ou comme la Science qui étudie les processus de recherche et de développement du médicament, qui détermine les stratégies de découverte de médicaments, qui rationnellement « dessine » et « façonne » la structure des drogues qui seront utilisées pour soigner toutes les formes de pathologies. Ce dernier concept est intéressant puisqu'il y est question de « *design* » pour utiliser un terme très en vogue et de façonnage, cela y introduit non seulement une connotation de technologies fines mais également d'artisanat et de savoir faire (même s'il est évident qu'au niveau industriel, ce secteur est depuis longtemps entré dans une aire qui n'a guère de comparaison avec ce qui est enseigné et pratiqué au niveau universitaire).

De ces termes de « *design* » et de façonnage, nous sortons de cette digression pour en revenir à notre propos principal qui était d'expliquer pourquoi dans la discipline qui nous occupe, plus que dans beaucoup d'autres, la structure des composés développés et étudiés n'est pas anodine mais doit répondre à toute une série de règles dictées par la nature des cibles biologiques visées. Tout cela pour dire que toute réaction chimique et toute voie de synthèse ne peuvent être appliquées en Chimie Pharmaceutique que si elles aboutissent à l'enchaînement d'atomes espéré. Cela peut paraître trivial comme réflexion au premier abord mais les personnes concernées savent, par expérience, que cela constitue souvent une entrave importante dans le développement de certaines structures chimiques. Nous ne décrivons donc dans ce travail que les séries compatibles

avec une application médicale et nous nous emploierons, sans nous mettre des œillères, à rester dans le cadre pharmaceutique qui nous intéresse. Ceci ne donnera donc pas une vision globale de la chimie des 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxydes mais adoptera l'angle de la Chimie Pharmaceutique pour balayer ce qui a été fait dans notre laboratoire comme dans les autres.

Une autre problématique qui doit être évoquée dans cet avant propos concerne les brevets. En effet, pour les données bibliographiques utilisées dans ce travail, nous avons décidé de nous focaliser presque exclusivement sur les articles publiés dans des revues scientifiques. Nous avons donc peu ou pas tenu compte des brevets concernant les structures qui nous intéressent et ce pour deux raisons principales. La première est liée à la chimie de ces composés et à la manière dont la synthèse et la caractérisation des structures sont présentées dans les brevets. En effet, les modes opératoires et les schémas réactionnels sont souvent succincts voire généraux et les produits revendiqués, quand ils sont décrits, ne sont généralement pas accompagnés de données spectrales permettant de les identifier sans ambiguïtés. La seconde raison est en rapport avec l'optique pharmaceutique de ce travail et la corrélation recherchée entre structure et activité puisqu'il n'existe, en général, que peu ou pas de données pharmacologiques associées aux molécules présentes dans un brevet.

Et pour terminer ce préambule, mettons l'accent sur la présentation de ce travail. Deux possibilités s'offraient de prime abord à nous pour la structuration des données : l'une basée sur la structure chimique des composés, facilitant la description des différentes voies de synthèse mais mélangeant alors les activités pharmacologiques de telle manière qu'il ne soit pas évident de les décrire clairement; l'autre basée sur l'activité biologique, idéale au niveau pharmaceutique mais amenant difficultés et redondances dans la présentation des différentes voies de préparation des composés d'intérêts. Ces deux approches n'étant pas à notre sens satisfaisantes prises séparément, nous avons dès lors choisi un mélange des deux optiques en débutant par la description des différents axes d'activité biologique des 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxydes, quelque soit leur structure chimique. Ce premier éclairage ayant mis en lumière les différentes structures intéressantes au niveau pharmaceutique, il est donc plus facile de présenter dans la deuxième partie les divers schémas de synthèse décrits dans la littérature ; la troisième partie du travail nous amenant à la présentation des

travaux tant chimiques que pharmacologiques effectués au sein du laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université de Liège autour de ce noyau selon l'axe « activité biologique ».

Il est de coutume de débiter tout manuscrit présentant des travaux de recherches par une liste plus ou moins longue et exhaustive de remerciements. Je ne veux déroger à la coutume mais je ne veux pas non plus m'y plier simplement parce que cela est nécessaire ou de bon ton. Le temps où la science était affaire de « solitaire » plus ou moins « illuminé » est depuis longtemps révolu et s'il est une évidence aujourd'hui, elle est dans la collaboration étroite et nécessaire qui régit et enrichit tout ce que nous avons entrepris et entreprenons encore. C'est pourquoi, il est tout une série de personnes sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour et qu'il m'est plaisant de nommer ici afin qu'ils comprennent et accepte ma reconnaissance.

Je me devais malheureusement de débiter par un bien triste remerciement puisqu'il va à titre posthume au Professeur Jacques Delarge qui nous a quitté en 2006. Il m'a permis de débiter ce travail et d'accomplir bon nombre de recherches en me témoignant un soutien sans failles et en me prodiguant de nombreux et précieux conseils. Je veux lui témoigner ici ma profonde et sincère gratitude.

Le professeur Bernard Pirotte, qui lui a succédé à la tête du service de chimie pharmaceutique, a été l'initiateur des différents projets auxquels j'ai eu la chance de participer depuis le début. Il m'a fait l'honneur de m'accepter à ses côtés et c'est avec grand plaisir que nous avons pu faire évoluer ensemble les différents travaux de recherches présentés dans ce mémoire. Je voudrais dès lors vivement le remercier pour la confiance qu'il a bien voulu mettre en moi et l'amitié qu'il m'a témoignée.

Je citerais ensuite les personnes du laboratoire de chimie pharmaceutique qui me sont les plus proches et qui ont grandement contribué à l'avancée de tous les projets, à la bonne ambiance de travail et à la bonne rédaction de cette thèse. Il m'est donc agréable d'exprimer ma gratitude à Pierre Francotte et Pierre Fraikin. Par ailleurs, je ne voudrais oublier de remercier Daniel Dewalque, Stéphane Boverie, Fabian Somers, Stéphane Counerotte, Yvette Abrassart et tous les membres du service qui ont participé au développement des différents travaux.

Comme je l'ai déjà signalé, ce travail fût et continue d'être le fruit d'une étroite collaboration entre divers services universitaires.

Je tiens dès lors à témoigner ma plus grande gratitude au Professeur Philippe Lebrun de l'Université Libre de Bruxelles qui, par sa grande expérience

des canaux potassiques sensibles à l'ATP et son grand professionnalisme, a grandement contribué à la réussite de ce projet.

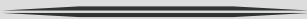
D'autres collaborations fructueuses ont également été à la base des nombreux résultats présentés ci-après.

Citons et remercions donc par la même occasion le docteur Léon Dupont du Laboratoire de Cristallographie de l'Université de Liège, le Professeur Jacques Damas du Laboratoire de Physiologie de l'Université de Liège, ainsi que les docteurs Pierre Kremers et Patrice Chiap et MM. Jean-Claude Van Heugen et Florian Gillotin de la société ATC.

Je tiens également à exprimer mes remerciements à la société Servier-Adir et plus particulièrement Mm. Daniel-Henri Caignard, Pierre Renard, Pierre Lestage, Alex Cordi et Mlle Laurence Danober pour leur soutien tant financier que scientifique.

Je terminerais par une pensée pour mon épouse Muriel et mes enfants Quentin et Maxime qui m'ont apporté un soutien sans failles malgré le temps que la rédaction de ce travail m'a empêché de leur consacrer.

Table des matières



Chapitre 1 : Introduction	1
Chapitre 2 : Le noyau 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde en chimie thérapeutique	5
2.1. Les diurétiques thiazidiques	7
2.2. Les antihypertenseurs.....	12
2.3. Les activateurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP	18

2.4. Les benzothiadiazines en tant qu'agents « antimicrobiens »	24
2.5. Les benzothiadiazines à propriétés « anti-inflammatoires ».....	26
2.6. Les benzothiadiazines en tant qu'inhibiteurs de la HCV NS5B polymérase.	28
2.7. Les arylthiadiazines en tant qu'anti-HIV-1.....	30
2.8. Les arylthiadiazines et le système glutamatergique.....	32
2.9. Autres applications pharmacologiques du noyau arylthiadiazine.	38
Chapitre 3 : La chimie des arylthiadiazine 1,1-dioxydes	45
3.1. Les séries benzéniques	45
3.1.1. Synthèse des o-aminobenzènesulfonamides.....	47
3.1.1.1. La réaction de chlorosulfonation.	48
3.1.1.2. La réaction de Sandmeyer : variante de Meerwein.	50
3.1.1.3. Rupture oxydative de disulfures ou de thioéthers.....	51
3.1.1.4. Ouverture du cycle 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4- benzothiadiazine 1,1-dioxyde.....	52
3.1.1.5. Autres réactions d'ouverture de cycle.....	53
3.1.1.6. Action du sulfite sodique sur un dérivé dinitrobenzénique.....	54
3.1.2. Synthèse des 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	55
3.1.2.1. Synthèse des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1- dioxydes.....	55
3.1.2.2. Synthèse des 3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	58
3.1.2.3. Synthèse des 3-alkyl-, 3-cycloalkyl- et 3-aralkyl-3,4-dihydro-2H- 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	60
3.1.2.3.1. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	60
3.1.2.3.2. Les autres dérivés de type 3,4-dihydro-2H-1,2,4- benzothiadiazine 1,1-dioxyde.	61
3.1.2.4. Synthèse des dérivés 3,4-dihydro substitués en position 2 et/ou 4.	64
3.1.2.4.1. Alkylation des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	64

3.1.2.4.2. Les autres 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 2 et/ou 4.	68
3.1.3. Synthèse des dérivés insaturés.....	70
3.1.3.1. Synthèse des 3-alkoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	71
3.1.3.2. Synthèse des 3-alkylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	72
3.1.3.3. Synthèse des 3-alkyl-, 3-cycloalkyl-, 3-aryl- ou 3-aralkyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	74
3.1.3.4. Synthèse des 3-alkyl-, 3-aryl- ou 3-aralkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	79
3.1.4. Synthèse des dérivés tricycliques	87
3.1.4.1. Les systèmes tricycliques 2,3.	87
3.1.4.2. Les systèmes tricycliques 3,4.	89
3.2. Les séries pyridiniques.....	94
3.3. Les séries thiophéniques.....	98
3.4. Les séries pyrazolo.....	102

Travaux réalisés au sein du laboratoire de Chimie

Pharmaceutique de l'université de Liège autour du noyau

arylthiadiazine 1,1-dioxyde	105

Chapitre 4 : Les activateurs des canaux potassiques sensibles à

l'ATP	109

4.1. Les canaux potassiques : généralités.....	109
4.2. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ou canaux K_{ATP}.....	111
4.3. Structure des canaux K_{ATP}.....	112
4.4. Rôles physiologiques des canaux K_{ATP}.....	114
4.4.1. Les canaux K_{ATP} au niveau des cellules B du pancréas.	115
4.4.2. Les canaux K_{ATP} au niveau des cellules des muscles lisses.	116
4.4.3. Les canaux K_{ATP} au niveau des cellules cardiaques.....	116

4.4.4. Les canaux K_{ATP} au niveau du complexe adénohypophysaire.	117
4.4.5. Les canaux K_{ATP} au niveau du système nerveux central.	117
4.4.6. Les canaux K_{ATP} au niveau des mitochondries.	117
4.5. Les modulateurs des canaux K_{ATP}.	118
4.5.1. Les bloqueurs des canaux K_{ATP}	118
4.5.2. Les activateurs des canaux K_{ATP}	120
4.6. Le développement d'activateurs sélectifs des canaux K_{ATP} pancréatiques.	122
4.7. La pharmacochimie des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP}.	126
4.8. La pharmacochimie des benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} [Cf. annexes 1 à 7 et 10 à 18]	132
4.8.1. Synthèse des dérivés benzéniques.	134
4.8.1.1. Les 7-halogéno-3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1- dioxydes [Cf. annexe 3 et annexe 6].	136
Études structurales en série 3-alkylamino-7-chloro-1,2,4- benzothiadiazine 1,1-dioxyde.	137
4.8.1.2. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués sur le noyau aromatique [Cf. annexe 7].	138
4.8.1.3. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par des groupements électrodonneurs (O-alkyle, alkyle, ...) [Cf. annexe 7].	139
4.8.1.4. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par des groupements électroattracteurs (CF_3 , NO_2 , CN , SO_2CH_3 , ...) [Cf. annexe 2 et annexe 7].	140
4.8.1.5. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement acide carboxylique ou dérivé [Cf. annexe 2 et annexe 7].	143
4.8.1.6. Modulation de la position du substituant sur le cycle benzénique des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1- dioxydes.	144
Les 3-alkylamino-5-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	144

Les 3-alkylamino-6-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	144
Les 3-alkylamino-8-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	145
4.8.1.7. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 6 et 7 [Cf. annexe 11].	146
Les 3-alkylamino-6,7-dichloro- 6-chloro-7-bromo- et 6-chloro-7-fluoro- 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	147
Les 3-alkylamino-6,7-difluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes. ..	147
Les 3-alkylamino-6-chloro-7-méthoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1- dioxydes.....	148
4.8.1.8. Les 2-alkyl-3-alkylamino en séries benzénique et pyridinique [Cf. annexe 1 et annexe 5].	149
4.8.1.9. Les 3-alkylsulfanyl- ou aralkylsulfanyl-4H-1,2,4- benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	153
4.8.1.10. Les 3-alkoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	155
4.8.2. Paramètres physico-chimiques des 3-alkylamino-4H-1,2,4- benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	156
4.8.2.1. Détermination des pKa.	157
4.8.2.2. Détermination des logarithmes du coefficient de partage (Log P)	161
4.8.3. Evaluation pharmacologique	163
Le modèle pancréatique	163
Le modèle d'aorte de rat.....	164
4.8.3.1. Evaluation des drogues de références.	165
4.8.3.2. Evaluation des 3-alkylamino-7-halogéno-4H-1,2,4- benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 6].	167
4.8.3.3. Modulation de la nature du substituant en position 7 des 3- alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 2 et annexe 7].....	173
4.8.3.4. Les 2-alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- et pyridothiadiazine 1,1- dioxydes [Cf. annexe 5].....	178
4.8.3.5. Modulation de la position du chlore sur le noyau benzénique des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	179
4.8.3.6. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 6 et 7 [Cf. annexe 11]..	182

4.8.3.7. Les 3-alkylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	186
4.9. Analyse Quantitative des Relations Structure-Activité (QSAR) [Cf. annexe 15]	190
4.10. La métabolisation des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 16]	194
4.10.1. Protocole d'incubation.....	197
4.10.2. Analyse par LC-MS/MS	198
4.10.3. Analyse par LC-SPE-RMN.	198
4.10.4. Métabolisation des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzo et pyridothiadiazine 1,1-dioxydes.	200
<i>Métabolisation du BPDZ 73 :</i>	<i>200</i>
<i>Métabolisation du composé 402.</i>	<i>207</i>
<i>Métabolisation des BPDZ 157 et BPDZ 188.</i>	<i>208</i>
4.10.5. conclusions de la métabolisation	217
4.11. Les activateurs des canaux K_{ATP} : conclusions et perspectives.....	218
Chapitre 5 : Les modulateurs allostériques positifs des récepteurs glutamatergiques de sous-type AMPA.....	223
5.1. Le système glutamatergique.....	223
5.2. La structure des récepteurs AMPA	225
5.3. Les implications physiologiques de la modulation des récepteurs AMPA	228
5.4. Les différentes familles chimiques constituant les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.....	231
5.4.1. Les biarylpropylsulfonamides	232
5.4.2. Les dérivés benzamides ou ampakines.	232
5.4.3. Le PEPA et le GT005.....	233
5.4.4. Les benzothiadiazine 1,1-dioxydes.	234
5.5. Le développement de modulateurs allostériques positifs au sein du laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège.....	235

5.6. La pharmacochimie des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.....	236
5.7. La pharmacochimie des benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.....	244
5.7.1. La synthèse des dérivés benzéniques	246
5.7.2. Les 7-chloro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.....	247
5.7.3. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7	252
5.7.3.1. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués en position 7.....	252
5.7.3.2. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par d'autres halogènes que le chlore et des groupements électrodonneurs.	252
5.7.3.3. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement nitro, amino ou acétamido.....	253
5.7.3.4. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement acide carboxylique ou dérivé.....	255
5.7.3.5. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement trifluorométhyle.	256
5.7.3.6. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement cyano.	256
5.7.3.7. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement méthylsulfonyl.....	257
5.7.4. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 6.....	258
5.7.5. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 8.....	259
5.7.6. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 5.....	259

5.7.7. Les 2,3-dihydro-4 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 6 et 7.	262
5.7.8. Les 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 6 et 8.	264
5.7.9. Les 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 5 et 7 ou 5 et 8.	264
5.7.10. Les 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 7 et 8.	266
5.7.11. Les 4 <i>H</i> -1,2,4-thiénythiadiazine 1,1-dioxydes.	267
5.7.11.1. Les 6-chloro-4 <i>H</i> -thiéo[3,2- <i>e</i>]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.	268
5.7.11.2. Les 5,7-dichloro-4 <i>H</i> -thiéo[3,4- <i>e</i>]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.	269
5.7.11.3. Les 4 <i>H</i> -thiéo[2,3- <i>e</i>]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.	273
5.8. Evaluation pharmacologique des drogues synthétisées en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.	277
5.8.1. Evaluation des composés de référence 280	280
5.8.2. Evaluation des 4-alkyl-7-chloro-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (série 7-chloro).	283
5.8.3. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués sur le noyau benzénique (série 7-H).	286
5.8.4. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7 sur le noyau benzénique.	287
5.8.4.1. Les dérivés 7-halogénés 288	288
5.8.4.2. Les dérivés substitués en position 7 par un groupement électrodonneur.	289
5.8.4.3 Les dérivés substitués en position 7 par un groupement électroattracteur.	290
5.8.5. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 5, 6 et 8 sur le noyau benzénique.	293

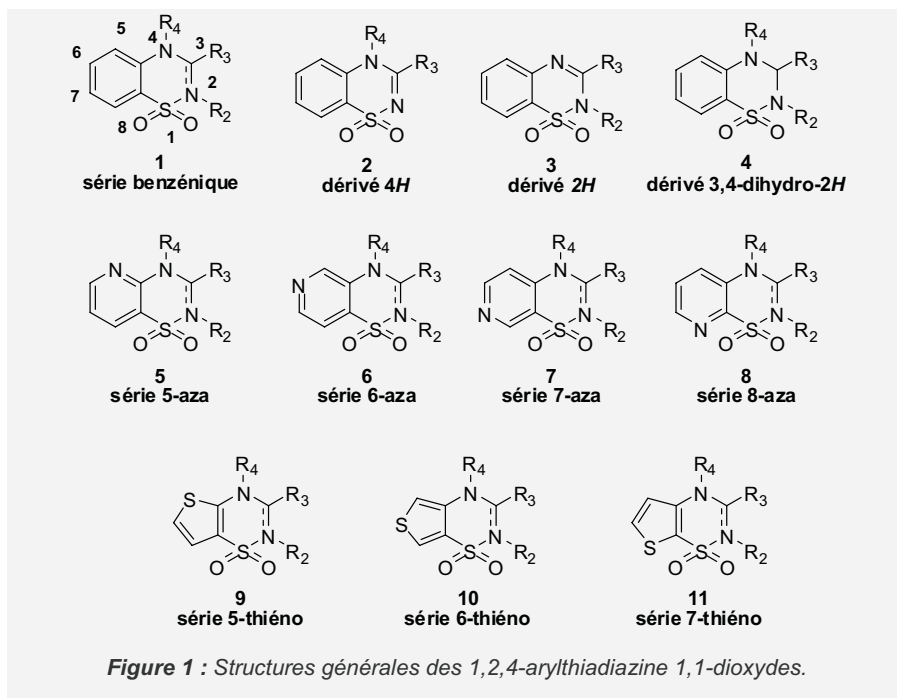
5.8.6. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement disubstitués en position 6 et 7 sur le noyau benzénique.....	295
5.8.7. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 5,7 - 5,8 - 6,8 et 7,8 sur le noyau benzénique.....	297
5.8.8. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2,4-thiénothiadiazine 1,1-dioxydes.	297
5.9. Les modulateurs allostériques positifs du courant AMPA : conclusion et perspectives.....	301
Conclusion générale.....	307
Bibliographie	313
Annexes	353
Listes des annexes :	354
Thèses annexes 1 à 3	573

Chapitre 1 :

Introduction



Débutons tout d'abord par la mise en lumière et la visualisation de notre structure d'intérêt : le noyau 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde, et plus spécifiquement les 1,2,4-benzo-, pyrido- et thiénothiadiazine 1,1-dioxydes, qui constituent l'immense majorité des composés décrits dans la littérature, les autres hétérocycles à 5 ou 6 atomes fusionnés au noyau thiadiazine n'apparaissant que de manière sporadique, voire anecdotique. Par ailleurs, c'est clairement le noyau benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**1**, Figure 1), qui au niveau du nombre de composés développés et étudiés, tient le devant de la scène.



Ainsi que cela est représenté dans la figure 1, la numérotation de ces hétérocycles débute toujours pas l'atome de S et se poursuit de manière à minimiser les numéros donnés aux atomes d'azote; d'où la nomenclature 1,2,4 liée aux hétéroatomes de la fraction thiadiazinique. Sans tenir compte des substituants éventuellement présents, il existe deux grands types de noyaux thiadiazines, les « insaturés » et les « saturés ». Les premiers possèdent une insaturation située soit entre les positions 2-3 (**2**, Figure 1), auquel cas nous parlerons de composés 4H, soit entre les positions 3-4 (**3**, Figure 1), auquel cas il s'agit de composés 2H. Les seconds sont complètement saturés et sont nommés 3,4-dihydro-2H (**4**, Figure 1). Dans de nombreux articles, surtout les plus anciens, la double liaison des composés insaturés est tantôt positionnée entre l'azote 2 et le carbone 3 (tautomère 4H), tantôt entre le carbone 3 et l'azote 4 (tautomère 2H). Dans un souci d'homogénéité, et surtout en fonction des résultats des analyses structurales que nous avons obtenus et qui seront discutés dans un chapitre ultérieur, nous avons décidé de représenter, lorsque le choix reste possible, les composés uniquement sous leur forme 4H.

Dans le cas des dérivés pyridiniques, 4 isomères sont possibles en faisant varier la position de l'azote pyridinique. Le positionnement de l'azote en 5 fournit la série pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**5**, Figure 1) que nous appellerons communément 5-aza. Le passage de l'azote en position 6 amène à la série pyrido[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**6**, Figure 1) nommée trivialement 6-aza. La série pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**7**, Figure 1) ou 7-aza résulte du passage de l'azote vers la position 7 et enfin la série 8-aza ou pyrido[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**8**, Figure 1) voit son azote pyridinique placé en position 8. Il en est presque de même pour les thiénothiadiazines qui par la réduction de la taille du cycle aryle, ne peuvent plus exister que sous 3 formes isomériques que nous appellerons 5-, 6- ou 7-thiéno selon qu'il s'agisse du thiéno[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**9**, Figure 1), du thiéno[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**10**, Figure 1) ou du thiéno[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**11**, Figure 1).

Ce premier coup de projecteur terminé, essayons d'examiner à présent quel peut être l'intérêt de ce ou de ces noyaux pour la chimie pharmaceutique; en d'autres termes, il s'agit de comprendre pourquoi ils sont à la base de plusieurs médicaments et quels sont les atouts dont ils disposent pour réussir en tant que structures de base de nouvelles drogues. Sans entrer dans trop de détails, nous pouvons citer dans le désordre et de manière non exhaustive : leur aromaticité, la présence d'un hétérocycle (azoté de surcroît), leur relative compacité et planéité (qui entraîne une certaine rigidité), la présence de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène et la présence potentielle de protons labiles si les positions 2 et/ou 4 ne sont pas substituées (Cf. Figure 2). Cette liste est constituée d'éléments plutôt favorables et en assez bonne adéquation avec de nombreux requis structuraux présents sur de nombreux xénobiotiques.

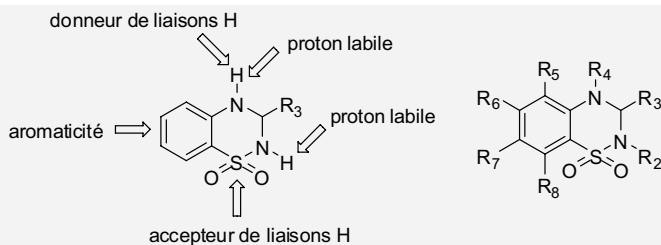


Figure 2 : Avantages et pôles de substitutions du noyau 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

Par ailleurs, il est en effet évident, et nous le démontrerons dans la suite de ce travail que l'activité biologique est souvent fonction du type, du nombre et du positionnement de groupements placés autour de ces noyaux de base. Dans le cas qui nous occupe, ces noyaux offrent de très nombreuses positions de substitution, que ce soit sur la partie aromatique ou sur le cycle thiadiazinique (Cf. Figure 2, positions R₂ à R₈).

Chapitre 2 : Le noyau 1,2,4- arylthiadiazine 1,1-dioxyde en Chimie Thérapeutique

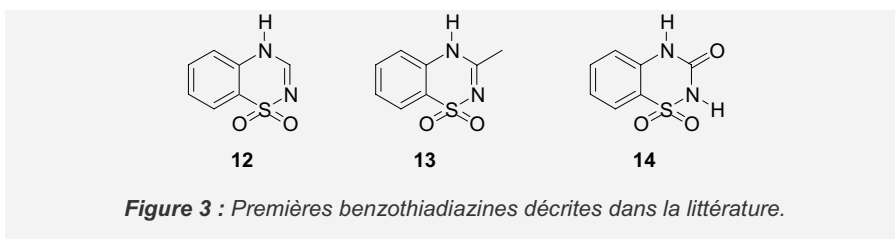


Après ces présentations superficielles, entrons à présent dans le vif du sujet et examinons quelle place le noyau 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde a occupé et occupe encore en chimie pharmaceutique. Pour ce faire, nous avons choisi une classification par potentialités thérapeutiques.

Lorsque une recherche bibliographique est entreprise sur le noyau 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde en partant d'une structure complètement « libre » de manière à n'exclure aucune substitution, c'est plus de 8000 structures décrites et

près de 15000 références associées (dont un peu plus de 1000 brevets) qui apparaissent. Un examen plus fin de ces références et des sujets traités montre que dans la majorité des cas, elles se trouvent dans le domaine thérapeutique et que, depuis près de 40 ans, leur nombre n'a cessé de croître pour avoisiner en 2005 les 500. Et s'il est vrai que la plupart de ces publications ne présentent pas de nouveaux composés et que beaucoup d'entre elles parlent de quelques drogues connues de longue date pour être des produits de référence tels que le diazoxide et l'hydrochlorothiazide, il subsiste néanmoins une somme importante d'informations générées autour de cette structure.

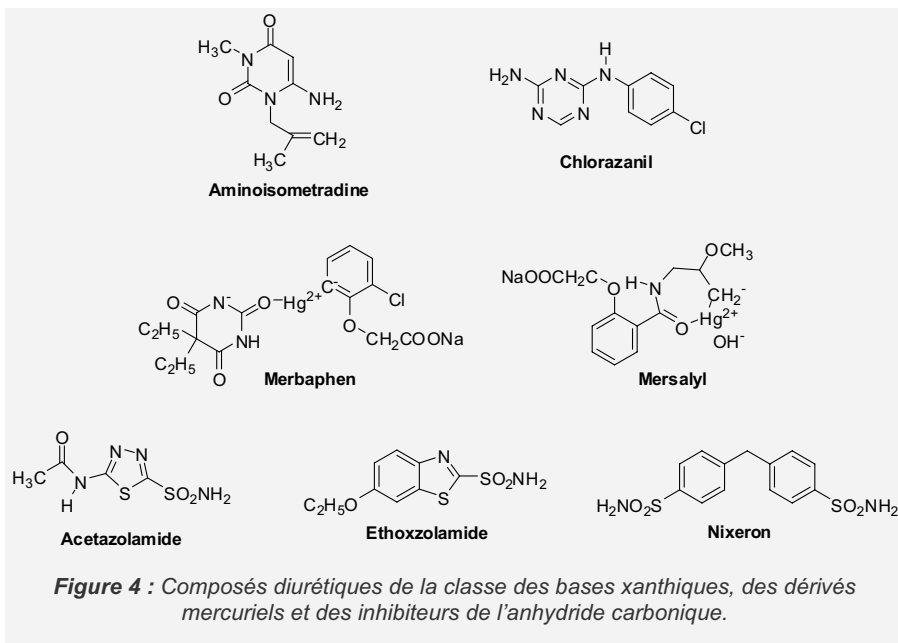
Il est assez difficile et sans doute un peu hors propos de plonger dans les entrailles historiques de la science afin de retrouver les premières traces du noyau 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde. Sans pouvoir être totalement affirmatif quant à la date exacte de l'apparition initiale de ce noyau dans la littérature, il semble que ce soit au début du siècle qu'apparaissent les structures de ce genre. Ainsi, en 1902, Ekbom décrit deux composés : le 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**12**) et son homologue 3-méthylé (**13**, Figure 3). Dans un article de Schrader en 1917, nous pouvons identifier un dérivé dont la structure est celle du 3-oxo-2*H*-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**14**, Figure 3) [Schrader 1917].



Cependant, il faut attendre les années cinquante pour voir apparaître les premières études sérieuses concernant cette structure. Leur progression n'a cependant réellement débuté qu'avec la découverte de leurs activités diurétique et antihypertensive à l'approche des années soixante. C'est alors un foisonnement de recherches tant sur le plan biologique, clinique et chimique que nous allons tenter de décrire brièvement dans les chapitres qui vont suivre.

2.1. Les diurétiques thiazidiques

Sans entrer ici dans des détails descriptifs de la classe des diurétiques, il n'est pas inintéressant de rappeler l'historique ayant mené à la découverte de l'effet diurétique des benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Schlittler et al. 1962]. Peu après la moitié du 19^{ème} siècle apparaissent les premiers diurétiques décrits ; ces composés sont des bases xanthiques dérivées de la caféine et de la théophylline. Citons par exemple l'aminoisometradine et le chlorazanil (Figure 4).



Ces composés ne montrent pas une grande efficacité et sont, en outre, relativement toxiques. Vient ensuite, peu après la première guerre mondiale, le temps des dérivés mercuriels. L'activité diurétique de ces composés est relativement importante. Cette classe de composés a été particulièrement investiguée entre 1920 et 1945. Le Merbaphen et le Mersalyl (Figure 4) sont deux représentants des dérivés mercuriels qui ont été couramment utilisés. Malgré leur activité intéressante, les drogues de cette classe présentent de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ils ne sont administrables que par voie parentérale. Ensuite, leur toxicité n'est pas négligeable car ils peuvent provoquer des

complications telles que l'apparition de glomérulonéphrites. Une étape importante est ensuite franchie lors de la découverte du fait que certains sulfamidés provoquent de l'acidose *via* une inhibition de l'anhydrase carbonique. Il est ensuite démontré que cette inhibition peut engendrer un effet diurétique. De là, une série d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique a été développée et l'acétazolamide (Figure 4) fut finalement décrit comme le premier diurétique non mercuriel puissant par prise orale et non irritant pour les reins [Berliner et al. 1956]. Suivent d'autres molécules telles que l'éthoxzolamide et le Nixeron, un dérivé disulfamoyle (Figure 4).

Ce n'est cependant que vers la fin des années cinquante qu'a lieu l'étape décisive de la découverte des propriétés diurétiques des benzothiadiazine 1,1-dioxydes. Novello et al. décrivent le 6-chloro-7-sulfamoyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (Figure 5) en tant que puissant diurétique [Novello et al. 1957].

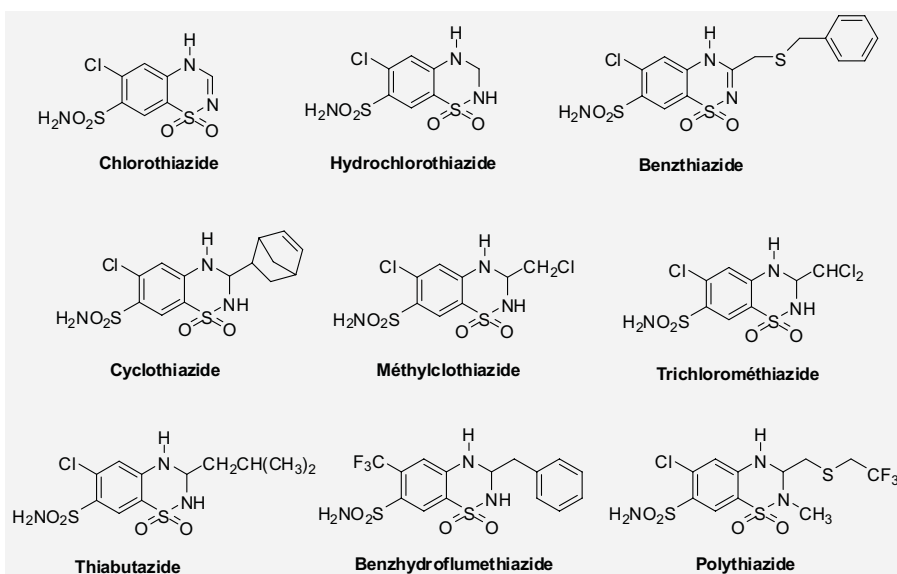


Figure 5 : Principaux composés diurétiques de la classe des benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Ce composé, appelé chlorothiazide, représente le point de départ de la classe des diurétiques thiazidiques. La réduction de la double liaison entre les

positions 3 et 4 du noyau thiadiazine augmente sensiblement l'activité diurétique et l'analogue saturé du chlorothiazide, nommé hydrochlorothiazide (Figure 5) se révèle être dix fois plus actif [De Stevens et al. 1958, Renzi et al. 1959]. Dans les années qui ont suivi ces découvertes, de très nombreuses recherches ont été entreprises autour de ce noyau afin d'augmenter l'activité et d'améliorer le profil pharmacologique général de ces drogues. La plupart des sociétés pharmaceutiques importantes (CIBA, Merck, Bristol, Abbott, Lilly, ...) font état de leurs propres structures, souvent redondantes ou découvertes et publiées au même moment.

Il est ainsi possible de citer le benzthiazide [P'An et al. 1960], le cyclothiazide [Whitehead et al. 1961a], le methylclothiazide [Ford et al. 1960], le trichloromethiazide [Sherlock et al. 1960], le thiabutazide [Schlittler et al. 1962], le benzhydroflumetazide [Holdrege et al. 1959], le cyclopenthiazide [Barrett et al. 1961] et le polythiazide [Ford et al. 1961] (Figure 5). Cette liste est bien entendu non exhaustive. La plupart de ces composés sont des dérivés « 3,4-dihydro » et se montrent beaucoup plus actifs que le chlorothiazide et l'hydrochlorothiazide.

Un grand nombre de pharmacomodulations a donc été réalisé dans cette série [Renzi et al. 1959, Holdrege et al. 1959, Novello et al. 1960a, Short et al. 1960, Werner et al. 1960, Selleri et al. 1960, Whitehead et al. 1961b, Close et al. 1961, Topliss et al. 1961, Schlittler et al. 1962] et a permis, via l'étude des relations structure-activité, de définir les paramètres structuraux importants pour l'effet diurétique :

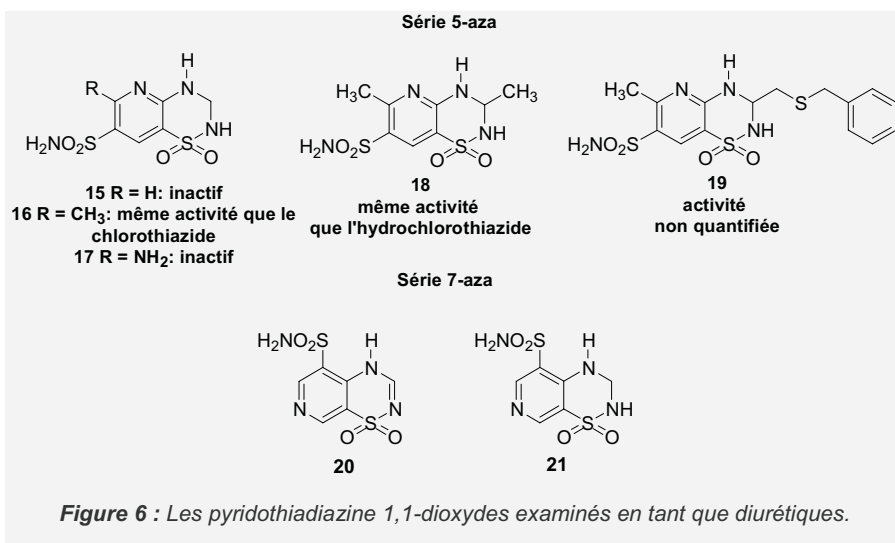
- En position 7, la présence d'un second groupe sulfonamide est très favorable à l'activité. Le remplacement de ce groupe ou son déplacement dans d'autres positions du noyau aromatique est défavorable.
- En position 6, l'atome de chlore représente le meilleur choix. Les groupements électrocaptants tels que Br, CF₃ ou NO₂ donnent également une bonne activité, alors que la présence de groupements électrodonneurs est plutôt défavorable.
- L'alkylation en position 2 par de courtes chaînes est plutôt favorable.
- En position 3, la présence de courtes chaînes linéaires est favorable, de même que celle de cycloalkylméthyle ou de mono- ou di-chlorométhyle. Les groupements benzyle ou phénéthyle peuvent augmenter l'activité. Par

contre, la présence d'un groupement C=O ou d'une chaîne alkylaminée est moins favorable.

- La substitution en position 5 ou 8 entraîne une baisse d'activité.

Au niveau du mode d'action, il convient de signaler que, contrairement aux dérivés de type ouvert (i.e. acétazolamide), ces composés, en général, ne sont que faiblement actifs en tant qu'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique. Leur mécanisme d'action est à rapprocher de celui des diurétiques mercuriels. Ils sont également présentés comme « natriurétiques » ou « salurétiques » du fait de l'élimination préférentielle des ions chlorure et sodium qu'ils provoquent. Ils agiraient par blocage d'un transporteur neutre aux ions Na^+ et Cl^- au niveau de la première partie du tube distal. Parmi l'ensemble des diurétiques thiazidiques, voire de l'ensemble des diurétiques, l'hydrochlorothiazide reste probablement, à l'heure actuelle, le diurétique le plus utilisé en thérapeutique, le plus souvent en association avec d'autres principes actifs.

Par ailleurs, au début des années soixante, quelques analogues pyridiniques en série 5-aza et 7-aza ont été synthétisés et évalués en tant que diurétiques. Les composés de la série 5-aza (**15-19**, Figure 6) se sont montrés soit aussi actifs que le chlorothiazide ou que l'hydrochlorothiazide, soit totalement inactifs [Yale et al. 1960, Cragoe et al. 1961].



Seuls deux composés de la série 7-aza ont été préparés et évalués (**20** et **21**, Figure 6). Ils se sont révélés être moins actifs que leurs homologues 5-aza. Ceci n'est pas surprenant à l'examen de la structure des composés (Figure 6) et la position du second groupement sulfamoylé. Il s'agit, à notre connaissance, de la première apparition du noyau pyridothiadiazine 1,1-dioxyde dans la littérature et qui par ailleurs se limite à quelques composés.

Concernant les recherches visant à la découverte de nouveaux diurétiques dans la classe des thiazides, il faut signaler que, dès 1962, *ite missa est* et que peu de résultats intéressants seront encore générés après cette date. Pour être complet avec le type de structures explorées, il nous faut néanmoins citer quelques composés dont l'activité diurétique n'est pas détaillée ou est moindre que celle des composés de référence présentés dans la figure 5. Les principales modulations ont été effectuées en position 3 avec, par exemple, l'introduction des groupements suivants :

- Un groupement acide ou dérivé (**22**, Figure 7) [Close et al. 1961].
- Un groupement cycloalkyloxyméthyle (**23**, Figure 7) [Morren et al. 1961].
- Un groupement de type 3,3-spiro (**24** et **25**, Figure 7) [Cragoe et al. 1962, Ravina et al. 1973].
- un groupement cétoalkyle ou dérivé (oxime, hydrazone, **26**, Figure 7) [Robertson et al. 1965].
- Un groupement polyfluoroalkyle (**27**, Figure 7) [Greiner et al. 1986].

Relevons enfin qu'en 2001, des dérivés présentant en position 3 un lien amide entre un cycle benzothiadiazine et un cycle 4-hydroxy-2-quinolone (**28**, Figure 7) ont été décrits comme des agents diurétiques potentiels [Taran et al. 2001].

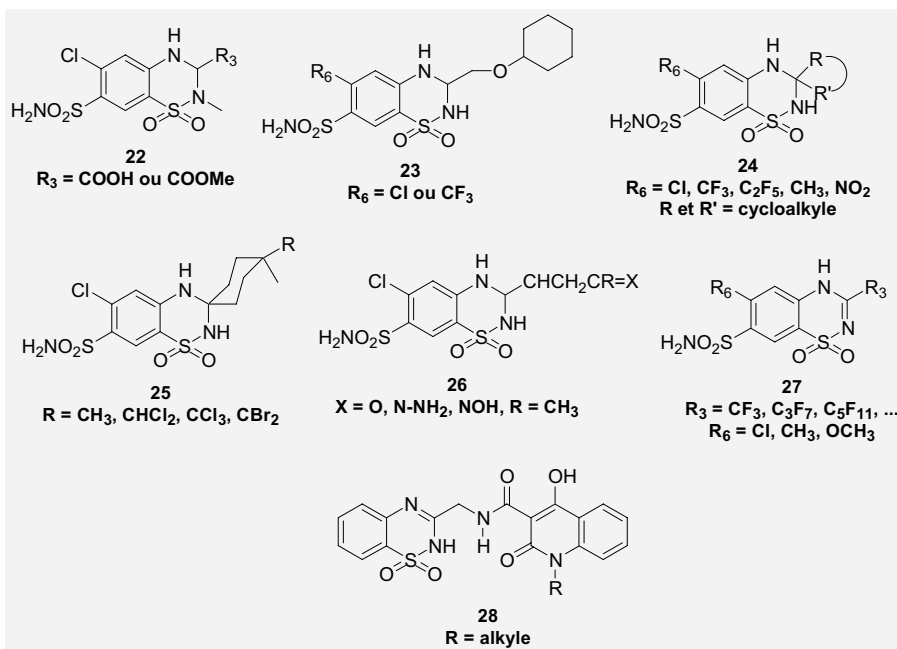


Figure 7 : Autres pharmacomodulations réalisées autour des diurétiques thiazidiques.

2.2. Les antihypertenseurs

Les recherches concernant les effets antihypertenseurs des arylthiadiazine 1,1-dioxydes découlent de la constatation que certains diurétiques thiazidiques, tels que le chlorothiazide, montrent également un effet hypotenseur. Assez rapidement, il a été démontré qu'il était possible de séparer l'activité antihypertensive de l'activité diurétique par exemple en supprimant la fonction sulfonamide en position 7. De ces travaux ressort en 1961 le diazoxide (Figure 8), un agent antihypertenseur puissant et sans effet marqué sur la diurèse [Rubin et al. 1961]. De nombreuses études ont été menées sur cette drogue qui malgré un bon effet hypotenseur *in vivo* provoque à long terme une rétention de sodium et peut engendrer l'apparition d'œdèmes. Par ailleurs, ainsi que nous le verrons dans le chapitre suivant, l'utilisation de ce composé va de pair avec l'apparition d'une hyperglycémie. Pour cette raison, l'utilisation en clinique du diazoxide a été limitée dans le traitement d'urgence de la crise hypertensive en milieu hospitalier. Le mécanisme d'action du diazoxide et de ses analogues proches est longtemps

resté mystérieux. Ce n'est qu'au début des années quatre vingt, avec la mise en évidence de l'existence de canaux potassiques sensibles à l'adénosine triphosphate (canaux K_{ATP}) et de leur implication au niveau du contrôle du potentiel membranaire et du tonus musculaire, que la cible de cette drogue a pu être identifiée. Sans entrer dans des détails qui seront discutés plus avant dans le travail, il a été démontré que le diazoxide provoque l'ouverture de ces canaux. Cette ouverture entraîne la sortie d'ions potassium, l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et, de manière un peu schématique, un effet myorelâchant sur la fibre musculaire lisse vasculaire. Il est donc à présent prouvé que l'effet hypotenseur du diazoxide est dû à une action sur les canaux potassiques du système cardio-vasculaire [Standen et al. 1989].

Il est évident que la découverte prometteuse du diazoxide a suscité un certain engouement pharmacochimique. De nombreuses pharmacomodulations ont donc été entreprises autour de la structure de ce composé « lead ». Malheureusement, malgré l'amélioration notable de l'activité antihypertensive par rapport au diazoxide, aucune drogue n'a été conduite au bout du développement clinique. De ce fait, le nombre de publications décrivant la préparation de nouveaux composés appartenant à cette famille est moins élevé que celui des diurétiques thiazidiques et va, à partir de 1963, rapidement chuter. Il reste cependant intéressant de décrire les résultats de ces pharmacomodulations et les relations structure-activité qui en découlent. Globalement, à l'examen des modifications structurales envisagées, il est possible de distinguer celles qui ont eu lieu peu après la découverte du diazoxide et qui exploitent généralement des modulations légères, de celles, plus éloignées dans le temps, qui présentent des structures plus complexes et dont les mécanismes d'action proposés s'éloignent de celui décrit pour le diazoxide et ses analogues proches.

Si nous reprenons l'ordre chronologique des recherches, il apparaît que les premières pharmacomodulations ont principalement concerné la position 3 du noyau thiadiazine et les positions 6 et 7 du noyau aromatique. Même s'il n'est pas toujours aisé de comparer entre eux les résultats pharmacologiques provenant de différents modèles, surtout s'il s'agit d'expérimentations *in vivo*, un certain nombre d'aspects structuraux influençant l'activité hypotensive ont pu être déduits de l'analyse des relations structure-activité; à savoir :

- Les composés insaturés sont sensiblement plus actifs que leurs homologues saturés [Topliss et al. 1962].
- La présence d'un atome d'halogène en position 6 ou 7 du noyau est un facteur favorable ; les positions 5 et 8, quant à elles, le sont beaucoup moins [Topliss et al. 1962, Grana et al. 1962, Bierbaum et al. 1963].
- En position 7, les groupements électroattracteurs tels que CF_3 ou NO_2 augmentent l'activité tandis que la présence de groupements électrodonneurs diminue l'activité [Grana et al. 1962, Topliss et al. 1962, Bierbaum et al. 1963].

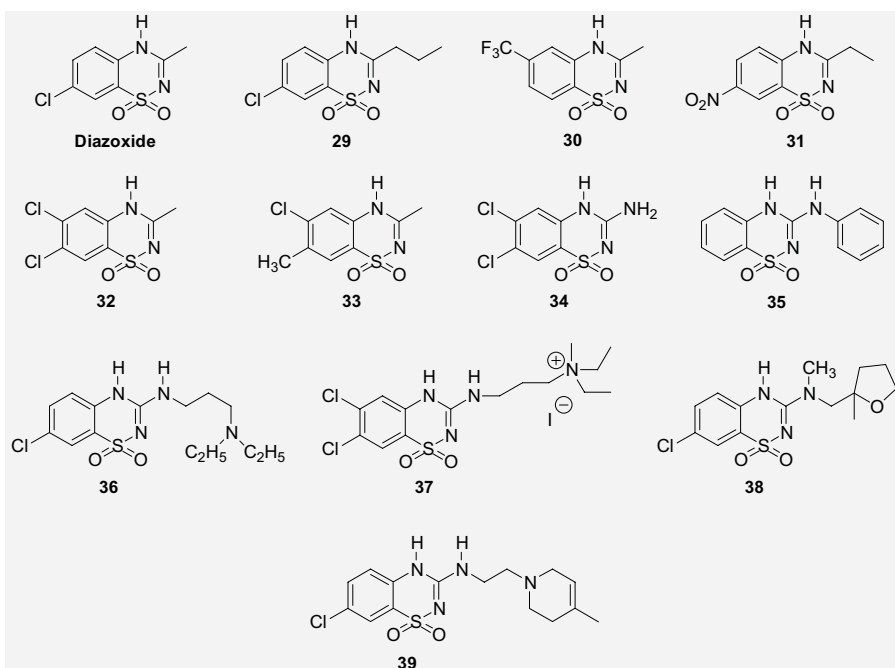


Figure 8 : Principales drogues issues des modulations autour du diazoxide présentant, selon la littérature, une bonne activité hypotensive.

- La disubstitution en position 6 et 7, surtout par deux halogènes, entraîne une amélioration de l'effet hypotenseur, les autres disubstitutions semblent moins favorables [Topliss et al. 1962 et 1964, Bierbaum et al. 1963, Raffa et al. 1964 et 1965, Pisanti et al. 1964, Marchetti et al. 1964].

- En position 3, la présence d'un alkyle court et/ou éventuellement ramifié est la substitution qui donne les meilleurs résultats, les dérivés 3-oxo sont par contre peu actifs. L'augmentation de la taille de la chaîne alkyle et les aryles diminuent par contre l'activité [Grana et al. 1962, Topliss et al. 1962 et 1964, Bierbaum et al. 1963, Pisanti et al. 1964].
- Le remplacement du groupement alkyle en position 3 par un groupement amine engendre une légère baisse mais pas de perte totale d'activité [Grana et al. 1962, Raffa et al. 1964 et 1965]. De plus, ces composés, comparativement aux dérivés 3-alkyles semblent également affecter la fréquence cardiaque et auraient donc un effet bradycardisant [Grana et al. 1962]. Les dérivés 3-alkylamino ou 3-arylamino ont aussi présenté un effet hypotenseur dans différents tests *in vivo*. Signalons encore que l'introduction d'une seconde fonction amine, cyclique ou non, en bout de chaîne aminoalkyle (**36**, Figure 8) permet de dissocier l'effet hypotenseur de l'effet bradycardisant [Di bella et al. 1978]. La quaternisation de l'azote non lié au cycle thiadiazine (**37**, Figure 8) permet également d'obtenir des composés hypotenseurs avec parfois un effet sur la fréquence cardiaque plus ou moins marqué [Parenti et al. 1983].
- La présence d'une fonction acide ou ester en position 3 ne semble pas être favorable à l'activité [Monzani et al. 1979].

Quelques dérivés parmi les plus intéressants et structuralement proches du diazoxide sont présentés dans la figure 8.

Signalons encore une étude sur l'effet diurétique, hypotenseur et hyperglycémiant de quelques dizaines de composés de type 7-chloro substitués en position 3 par des fonctions aminées ou polyaminées, cycliques ou non réalisées par Wollweber en 1981 [Wollweber et al. 1981]. Cette étude a permis de mettre en évidence pour plusieurs composés (**38** et **39**, Figure 8) une action hypotensive aussi puissante que celle du diazoxide dans une évaluation *in vivo*.

Certains composés de type 3-oxo substitués en position 2 par un groupement pipérazine (**40**, Figure 9) ont été décrits comme des bloqueurs adrénergiques [Hayao et al. 1968].

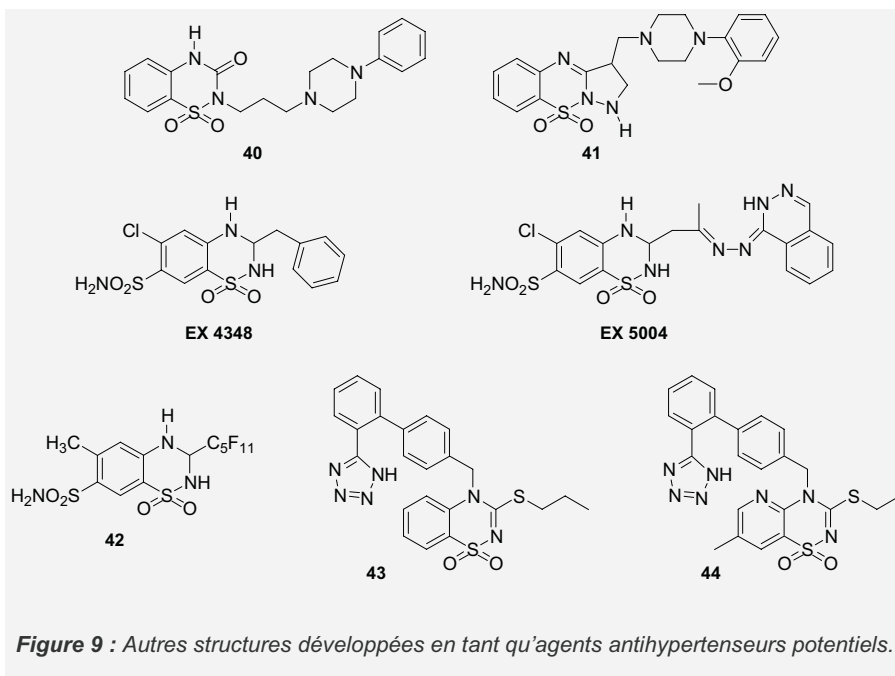


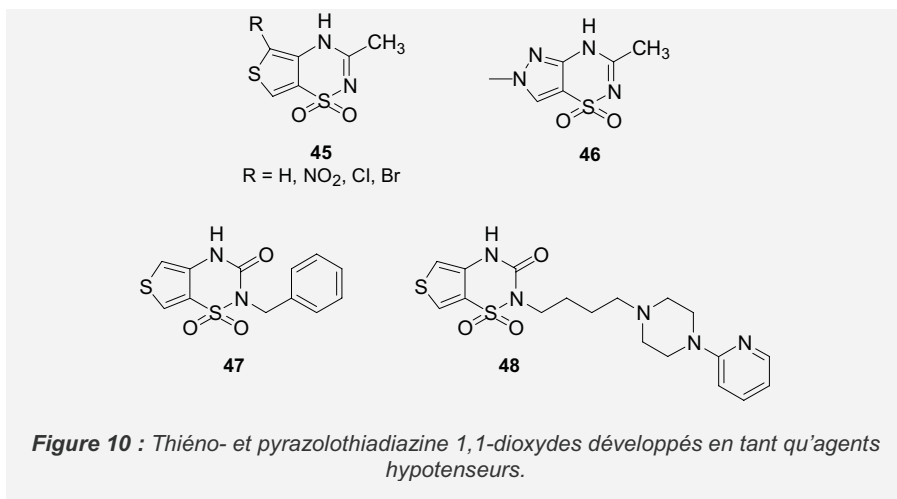
Figure 9 : Autres structures développées en tant qu'agents antihypertenseurs potentiels.

30 ans après cette publication, une équipe taïwanaise a proposé des structures tricycliques proches soit en série quinazolinone, soit en série benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**41**, Figure 9) [Chern et al. 1998].

D'autres structures ont été étudiées et présentées comme des agents antihypertenseurs potentiels. Il s'agit notamment des dérivés possédant une fonction sulfonamide en position 7 tels que le EX 4348 ou le EX 5004 (Figure 9) [Edlin et al. 1965, Severs et al. 1965] ou encore en position 7, des dérivés substitués en 3 par des chaînes polyfluoroalkylées (**42**, Figure 9) [Greiner et al. 1986]. Des benzo et des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 3 et 4 (**43** et **44**, Figure 9) sont présentés comme des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II [Weller et al. 1992].

Toujours proches de la structure du diazoxide, quelques dérivés en séries 4*H*-thiéo[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde et 4*H*-pyrazolo[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde méthylés en position 3 ont été préparés et évalués en tant qu'agents antihypertenseurs (**45** et **46**, Figure 10). Il ne s'agit pas des premiers dérivés thiophéniques et pyrazoliques décrits mais ils doivent être considérés comme des bioisostères du diazoxide. Contrairement à ce qui a été reporté pour

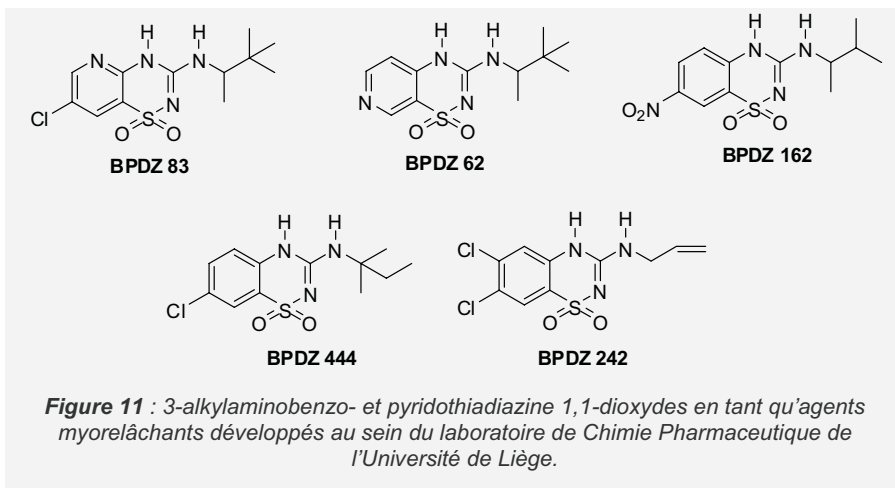
d'autres familles chimiques telles que les 1,2,4-benzothiadiazépine 1,1-dioxydes, le remplacement « bioisostérique » du noyau benzénique par un noyau thiophénique ou pyrazolique entraîne malheureusement une diminution notable voire une perte totale d'activité [Vega et al. 2004].



Nous pouvons par ailleurs signaler la description de 2,3-dihydro-3-oxo-4*H*-thiéno[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 2 par des groupements de type benzyle, phényle substitué ou pipérazinyle [Arranz et al. 2000]. Le choix des substituants en position 2 est basé sur des travaux relatifs à d'autres séries chimiques. Plusieurs composés (**47** et **48**, Figure 10) de cette série ont montré une activité antihypertensive identique à celle du diazoxide. Cependant, le mécanisme d'action ne passe pas par l'activation des canaux K_{ATP} mais semble plutôt impliquer le blocage des canaux calciques voltage-dépendants.

Nous n'évoquerons que très brièvement pour l'instant les analogues pyridiniques et benzéniques du diazoxide que nous avons développés au sein de notre laboratoire puisque cela fera l'objet d'une discussion spécifique dans un chapitre ultérieur. Qu'il soit juste noté à ce stade que le remplacement du noyau benzénique du diazoxide par un noyau pyridinique entraîne une perte sensible d'activité lorsqu'un groupement alkyle est placé en position 3. Par contre, plusieurs composés de type 3-aminoalkyle en séries benzénique et pyridinique

(BPDZ 62, BPDZ 83, BPDZ 162, BPDZ 242 et BPDZ 444, Figure 11) se sont révélés être de puissants agents myorelâchants dans un modèle d'aorte de rat précontractée au KCl [Pirotte et al. 2000, de Tullio et al. 1996 et 2005, Boverie et al. 2005]. Le mécanisme d'action de la plupart de ces drogues passe probablement par l'activation des canaux K_{ATP} .



2.3. Les activateurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP

Sans entrer dans des détails qui seront développés dans un chapitre ultérieur, il est néanmoins utile de présenter brièvement les canaux potassiques sensibles à l'ATP (canaux K_{ATP}). Il s'agit de canaux ioniques dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlées par le métabolisme cellulaire et plus spécifiquement par le rapport des concentrations ATP/ADP intracellulaire [Cook et al. 1984]. Ils modulent le flux d'ions potassium au travers de la membrane plasmique et jouent ainsi un rôle prépondérant dans le contrôle du potentiel membranaire et donc de l'excitabilité cellulaire. La présence de ces canaux a été identifiée au niveau de nombreux tissus tels que le cœur et les tissus musculaires lisses et squelettiques, au niveau du tissu endocrinien et du système nerveux central [Noma 1983, Cook et al. 1984, Spruce et al. 1985, Bernardi et al. 1988]. Des études relativement récentes ont permis de montrer que ces canaux sont constitués d'un assemblage en tétramères de sous-unités de type Kir (identiques à celles identifiées dans la

famille des canaux potassiques « inward rectifier »), qui forment le pore du canal, et de sous-unités de type SUR (« sulfonylurea receptor ») sur lesquelles sont présents les différents sites récepteurs des ouvreurs et des bloqueurs du canal (Figure 12).

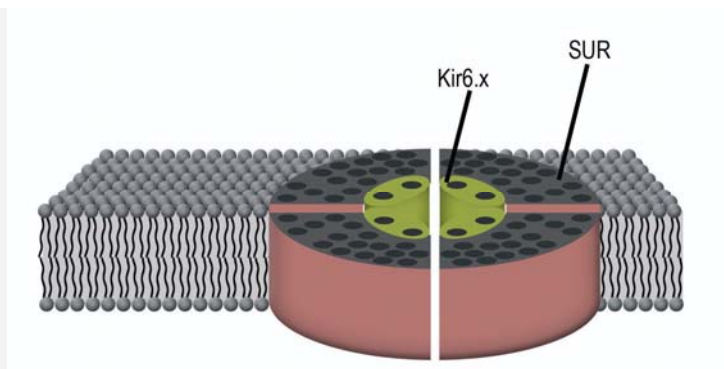


Figure 12 : Structure des canaux potassiques sensibles à l'ATP.

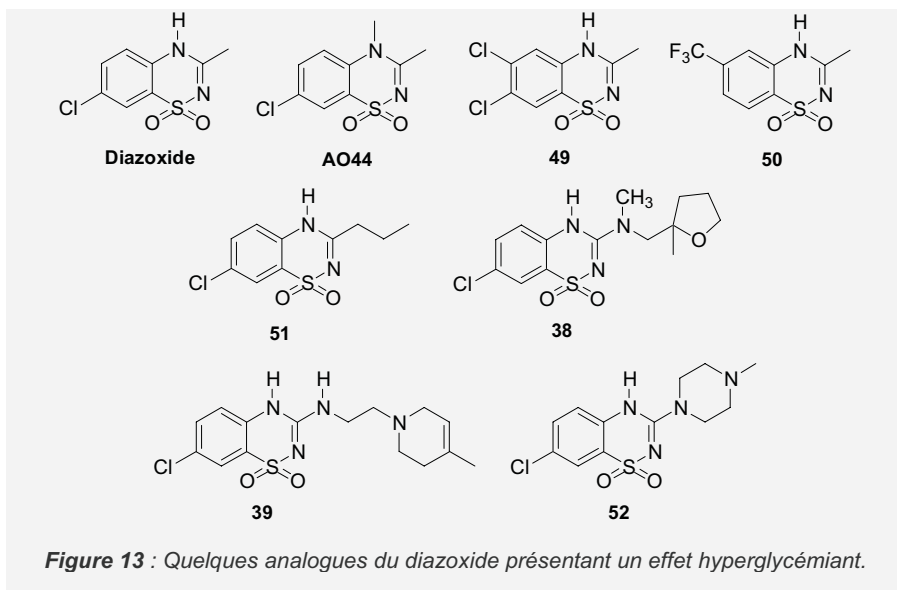
Différents isoformes de ces sous-unités ont été identifiés et il semble que leur agencement varie en fonction de leur localisation tissulaire [Inagaki et al. 1995, Seino 1999, Moreau et al. 2005]. Les canaux K_{ATP} sont impliqués dans d'importants processus physiologiques tels que le contrôle du tonus et de la contractilité des muscles lisses ou le processus insulino-sécrétoire [Ashcroft et al. 1990, Aguilar-Bryan et al. 1999].

Nous avons vu précédemment que l'effet hypotenseur du diazoxide (Figure 13) avait pu être attribué à son action activatrice des canaux potassiques sensibles à l'ATP présents au niveau des fibres musculaires lisses vasculaires [Standen et al. 1989]. Nous ne reviendrons bien évidemment pas sur les développements des arylthiadiazine 1,1-dioxydes à ce niveau. Par contre, l'activation des canaux K_{ATP} pancréatiques entraîne l'inhibition de la sécrétion d'insuline. De ce fait, des molécules capables d'activer les canaux pancréatiques (PCOs) sont d'une grande utilité dans le traitement de désordres métaboliques entraînant une hypersécrétion d'insuline tels que l'hyperinsulinisme chez l'enfant et la nésidioblastose. C'est au niveau pancréatique que le diazoxide prend une importance accrue. Comme nous l'avons vu, ce composé a été initialement développé pour son action antihypertensive. Or, il a été constaté que l'utilisation

du diazoxide, tout comme dans une moindre mesure le chlorothiazide ou le trichlorométhiazide, provoquait l'apparition d'une importante hyperglycémie [Tabachnick et al. 1965, Black et al. 1968, Gulbenkian et al. 1972]. Le mécanisme de cette hyperglycémie resta longtemps une question en suspens jusqu'à la découverte des propriétés activatrices des canaux K_{ATP} du diazoxide [Trude et al. 1986, Dunne et al. 1987]. Pourtant, dès la fin des années soixante, le diazoxide fût proposé dans le traitement des états d'hyperinsulinémie. Malgré les nombreux effets secondaires qu'il engendre de manière parfois non négligeable (hirsutisme, tachycardie, œdème, ...) [Black et al. 1968], cette drogue est restée durant longtemps et reste encore la seule utilisable dans le traitement de ces pathologies. Ensuite, durant une longue période, peu de développements relatifs à l'effet hyperglycémiant des arylthiadiazine 1,1-dioxydes sont décrits. Wales et al. présentent une étude de relations structure-activité sur base de dérivés saturés et insaturés très proches du diazoxide [Wales et al. 1968]. Ils constatent que les dérivés insaturés expriment une activité hyperglycémiant plus marquée que les dérivés saturés et que cette hyperglycémie est souvent accompagnée d'une réduction de la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, les composés 6 et/ou 7-substitués par un atome de chlore ou un groupement trifluorométhyle sont les plus actifs ; les positions 5 et 8 étant moins favorables. En outre, les meilleurs résultats sont obtenus avec des substituants alkyles courts (préférentiellement méthyle) en position 3 ; la présence d'un groupement phényle est très défavorable. Plusieurs composés sont présentés comme aussi actifs ou légèrement plus actifs que le diazoxide (**49-51**, Figure 13). Cet effet sur la glycémie s'accompagne souvent d'une réduction du volume urinaire.

L'analogue méthylé en position 4 du diazoxide, appelé AO44 (Figure 13), a également été décrit comme possédant, *in vivo*, un effet plus prononcé que le diazoxide sur la glycémie tout en étant moins hypotenseur [Lopez et al. 1971].

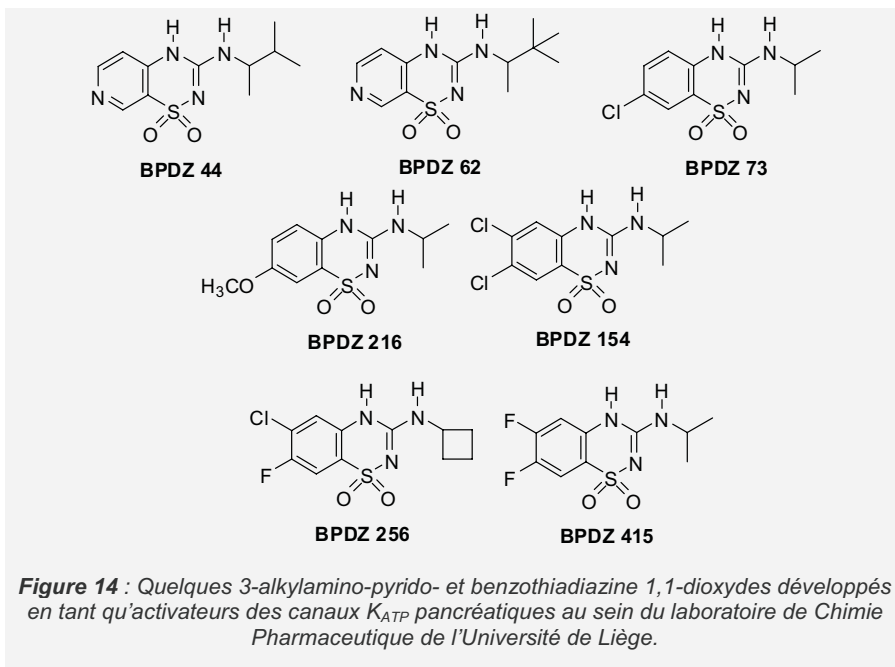
En 1981, Wollweber montre que certains dérivés de type 3-alkylamino (**38**, **39** et **52**, Figure 13) possèdent une faible activité hyperglycémiant et ont également un effet sur la sécrétion d'insuline mais à des doses beaucoup plus élevées que celles du diazoxide [Wollweber et al. 1981]. Deux de ces composés (**38** et **39**, Figure 13) possèdent également une activité antihypertensive.



Ainsi, le diazoxide et quelques uns de ses analogues proches sont restés pendant très longtemps les seules drogues capables d'exercer un effet hyperglycémiant probablement par inhibition de la sécrétion d'insuline qui résulte d'une activation des canaux K_{ATP} pancréatiques. Dans le courant des années nonante, l'intérêt de développer des activateurs des canaux K_{ATP} de type pancréatique a notablement grandi suite à plusieurs études postulant notamment la présence de canaux similaires au niveau du système nerveux central [Mourre et al. 1990, Fosset et al. 1992] et surtout à différents essais cliniques démontrant l'effet bénéfique du diazoxide dans des pathologies telles que le diabète de type 1 et 2 et l'obésité [Björk et al. 1996, Alemzadeh et al. 1998, Rasmussen et al. 2000].

Notre laboratoire s'est donc investi dans un projet de recherche visant à la préparation et l'évaluation d'activateurs des canaux K_{ATP} sélectifs du tissu pancréatique, tout d'abord en investiguant les analogues pyridiniques du diazoxide puis des dérivés 3-aminoalkyles en série pyridinique et benzénique. Ces travaux seront décrits en détail plus avant dans le manuscrit, mais il convient de signaler à ce stade que ces recherches ont permis d'obtenir les premiers activateurs puissants et sélectifs des canaux K_{ATP} pancréatiques (sous-type SUR 1). Ces drogues, telles que le BPDZ 44, le BPDZ 62, BPDZ 73, le BPDZ 154, le BPDZ 216, le BPDZ 256, le BPDZ 415 (Figure 14), inhibent la sécrétion d'insuline avec

une plus grande efficacité que le diazoxide. De plus, leur effet myorelâchant est quant à lui fortement réduit par rapport au diazoxide. Signalons par ailleurs que quelques dérivés de type 3-cyclobutylamino proches du BPDZ 256 ont été synthétisés et présentés également comme des activateurs potentiels des canaux K_{ATP} sélectifs du sous-type SUR1 [Peat et al. 2002].



La découverte de ces composés a permis d'entrevoir la possibilité d'une utilisation clinique des activateurs sélectifs du tissu pancréatique, ce qui jusqu'alors restait difficilement envisageable vu les très nombreux effets secondaires du diazoxide [Hansen J.B. 2006]. La société Novo-Nordisk a dès lors entrepris l'exploration d'analogues thiophéniques de nos composés pyridiniques et benzéniques. Une première série de 3-alkylamino-4*H*-thiéo[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes structuralement proches du BPDZ 73 a donc été synthétisée et évaluée dans différents modèles pharmacologiques. Trois composés, le NNC 55-0118, qui est l'analogue stricte du BPDZ 73, le NN-414, un dérivé 3-méthylcyclopropylamino et le NNC 55-0462, l'homologue 3-méthylcyclobutylamino (Figure 15) se sont révélés être particulièrement puissants

en tant qu'inhibiteurs de la sécrétion d'insuline [Nielsen et al. 2002]. Des études mécanistiques ont démontré que leur action biologique résultait d'une activation des canaux potassiques de type pancréatique (Kir6.2/SUR1) [Dabrowski et al. 2003]. De plus, tout comme leurs bioisostères benzéniques, ils n'ont montré qu'une faible activité sur les canaux potassiques des fibres musculaires lisses vasculaires (Kir6.1/SUR2B). Dans cette série, les relations structure-activité sont fort proches de celles définies en séries pyridiniques et benzéniques (Cf. Figure 15). Ainsi, la présence d'une courte chaîne alkylamine ou mieux d'une chaîne cycloalkylamine est favorable à l'activité. Le passage du groupement cyclopropyle (NN-414) au cyclobutyle (NNC 55-0462) est plutôt favorable (Cf. Figure 15) ; l'augmentation de la taille du cycle entraîne ensuite une diminution de l'activité [Nielsen et al. 2002]. Plus récemment, de nouvelles pharmacomodulations ont démontré d'une part qu'il est possible de remplacer l'atome de chlore du noyau thiophénique par un atome de brome sans perte d'activité (**53**, Figure 15) et d'autre part que l'introduction en position 3 d'un groupement 1-méthyl-1-phénéthyle (**54**, Figure 15) donne également des composés très puissants et très sélectifs du sous-type SUR-1 [Nielsen et al. 2006]. Par contre, la modification de la position de l'atome d'halogène du noyau thiophène ou de la position du soufre thiophénique est relativement défavorable à l'activité sur les canaux potassiques (**55** et **56**, Figure 15).

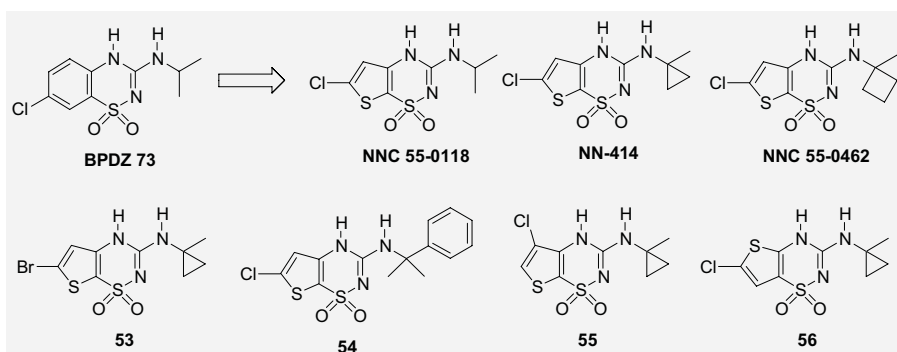


Figure 15 : Les 3-alkylamino-thiéo-thiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} pancréatiques.

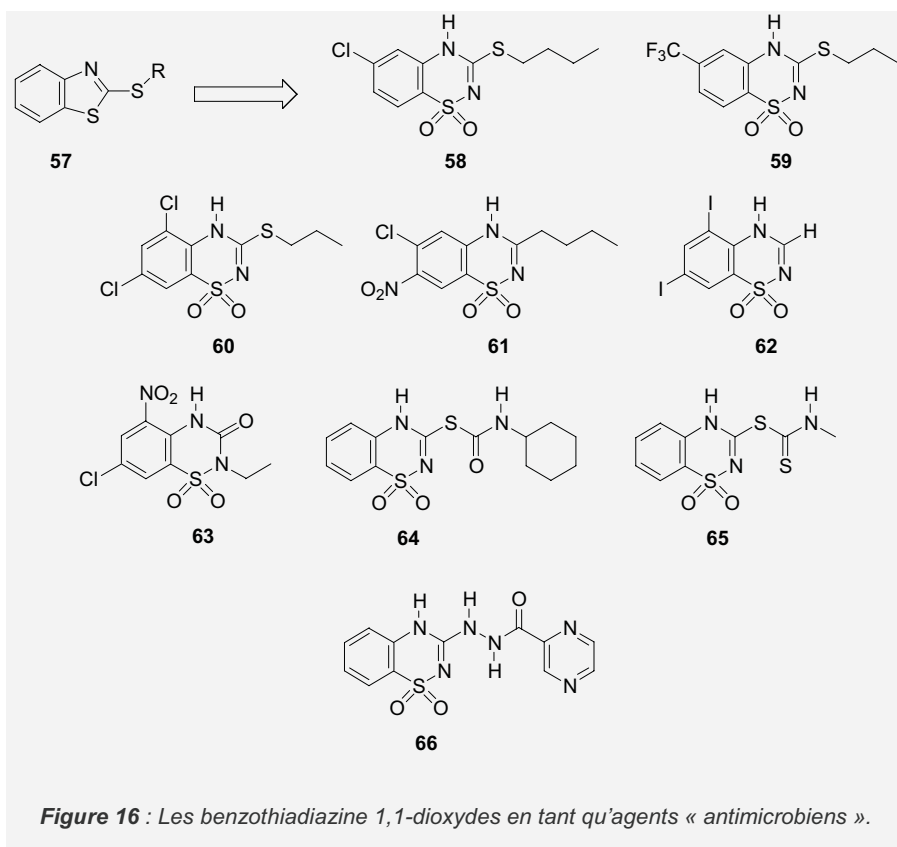
De part leurs profils pharmacologiques *in vitro*, le NNC 55-0118 et son homologue le NN 414 ont été largement étudiés dans différents modèles *in vivo*.

Ainsi, à des concentrations élevées, le NNC 55-0118 a montré une action protectrice des îlots pancréatiques de rat contre les effets toxiques de la streptozotocine, l'alloxan, le nitroprussiate sodique et l'interleukine-1 β [Kullin et al. 2000 et 2003]. D'autres données *in vivo* obtenues avec le NN 414 indiquent que ce composé améliore l'activité des cellules B pancréatiques et réduit l'insulinitis dans un modèle de diabète de type 1 chez le rat [Skak et al. 2004]. Compte tenu des résultats pharmacologiques obtenus avec le NN 414, le développement de cette drogue a été poursuivi en phase clinique où il a été démontré qu'elle était capable de diminuer le niveau d'insuline chez des sujets mâles sains [Zdravkovic et al. 2005]. Malheureusement, le développement du NN 414 a dû être stoppé en phase clinique II à cause de l'augmentation indésirable du niveau des enzymes hépatiques dans le sang, suggérant une hépato-toxicité [Pirotte et al. 2005].

2.4. Les benzothiadiazines en tant qu'agents « antimicrobiens ».

Début des années septante, une série d'articles provenant de l'équipe de Di Bella de l'Université de Modène présente la synthèse et l'évaluation biologique de composés benzothiadiaziniques en tant qu'agents antimicrobiens. Le point de départ rationnel de ces recherches ne fait pas référence aux sulfamidés antibactériens mais plutôt à des dérivés de type benzothiazole (**57**, Figure 16) connus pour posséder une activité antimicrobienne. Sur cette base, Di Bella prépare et évalue une série de 3-alkylsulfanyles qui sont diversement substitués sur le noyau aromatique [Di Bella et al. 1972]. L'analyse des relations structure-activité montre que la plupart des dérivés possédant une chaîne alkyle courte et un halogène en position 5 ou 6 (**58**, Figure 16) exerce une activité antimicrobienne sur des souches Gram + de type staphylocoque. Aucun effet n'est relevé sur les souches de type Gram -. D'autres articles suivent décrivant de nouvelles pharmacomodulations. Par exemple, en série 3-alkylsulfanyle, la substitution des positions 2 et/ou 4 semble défavorable à l'activité [Di Bella et al. 1973a], par contre, la présence en position 6 d'un groupement trifluorométhyle ou en 5 et 7 de deux atomes de chlore et en 3 d'un groupe alkyle court (**59** et **60**, Figure 16) donne des composés actifs sur les Gram + de type staphylocoque, streptocoque et diplocoque [Di Bella et al. 1979a et b]. Le remplacement de la fonction 3-alkylsulfanyle par un groupement alkyle court donne également des composés

actifs sur certaines bactéries de type Gram +, surtout lorsqu'un groupement NO₂ est en position 5 ou 7 ou encore deux atomes d'iode en position 5 et 7 (**61** et **62**, Figure 16) [Monzani et al. 1973 et 1974]. Le passage en série 3-oxo permet également d'obtenir des composés actifs sur Gram +, surtout si ces composés sont substitués en position 2 par des groupements alkyles courts et sur le noyau aromatique par un groupement NO₂ (**63**, Figure 16) [Di Bella et al. 1973b et 1974a].



Signalons enfin que des dérivés substitués en position 3 par des fonctions esters thio- ou dithiocarbamiques ont également été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Certains composés (**64** et **65**, Figure 16) montrent une faible activité sur certaines souches de Gram + et sur le mycélium du genre *Candida* [Di Bella et al. 1983]. L'efficacité antimicrobienne réelle des

drogues présentées dans ces différents articles, reste difficile à évaluer car aucune référence connue n'est utilisée à titre de comparaison dans les différentes évaluations pharmacologiques. Aucun des composés étudiés ne semble avoir dépassé ce stade de « screening » expérimental et aucune autre équipe n'a développé des arylthiadiazines dans cette indication. Cet axe de recherche resta donc marginal et limité. Tout récemment, Kamal et al. ont proposé d'utiliser le noyau 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde comme structure hétérocyclique de base et d'y greffer en position 3 des groupements pyridine ou pyrazine, connus pour leur effet anti-tuberculeux [Kamal et al. 2006]. Seule une drogue (**66**, Figure 16) a montré une activité contre les mycobactéries de la tuberculose dans une évaluation *in vitro*. Cependant, sa faible biodisponibilité affecte de manière importante son efficacité *in vivo*.

2.5. Les benzothiadiazines à propriétés « anti-inflammatoires ».

De la même manière que pour les composés à propriétés « antimicrobiennes », les travaux relatifs à la synthèse et à l'évaluation de benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'agents « anti-inflammatoires » restent limités à une seule équipe ainsi qu'à quelques articles et n'ont débouché, à notre connaissance, sur aucun dérivé pharmaceutiquement exploitable. Basé sur la constatation que toute une série d'anti-inflammatoires non stéroïdiens sont de type aryle ou hétéroaryle et dans la plupart des cas porteurs d'une fonction acide, Raffa et al. envisagent d'utiliser le noyau benzothiadiazine comme structure de base pour le « design » de nouveaux anti-inflammatoires et d'y greffer, au bout d'un linker, une fonction acide carboxylique soit en position 2, soit en position 3. Les premiers composés sont de type 3-oxo porteurs en position 2 ou en position 3 d'une fonction acide et diversement substitués sur le noyau aromatique [Raffa et al. 1979]. Les composés synthétisés sont évalués dans un modèle d'œdème induit à la carragénine chez le rat. L'indométacine sert de référence. Les composés substitués en position 3 ne semblent pas très actifs dans le modèle choisi. Par contre, quelques composés 3-oxo (**67** et **68**, Figure 17) se montrent aussi actifs que la référence mais à des doses 10 à 20 fois supérieures. Ultérieurement, il a été envisagé de déplacer la chaîne acide de la position 2 à la position 3 tout en éliminant l'atome d'oxygène dans cette position [Andrisano et al. 1981]. Le même

précédemment. Seuls les composés NH (**73** et **74**, Figure 17) présentent la même activité que la plupart de leurs analogues décrits précédemment.

2.6. Les benzothiadiazines en tant qu'inhibiteurs de la HCV NS5B polymérase.

Il s'agit d'une des cibles les plus récentes du noyau benzothiadiazine 1,1-dioxyde. De nombreux articles sur le sujet sont parus en 2005 et 2006.

L'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) entraîne souvent l'apparition de maladies chroniques et sévères du foie pouvant même aller jusqu'à la mort du patient. Il s'agit d'un problème touchant plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de millions d'individus dans le monde. De ce fait, de nombreuses recherches ont été entreprises dans le but de mettre au point de nouvelles stratégies de traitement et d'éradication du virus chez le patient infecté. L'approche thérapeutique classique consiste en une combinaison de IFN- α (α -interféron pégylé) et de ribavirine qui est souvent limitée par les aspects toxicité et tolérabilité. C'est pourquoi, des efforts significatifs ont été entrepris et dirigés vers de nouvelles cibles thérapeutiques situées au niveau du génome du HCV. La NS5B RNA polymérase RNA-dépendante (RdRp), de par son rôle important dans la réplication du virus, a été l'une des cibles protéiniques les plus étudiées. Plusieurs études ont permis d'identifier des inhibiteurs nucléosidiques ou non. Issue d'une approche de type « High-Troughput Screening » effectuée au sein de la société GlaxoSmithKline, une petite série de [*N*-1-alkyl-4-hydroxyquinolon-3-yl]benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**75** et **76**, Figure 18) a pu être identifiée comme étant des inhibiteurs non-nucléosidiques de polymérase au stade initial de la réplication du RNA du HCV [Dhanak et al. 2002]. Le remplacement du noyau quinolinone par un noyau 1,8-naphtyridone peut s'effectuer de manière bioisostérique et conduit à des composés de même activité (**77**, Figure 18) [Pratt et al. 2005]. La nature du groupement lié en position *N*-1 du noyau quinolone ou naphtyridone semble également exercer un effet extrêmement important sur le pouvoir inhibiteur de la HCV NS5B polymérase. En effet, si l'introduction d'un groupement benzyle paraît favorable, la présence d'une ramification sur le carbone en α de l'azote *N*-1 semble avoir un impact négatif. L'insertion sur cette

chaîne latérale en *N*-1 d'un groupement NH entre l'azote intracyclique et la chaîne hydrocarbonée permet également de maintenir l'activité inhibitrice sur les génotypes 1a et 1b de la HCV polymérase, surtout si la chaîne latérale alkyle est de type alkyle court ou cycloalkyle (**78** et **79**, Figure 18).

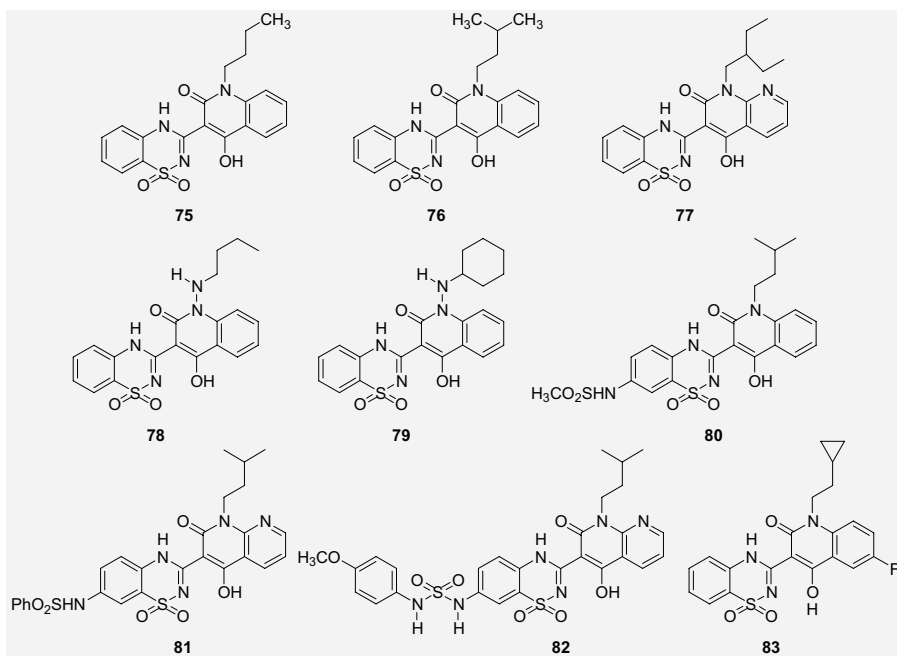


Figure 18 : Benzothiadiazine 1,1-dioxydes inhibiteurs de HCV NS5B polymérase.

Le remplacement du « linker » NH par un atome d'oxygène entraîne une perte drastique d'activité [Pratt et al. 2005]. D'autres travaux de pharmacomodulations ont été envisagés visant l'introduction de divers substituants sur le noyau benzénique du cycle thiadiazine tels que des groupements OCH_3 ou OH en position 5, 6 et 7 ou des groupements alkyl- ou arylsulfonamino en position 7 [Rockway et al. 2006]. La présence d'un groupement sulfonamide sur le noyau thiadiazine entraîne une diminution sensible des valeurs d' IC_{50} pour l'inhibition des génotypes 1a et 1b de la HCV NSB polymérase (**80** et **81**, Figure 18). Dans la lignée de ces travaux, le remplacement de la fonction sulfonamide en position 7 du noyau benzothiadiazinique par une fonction de type « aminosulfonamino » a également été exploré (**82**, Figure 18)

[Krueger et al. 2006]. Ces modulations amènent plutôt une perte d'activité par rapport aux composés sulfonamido. Une dernière étude reprend le « scaffold » 3-(1,1-dioxo-2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2(1*H*)-quinolinone décrit par Dhanak en 2002 et module à la fois les substituants du noyau phényle de la partie quinolone ainsi que la nature de la chaîne alkyle fixée sur l'azote en *N*-1 [Tedesco et al. 2006]. Plusieurs composés se montrent particulièrement actifs en tant qu'inhibiteurs de la HCV NSB polymérase et l'un d'un d'entre eux (**83**, Figure 18) est entré dans une phase de développement préclinique.

2.7. Les arylthiadiazines en tant qu'anti-HIV-1.

Il est inutile de présenter longuement le virus HIV-1 et les ravages qu'il cause à travers le monde. Il est donc logique que de nombreux groupes de recherches se soient engagés dans l'exploration de nouveaux composés aux propriétés anti HIV-1. Les travaux utilisant le « scaffold » arylthiadiazine ne sont cependant pas très nombreux et donc cette série n'a pas joué ou ne joue pas un rôle important dans la recherche anti-virale à ce niveau. Il est néanmoins utile d'évoquer ces séries car elles sont principalement basées sur le noyau thiénothiadiazine 1,1-dioxyde, ce qui est assez rare et mérite donc que nous nous y intéressions. Sur le plan de l'action biologique potentielle, ces dérivés seraient capables d'inhiber de manière spécifique la transcriptase inverse du virus HIV-1. Cette cible est d'ailleurs la cible principale de la plupart des anti-HIV connus tels que l'AZT (azidothymidine), le PMEA (adéfovir) ou la PMPA (ténofovir) (inhibiteurs nucléosidiques ou NRTI) ainsi que de la nevirapine et de l'efavirenz (inhibiteurs non nucléosidiques ou NNRTI), ces derniers se fixant sur un site allostérique proche du site actif de la polymérase. Cette approche provoque cependant l'apparition d'une résistance virale qui oblige souvent l'application d'une trithérapie qui combine différents anti-viraux. Sur base de la découverte que certains 1,2,4-benzothiadiazine 1-oxydes (NSC 287474, Figure 19) agiraient puissamment en tant que « non nucléosidic reverse transcriptase inhibitors » [Buckheit et al. 1994, Hizi et al. 1993], Arranz et son équipe ont envisagé la préparation « d'analogues thiophéniques » de ces premiers composés [Arranz et al. 1999]. Les composés les plus actifs font partie de la série 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-thiéno[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**84-86**, Figure 19) et montrent une efficacité en tant

qu'inhibiteurs de la transcriptase inverse du virus HIV-1. La présence d'un groupement benzyle en position 2 semble absolument nécessaire à l'activité. L'introduction d'un atome de chlore sur le noyau benzyle en position 2 permet d'augmenter l'activité d'un facteur 10 [Arranz et al. 1998]. Les meilleurs groupements en position 4 restent le benzyle, le cyanométhyle et le propargyle (**87-89**, Figure 19). Le passage en séries thiéno[3,2-e]- (**90**, Figure 19) , thiéno[2,3-e]- (**91**, Figure 19) et pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**92**, Figure 19) entraîne une perte notable d'activité [Arranz et al. 1998].

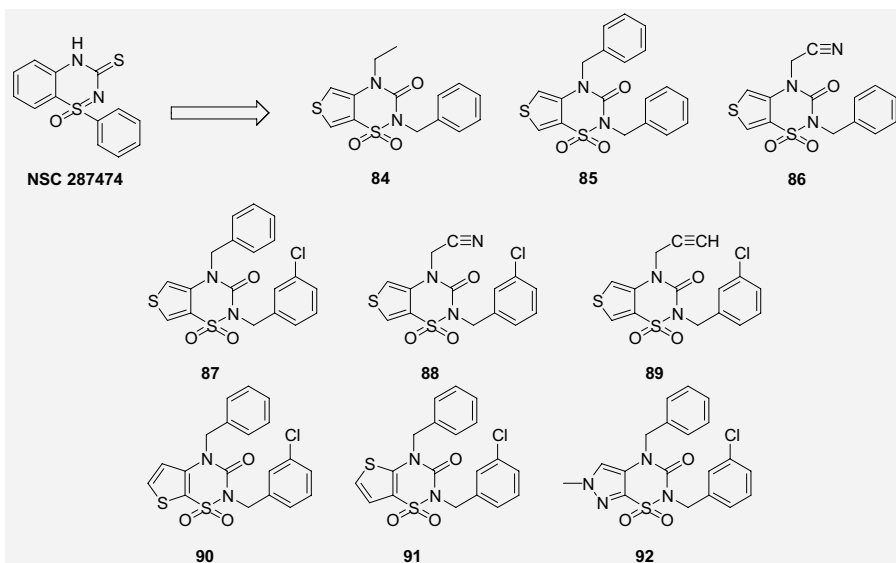


Figure 19 : Thiénothiadiazine 1,1-dioxydes inhibiteurs spécifiques la transcriptase inverse du virus HIV-1.

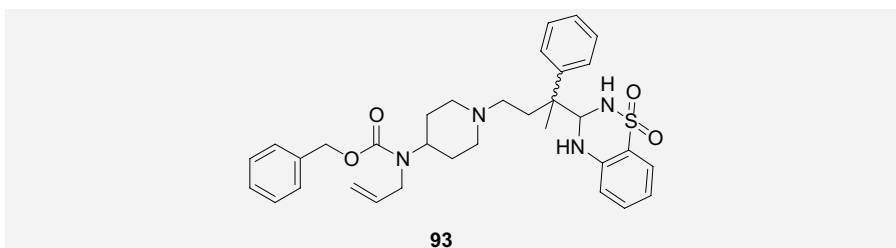


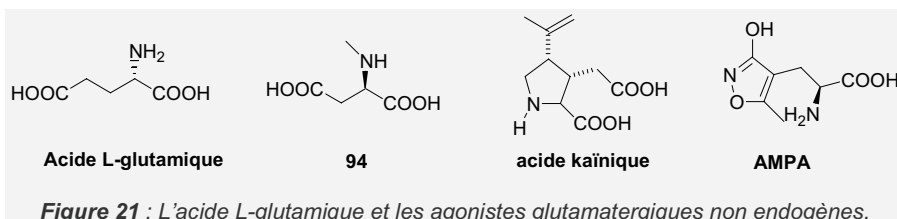
Figure 20 : Les benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'antagonistes du récepteur CCR-5 humain.

Signalons également que le « scaffold » benzothiadiazine 1,1-dioxyde a été utilisé dans le « design » et la préparation de systèmes hétérocycliques plus complexes qui ont été évalués en tant qu'antagonistes du récepteur macrophagique humain CCR-5 dans le traitement des infections au HIV-1 (93, Figure 20) [Kim et al. 2001].

2.8. Les arylthiadiazines et le système glutamatergique.

Le système glutamatergique, et plus spécifiquement les récepteurs à l'acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-yl)propionique (AMPA), étant développé en détail dans un des chapitres suivants, nous nous limiterons à présenter ici les grandes généralités de ce système et les quelques développements qui ont relié les récepteurs au glutamate et le noyau arylthiadiazine 1,1-dioxyde. De plus, cet axe de recherche étant encore en plein développement dans le milieu des industries pharmaceutiques, bon nombre de structures nouvelles ne sont décrites ou revendiquées que dans les brevets et donc ne sont pas accompagnées de données pharmacologiques.

L'acide L-glutamique, plus connu sous le vocable L-glutamate (Figure 21), est le principal acide aminé endogène agissant comme neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des mammifères. Les récepteurs au glutamate se divisent en deux grandes espèces : les récepteurs métabotropiques (mGluRs) et les récepteurs ionotropiques (iGluRs). Ces derniers sont des canaux ioniques sensibles au glutamate et perméables à différents ions. Il existe 3 sous-types de iGluRs : les récepteurs NMDA, KA et AMPA qui ont été identifiés en fonction de leur réponse à différents agonistes non endogènes.



Les récepteurs NMDA, sensibles à l'acide N-méthyl-D-aspartique (94, Figure 21), sont des canaux de haute conductance perméables aux ions

potassium, sodium et calcium. L'activité du canal dépend non seulement de la présence du ligand mais également du potentiel membranaire. Au repos, le canal est obstrué par des ions Mg^{2+} et se libère sous l'effet d'une dépolarisation [Bear et al. 2002]. L'activation des récepteurs NMDA jouerait un rôle crucial dans la plasticité synaptique et serait impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation [Danysz et al. 1995].

Dus à une colocalisation, les deux autres sous-types de récepteurs, KA et AMPA sont encore difficilement distinguables et restent parfois associés en un seul groupe [Bleakman et al. 2002]. De plus, l'acide kaïnique (Figure 21) qui se lie préférentiellement aux récepteurs KA est également un agoniste des récepteurs AMPA, ce qui ne favorise pas l'étude des récepteurs KA [Bettler et al. 1995]. Il est par contre aisé de comprendre les implications physiologiques des récepteurs à l'acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-yl)propionique (AMPA, Figure 21). En effet, ces canaux sont impliqués dans la neurotransmission glutamatergique excitatrice rapide et sont perméables à la fois aux ions potassium, sodium et, dans une moindre mesure, calcium. Les récepteurs AMPA interviennent, tout comme les récepteurs NMDA, dans les phénomènes de mémorisation.

Les implications des récepteurs glutamatergiques en thérapie sont nombreuses puisqu'il a été démontré qu'un désordre dans la stimulation de ces récepteurs pouvait avoir des conséquences extrêmement sérieuses. Une stimulation excessive des récepteurs entraîne des effets neurotoxiques (« excitotoxicité ») conduisant à la mort neuronale [Beal 1992]. Cette suractivation est décrite comme étant, au moins partiellement, à la base de diverses neuropathologies telles l'ischémie cérébrale, l'épilepsie et de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Huntington et la maladie d'Alzheimer. C'est pour cette raison que bon nombre d'études ont été menées afin de découvrir des antagonistes compétitifs, notamment des récepteurs AMPA [Stendbøl et al. 2002].

Par contre, au vu du rôle physiologique du glutamate et de ses récepteurs, il a été postulé qu'un hypofonctionnement glutamatergique pouvait être responsable de déficits cognitifs liés à l'âge ou à des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [Francotte et al. 2004]. L'effet bénéfique d'une activation des récepteurs glutamatergiques pourrait

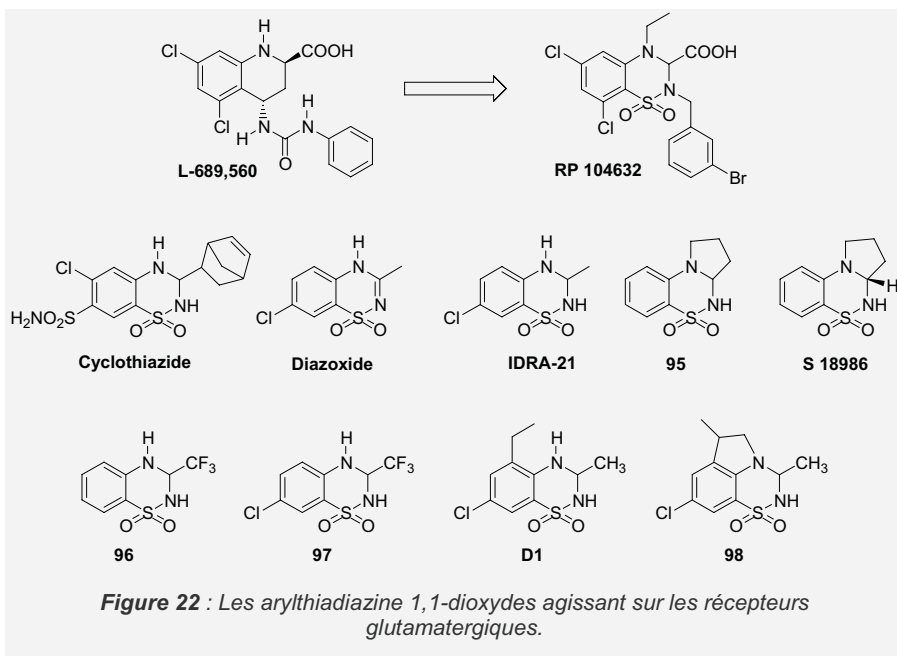
également se marquer dans des pathologies telles que la schizophrénie ou la dépression [Lynch et al. 1998]. L'augmentation des courants glutamatergiques a donc également constitué un axe important de recherches pharmacologiques.

Nous ne discuterons pas ici de l'ensemble des développements ayant abouti à la découverte d'agonistes ou d'antagonistes ou encore de modulateurs allostériques positifs ou négatifs des récepteurs glutamatergiques, mais nous nous focaliserons sur ceux, en petit nombre, qui ont utilisé le noyau arylthiadiazine 1,1-dioxyde.

Il a été démontré, en 1987, que la glycine pouvait agir comme coagoniste sur un site spécifique du récepteur NMDA pour amplifier l'action agoniste du glutamate [Johnson et al 1987] ; cette action étant indépendante de son effet sur les récepteurs de la glycine sensibles à la strychnine. Cette découverte a lancé de nombreuses recherches en vue de découvrir de nouveaux antagonistes NMDA inhibant l'effet de la glycine. Jimonet et al. ont ainsi développé une série de benzothiadiazine 1,1-dioxydes porteurs d'une fonction acide en position 3 sur la base de drogues connues pour leur effet sur le site à la glycine du récepteur NMDA telles que le L-689,560 (Figure 22), le but étant d'empêcher l'excitotoxicité liée à une hyperexcitation glutamatergique [Jimonet et al. 1994]. Une drogue, nommée RP 104632 (Figure 22) apparaît comme étant un puissant antagoniste du site à la glycine situé sur le récepteur NMDA et est présentée comme un possible agent neuroprotecteur.

Pour ce qui est de l'action au niveau des récepteurs AMPA, plusieurs types de modulateurs ont été développés, depuis les agonistes jusqu'aux antagonistes en passant par les modulateurs allostériques principalement positifs. La piste des agonistes a vite été abandonnée pour cause d'excitotoxicité au profit de celle des modulateurs allostériques positifs. Ceux-ci présentent l'avantage de permettre une régulation plus fine du signal puisque l'activité est liée nécessairement à la présence de ligands du récepteur AMPA. Par ailleurs, il a été démontré que plusieurs benzothiadiazine 1,1-dioxydes tels que le cyclothiazide, un diurétique bien connu (Figure 22), et le diazoxide (Figure 22) pouvaient potentialiser le courant des récepteurs AMPA [Partin et al. 1993, Impagnatiello et al. 1997]. Sur ces constatations, des dérivés analogues du diazoxide (série insaturée) et du cyclothiazide (série saturée) ont été synthétisés et évalués en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA/kaïnate dans un modèle

de type «excised outside-out patches» [Bertolino et al. 1993]. Si les différents analogues du diazoxide et du cyclothiazide se montrent moins actifs que leurs composés parents, un dérivé, l'IDRA-21 (Figure 22) qui est en fait l'analogue saturé du diazoxide, se montre 3 fois plus actif que ce dernier à une concentration de 100 μ M. L'IDRA-21 a par ailleurs démontré son efficacité dans des tests cognitifs chez l'animal [Zivkovic et al. 1995].



Une équipe de la société Servier a constaté qu'un dérivé de type pyrrolo-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**95**, Figure 22) décrit par Bernabei vingt ans plus tôt [Bernabei et al. 1976] était capable de potentialiser le courant induit par l'AMPA dans un modèle d'ovocytes de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA [Desos et al. 1996]. Suite à différentes études réalisées sur le cyclothiazide et l'IDRA-21 ayant montré l'impact de la stéréochimie sur l'activité, la préparation de chaque énantiomère du composé **95** a été envisagée, soit par synthèse stéréospécifique, soit par séparation chromatographique sur colonne chirale [Desos et al. 1996, Cobley et al. 2003]. L'énantiomère de configuration absolue S, nommé S18986 (Figure 22) est décrit comme le plus actif. Il potentialise en effet sélectivement le

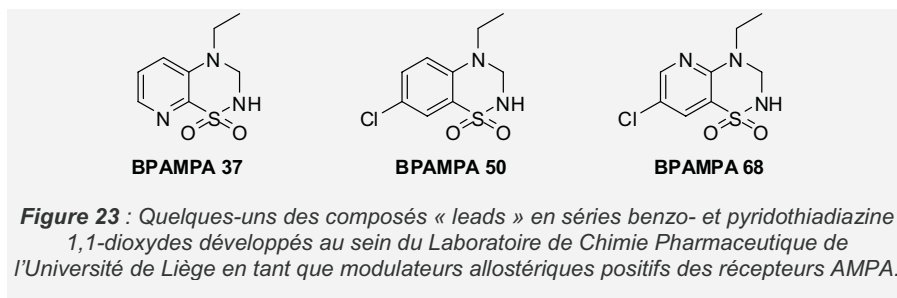
courant induit par l'AMPA mais n'a aucun effet lorsque la stimulation se fait avec le kaïnate ou le NMDA. Cette drogue est actuellement en phase clinique II.

En 2002, Braghiroli et son équipe préparent une série de composés substitués ou non en position 7 par un atome de chlore et en position 3 par des groupes de type CH_2Cl , CF_3 ou phényle substitué ou non en *para* par un hydroxyle ou un groupement diméthylamino [Braghiroli et al. 2002]. Ces composés étant des mélanges racémiques, les énantiomères de chaque couple sont séparés. Cependant, une fois en solution, les énantiomères purs racémisent très rapidement et les drogues racémiques sont donc testées en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA et KA. Seuls les composés porteurs d'un groupement CF_3 en position 3 (**96** et **97**, Figure 22) semblent augmenter le courant induit à l'acide kaïnique mais de façon moins importante que le cyclothiazide ou l'IDRA-21. Par contre, la présence d'un groupement CH_2Cl en position 3 entraîne plutôt un effet antagoniste sur le courant induit à l'acide kaïnique.

Toujours en 2002, une série d'analogues de l'IDRA-21 est préparée suivant une approche combinatoire complexe qui amène à la constitution d'une librairie de 16 mélanges (« pools ») de 8 composés obtenus par combinaison croisée de 8 aminosulfonamides avec 8 aldéhydes [Phillips et al. 2002]. Les aminosulfonamides sont choisis en fonction de leur disponibilité commerciale ou de leurs relations avec les sous-structures du cyclothiazide et de l'IDRA-21 ; les aldéhydes sont sélectionnés en fonction de leur disponibilité commerciale et de manière à explorer la tolérance pour différentes fonctionnalités en position 3. Les structures obtenues combinent ainsi les séries 7-Cl, 7-Br, 7- NO_2 , 6-Cl, 6-Cl-7- SO_2NH_2 , 5-éthyle, 7-chloro-5-éthyle avec des substituants en position 3 de type alkyle court ou long, phényle substitué ou non par un ou plusieurs groupements méthoxy ou pyridyle. L'évaluation pharmacologique de ces « pools » doit permettre, en principe, d'identifier des composés « hits » qui devront être ensuite resynthétisés individuellement et réévalués. Ainsi, le composé appelé D1, un dérivé 7-chloro-5-éthyle (Figure 22) apparaît comme le composé le plus intéressant puisqu'il semble plus affiné pour le récepteur AMPA que l'IDRA-21. Sur base de ce composé « hit » et de l'IDRA-21, de nouvelles pharmacomodulations ont ensuite été envisagées de manière à apporter un éclairage sur l'influence qu'exercent des substituants halogénés et alkylés sur l'activité. Quatre groupes de

composés ont ainsi été préparés en modulant principalement la longueur de la chaîne alkyle en position 5 (de méthyle à propyle ou isopropyle), la nature du substituant en cette position (F, Cl, OCH₃) et la nature du substituant en position 7 (H, halogène, alkyle court, OCH₃). Les relations structure-activité ayant démontré que la présence d'alkyles longs était défavorable à l'activité, seuls des dérivés porteurs d'un méthyle en position 3 ont été synthétisés. Les résultats pharmacologiques obtenus démontrent que le meilleur substituant en position 5 est l'éthyle tandis qu'un atome de fluor ou de chlore en position 7 semble également favorable. Le remplacement de l'éthyle en position 5 par un méthyle amène, par exemple, une diminution drastique de l'affinité pour le récepteur AMPA. Il en est de même pour l'introduction dans cette même position d'un atome de fluor ou d'un groupement méthoxy qui amène à des composés très peu affins. Des composés tricycliques qui peuvent être considérés comme des analogues indolyles du composé D1 ont aussi été préparés et évalués. Certains de ces dérivés (i.e. **98**, Figure 22) se sont révélés être aussi actifs que leurs homologues ouverts. Le remplacement du méthyle en position 3 par d'autres alkyles courts ou deux méthyles ou un groupement phényle semble défavorable à l'activité. L'introduction d'un groupement fonctionnalisé en position 2 est également défavorable. De cette large étude, il ressort finalement que c'est le composé D1 et son homologue cyclique (**86**) qui restent les drogues les plus actives. D1 est présenté comme plus actif que le cyclothiazide.

Dans la figure 23, sont présentés, en guise d'avant goût, quelques-uns des dérivés synthétisés au sein de notre laboratoire et qui se sont révélés être de puissants modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. Il s'agit des premiers composés « leads » d'une longue série que nous développerons plus avant et qui peuvent être considérés comme des analogues pyridiniques et benzéniques de l'IDRA-21 et du diazoxide. Certaines drogues telles que les BPAMPA 37, 50 et 68 se sont révélées être plus actives que l'IDRA-21 dans des tests *in vitro* et ont montré des profils pharmacologiques extrêmement intéressants.



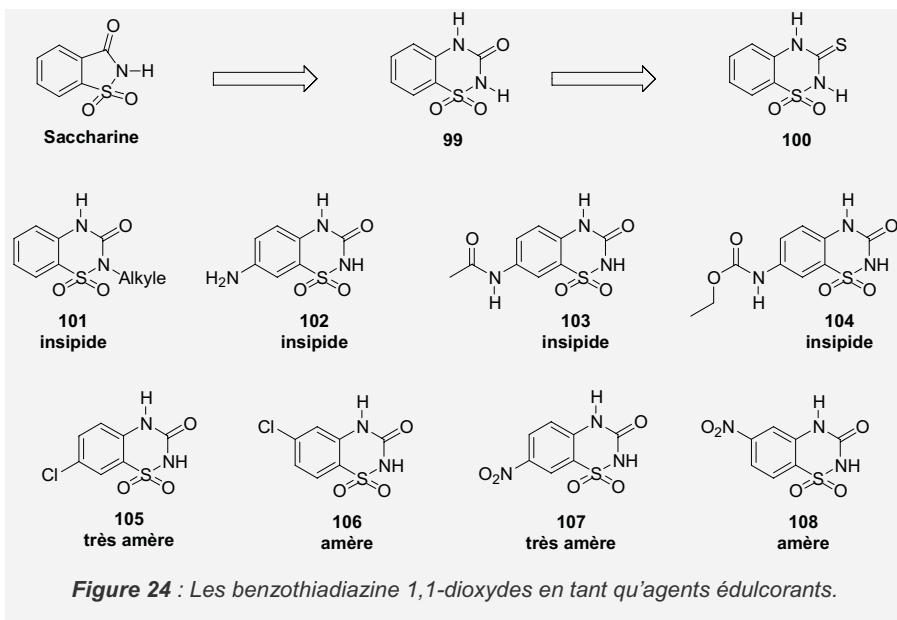
2.9. Autres applications pharmacologiques du noyau arylthiadiazine.

Outre les grandes applications pharmacologiques développées dans les chapitres précédents, plusieurs études disparates décrivent diverses propriétés biologiques du noyau arylthiadiazine 1,1-dioxyde.

Ainsi, l'examen « historique » des premières benzothiadiazines décrites permet de constater qu'il s'agit de dérivés 3-oxo. Lorsque la structure de ces dérivés (Figure 24) est comparée à celle de la saccharine, un des plus vieux édulcorants (décrit dès 1879 par Ira Remsen et Constantin Falhberg), il est noté des similitudes évidentes. En effet, le 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**99**, Figure 24) peut être considéré comme un homologue supérieur de la saccharine et comme ce dernier, il présente des propriétés édulcorantes [Parke et al. 1950, Raffa et al. 1954a]. Le principal désagrément de la saccharine étant son arrière goût métallique et amer, quelques pharmacomodulations ont évidemment été réalisées autour de son noyau « homologue » afin d'en améliorer les caractéristiques (**101-108**, Figure 24) [Raffa et al. 1960a]. Ainsi, tout comme cela avait été noté en série thiazole, l'alkylation en position 2 est défavorable à l'impression de douceur donnée par les composés. De même, la substitution en position 7 par un groupement amino, acétamido, éthylcarbamate ou uréido est également défavorable aux propriétés édulcorantes. La présence en position 6 ou 7 d'un atome de chlore donne des composés fortement amers. Il en est de même pour le nitro en position 6 et dans une moindre mesure pour le nitro en position 7.

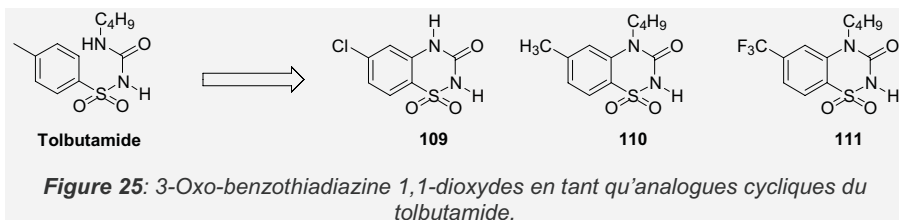
En finalité, aucun des dérivés étudiés n'a montré les mêmes caractéristiques édulcorantes que le composé **99**.

Un seul autre article décrit un semblant de recherche autour des propriétés édulcorantes avec la préparation « d'homothiosaccharine » (**100**, Figure 24) [Raffa et al. 1962a]. Aucune information sur les caractéristiques douces ou amères de ce composé n'est donnée dans la référence.



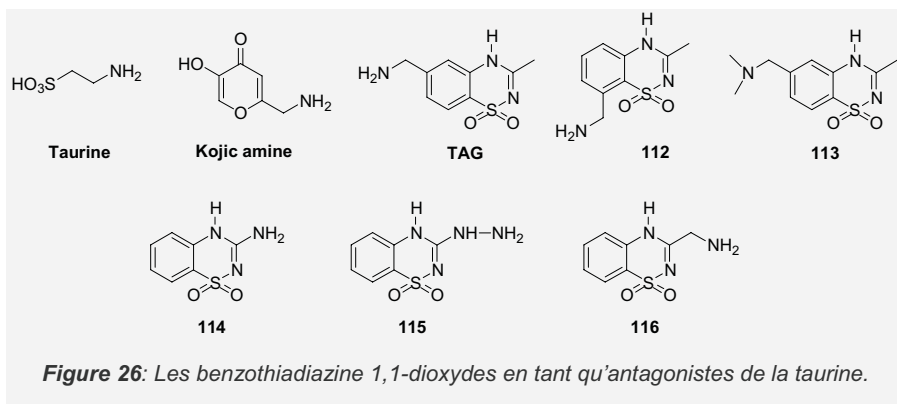
Une analyse plus proche des fonctionnalités de ces dérivés 3-oxo, montre qu'il s'agit en fait de sulfonylurées cycliques. Or c'est notamment la fonction sulfonylurée qui est responsable de l'activité des hypoglycémiant oraux tels que le tolbutamide (Figure 25). Cette drogue fait partie des dérivés de la première génération utilisés pour stimuler la sécrétion d'insuline via la fermeture des canaux K_{ATP} pancréatiques dans le traitement du diabète de type 2. Il était donc logique de penser que les 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes aient été utilisés comme structures de base en vue de préparer des analogues cycliques du tolbutamide [Simmons et al. 1963]. Les composés synthétisés sont porteurs d'un groupement méthyle, trifluorométhyle ou d'un atome de chlore en

position 6 et d'un H ou d'un groupement *n*-butyle en position 4 (**109-111**, Figure 25). Aucune donnée pharmacologique n'accompagne l'article.



L'acide β -aminoéthanesulfonique fut isolé il y a plus de 150 ans à partir de bile de bœuf. Cette provenance lui a valu le nom de taurine (Figure 26). Longtemps considérée comme non-essentielle et biologiquement inerte, la taurine a été récemment redécouverte pour ses effets bénéfiques dans des processus tels que l'épilepsie, l'hypertension, l'angine de poitrine, le diabète et l'alcoolisme [Gupta et al. 2005]. Bien que la présence de récepteurs spécifiques à la taurine reste encore controversée, de nombreux développements pharmacologiques ont été entrepris afin de découvrir des analogues de la taurine. A la recherche d'analogues rigides du GABA (acide γ -aminobutyrique) proches de la « kojic amine » (Figure 26), Girard et son équipe envisagent la préparation de benzothiadiazine 1,1-dioxydes porteurs d'un groupement aminométhyle sur le noyau aromatique [Girard et al. 1982]. La présence de cette fonction aminométhyle et d'un H légèrement acide en position 4 du cycle thiazine sur une structure rigidifiée permet de comparer ces composés à la « kojic amine ». Malheureusement, aucun des composés préparés ne montre un degré d'interaction significatif avec le système GABAergique. Par contre, plusieurs drogues (TAG, **112** et **113**, figure 26) présentent toutes les caractéristiques d'antagonistes sélectifs de la taurine. Le plus puissant est le composé appelé TAG (6-aminométhyl-3-méthyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde) qui bloque les effets de la taurine sans affecter ceux du GABA ou de la glycine. Ce dérivé, qui présente des similitudes structurales avec la taurine, reste jusqu'à présent le seul antagoniste sélectif et puissant. Comme signalé ci-avant, l'existence d'un récepteur à la taurine est encore matière à discussion et donc le terme antagoniste peut sembler inapproprié en l'état actuel des connaissances. En vue d'augmenter l'effet de TAG, trois analogues de ce dernier, les 3-amino- (**114**), 3-

hydrazino- (**115**) et 3-aminométhyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxydes (**116**, Figure 26) ont été préparés sans aboutir toutefois à une meilleure inhibition des effets de la taurine, même si les dérivés **114** et **115** semblent plus sélectifs que le TAG [Braghiroli et al. 1990].



Signalons encore la préparation de composés de type 4-(1,1-dioxo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)-2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol (**117**, Figure 27) présentés comme des capteurs de radicaux libres et dont l'action anti-oxydante serait utile dans des applications anti-inflammatoires [Tait et al. 1996]. Cet effet sur les radicaux libres serait principalement dû à la présence du groupement phénol. Il est également possible de retrouver la trace de deux 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**118** et **119**, Figure 27), analogues de 1,2-benzothiazine 1,1-dioxydes, présentés comme des P2-P3 peptidomimétiques inhibiteurs de la calpaïne 1 [Wells et al. 2001].

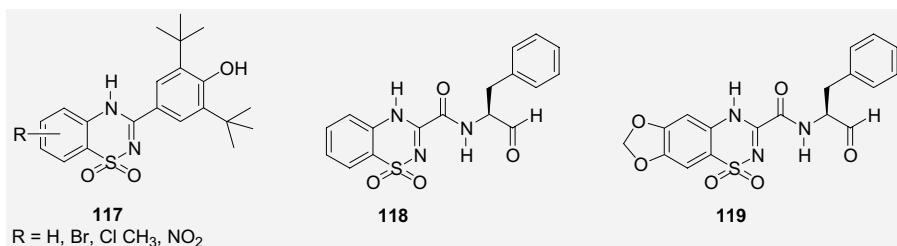


Figure 27: Les benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'anti-oxydants ou inhibiteurs de la calpaïne.

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine actives qui sont présentes principalement au niveau neuronal et sont régulées par le calcium. Ces protéases sont impliquées dans des événements cellulaires majeurs tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, les phénomènes neurodégénératifs suivant une ischémie cérébrale ou un traumatisme crânien. Les 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes se montrent moins actifs que leurs homologues 1,2-benzothiazine 1,1-dioxydes.

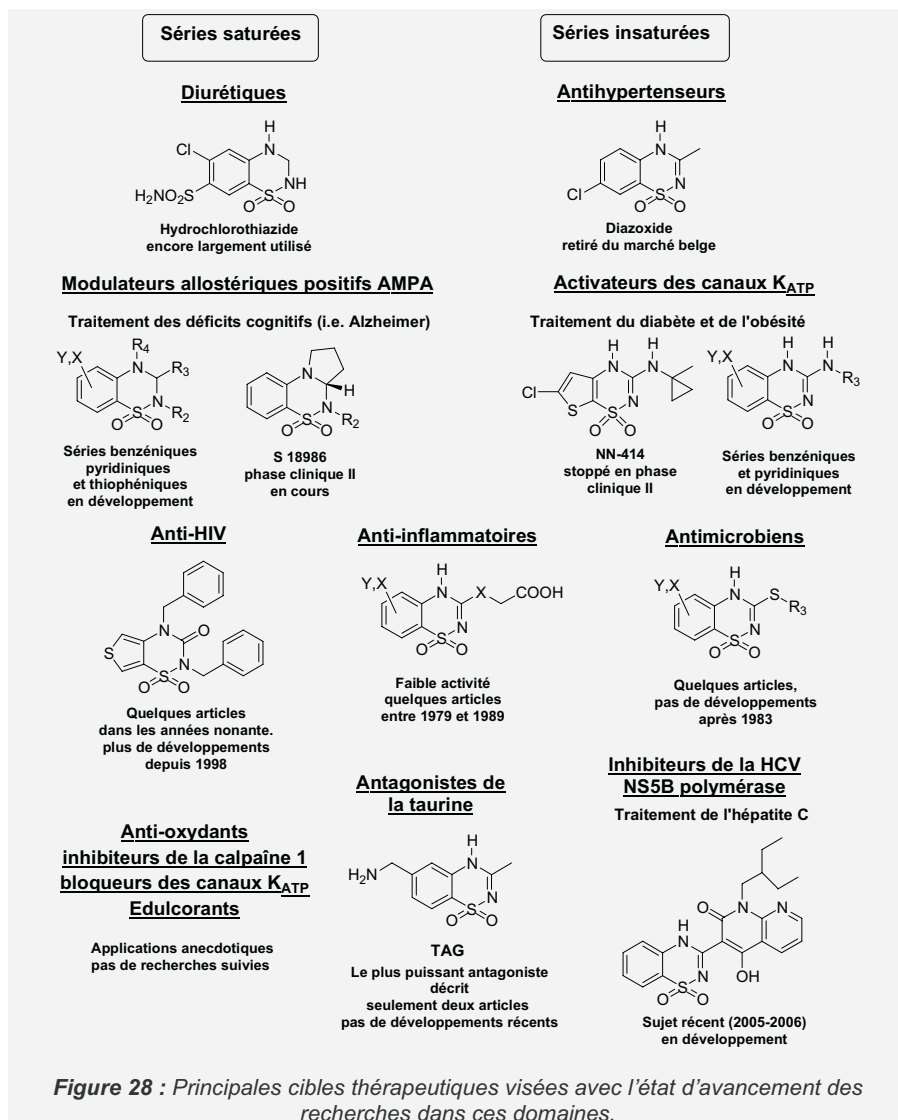


Figure 28 : Principales cibles thérapeutiques visées avec l'état d'avancement des recherches dans ces domaines.

Voilà qui clôt un chapitre qui, espérons-le, a donné le plus large aperçu possible des applications révélées ou potentielles du noyau arylthiadiazine 1,1-dioxyde dans le domaine pharmaceutique.

Le fait que plusieurs drogues appartenant à cette série chimique ont été et sont encore utilisées (i.e. hydrochlorothiazide et diazoxide) en tant que médicaments et que d'autres sont en phase de développement avancé prouve à suffisance l'intérêt de cet hétérocycle dans la découverte de nouvelles applications pharmaceutiques.

La figure 28 résume et schématise les principaux axes de recherches pharmacologiques suivis. Les structures générales des séries développées et les composés « leads » pour chaque cible thérapeutique y sont également décrits de même que leur utilisation passée ou actuelle ou l'état d'avancement connu des travaux.

Chapitre 3 :

La chimie des arylthiadiazine 1,1-dioxydes

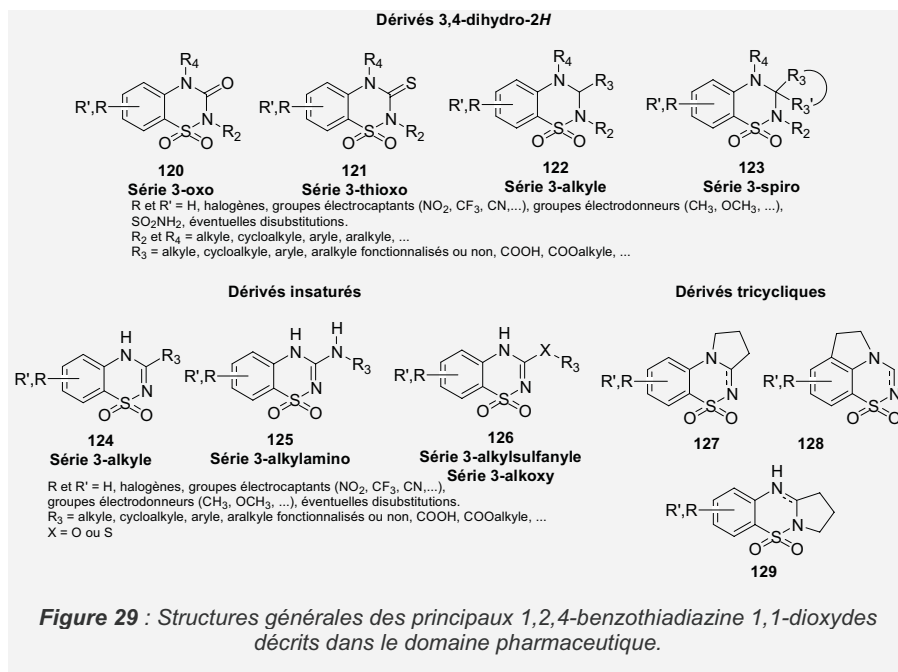


Dans ce chapitre, nous allons présenter les différentes voies de synthèse permettant l'accès aux drogues décrites précédemment. Pour des questions de clarté, nous examinerons séparément les séries benzénique, pyridinique et thiophénique.

3.1. Les séries benzéniques

Comme nous avons pu le constater lors de l'examen des applications du noyau arylthiadiazine 1,1-dioxyde au niveau pharmaceutique, c'est en série

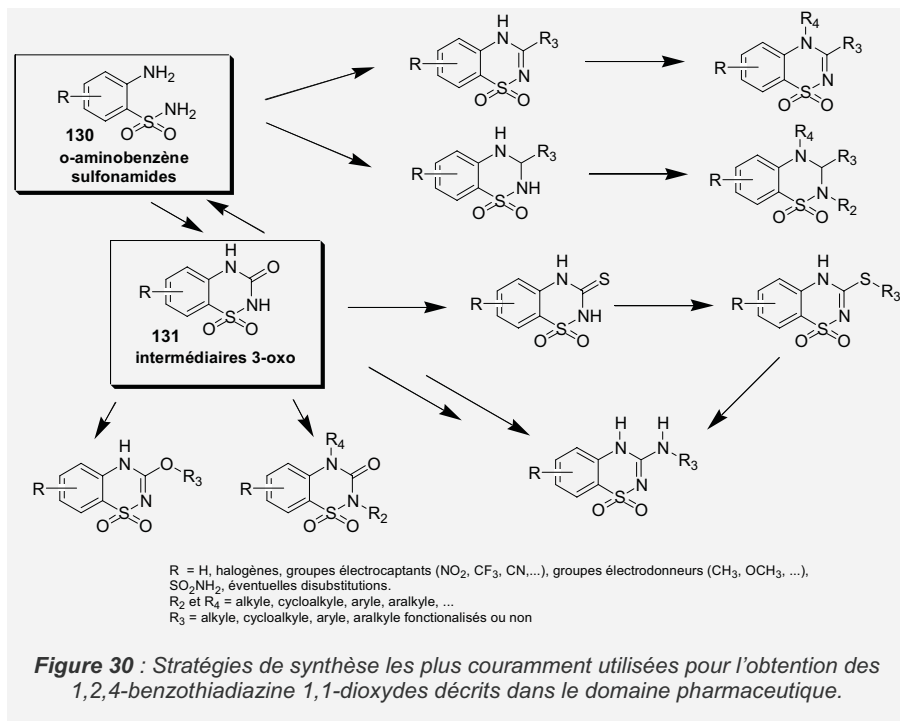
benzénique que se situe la majeure partie des travaux réalisés. La figure 29 montre la grande diversité des structures qui ont été étudiées.



D'une manière assez large, il est possible de classer les différentes séries de composés en deux grands sous-groupes : les dérivés saturés ou 3,4-dihydro-2H (**120-123**, Figure 29) et les dérivés insaturés (**124-126**). Pour des raisons de facilité, nous avons souhaité traiter séparément les dérivés tricycliques (**127-129**) car il peut s'agir aussi bien de composés saturés qu'insaturés. Par ailleurs, puisque bon nombre de dérivés saturés ont été développés dans le cadre des diurétiques, la plupart des structures décrites possèdent un groupement sulfonamide en position 7.

Un rapide survol des différentes voies de synthèse de la littérature montre clairement qu'il existe deux principaux intermédiaires clés permettant d'arriver à la plupart des séries: les *o*-aminobenzène(mono ou di)sulfonamides (**130**, Figure 30) et les 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**131**, Figure 30); ces composés étant souvent synthétiquement liés l'un à l'autre comme l'illustre le schéma de la figure 30.

Nous débuterons donc la description chimique par la présentation des principales voies de synthèse des *o*-aminobenzène(mono ou di)sulfonamides.



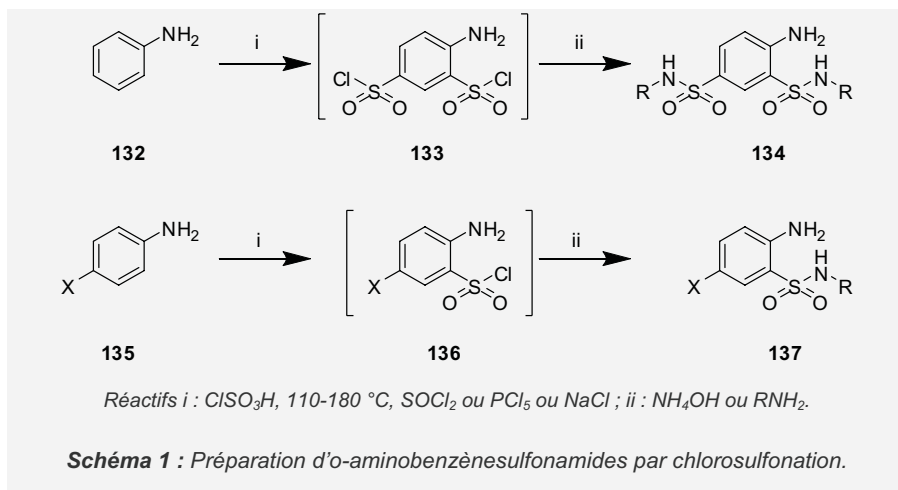
3.1.1. Synthèse des *o*-aminobenzènesulfonamides

Les *o*-aminobenzènesulfonamides sont les molécules qui supportent pratiquement à elles seules toute la chimie des benzothiadiazine 1,1-dioxydes. Seuls trois ou quatre schémas de synthèse différents sont décrits dans la littérature. Ils visent pratiquement tous à introduire la fonction sulfonamide sur un cycle aromatique déjà porteur d'une fonction azotée (amine ou nitro). Nous incluons par ailleurs dans ce chapitre les stratégies de synthèse des composés *o*-aminobenzènedisulfonamides qui furent principalement utilisées dans la préparation des diurétiques thiazidiques.

3.1.1.1. La réaction de chlorosulfonation.

Il s'agit de loin de la réaction la plus utilisée pour l'introduction d'un groupement sulfonyle sur le noyau benzénique. Le plus souvent, elle met en jeu une aniline et l'acide chlorosulfonique en présence de chlorure de thionyle, de pentachlorure de phosphore ou de NaCl. Il s'agit d'une réaction de substitution électrophile du noyau aromatique. La position de l'attaque électrophile est dépendante de la nature des substituants du noyau aromatique. Dans le cas d'aniline (**132**, Schéma 1), la substitution a généralement lieu en ortho et/ou en para de la fonction NH₂. De ce fait, si les deux positions ortho et para sont libres ou si une des deux positions n'est pas désactivée par un groupement électroattracteur, des produits de disubstitution sont généralement obtenus. Quelques cas de monosubstitution ont cependant été décrits; les conditions de réaction en température et/ou durée étant en règle générale moins drastiques que dans le cas des disubstitutions [Short et al. 1960, Jimonet et al. 1994]. Cette voie de synthèse reste principalement celle qui a été préférentiellement utilisée pour la préparation des dérivés *o*-aminobenzènedisulfonamides (**134**, Schéma 1) qui sont les intermédiaires clés dans la chimie des diurétiques thiazidiques. Dans la plupart des cas, cette réaction se passe par chauffage du mélange aniline-acide chlorosulfonique durant plusieurs heures (ou jours) à des températures comprises entre 110°C et 180°C et ce en présence ou non d'un réactif chloré (Schéma 1) [Novello et al. 1957 et 1960b, Yale et al. 1960, Short et al. 1960 et 1961, Schlitter et al. 1962]. Le chlorure de sulfonyle (**133**) ainsi obtenu est isolé du milieu réactionnel en versant ce dernier sur glace et en récupérant le précipité formé. Ce précipité est redissous rapidement dans un solvant organique aprotique et versé goutte à goutte sur une solution d'ammoniaque diluée ou d'amine en fonction du type d'aminosulfonamide désiré. La présence d'un substituant en para du NH₂ (**135**) ou la désactivation de cette position permet d'éviter les disulfonations (**137**, Schéma 1) [Bierbaum et al. 1963, Heindel et al. 1971].

Il semble que la présence d'agents chlorants tels que le chlorure de thionyle ou le pentachlorure de phosphore sert, d'une part, à capter l'eau formée par dissociation de l'acide chlorosulfonique et d'autre part, à transformer l'acide sulfonique qui se formerait éventuellement en chlorure d'acide correspondant.



Il existe à côté de l'acide chlorosulfonique, d'autres agents, tels que l'oléum sulfurique, capables d'introduire sur un noyau aromatique une fonction sulfonyle par réaction de substitution électrophile. Cependant, ils sont beaucoup moins utilisés que l'acide chlorosulfonique qui reste un réactif, certes délicat à manipuler, mais relativement réactionnel, peu coûteux et efficace. Signalons également qu'il existe d'autres possibilités plus récentes d'introduire un groupement sulfonyle sur le noyau aromatique : citons par exemple et sans être exhaustif :

- L'action de SO_2 sur un carbanion aromatique généralement obtenu par action d'une base forte telles qu'un organolithique ou un réactif de Grignard sur différents dérivés aromatiques (généralement un dérivé halogéné) [Chan et al. 2002]. Le désavantage majeur de cette méthode est qu'elle n'est pas applicable à des dérivés porteurs de groupements à hydrogène labile.
- L'action de triisopropylsilanethiolate potassique sur un dérivé aromatique halogéné catalysée par le palladium permet d'obtenir l'intermédiaire triisopropylsilylsulfanyle qui peut être oxydé en chlorure de sulfonyle [Gareau et al. 2003]

Aucune de ces méthodes n'a cependant été décrite pour la préparation des o-aminobenzènesulfonamides.

3.1.1.2. La réaction de Sandmeyer : variante de Meerwein.

L'introduction du groupement sulfonyle sur un noyau aromatique en *ortho* d'une fonction azotée peut également se faire via une réaction de diazotation réalisée très souvent à partir d'*o*-nitroanilines (**138**, schéma 2). Cette étape consiste tout d'abord en la formation d'un sel de diazonium par action de nitrite sodique en milieu acide (acide acétique/acide chlorhydrique). Le diazoïque obtenu (**139**) est ensuite décomposé en présence de SO₂ et de chlorure cuivreux suivant la réaction de Sandmeyer, variante de Meerwein, pour fournir le chlorure de sulfonyle correspondant (**140**) [Meerwein et al. 1957]. Cette réaction est catalysée par le chlorure cuivreux généré *in situ* par action d'une solution d'acide acétique saturée de SO₂ sur une solution aqueuse de chlorure cuivrique. Si l'effet catalytique du cuivre semble passer par un mécanisme radicalaire, son action sur le SO₂ n'est pas complètement expliquée.

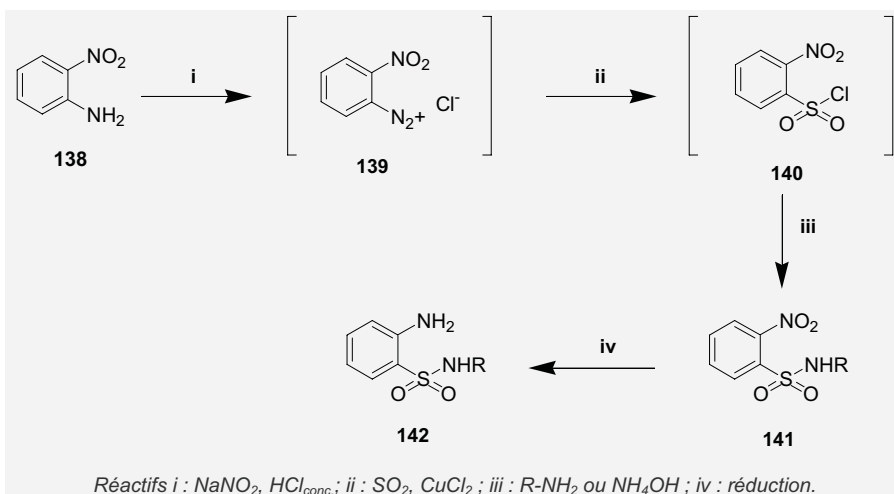


Schéma 2 : Préparation d'*o*-aminobenzènesulfonamides par réaction de Sandmeyer-Meerwein.

Le chlorure de sulfonyle obtenu (**140**) est isolé et utilisé immédiatement afin de former le sulfonamide (**141**). La fonction nitro peut être ensuite réduite en fonction amino pour donner l'*o*-aminobenzènesulfonamide (**142**) par l'utilisation de divers réactifs tels que :

- L'hydrazine en présence de catalyseur métallique (Pd, Pt, Ni, Fe, Ru, ...) [Furst et al. 1965].
- Le fer en présence de NH_4Cl , le zinc ou le chlorure stanneux en présence d'acide chlorhydrique ou d'acide acétique [Wertheim 1948].
- Par hydrogénation catalytique en présence de charbon palladié [Yale et al. 1968].

3.1.1.3. Rupture oxydative de disulfures ou de thioéthers.

Le groupement sulfonamide peut également être introduit sur le noyau aromatique par une séquence qui débute par la substitution nucléophile d'un halogène aromatique par différents groupements porteurs d'un atome de soufre. Pour subir cette substitution, l'atome d'halogène (préférentiellement chlore ou fluor) doit être activé par un groupement électrocaptant en position *ortho* ou *para*. Dans le cas qui nous concerne, le dérivé de départ est souvent un *o*-chloronitrobenzène (**143**, Schéma 3).

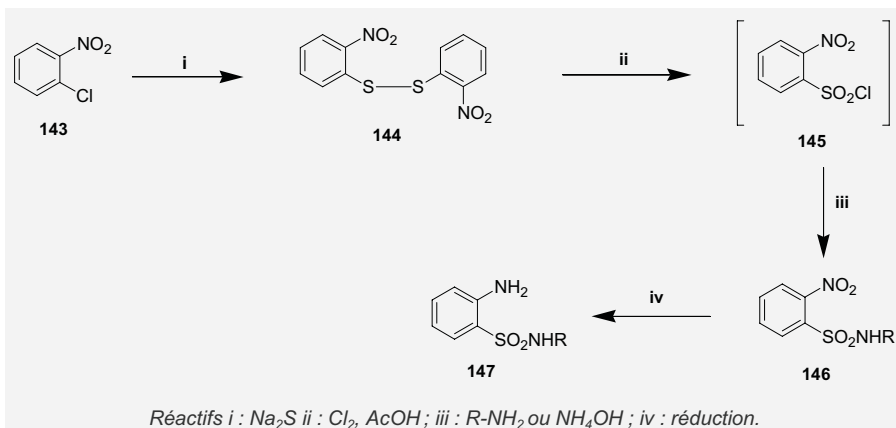


Schéma 3 : Action de sulfure sodique sur les *o*-chloro-nitrobenzènes.

Traité par exemple par du sulfure sodique, il forme un dimère comprenant un pont disulfure (**144**, Schéma 3). Ce pont, sous l'effet de chlore gazeux dans de l'acide acétique, subit une rupture oxydative pour donner le chlorure de sulfonyl correspondant (**145**) qui est immédiatement transformé en sulfonamide (**146**) sous l'action d'ammoniaque ou d'une amine [Holdrege et al. 1959]. La fonction nitro

peut ensuite être réduite en amino tel que cela est décrit dans le paragraphe précédent pour donner l'*o*-aminobenzènesulfonamide attendu (**147**).

Le chlore de l'*o*-chloronitrobenzène (**143**) peut aussi être substitué par le benzylthiol pour donner un benzylthioéther (**148**, Schéma 4) qui, lui aussi, peut subir une rupture oxydative par le chlore gazeux dans l'acide acétique pour donner le chlorure de sulfonyl (**145**) qui rentre ensuite dans le même schéma que précédemment à savoir formation du sulfonamide et réduction de la fonction nitro [Rubin et al. 1961, Raffa et al. 1962b]. Le même intermédiaire benzylthioéther peut être obtenu par action sur l'*o*-chloronitrobenzène de la thiourée et du chlorure de benzyle (Schéma 4). La réaction entre ces deux réactifs générant *in situ* le benzylthiol [Topliss et al. 1962, Bierbaum et al. 1963]. Des *o*-aminobenzènesulfonamides ont également pu être préparés par cette méthode [Schlittler et al. 1962].

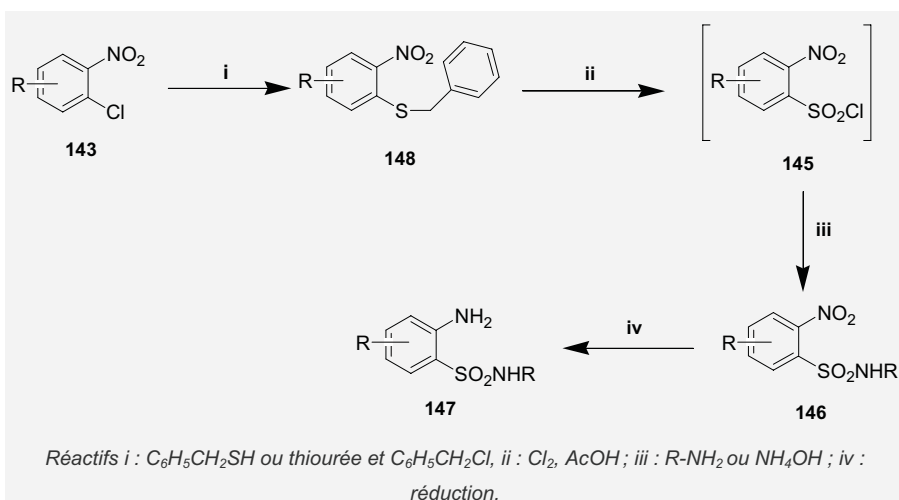
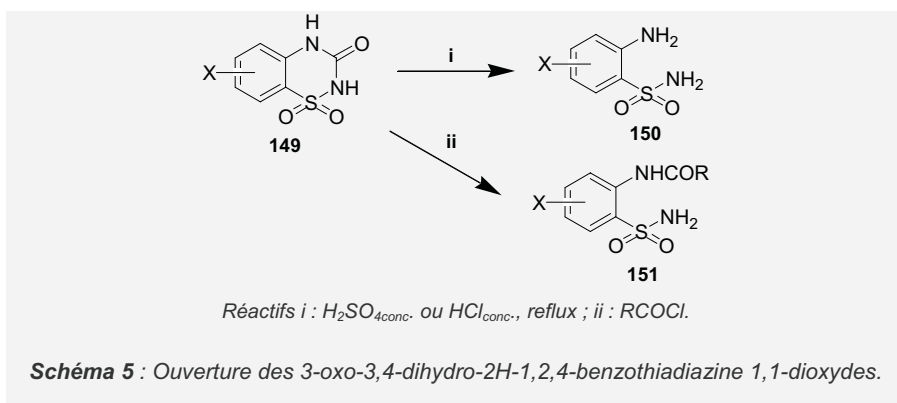


Schéma 4 : Action du benzylthiol sur les *o*-chloronitrobenzènes.

3.1.1.4. Ouverture du cycle 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

Jusque la fin des années septante, cette méthode ne présentait pas beaucoup d'intérêt car les produits de départ pour arriver aux 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**149**, Schéma 5) étaient justement les *o*-

aminosulfonamides correspondantes. Cependant, en 1979, Girard et al. décrivent la préparation de dérivés que nous appellerons trivialement « 3-oxo » à partir d'anilines par action d'isocyanate de chlorosulfonyle suivie d'une cyclisation de type Friedel-Crafts (cette voie de préparation est détaillée dans le chapitre suivant [Girard et al. 1979]). L'hydrolyse de ces intermédiaires 3-oxo en milieu acide sulfurique ou chlorhydrique concentré, qui permet d'accéder aux *o*-aminobenzènesulfonamides, (**150**, Schéma 5), si elle est reprise par les auteurs, était déjà décrite par ailleurs [Close et al. 1961]. La réaction d'ouverture de cycle peut également avoir lieu en milieu basique (i.e. NaOH 8%) mais uniquement si le produit de départ est substitué en position 2 par un alkyle ou un benzyle [Raffa et al. 1954b]. Le composé obtenu est alors substitué sur l'azote de la fonction sulfonamide. L'action de chlorure d'acide entraîne également l'ouverture du cycle 3-oxo mais ne fournit cependant pas l'*o*-aminobenzènesulfonamide mais son analogue *o*-amidobenzènesulfonamide (**151**, Schéma 5) [Raffa et al. 1961a].



3.1.1.5. Autres réactions d'ouverture de cycle.

En 1968, Ghelardoni décrit l'effet du KBH_4 sur des dérivés de type 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde [Ghelardoni et al. 1968]. Si ce réactif n'a aucune action envers les composés non substitués en position 3 (**152**, Schéma 6), il provoque l'ouverture du cycle des dérivés 3-alkylés (**153**). Suivant les substitutions en position 2 et 4, cette ouverture s'effectue soit entre l'azote 2 et le carbone 3 pour les dérivés 2-alkylés (**154**), soit entre le carbone 3 et l'azote 4 pour les composés 4-alkylés (**155**). Cette réaction est néanmoins anecdotique

puisque en pratique, elle n'est pas réellement applicable à la préparation des o-aminobenzènesulfonamides.

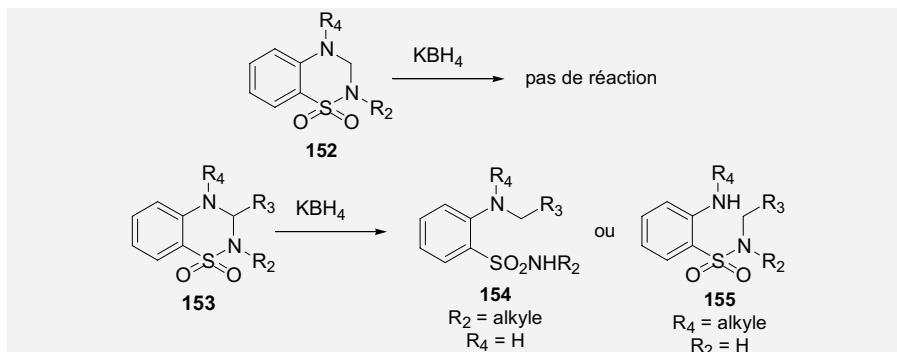


Schéma 6 : Ouverture au KBH_4 des 3-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

3.1.1.6. Action du sulfite sodique sur un dérivé dinitrobenzénique.

Il s'agit d'une méthode tout à fait particulière puisqu'à notre connaissance, elle n'a été appliquée qu'à une seule série [Cronin et al. 1968]. Le composé de départ est le 4,5-dinitrovératrol (**156**, Schéma 7). Ce composé, mis à reflux avec une solution à 10% de sulfite sodique, donne le sel sodique de l'acide sulfonique correspondant (**157**) qui traité au SOCl_2 permet d'obtenir le chlorure de sulfonyle (**158**) puis le sulfonamide (**159**). La réduction de la seconde fonction nitro donne l'o-aminobenzènesulfonamide attendu (**160**).

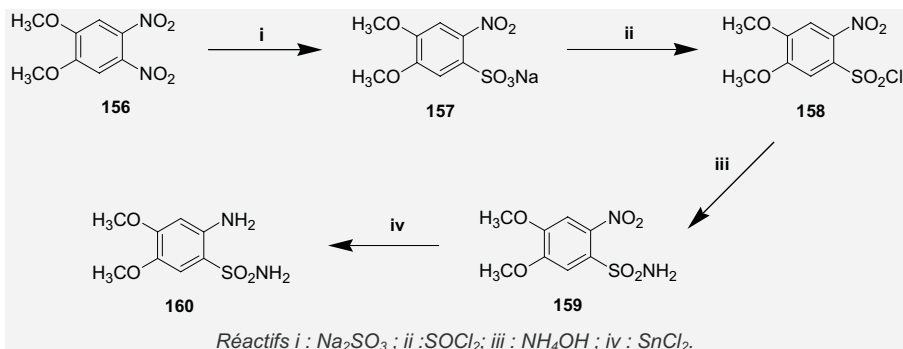
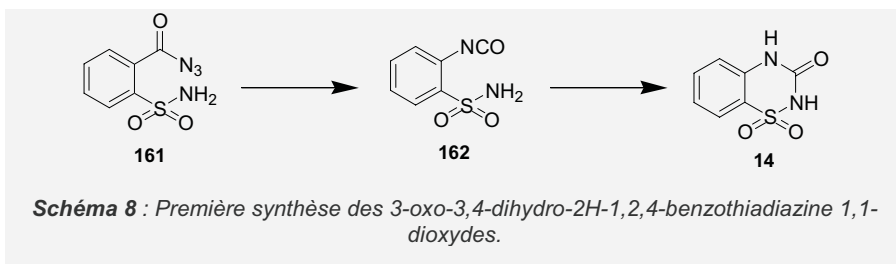


Schéma 7 : Action du sulfite sodique sur un dérivé dinitrobenzénique.

3.1.2. Synthèse des 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

3.1.2.1. Synthèse des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

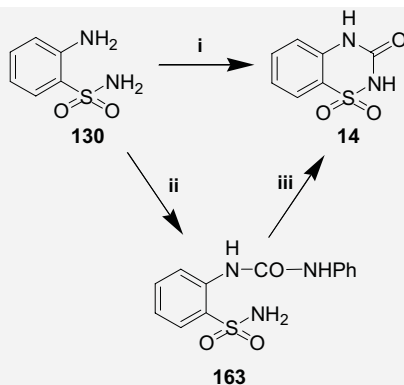
Les 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**14**, Schéma 8) sont les premiers benzothiadiazine 1,1-dioxydes décrits dans la littérature. Outre cette préséance historique, ils sont apparus aussi bien comme des composés d'intérêt pharmaceutique que comme des intermédiaires clés dans l'obtention, par exemple, d'*o*-aminobenzènesulfonamides ou de 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes. La première synthèse des composés 3-oxo est décrite en 1917 par Schrader [Schrader 1917]. Au départ d'un *o*-sulfamoylbenzoylazide (**161**, Schéma 8), il réalise une dégradation de Curtius pour obtenir l'isocyanate correspondant (**162**) qui cyclise par chauffage pour donner le dérivé 3-oxo attendu.



Les schémas suivants procèdent tous par une étape de cyclisation à partir d'*o*-aminobenzènesulfonamides (**130**, Schéma 9), seuls changent les réactifs de cyclisation. Début des années cinquante, Parke décrit la fusion à l'urée comme voie de synthèse des dérivés 3-oxo (**14**, Schéma 9) [Parke et al. 1950] ; cette méthode fut d'ailleurs largement utilisée par d'autres équipes [i.e. Magnien et al. 1964]. Toujours dans le même article, il présente également une voie alternative qui consiste à faire réagir une *o*-aminobenzènesulfonamide avec de l'isocyanate de phényle. L'intermédiaire phénylurée produit (**163**, Schéma 9) cyclise ensuite sous l'action de la chaleur pour donner le dérivé 3-oxo. Plusieurs années plus

tard, Chern reprend cette technique en utilisant d'autres isocyanates à reflux dans la DMF [Chern et al. 1990b].

Le remplacement de l'urée par le phosgène, qui est un réactif beaucoup plus réactionnel, a également été envisagé avec comme avantage principal de pouvoir travailler en solution et dans des conditions plus douces en température (Schéma 9) [Simmons et al. 1963, Hayao et al. 1968]. Il ne faut cependant pas perdre de vue le danger lié à l'utilisation d'un réactif aussi toxique que le phosgène.

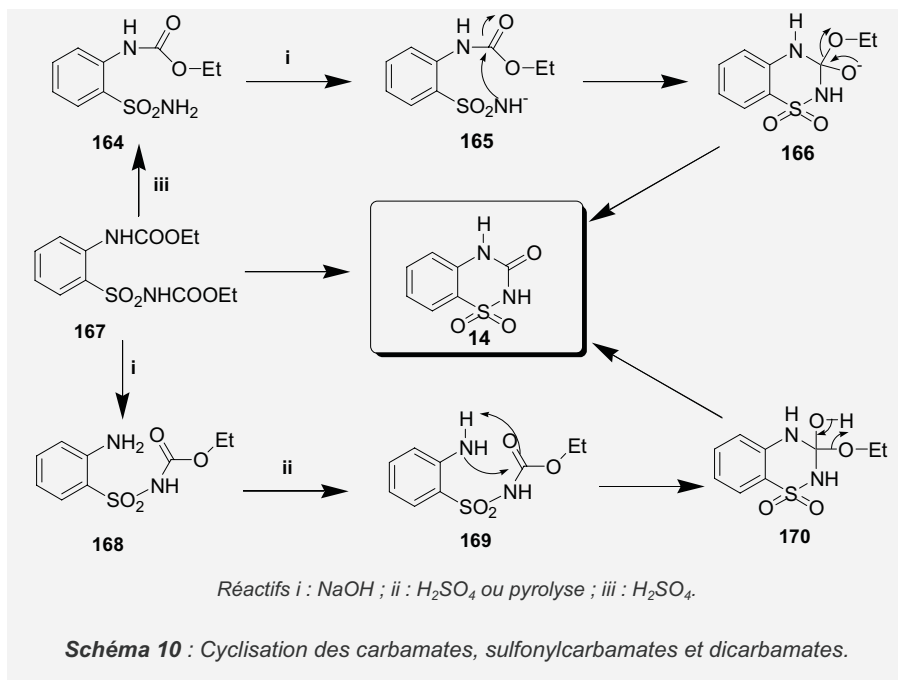


Réactifs i : urée ou phosgène ; ii : PhNCO ; iii : fusion.

Schéma 9 : Cyclisation des o-aminobenzènesulfonamides.

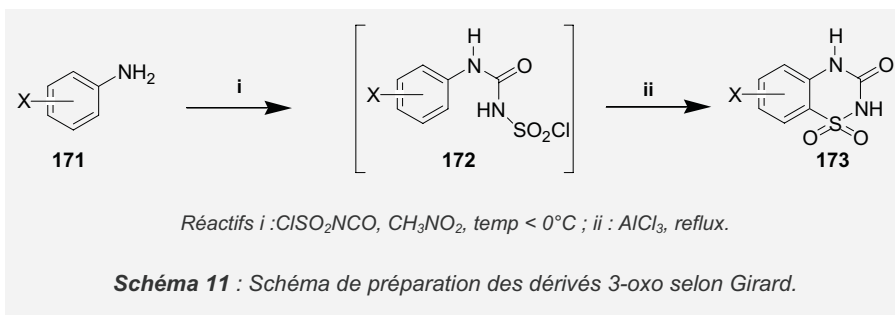
Une autre grande méthode d'obtention des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes est une réaction de cyclisation à partir d'un intermédiaire de type carbamate (**164**, Schéma 10), sulfonylcarbamate (**168**, Schéma 10) ou dicarbamate (**167**, Schéma 10) [Raffa et al. 1954a, 1957a et 1960a]. Ces intermédiaires **164**, **167** et **168** sont obtenus par action du chloroformiate d'éthyle sur les o-aminobenzènesulfonamides dans différentes conditions. Le carbamate d'éthyle **164** cyclise avec de bons rendements en milieu basique (NaOH) tandis qu'un traitement par pyrolyse diminue sensiblement les rendements et que l'utilisation d'H₂SO₄, même en trace, régénère l'o-aminobenzènesulfonamide (Schéma 10). Le sulfonylcarbamate **168**, quant à lui, peut subir la cyclisation soit en milieu acide ou par pyrolyse (Schéma 10) ; l'utilisation de base ne donne pas le produit attendu. Le dicarbamate **167**

s'hydrolyse en milieu acide pour donner le carbamate **164** et en milieu basique le sulfonylcarbamate **168** ; ce n'est qu'en cas de pyrolyse qu'il fournit avec de faibles rendements le composé 3-oxo.



Toutes les réactions décrites ci-avant avaient comme produits de départ les *o*-aminobenzènesulfonamides. L'accès aux dérivés 3-oxo était donc directement lié à l'obtention plus ou moins aisée de ces produits de départ. En 1979, une nouvelle voie de synthèse, proposée par Girard et al., va quelque peu révolutionner la chimie des 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Girard et al. 1979]. D'une part, ce schéma utilise comme produit de départ des anilines qui sont des composés commerciaux pour la plupart ou facilement accessibles et en général peu onéreux. D'autre part, il donne un accès facile, en une seule étape multiréactionnelle, aux composés 3-oxo. Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrolyse de ces analogues 3-oxo permet d'obtenir les *o*-aminobenzènesulfonamides qui restent des intermédiaires clés dans les synthèses qui nous intéressent. La voie décrite par Girard procède en deux étapes réalisées successivement sans purification dans une réaction qualifiée de « one

pot ». La première de ces étapes est une addition nucléophile de l'aniline (**171**, Schéma 11) sur l'isocyanate de chlorosulfonyle. L'intermédiaire obtenu (**172**), qui est une sorte de sulfonyleurée, n'est pas isolé mais entre directement dans une étape de cyclisation intramoléculaire de type Friedel-Crafts catalysée par le chlorure d'aluminium (Schéma 11). Cette réaction est l'étape limitante de ce schéma puisqu'elle nécessite la présence d'un noyau aromatique favorable à la substitution électrophile, c'est-à-dire non désactivé par des groupements électroattracteurs en position *ortho* ou *para* par rapport à la position de réaction. Lorsque plusieurs produits de cyclisation sont possibles, ce sont les règles contrôlant la substitution électrophile aromatique qui déterminent la régiosélectivité de la cyclisation. Si plusieurs positions sont équivalentes, alors la réaction donne un mélange d'isomères en proportions variées. Il est par ailleurs à noter que la position la moins stériquement encombrée est toujours la plus favorisée.

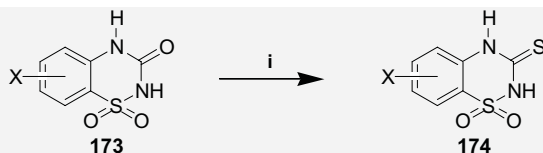


Il est également à noter que des réactions d'halogénéation et de nitration des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sont également décrites donnant accès soit à des dérivés monohalogénés en position 7 ou dihalogénés en 5 et 7, soit à des dérivés 7-nitro [Raffa et al. 1962c et d, Di Bella et al. 1966b, Phillips et al. 2002].

3.1.2.2. Synthèse des 3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Les 3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**174**, Schéma 12) sont les analogues soufrés des composés 3-oxo (**173**) mais

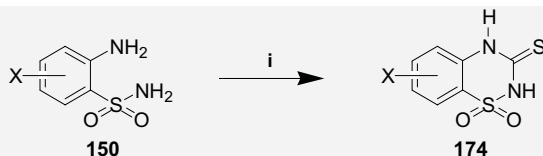
contrairement à ces derniers, ils ne représentent souvent que des intermédiaires de synthèse dans les schémas réactionnels vers les dérivés de types 3-alkyl ou aralkylsulfanyl et 3-amino, alkylamino ou aralkylamino. Deux grandes méthodes d'obtention de ces dérivés, que nous nommerons de manière raccourcie « 3-thioxo », sont décrites. La première consiste en une transformation de la fonction sulfonylurée des dérivés 3-oxo en une fonction thiourée par des polysulfures de phosphore (souvent P_2S_5) en présence d'un solvant aromatique azoté tel que la 3-picoline ou la pyridine (Schéma 12) [Di Bella et al 1972].



Réactifs i : P_2S_5 , 3-picoline ou pyridine.

Schéma 12 : Thionation des dérivés 3-oxo.

L'autre grande méthode utilise les o-aminobenzènesulfonamides (**150**, Schéma 13) comme produits de départ. Ces intermédiaires peuvent être cyclisés soit par action de la thiourée à une température proche de la fusion, soit par action du thiophosgène à reflux dans le dioxanne, soit au disulfure de carbone [Raffa et al. 1962a, Bell et al. 1975, Di Bella et al. 1979a, Chern et al. 1998].

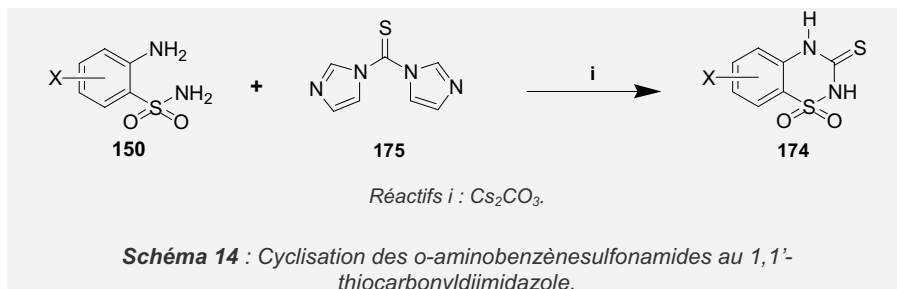


Réactifs i : thiourée, thiophosgène, CS_2 .

Schéma 13 : Cyclisation des o-aminobenzènesulfonamides à la thiourée ou au thiophosgène.

A côté des réactifs classiques de cyclisation que sont la thiourée et le thiophosgène, Weller et al. décrivent l'utilisation du 1,1-thiocarbonyldiimidazole (**175**, Schéma 14) comme agent de cyclisation [Weller et al. 1992]. Ce réactif,

souvent comparé au thiophosgène [Staab et al. 1962], permet d'accéder directement au dérivé 3-thioxo (**174**) s'il est mis en présence de carbonate de césium. Nous verrons ultérieurement qu'il n'en est pas de même en l'absence de base.



3.1.2.3. Synthèse des 3-alkyl-, 3-cycloalkyl- et 3-aralkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

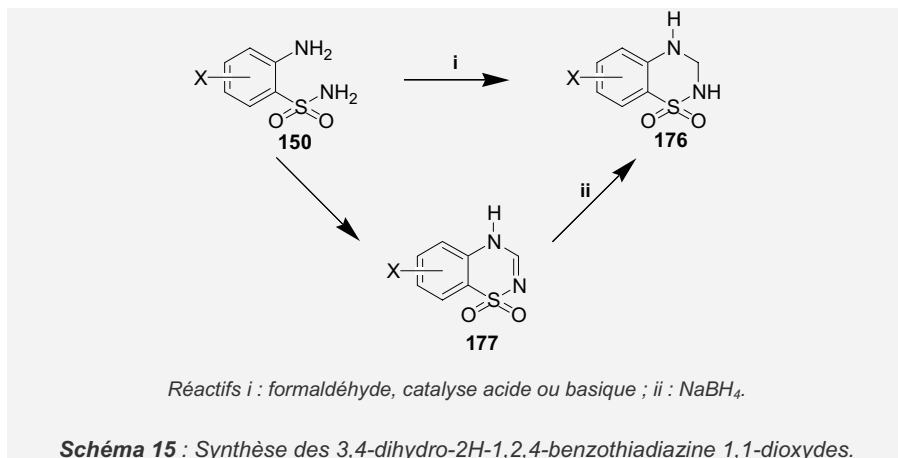
La formation des dérivés 3-alkyl-, 3-cycloalkyl- et 3-aralkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes procède toujours via une étape de cyclisation à partir des o-aminobenzènesulfonamides. D'une manière générale, mis à part les conditions expérimentales qui varient d'un article à l'autre ou d'une série à une autre, peu de schémas différents sont décrits. Les réactifs principaux utilisés sont généralement des aldéhydes ou leurs dérivés acétal ou hémiacétal et plus rarement des cétones.

Nous distinguerons, pour plus de clarté, les composés non substitués en position 3 des autres dérivés.

3.1.2.3.1. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Il s'agit des composés les plus simples (**176**, Schéma 15). Ils peuvent être synthétisés par deux voies de synthèse. La première, et probablement la plus utilisée, consiste en la cyclisation d'o-aminobenzènesulfonamides (**150**) en présence d'une solution aqueuse de formaldéhyde et d'une quantité catalytique d'acide minéral (HCl ou H_2SO_4) ou de NaOH souvent dans un mélange hydro-

alcoolique [De Stevens et al. 1958, Holdrege et al. 1959, Close et al. 1960, Werner et al. 1960, Short et al. 1960, Yale et al. 1960]. Une autre méthode, moins directe, passe par une réduction au NaBH_4 de l'analogue insaturé (**177**, Schéma 15) [Novello et al. 1960a, Werner et al. 1960].



3.1.2.3.2. Les autres dérivés de type 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

Le schéma de synthèse des 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 3 est proche de celui décrit pour leurs analogues non substitués (Cf. Schéma 15). Dans la plupart des cas, les o-aminobenzènesulfonamides (**150**, Schéma 16) sont mis en réaction avec des aldéhydes aliphatiques, cycliques ou aromatiques, éventuellement fonctionnalisés ou des dérivés d'aldéhyde (acétal ou hémiacétal). Les conditions réactionnelles appliquées varient parfois d'un auteur à un autre. Elles peuvent se résumer comme suit :

- Réaction d'un aldéhyde ou d'un acétal en présence d' H_2SO_4 comme catalyseur [Holdrege et al. 1959, Raffa et al. 1974a].
- Réaction d'un aldéhyde en présence d' HCl comme catalyseur [Whitehead et al. 1961a, Marchetti et al. 1964, Raffa et al. 1974a, El-Maghraby et al. 1985].

- Réaction d'un aldéhyde en catalyse acide ou basique [Novello et al. 1960a, Close et al. 1960, Werner et al. 1960, Roberston et al. 1965, Braghiroli et al. 2002].
- Réaction de fusion avec un aldéhyde aromatique [Topliss et al. 1961]
- Réaction d'un aldéhyde ou d'un acétal à reflux dans l'acétonitrile [Topliss et al. 1961].
- Réaction d'un aldéhyde dans l'acétonitrile en présence d'acide ($\pm$)10-camphorsulfonique en quantité catalytique [Phillips et al. 2002].

Certains auteurs décrivent, dans des cas particuliers, surtout liés à l'utilisation d'aldéhydes aromatiques, l'apparition, à côté du produit 3,4-dihydro attendu (**179**, Schéma 16), d'un composé ouvert de type imine (**180**, Schéma 16) [Topliss et al. 1961]. Cette réaction passe probablement par un intermédiaire non cyclique (**178**).

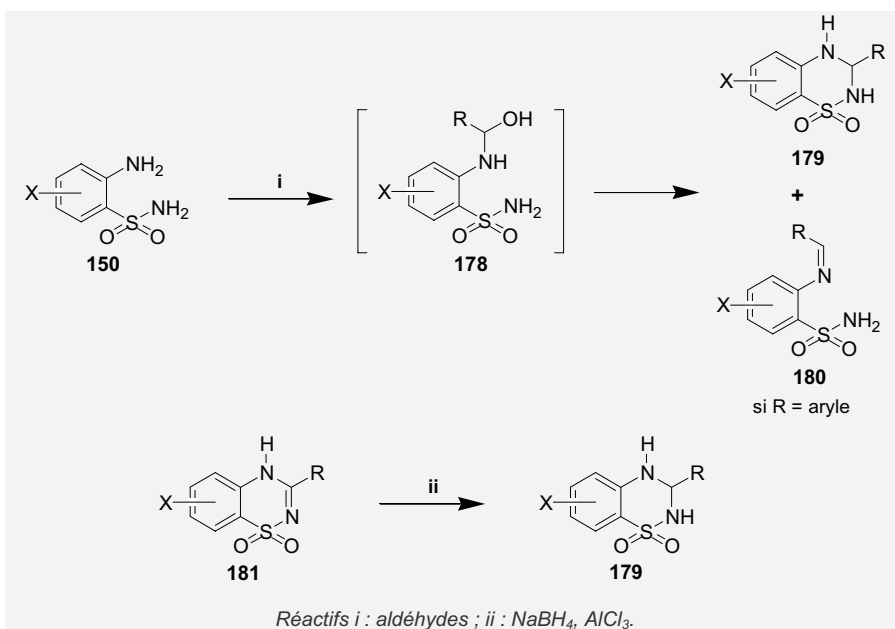
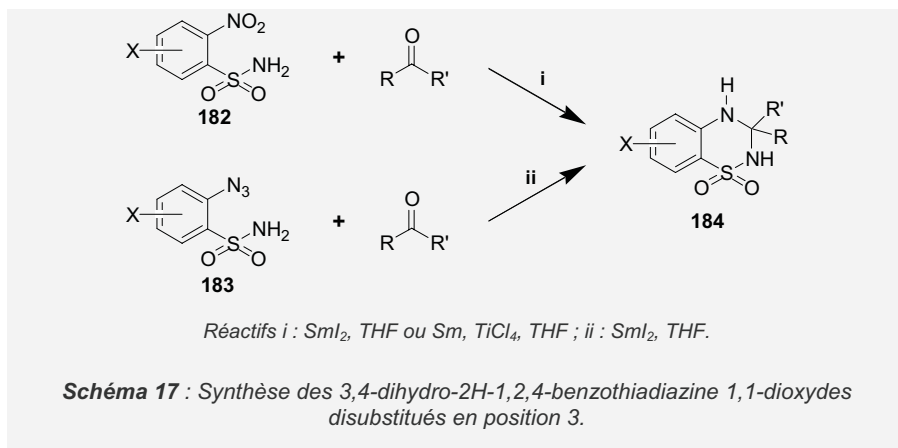


Schéma 16 : Synthèse des 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 3.

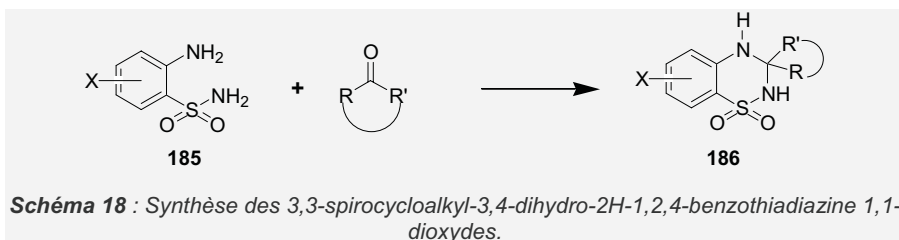
Des dérivés 3-COOH ou 3-COOCH₃ ont également été décrits et sont obtenus par cyclisation à l'acide glyoxylique (HOOCCHO) [Close et al. 1961].

Un article décrit également la réduction des composés 3-alkyles insaturés (**181**, Schéma 16) par le NaBH₄ en présence d'AlCl₃. Cette réaction semble toutefois beaucoup plus difficile que dans le cas des composés non substitués en position 3 et ne fonctionne que dans certains cas précis [Whitehead et al. 1961a].

Peu de composés disubstitués en position 3 ont été décrits, sans doute à cause des difficultés de synthèse liées à la plus faible réactivité des cétones utilisées dans ce cas et à leur encombrement stérique plus important. Les dérivés 3,3-diméthyles sont les premiers dont la synthèse ait été décrite. Ils sont obtenus soit par réaction de l'acétone, soit par celle du 2,2-diméthoxypropane [Topliss et al. 1962, Phillips et al. 2002]. Plus récemment, des composés « asymétriques » porteurs d'un groupement méthyle et d'un groupement alkyle plus ou moins long en position 3 ont également été décrits (**184**, Schéma 17). Ces réactions, qualifiées de cyclisations réductrices, sont généralement catalysées au samarium sous forme métallique ou sous forme d'iodure et utilisent comme produits de départ des *o*-nitrobenzènesulfonamides (**182**, Schéma 17) ou des *o*-azidobenzènesulfonamides (**183**) et les cétones appropriées [Zhong et al. 2000a et 2000b ; Su et al. 2003].



Nous terminerons enfin par la synthèse de quelques dérivés de type 3,3-spirocycloalkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**186**, Schéma 18) décrits dans la littérature [Cragoe et al. 1962, Ravina et al. 1973].

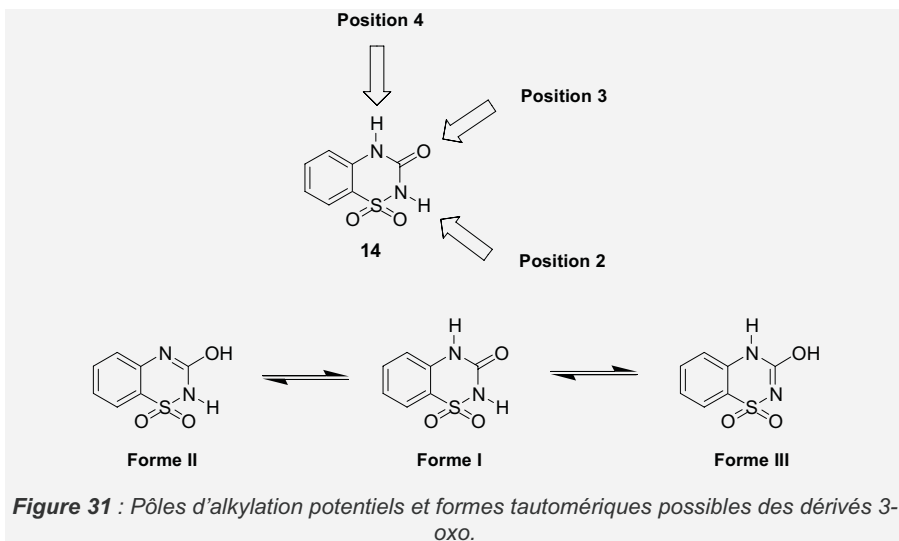


Les méthodes employées utilisent toutes les cétones cycliques ou les cétales correspondants comme agents de cyclisation et les *o*-aminobenzènesulfonamides comme produits de départ dans différentes conditions réactionnelles à savoir :

- Les cétones en excès avec l'acide *p*-toluènesulfonique comme catalyseur avec ou sans dioxanne.
- Les cétones dans la DMF avec ou sans fluorure potassique comme catalyseur.
- Les éthylène-cétales dans le butan-1-ol avec l'acide sulfurique comme catalyseur.

3.1.2.4. Synthèse des dérivés 3,4-dihydro substitués en position 2 et/ou 4.

3.1.2.4.1. Alkylation des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.



Comme cela apparaît à la figure 31, les 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**14**) possèdent 3 positions d'alkylation potentielles.

De plus, l'existence de trois formes tautomériques potentielles (Figure 31) ne facilite pas la prévision des pôles d'alkylation. L'examen des différents pôles nucléophiles montre cependant que l'azote en position 2, du fait de la proximité des fonctions carbonyle et sulfonyle, possède un proton relativement labile. Il peut donc, dans les conditions habituelles d'alkylation, c'est-à-dire en présence d'une base, être déprotoné et devenir le pôle le plus nucléophile.

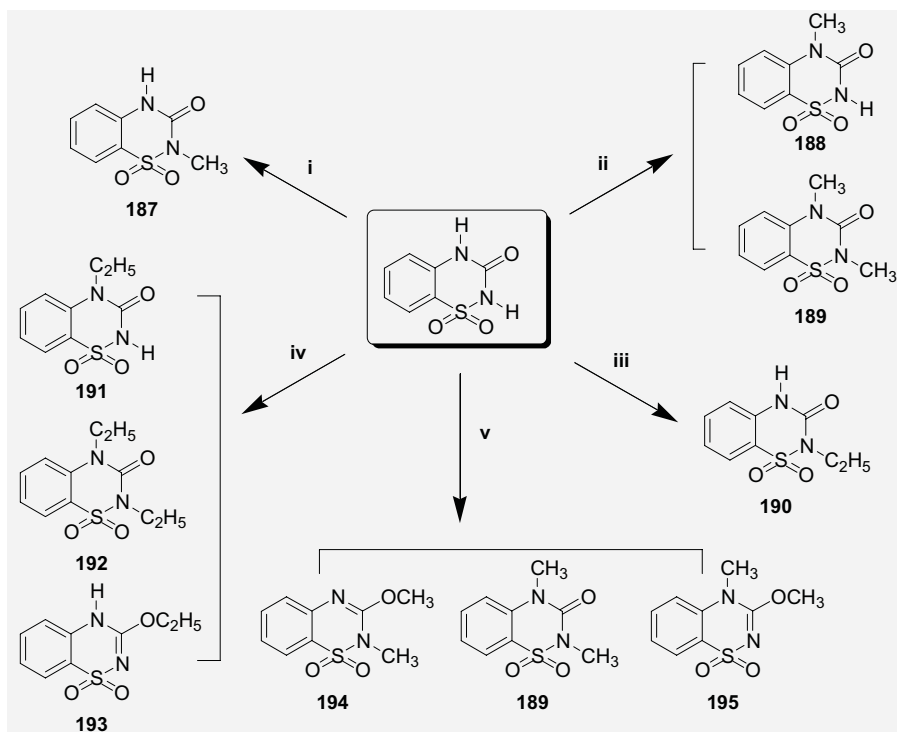
Suivant les conditions expérimentales et la nature de l'agent alkylant utilisé, différents isomères mono- ou polyalkylés peuvent être obtenus, ce qui complique passablement la rédaction d'une synthèse sur la réactivité des différents pôles. Ainsi, en cas de méthylation ou d'éthylation au sulfate de diméthyle en léger excès et en présence de carbonate potassique ou à l'aide de diazométhane en milieu neutre, l'alkylation s'effectue préférentiellement en position 2 (**187**, Schéma 19) [Parke et al. 1950, Raffa et al. 1957b et c]. En présence d'un large excès de sulfate de diméthyle et en présence de NaOH, deux produits de réaction sont obtenus, le composé 4-méthylé (**188**, Schéma 19) et le dérivé 2,4-diméthylé (**189**). Si l'agent alkylant est le sulfate de diéthyle, en présence de carbonate potassique, seul le dérivé éthylé en position 2 (**190**) est obtenu. Par contre en milieu NaOH, quatre dérivés sont isolés, le composé 4-éthylé (**191**), le composé 2-éthylé (**190**), le composé 2,4-diéthylé (**192**) et en moindre quantité, le composé 3-éthoxy (**193**). L'utilisation d'un excès de diazométhane aboutit à l'obtention d'au moins trois produits de réaction, le premier est méthylé en position 2 et 3 (**194**, Schéma 19), le second en position 2 et 4 (**189**) et le troisième, minoritaire, en 3 et 4 (**195**) [Raffa et al. 1960b, Di Bella et al. 1966a]. Par ailleurs, l'utilisation comme produit de départ du sel sodique des dérivés 3-oxo (déprotoné en position 2) favorise très largement l'alkylation en position 2 avec en quantité variable des composés 3-alkoxy [Raffa et al. 1966, 1979]. La proportion de composés 3-alkoxy formés augmente avec l'encombrement stérique de l'agent alkylant.

D'une manière générale, il apparaît que :

- L'alkylation en position 2 est souvent majoritairement observée. Suivant l'encombrement de l'agent alkylant, elle peut être accompagnée ou non

d'un composé minoritaire d'alkylation en position 3 [Di Bella et al. 1966b, Raffa et al. 1957b et 1966a, Girard et al. 1982] .

- Des conditions d'alkylation moins douces donnent souvent des produits de polyalkylations [Raffa et al. 1957c, Di Bella et al. 1966a].
- Il est difficile d'alkyler sélectivement en position 4.

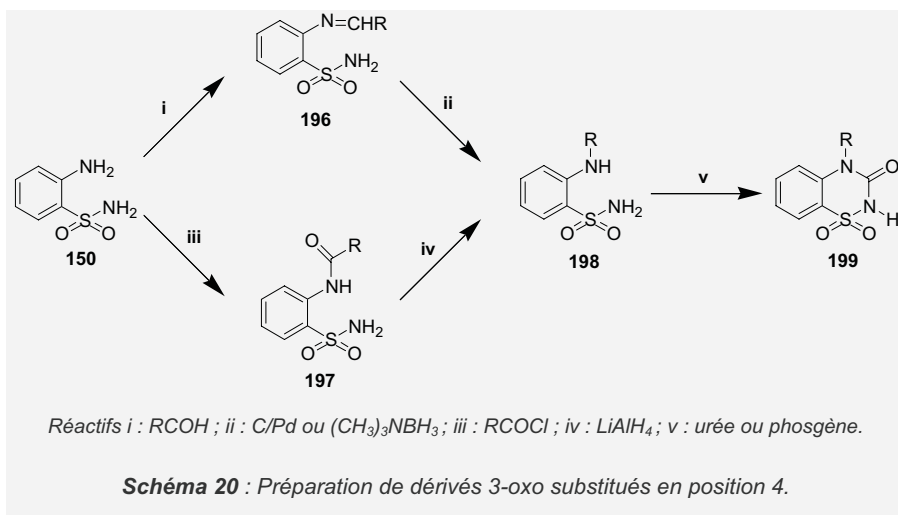


Réactifs i : $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, Na_2CO_3 ou CH_3N_2 ou CH_3I ; ii : $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ excès, NaOH ; iii : $(\text{CH}_2\text{H}_5)_2\text{SO}_4$, Na_2CO_3 ; iv : $(\text{CH}_2\text{H}_5)_2\text{SO}_4$ excès, NaOH ; v : CH_3N_2 excès.

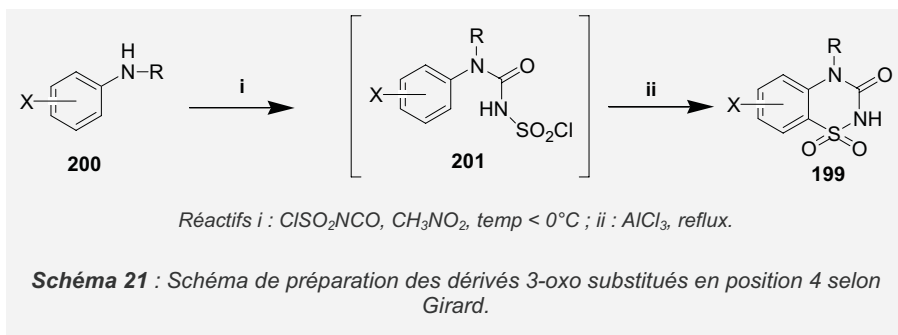
Schéma 19 : Méthylation et éthylation des dérivés 3-oxo.

Les composés alkylés en position 4 peuvent être obtenus via des schémas de synthèse particuliers avec comme produits de départ des *o*-aminobenzènesulfonamides. Le premier schéma décrit passe par une base de schiff (196, Schéma 20) qui est obtenue par réaction d'un aldéhyde sur la fonction amine d'une *o*-aminobenzènesulfonamide (150) dans l'éthanol [Magnien et al. 1964]. La base de schiff est ensuite réduite soit au charbon palladié, soit au

triméthylamine borane dans l'acide acétique pour donner une *N*-alkylaminobenzènesulfonamide (**198**, Schéma 20). Cet intermédiaire est ensuite cyclisé par l'utilisation de phosgène. Une autre possibilité est l'acylation contrôlée de la fonction amine d'une *o*-aminobenzènesulfonamide par un chlorure d'acide [Simmons et al. 1963]. Le composé obtenu (**197**, Schéma 20) est réduit au LiAlH_4 pour donner l'intermédiaire *N*-alkylaminobenzènesulfonamide (**198**) qui peut ensuite être cyclisé à l'urée.

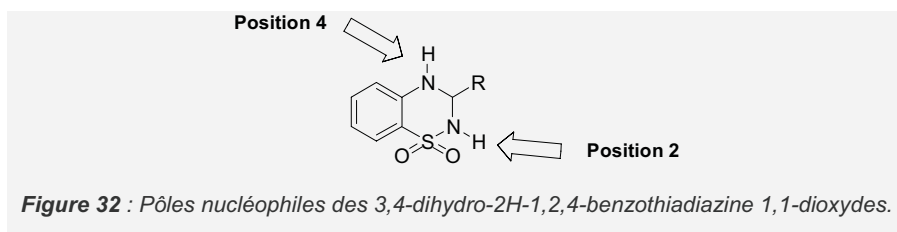


Signalons enfin que la réaction dite de Girard décrite ci-avant peut également être appliquée à des anilines substituées (Schéma 21) [Girard et al. 1979].

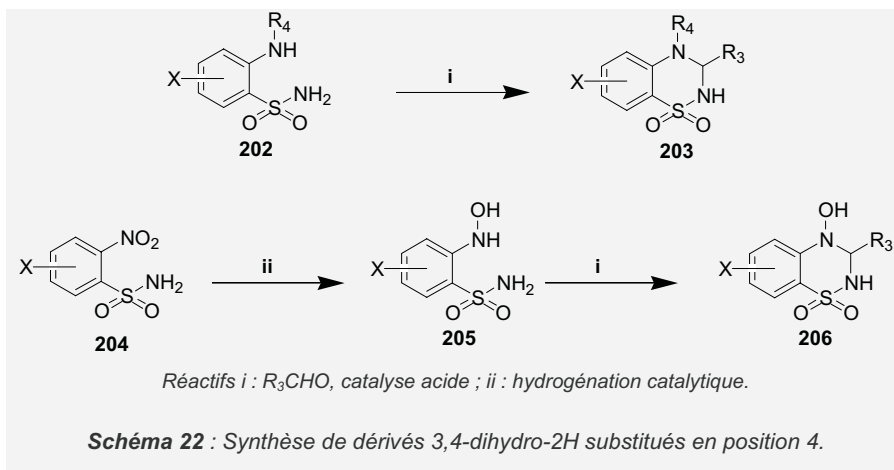


3.1.2.4.2. Les autres 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 2 et/ou 4.

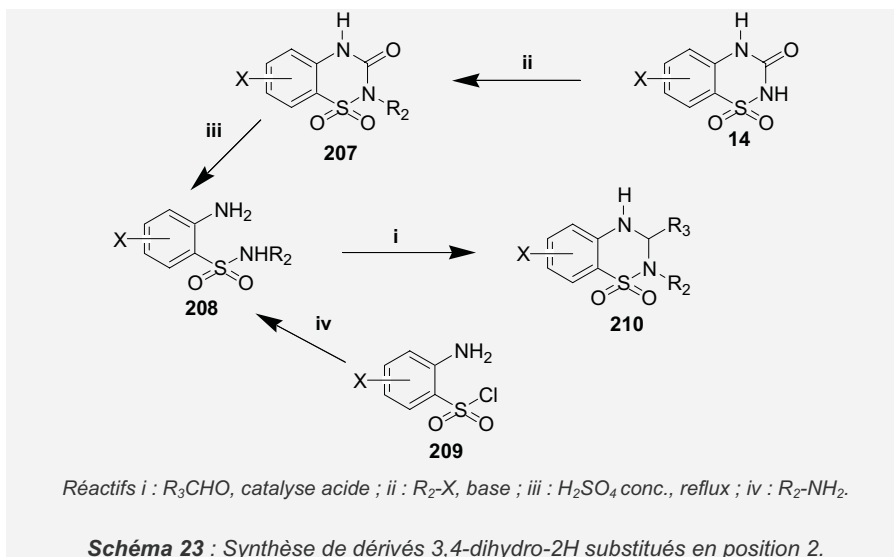
Tout comme les dérivés 3-oxo, les autres composés de type 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (exception faite des dérivés 3-thioxo dont nous parlerons dans le chapitre suivant) possèdent également plusieurs centres nucléophiles susceptibles d'agir sur des groupements électrophiles et de donner des réactions telles que des alkylations ou des acylations (Figure 32). Ainsi, les positions 2 et 4 du noyau thiadiazine peuvent être considérées comme quasiment comparables au niveau de la réactivité chimique. Cette constatation est confirmée par exemple par le fait que l'acétylation des 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes donne principalement des composés diacétylés en positions 2 et 4 [Werner et al. 1960].



Peu de dérivés substitués uniquement en position 4 ont été décrits (exception faite de nos travaux sur les modulateurs allostériques positifs AMPA); seuls quelques composés méthylés sur cette position sont présentés. Ils sont obtenus par cyclisation de *N*-alkylaminobenzènesulfonamides (**202**, Schéma 22) avec différents aldéhydes [Werner et al. 1960]. Cela est probablement dû à la difficulté d'obtention de ces intermédiaires ouverts. Citons encore des dérivés 4-hydroxylés (**206**, Schéma 22) qui sont synthétisés par cyclisation d'*o*-hydroxylaminobenzènesulfonamides (**205**) au moyen de formaldéhyde ou d'acétaldéhyde en catalyse acide [Yale et al. 1968]. Les intermédiaires d'*o*-hydroxylaminobenzènesulfonamides sont générés par réduction partielle des dérivés nitro correspondants par hydrogénation catalytique (Schéma 22).



Un peu plus nombreux sont les dérivés alkylés en position 2. Les intermédiaires clés pour leur obtention sont les *o*-amino-alkyl ou aralkyl-benzènesulfonamides (**208**, Schéma 23) qui sont cyclisés classiquement au moyen d'aldéhydes ou de leurs dérivés. Ces composés peuvent être synthétisés de deux manières distinctes.



La première voie de synthèse passe tout d'abord par l'alkylation ou l'arylation en position 2 d'un dérivé 3-oxo (**14**, Schéma 23) suivie d'une hydrolyse

acide [Close et al. 1960, Short et al. 1961]. La seconde voie de synthèse utilise le chlorure de sulfonyle (**209**, Schéma 23) isolé après chlorosulfonation pour le mettre en réaction avec les amines appropriées [Werner et al. 1960, El-Maghraby et al. 1985].

Terminons par les dérivés 3,4-disubstitués. Somasekhara a présenté en 1968 une voie de synthèse passant par des dérivés de type 2-aralkylamino-*N*-alkylbenzènesulfonamides (**213**, Schéma 24). Ces composés seraient obtenus en deux étapes par la réaction entre un chlorure de sulfonyle (**211**) et une amine aromatique suivie de la substitution d'un atome d'halogène en α de la sulfonamide par une amine (Schéma 24). En réalité, un seul composé de ce type apparaît dans l'article [Somasekhara et al. 1968].

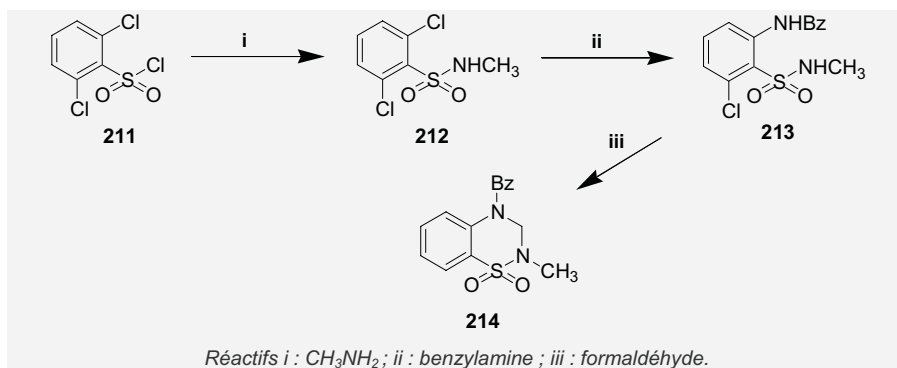


Schéma 24 : Synthèse de dérivés 3,4-dihydro-2H substitués en positions 2 et 4.

3.1.3. Synthèse des dérivés insaturés.

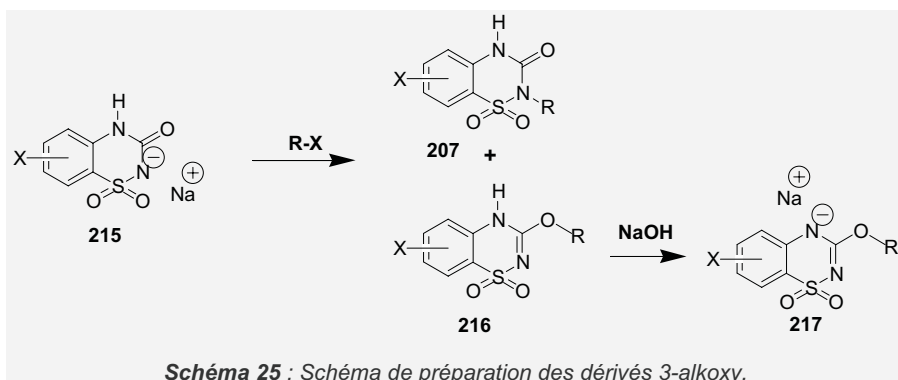
Nous évoquerons dans ce chapitre les composés porteurs d'une liaison double au niveau du cycle thiadiazinique. Ainsi que nous l'avons déjà signalé dans la partie introductive, cette insaturation peut se situer, soit entre l'azote 2 et le carbone 3, soit entre le carbone 3 et l'azote 4. Comme nous l'avons démontré dans plusieurs études, lorsque le choix est possible, cette liaison double se positionne entre l'azote 2 et le carbone 3 donnant ainsi un tautomère de forme 4*H*. Tous les composés seront donc représentés sous cette forme et avec cette nomenclature.

3.1.3.1. Synthèse des 3-alkoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Même si nous avons présenté les composés 3-oxo comme étant des dérivés saturés, l'alkylation de l'oxygène en position 3 entraîne inévitablement l'apparition d'une insaturation au niveau du cycle thiadiazine. C'est pourquoi nous les avons classifiés avec les dérivés insaturés.

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre concernant l'alkylation des dérivés 3-oxo, c'est la position 2 qui s'alkyle préférentiellement. Dans des conditions de réactions plus drastiques ($\text{pH} > 12$, excès d'agent alkylant, ...), une petite quantité de composés O-alkylés peut se former. Cette O-alkylation est cependant toujours accompagnée d'une alkylation sur une des deux autres positions du cycle thiadiazine [Raffa et al 1960b et 1966a].

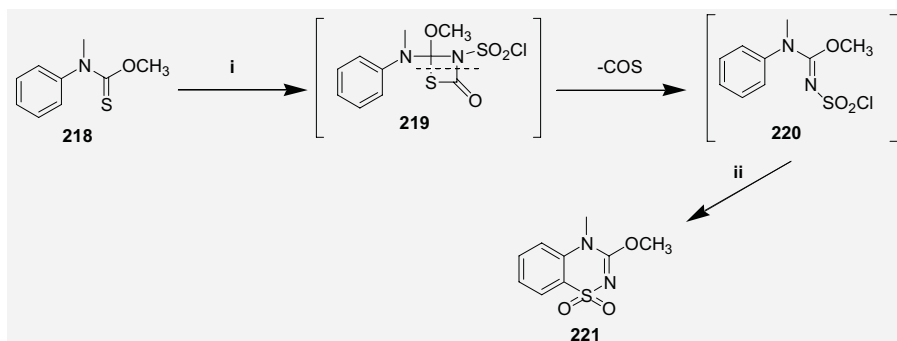
Seul l'utilisation des sels sodiques des dérivés 3-oxo comme produits de départ permet de former, à côté des composés 2-alkylés (**207**) qui sont largement majoritaires, des analogues 3-alkoxy non substitués en position 2 et 4 en quantités variables (**216**, Schéma 25) [Raffa et al. 1966a, 1967 et 1971, Di Bella 1974a]. La quantité de dérivés 3-alkoxy formée, ainsi que la facilité de réaction, sont largement dépendantes de la longueur et de la ramification de la chaîne de l'agent alkylant. Ainsi, il apparaît que l'utilisation de sulfate de diméthyle ou d'iodure de méthyle donne seulement le composé méthylé en 2. Par contre, l'iodure d'isopropyle ou de *sec*-butyle permet d'obtenir majoritairement les composés O-isopropyle et O-*sec*-butyle [Raffa et al. 1967].



Les composés 3-alkoxy et 2-alkylé peuvent être séparés l'un de l'autre par un traitement à la soude qui solubilise uniquement le composé **216** qui,

contrairement à son isomère, possède encore un proton relativement labile en position 4 et peut ainsi être converti en sel sodique hydrosoluble (**217**).

Signalons encore un schéma de synthèse particulier permettant d'accéder au 3-méthoxy-4-méthyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**221**, Schéma 26) à partir de *N*-méthyl-*N*-phénylthiocarbamate de *O*-méthyle (**218**) [Iwakawa et al. 1991]. Ce dérivé est mis en réaction avec de l'isocyanate de chlorosulfonyle dans une réaction de type cycloaddition [2+2]. L'élimination de COS donne un intermédiaire ouvert (**220**) qui cyclise selon une réaction de Friedel et Crafts en présence d'AlCl₃.



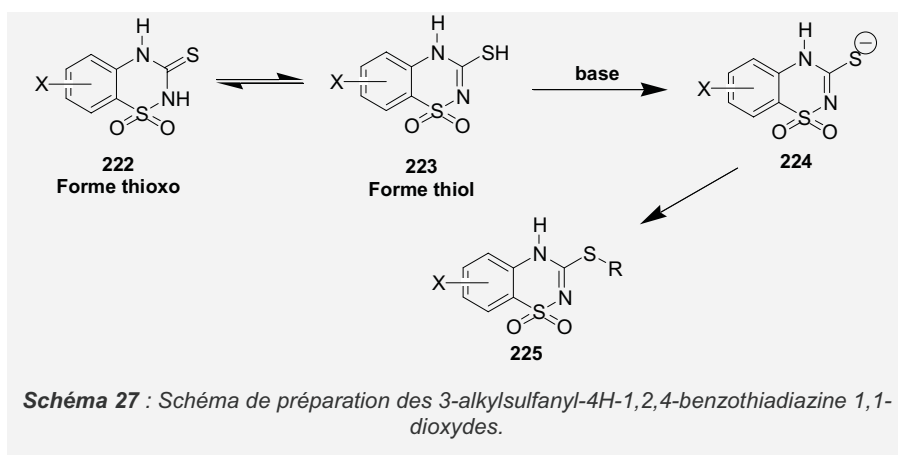
Réactifs *i* : isocyanate de chlorosulfonyle ; *ii* : AlCl₃.

Schéma 26 : 3-méthoxy-4-méthyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

3.1.3.2. Synthèse des 3-alkylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Contrairement à leurs homologues 3-oxo, il n'y a pas de problème au niveau du site d'alkylation pour ce qui concerne les 3,4-dihydro-3-thioxo-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes. En effet, tout comme cela se passe dans les thiourées, c'est sur l'atome de soufre que se trouve le centre nucléophile le plus puissant et c'est lui qui est capable d'attaquer le centre électrophile des agents alkylants. Ce fait est probablement dû à l'existence d'une prototropie entre l'azote en 4 et le soufre en 3 amenant un équilibre entre les formes thioxo (**222**) et thiol (**223**, Schéma 27). Les réactions d'alkylation se passent en général en milieu basique, c'est l'hydrogène de la forme thiol, c'est-à-dire celui présent sur l'atome de soufre, qui est éliminé. Cette déprotonation entraîne l'apparition d'une charge

négative sur le soufre exocyclique qui devient le centre réactionnel préférentiel (**224**, Schéma 27). L'alkylation s'effectue donc sur cette position selon une réaction de type S_N2 régie par un équilibre et permet l'obtention des composés 3-alkylsulfanyles (**225**, Schéma 27). Dans la plupart des cas décrits, l'agent alkylant est un halogénure (souvent un iodure) d'alkyle fonctionnalisé ou non ou d'un halogénure d'aralkyle éventuellement substitué et la réaction se passe en présence d'une base minérale telle que le bicarbonate potassique [Raffa et al. 1962a, Di Bella et al. 1979b, Parenti et al. 1987, Gamberini et al. 1989b]. Les dérivés 3-méthylsulfanylés (**225**, Schéma 27, $R = CH_3$) sont généralement des intermédiaires de synthèse susceptibles de subir des substitutions nucléophiles en position 3 avec départ de méthylmercaptan.



L'acylation en position 3 est également possible dans les mêmes conditions réactionnelles par l'utilisation de chlorure d'acyle ou de benzoyle en présence de bicarbonate de sodium [Di Bella et al. 1973a et 1979a].

Iwakawa et al. décrivent une méthode de synthèse particulière des 3-alkylsulfanyl-4-méthyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**230**, Schéma 28) [Iwakawa et al. 1990]. Le schéma présenté est similaire à celui suivi pour la préparation de 3-méthoxy-4-méthyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (cf. Schéma 26). Les intermédiaires clés sont des *N*-méthyl-*N*-phényldithiocarbamates de *S*-alkyle (**227**, Schéma 28) qui sont obtenus par action de disulfure de carbone sur des *N*-méthylanilines (**226**, Schéma 28). Ces dithiocarbamates réagissent

alors avec l'isocyanate de chlorosulfonyle pour donner un composé ouvert (**229**, Schéma 28) après perte de COS. Une réaction de Friedel-Crafts au chlorure d'aluminium permet d'aboutir aux composés attendus.

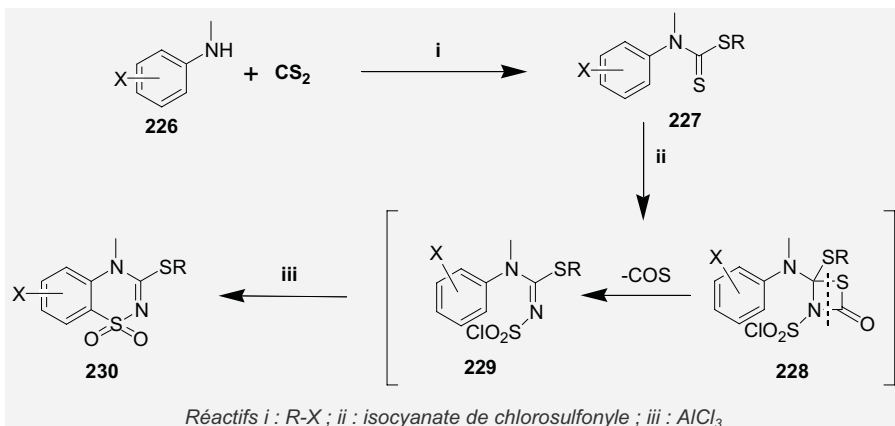
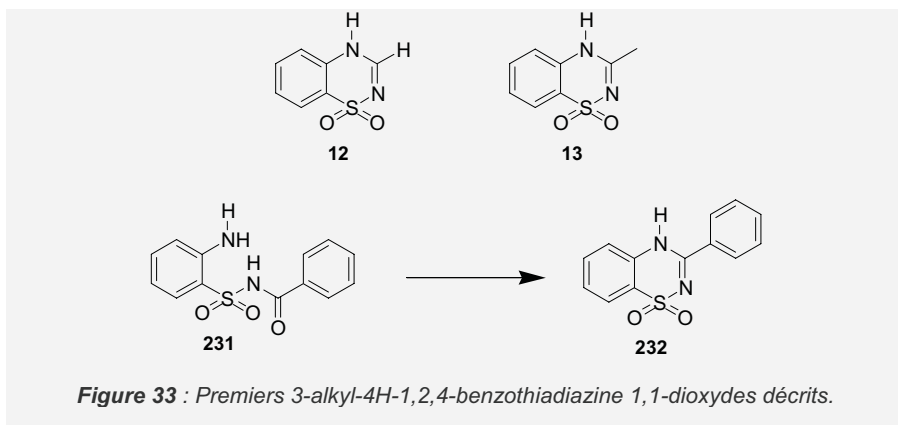


Schéma 28 : Schéma de préparation des 3-alkylsulfanyl-4-méthyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

3.1.3.3. Synthèse des 3-alkyl-, 3-cycloalkyl-, 3-aryl- ou 3-aralkyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

C'est Ekbohm en 1902 qui décrit les deux premiers benzothiadiazine 1,1-dioxydes insaturés. L'un de ceux-ci est le composé non substitué en position 3 (**12**, Figure 33) et l'autre est son homologue 3-méthylé (**13**). Wertheim décrit quelques années plus tard l'obtention du 3-phényl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**232**, Figure 33) par cyclisation d'un N-benzoyl-o-aminobenzènesulfonamide (**231**, Figure 33) [Wertheim 1934].

D'une manière générale, il est permis d'affirmer que la plupart des dérivés insaturés porteurs ou non d'un substituant de type alkyle, aryle ou aralkyle sont obtenus par des réactions de cyclisation d'o-aminobenzènesulfonamides avec différents agents dérivés d'acide carboxylique.



Si nous prenons les composés non substitués en position 3, les agents de cyclisation les plus utilisés sont l'acide formique et l'orthoformate d'éthyle [Freeman et al. 1951, Novello et al. 1960a, Yale et al. 1960, Bierbaum et al. 1963, Raffa et al. 1964]. Ils servent à la fois de réactifs et de solvants et réagissent avec les *o*-aminobenzènesulfonamides par chauffage (Schéma 29). Si aucun intermédiaire réactionnel n'est décrit avec l'acide formique, le passage par un intermédiaire ouvert (**233**, Schéma 29) est parfois admis lors de l'utilisation de l'orthoformate d'éthyle [Freeman et al. 1951]. Ce dernier perd alors deux molécules d'alcool pour donner le composé attendu (**177**).

Lors d'une tentative de fixation d'un atome d'iode sur le noyau aromatique des *o*-amino-4-halogénobenzènesulfonamides au moyen de CII en présence de DMF, Di Bella et al. isolent comme produits secondaires des composés cycliques qui sont présentés comme des 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués sur le noyau aromatique. Cette réaction serait due à l'action formylante de la DMF en présence de CII [Di Bella et al. 1974b].

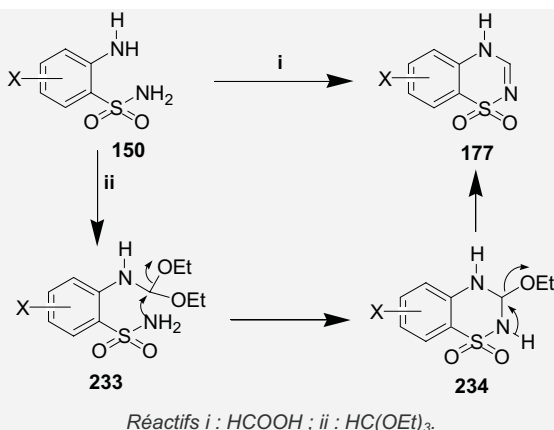


Schéma 29 : Synthèse des 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Commençons la description de la synthèse des 3-alkyl-, 3-aryl- ou 3-aralkyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes par une exception à l'utilisation d'o-aminobenzènesulfonamides comme produit de départ. En effet, Raffa et al. signalent dès 1954 que le chauffage de dérivés 3-oxo en présence de différents anhydrides provoque l'ouverture du cycle et l'apparition de composés diacylés sur les fonctions amine et sulfonamide (**235**, Schéma 30) [Raffa 1954b et 1957d].

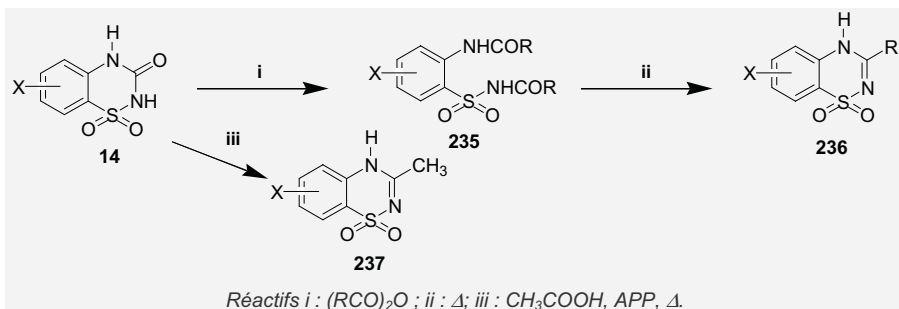


Schéma 30 : Action d'anhydrides sur des dérivés 3-oxo.

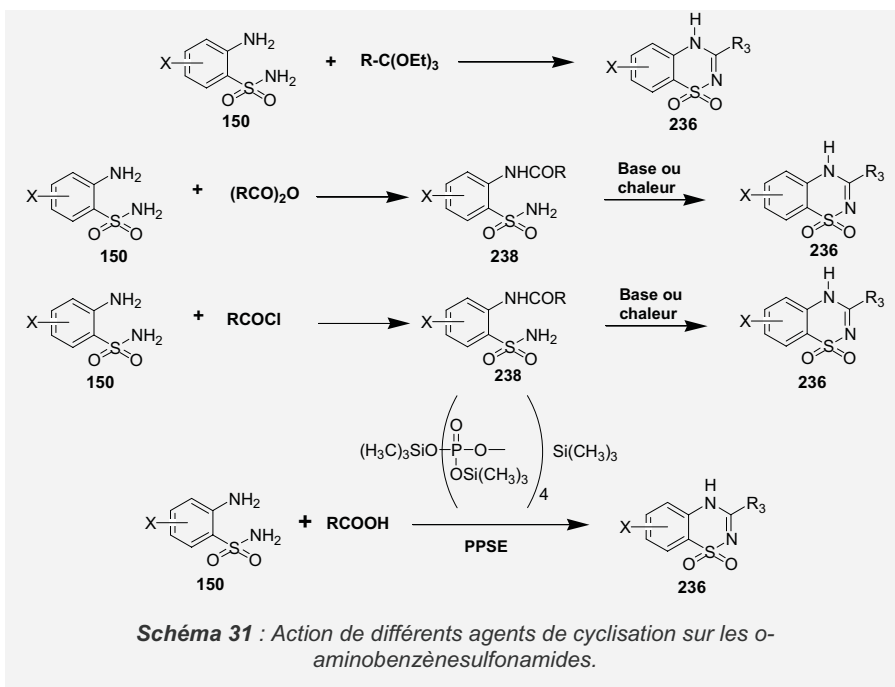
Ces intermédiaires cyclisent ensuite sous l'effet de la chaleur pour donner les composés attendus (**236**). Les rendements de ce genre de réaction apparaissent comme faibles avec l'anhydride acétique et très faibles avec les anhydrides supérieurs [Raffa et al. 1963]. Girard et al. décrivent, en 1982, la

réaction entre des dérivés 3-oxo et l'acide acétique en présence d'acide polyphosphorique (APP) qui amène sous l'action de la chaleur aux dérivés 3-méthyles correspondants (**237**, Schéma 30) [Girard et al. 1982].

A partir d'*o*-aminobenzènesulfonamides, différents agents de cyclisation ont été utilisés pour l'obtention des dérivés insaturés (Schéma 31) à savoir :

- Les orthoalkylates d'éthyle (surtout orthoacétate et orthopropionate) [Rubin et al. 1961, Raffa et al. 1962b, Topliss et al. 1962, Bierbaum et al. 1963, Kumar et al. 1986] . Ils sont surtout utilisés pour les dérivés 3-alkyles à cause de la disponibilité des esters triéthyliques. Le mécanisme d'action est probablement similaire à celui décrit pour l'orthoformiate d'éthyle dans le schéma 29.
- Les anhydrides [Novello et al. 1957 et 1960a, Yale et al. 1960, Raffa et al. 1962e et 1964, Monzani et al. 1973b et 1974b]. Selon les articles, le passage par un intermédiaire *N*-acylé (**238**, Schéma 31) est décrit. Ce composé ouvert cyclise ensuite sous l'action de la chaleur et/ou de bases telles que NH_4OH , NaHCO_3 ou de KF . L'avantage est qu'il existe une grande variété d'anhydrides qui pour la plupart sont des dérivés « relativement » stables. Il est à noter que lorsqu'il s'agit d'anhydrides fortement encombrés, le chauffage du dérivé acylé **238** peut entraîner l'élimination de la sulfonamide au lieu de la cyclisation. Cette réaction secondaire a pu être évitée par l'utilisation d'une base diluée pour faciliter la cyclisation [Topliss et al. 1963b].
- Certains auteurs préfèrent des anhydrides mixtes avec l'acide trifluoroacétique aux anhydrides classiques (Schéma 31), sans doute pour des raisons de réactivité [Bierbaum et al. 1963].
- Les chlorures d'acide [Topliss et al. 1964, McManus et al. 1968, Andrisano et al. 1981, Greiner al. 1986]. Plus réactionnels que les anhydrides mais moins stables et commercialement moins disponibles, les chlorures d'acide sont beaucoup moins utilisés. Comme dans le cas des anhydrides, ils semblent former un intermédiaire *N*-acylé (**238**, Schéma 31) qui cyclise sous l'action de bases et/ou de la chaleur.
- Les acides organiques [Imai et al. 1983]. Généralement peu réactionnels, les acides organiques peuvent être néanmoins utilisés en tant qu'agents de

cyclisation des *o*-aminobenzènesulfonamides s'ils sont en présence d'ester triméthylsilylé de l'acide polyphosphorique (PPSE) (Schéma 31). Le PPSE, qui est obtenu par action de P_2O_5 sur de l'hexaméthylidisiloxane, est présenté comme un agent de cyclisation doux mais puissant, analogue de l'acide polyphosphorique (APP).



Signalons encore l'utilisation potentielle d'amidines ou d'imidoesters comme agents de cyclisation du 1,3-disulfamoyl-4-chloro-6-fluorobenzène (**240**, Schéma 32) [McManus et al. 1968]. La première étape de cette réaction serait la substitution de l'atome de fluor suivie par une condensation sur la fonction sulfonamide en α .

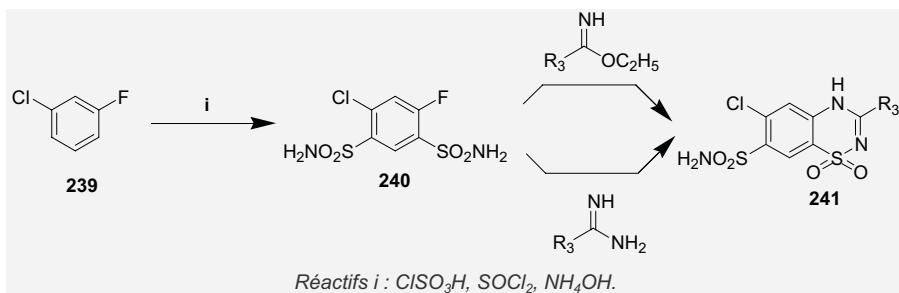


Schéma 32 : Action d'amidines ou d'imidoesters sur le 1,3-disulfamoyl-4-chloro-6-fluorobenzène.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la réaction entre des aldéhydes et des o-aminobenzènesulfonamides en présence de DMF donne généralement les composés saturés de type 3,4-dihydro. L'adjonction au milieu d'hydrogénosulfite sodique semble modifier le produit de réaction puisque dans ces conditions, c'est le composé insaturé qui est obtenu (Schéma 33) [Imai et al. 1981]. L'hydrogénosulfite sodique agirait en tant que catalyseur de déhydrogénation sans que le mécanisme d'action ne soit clairement établi.

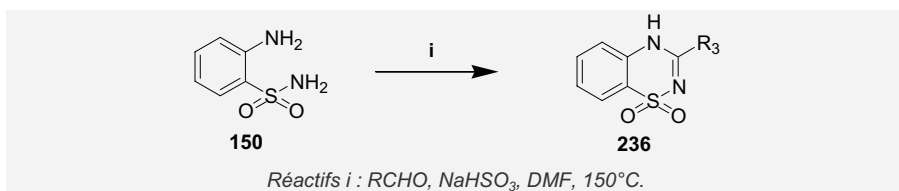
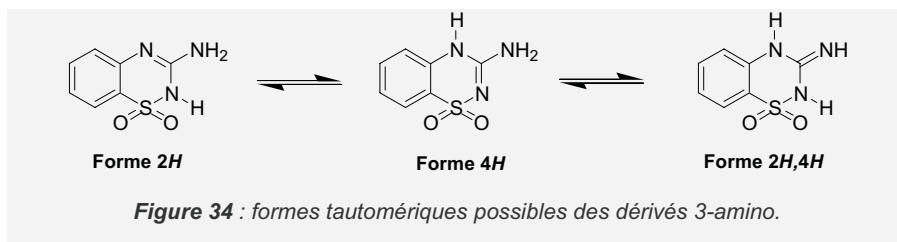


Schéma 33 : Cyclisation des o-aminobenzènesulfonamides en présence d'aldéhydes et d'hydrogénosulfite sodique.

3.1.3.4. Synthèse des 3-alkyl-, 3-aryl- ou 3-aralkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Les dérivés substitués en position 3 par des groupements de type alkylamino sont à considérer comme des sulfonylguanidines cycliques. Tout comme les composés 3-oxo, ils peuvent exister sous 3 formes tautomériques potentielles avec la liaison double entre l'azote 2 et le carbone 3 (forme 4H), entre le carbone 3 et l'azote 4 (forme 2H) ou encore située de manière exocyclique (forme imine 2H, 4H) (Figure 34).

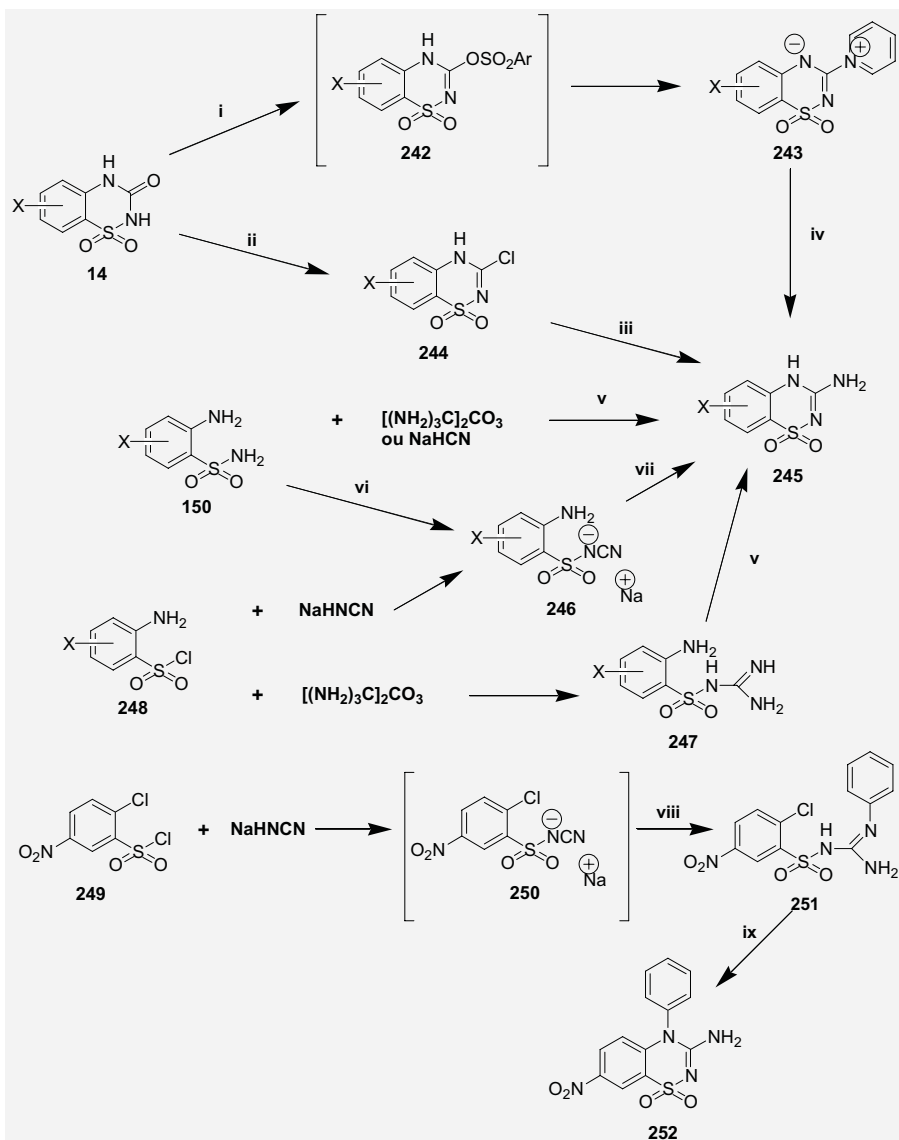


Certains auteurs présentent ces composés comme étant majoritairement sous forme imine [Topliss et al. 1963c], d'autres démontrent que la double liaison est plutôt endocyclique sans trancher toutefois sur sa position exacte [Albasini et al. 1967]. Compte tenu des différents résultats d'analyses structurales que nous avons réalisés (notamment des études cristallographiques et spectroscopiques) et des données de la littérature, nous pouvons affirmer que la forme tautomérique 4H est prédominante.

Les premiers composés de cette série apparaissent en 1957 et sont de type 3-amino (**245**, Schéma 34) non substitués sur l'azote exocyclique. Ils peuvent être obtenus de différentes manières à savoir :

- Par action de NaOH 8% et de la chaleur sur un dérivé pyridinium (**243**, Schéma 34), considéré comme une structure de type bêtaïne [Raffa et al. 1957e et 1961b]. Ce pyridinium est obtenu en faisant réagir le dérivé 3-oxo avec un sulfochlorure d'aryle en présence de pyridine.
- Par action de carbonate de guanidine à fusion sur les o-aminobenzènesulfonamides (Schéma 34) [Topliss et al. 1963c, Raffa et al. 1964]. Il est à noter que cette réaction ne fonctionne pas si les aminobenzènesulfonamides sont substitués soit sur la fonction amino, soit sur la fonction sulfonamide.
- Par action du carbonate de guanidine sur le chlorure d'o-aminobenzènesulfonyle (**248**). L'intermédiaire sulfonylguanidine ouvert (**247**, Schéma 34) subit ensuite une fusion [Petersen 1973].
- Par action du cyanamide sodique à fusion sur les o-aminobenzènesulfonamides (Schéma 34) [Topliss et al. 1963c]. Cette réaction donne de moins bons rendements que celle utilisant le carbonate de guanidine.

- Par action du cyanamide sodique sur le chlorure d'*o*-aminobenzènesulfonyle. L'intermédiaire sulfonylcyanamide obtenu (**246**, Schéma 34) peut être ensuite cyclisé en milieu acide [Petersen 1973]. Lorsqu'un chlorure de 2-chloro-5-nitrobenzènesulfonyle (**249**) est utilisé comme produit de départ et que l'intermédiaire sulfonylcyanamide obtenu (**250**) est mis en réaction avec une aniline, alors une sulfonylguanidine substituée (**251**) est obtenue. Elle peut ensuite être cyclisée par substitution du chlore aromatique pour obtenir un dérivé 4-substitué (**252**) [Angeletti et al. 1960 et 1963].
- Par action du bromure de cyanogène sur les *o*-aminobenzènesulfonamides (**150**) [Petersen 1973]. L'intermédiaire **246** est obtenu et cyclise toujours en milieu acide (Schéma 34).
- Par action du pentachlorure de phosphore sur le dérivé 3-oxo (**14**, Schéma 34). Le composé réactionnel 3-chloro (**244**) est ainsi obtenu et peut réagir avec une solution chloroformique d'ammoniac afin de conduire au dérivé attendu [Reddy et al. 1986].
- Par action de 5-aminotétrazole (5-AT) sur un chlorure d'*o*-nitrobenzènesulfonyle (**253**, Schéma 35) [Peet et al. 1987]. Un intermédiaire de type azide sulfonylcarbamique (**254**) est ainsi synthétisé. Il cyclise ensuite spontanément durant la réduction de la fonction nitro au dithionite sodique en milieu basique.
- Par action de carbonate ammonique à fusion sur un intermédiaire 3-méthylsulfonyl (**255**, Schéma 35) [Raffa et al. 1966b].



Réactifs i : ArSO_2Cl , pyridine ; ii : PCl_5 ; iii : $\text{NH}_3/\text{CHCl}_3$; iv : NaOH_d ; v : Δ ; vi : BrCN ; vii : H^+ ; viii : aniline ; ix : NaHCO_3 .

Schéma 34 : Schémas de synthèse des 3-amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

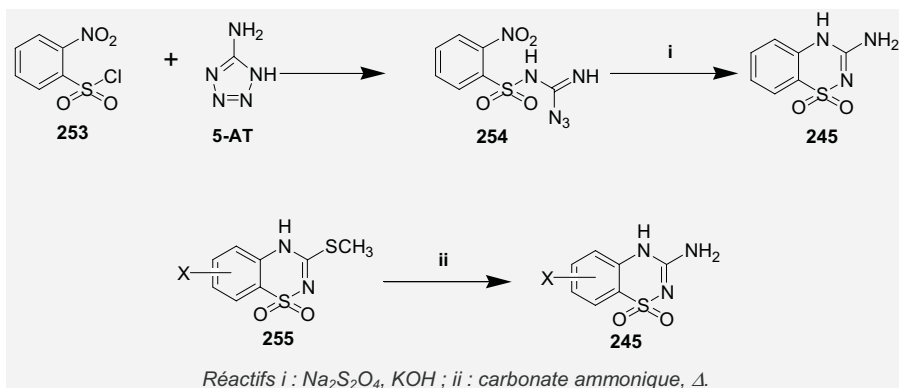


Schéma 35 : Schémas de synthèse des 3-amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

En ce qui concerne les dérivés 3-alkylamino-, 3-arylamino- et 3-aralkylamino-, la méthode la plus courante de synthèse consiste à mettre en réaction un intermédiaire 3-méthylsulfanylé (**255**, Schéma 36) avec l'amine appropriée généralement par chauffage dans une enceinte close [Raffa et al, 1962f, 1965 et 1974b, Grana et al. 1962, Di Bella et al. 1978, Monzani et al. 1979, Wollweber et al. 1981, Peat et al. 2002]. Lorsque l'amine à greffer est peu réactionnelle ou relativement encombrée, il est parfois nécessaire de recourir à un meilleur groupement partant que le groupement méthylsulfanylé.

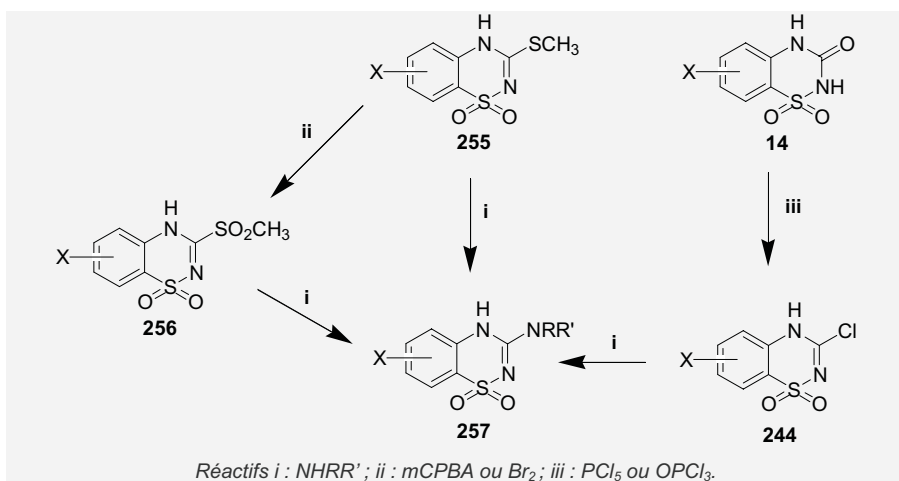
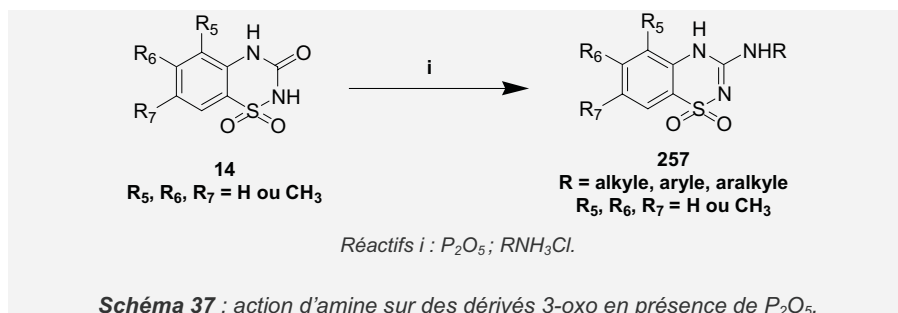


Schéma 36 : Schémas de synthèse des 3-alkyl-, 3-aryl ou 3-aralkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Ainsi, des intermédiaires 3-méthylsulfonyl (**256**, Schéma 36) et 3-chloro (**244**) ont été utilisés avec succès [Cronin et al. 1968, Wollweber et al. 1981, Peat et al. 2002]. Ils sont obtenus respectivement par oxydation à l'acide *m*-chloroperbenzoïque (mCPBA) ou au brome du composé 3-méthylsulfonyl correspondant et par action de PCl_5 ou d' OPCl_3 sur les composés 3-oxo (Schéma 36).

Toujours à partir de dérivés 3-oxo (**14**), il est possible de substituer l'atome d'oxygène par un groupement alkyl- aralkyl- ou arylamine par simple action du chlorhydrate de l'amine souhaitée en présence de P_2O_5 (Schéma 37) [Jensen et al. 1982].



Petersen présente en 1973 quelques autres voies de synthèse utilisant les *o*-aminobenzènesulfonamides comme produit de départ [Petersen 1973]. L'action d'alkylcyanamide sur ces dérivés permet d'obtenir des intermédiaires sulfonylguanidines ouverts (**258**, Schéma 38) qui cyclisent sous l'action de la chaleur pour donner les composés attendus. Un chauffage graduel d'*o*-aminobenzènesulfonamides avec de la *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (**260**) permet selon l'auteur d'arriver directement au composé 3-cyclohexylamino (**261**, schéma 38) par perte d'une molécule de cyclohexylamine. Cet article décrit également la possibilité de substituer le groupement 3-amino sur l'azote exocyclique par d'autres alkylamines par simple chauffage en présence des amines appropriées (Schéma 38).

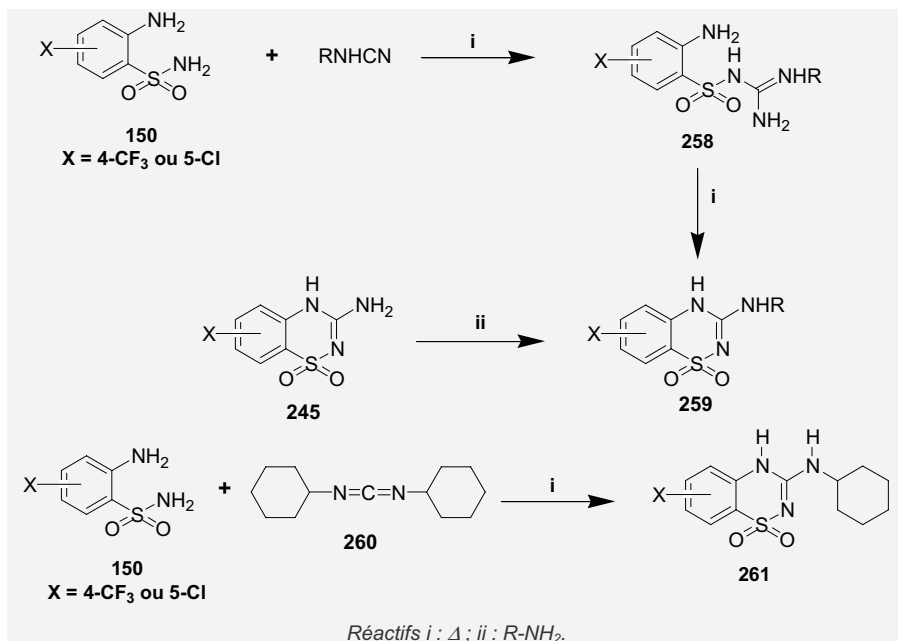
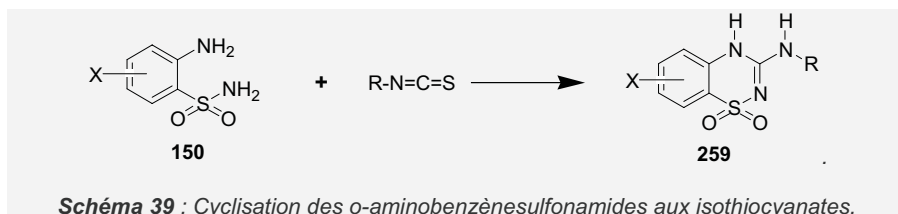


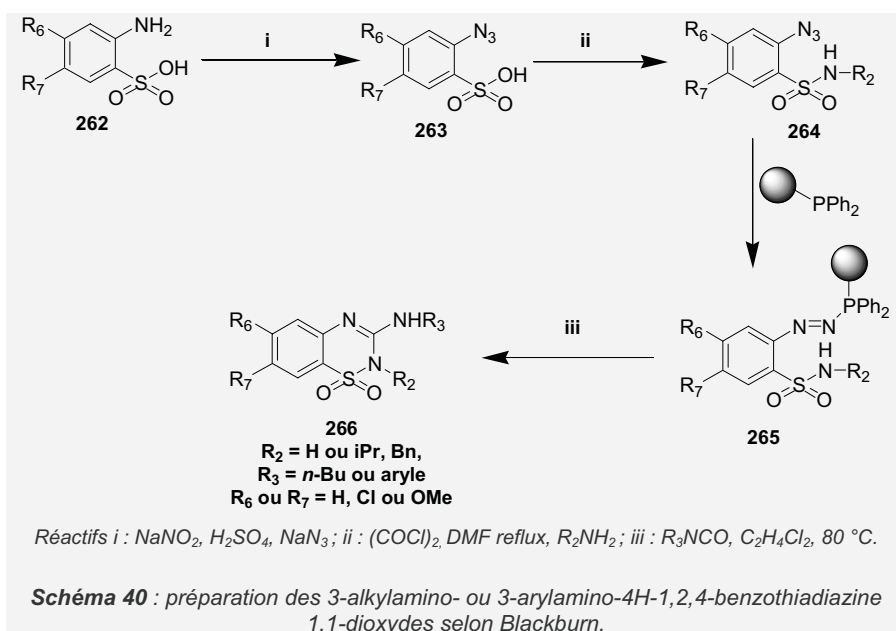
Schéma 38 : Schémas de synthèse des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes selon Petersen.

La réaction entre une o-aminobenzènesulfonamide et un isothiocyanate permet également d'obtenir les dérivés de type 3-alkylamino ou 3-arylamino (**259**, Schéma 39) [Topliss et al. 1963b].



Sur base d'un schéma réactionnel développé pour la synthèse des 2-alkylamino-3-alkylquinazolinones via une réaction intramoléculaire de type aza-Wittig, Blackburn et al. proposent une voie de synthèse alternative pour la préparation des composés 3-alkylamino et 3-arylamino substitués ou non en position 2 [Blackburn et al. 2005]. Les produits de départ de cette synthèse sont

des *o*-azidobenzènesulfonamides (**264**, Schéma 40) qui sont obtenus en 3 étapes à partir d'acide *o*-aminobenzènesulfonique (**262**). La fonction aminée est tout d'abord transformée en azide (**263**) par une diazotation suivie de l'action d'azidure sodique. L'acide sulfonique est ensuite activé sous forme de chlorure par le chlorure de l'acide oxalique avant d'être mis en réaction avec une amine ou de l'ammoniaque. L'*o*-azidobenzènesulfonamide (**264**) peut réagir avec de la triphénylphosphine greffée sur un support polymérique pour donner un iminophosphorane (**265**). Cet intermédiaire est enfin cyclisé par action d'isocyanates appropriés pour donner les composés attendus avec des rendements qualifiés de bons à modérés. Contrairement à ce que présente les auteurs, la longueur de ce schéma et notamment l'étape de formation de l'azidosulfonamide n'en fait pas une méthode particulièrement attrayante et certainement probablement pas une alternative viable aux schémas classiquement utilisés jusqu'alors.



Signalons enfin deux schémas réactionnels particuliers puisqu'ils permettent d'obtenir des composés porteurs d'une chaîne alkylamino en position 3 fonctionalisée avec un groupement hydroxyle ou thiol [Chern et al. 1990a et

1990b]. Ces composés (**268** et **270**, Schéma 41) sont obtenus respectivement par action d'isocyanate et d'isothiocyanate convenablement substitués via des intermédiaires ouverts de type urée ou thiourée (**267** et **269**, Schéma 41) à partir d'*o*-aminobenzènesulfonamide.

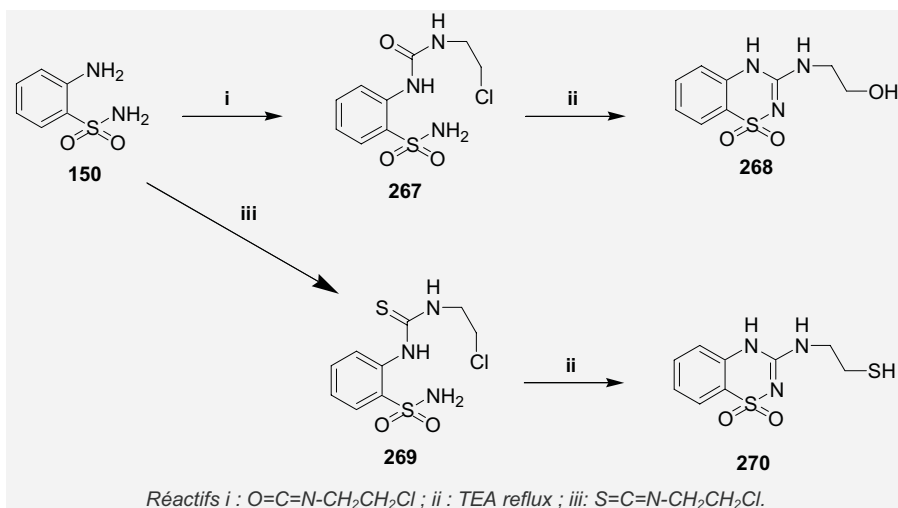


Schéma 41 : préparation des 3-alkylamino substitués par une fonction hydroxyle ou thiol.

3.1.4. Synthèse des dérivés tricycliques.

Débutons ce paragraphe par la clarification de son contenu et l'explication de la signification du titre. En effet, par la dénomination « composés tricycliques », nous entendons les composés dont un troisième cycle est accolé au système benzothiadiazinique au niveau de la partie thiadiazine. Deux structures sont alors possibles; la première où le troisième cycle est accolé entre les positions 2 et 3, c'est-à-dire sur la face b du cycle thiadiazine (système 2,3) et la seconde où il est accolé entre les positions 3 et 4, c'est-à-dire sur la face c (système 3,4). Nous présenterons séparément ces deux systèmes.

3.1.4.1. Les systèmes tricycliques 2,3.

Peu de composés de ce type sont décrits dans la littérature, cela est sans doute lié autant à des difficultés de synthèse qu'au manque d'intérêt

pharmacologique qu'ils ont suscité. Entre la fin des années septante et le début des années nonante, Alo et son équipe sont les seuls à décrire ce type de système tricyclique. Leur voie de synthèse passe par un sel de sulfonyliminium. Deux séries sont préparées suivant cette méthode : les 2,3,10,10a-tétrahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*b*]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxydes (**279**, Schéma 42) et les 1,2,3,4,11,11a-hexahydropyrido[1,2-*b*]-1,2,4-benzothiadiazine 6,6-dioxydes (**285**, Schéma 43) [Adesogan et al. 1979, Alo et al. 1986 et 1990]. Les produits de départ des dérivés pyrrolo sont les acides *N*-(2-nitroarylsulfonyl)pyrrolidine-2-carboxyliques (**273**, Schéma 42) qui sont obtenus par action de l'acide pyrrolidine-2-carboxylique (**272**) sur les chlorures d'*o*-nitrobenzènesulfonyles correspondants (**271**). La fonction acide de ces composés est ensuite transformée en chlorure d'acide (**274**) par action de SOCl_2 . L'adjonction de trifluorométhanesulfonate d'argent sur cet intermédiaire provoque l'apparition rapide du sulfonyliminium (**277**) via un mécanisme décrit dans le schéma 42. Ce sulfonyliminium est ensuite mis en réaction avec de l'ammoniaque concentrée pour donner la 2-amino-*N*-(2-nitroarylsulfonyl)pyrrolidine (**278**). La réduction au fer subséquente de la fonction nitro provoque la fermeture du cycle et aboutit aux composés attendus (**279**).

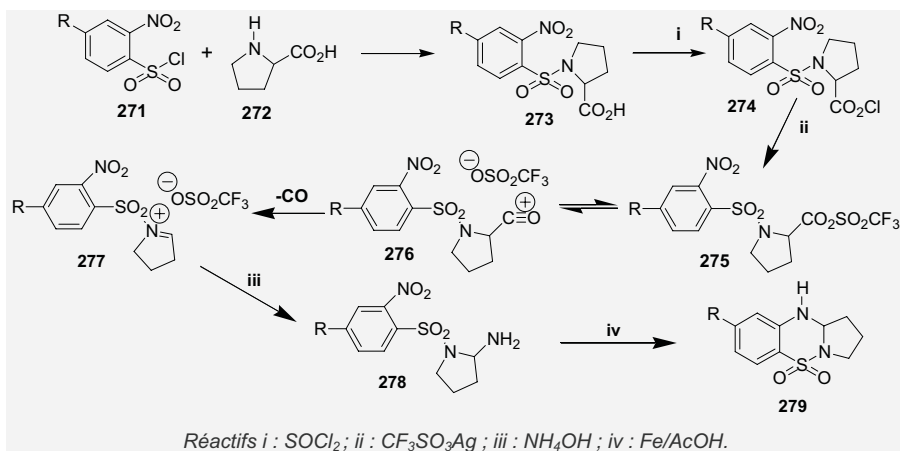
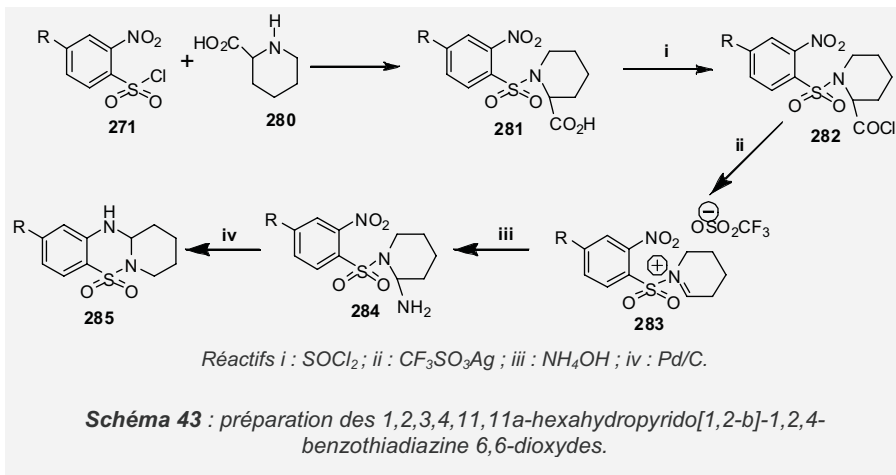


Schéma 42 : Préparation des 2,3,10,10a-tétrahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*b*]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxydes.

Les 1,2,3,4,11,11a-hexadihydropyrido[1,2-*b*]-1,2,4-benzothiadiazine 6,6-dioxydes (**285**, Schéma 43) sont préparés suivant le même schéma, le chlorure de

sulfonyl (271) étant cette fois mis en réaction avec l'acide pipéridine-2-carboxylique (280). L'étape de cyclisation réductrice ne s'effectue cependant pas non plus avec du fer mais avec du charbon palladié.



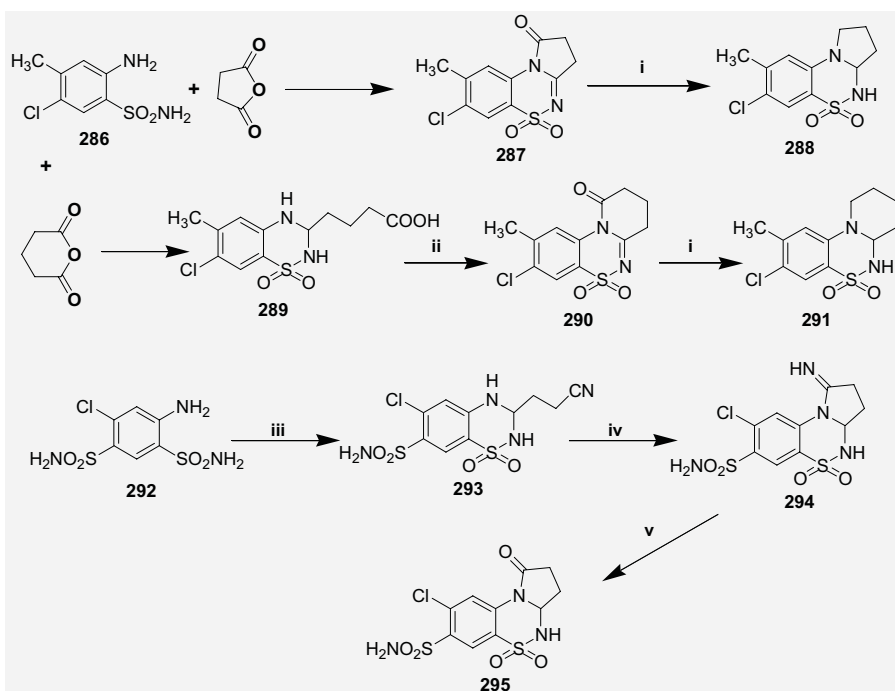
Nous ne décrivons pas ici les autres schémas de synthèse qui nous semblent trop spécifiques et qui permettent d'aboutir notamment à trois composés de type 3-carboéthoxy-4,11-dihydro-11-alkyl- ou phényl-4-oxo-pyrimido[1,2-b]-1,2,4-benzothiadiazine 6,6-dioxyde [Murthy et al. 1989] et au 7,12-dihydroisoquino[3,2-c]-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde [Kisel et al. 2000].

3.1.4.2. Les systèmes tricycliques 3,4.

Beaucoup plus répandus que leurs homologues, il s'agit principalement de systèmes avec un cycle à cinq ou six chaînons greffé sur la face c du cycle thiadiazine et sans autre hétéroatome que l'azote du cycle principal.

Les premiers travaux concernant cet hétérocycle font état de réactions de cyclisation entre des *o*-aminobenzènesulfonamides (286) et l'anhydride succinique à fusion (Schéma 44) [Bell et al. 1964]. Cette réaction permet d'obtenir des composés de type 2,3,3a,4-tétrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-c]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxyde (288, Schéma 44) après réduction au LiAlH_4 de l'intermédiaire insaturé 287. L'utilisation d'anhydride glutarique au lieu d'anhydride succinique ne permet pas d'obtenir directement l'homologue supérieur du 288 mais aboutit à un composé porteur d'un groupement acide butyrique en position 3 (289, Schéma

44). Ce composé, chauffé en présence d'anhydride acétique, conduit bien au 8,9-dihydropyrido[2,1-*c*]-1,2,4-benzothiadiazine-10(7*H*)-one 5,5-dioxyde (**290**) qui peut être réduit au LiAlH_4 pour donner le dérivé **291**. Les *o*-aminobenzènesulfonamides (**292**) mis en réaction avec le diméthyl acétal du γ -cyanopropionaldéhyde permettent d'obtenir les 3-cyanoéthyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**293**, Schéma 44) [Bell et al. 1968]. Ces composés, traités *in situ* par une base minérale, donnent les 2,3,3a,4-tétrahydro-1-imino-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxydes (**294**) qui peuvent être hydrolysés en leurs analogues oxo (**295**) en milieu HCl.

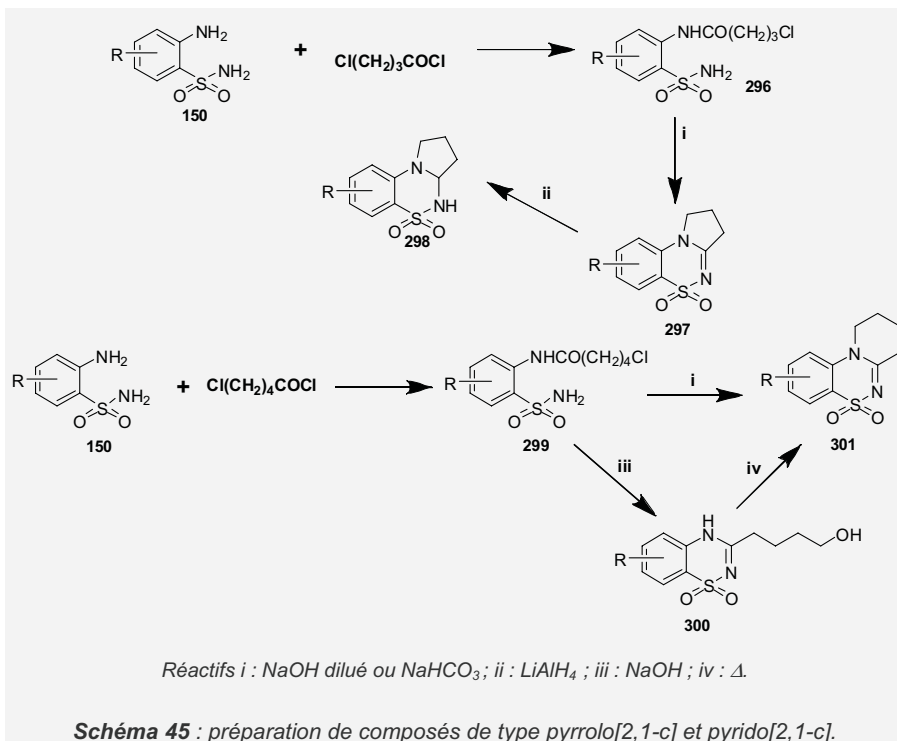


Réactifs i : LiAlH_4 ; ii : Ac_2O ; iii : $\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$; iv : NaOH ; v : HCl .

Schéma 44 : préparation de composés de type pyrrolo[2,1-*c*] et pyrido[2,1-*c*].

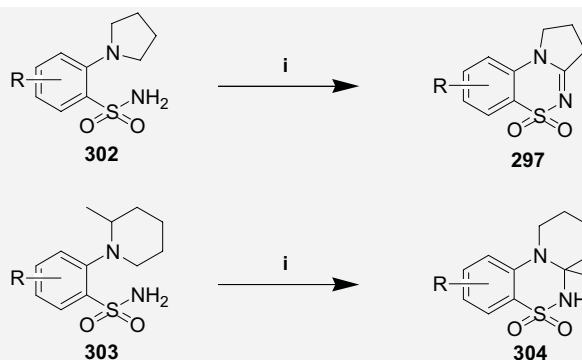
Un autre voie de synthèse possible des dérivés pyrrolo[2,1-*c*] ou pyrido[2,1-*c*] consiste en une cyclisation intramoléculaire de *N*-(4-chlorobutanoyl)aminobenzènesulfonamides (**296**, Schéma 45) ou *N*-(5-chloropentanoyl)aminobenzènesulfonamides (**299**, Schéma 45) en milieu basique

dilué [Cameroni et al. 1972a et 1972b]. Cette réaction donne accès aux dérivés insaturés (**297** et **301**) qui peuvent être réduits par action de LiAlH_4 [Bernabei et al. 1976]. Les deux intermédiaires **296** et **299** sont, quant à eux, obtenus par réaction des *o*-aminobenzènesulfonamides (**150**) avec les chlorures des acides 4-chlorobutyrique et 5-chlorovalérienique (Schéma 45).



Les 7,8,9,10-tétrahydropyrrolo[2,1-c]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxydes (**301**) peuvent également être préparés par cyclisation thermique d'intermédiaires 3-(4-hydroxybutyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**300**, Schéma 45) ; eux-mêmes obtenus, en proportions variables, par action de NaOH dans des conditions plus vigoureuses sur le composé **299** [Cameroni et al. 1972c].

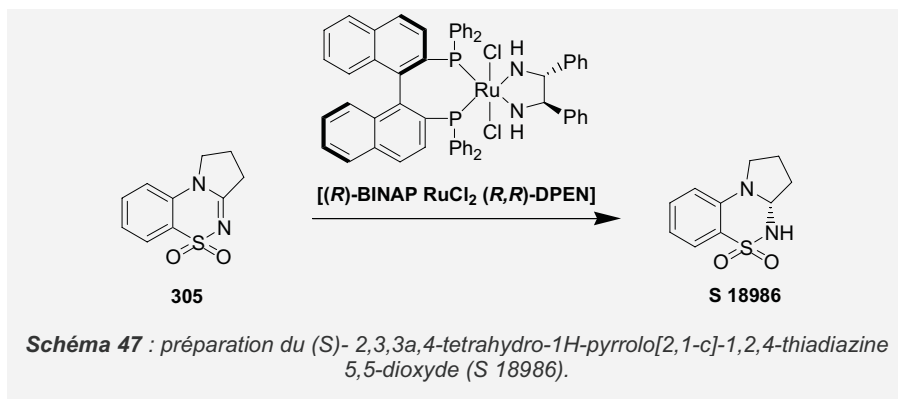
Möhrle et son équipe présentent en 1990, une méthode particulière d'obtention des composés pyrrolo[2,1-c] et pyrido[2,1-c] par déshydrogénation de 2-(1-pyrrolidiny)benzènesulfonamide (**302**, Schéma 46) et 2-(2-méthylpipéridino)benzènesulfonamide (**303**, Schéma 46) au moyen d'un complexe $\text{Hg}(\text{II})$ -EDTA [Möhrle et al. 1990].



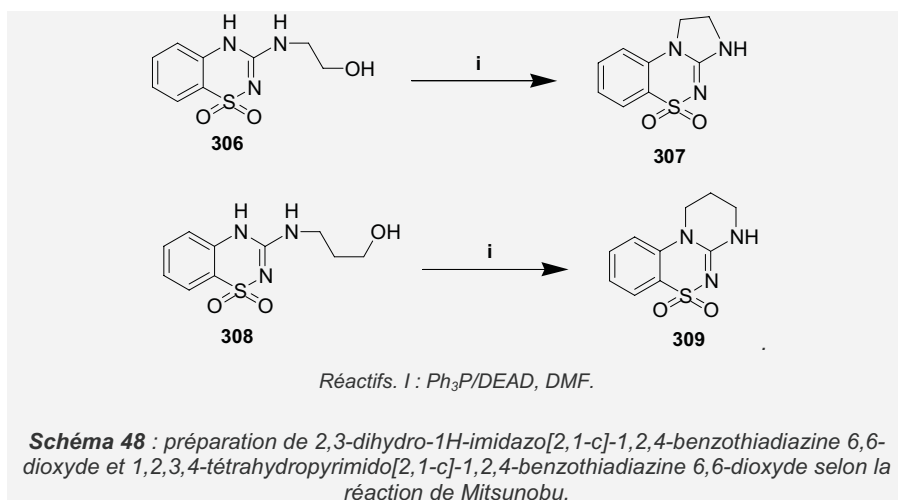
Réactifs i : Hg(II)-EDTA.

Schéma 46 : préparation de composés de type pyrrolo[2,1-c] et pyrido[2,1-c].

Avant de terminer avec les composés de type pyrrolo[2,1-c], revenons quelques instants sur le composé S 18986, qui est un potentialisateur du courant AMPA particulièrement intéressant. Ce dérivé est l'énantiomère S du 2,3,3a,4-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-c]-1,2,4-thiadiazine 5,5-dioxyde (Schéma 47). Il est préparé à partir de son homologue non réduit (**305**) par réduction énantiosélective. Les premiers essais de réduction sélective ont été conduits par du LiAlH₄ en présence de différents modificateurs chiraux (souvent des amines secondaires chirales) [Desos et al. 1996]. Les résultats de ces expériences n'étant pas tout à fait satisfaisants (quantité de modificateurs chiraux trop élevée et excès énantiomérique (ee) insuffisant), d'autres types d'hydrogénations catalytiques asymétriques ont été investigués [Cobley et al. 2003]. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un catalyseur au ruthénium de type [(R)-BINAP RuCl₂ (R,R)-DPEN] en présence de tert-butoxylate potassique dans l'isopropanol. L'ee obtenu est dans ce cas supérieur à 99% après recristallisation.



Terminons enfin par la description de la synthèse de 2,3-dihydro-1H-imidazo[2,1-c]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxyde (**307**, Schéma 48) et 1,2,3,4-tétrahydropyrimido[2,1-c]-1,2,4-benzothiadiazine 6,6-dioxyde (**309**, Schéma 44) [Chern et al. 1991]. Le schéma réactionnel permettant d'accéder à ces composés procède par une réaction intramoléculaire de Mitsunobu à partir d'intermédiaires 3(2-hydroxyéthyl)amino- et 3-(3-hydroxypropyl)amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**306** et **308** Schéma 48).

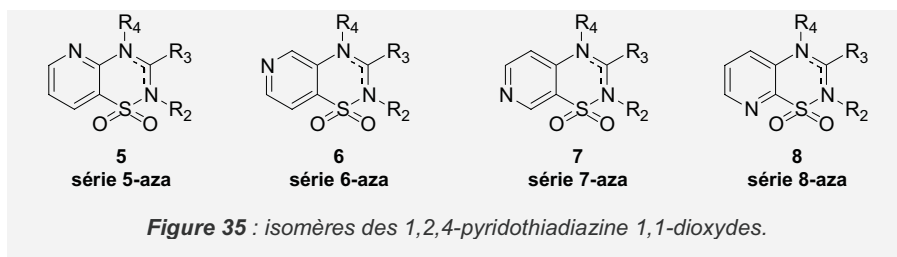


Ces intermédiaires sont obtenus comme décrits dans le schéma 41 à partir d'o-aminobenzènesulfonamides et d'isocyanates appropriés [Chern et al. 1990b]. La réaction de Mitsunobu permet l'utilisation d'alcools comme agents alkylants par

la présence dans le milieu réactionnel de triphénylphosphine et de DEAD (azodicarboxylate de diéthyle) [Ikemizu et al. 1997].

3.2. Les séries pyridiniques.

Débutons ce chapitre par un nouveau rappel, celui de l'existence de quatre isomères de position de l'azote pyridinique qui peuvent donner évidemment naissance à quatre séries distinctes, séries que nous nommerons trivialement 5-, 6-, 7- et 8-aza (Figure 35).



Exception faite du travail réalisé par notre laboratoire dans le domaine des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes (voir chapitre 4 et 5), peu de choses apparaissent dans la littérature concernant la chimie de ces séries. Les premières traces de ce type de structures sont trouvées au début des années soixante. Yale en 1960 et Cragoe en 1961 décrivent quasiment le même schéma de synthèse pour des dérivés en série 5-aza porteur en position 7 d'un second groupement sulfonamide [Yale et al. 1960, Cragoe et al. 1961] et qui sont présentés comme les bioisostères pyridiniques des diurétiques thiazidiques. La première étape consiste en une chlorosulfonation de 2-aminopyridines et conduit après traitement à l'ammoniaque aux 2-aminopyridine-3,5-disulfonamides (**312**, Schéma 49). Ces intermédiaires peuvent être cyclisés, soit à l'orthoformiate de triéthyle ou à l'acide formique pour donner les composés insaturés (**313**), soit au formaldéhyde pour donner les dérivés 3,4-dihydro-2H (**314**). Certains composés peuvent être substitués en position 6 par des groupements méthyle, amino, hydroxyle ou chloro. Cragoe décrit aussi la synthèse de 2 composés en série 7-aza à savoir le 5-sulfamoyl-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**318**, Schéma 49) et son homologue 3,4-dihydro-2H (**319**) qui sont obtenus à partir de 4-aminopyridine (**315**) via une

chlorosulfonation suivie d'un traitement à l'ammoniaque pour donner le 4-aminopyridine-3,5-disulfonamide (**317**) qui réagit ensuite avec du formamide ou du formaldéhyde.

En 1974, en tentant de préparer des *N*-acylpyridinesulfonamides par action de différents anhydrides sur le 4-phénylaminopyridine-3-sulfonamide (**320**, Schéma 49), Delarge et al. ont isolé plusieurs composés caractérisés comme étant des 3-alkyl-4-phényl-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes (**321**) [Delarge et al. 1974].

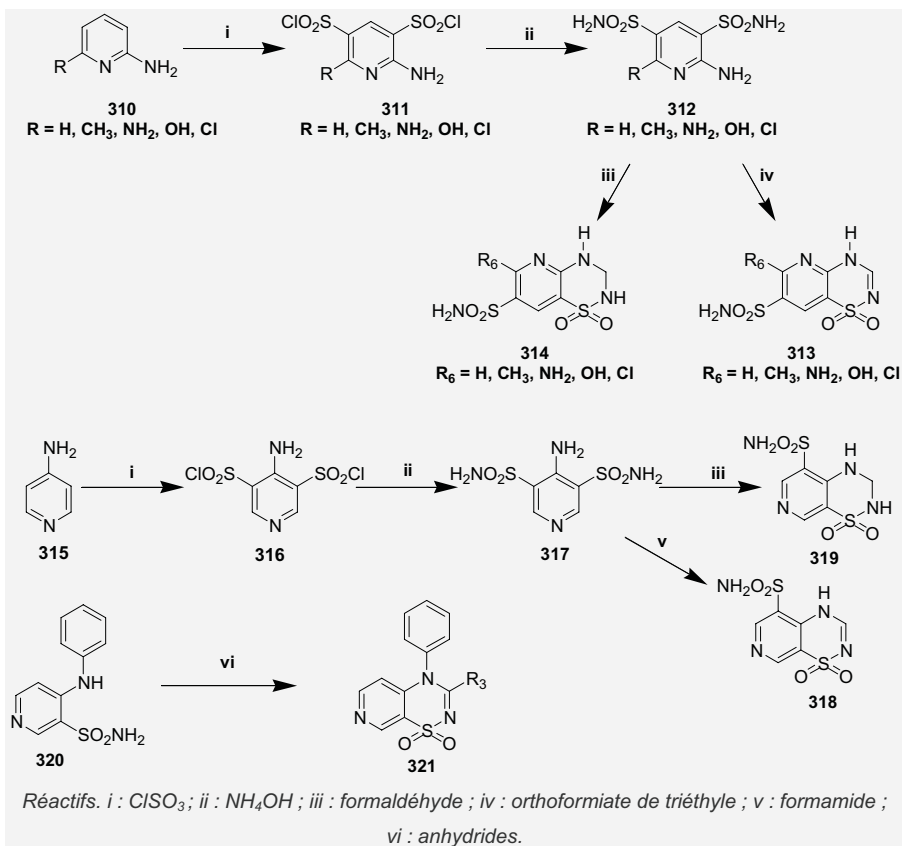
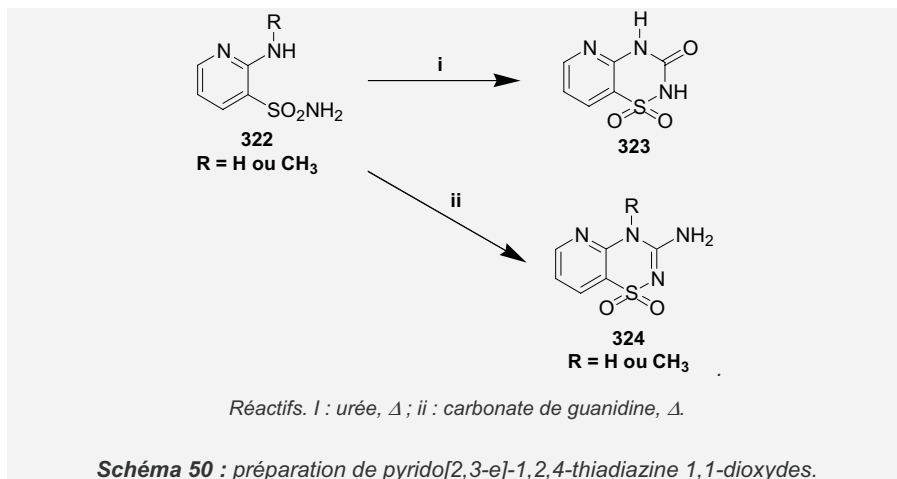


Schéma 49 : préparation de pyridothiadiazine 1,1-dioxydes.

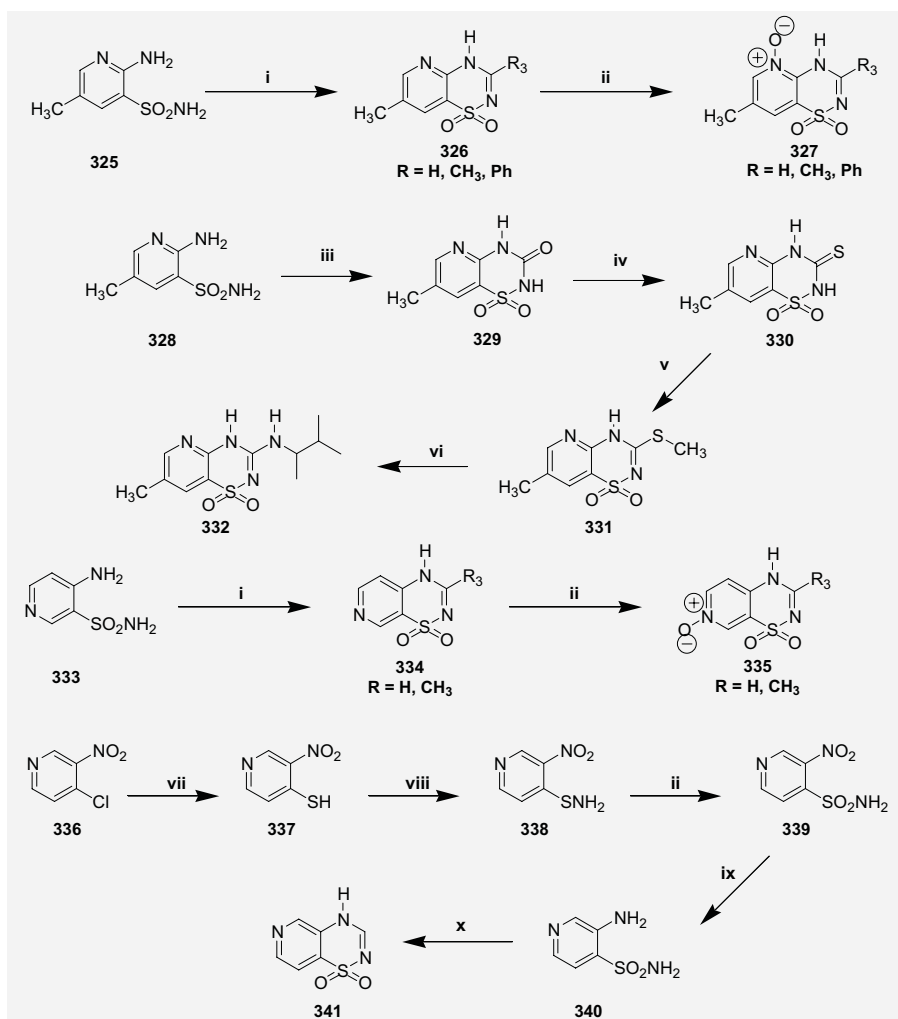
Toujours en série 5-aza, les dérivés 3-oxo (**323**, Schéma 50) et 3-amino (**324**) 4-méthylés ou non ont également été préparés et décrits par une équipe

russe en 1979 [Kotovskaya et al. 1979]. Ces composés sont obtenus par fusion du 2-aminopyridine-3-sulfonamide ou du 2-méthylaminopyridine-3-sulfonamide (**322**) à l'urée pour le **323** et au carbonate de guanidine pour le **324**.



Enfin, plus récemment, un article a présenté la préparation de quelques composés dans les séries 5-aza, 7-aza et pour la première fois de composés appartenant à la série pyrido[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde, que nous qualifierons de série 6-aza [Neill et al. 1998]. En série 5-aza, trois composés 3-alkylés et 7-méthylés (**326**, Schéma 51), ainsi que leurs analogues *N*-oxydes (**327**) ont été synthétisés par action d'orthoesters appropriés sur la 2-amino-5-méthylpyridine-3-sulfonamide (**328**). Le 3-(1,2-diméthylpropyl)amino-7-méthyl-4*H*-pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**332**, Schéma 51) est un analogue stricte du BPDZ 44, une pyridothiadiazine de la série 7-aza que nous avons développé quelques années plus tôt (Cf. chapitre 4). Ce dérivé est préparé selon un schéma similaire au nôtre à savoir cyclisation de l'aminopyridinesulfonamide (**328**) à l'urée puis transformation de la sulfonylurée cyclique obtenue (**329**) en sulfonylthiourée (**330**). La méthylation du soufre exocyclique donne l'intermédiaire réactionnel 3-méthylsulfanylé (**331**) qui, traité à la 3-méthyl-2-butylamine, fournit le composé attendu (**332**). En série 7-aza, les composés 3-hydrogéné et 3-méthylé (**334**, Schéma 51) ont été préparés, ainsi qu'un dérivé *N*-oxyde (**335**) par cyclisation du 4-aminopyridine-3-sulfonamide (**333**) avec l'orthoformiate ou l'orthoacétate d'éthyle suivi d'une oxydation à l'acide métachloroperbenzoïque

(*m*CPBA) pour obtenir les composés **335**. Pour ce qui est de la série 6-aza, seul le composé 3-hydrogéné (**341** Schéma 51) a été synthétisé à partir du 3-aminopyridine-4-sulfonamide (**340**). Cet intermédiaire est obtenu en suivant un schéma déjà développé en série 8-aza et qui part de la 4-chloro-3-nitropyridine (**336**).



Réactifs. *i* : orthoester d'éthyle ; *ii* : *m*CPBA ; *iii* : urée ; *iv* : P₂S₅-pyridine ; *v* : CH₃I ; *vi* : 3-méthyl-2-butylamine ; *vii* : NaSH.x.H₂O ; *viii* : chloramine ; *ix* : SnCl₂, HCl ; *x* : HC(OEt)₃.

Schéma 51 : Préparation de pyrido[2,3-*e*], [4,3-*e*] et [3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Ce produit de départ est transformé en 4-mercapto-3-nitropyridine (**337**) par action d'hydrogénosulfite de sodium. L'action subséquente de chloramine permet de former le sulfénamide (**338**) qui est lui-même oxydé en sulfonamide (**339**) par l'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*CPBA). La fonction nitro est ensuite réduite par le chlorure d'étain en milieu acide chlorhydrique concentré.

3.3. Les séries thiophéniques.

Tout comme pour les séries pyridiniques, les articles présentant des 1,2,4-thiénythiadiazine 1,1-dioxydes sont peu nombreux et de plus relativement récents. Ceci peut s'expliquer aisément par les difficultés de synthèse que présente cette série.

Rappelons également l'existence de trois isomères de position du soufre thiophénique qui peuvent donner évidemment naissance à trois séries distinctes, séries que nous nommerons trivialement 5-, 6-, 7-thiéno (Figure 36).



Figure 36 : isomères des 1,2,4-thiénythiadiazine 1,1-dioxydes.

Les premiers thiénythiadiazine 1,1-dioxydes décrits sont des dérivés 3-oxo en série 5-, 6- et 7-thiéno (**346**, **352** et **358**, Schéma 52) [Arranz et al. 1997, 1998, 1999 et 2000]. Ils sont obtenus par cyclisation intramoléculaire d'*o*-sulfamoylthiophénecarbonyl azides sous l'action de la chaleur *via* une dégradation de type Curtius. Ces intermédiaires sont eux-mêmes préparés de deux manières différentes. La première utilise comme produits de départ des esters méthyliques d'acide 3-sulfamoyl-2-thiophénecarboxylique (**342**) ou d'acide 4-sulfamoyl-3-thiophénecarboxylique (**348**). Ils sont transformés en azides correspondants (**344** et **350**) via la formation d'hydrazides (**343** et **349**) suivie d'un traitement à l'acide nitreux. La seconde part de chlorure de 5-chlorothiophène-2-sulfonyle (**355**, Schéma 52). L'action de benzylamine fournit le composé *N*-benzylsulfonamide

(**356**) qui se déprotone en α de la sulfonamide sous l'effet du buthyl lithium et réagit avec le CO_2 pour aboutir à l'acide 5-chloro-2-sulfamoyl-3-thiophène carboxylique (**357**). Cet acide cyclise selon un mécanisme de type Curtius modifié par réaction avec l'azide de diphenylphosphorylène (DPPA).

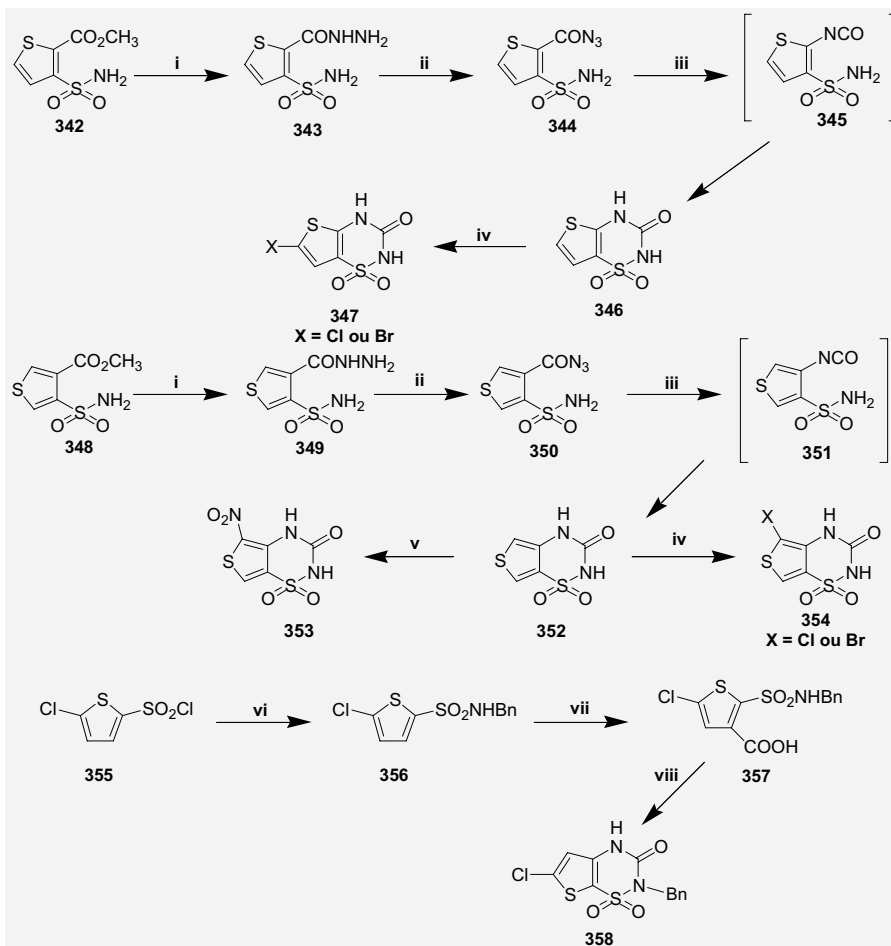
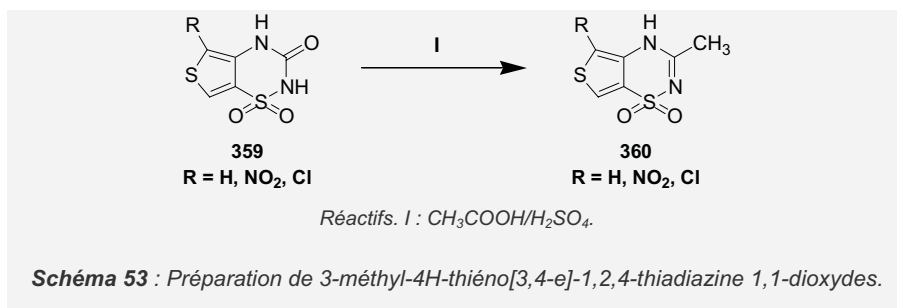


Schéma 52 : Préparation de 3-oxo-3,4-dihydro-2H-thiéo[2,3-e], [3,4-e] et [3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Le 3-oxo-3,4-dihydro-2H-thiéo[3,4-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**352**) peut subir une bromation, une chloration (**354**) ou une nitration en position 5 (**353**),

tandis que l'homologue 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-thiéo[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**346**) peut être chloré ou bromé en position 6 mais pas nitré (Schéma 52). Ce type de composé peut être également alkylé en position 2 et 4.

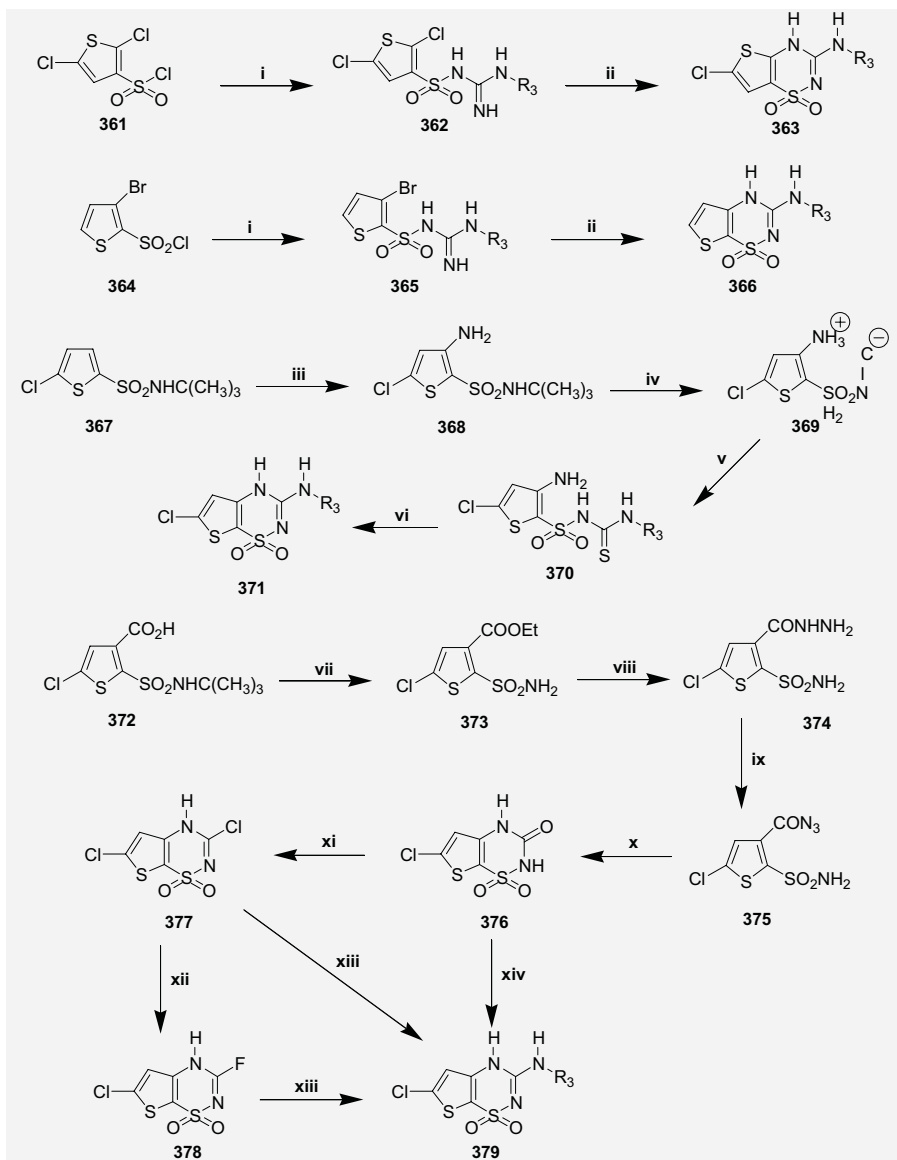
Le traitement de 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-thiéo[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes (**359**, Schéma 53) par un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique permet d'aboutir en une seule étape d'hydrolyse-cyclisation à des 3-méthyl-4*H*-thiéo[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes (**360**) [Vega et al. 2004].



Nielsen et al. ont décrit début des années deux mille, la synthèse de composés 3-alkylamino en séries 5- et 7-thiéo (**363**, **366** et **371**) [Nielsen et al. 2002 et 2006]. Seuls quelques dérivés ont été préparés en série 5-thiéo par action de chlorhydrate ou de tosylate de différentes guanidines sur le chlorure de 2-5-dichlorothiophène-3-sulfonyle (**361**, Schéma 54) suivie d'une cyclisation intramoléculaire des sulfonylguanidines obtenues (**362**) catalysée au cuivre bronze à 150°C.

Trois schémas de synthèse différents ont été utilisés en ce qui concerne la série 7-thiéo :

- Le premier est similaire à celui décrit en série 5-thiéo et met en réaction des chlorhydrates de guanidines et un intermédiaire chlorure de 3-bromothiophène-2-sulfonyle (**364**, Schéma 54). Le sulfonylguanidine ainsi préparé (**365**) est cyclisé au cuivre bronze à haute température.
- Le second met en réaction la 3-amino-5-chlorothiophène-2-sulfonamide (**369**) avec un isothiocyanate. La sulfonylthiourée obtenue (**370**, Schéma 54) est ensuite cyclisée par du phosgène à 0°C en présence de TEA.



Réactifs. **i** : guanidine ; **ii** : cuivre bronze, Δ ; **iii** : *n*-BuLi, azide de *p*-toluènesulfonyle, bromure d'hexadécyltributylphosphonium, NaBH₄ ; **iv** : HCl ; **v** : R₃NCS, *t*-BuOK ; **vi** : COCl₂, TEA ; **vii** : EtOH-HCl gaz ; **viii** : N₂H₄ ; **ix** : NaNO₂-HCl ; **x** : Δ ; **xi** : OPCl₃ ; **xii** : CsF, Δ ; **xiii** : alkylamine ; **xiv** : P₂O₅, alkylamine.

Schéma 54 : Préparation de 3-alkylamino-4H-thiéno[2,3-e] et [3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Le produit de départ **369** est, quant à lui, préparé à partir du *N*-tert-butyl-5-chlorothiophène-2-sulfonamide (**367**, Schéma 54) qui est déprotoné par le *n*-BuLi avant de réagir avec l'azide de *p*-toluènesulfonyle et de subir une réduction au NaBH₄ en présence de bromure d'hexadecyltributylphosphonium.

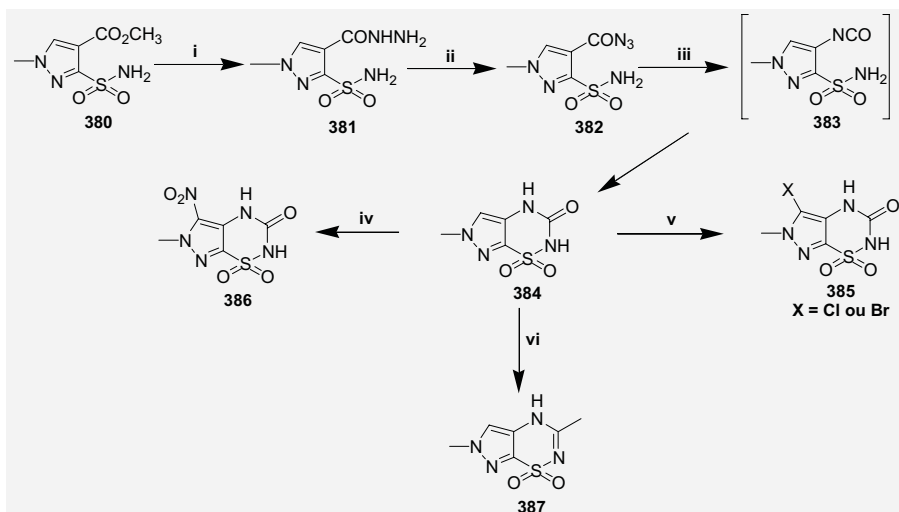
Le traitement du *N*-tert-butyl-3-amino-5-chlorothiophène-2-sulfonamide (**368**) à l'HCl permet d'aboutir à l'intermédiaire attendu.

- Le troisième passe par un intermédiaire 3-oxo (**376**, Schéma 54) qui est préparé selon un schéma quasi similaire à celui décrit dans le schéma 52. L'acide *N*-tert-butyl-5-chloro-2-sulfamoylthiophène-3-carboxylique (**372**, Schéma 54) est transformé tout d'abord en ester éthylique (**373**) puis en hydrazide (**374**) et enfin en acylazide (**375**) qui subit une dégradation-cyclisation de Curtius pour donner l'intermédiaire 3-oxo (**376**).

Celui-ci peut, d'une part, donner directement les composés 3-alkylamino (**379**) par action d'alkylamines en présence de P₂O₅ à haute température, d'autre part, être transformé en dérivé 3-chloro (**377**) par action d'OPCl₃, réagir avec des alkylamines pour donner les composés attendus. Il est enfin possible de préparer également un intermédiaire 3-fluoro (**378**) par action de CsF sur le composé 3-chloro (**377**). Ce dérivé fluoré est plus réactionnel que son homologue chloré et réagit mieux avec les amines encombrées.

3.4. Les séries pyrazolo.

Encore plus que les séries thiophéniques et pyridiniques, les 1,2,4-pyrazolothiadiazine 1,1-dioxydes décrits dans la littérature sont très peu nombreux. Seuls quelques dérivés 3-oxo (**384**, Schéma 55) et l'analogue strict du diazoxide (**387**, Schéma 55) en série 6-méthylpyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde sont repris dans 3 articles d'une équipe espagnole en même temps que leurs homologues thiophéniques [Arranz et al. 1997 et 1998, Vega et al. 2004]. Les voies de synthèse sont également identiques à celles des composés thiophéniques présentés dans les schémas 52 et 53.



Réactifs. i : N_2H_4 ; ii : HNO_2 ; iii : Δ ; iv : HNO_3/H_2SO_4 ; v : NCS ou NBS ; vi : CH_3COOH/H_2SO_4 .

Schéma 55 : Préparation de 3-oxo et 3-méthyl-4H-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

A partir de l'ester méthylique de l'acide 1-méthyl-3-sulfamoylpyrazole-4-carboxylique (**380**, Schéma 55), le composé 3-oxo correspondant (**384**) peut être obtenu après passage au dérivé hydrazide (**381**), acylazide (**382**) et une réaction de type Curtius. Le dérivé 3-oxo peut ensuite être nitré, chloré ou bromé en position 5. L'action d'acide acétique en présence d'acide sulfurique permet également d'aboutir au dérivé 6-méthylé (**387**).

Travaux réalisés au sein du laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'université de Liège autour du noyau arylthiadiazine 1,1- dioxyde

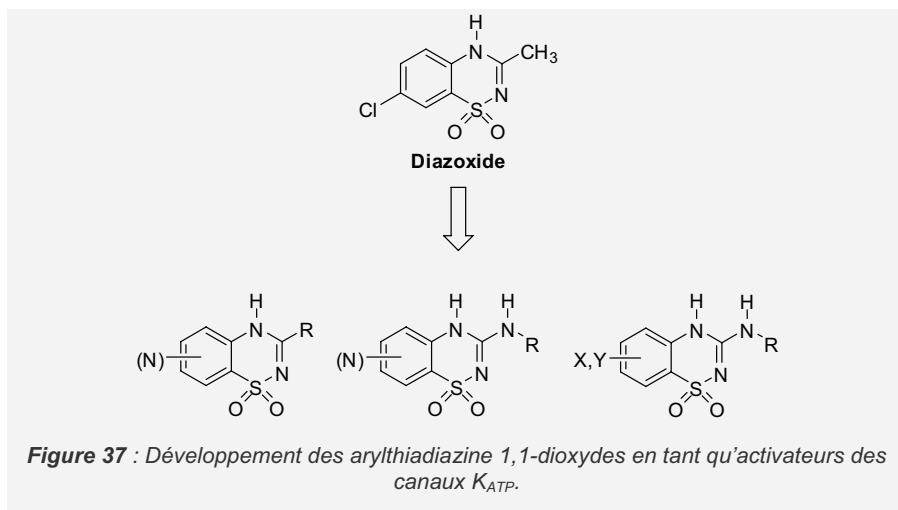
Comme nous venons de le voir, les applications et les implications du noyau arylthiadiazine 1,1-dioxyde au niveau pharmaceutique sont nombreuses et intéressantes.

Notre laboratoire possédant, depuis de nombreuses années, une grande expérience dans la synthèse de dérivés de la pyridine structuralement peu éloignés des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes, nous avons donc entrepris de nous baser sur cette expérience pour explorer la chimie des arylthiadiazine 1,1-dioxydes dans divers domaines de la chimie pharmaceutique.

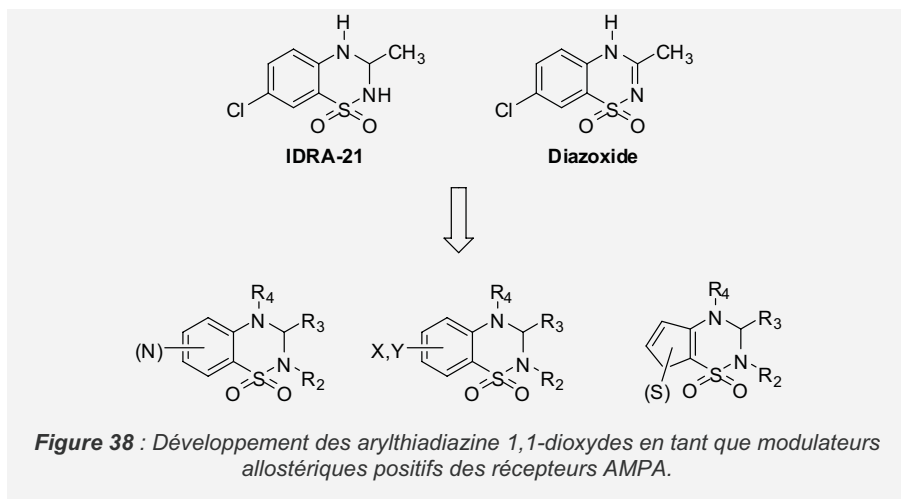
Autour de cet hétérocycle, trois axes de recherches pharmacochimiques principaux ont été développés.

Le premier, qui ne sera pas décrit dans ce manuscrit, a tenté de mettre en avant la bioisostérie potentielle existant entre les noyaux pyrido- et benzothiadiazine 1,1-dioxydes et le noyau quinazolinone. Il est en effet connu par de multiples exemples que ces deux systèmes hétérocycliques pouvaient dans certains cas donner des drogues d'activité pharmacologique similaire. Plusieurs quinazolinones ont été décrites au début des années nonante comme les premiers antagonistes non peptidiques puissants et sélectifs de la fixation de la cholécystokinine sur son récepteur central (CCK-B). A cette époque, il existait un grand intérêt à développer de tels antagonistes [de Tullio et al. 1999c et 2000]. Nous avons donc entrepris la préparation et l'évaluation de drogues de la série des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes proches des quinazolinones les plus actives sur les récepteurs CCK. Malheureusement, les composés évalués se sont montrés extrêmement décevants et n'ont pas permis de vérifier l'existence d'une bioisostérie entre ces deux hétérocycles. Ces mauvais résultats, couplés à l'apparition de problèmes de toxicité lors de l'utilisation prolongée d'antagonistes CCK ont mené à l'abandon rapide de cet axe thérapeutique. Ces travaux ont été présentés dans notre thèse de doctorat ainsi que dans la thèse d'agrégation du Professeur B. Pirotte et ont abouti à la publication de trois articles [de Tullio et al. 1997, Pirotte et al. 1997 et 1998] . Ces recherches nous ont servi à parfaire notre expérience dans la chimie des dérivés pyridiniques.

Au début des années nonante, la pharmacologie et les applications thérapeutiques potentielles des canaux K_{ATP} étaient en plein essor. Seul le diazoxide, un benzothiadiazine 1,1-dioxyde, était alors décrit comme un activateur des canaux K_{ATP} agissant sur le tissu pancréatique. C'est autour de cette molécule et de son action biologique que tourne le second axe de recherche que nous avons développé. Nous nous sommes donc lancés dans la préparation d'analogues pyridiniques puis benzéniques du diazoxide dans le but de trouver de nouvelles drogues agissant de manière plus puissante et plus sélective que ce dernier sur les canaux K_{ATP} pancréatiques (Figure 37). Cette partie de nos travaux sera développée dans le chapitre 4 de ce manuscrit. Elle nous a conduit à la découverte de composés identifiés comme étant les activateurs des canaux potassiques pancréatiques les plus puissants et les plus sélectifs décrits.



Le troisième axe débute avec la constatation que le diazoxide et son homologue « saturé » l'IDRA-21 peuvent, à haute concentration, augmenter le courant induit par l'AMPA via une action modulatrice positive sur un site allostérique des récepteurs AMPA. Les potentialités thérapeutiques de tels modulateurs sont apparues il y a quelques années comme un réel espoir dans le traitement de maladies engendrant un déficit cognitif mais également dans la dépression. C'est pourquoi, parallèlement aux recherches menées sur les canaux K_{ATP} , nous avons entrepris de moduler la structure du diazoxide et de l'IDRA-21 afin de tenter d'en améliorer le profil pharmacologique (Figure 38). Cette partie du travail, réalisée en étroite collaboration avec les Laboratoires Servier, nous a amené à explorer plus en détails la chimie des dérivés « saturés » dans les séries pyridinique, benzénique et thiophénique et est présentée largement dans le chapitre 5. Plusieurs drogues, issues de ces recherches, apparaissent actuellement comme des candidats sérieux pour le passage vers les étapes de pré-développement clinique.



Même si nous avons contribué aux deux axes de recherches présentés ci-dessus dès le début, les chapitres 4 et 5 présenteront les travaux que nous avons réalisés après notre thèse de doctorat et qui n'ont pas été repris dans la thèse d'agrégation du Professeur B. Pirotte. Cependant, afin de mieux appréhender le cheminement pharmacochimique qui nous a amené aux molécules présentées dans ce manuscrit, ces travaux antérieurs à l'année 2000 seront brièvement décrits en début des chapitres 4 et 5.

Par ailleurs, dans le but de ne pas alourdir la présentation, les modes opératoires relatifs aux drogues synthétisées ne seront pas détaillés dans cet exposé. En effet, la plupart des composés décrits ci-après sont publiés soit sous forme d'articles scientifiques originaux, soit sous forme de thèse de doctorat ou encore sous forme de brevet. La copie des articles et des brevets est jointe en annexe.

Chapitre 4 :

Les activateurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP



4.1. Les canaux potassiques : généralités.

Les canaux potassiques sont des structures protéiques transmembranaires appartenant à la super famille des canaux ioniques. Ils jouent un rôle fondamental dans la modulation de l'excitabilité cellulaire [Rudy 1988]. Ils régulent le passage d'ions potassium au travers de la membrane plasmique selon un mécanisme passif lié au gradient de concentration de cet ion ou plutôt à son gradient électrochimique. Dans

une cellule en état de repos, la concentration en potassium extracellulaire (3-5 mM) est au moins 25 fois plus faible que la concentration intracellulaire (100-160 mM). De ce fait, un courant sortant dû au flux d'ions potassiques est généré par l'ouverture des canaux potassiques (Figure 39).

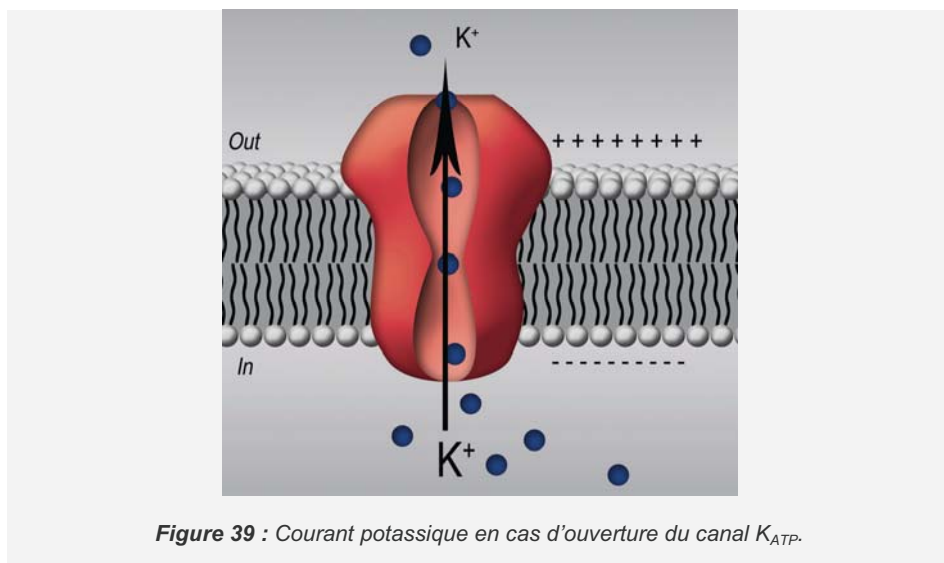


Figure 39 : Courant potassique en cas d'ouverture du canal K_{ATP} .

Ce flux d'ions potassiques sortant est, notamment, un mécanisme destiné à restituer et/ou à maintenir le potentiel de la cellule.

L'activité des canaux potassiques peut être modulée et contrôlée par différents facteurs tels que :

- Le potentiel membranaire [Pongs 1992], ce qui donne la classe des canaux potassiques potentiel-dépendants de type « delayed rectifier » (K_v) et « transient outward » (K_A).
- La concentration en calcium intracellulaire qui forme la classe des canaux potassiques calcium-dépendants dont les canaux à grande conductance BK_{Ca} [Meech 1978], à conductance moyenne IK_{Ca} [Inoue et al. 1986] et à faible conductance SK_{Ca} [Cook et al. 1990].
- Le métabolisme cellulaire [de Weille 1992a, Edwards et al. 1993]. Il s'agit dès lors de la classe des canaux potassiques sensibles à l'ATP.
- Signalons enfin l'existence de canaux couplés à des récepteurs (muscariniques, sérotoninergiques, cholinergiques, ...) et éventuellement à des protéines G. Les

canaux Kir (« inward rectifier), quant à eux, permettent l'entrée et non plus la sortie d'ions potassium et sont responsables du maintien du potentiel membranaire.

4.2. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ou canaux K_{ATP} .

Au début des années quatre-vingt, Noma découvre l'apparition d'un courant potassique sortant au niveau du cardiocyte quand la concentration intracellulaire en adénosine-5'-triphosphate est diminuée [Noma 1983]. Il caractérise ce courant au niveau d'un canal isolé qui fût alors appelé canal potassique sensible à l'ATP et noté canal K_{ATP} . Quelques années plus tard, Sturgess et al. démontrent que dans une lignée cellulaire dérivée des cellules B pancréatiques, le tolbutamide bloquait un canal tout à fait similaire à celui du cardiocyte ; le mécanisme d'action des sulfonurées hypoglycémiantes venait d'être élucidé [Strugess et al. 1985]. Outre leur présence au niveau des cellules cardiaques et des cellules B du pancréas, la présence de canaux K_{ATP} a également pu être mise en évidence dans :

- Les cellules musculaires lisses vasculaires [Standen et al. 1989], gastro-intestinales [Lebrun et al. 1990, Franck et al. 1994] ou utérines [Piper et al 1990].
- Les neurones [Bernardi et al. 1988].
- Les cellules musculaires striées [Allard et al. 1993].
- Les cellules de l'adénohypophyse [de Weille et al. 1992b].
- L'hypothalamus [Evans et al. 2004, Poci et al. 2005a].
- Les mitochondries [Inoue et al. 1991, O'Rourke 2004].

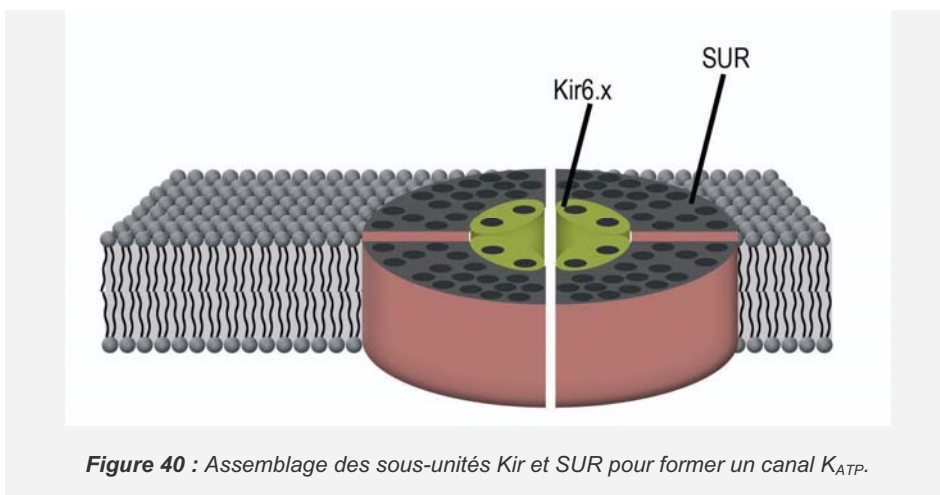
De manière simplifiée, il peut être dit que l'ATP est le bloqueur endogène des canaux K_{ATP} . En tenant compte uniquement de leur sensibilité envers l'ATP, il est évident que les canaux devraient toujours être fermés, même en période d'ischémie ou d'hypoglycémie. En effet, la constante d'inhibition est de l'ordre de 10 à 30 μM tandis que la concentration totale en ATP est d'environ 5 mM. La diminution de la concentration en ATP ne peut donc, à elle seule, expliquer l'ouverture des canaux K_{ATP} . Des études ont dès lors démontré que l'augmentation de la concentration intracellulaire en MgADP (complexe entre Mg^{2+} et l'adénosine diphosphate) est le facteur principal induisant l'ouverture du canal, même en présence de concentrations

bloquantes en ATP. Le MgADP est donc l'ouvreur endogène du canal K_{ATP} [Nichols et al. 1996, Thuringer et al. 1997].

De la même manière que pour les sulfonylurées hypoglycémiantes, il a été démontré que les effets hypotenseurs et hyperglycémiantes du diazoxide pouvaient être attribués à l'activation des canaux K_{ATP} pancréatiques et vasculaires [Trude et al. 1986, Dunne et al. 1987, Standen et al. 1989].

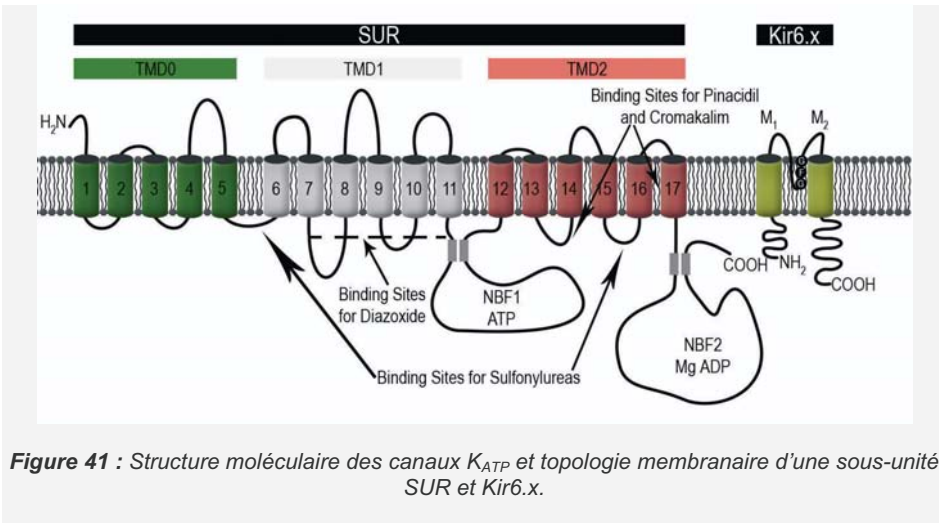
4.3. Structure des canaux K_{ATP} .

Il est actuellement établi que les canaux K_{ATP} sont constitués par l'association octamérique de deux types de sous-unités : les sous-unités Kir et les sous-unités SUR (Figure 40) [Clément et al. 1997, Shyng et al. 1997, Seino 1999].



Les sous-unités Kir résultent de l'expression des gènes de la famille « inward rectifier ». Ces protéines d'environ 40 kDa s'assemblent pour former le pore du canal. Deux isoformes de Kir sont décrites dans la littérature : les Kir6.1 et les Kir6.2 qui possèdent 71 % d'homologie. Ces sous-unités Kir6.x possèdent deux segments transmembranaires M1 et M2 connectés par une région transmembranaire qui définit la sélectivité du pore pour l'ion potassique et posséderait un site de liaison pour l'ATP (Figure 41). Les canaux possédant la sous-unité Kir6.2 sont très sensibles à l'ATP

tandis que ceux contenant la sous-unité Kir6.1 ne sont que faiblement inhibés par l'ATP [Seino et al. 2003]



Les autres sous-unités, nommées SUR, sont celles qui contiennent les sites récepteurs de modulation. Elles proviennent de l'expression des gènes de type ABCC et sont composées de 17 segments transmembranaires (TMD) arrangés en 3 domaines distincts : TMD0 qui inclut 5 segments, TMD1 et TMD2 qui en contiennent 6. Deux larges boucles intracellulaires contiennent les domaines de liaison aux nucléotides NBF1 et NBF2. Trois isoformes de la sous-unité SUR ont été identifiées : SUR1, SUR2A et SUR2B. SUR2A et SURB montrent 99 % d'homologie et ne diffèrent que par les derniers 42 acides aminés de la partie C-terminale. Par contre SUR1 ne possède que 79 % d'homologie avec les isoformes SUR2 [Moreau et al. 2005, Bryan et al. 2005].

En fonction de leur localisation tissulaire, la composition des canaux K_{ATP} peut varier :

- La combinaison des sous-unités SUR2A et Kir6.2 est retrouvée au niveau des canaux cardiaques et des canaux des muscles squelettiques [Inagaki et al, 1996].
- La co-expression de Kir6.2 et de SUR2B génère un canal dont les propriétés sont similaires aux canaux K_{ATP} natifs des muscles lisses non-vasculaires tels

que ceux de la vessie, de l'intestin ou de la trachée [Foster et al. 1989, McPherson et al. 1990, Nielsen-Kudsk et al. 1990].

- La sous-unité SUR2B associée à la sous-unité Kir6.1 forme par contre le canal présent au niveau de la musculature lisse vasculaire [Babenko et al. 1998].
- Le canal natif des cellules B pancréatiques est constitué de l'assemblage de SUR1 et de Kir6.2 [Ashcroft 1997].
- La même combinaison de Kir6.2 et de SUR1 se retrouve au niveau du canal de l'hypothalamus ventromédial et de la substance noire réticulée [Liss et al. 1999, Miki et al. 2001].
- Sans que cela ne soit démontré de manière non équivoque, il semble que les canaux K_{ATP} mitochondriaux soient fort proches d'un canal de type Kir6.1/SUR1 [Liu et al. 2001].

4.4. Rôles physiologiques des canaux K_{ATP} .

Puisque l'ion potassium est un des ions fondamentaux pour le contrôle du potentiel membranaire, il apparaît que les canaux K_{ATP} couplent le métabolisme cellulaire et l'activité électrique. En raison de l'existence d'un gradient de concentration de l'ion potassium entre les milieux intra et extracellulaires, l'ouverture des canaux K_{ATP} entraîne la sortie d'ions K^+ vers le milieu extracellulaire. Ce mouvement ionique engendre l'apparition d'une hyperpolarisation de la membrane plasmique (déplacement du potentiel membranaire vers des valeurs plus négatives). De ce fait, la cellule se trouve dans un état de « repos » ou de non excitabilité. A l'inverse, la fermeture de ces canaux peut conduire à l'établissement d'un potentiel membranaire plus positif et donc d'une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation peut engendrer toute une série de réponses intracellulaires via l'entrée d'ions calcium par exemple. Ces actions au niveau du potentiel membranaire font que les canaux K_{ATP} sont impliqués dans de très nombreux processus physiologiques. Ils y représentent généralement soit un moyen de réguler l'activité sécrétoire ou contractile, soit un moyen de protéger certaines cellules en cas d'hypoxie ou d'ischémie caractérisée par une diminution de la concentration intracellulaire en ATP.

4.4.1. Les canaux K_{ATP} au niveau des cellules B du pancréas.

C'est probablement au niveau des cellules B du pancréas que le rôle des canaux potassiques est le mieux compris. En effet, il est maintenant clairement établi que le canal K_{ATP} intervient de manière prépondérante dans la modulation de la sécrétion d'insuline glucose-dépendante [Petersen et al. 1989, Lebrun et al. 1992, Efrat et al. 2004]

L'intervention des canaux K_{ATP} dans la sécrétion d'insuline est décrite schématiquement dans la figure 42.

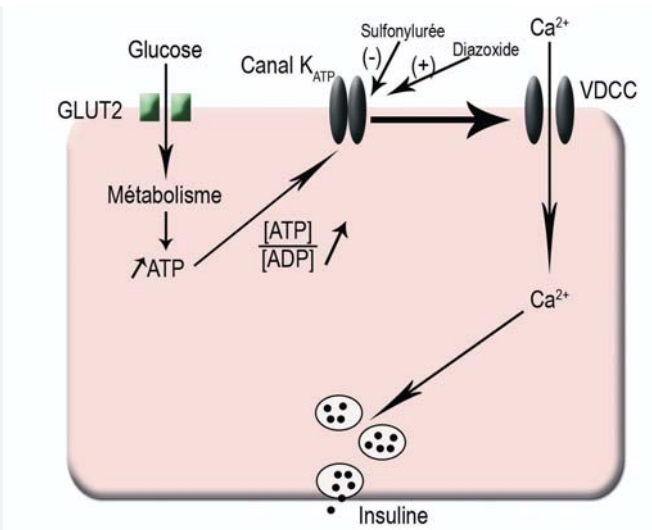


Figure 42 : Représentation schématique de la sécrétion d'insuline par les cellules B pancréatiques [d'après Seino 1999].

Après un repas, le glucose entre dans les cellules sécrétrices d'insuline grâce au transporteur spécifique GLUT2 et est phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase, une enzyme considérée comme un « senseur de glucose » [Thorens 2001]. Cela entraîne une augmentation de la concentration en ATP, ou plutôt une augmentation du rapport ATP/ADP intracellulaire [Lebrun 1993]. Cela a pour effet de fermer les canaux K_{ATP} des cellules B du pancréas et de dépolariser la membrane cellulaire. Cette dépolarisation permet l'activation des canaux calciques potentiel-

dépendants et l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ion calcium initialise la libération d'insuline à partir des vésicules sécrétrices de stockage. Ces pulses de sécrétion d'insuline vont réduire la glycémie et donc le ratio ATP/ADP, permettant ainsi la ré-ouverture des canaux potassiques des cellules B du pancréas. L'hyperpolarisation membranaire ainsi provoquée diminue l'activation des canaux calciques voltage-dépendants et diminue la sécrétion d'insuline [Nichols et al. 1996].

4.4.2. Les canaux K_{ATP} au niveau des cellules des muscles lisses.

Les canaux K_{ATP} semblent intervenir dans le contrôle du tonus musculaire et dans le maintien de la contractilité des muscles vasculaires et des autres types de muscles lisses [Kolb 1990, Brayden 2002]. En effet, c'est l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} qui déclenche la contraction musculaire par l'interaction entre l'actine et la myosine. Or, de par leur effet sur le potentiel membranaire, les canaux potassiques influencent fortement cette concentration et contrôlent donc, de manière indirecte, la contractilité cellulaire [O'Donnel et al. 1994].

L'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP au niveau de la fibre musculaire lisse prévient l'entrée de calcium dans la cellule et induit donc une relaxation musculaire [Beech et al. 1993].

4.4.3. Les canaux K_{ATP} au niveau des cellules cardiaques

Même s'il subsiste de nombreuses questions quant au rôle exact des canaux K_{ATP} des cellules du myocarde, les canaux K_{ATP} pourraient jouer un rôle protecteur durant de courtes périodes d'ischémie ou d'hypoxie. En effet, en l'absence d'oxygène, la cellule épuise rapidement ses réserves d'énergie ce qui entraîne la diminution de la concentration intracellulaire en ATP et donc l'ouverture des canaux K_{ATP} . L'hyperpolarisation qui suit induirait une diminution de la durée du potentiel d'action et donc préviendrait l'entrée excessive d'ions calcium dans la cellule et son accumulation au niveau intracellulaire. Cet effet protecteur pourrait permettre de limiter les risques de mort cellulaire [Takano et al. 1993].

Même si l'utilisation d'activateurs des canaux potassiques cardiaques est encore soumise à controverse, Il semble qu'activer les canaux K_{ATP} cardiaques puisse

exercer un effet protecteur vis-à-vis d'une ischémie passagère [Sunkyung et al. 2003]. Plus récemment, le rôle des canaux mitochondriaux des cellules du myocarde dans le mécanisme cardioprotecteur a été démontré [Tshushida et al. 2002, O'Rourke 2004, Wang et al. 2005b].

4.4.4. Les canaux K_{ATP} au niveau du complexe adénohypophysaire.

Des canaux K_{ATP} ont également été identifiés au niveau du complexe adénohypophysaire. Ils y joueraient un rôle dans le contrôle de la libération d'hormone de croissance et de prolactine [de Weille et al. 1992b, Fosset et al. 1992]. La modulation de ces canaux pourrait donc se révéler intéressante dans le traitement de désordres endocriniens liés à la sécrétion de ces hormones.

4.4.5. Les canaux K_{ATP} au niveau du système nerveux central.

Des canaux K_{ATP} seraient aussi présents à différents niveaux du système nerveux central et notamment dans la substance noire, dans l'hippocampe et dans le cortex [Mourre et al. 1990]. Sans que leur rôle ne soit clairement établi, ils pourraient intervenir en cas d'anoxie ou d'une brève période d'ischémie en limitant les effets délétères d'une libération massive de glutamate [Ben-Ari et al. 1990, Heurteaux et al. 1995]. Par ailleurs, il existe des canaux K_{ATP} hypothalamiques. Ces canaux joueraient un rôle extrêmement important dans le contrôle de l'homéostasie du glucose. En effet, l'hypothalamus médian est l'intégrateur principal des signaux hormonaux et nutritionnels et interviendrait, de manière prépondérante, dans la modulation de la libération de glucose à partir du foie. De ce fait, il a été récemment suggéré que les canaux K_{ATP} hypothalamiques pourraient diminuer la glycémie par l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique [Evans et al. 2004, Poci et al. 2005a et b].

4.4.6. Les canaux K_{ATP} au niveau des mitochondries.

Identifiés début des années nonante dans la membrane interne des mitochondries [Inoue et al. 1991], ces canaux K_{ATP} ont pris, ces dernières années, de plus en plus d'importance. En effet, il semble que ces structures puissent intervenir dans le contrôle du volume mitochondrial ainsi que dans la régulation des

mouvements calciques au travers de leur membrane [Szewczyk et al. 2002]. Les canaux K_{ATP} mitochondriaux sont ainsi présentés comme des acteurs potentiellement importants dans la gestion par l'organisme des périodes d'ischémie ou d'hypoxie [Szewczyk et al. 1999, Tshushida et al. 2002, O'Rourke 2004, Wang et al. 2005a].

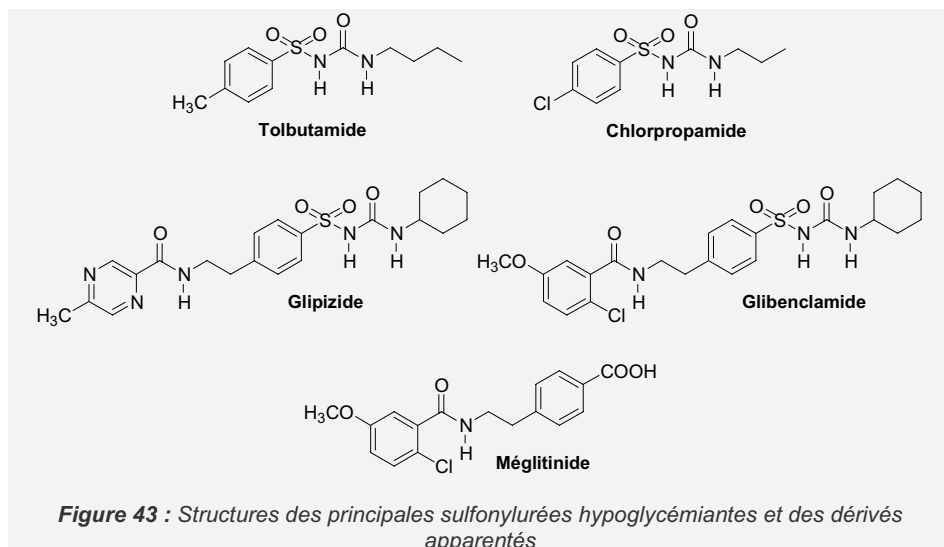
4.5. Les modulateurs des canaux K_{ATP} .

Compte tenu de leur large distribution au niveau d'organes importants ou de cellules excitables et de leur implication dans de très nombreux processus physiologiques cruciaux, les canaux K_{ATP} ont très rapidement représenté une cible thérapeutique d'intérêt. Il faut cependant avouer que bon nombre de drogues ont été développées et utilisées avant même que leur action sur les canaux potassiques sensibles à l'ATP ait été mise en évidence. Il existe bien entendu deux classes de modulateurs des canaux K_{ATP} : les bloqueurs, qui vont diminuer le passage d'ions potassiques au travers de la membrane plasmique et induire ainsi une dépolarisation membranaire et les activateurs, qui vont augmenter le flux sortant d'ions K^+ et induire une hyperpolarisation de la membrane plasmique.

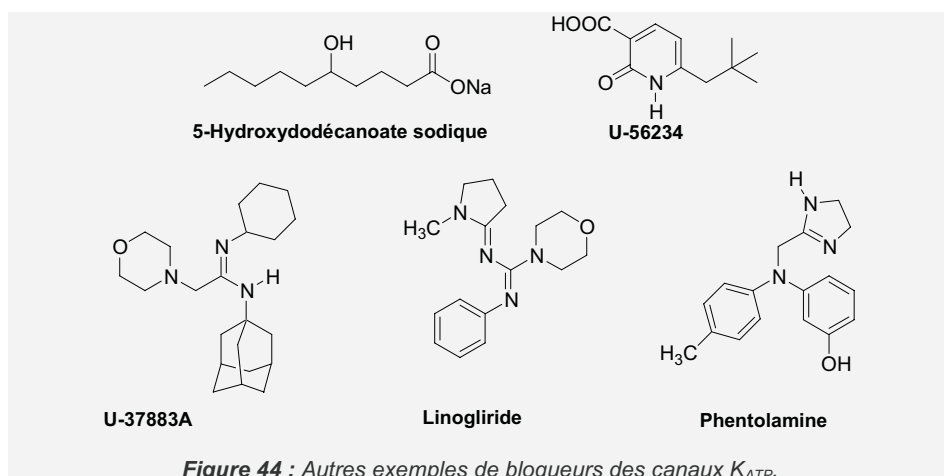
4.5.1. Les bloqueurs des canaux K_{ATP} .

Un des effets majeurs de la fermeture des canaux K_{ATP} est l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Selon le mécanisme décrit dans le paragraphe 4.4.1, les composés capables de bloquer les canaux potassiques des cellules B du pancréas permettraient en effet de favoriser la libération d'insuline et d'être thérapeutiquement utilisables dans le traitement du diabète non-insulinodépendant [Malaise et al. 1990]. Les sulfonylurées hypoglycémiantes sont les drogues les plus connues de cette classe. Elles sont employées depuis relativement longtemps en thérapeutique et demeurent le traitement de choix dans la gestion du diabète de type 2 [Gylfe et al. 1984, Boyd 1988]. Elles renforcent l'action de l'ATP en se liant à la sous-unité SUR du canal K_{ATP} . Les composés les plus connus de cette classe sont présentés à la figure 43. Il s'agit du tolbutamide et du chlorpropamide, qui sont des composés dits de première génération (un seul site de fixation sur les sous-unités SUR1) du glipizide et du glibenclamide qui appartiennent à la seconde génération et posséderaient deux sites de fixation au niveau de la sous-unité SUR1.

Citons encore des dérivés d'acide benzoïque (Figure 43) tels que le méglitinide dont la structure est proche de celle du glibenclamide et qui possède également des propriétés hypoglycémiantes grâce à un mécanisme d'action semblable à celui des sulfonylurées [Garrino et al. 1988, Schwanstecher et al. 1994].



À côté des sulfonylurées, il existe un grand nombre d'autres structures capables de bloquer les canaux K_{ATP} . Citons par exemple le 5-hydroxydodécanoate sodique, le U-56234, le U-37883A, le linogliride et la phéntolamine (Figure 44).



La plupart de ces bloqueurs apparaissent, en général, comme moins actifs et moins sélectifs que les sulfonylurées [Hopkins et al. 1990, Ronner et al. 1991, Notsu et al. 1992]. Le U-37883A est une drogue particulière puisqu'elle se lierait sélectivement aux canaux K_{ATP} du muscle vasculaire sans effets majeurs sur les canaux pancréatiques ou cardiaques [Meisheri et al. 1995].

4.5.2. Les activateurs des canaux K_{ATP} .

A côté du développement des bloqueurs des canaux K_{ATP} , d'autres composés se sont révélés capables d'induire l'ouverture des canaux. Appelées souvent PCOs pour « Potassium Channel Openers », ces drogues provoquent la fuite d'ions potassium vers le milieu extracellulaire et place donc la cellule dans un état de non-excitabilité via l'hyperpolarisation de la membrane plasmique. Du fait de la présence des canaux K_{ATP} dans de nombreux tissus et de leur implication dans plusieurs processus physiologiques importants, cette classe pharmacologique a été largement étudiée et développée [Lawson et al. 2000, Coghlan et al. 2001, Mannhold et al. 2004 et 2006]. Les pathologies et les axes thérapeutiques potentiels que pourraient viser les PCOs sont nombreux ; Ainsi, ils pourraient se montrer actifs au niveau :

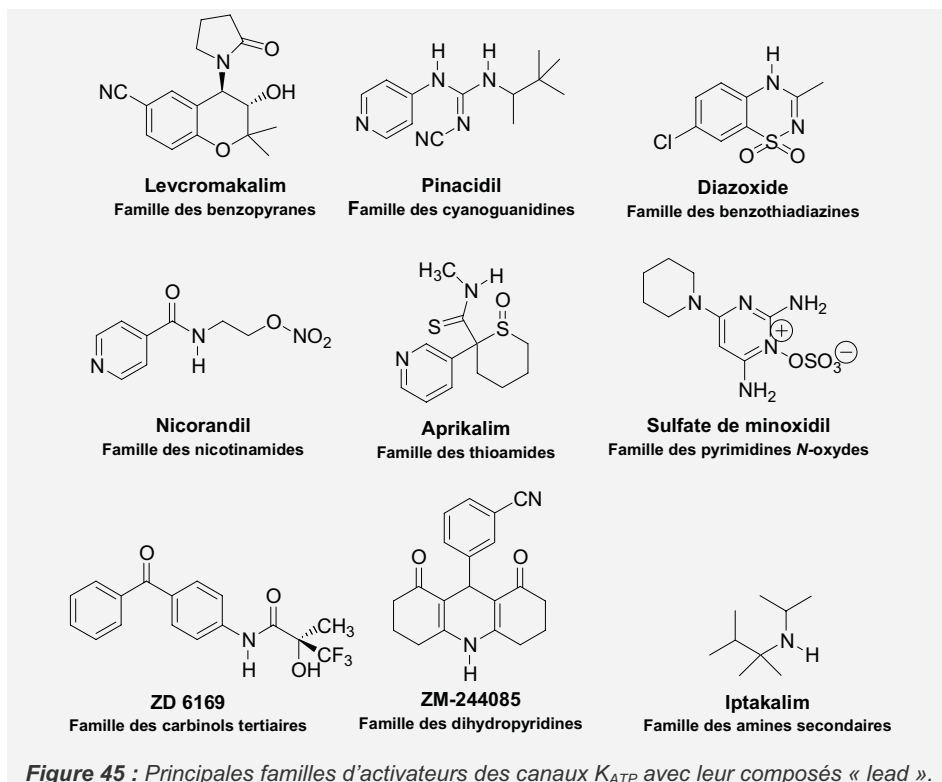
- Du système nerveux central où les agents capables d'ouvrir les canaux K_{ATP} pourraient jouer un rôle neuroprotecteur [Heurteaux et al. 1995] et être utiles comme agent antiépileptique par stabilisation de l'hyperexcitabilité neuronale [Abele et al. 1990].
- Des cellules cardiaques en tant qu'agents cardioprotecteurs [Cavero et al. 1994, Grover et al. 2002].
- De la fibre musculaire lisse vasculaire en tant qu'antihypertenseurs [Atwal 1992, Edwards et al. 1990].
- De la fibre musculaire utérine où il a été démontré que plusieurs PCOs étaient capables d'inhiber les contractions utérines provoquées notamment par l'ocytocine [Cheuk et al. 1993, Morrison et al. 1993].
- D'autres fibres musculaires lisses telles que la trachée ou la vessie. En effet de par leur action sur le tonus musculaire, les PCOs seraient potentiellement utiles dans le traitement de l'asthme ou de l'incontinence urinaire [Barnes 1996, Shi et al. 1999, Chiu 2001].

- Des cellules B du pancréas où les activateurs des canaux K_{ATP} , de par leur action sur la sécrétion d'insuline, peuvent se révéler efficaces dans le traitement et/ou la prévention de pathologies entraînant un désordre de l'homéostasie du glucose, telles que l'hypersécrétion d'insuline ou les diabètes de type 1 et 2 et l'obésité [Goode et al. 1986, Björk et al. 1996 et 1998, Krassas et al. 1998, Kane et al. 1997].

La plupart des développements pharmacologiques autour des activateurs des canaux K_{ATP} ont eu pour cible principale la fibre musculaire lisse vasculaire dans le but de découvrir de nouveaux agents antihypertenseurs. Ces recherches ont permis l'identification de plusieurs composés relativement puissants sur ce tissu. Ces composés « leads » (Cf. Figure 45) ont donné naissance aux principales familles de PCOs à savoir :

- Les benzopyranes centrés autour du cromakalim ou de son isomère le plus actif, le levcromakalim.
- Les *N*-aryl-*N'*-alkyl-*N''*-cyanoguanidines analogues du pinacidil.
- Les benzothiadiazine 1,1-dioxydes dont le composé « lead » est le diazoxide.
- Les dérivés de la nicotinamide proches du nicorandil.
- Les (pyrid-3-yl)thioamides analogues de l'aprikalim.
- Les pyrimidines *N*-oxydes sulfates centrés autour du sulfate de minoxidil.
- Les carbinols tertiaires proches du ZD 6169.
- Les dihydropyridines et les dérivés apparentés au ZM-244085.

Citons encore les amines secondaires ramifiées analogues de l'iptakalim (Figure 45) qui sont décrites comme activateurs des canaux K_{ATP} [Wang et al. 2005b] mais dont le mécanisme d'action exact reste controversé.



Malgré la puissante activité montrée par bon nombre de ces dérivés et la mise sur le marché de plusieurs d'entre eux en tant qu'agents antihypertenseurs, cette classe pharmacologique n'a jamais vraiment été prépondérante dans cette indication. C'est pourquoi les développements les plus récents visent d'autres types de tissus tels que les muscles lisses vasculaires, les bronches et la vessie, ainsi que le tissu cardiaque [Sebille et al. 2004, Mannhold et al. 2005].

4.6. Le développement d'activateurs sélectifs des canaux K_{ATP} pancréatiques.

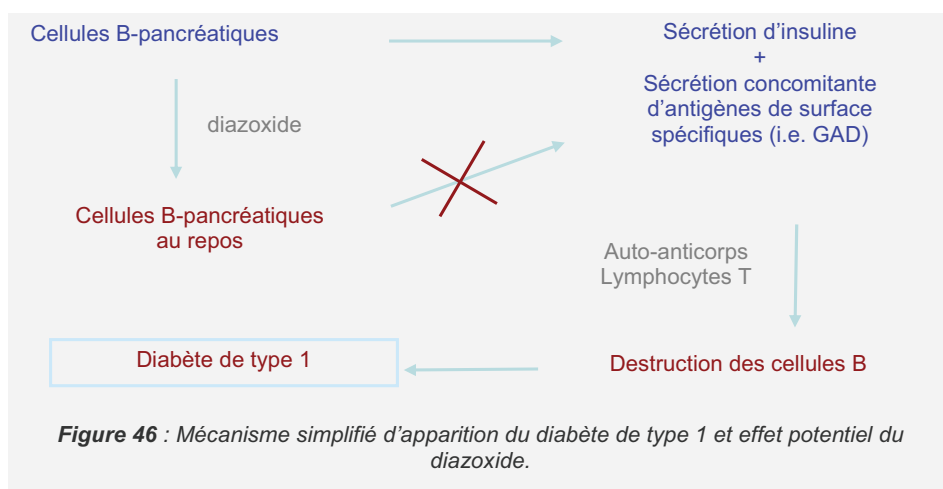
Comme nous venons de le voir, la plupart des développements pharmacochimiques des activateurs des canaux K_{ATP} ont visé la découverte de drogues agissant sur la fibre musculaire lisse, vasculaire ou non. Par ailleurs, jusqu'au début des années nonante, peu de composés agissant sur les canaux K_{ATP}

pancréatiques avait été décrits. Le diazoxide, un benzothiadiazine 1,1-dioxyde, et quelques dérivés proches représentaient la seule famille chimique capable d'agir sur la glycémie par l'intermédiaire d'une activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP. Rappelons que le diazoxide, composé relativement ancien, a été utilisé en tant qu'agent antihypertenseur et hypoglycémiant avant même que son mécanisme d'action ne soit compris. Ce n'est que plus récemment encore que son effet sur les sous-unités SUR1 mais également SUR2 a été identifié [Trude et al. 1986, Dunne et al. 1987, Standen et al. 1989]. Ce double effet, égal en intensité, sur les deux grands types de sous-unités SUR en fait un composé non sélectif. Une conséquence fâcheuse de cette absence de sélectivité tissulaire est l'apparition de nombreux effets secondaires tels que l'hypertrichose, l'apparition d'œdèmes, d'hypotension artérielle et de tachycardie [Black et al. 1968, Kumar et al. 1976]. Ces effets indésirables, ainsi que les perspectives thérapeutiques, limitées à l'époque, des activateurs des canaux K_{ATP} pancréatiques n'ont pas favorisé les développements autour de cette série chimique qui sont donc restés quasi inexistants. En effet, durant assez longtemps, les seules applications réelles des ouvreurs des canaux K_{ATP} pancréatiques sont restées le traitement de l'hyperinsulinémie qui apparaît dans des pathologies telles que l'hypoglycémie persistante chez l'enfant (PHHI) et le cancer du pancréas (nésidioblastose ou insulinoma) [Kane et al. 1997, Goode et al. 1986, Gill et al. 1997, Cosgrove et al. 2004]. Le PHHI, dans sa forme la plus sévère, est lié à une déficience génétique de certaines sous-unités des canaux K_{ATP} pancréatiques, ce qui amène une sécrétion non contrôlée d'insuline et un taux de glucose circulant très bas pouvant causer de graves complications neurologiques [Dunne et al. 1997, Verkarre et al. 1998, Aynsley-Green et al. 2000]. Les tumeurs du pancréas sont, quant à elles, souvent accompagnées d'une hypersécrétion d'insuline [Frerichs et al. 1976, Flatt et al. 1990].

Par ailleurs, l'hypersécrétion d'insuline est l'un des symptômes du syndrome polycystique ovarien qui est un désordre hormonal sévère affectant la femme en âge de reproduction [Goodarzi et al. 2006, Baillargeon et al. 2006]. Le diazoxide pourrait avoir un effet bénéfique dans le traitement du symptôme hyperinsulinémique de cette pathologie [Krassas et al. 1998].

Vers le milieu des années nonante, plusieurs études cliniques ont démontré que la réduction de la sécrétion d'insuline endogène par l'utilisation d'un activateur des canaux K_{ATP} pourrait être favorable pour la sauvegarde de la fonction des cellules B du

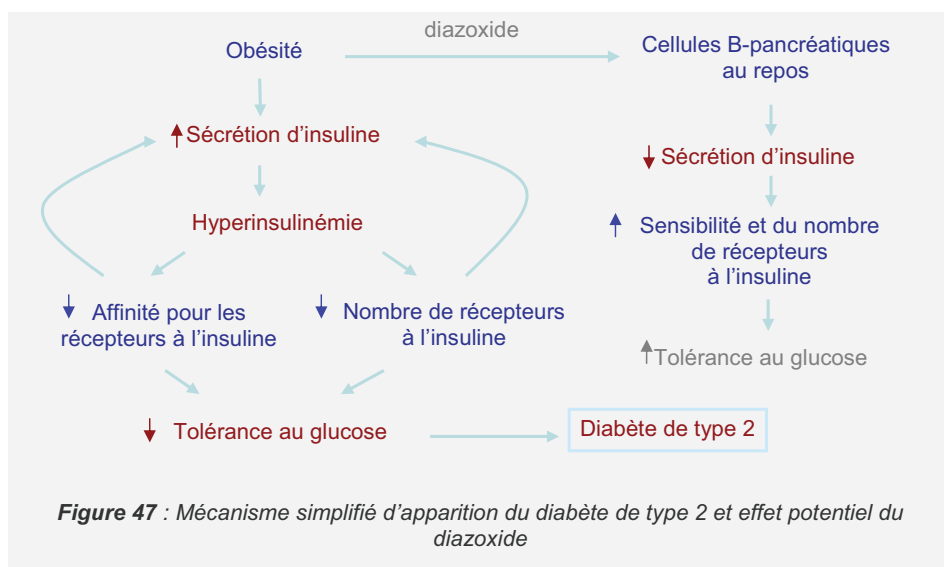
pancréas. En effet, lorsque les cellules B sont mises au repos par le diazoxide, la destruction de ces cellules chez des patients atteints de diabète de type 1 récemment diagnostiqué semble freinée [Björk et al. 1996 et 1998]. Les effets bénéfiques des PCOs pancréatiques sur la préservation de la fonction des cellules B a également été mise en évidence dans différents modèles animaux *in vitro* et *in vivo* [Rasmussen et al. 2000, Ritzel et al. 2004]. Ils pourraient être dus à une modification de l'expression de certains auto-antigènes de surface [Björk et al. 1992]. Une manière plus schématique et simplifiée de visualiser l'effet bénéfique des PCOs au niveau du diabète de type 1 est présentée dans la figure 46.



La sécrétion d'insuline entraîne de manière concomitante la libération d'antigènes spécifiques. Ces antigènes se retrouvent à la surface des cellules B lors du phénomène d'exocytose. Chez les patients pré-diabétiques, il existe des auto-anticorps de type lymphocytes T spécifiquement dirigés contre ces antigènes. Ces lymphocytes T vont alors s'attaquer et détruire les cellules B porteuses des antigènes. Il est dès lors aisé de comprendre que si la sécrétion d'insuline est réduite, par exemple en activant les canaux K_{ATP} , cela va diminuer la présence des antigènes de surface et donc, en principe, réduire les phénomènes d'autodestruction.

Certains PCOs, dont le diazoxide, ont également démontré leur intérêt dans le maintien de la fonction des îlots de rat et des îlots humains en présence d'une haute concentration en glucose et donc de prévenir ou de retarder l'apparition du diabète de type 2 [Alemzadeh et al. 2004, Surwit et al. 2000, Bjorklund et al. 2004]. Par ailleurs,

l'obésité est souvent associée au diabète de type 2 et il a été postulé qu'une diminution de la sécrétion d'insuline à partir des cellules B pancréatiques serait susceptible de restaurer la sensibilité aussi bien que le nombre de récepteurs à l'insuline ainsi que de rétablir la tolérance au glucose. La figure 47 schématise le mécanisme d'apparition du diabète de type 2 et l'effet potentiel du diazoxide.



L'apparition du diabète de type 2 serait la résultante d'une diminution de l'affinité des récepteurs pour l'insuline couplée à une diminution du nombre de ces récepteurs. Cela obligerait l'organisme à augmenter la sécrétion d'insuline pour maintenir la glycémie. Par l'entrée dans une espèce de cercle vicieux, cette hypersécrétion provoquerait malheureusement la diminution du nombre de récepteurs à l'insuline et une baisse d'affinité pour ce peptide. Cela aboutirait, en finalité, à l'épuisement des cellules B, à l'incapacité de maintenir la glycémie et à la diminution de la tolérance au glucose. La mise au repos des cellules B pancréatiques pourrait briser le cercle vicieux en restaurant le nombre de récepteurs et leur affinité pour l'insuline.

Pour parfaire la description du contexte général dans lequel ont débuté et évolué les travaux que nous avons réalisés au sein de notre laboratoire sur le sujet, signalons qu'au début des années nonante, les canaux potassiques sensibles à l'ATP localisés dans les différentes sous-structures du système nerveux central ont été

présentés comme structuralement proches de ceux des canaux pancréatiques [Lazdunski 1990, Amoroso et al. 1990].

Nous nous sommes donc lancés dans l'aventure des canaux K_{ATP} au moment même où régnait une grande effervescence et où de nombreuses recherches fondamentales mettaient en avant les multiples implications physiologiques et les importants intérêts thérapeutiques de ces canaux et des composés capables de les activer. La majorité des travaux de pharmacochimie était dirigée vers la découverte de composés agissant sur la fibre musculaire lisse et cardiaque et principalement centrée sur les familles du cromakalim et du pinacidil. Rien n'avait par contre été entrepris autour du diazoxide et de son action sur les canaux K_{ATP} pancréatiques. Il est vrai qu'à l'époque, les potentialités de ces composés dans le traitement du diabète et de l'obésité n'étaient pas encore connues. Ces travaux nous ont permis d'établir plusieurs collaborations avec le milieu industriel, dans un premier temps avec la société Servier et plus récemment avec la société Novo-Nordisk dans le but de développer un nouveau médicament actif dans le traitement des différents types de diabètes et de l'obésité. Plusieurs brevets ont été déposés sur ce projet et la collaboration industrielle, étalée sur plusieurs années a cessé avec l'entrée en phase de développement clinique du NN-414 de la société Novo-Nordisk.

4.7. La pharmacochimie des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} .

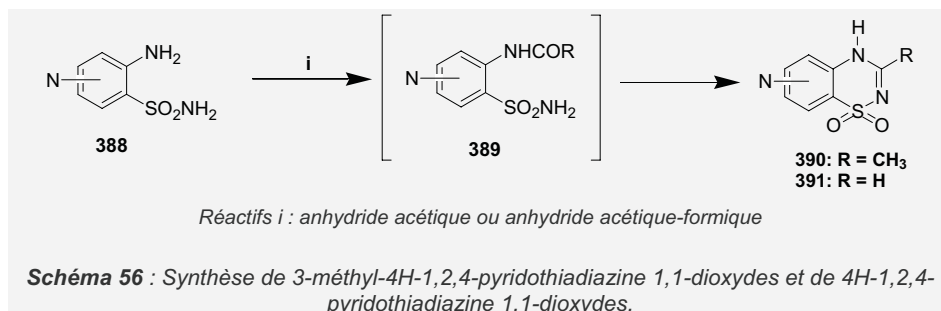
Afin de mieux appréhender les recherches développées dans ce travail, nous allons, dans ce chapitre, brièvement décrire les relations structure-activité dégagées de l'évaluation des premiers composés synthétisés afin de découvrir de nouveaux activateurs sélectifs du tissu pancréatique. Il s'agit principalement de dérivés pyridiniques qui ont fait l'objet d'une présentation soit dans notre thèse de doctorat, soit dans la thèse d'agrégation du Professeur B. Pirotte. Les informations structurales et pharmacologiques qui ont pu être obtenues dans ces séries ont servi de base aux futures modulations envisagées en série benzénique.

L'approche pharmacologique par laquelle nous avons choisi d'aborder ce sujet est basée sur des principes de bioisotéries bien connus et déjà appliqués avec un certain succès dans d'autres séries d'activateurs des canaux K_{ATP} et de diurétiques

thiazidiques. Nous avons donc postulé que le remplacement du noyau chlorobenzénique du diazoxide par un noyau pyridinique pourrait nous permettre d'obtenir des activateurs actifs mais également sélectifs du tissu pancréatique. Nous avons ainsi préparé une série de composés pyridiniques en série 5-aza, 7-aza et 8-aza porteurs en position 3 de groupements alkyles courts.

Comme décrit dans le chapitre 3, peu de choses avait été réalisé concernant la chimie des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes. Seule la synthèse de quelques composés, surtout en série diurétique, avait été détaillée.

Pour la préparation des 3-alkyl-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes en série 5-, 7- et 8-aza, nous nous sommes basés sur des stratégies développées en série benzénique. La principale difficulté de ces schémas a consisté en l'obtention des différents *o*-aminopyridinesulfonamides **388** [de Tullio et al. 1995a et 1995b]. Une fois ces intermédiaires clés préparés, l'action de différents anhydrides ou d'orthoformiates d'éthyle permet d'arriver aisément, et avec de bons rendements, aux composés escomptés (**390** et **391**, schéma 56) [de Tullio et al. 1995a, 1995b et 1996].

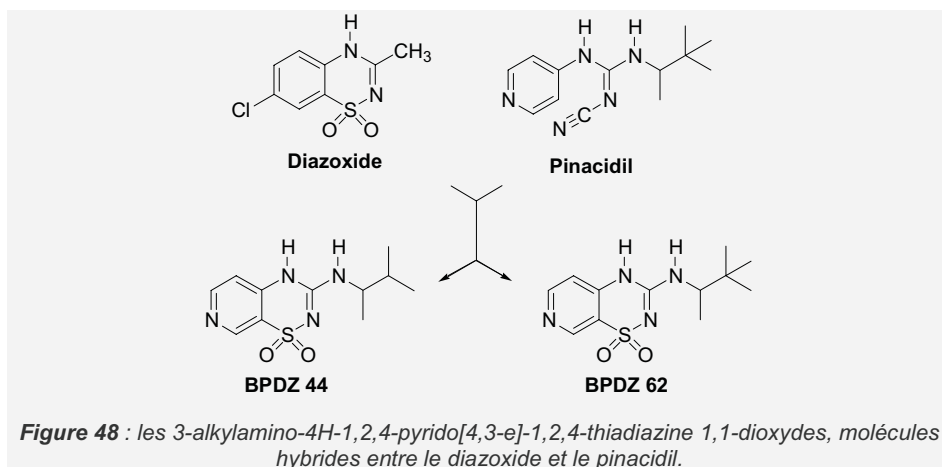


L'évaluation pharmacologique de ces composés sur cellules B pancréatiques de rat (modèle endocrinien) et sur aorte de rat (modèle de fibre musculaire lisse) montre que le passage de la série benzénique à la série pyridinique entraîne une perte sensible d'activité par rapport au diazoxide dans les deux modèles. et ce quelque soit la position de l'azote pyridinique [de Tullio et al. 1995a et 1996]. L'examen des propriétés physico-chimiques des composés, et plus spécifiquement des valeurs de pKa, permet peut-être d'expliquer, du moins en partie, la mauvaise activité de nos dérivés. En effet, le pKa mesuré du diazoxide est de 8.62 ; cette drogue n'est donc pratiquement pas ionisée au pH physiologique. Par contre les valeurs de pKa des composés pyridiniques 3-alkylés, déterminées soit par titrimétrie, soit par

spectrophotométrie UV, s'échelonnent entre 6.9 et 7.7. Ils existent donc, de manière non négligeable, sous la forme ionisée anionique au pH physiologique (c'est l'azote porteur du proton en position 4 qui est, en principe, déprotoné).

La comparaison des cartes de potentiels électrostatiques des dérivés 4-méthyl-4*H*-pyrido[3,2-*e*], [4,3-*e*] et [2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes avec celle du diazoxide a clairement démontré que c'est la série [4,3-*e*], nommée trivialement 7-aza, qui est la plus proche électroniquement du noyau 7-chlorobenzénique du diazoxide. De ce fait, les développements pharmacochimiques suivants ont concerné dans un premier temps cette unique série.

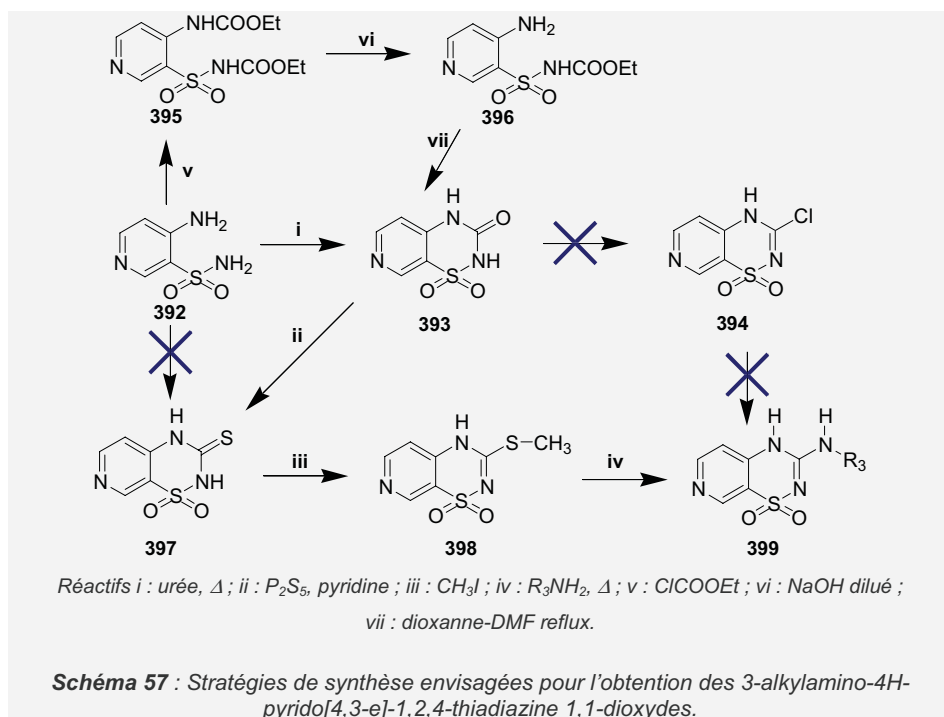
L'étape suivante a consisté à moduler la position 3 en remplaçant la chaîne alkyle par une chaîne alkylamino [Pirotte et al. 1993 et 1994, de Tullio 1995a, 1996, 1999a, Lebrun et al. 1996, Khelili et al. 1999]. Ces 3-alkylamino-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes, développés tout d'abord dans la série 7-aza qui est au niveau bioisostérique la plus proche des 7-chlorobenzothiadiazine 1,1-dioxydes, peuvent être vus, en réalité, comme des structures hybrides entre le diazoxide et le pinacidil, un activateur des canaux K_{ATP} de la classe des *N*-aryl-*N'*-cyanoguanidines (Figure 48).



En effet, ces dérivés sont, en fait, des sulfonylguanidines cycliques ; or la fonction sulfonylguanidine peut être considérée comme bioisotère de la fonction cyanoguanidine du pinacidil.

Au moment du développement de ces séries, peu de choses apparaît dans la littérature concernant la préparation des 3-amino- ou 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes. Seules les synthèses du 3-amino- et du 4-méthyl-3-amino-4*H*-pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde avaient été décrites (Cf. Ch3, Schéma 50) [Kostovskaya et al. 1979].

Nous avons donc opté pour l'adaptation de schémas de synthèse décrits en série benzénique [Pirotte et al. 1993, de Tullio et al. 1995a, de Tullio et al. 1996, de Tullio et al. 1999b]. Suivant notre stratégie, le 4-aminopyridine-3-sulfonamide (**392**, Schéma 57) et le 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**393**) apparaissent comme étant les intermédiaires clés. Le schéma 57 reprend les différentes voies de synthèse envisagées. La transformation du dérivé 3-oxo (**393**) en dérivé 3-thioxo (**397**) suivi de sa S-méthylation a permis de fixer un bon groupement partant en position 3.



Différentes chaînes alkylaminées courtes, ramifiées ou cycliques, ont pu ainsi être greffées en position 3 du cycle thiadiazine par simple chauffage du composé 3-

méthylsulfanylé (**398**) avec les amines appropriées, soit en autoclave scellé pour les amines de bas point d'ébullition, soit à pression atmosphérique pour les autres.

L'évaluation pharmacologique des différents composés synthétisés dans les modèles endocrinien et vasculaire (modèles qui seront décrits en détail plus avant dans le travail), nous a cette fois livré d'intéressants résultats tant au niveau activité que sélectivité [de Tullio et al. 1995a et 1996]. En effet, la présence de courtes chaînes alkylamino ramifiées en position 3 entraîne une amélioration de l'activité inhibitrice de la sécrétion d'insuline par rapport au diazoxide et ce généralement de manière concomitante avec une diminution de l'activité sur fibre musculaire lisse vasculaire. De ce fait, plusieurs drogues de cette série (i.e. BPDZ 42, BPDZ 44 et BPDZ 62) sont apparues comme exhibant une certaine sélectivité tissulaire (pancréas vs aorte). Cette découverte a constitué une avancée importante dans la recherche de drogues sélectives des canaux K_{ATP} de type Kir6.2/SUR1. Ces composés furent, en effet, les premières drogues décrites pour agir plus puissamment et plus sélectivement que le diazoxide sur les canaux K_{ATP} pancréatiques.

Ces premiers développements nous ont donc démontré qu'il était possible de distinguer, au niveau pharmacochimique, les récepteurs pancréatiques (identifiés par la suite comme étant de type SUR 1) des récepteurs vasculaires (identifiés par la suite comme étant de type SUR 2B).

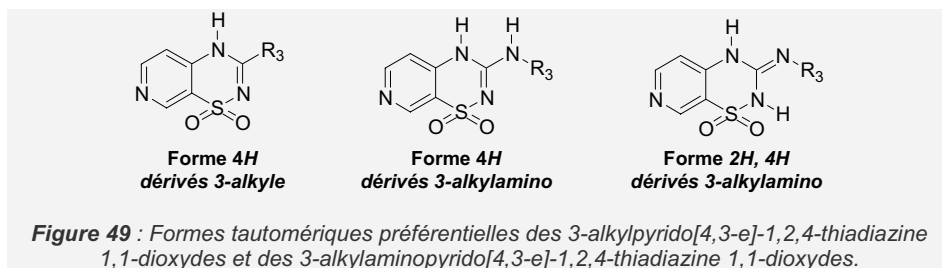
Des études pharmacologiques complémentaires, réalisées autour des BPDZ 44 et 62 ont permis de caractériser le mécanisme d'action de ces composés [Pirrotte et al. 1994, Antoine et al. 1994, Lebrun et al. 1996].

L'introduction sur le noyau 4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde en position 3 de certaines chaînes latérales alkylamino de type *sec*-butylamino ou 2,2-diméthylpropylamino entraîne l'apparition sur les composés d'un centre stéréogénique (i.e. BPDZ 42 et 44). L'aspect stéréochimique étant susceptible d'être important pour l'activité des ouvreurs des canaux K_{ATP} , la préparation des énantiomères des BPDZ 42 et 44 par action d'amines optiquement pures sur l'intermédiaire 3-méthylsulfanylé (**398**) et leur évaluation biologique a dès lors été envisagée. Les amines optiquement pures étaient soit commercialement disponibles, soit préparées par la technique de cristallisation fractionnée de sels diastéréomériques formés par action d'acides organiques optiquement purs sur le mélange racémique des amines [Khelili et al. 1999]. Une fois la résolution réalisée, les amines optiquement pures ont été greffées sur noyau pyridothiadiazine par réaction avec l'intermédiaire 3-méthylsulfanylé (**430**).

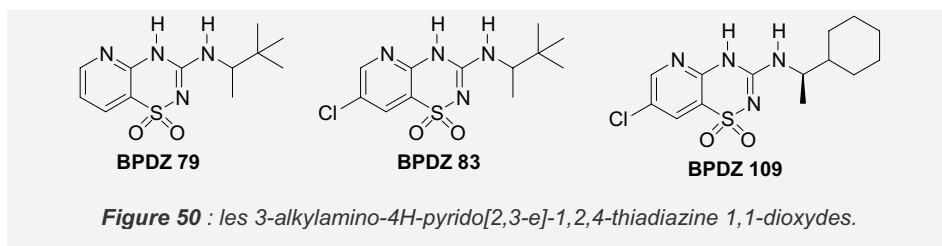
La pureté optique des drogues synthétisées a été ensuite vérifiée par HPLC chirale ou électrophorèse capillaire. L'analyse des résultats pharmacologiques générés avec ces dérivés chiraux montre que la stéréochimie des drogues n'exerce que très peu d'influence, pour ne pas dire aucune, sur l'activité au niveau de la sécrétion statique d'insuline [Khelili et al. 1999, de Tullio et al. 1999a]. En ce qui concerne les résultats au niveau vasculaire, s'il est difficile de tirer des conclusions à partir des données du BPDZ 42, celles du BPDZ 44 et de ses énantiomères montrent clairement que l'isomère *R* est plus actif que son antipode *S*. Ce fait semble relativement important si les résultats sont examinés sous l'angle de la sélectivité tissulaire puisqu'il apparaît en effet qu'il soit possible d'augmenter la sélectivité des drogues pour le tissu pancréatique vs aortique en sélectionnant la bonne stéréochimie du centre d'asymétrie.

Au niveau des données physico-chimiques de cette série de composés, il est à noter que, par rapport à leurs homologues 3-alkyles, les 3-alkylamino montrent une valeur de pKa sensiblement supérieure à 8. En cela, elle se rapproche de la valeur notée pour le diazoxide, et donc la fraction ionisée au pH physiologique est notablement réduite pour la plupart des dérivés de cette série [de Tullio et al. 1995a, 1995b et 1996]. Par ailleurs, les valeurs de log P' des composés les plus intéressants, déterminées soit par la méthode statique soit par la méthode dynamique, se situent entre + 0.6 et + 1.4, ce qui semble tout à fait compatible avec l'utilisation *in vivo* de ces drogues au niveau périphérique [de Tullio et al. 1995a].

Deux études structurales menées par spectroscopie UV, IR, RMN et diffraction de rayonnement X, ont par ailleurs démontré que les 3-alkylpyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes et les 3-alkylamino-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes existent préférentiellement sous leur forme tautomérique *4H* (Figure 49) [de Tullio et al. 1995a, 1995b, 1996 et 1999b, Dupont et al. 1995a, 1995b et 1996]. Il apparaît cependant que pour les composés 3-alkylamino, il existe une certaine délocalisation des électrons de cette insaturation vers la liaison entre le carbone 3 et l'azote exocyclique (forme *2H,4H*).



Ces excellents résultats nous ont poussés à examiner d'autres positions de l'azote du cycle pyridinique et notamment la position 5 [Pirotte et al. 2000]. Les composés 5-aza et 5-aza-7-chloro préparés ont été évalués en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} . Le passage de l'azote pyridinique de la position 7 à la position 5 entraîne un net changement de profil pharmacologique avec des composés plus actifs sur fibres musculaires lisses que sur îlots pancréatiques. Parmi les drogues les plus actives, citons les BPDZ 79, 83 et 109 (Figure 50).

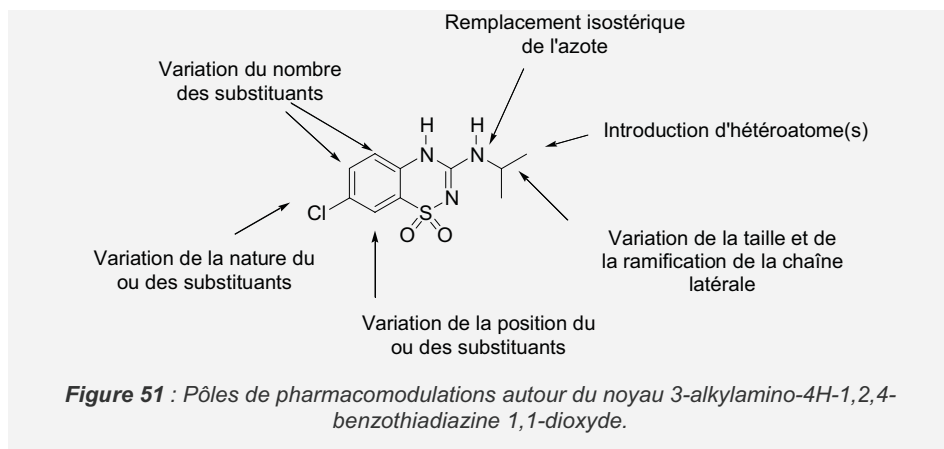


4.8. La pharmacochimie des benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} [Cf. annexes 1 à 7 et 10 à 18].

Nous débuterons avec ce chapitre, la description détaillée de nos recherches post-doctorales dans le domaine des activateurs des canaux K_{ATP} .

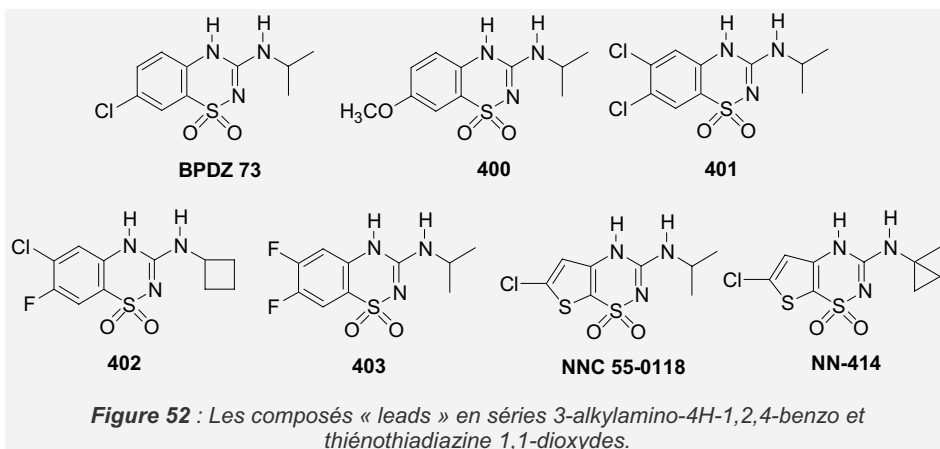
Après avoir dégagé quelques composés « leader » en série pyridothiadiazine 1,1-dioxyde, nous avons entrepris de poursuivre les pharmacomodulations en série benzénique. Les analogues 3-alkylamino-7-chlorobenzéniques des composés 7-aza ont tout d'abord été préparés et évalués [de Tullio et al. 2003 : Annexe 6]. Il a été noté pour certains composés une meilleure activité et une meilleure sélectivité sur les cellules B pancréatiques que leurs homologues pyridiniques. Sur ces bases, diverses autres modulations ont été envisagées, à la fois en position 3, mais également 2 et 4

du noyau thiadiazine (Figure 51) [Ouedraogo et al. 2002, Somers 2000 et 2001, Boverie 2001 : cf. annexe 2, annexe 3 et annexe 5].



Les différentes possibilités de substitutions du noyau benzénique ont aussi été explorées avec succès (Figure 51) [Boverie et al. 2005, de Tullio et al. 2005 : Cf. annexe 7 et annexe 11].

Ces modifications structurales nous ont permis d'obtenir différents profils d'activités pharmacologiques, de proposer des modèles de pharmacophores [de Tullio et al. 2006 : cf. annexe 15] mais surtout de découvrir des drogues parmi les plus puissantes et les plus sélectives envers les canaux K_{ATP} du tissu pancréatique jamais décrites. Ces composés, présentés dans la figure 52 ont servi de modèles au développement d'analogues thiophéniques par la société Novo-Nordisk. (i.e. composés NNC 55-0118 et NN-414, Figure 52) [Nielsen et al. 2002 et 2006].

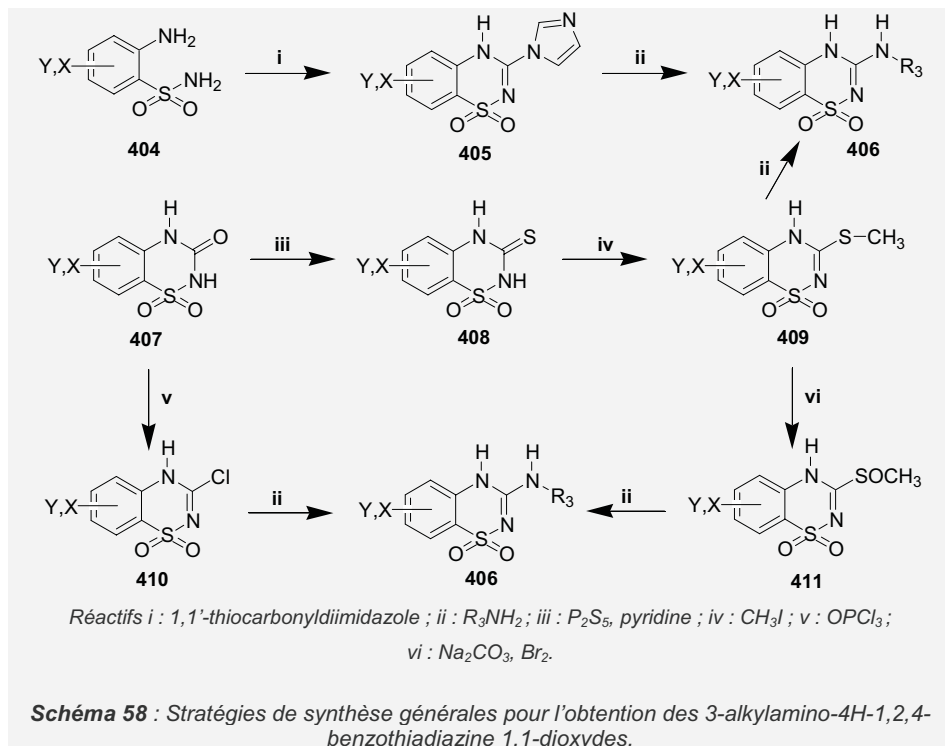


4.8.1. Synthèse des dérivés benzéniques.

Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes ayant donné d'excellents résultats pharmacologiques, il a donc été envisagé dans un second temps de faire le chemin inverse à celui qui avait été pris lors du début de ce programme de recherche, à savoir passer de la série pyridinique à la série benzénique [Somers et al. 2000 et 2001, de Tullio et al. 2003, 2005 et 2006, Boverie et al. 2001, 2004 et 2005].

Contrairement à leurs homologues pyridiniques, les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes ont été plus largement décrits dans la littérature (Cf. Ch 3). Dans la plupart des cas, les intermédiaires de départ restent cependant toujours identiques ; il s'agit des o-aminobenzènesulfonamides (**404**, Schéma 58) et des 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**407**). L'expérience acquise dans la préparation des dérivés pyridiniques a néanmoins pu être transposée à la série benzénique. Le schéma 58 présente les stratégies de synthèse générales permettant d'accéder aux différents composés finis. Ainsi, lorsque cela était possible, c'est-à-dire lorsque le noyau aromatique était favorable à des réactions de type Friedel-Crafts et que des problèmes d'isomérisation de position ne pouvaient se poser, la voie dite de Girard (réaction à l'isocyanate de chlorosulfonyle sur une aniline) a été préférentiellement choisie de manière à accéder aux composés 3-oxo (**407**). Ces derniers s'intègrent ensuite dans un schéma classique, à savoir la transformation en 3-thioxo (**408**) puis en dérivés 3-méthylsulfanylés (**409**). Ces intermédiaires réactionnels peuvent ensuite subir une attaque nucléophile de la part des amines souhaitées. Lorsque l'amine à

greffer est relativement encombrée, le passage par un intermédiaire plus réactionnel de type 3-chloro (**410**) ou 3-méthylsulfinyle (**411**) est requis.



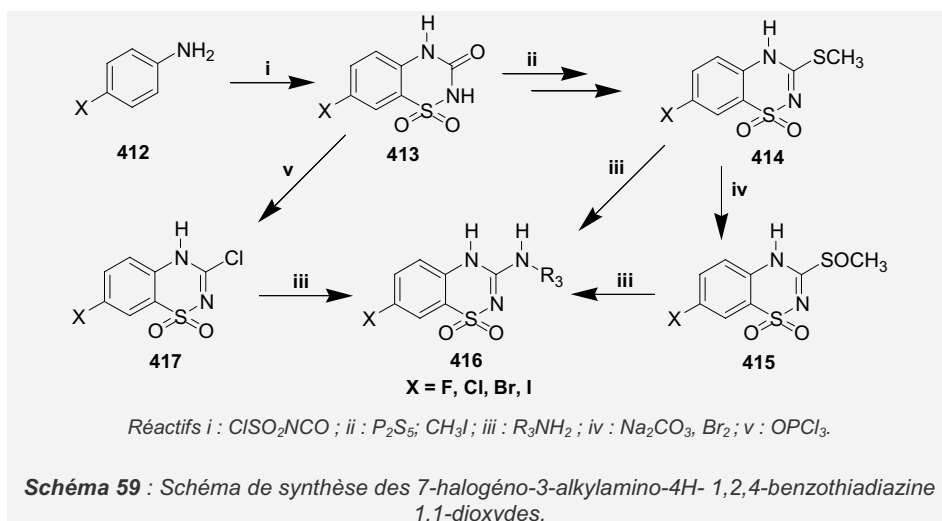
Dans le cas de composés disubstitués, l'action de l'acide chlorosulfonique a été préférée de manière à accéder aux *o*-aminobenzènesulfonamides. Ces derniers, traités au 1,1'-thiocarbonyldiimidazole permettent d'obtenir les intermédiaires réactionnels 3-imidazolés (**405**) qui réagissent avec différentes amines pour donner les dérivés attendus. D'une manière générale, c'est encore une fois l'accès aux composés 3-oxo et/ou *o*-aminobenzènesulfonamides qui constitue l'étape clé des schémas réactionnels.

La préparation des composés énantiomériques, dont le centre d'asymétrie se trouve sur la chaîne latérale en position 3, est réalisée de manière assez simple par action d'amines optiquement pures sur les intermédiaires 3-méthylsulfonylé ou 3-imidazolé

Détaillons maintenant les voies de synthèse des différentes séries développées.

4.8.1.1. Les 7-halogéno-3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 3 et annexe 6].

Il s'agit là des premiers composés synthétisés dans cette série [de Tullio et al. 1996 et 2003]. Plusieurs composés avaient déjà été décrits dans la littérature des années soixante, surtout en série 7-chloro. Leur préparation n'a pas révélé de grandes difficultés. Le schéma que nous avons utilisé est classique sans être identique à celui déjà décrit puisque nous y avons inséré la synthèse de Girard pour l'obtention des intermédiaires 3-oxo (**413**, Schéma 59). Les quatre halogènes ont été envisagés et les chaînes latérales sont, en général, des chaînes alkyles ou cycloalkyles de longueur et de ramifications diverses ainsi que des chaînes de type aralkyle.



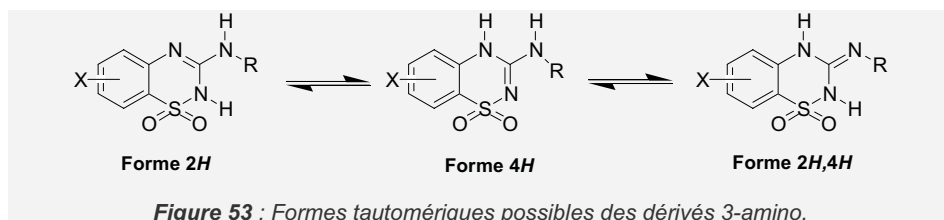
Des chaînes avec des hétéroatomes, ainsi que des amines optiquement pures, ont également pu être greffées. Les produits de départ sont les différentes *p*-halogénoanilines (**412**, Schéma 59) qui par réaction avec l'isocyanate de chlorosulfonyl donnent les intermédiaires 3-oxo (**413**), l'action de pentasulfure de phosphore et d'iodure de méthyle fournit les intermédiaires réactionnels 3-méthylsulfanylés (**414**).

Il est possible d'oxyder le groupement méthylsulfanyle afin de le rendre plus labile. Habituellement, cette oxydation va jusqu'au stade méthylsulfoxyde en présence

d'acide *m*-chloroperbenzoïque. L'utilisation contrôlée de brome en présence de carbonate permet de s'arrêter au stade méthylsulfinyle, tout aussi réactionnel mais sans doute un peu plus stable. Cet intermédiaire (**415**) a été utilisé pour greffer des amines encombrées (i.e. *tert*-butylamine). Dans le cas d'amines particulièrement sensibles, comme la 2-fluoroéthylamine, l'utilisation de conditions de réaction particulièrement douces est requise et donc, nous avons envisagé la préparation de composés 3-chloro (**417**) par action d'OPCl₃ sur le dérivé 3-oxo. L'intermédiaire 3-chloro ayant été obtenu avec de bons rendements en série 7-chloro et étant relativement stable sous forme solide, cette voie se révèle être particulièrement intéressante. Nous ne l'avons cependant pas encore appliquée aux autres analogues halogénés.

Études structurales en série 3-alkylamino-7-chloro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

Une étude structurale similaire à celle réalisée pour déterminer la position de la liaison double des 3-alkylaminopyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes a également été entreprise en série 3-alkylamino-7-chloro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde. Comme décrit précédemment, trois formes tautomériques différentes sont possibles : la forme *2H*, la forme *4H* et la forme *2H,4H* (Figure 53).



La littérature a démontré que la forme *2H,4H* n'était probablement pas la forme préférentielle adoptée par cet hétérocycle [Albasini et al. 1967] et les résultats de l'étude en série pyridinique sont en faveur de la forme *4H* [de Tullio et al. 1999b].

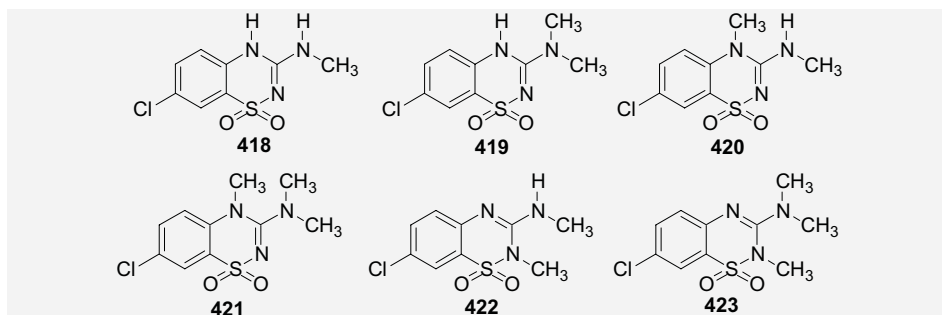


Figure 54 : 3-Alkylaminobenzothiadiazine 1,1-dioxydes sélectionnés pour l'étude structurale du cycle thiadiazine.

Nous avons donc préparé et analysé plusieurs composés, fixant ou non la position de cette liaison double (**418-423**, Figure 54) [Somers 2001]. Les études de diffraction de rayonnements X conduisent à penser que les 3-alkylamino-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués sur l'azote en 2 ou en 4 se présentent majoritairement à l'état solide sous la forme tautomérique *4H*. Les données collectées par spectroscopie UV et par RMN ^1H et ^{13}C corroborent cette conclusion en solution. Toutefois, comme dans le cas de leurs analogues pyridiniques (i.e. BPDZ 44) [de Tullio et al. 1999b], il semble qu'il puisse exister une certaine délocalisation de la liaison double entre le carbone en position 3 et l'azote exocyclique (forme *2H*, *4H*).

4.8.1.2. Les 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués sur le noyau aromatique [Cf. annexe 7].

Cette série est également relativement facile d'accès puisque l'*o*-aminobenzènesulfonamide (**427**, Schéma 60) est commercialement disponible [Boverie et al. 2005]. Comme cela est décrit en série pyridinique [de Tullio et al. 1998], l'action du 1,1'-thiocarbonyldiimidazole sur ce produit de départ donne l'intermédiaire 3-imidazolé (**425**). Ce composé est aussi réactionnel que son homologue pyridinique et mis en réaction en autoclave à haute température avec diverses amines, il permet d'obtenir les dérivés attendus (**426**). Il est à noter que l'intermédiaire 3-imidazolé est cependant moins réactionnel que le composé 3-méthylsulfanylé. Cette baisse de réactivité nécessite l'emploi de conditions de réaction plus drastiques ce qui entraîne en général l'apparition de nombreux produits secondaires et rend plus délicate l'étape de purification.

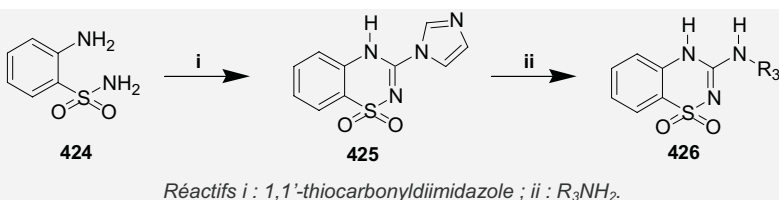


Schéma 60 : Schéma de synthèse des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

4.8.1.3. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par des groupements électrodonneurs (O-alkyle, alkyle, ...) [Cf. annexe 7].

La présence de tels groupements étant particulièrement propice à la réaction intramoléculaire de Friedel-Crafts, le même schéma de réaction que celui des dérivés 7-halogénés a été appliqué ici (Schéma 61), à savoir cyclisation des anilines (**427**) à l'isocyanate de chlorosulfonyle en présence d' $AlCl_3$ puis thionation de l'intermédiaire 3-oxo (**428**), méthylation du soufre et substitution nucléophile du groupement méthylsulfanyle par différentes amines.

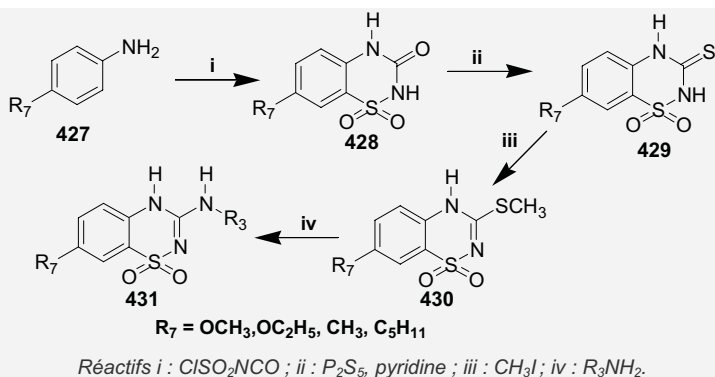


Schéma 61 : Schéma de synthèse des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement électrodonneur.

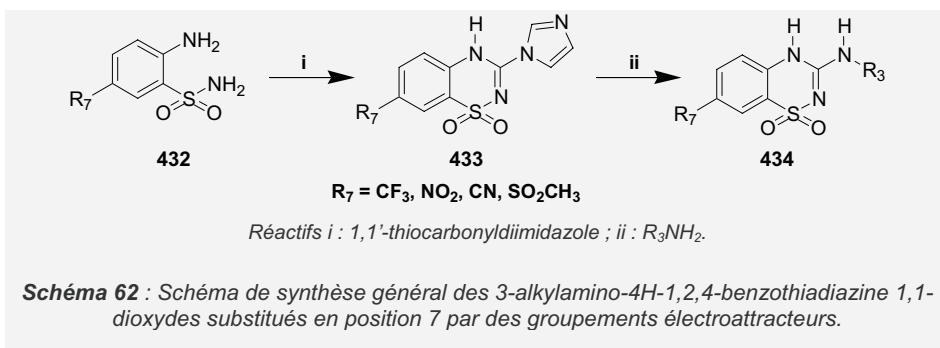
Une remarque doit cependant être faite lorsque l'aniline de départ est porteuse d'un groupement alkoxy. En effet, il est bien connu que les acides de Lewis sont capables de briser les liens éthers. C'est pourquoi des précautions toutes particulières concernant la durée de chauffe après l'adjonction du chlorure d'aluminium lors de la

réaction de Friedel-Crafts doivent être prises. En effet, il semble qu'un temps de réaction trop important entraîne une baisse sensible du rendement en produit final.

Les séries 7-méthoxy, 7-éthoxy, 7-méthyle et 7-pentyle ont été préparées suivant ces conditions.

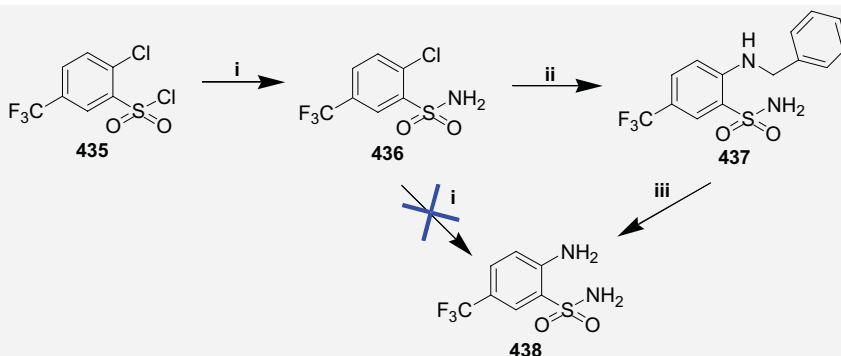
4.8.1.4. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par des groupements électroattracteurs (CF_3 , NO_2 , CN , SO_2CH_3 , ...) [Cf. annexe 2 et annexe 7].

La présence de groupements électroattracteurs sur le noyau aromatique rend difficilement applicable le schéma de type Girard. Les stratégies appliquées passent donc plutôt par la formation des intermédiaires réactionnels 3-imidazolés (**433**, Schéma 62) obtenus par action du 1,1'-thiocarbonyldiimidazole sur les o-aminobenzènesulfonamides correspondants (**432**). Ces derniers sont donc les molécules clés dans l'obtention des dérivés finaux (**434**).



En fonction de la nature du substituant du noyau aromatique, diverses voies de préparation ont dû être envisagées. Les chaînes latérales introduites en position 3 dans ces différentes séries sont celles qui ont apporté les meilleures réponses pharmacologiques dans les séries pyridiniques et 7-halogénobenzéniques.

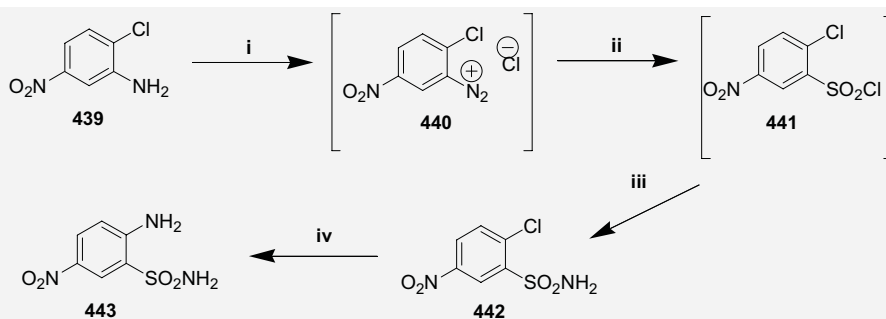
Ainsi, le 2-amino-5-trifluorométhylbenzènesulfonamide (**438**, Schéma 63) peut être obtenu par action d'ammoniaque sur le chlorure de 2-chloro-5-trifluorobenzène sulfonyle (**435**) suivie d'une substitution du chlore labile en position 2 par la benzylamine, l'action directe de l'ammoniaque sur ce dérivé ne permettant pas d'obtenir le produit attendu. Le 2-benzylamino-5-trifluorométhylbenzènesulfonamide (**437**) peut ensuite être débenzylé par hydrogénation catalysée par le charbon palladié.



Réactifs i : NH_4OH ; ii : benzylamine ; iii : C/Pd 5%, H_2 5 bars.

Schéma 63 : Synthèse du 2-amino-5-trifluorométhylbenzènesulfonamide.

Le 2-amino-5-nitrobenzènesulfonamide (**443**, Schéma 64) est, quant à lui, obtenu par une réaction de Sandmeyer variante de Meerwein sur le produit de départ 2-chloro-5-nitroaniline (**439**). La diazotation suivie du traitement à l'anhydride sulfureux en présence de chlorure cuivreux permet de former le chlorure de 2-chloro-5-nitrobenzènesulfonyl (**441**) qui, par un double traitement à l'ammoniaque, l'un à température ordinaire, l'autre par chauffage en autoclave forme le produit attendu (**443**).

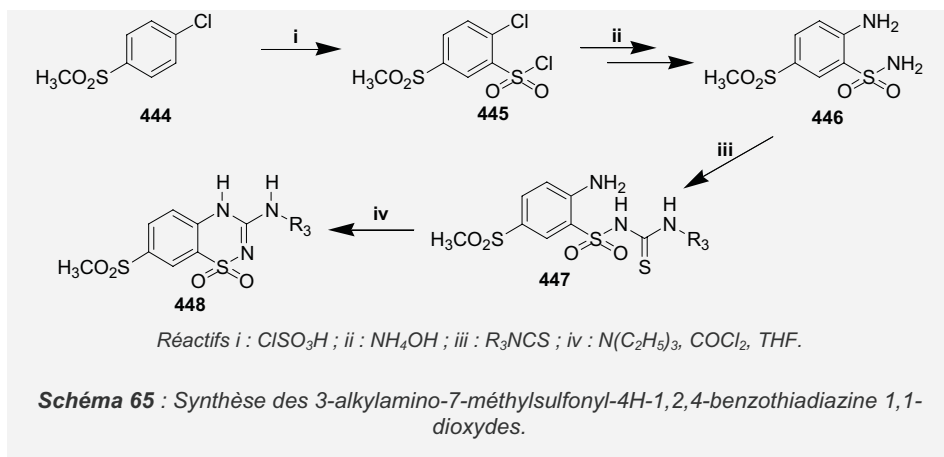


Réactifs i : NaNO_2 , HCl conc. ; ii : SO_2 , CuCl_2 ; iii : NH_4OH ; iv : NH_4OH conc.

Schéma 64 : Synthèse du 2-amino-5-nitrobenzènesulfonamide.

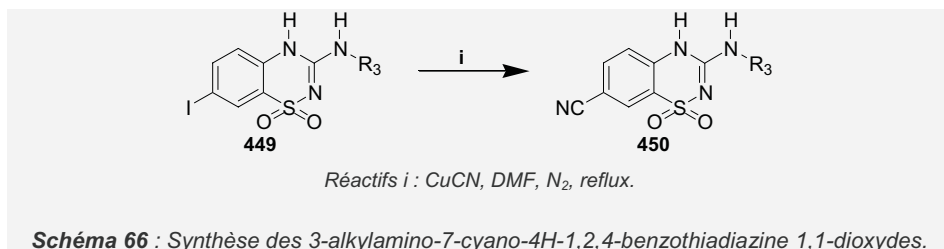
Le cas du dérivé 7-méthylsulfonylé est un peu particulier. En effet, si l'obtention de l'*o*-aminobenzènesulfonamide **446** (décrite dans le Schéma 65) ne pose guère de

problème, il n'en est pas de même pour la réaction de cyclisation au 1,1'-thiocarbonyldiimidazole qui donne des rendements extrêmement médiocres. De ce fait, une autre voie a dû être envisagée. Il nous est dès lors apparu que l'utilisation d'isothiocyanates pouvait être une alternative intéressante.



L'action de ces réactifs sur le 2-amino-5-méthylsulfonylbenzènesulfonamide (446) entraîne la formation d'une sulfonylthiourée (447) qui cyclise à basse température en présence de phosgène et de triéthylamine pour conduire aux dérivés finis (448). La seule limitation de cette méthode réside dans le peu d'isothiocyanates commercialement disponibles. Le 2-amino-5-méthylsulfonylbenzènesulfonamide est, quant à lui, préparé par chlorosulfonation du 4-chloro-1-méthylsulfonylbenzène (449) suivi d'un double traitement à l'ammoniaque.

La synthèse des dérivés 7-cyano (450) est elle aussi différente puisque l'introduction de ce groupement s'effectue sur les composés finis porteurs dans cette position d'un atome d'iode (449).



Ce dernier est alors substitué par l'action de cyanure de cuivre I (Schéma 66). Les rendements de cette réaction restent cependant assez médiocres.

4.8.1.5. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement acide carboxylique ou dérivé [Cf. annexe 2 et annexe 7].

L'introduction d'une fonction acide, c'est-à-dire d'un proton ionisable au pH physiologique, peut considérablement influencer l'activité biologique. Pour évaluer l'influence de l'ionisation complète de la molécule, nous avons donc décidé de placer une fonction carboxylique en position 7 des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes, ainsi que des fonctions dérivées non ionisables (ester et amide).

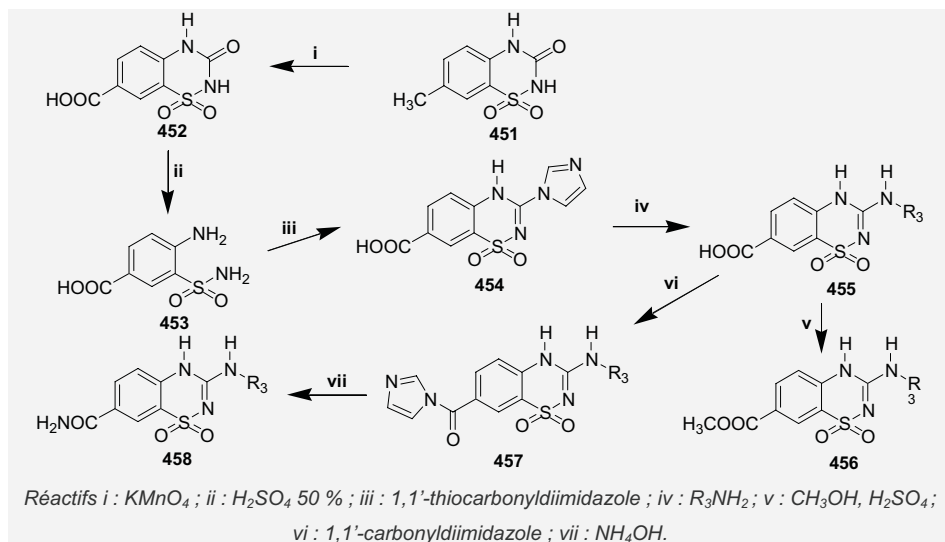


Schéma 67 : Synthèse des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par une fonction carboxylique ou dérivée.

Cette substitution se fait par oxydation au permanganate de potassium du 7-méthyl-3-oxo-2,3-dihydro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**451**, Schéma 67). Le dérivé carboxylique obtenu (**452**) est ensuite hydrolysé en milieu acide sulfurique 50 % pour donner l'aminobenzènesulfonamide correspondant (**453**). Ce dernier est cyclisé au 1,1'-thiocarbonyldiimidazole avant d'être mis en réaction avec différentes

amines en autoclave. Les dérivés 7-carboxyliques (**455**) peuvent être ensuite estérifiés par le méthanol en catalyse acide pour fournir les esters méthyliques (**456**). Le traitement de la fonction acide par le 1,1'-carbonyldiimidazole fournit les amides imidazolés (**457**), qui mis en réaction avec l'ammoniaque, permettent d'aboutir aux composés carboxamides (**458**).

4.8.1.6. Modulation de la position du substituant sur le cycle benzénique des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Jusqu'à présent, nous avons uniquement modulé la nature du substituant dans la position 7 du cycle thiadiazine. Il nous est apparu comme extrêmement important d'étudier l'impact du changement de position de ce substituant. Pour ce faire, nous avons choisi dans un premier temps l'atome de chlore, que nous avons placé en positions 5, 6 et 8.

Les 3-alkylamino-5-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes

La synthèse de cette série s'effectue tout à fait classiquement (Schéma 68) par cyclisation de la 2-chloroaniline (**459**) à l'isocyanate de chlorosulfonyl puis passage par le dérivé 3-thioxo (**461**), 3-méthylsulfanyle (**462**) et enfin réaction avec les alkylamines.

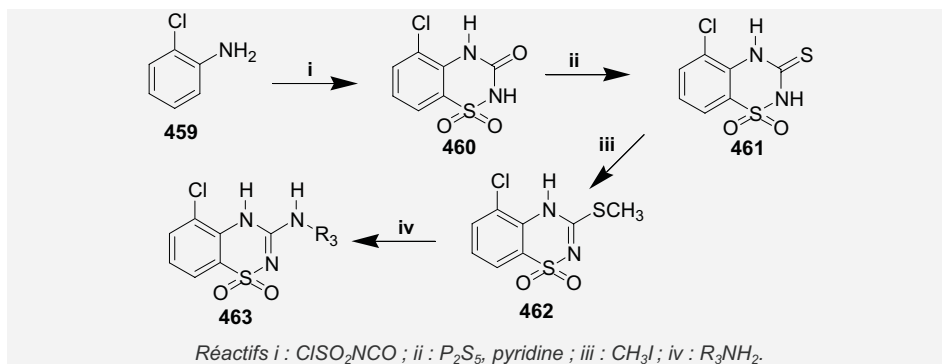
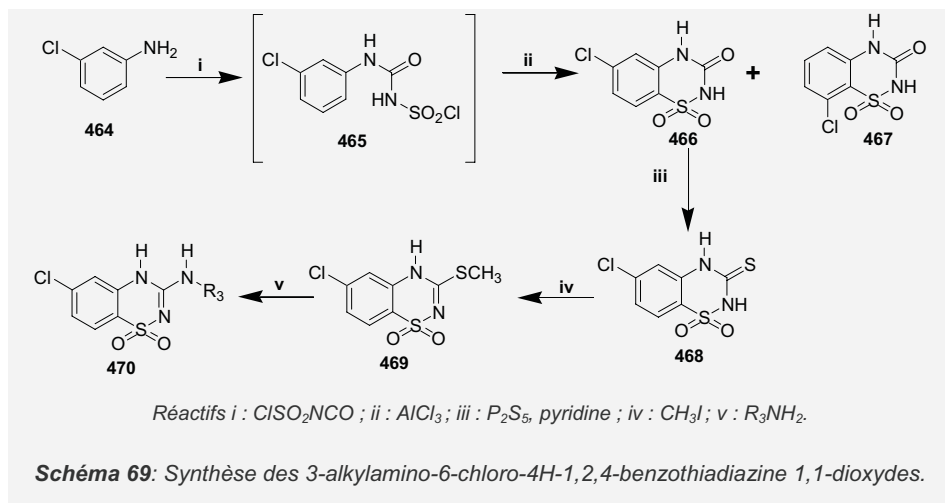


Schéma 68 : Synthèse des 3-alkylamino-5-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Les 3-alkylamino-6-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

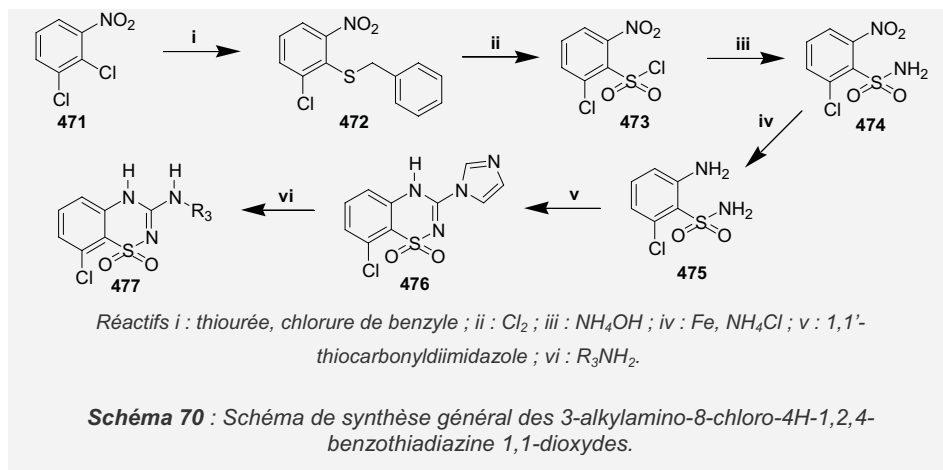
Un schéma identique à celui appliqué pour l'obtention des dérivés 5-chloro peut être appliqué en série 6-chloro.



La seule difficulté réside dans le fait que, lors de l'étape de cyclisation de type Friedel-Crafts de l'intermédiaire **465**, deux isomères de position peuvent être obtenus, les composés substitués en position 6 ou 8 (**466** et **467**, Schéma 69). Sans doute pour des raisons stériques, le composé 6 est celui qui se forme majoritairement. Par ailleurs, cet isomère peut facilement être débarrassé de son homologue 8-chloro par simple recristallisation dans l'eau. Une fois le composé 3-oxo obtenu, le reste de la synthèse est analogue à celle des composés 5-chloro.

Les 3-alkylamino-8-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Comme nous venons de le voir au paragraphe précédent, l'intermédiaire 8-chloro-3-oxo-2,3-dihydro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**467**) est généré lors de la cyclisation de la 3-chloroaniline (Cf. Schéma 69). Cependant, cet intermédiaire est largement minoritaire dans cette réaction et ne peut être isolé parfaitement pur puisqu'il est très souvent contaminé par son isomère 6-chloro. Une autre voie de synthèse a donc été utilisée découlant de travaux décrits dans la littérature [Topliss et al. 1962, Bierbaum et al. 1963]. Le composé de départ est le 2,3-dichloronitrobenzène (**471**, Schéma 70).



L'atome de chlore en *para* du groupement nitro peut alors être substitué par le benzylthiol généré in situ par action de thiourée et de chlorure de benzyle. L'intermédiaire benzylthioéther ainsi formé (**472**) subit ensuite une rupture oxydative par le chlore gazeux en présence d'acide acétique pour donner le chlorure de sulfonyle (**473**). Le sulfonamide (**474**) est ensuite obtenu par action d'ammoniaque tandis que la fonction nitro est réduite en amino (**475**) au moyen de fer en présence de chlorure ammonique. Il s'ensuit une cyclisation au 1,1'-thiocarbonyldiimidazole et la mise en contact de l'intermédiaire obtenu (**476**) avec les amines appropriées. Dans ce schéma réactionnel, c'est l'étape de rupture oxydative qui est limitante. Les rendements obtenus sont en effet relativement faibles et souvent assez variables. Le chlore est, en général, généré par action d'acide chlorhydrique sur du permanganate potassique.

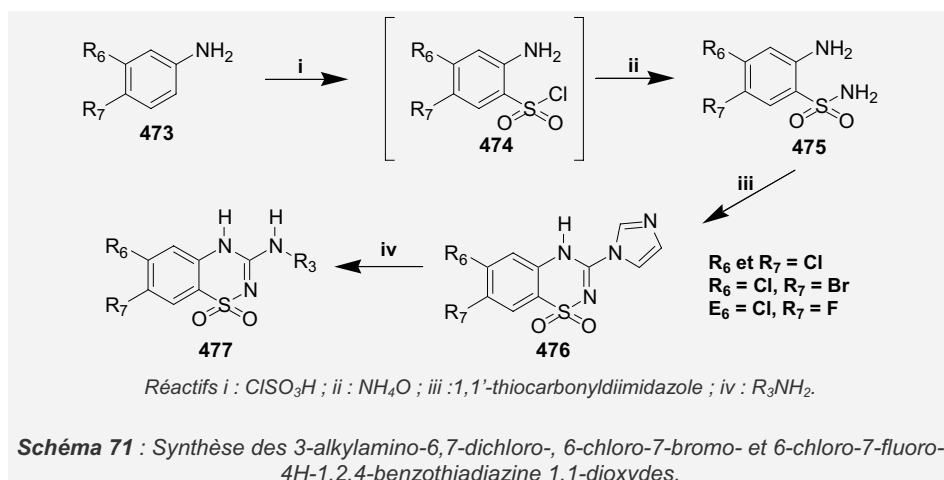
4.8.1.7. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 6 et 7 [Cf. annexe 11].

La poursuite des pharmacomodulations impliquait de manière naturelle, l'étude de l'influence des polysubstitutions du noyau aromatique sur l'activité [de Tullio et al. 2005]. Les positions 6 et 7 apparaissant comme relativement favorables, de même que les halogènes de petits poids moléculaires (Cl, F) et certains groupements électrodonneurs (i.e. méthoxy), c'est autour de ces éléments que nous avons envisagé cette étude.

Deux voies de synthèse ont été utilisées pour ces dérivés, la première passe par un intermédiaire aminobenzènesulfonamide et la seconde par un intermédiaire de type 3-oxo.

Les 3-alkylamino-6,7-dichloro- 6-chloro-7-bromo- et 6-chloro-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Dans ces trois séries, le schéma réactionnel est le même (Schéma 71) ; il débute par la chlorosulfonation du noyau aromatique des anilines appropriées, suivi d'une réaction entre le chlorure de sulfonyle formé et l'ammoniaque. Les aminobenzènesulfonamides sont alors cyclisés au 1,1'-thiocarbonyldiimidazole pour donner les intermédiaires réactionnels attendus (**476**). L'action d'alkylamines appropriées achève le schéma.

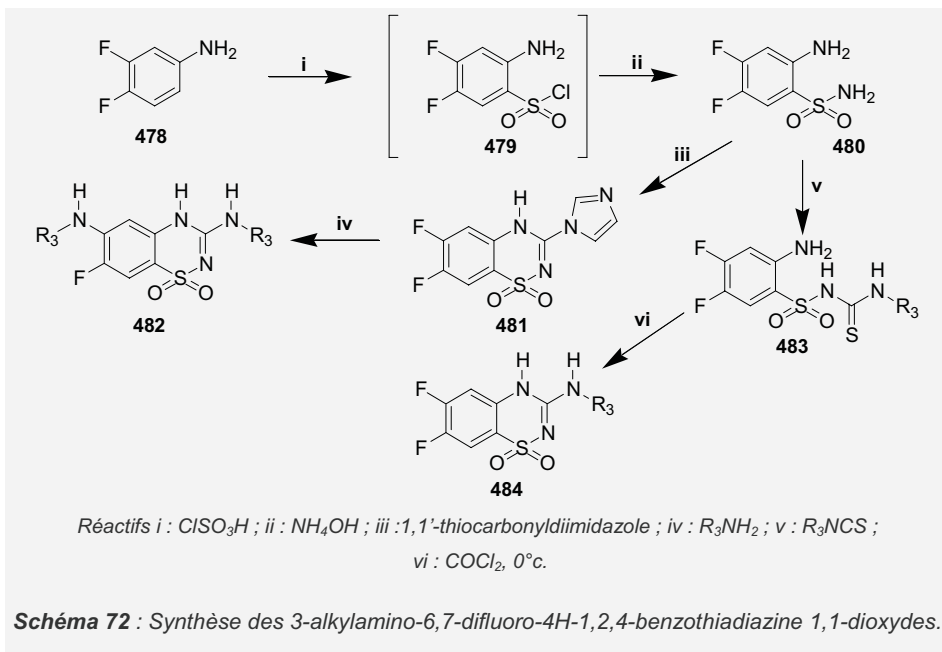


Les 3-alkylamino-6,7-difluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Le même schéma réactionnel que précédemment a bien entendu été envisagé pour cette série. L'obtention du dérivé 3-imidazolé (**481**, Schéma 72) se passe sans grande difficulté, exception faite de la plus grande solubilité aqueuse de ces composés qui rend plus délicat leur isolement.

Cependant lorsque cet intermédiaire 3-imidazolé est mis en réaction avec une amine dans les conditions classiques, à savoir chauffage à 150°C en autoclave, il se

produit majoritairement une disubstitution non désirée en position 3 et en position 6 (**482**). Il apparaît en effet que le fluor en position 6 est beaucoup plus labile qu'attendu.

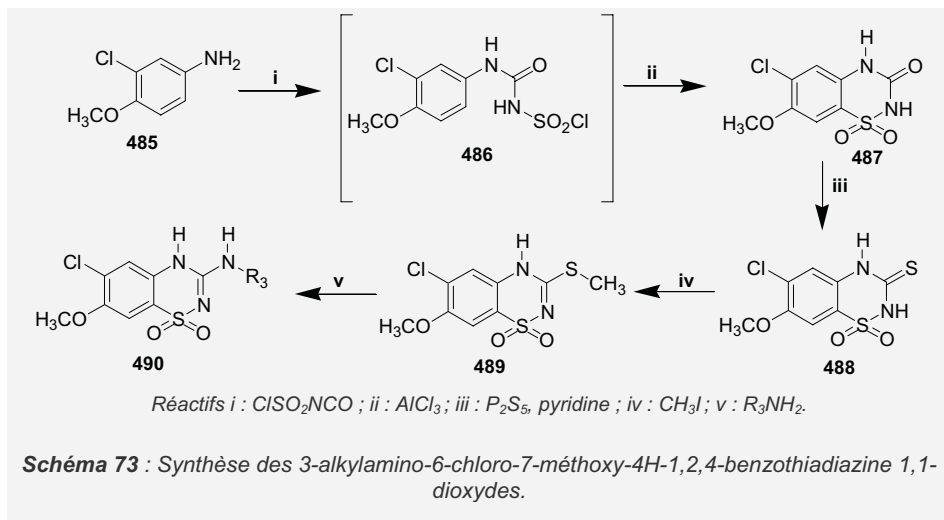


Pour pallier cette réaction secondaire, nous avons alors envisagé, comme nous l'avons fait en série 7-méthylsulfanyle, l'emploi d'isothiocyanate comme agent de cyclisation du 2-amino-4,5-difluorobenzènesulfonamide (**480**). La sulfonylthiourée ainsi obtenue (**483**) est cyclisée par action de phosgène à basse température.

Les 3-alkylamino-6-chloro-7-méthoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Il n'y a aucune difficulté majeure à l'obtention de ces composés si ce n'est la même remarque que dans les séries 7-méthoxy et 7-éthoxy concernant l'utilisation d'acide de Lewis et la possible déalkylation de ces fonctions éthers. En effet, lors de la première étape et de la réaction à l'isocyanate de chlorosulfonyle sur la 3-chloro-4-méthoxyaniline (**485**, Schéma 73), l'ajout d' AlCl_3 peut se révéler néfaste et diminuer sensiblement les rendements si la durée et la température de chauffe ne sont pas scrupuleusement contrôlées. Le reste du schéma est classique avec passage du 3-

oxo (**487**) au 3-thioxo (**488**), méthylation du soufre (**489**) et substitution du groupement 3-méthylsulfonyl avec différentes amines.

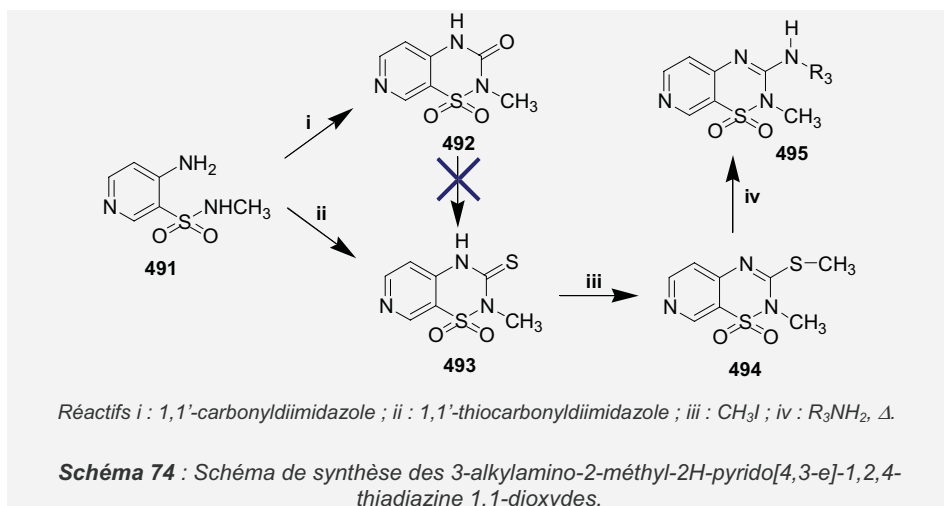


4.8.1.8. Les 2-alkyl-3-alkylamino en séries benzénique et pyridinique [Cf. annexe 1 et annexe 5].

Une petite série de 2-méthyl-3-alkylamino-7-chloro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes et de 2-méthyl-3-alkylamino-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes a également été synthétisée afin d'analyser l'impact que pourrait avoir la tautomérie 2H sur l'activité [Ouedraogo et al. 2002].

En ce qui concerne les composés pyridiniques méthylés en position 2, l'accès en synthèse s'est révélé plus complexe que pour leurs homologues non alkylés dans cette position. Rapidement, il s'est avéré que le schéma classique ne pouvait être utilisé dans ce cas de figure car le N-méthyl-4-aminopyridine-3-sulfonamide (**491**, Schéma 74) ne cyclise ni en présence d'urée, ni de thiourée. Il est cependant possible d'obtenir le composé 3-oxo (**492**) par action du 1,1'-carbonyldiimidazole selon une réaction décrite pour les 2-alkyl-3-oxo-2,3-dihydro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes dans un brevet de 1988 [Eur. Patent, 1988]. Malheureusement, les diverses tentatives de transformation de la fonction oxo en thioxo n'ont pas abouti. Nous avons alors eu l'idée de remplacer le 1,1'-carbonyldiimidazole par le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole dans l'espoir d'obtenir directement le composé thioxo (**493**)

[de Tullio et al. 1998]. Cette stratégie s'est révélée être la bonne puisque cet intermédiaire a bien été obtenu dans ces conditions. Ce résultat est en adéquation avec ceux générés à la même époque par une équipe américaine qui a également utilisé le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole comme agent de cyclisation d'o-alkylaminobenzènesulfonamides [Weller et al. 1992]. L'action subséquente d'iodure de méthyle sur le composé 3-thioxo permet d'aboutir au composé 3-méthylsulfanylé (**494**) qui subit une substitution nucléophile de la part de diverses alkylamines. Comme nous l'avons constaté pour le dérivé 4-méthyl-3-méthylsulfanylé, son homologue 2-méthylé (**494**) est beaucoup plus réactionnel que l'intermédiaire non méthylé (**398**, Schéma 57).



Le schéma utilisé dans le cas des composés benzéniques est similaire à celui de leurs isostères pyridiniques et est donc différent de celui employé pour la série 7-chloro non substituée. Le produit de départ est la 4-chloro-2-nitroaniline (**496**, Schéma 75). Il subit une diazotation puis réagit dans les conditions de Sandmeyer-Meerwein pour donner le chlorure de 2-nitro-5-chlorobenzènesulfonyle (**498**).

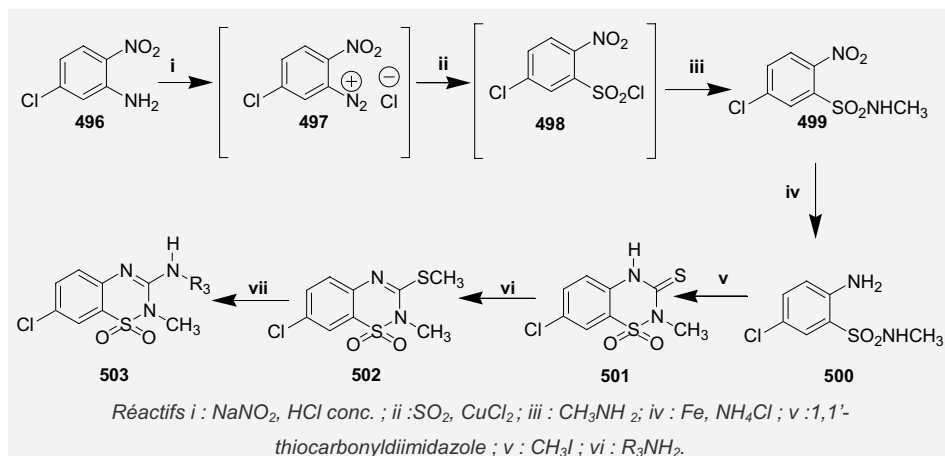


Schéma 75 : Synthèse des 2-méthyl-3-alkylamino-7-chloro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

La mise en réaction de cet intermédiaire avec une solution aqueuse de méthylamine permet de former le *N*-méthylsulfonamide (**499**). La réduction subséquente du nitro en position 2 au fer en présence de chlorure ammonique nous amène à l'*o*-aminobenzènesulfonamide (**500**). L'utilisation de 1,1'-thiocarbonyldiimidazole sur ce composé donne, comme cela avait été constaté en série pyridinique, le dérivé 3-thioxo (**501**). Le reste du schéma est déjà connu avec une étape de S-méthylation et une étape de réaction avec différentes amines. Cette dernière nécessite cependant le respect de quelques précautions puisqu'un chauffage modéré du milieu réactionnel est requis afin d'éviter l'apparition de très nombreux produits secondaires. D'une manière générale, la purification des composés méthylés en position 2 semble plus délicate et compliquée.

Ouvrons ici une parenthèse mécanistique pour tenter d'expliquer les différences de réactivité constatées entre les aminosulfonamides et le 1,1-thiocarbonyldiimidazole.

Ainsi que nous l'avons démontré dans une étude réalisée à la fois en série benzénique et pyridinique, tous les *o*-aminosulfonamides non substitués en position 2 réagissent de la même manière avec le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole et fournissent majoritairement, en l'absence de base, les composés 3-imidazolés [de Tullio et al. 1998].

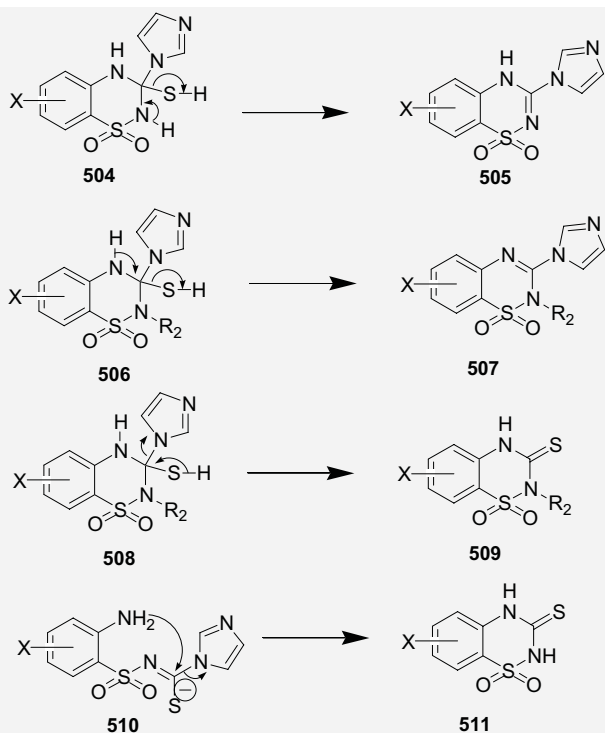


Schéma 76 : Mécanismes réactionnels potentiels de cyclisation au 1,1'-thiocarbonyldiimidazole.

Par contre, selon la nature du substituant en position 2, il est possible d'obtenir dans les mêmes conditions de réaction, soit le composé 3-thioxo, soit le composé 3-imidazolé. La présence de base dans le milieu tel que le carbonate de césium aboutit, dans tous les cas, à l'obtention du seul composé 3-thioxo. Cette différence de réactivité pourrait s'expliquer par la formation d'intermédiaires cycliques tétrahédriques (**504**, **506** et **508**, Schéma 76). Ces intermédiaires permettraient d'aboutir aux composés finis par perte du proton le plus labile (N-H ou S-H). Dans le cas de départ préférentiel du proton S-H , le groupement imidazole deviendrait le groupement partant et le composé 3-thioxo (**509**) serait ainsi obtenu. Cependant, si le proton N-H est le plus acide, le second groupe partant devient celui qui est le moins basique à savoir la partie S-H et la réaction conduit aux composés 3-imidazolés (**505** et **507**) par perte de H_2S . La labilité des différents protons des intermédiaires **504**, **506** et **508** serait probablement influencée par les substituants tant au niveau du noyau aromatique que

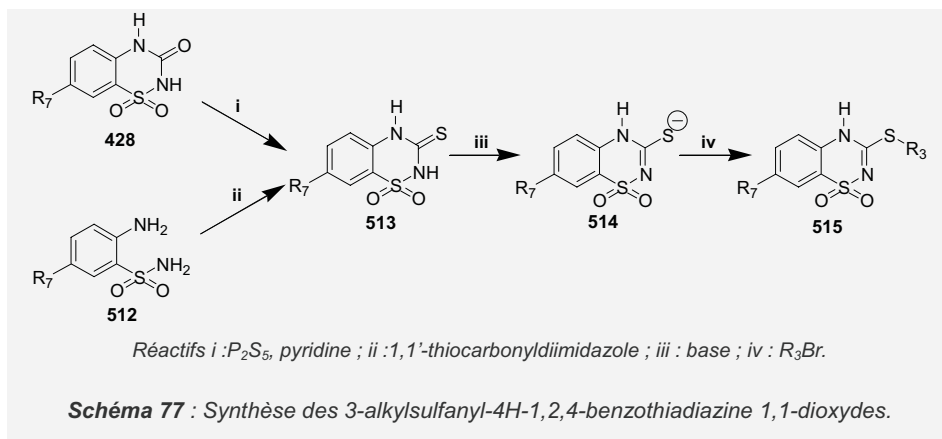
de la partie thiadiazine. Dans la majorité des cas, le proton N-H apparaît comme étant le plus labile.

L'utilisation de carbonate de césium change probablement la donne. En permettant la déprotonation, même partielle, de la fonction sulfonamide, cette base entraînerait dans un premier temps la formation d'un intermédiaire ouvert (**510**, Schéma 76). Cette « sulfonylthiourée » est probablement ionisée sous l'action de la base et l'étape de cyclisation ne peut alors s'effectuer que par départ du groupement imidazole.

4.8.1.9. Les 3-alkylsulfanyl- ou aralkylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Toujours dans l'optique d'étudier l'impact des différentes substitutions du noyau benzothiadiazine sur l'activité agoniste des canaux K_{ATP} , le remplacement de l'atome d'azote exocyclique par un atome de soufre a également été envisagé. La présence d'une fonction alkylsulfanyle ou aralkylsulfanyle en position 3 permettra de juger de l'importance d'un atome d'azote et de son hydrogène.

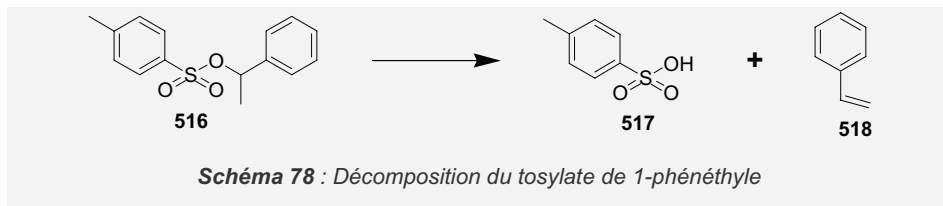
La synthèse de ces composés apparaît comme relativement simple à partir du moment où l'intermédiaire 3-thioxo est disponible. En effet, l'utilisation d'un agent alkylant (souvent un halogénure d'alkyle ou d'aralkyle) permet d'aboutir aisément, dans la plupart des cas, aux dérivés 3-alkylsulfanyles ou aralkylsulfanyles. Dans le cas où l'agent alkylant est un dérivé halogéné (souvent un bromure ou un iodure d'alkyle), la réaction est de type S_N2 . Ce mécanisme concerté fait intervenir un seul état de transition déterminant. L'attaque du nucléophile sur le réactif se fait sur la face opposée à celle porteuse du groupement nucléofuge et entraîne donc une inversion de configuration du carbone électrophile (inversion de Walden). L'état de transition comporte un carbone pentacoordonné de géométrie triangulaire bipyramidale. La cinétique de la réaction est fortement influencée par l'encombrement stérique de l'agent alkylant, par la présence d'une charge négative sur le nucléophile, par l'utilisation d'un solvant polaire aprotique et bien évidemment par la nature du nucléofuge.



Plusieurs composés ont donc été synthétisés par la mise en réaction d'un bromure d'alkyle sur la forme déprotonée des intermédiaires 3-thioxo (**514**, Schéma 77) en milieu polaire aprotique. Les dérivés 3-thioxo (**513**) sont, quant à eux, obtenus, soit par action de pentasulfure de phosphore sur le composé 3-oxo (**428**), soit par cyclisation des *o*-aminobenzènesulfonamides (**512**) au moyen de 1,1'-thiocarbonyldiimidazole en présence de carbonate de césium selon les conditions décrites par Weller [Weller et al. 1992].

Malgré les bons résultats obtenus, il n'a pas été possible de greffer des groupements très encombrés tels que le groupement *tert*-butyle sur l'atome de soufre exocyclique. L'utilisation d'autres agents alkylants tels que les tosylates par exemple a été également tentée sans que cela ne semble résoudre les problèmes d'encombrements stériques. L'utilisation de ces dérivés sous forme d'alcool pourrait cependant se révéler utile au cas où le composé halogéné serait difficilement accessible. Par exemple, la formation de dérivés halogénés sur un carbone stéréogénique entraîne généralement la racémisation de ce centre optique. De ce fait, il est difficile d'envisager une synthèse stéréosélective de composés 3-alkylsulfanylés ou aralkylsulfanylés optiquement purs. La formation de tosylates d'alcools optiquement purs ne devrait pas poser ce type de problème. Nous avons donc tenté de préparer les tosylates de phénétyle par action de chlorure de tosyloxyde sur le 1-phényléthanol. Malheureusement, aucune de nos tentatives n'a donné de bons résultats. Cela est probablement dû à l'instabilité relative des tosylates d'alcools secondaires [Hoffmann 1965a et 1965b]. Il semble en effet que les tosylates secondaires puissent se

décomposer en donnant, d'une part l'oléfine correspondante (**518**, Schéma 78), et d'autre part, l'acide *p*-toluènesulfonique (**517**).



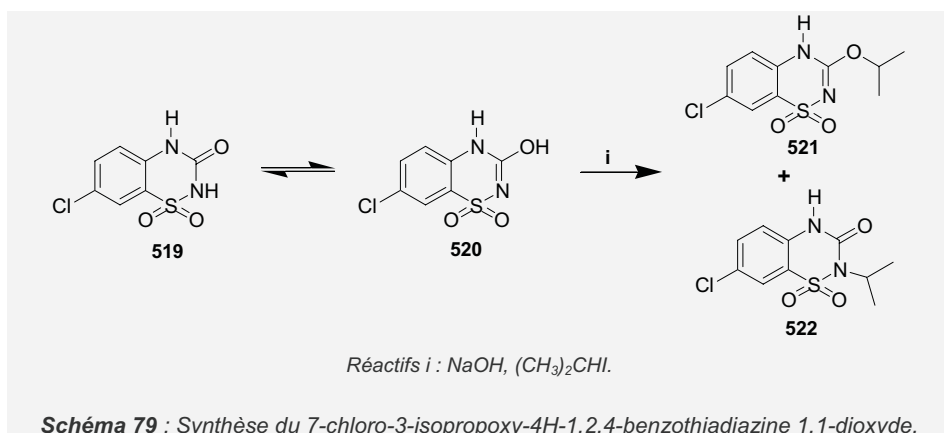
La réaction de Mitsunobu nous est également apparue comme une alternative intéressante. En effet, cette réaction permet l'utilisation d'alcools comme agents alkylants en présence de triphénylphosphine et d'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD). Cette technique ayant déjà été décrite pour l'alkylation des thiourées [Nagasawa et al. 1981, Mitsunobu 1991], il nous est apparu intéressant de tenter de l'appliquer aux dérivés 3-thioxo en utilisant l'alcool *tert*-butylique. Malheureusement, encore une fois, nous n'avons pas pu, par cette voie, obtenir les composés 3-alkylsulfanylés espérés.

4.8.1.10. Les 3-alkoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Pour les mêmes raisons pharmacochimiques que nous avons d'évaluer l'impact du remplacement de l'atome d'azote exocyclique de nos composés leaders par un atome de soufre, l'idée de placer un atome d'oxygène était également intéressante. Cependant, l'alkylation des sulfonylurées sur l'atome d'oxygène est loin d'être aussi simple qu'elle ne l'est en série sulfonylthiourée. En effet, la littérature montre clairement que dans le cas qui nous intéresse, la position 2 est logiquement la plus réactionnelle et c'est elle qui est donc majoritairement substituée. Dans le cas où les conditions réactionnelles sont forcées, il est possible d'alkyler l'oxygène exocyclique mais cela est souvent accompagné d'une alkylation dans d'autres positions. Il semble cependant que lorsque l'agent alkylant est encombré, une certaine proportion de dérivés 3-alkoxy se forme à côté du composé 2-alkylé. Les propriétés acido-basiques de ces deux dérivés étant différentes, il est possible par une action sur le pH de la solution de les séparer. En effet, l'alkylation en position 2 du cycle thiadiazine entraîne la disparition de tout proton labile sur l'hétérocycle et rend le

composé non ionisable. A l'inverse, l'alkylation en position 3 laisse sur la molécule un azote ionisable et sous l'effet d'une base, le dérivé s'ionise et se solubilise dans l'eau.

Par cette méthode, le 7-chloro-3-isopropoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**521**, Schéma 79), qui est l'analogue strict du BPDZ 73 (un de nos activateurs des canaux K_{ATP} de référence), a pu être synthétisé.



4.8.2. Paramètres physico-chimiques des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

La détermination de certains paramètres physico-chimiques tels que la constante d'ionisation (pKa) et le logarithme du coefficient de partage (log P) est importante dans l'optique du développement futur d'une drogue ou d'une série de drogue. En effet, la connaissance du degré d'ionisation au pH physiologique et du caractère lipophile des composés doit permettre d'une part de mieux appréhender l'analyse des résultats pharmacologiques *in vitro* et l'étude des relations structure-activité (aspect pharmacodynamique) et d'autre part d'avoir une première approche de l'aspect pharmacocinétique. En effet, certaines valeurs de ces deux paramètres physico-chimiques peuvent se révéler difficilement compatibles avec diverses applications *in vivo*. La détermination précoce de ces incompatibilités éventuelles et de l'effet de ces paramètres sur les caractéristiques ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) et leur intégration dans le processus de « drug design » apparaît comme essentielle dans tout programme visant à découvrir de nouvelles

drogues. Pour un certain nombre de composés, les valeurs de pKa et de log P ont été déterminées.

4.8.2.1. Détermination des pKa.

La plupart des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes synthétisés dans le cadre de ces recherches possèdent un proton échangeable en position 4. L'acidité de ce proton a été déterminée pour une série de composés 3-isopropylamino et diversement substitués sur le noyau benzénique. Deux méthodes principales sont utilisables : la titrimétrie et la spectrophotométrie UV.

La première méthode, utilisée surtout en série pyridinique est une méthode titrimétrique en retour et plus spécifiquement de pHmétrie. Les produits sont, dans ce cas-ci, mis en solution sous forme de sel sodique afin d'en augmenter la solubilité en milieu aqueux et titrés en retour au moyen d'acide perchlorique. Des valeurs de pKa apparents sont ainsi obtenues. Elles correspondent au pH mesuré au moment de la demi-neutralisation. Pour connaître le pH vrai, ce pKa apparent doit être corrigé en tenant compte de la variation de la force ionique du milieu lors de l'addition du réactif titrant. Bien que le composé à titrer soit sous une forme ionisée et donc en principe plus soluble, la concentration de sel sodique en solution doit néanmoins être voisine du mM, ce qui est souvent difficile à réaliser avec des molécules de la classe des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes. De plus, il convient de vérifier, lors de l'adjonction de l'acide perchlorique, que la forme neutralisée ne précipite pas avant le point de non-équivalence. De ce fait, cette technique a été peu utilisée dans notre cas.

L'utilisation de la spectrophotométrie UV permet partiellement de résoudre le problème de solubilité puisque cette méthode, basée sur la comparaison de densité optique, est plus sensible et permet de travailler, suivant le chromophore présent, à des concentrations proches du μM . Pour un acide, la connaissance du rapport des densités optiques des différentes espèces en solution à un pH connu permet de calculer le pKa [Albert et Serjeant, 1971]. Cette technique n'est bien sûr applicable que s'il existe une longueur d'onde où les densités optiques des formes chargée et neutre sont suffisamment différentes. Par ailleurs, il doit exister, en solution, un équilibre entre la forme chargée et la forme neutre se traduisant par l'obtention d'au minimum deux points de recoupement invariables quelque soit le pH et appelés points

isosbestiques. Comme le montre la figure 55, les benzothiadiazine 1,1-dioxydes possèdent un profil tout à fait adapté à la détermination de leur constante d'acidité par cette technique. La méthodologie employée dans le cas des dérivés benzéniques est identique à celle décrite pour leurs homologues pyridiniques [de Tullio et al. 1995a et 1995b, Somers 2001].

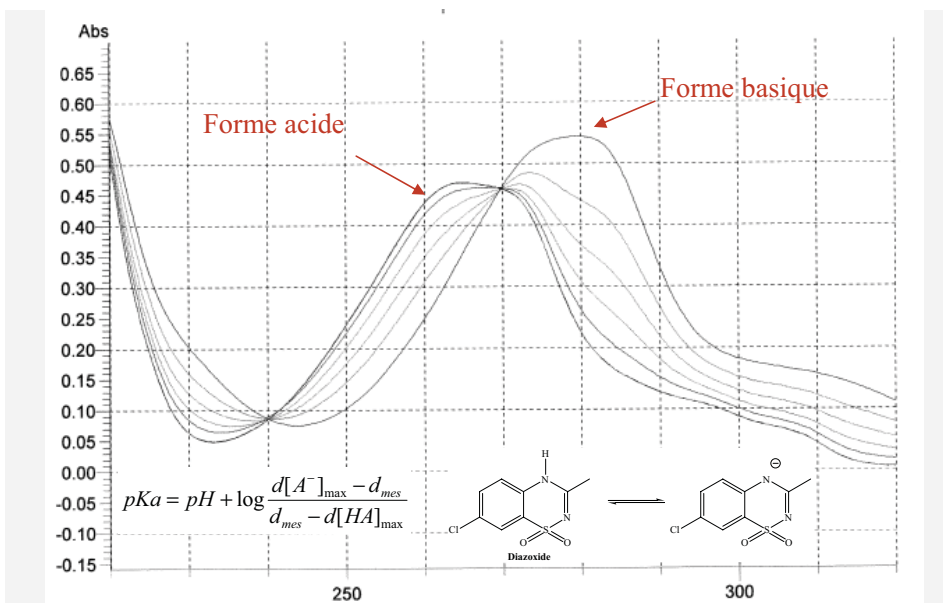
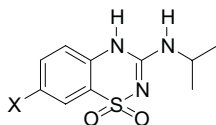


Figure 55 : Superposition des spectres UV du diazoxide à différents pH.

Le tableau 1 reprend les valeurs de pKa mesurées pour différents 3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7.

L'analyse des résultats montre que, tout comme cela avait été relevé en série pyridothiadiazine, le remplacement d'un groupement alkyle en position 3 par un groupement alkylamino (isopropylamino dans ce cas) entraîne, dans la plupart des cas, une augmentation sensible des valeurs de pKa (comparaison diazoxide et composé **525**) et donc une diminution du caractère acide de ces composés.

Tableau 1 : Valeurs de pKa, pourcentage d'ionisation au pH physiologique et valeurs des coefficients de partage relatifs (log P') de différents 3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7.



Droque	X	pKa ^a	% d'ionisation ^b	Log P' ± SEM (n)
523	H	9.98	< 1	0.86 ± 0.00 (6)
524	F	9.63	< 1	-
525 (BPDZ 73)	Cl	9.51	< 1	> 1.8 ^c
526	Br	9.41	< 1	-
527	I	9.28	1.3	-
528	NO ₂	7.91	23.6	1.16 ± 0.01 (5)
529	NH ₂	10.49	<1	0.06 ± 0.01 (5)
530	NHCOCH ₃	9.80	< 1	-
531	OCH ₃	10.11	< 1	1.27 ± 0.01 (6)
532	CH ₃	10.21	< 1	1.41 ± 0.00 (6)
533	CF ₃	8.96	2.7	> 1.8 ^c
534	CN	8.56	6.5	0.93 ± 0.00 (5)
Diazoxide	-	8.62	5.7	1.21

^a: déterminé par spectrophotométrie UV, ^b: pourcentage d'ionisation à pH 7.4 ^c: valeur approximative.

La nature du substituant présent en position 7 influence aussi de manière importante l'acidité du proton labile. En effet, si en prenant comme valeur de référence le pKa du composé non substitué sur le noyau aromatique, il apparaît que l'introduction de groupements faiblement électroattracteurs tels que les halogènes entraîne une diminution de la valeur du pKa, cette tendance s'amplifie avec l'augmentation du caractère attracteur du substituant (NO₂, CF₃, ...). A l'inverse, la présence de groupements électrodonneurs (i.e. **529**, **531**, **532**) engendre une diminution de la labilité du proton en position 4. S'il semble qu'à la fois les effets I et E interviennent, compte tenu de la distance entre le proton labile et le groupement substituant, c'est principalement les effets électromères qui influencent le pKa des composés. D'une manière générale, il est possible de conclure qu'exception faite du

dérivé 7-nitro (528), la plupart des drogues de cette série ne sont que très faiblement ionisées au pH physiologique. Ces résultats sont tout à fait en adéquation avec ce que nous espérons puisqu'il semble qu'une forme neutre soit requise pour interagir avec les sites récepteurs des canaux K_{ATP} .

L'examen des spectres RMN du proton de l'ensemble des composés étudiés pris dans le $DMSO-d_6$ et plus spécifiquement des valeurs de déplacement chimique du proton en position 4 nous a par ailleurs permis d'établir une corrélation intéressante entre ce déplacement et la labilité de ce proton, exprimée sous forme de valeurs de pKa (illustré par la figure 56). Cette relation peut apparaître comme évidente mais demandait à être vérifiée de manière expérimentale. La série examinée est relativement homogène ce qui explique sans doute le bon coefficient de régression linéaire obtenu.

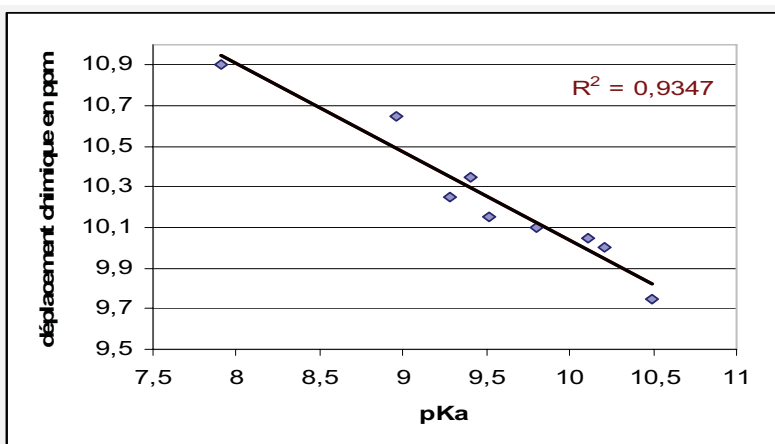


Figure 56 : corrélation entre les valeurs de pKa et les valeurs de déplacement chimique du proton en position 4 de différents 3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7.

Des études complémentaires pourraient être envisagées de manière à vérifier la corrélation entre le ou les déplacements chimiques du ou des protons labiles et le pKa de ces protons dans des séries chimiques différentes. L'influence de la concentration, du solvant et de la quantité d'eau qui y est contenue pourrait également être examinée. La RMN du proton pourrait donc s'avérer très utile dans certains cas

pour l'évaluation des constantes d'ionisation de composés à potentialités thérapeutiques peu solubles en milieu aqueux.

4.8.2.2. Détermination des logarithmes du coefficient de partage (Log P).

La lipophilie est également un paramètre physico-chimique extrêmement important pour la distribution des drogues au niveau des différents systèmes tissulaires et principalement pour leur passage de la barrière hémato-encéphalique. En effet, à l'exception des mécanismes de transport actif, le passage de cette barrière par de petites molécules semble conditionné par leur degré de lipophilie et corrélé favorablement à ce paramètre [Unger et al. 1985, Audus et al. 1992]. Par ailleurs, plusieurs études semblent démontrer que des molécules trop ou trop peu lipophiles aient peu de chance de devenir un jour des médicaments [Ghose et al. 1999, Lipinski et al. 2001]. La lipophilie est généralement exprimée par le coefficient de partage (P), souvent présenté sous forme de logarithme (log P) [Golstein et al. 1986]. Le log P est défini comme étant le logarithme du rapport de la distribution des concentrations, après agitation et à l'équilibre, d'une substance entre une phase organique peu polaire (*n*-octanol, CHCl_3 , cyclohexane, huile, ...) et une phase aqueuse éventuellement tamponnée. Plus la valeur du log P est élevée, plus la molécule est considérée comme lipophile, des valeurs négatives sont représentatives de molécules plus hydrophiles. Le log P ne tient en principe pas compte des éventuelles propriétés acido-basiques des drogues et de leur capacité à être partiellement ou totalement ionisées à certains pH et plus spécifiquement au pH physiologique. C'est pourquoi, cette valeur est généralement remplacée par le log P' ou log D (aussi appelé log P apparent) qui tient compte de l'ensemble des espèces ionisées ou non et est plus représentatif de la situation à pH 7.4. Il existe deux grandes méthodes expérimentales pour la détermination de ce log P' : la méthode dite statique ou « shake flask method » et la méthode dynamique.

La méthode statique est la plus ancienne et consiste en l'analyse de la distribution d'un composé entre un tampon aqueux de pH 7.4 et une solution de *n*-octanol, les deux solutions ayant été préalablement saturées en drogues. Après agitation et centrifugation, la concentration en drogue dans les deux phases est généralement déterminée par spectrophotométrie UV. La limitation de cette méthode est sa relative « lourdeur » de mise en oeuvre et la difficulté de mesurer avec précision

des valeurs de log P' supérieures à 1.8-1.9. En effet, dans ce cas, les concentrations en drogue dans la phase aqueuse sont très faibles et souvent à la limite de quantification de l'appareillage de spectrophotométrie UV dont nous disposons. Cette technique a cependant pu être appliquée avec succès aux pyridothiadiazine 1,1-dioxydes [de Tullio et al. 1995a] et n'a pas posé de problèmes pour certains de leurs homologues benzéniques [Somers et al. 2001].

La méthode dynamique est, quant à elle, beaucoup plus récente et plus rapide. Elle utilise la technique HPLC et est basée sur la relation existant entre la lipophilie et le temps de rétention (ou le facteur de capacité k') mesuré en général en phase inverse dans un système chromatographique utilisant une phase mobile tamponnée à pH 7.4 et une phase stationnaire qui peut être une silice greffée de type C8, C18 ou autres. Mc Call a défini que cette relation prenait en général la forme d'une équation linéaire $\log P' = a \log k' + b$ régie par deux constantes [Mc Call 1975]. Le problème de cette méthode vient de la nécessaire détermination de ces constantes qui ne peut se faire que si au moins trois valeurs connues de log P' de substances prises comme référence peuvent être mises en relation linéaire avec leur facteur de capacité. De plus, cette relation linéaire est fortement sensible aux variations structurales et donc son champ d'application est limité. Il apparaît donc nécessaire de mesurer par la méthode statique plusieurs coefficients de partage dans une série homogène de composés afin d'étalonner en quelque sorte et de valider la méthode HPLC. Dans le cas qui nous importe, cette méthode ne sera pas utilisée.

Une série de dérivés 3-isopropylamino diversement substitués en position 7 a été étudiée par la méthode statique. L'analyse rapide des résultats de cette étude présentés dans le tableau 1 montre que la plupart des composés possèdent des valeurs de log P' tout à fait compatibles avec leur visées périphériques. La présence d'halogène en position 7, soit sous forme d'un atome de chlore (**525**) soit d'un groupement trifluorométhyle (**533**) permet même d'atteindre des valeurs proches de 2.0, qui représenterait la valeur optimale pour les drogues destinées à passer la barrière hémato-encéphalique. Par rapport à un dérivé non substitué sur le noyau benzénique (**523**), la plupart des groupements introduits en position 7, qu'ils soient électrodonneurs ou attracteurs augmentent la lipophilie. Pour les groupements nitro et cyano, cette constatation semble en contradiction avec les valeurs tabulées de Π de Hansch qui prêtent à ces groupements un impact plutôt hydrophile sur les molécules. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les valeurs tabulées par Hansch

l'ont été à partir de molécules très simples alors que, dans notre cas, nous nous intéressons à l'impact d'un substituant sur la lipophilie de composés plus complexes. Le groupement amino (**529**) est le seul à présenter un comportement différent puisqu'à l'équilibre, il est réparti de manière quasiment identique entre la phase aqueuse et la phase organique. En fonction des résultats pharmacologiques obtenus et des potentialités de développements de certains composés, il conviendra éventuellement d'en déterminer la lipophilie et d'étudier l'influence de la nature de la chaîne latérale en position 3 sur le coefficient de partage.

4.8.3. Evaluation pharmacologique

Nous ne présenterons ici que les résultats ayant permis d'établir le profil pharmacologique des composés synthétisés, en d'autres termes du screening général donnant accès à des informations importantes au niveau de la détermination des relations structure-activité. Ces informations ont été utilisées pour entreprendre nos pharmacomodulations et proposer différents pharmacophores. Pour les résultats pharmacologiques sur des modèles plus évolués permettant l'étude mécanistique de l'action des meilleurs composés, nous ferons référence aux articles scientifiques qui ont été publiés sur ce sujet.

Afin d'évaluer non seulement l'activité sur les canaux potassiques mais également la sélectivité tissulaire, deux modèles pharmacologiques *in vitro* développés par le laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique de l'Université Libre de Bruxelles ont été utilisés : les cellules B pancréatiques et l'aorte de rat. Deux activateurs de référence, le diazoxide et le pinacidil, sont utilisés comme point de comparaison dans les tests pharmacologiques.

Le modèle pancréatique

Les cellules B (ou β) pancréatiques constituent un modèle de tissu endocrinien où l'effet des drogues sur la sécrétion statique d'insuline est évalué. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP des cellules B du pancréas a pour conséquence d'inhiber la sécrétion d'insuline induite par une augmentation du taux de glucose. Même si le mécanisme d'action exact ne

peut être défini sur ce seul modèle, cette diminution de la sécrétion d'insuline peut être comprise comme un effet des drogues sur les canaux de type Kir6.2/SUR1.

Les expériences sont menées sur îlots de Langerhans isolés de rat, placés en incubation dans un milieu contenant une concentration insulinothèque de glucose (16.7 mmol/l) et en présence des drogues à évaluer à une concentration donnée. L'insuline sécrétée dans le milieu extracellulaire est dosée par mesures radioimmunologiques. Une fraction du liquide d'incubation est prélevée, additionnée d'insuline radiomarquée, de sérum anti-insulinique de cobaye et, 72 heures plus tard, de charbon-dextran. Au cours de la réaction, l'insuline froide sécrétée, ainsi qu'une partie de l'insuline chaude vont se lier au sérum anti-insulinique. L'excès d'insuline radioactive va, quant à elle, se fixer au charbon-dextran. Ce charbon est isolé par centrifugation et la radioactivité qu'il émet est mesurée. Il est ainsi possible de déduire la quantité d'insuline marquée qui s'y est fixée. Connaissant la quantité de sérum anti-insulinique et la quantité d'insuline chaude, il est dès lors aisé, en se référant à des courbes standards, de quantifier l'insuline excrétée par les cellules en présence des drogues à évaluer. En comparant ces quantités par rapport à celles produites en l'absence de drogue, les pourcentages résiduels d'insuline sont obtenus. Une valeur proche de 100 % indique que le composé n'a aucun effet sur les cellules excrétrices tandis qu'une valeur entre 5 et 10% indique un effet maximal car il existe une sécrétion basale d'insuline non sensible au glucose.

Les pourcentages ont été mesurés pour des concentrations en drogues de 10 μ M et parfois de 50 ou de 1 μ M.

Pour les composés les plus actifs, des valeurs d'IC₅₀, qui correspondent à la concentration en drogue induisant une diminution de 50 % de la sécrétion en insuline, ont également été déterminées graphiquement.

Le modèle d'aorte de rat

La fibre musculaire lisse vasculaire est une autre cible importante des activateurs des canaux K_{ATP}. Les canaux K_{ATP} de ce tissu sont composés, en majeure partie, de sous-unités de sous-type SUR2B associées à la sous-unité Kir6.2 ou Kir6.1. Leur activation engendre une relaxation des fibres musculaires. Ainsi, des anneaux d'aorte de rat sont prélevés, débarrassés de l'endothélium et placés dans un bain à organe. Ils sont contractés grâce à une solution de chlorure potassique 30 mM. Cette

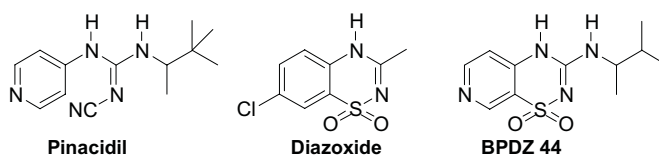
concentration provoque une contraction continue qui représente la contraction maximale. Des doses croissantes en drogue sont additionnées au milieu et la contraction résiduelle est mesurée. Une courbe dose réponse est alors établie et la concentration en drogue induisant 50% de réduction de la contraction (EC_{50}) est alors déterminée graphiquement.

4.8.3.1. Evaluation des drogues de référence.

Le pinacidil est un activateur de canaux K_{ATP} connu pour agir puissamment au niveau de la fibre musculaire lisse vasculaire. D'après la littérature, ce composé serait par contre peu actif sur les cellules B pancréatiques. Le diazoxide est, quant à lui, connu pour être aussi actif sur cellules B pancréatiques que sur fibre musculaire lisse vasculaire. Il est non « tissu-sélectif » mais a longtemps représenté la seule molécule à agir de manière importante sur la sécrétion d'insuline. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi cette molécule comme référence au niveau du test sur tissu endocrinien. Enfin, le BPDZ 44, un des composé « lead » de la série pyridinique, nous servira également à jauger la puissance et la sélectivité tissulaire des drogues que nous avons synthétisées.

Le tableau 2 présente les valeurs de sécrétion résiduelle d'insuline des drogues choisies comme références à différentes concentrations, ainsi que la valeur d' IC_{50} pour le diazoxide et le BPDZ 44 [de Tullio et al. 1996 et 2003].

Tableau 2 : Effets du diazoxide, du pinacidil et du BPDZ 44 sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat.



Drogue	% résiduel à 500 μM^a	% résiduel à 50 μM^a	% résiduel à 10 μM^a	IC_{50}^b en μM
Diazoxide	8.5 $\pm$ 0.7 (21)	26.7 $\pm$ 1.6 (16)	73.9 $\pm$ 4.4 (16)	22.6
Pinacidil	22.1 $\pm$ 2.2 (19)	88.8 $\pm$ 4.5 (13)	92.1 $\pm$ 3.9 (13)	> 100
BPDZ 44	8.4 $\pm$ 0.9 (24)	8.6 $\pm$ 0.9 (23)	13.7 $\pm$ 1.2 (23)	3.6

^a Pourcentage résiduel d'insuline libérée à partir d'îlots pancréatiques de rat incubés en présence de 16.7 mM de glucose $\pm$ SEM (n). ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose.

L'analyse des résultats montre que le diazoxide possède un effet sur la sécrétion d'insuline à partir d'une concentration de 10 μM . Il a un effet maximal à 500 μM et son IC_{50} est de l'ordre de 20 μM .

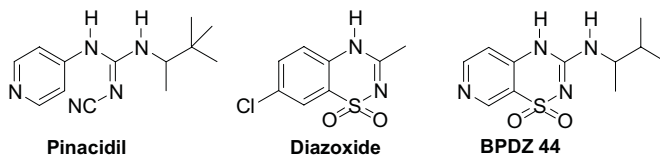
Le pinacidil, quant à lui, est pratiquement incapable d'inhiber la sécrétion d'insuline à des concentrations proches de 50 μM . Seule une concentration de 500 μM permet de visualiser l'impact de cette drogue sur la libération d'insuline. Ces résultats confirment ceux de la littérature.

Comme attendu, le BPDZ 44 est la référence la plus active sur ce modèle pharmacologique. Tenant compte de la sécrétion résiduelle d'insuline non glucose dépendante, Il montre un effet maximal jusqu'à une dose de 10 μM . Son IC_{50} est largement inférieur à celui du diazoxide.

Le tableau 3 nous montre l'effet de ces drogues de référence sur la contraction d'aorte de rat induite au KCl 30 mM.

Dans ce modèle de fibre musculaire lisse, le diazoxide montre une activité bien moindre que celle du pinacidil comme l'indique la comparaison des EC_{50} . En effet, le diazoxide montre une valeur proche de 20 μM , pratiquement 100 fois supérieure à celle mesurée pour le pinacidil. Ces constatations sont une fois encore en adéquation avec les données de la littérature. Le BPDZ 44 est cette fois le composé le moins actif. Il est largement moins puissant que le pinacidil et le diazoxide.

Tableau 3 : Effets du diazoxide, du pinacidil et du BPDZ 44 sur l'activité contractile d'aorte de rat et indice de sélectivité tissulaire $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$.



Drogue	EC_{50}^b en μM	IS $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}^c$
Diazoxide	22.4 ± 2.1 (11)	1.0
Pinacidil	0.35 ± 0.02 (11)	< 0.0035
BPDZ 44	154.4 ± 14.5 (8)	42.7

^a Pourcentage de la réponse contractile résiduelle d'aorte de rat dépolarisée par une solution de KCl 30 mM $\pm$ SEM (n). ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM. +++ = effet maximal. ^c Indice de sélectivité estimé.

A partir des valeurs d' EC_{50} et d' IC_{50} déterminées sur les deux modèles pharmacologiques, il est possible de calculer un indice de sélectivité (IS) qui permet d'estimer la sélectivité tissulaire (pancréas vs aorte) des drogues.

Une valeur > 1 est le signe d'une sélectivité favorable vis-à-vis du tissu pancréatique tandis que si la valeur est < 1 , alors l'activité est plutôt de type myorelâchant. Comme attendu, le diazoxide montre un IS de 1 et apparaît donc comme non tissu-sélectif. Par contre, le pinacidil, avec un IS bien inférieur à 1 démontre sa plus grande sélectivité pour le tissu aortique en comparaison au tissu pancréatique. Le BPDZ 44 apparaît, comme cela a été décrit, comme une molécule largement sélective du tissu pancréatique.

Le BPDZ 44, comme le laisse supposer ses valeurs sur les deux modèles pharmacologiques, exhibe une bonne sélectivité pour le tissu pancréatique.

4.8.3.2. Evaluation des 3-alkylamino-7-halogéno-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 6].

Après avoir obtenu d'excellents résultats pharmacologiques en série pyridinique, l'application des informations structurales recueillies dans ces séries aux composés benzéniques nous est apparue intéressante. Les premiers composés synthétisés en série benzénique sont ceux structuralement les plus proches des composés pyridiniques 7-aza les plus actifs, c'est à dire substitués en position 7 par un atome d'halogène et porteurs en position 3 de chaînes alkylaminées courtes et ramifiées ou cycliques de petites dimensions [de Tullio et al. 2003].

Le tableau 4 présente tout d'abord les résultats des composés 7-chloro sous forme d' IC_{50} au niveau pancréatique et d' EC_{50} au niveau vasculaire ; le rapport de ces deux valeurs permettant d'évaluer un indice de sélectivité tissulaire (pancréas vs aorte). Le diazoxide et le BPDZ 44 sont utilisés comme drogues de référence.

D'une manière générale, l'examen des résultats montre qu'au niveau pancréatique, le passage de la série pyridinique à la série 7-chlorobenzénique est un facteur plutôt favorable puisque les valeurs d' IC_{50} d'un grand nombre de composés sont inférieures à celle du composé pyridinique de référence, le BPDZ 44. C'est à nouveau les courtes chaînes plutôt ramifiées qui donnent les meilleurs résultats. Il y a cependant un décalage vers les plus petites chaînes par rapport à la série pyridinique. En effet, alors que le groupement 2,2-diméthylpropyle est le meilleur choix en série 7-

aza, ce sont plutôt les chaînes méthyle (**535**), éthyle (**536**) et isopropyle (**525**, BPDZ 73) qui sont les plus favorables en série chlorobenzénique.

L'introduction en position 3 d'un petit cycle à 3 ou 4 pièces (**545** et **546**) est plutôt favorable à l'activité. Il en est de même pour le groupe allyle (**539**). La présence d'un groupement hydroxyle sur la chaîne latérale donne des résultats assez contrastés. Ainsi, la présence d'une chaîne 2-hydroxypropylamino (**550**) entraîne une perte drastique d'activité tandis que l'isomère de position 1-hydroxy-2-propylamino (**551**) ne provoque qu'une faible diminution de l'activité en comparaison avec le BPDZ 73 (**525**).

La synthèse et l'évaluation des énantiomères de ce dérivé montrent, de manière assez surprenante, qu'il existe un net effet stéréochimique sur l'activité au niveau pancréatique puisque l'isomère *R* (**552**) est largement plus actif que le *S* (**553**). Il serait intéressant de confirmer ces résultats dans d'autres séries.

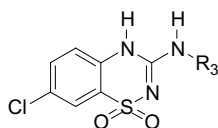
Au niveau vasculaire, les résultats sont également présentés dans le tableau 4. Il apparaît que l'augmentation d'activité relevée sur le modèle endocrinien peut être également notée sur la fibre musculaire lisse vasculaire par comparaison aux analogues pyridiniques. Exception faite de quelques composés qui possèdent en position 3 des groupements alkyles relativement encombrés (i.e. **541**, **543** et **544**), l'effet myorelâchant des drogues de cette série est souvent inférieur à celui démontré par le diazoxide.

L'analyse des indices de sélectivité (IS) permet de constater que beaucoup de composés porteurs d'une courte chaîne en position 3 (i.e. **535**, **536**, **525**, **545** et **546**) exhibent une sélectivité marquée pour le tissu pancréatique vs le tissu aortique.

Le cas du 7-chloro-3*R*-(1-hydroxy-2-propyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**552**) est intéressant car, si les résultats pharmacologiques sont confirmés, il serait parmi les composés les plus actifs de la série et montrerait une sélectivité tissulaire bien supérieure à celle des autres dérivés.

Le passage de la série 7-azapyridinique à la série 7-chlorobenzénique semble donc influencer l'activité sur les deux modèles pharmacologiques choisis tout en maintenant ou en améliorant la sélectivité tissulaire envers le tissu pancréatique.

Tableau 4 : Effets des 3-alkylamino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



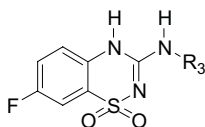
Droque	R ₃	IC ₅₀ ^a en μM	EC ₅₀ ^b en μM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
535	CH ₃	1.1	142 ± 15 (4)	129
536	CH ₂ CH ₃	0.52	39.9 ± 6.3 (4)	77
537	CH ₂ CF ₃	17.4	-	-
525	CH(CH ₃) ₂	0.7	36.3 ± 2.2 (6)	52
538	CH ₂ CH ₂ CH ₃	2.7	55.5 ± 3.8 (5)	21
539	CH ₂ CH=CH ₂	3.1	28.9 ± 5.5 (4)	9
540	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	3.1	15.5 ± 1.7 (6)	5
541	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	> 10	1.2 ± 0.2 (6)	< 0.12
542	CH(CH ₃)C(CH ₃) ₃	9.2	12.85 ± 2.07 (4)	1.4
543	C(CH ₃) ₃	> 10	1.4 ± 0.2 (4)	< 0.14
544	C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃	> 10	0.29 ± 0.05 (5)	< 0.029
545	CH(CH ₂) ₂ ^d	3.4	190 ± 19 (5)	56
546	CH(CH ₂) ₃ ^e	1.3	34.9 ± 4.4 (5)	27
547	CH ₂ CH(CH ₂) ₂ ^f	> 10	41.2 ± 12.2 (5)	< 4
548	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃	56	-	-
549	CH(C ₂ H ₅) ₂	4.5	93.6 ± 26.0 (6)	21
550	CH ₂ CH(CH ₃)OH	77.6	> 300	-
551	CH(CH ₃)CH ₂ OH	3.9	54.0 ± 11.2 (4)	13.8
552	<i>R</i> -CH(CH ₃)CH ₂ OH	0.74	188 ± 20 (6)	254
553	<i>S</i> -CH(CH ₃)CH ₂ OH	54	178 ± 42 (4)	3.3
554	(CH ₂) ₅ CH ₃	33	10.2 ± 2.8 (5)	0.31
Diazoxide	-	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1
BPDZ 44	-	3.6	154.4 ± 14.5 (8)	42.7

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclopropyle. ^e cyclobutyle. ^f cyclopropylméthyle.

Dans un premier temps, le BPDZ 73 (**525**) a été sélectionné parmi toutes les drogues afin de subir des investigations complémentaires permettant d'en définir exactement le mécanisme d'action. Comme pour le BPDZ 44 et le BPDZ 62 en série pyridinique, il a donc été démontré que le site d'action principal de ce composé est bien le canal K_{ATP} pancréatique [Lebrun P. et al. 2000].

Sur base des meilleures chaînes latérales découvertes en série 7-chloro, les analogues de ces composés en série 7-fluoro, 7-bromo et 7-iodo ont également été synthétisés et évalués (Cf. Tableaux 5 à 7).

Tableau 5 : Effets des 3-alkylamino-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Drogue	R ₃	IC ₅₀ ^a en μ M	EC ₅₀ ^b en μ M	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
555	CH ₃	2.2	> 300	> 136
556	CH ₂ CH ₃	1.0	> 300	> 300
557	CH(CH ₃) ₂	0.8	43.1 $\pm$ 10.7 (5)	54
558	CH ₂ CH ₂ CH ₃	2.0	166 $\pm$ 15 (4)	83
559	CH ₂ CH=CH ₂	2.7	> 300	> 111
560	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	1.6	39.2 $\pm$ 6.1 (4)	25
561	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	2.8	26.4 $\pm$ 4.3 (5)	9
562	CH(CH ₂) ₂ ^d	5.1	> 300	> 58
563	CH(CH ₂) ₃ ^e	1.3	71.8 $\pm$ 19.3 (9)	55
564	CH(CH ₂) ₄ ^f	1.8	58.0 $\pm$ 10.0 (5)	32
565	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃	33	-	-
566	CH(CH ₃)CH ₂ OH	3.8	> 300	> 80
Diazoxide	-	22.6	22.4 $\pm$ 2.1 (11)	1
BPDZ 44	-	3.6	154.4 $\pm$ 14.5 (8)	42.7

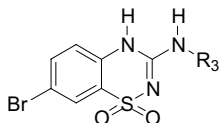
^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclopropyle. ^e cyclobutyle. ^f cyclopentyle.

Comme le montrent les résultats du tableau 5, le remplacement de l'atome de chlore par un atome de fluor semble plutôt favorable à l'activité au niveau pancréatique et défavorable au niveau vasculaire. En effet, il apparaît clairement que les composés testés inhibent de façon puissante la sécrétion d'insuline, les composés les plus actifs étant toujours ceux qui portent une courte chaîne alkyle ou cycloalkyle à 3 ou 4 pièces en position 3 (i.e. **556**, **557** et **563**). La diminution de l'activité sur fibre musculaire lisse vasculaire est un facteur qui va sensiblement influencer la sélectivité tissulaire en faveur du tissu pancréatique. Des études mécanistiques complémentaires ont également permis de démontrer que le composé **563** agissait principalement par l'activation des canaux K_{ATP} de type SUR1 [de Tullio et al. 2003].

Il est possible de conclure que, dans la recherche d'activateurs des canaux potassiques sensible à l'ATP sélectifs des cellules B du pancréas, le positionnement en 7 d'un atome de fluor sur le noyau aromatique est un élément extrêmement favorable.

Les 3-alkylamino-7-bromo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes testés sont présentés dans le tableau 6. L'activité de ces composés au niveau de l'inhibition de la sécrétion d'insuline reste tout à fait excellente et comparable à celle de leurs homologues chlorés et fluorés. Par contre, l'augmentation de la taille de l'halogène va de paire avec une augmentation de l'activité myorelâchante. En effet, la majeure partie des dérivés bromés se montrent particulièrement puissants sur le modèle aortique. Cette nette accentuation d'activité est de fait très défavorable au facteur « sélectivité tissulaire » (IS). Exception faite des composés porteurs en position 3 d'une chaîne méthylamino (**567**), cyclopropylamino (**573**) ou cyclobutylamino (**574**), qui conservent un certain indice de sélectivité favorable au tissu pancréatique, la plupart des drogues de cette série présentent plutôt un profil « diazoxide like » de non ou de faible sélectivité tissulaire.

Tableau 6 : Effets des 3-alkylamino-7-bromo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.

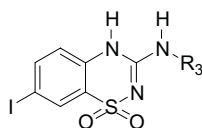


Drogue	R ₃	IC ₅₀ ^a en μM	EC ₅₀ ^b en μM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
567	CH ₃	1.8	31.0 ± 4.6 (4)	17
568	CH ₂ CH ₃	< 1.0	6.2 ± 0.4 (5)	> 6
569	CH(CH ₃) ₂	0.5	4.8 ± 0.7 (5)	9.6
570	CH ₂ CH=CH ₂	2.8	3.0 ± 0.4 (4)	1.1
571	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	4.0	5.6 ± 0.8 (6)	1.4
572	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	> 10	2.6 ± 0.8 (4)	< 0.26
573	CH(CH ₂) ₂ ^d	3.1	89.4 ± 13.1 (5)	29
574	CH(CH ₂) ₃ ^e	1.1	21.7 ± 4.3 (4)	20
Diazoxide	-	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1
BPDZ 44	-	3.6	154.4 ± 14.5 (8)	42.7

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclopropyle. ^e cyclobutyle.

L'iode est, quant à lui, un atome relativement volumineux. De plus, sa présence provoque un important gain de lipophilie. Tout en n'induisant pas une inactivité totale (Cf. Tableau 7), le remplacement de l'atome de chlore par un atome d'iode se répercute, en général, par une perte d'activité au niveau pancréatique. L'effet myorelâchant des drogues est, quant à lui, maintenu voire accentué. Il ne s'agit donc pas d'un substituant intéressant pour le profil pharmacologique recherché.

Tableau 7 : Effets des 3-alkylamino-7-iodo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Drogue	R ₃	IC ₅₀ ^a en μ M	EC ₅₀ ^b en μ M	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
575	CH(CH ₃) ₂	2.1	7.7 $\pm$ 1.6 (4)	3.7
576	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	19.5	1.3 $\pm$ 0.2 (6)	0.066
577	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	> 50	0.94 $\pm$ 0.41 (4)	< 0.02
578	CH(CH ₂ CH ₃) ₂	14.5	79.1 $\pm$ 20.6 (6)	5.5
579	CH(CH ₂) ₃ ^d	4.3	22.2 $\pm$ 4.4 (4)	5.1
Diazoxide	-	22.6	22.4 $\pm$ 2.1 (11)	1
BPDZ 44	-	3.6	154.4 $\pm$ 14.5 (8)	42.7

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclobutyle.

4.8.3.3. Modulation de la nature du substituant en position 7 des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 2 et annexe 7].

L'étude des relations structure-activité entreprises sur les 7-halogéno-3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes a permis de dégager des informations importantes concernant l'impact de la chaîne alkylamino sur l'activité. Ainsi, il a pu être constaté que si le but recherché est un effet maximal sur l'inhibition de la sécrétion d'insuline, c'est-à-dire l'ouverture des canaux K_{ATP} potassiques, l'encombrement stérique du substituant en position 3 était d'une grande importance. Il a ainsi été déterminé que les meilleurs groupements étaient l'éthylamino, l'isopropylamino, le sec-butylamino et le cyclobutylamino.

Après avoir modulé l'halogène en position 7 du cycle benzénique, il nous est apparu intéressant de moduler plus en profondeur la nature du groupement sur cette position. Ainsi, des groupements de type électrodonneur et électroattracteur ont été incorporés au cycle benzothiadiazine [Somers et al. 2000, Boverie et al. 2005]. Les substituants en position 3 sont ceux qui ont donné les meilleurs résultats sur tissu

pancréatique dans la série 7-chloro. De même, une série de dérivés non substitués sur le cycle benzénique a également été évaluée afin d'étudier uniquement l'effet de la substitution en position 7. Le BPDZ 73 devient, cette fois-ci, notre composé de référence.

Le tableau 8 présente les résultats pancréatiques et aortiques de quelques composés non substitués ou substitués en position 7 par des groupements électrodonneurs.

L'absence de substituants sur le noyau benzénique (composés **580** à **583**) entraîne, par rapport aux dérivés 7-chloro, une légère diminution d'activité au niveau pancréatique. L'effet étant plus marqué au niveau vasculaire, ces composés sont globalement un peu plus sélectifs pour le tissu pancréatique que leurs homologues chlorés.

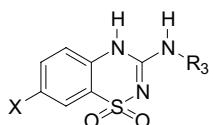
Les mêmes conclusions peuvent être tirées quant aux composés 7-méthylés (**584** à **587**) sur le modèle d'inhibition de la sécrétion d'insuline. Ces dérivés sont en effet globalement moins puissants que le BPDZ 73 dans ce modèle.

Sur le modèle aortique, les courtes chaînes en position 3 induisent une faible activité tandis que les chaînes plus longues sont plus efficaces, entraînant une baisse de la sélectivité tissulaire.

L'allongement de la chaîne alkyle en position 7 (composés **588** à **590**) est très défavorable à l'activité pancréatique. L'activité vasculaire est, quant à elle, maintenue voire améliorée par rapport au BPDZ 73.

L'introduction d'un groupement fortement électrodonneur en position 7 (i.e. OCH_3 , composés **591**, **400**, **592** et **593**) n'entraîne pas de diminution importante de l'activité inhibitrice de la sécrétion d'insuline. Exception faite de la chaîne 3-sec-butylamino (**592**), ce substituant influence de manière négative l'effet myorelâchant des drogues. Ces résultats apparaissent comme relativement favorables à une sélectivité pancréatique.

Tableau 8 : Effets des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués ou substitués par un groupement électrodonneur en position 7 sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Droque	X	R ₃	IC ₅₀ ^a en μM	EC ₅₀ ^b en μM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
580	H	CH ₂ CH ₃	11.4	> 300	> 26
581	H	CH(CH ₃) ₂	4.1	> 300	> 73
582	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	7.1	> 300	> 42
583	H	CH(CH ₂) ₃ ^d	4.3	-	-
584	CH ₃	CH ₂ CH ₃	-	210.2 ± 32.2 (6)	
585	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	2.0	200.0 ± 47.6 (3)	100
586	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-	15.5 ± 3.2 (10)	
587	CH ₃	CH(CH ₂) ₃ ^d	5.6	58.4 ± 7.0 (4)	10.5
588	C ₅ H ₁₁	CH ₂ CH ₃	-	6.6 ± 0.3 (4)	
589	C ₅ H ₁₁	CH(CH ₃) ₂	-	20.1 ± 4.6 (4)	
590	C ₅ H ₁₁	CH(CH ₂) ₃ ^d	-	> 30	
591	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	9.8	> 300	> 30.6
400	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	1.8	274.0 ± 19.0 (5)	152
592	OCH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	4.5	17.5 ± 3.6 (4)	3.9
593	OCH ₃	CH(CH ₂) ₃ ^d	2.4	157.3 ± 7.4 (6)	65
594	OC ₂ H ₅	CH ₂ CH ₃	24.5	162.5 ± 12.8 (4)	6.6
595	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	17.2	233.2 ± 29.2 (4)	13.5
596	OC ₂ H ₅	CH(CH ₂) ₃ ^d	36.3	> 300	> 8.2
597	NH ₂	CH(CH ₃) ₂	> 50	> 300	-
Diazoxide	-	-	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1
BPDZ 73	-	-	0.7	36.3 ± 2.2 (6)	52

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclobutyle.

Le passage d'une fonction méthoxy à une fonction éthoxy (composés **594** à **596**) entraîne une perte importante d'activité sur cellules B pancréatiques. Tout

comme pour les dérivés 7-pentyles, l'augmentation de l'encombrement en position 7 est globalement assez défavorable tant au niveau de l'activité qu'au niveau de la sélectivité tissulaire.

La présence d'un groupement amine en position 7 (composé **597**) est également extrêmement défavorable à l'activité pancréatique et vasculaire.

D'une manière générale, il est à remarquer que, exception faite du groupement NH_2 , la présence de substituants électrodonneurs d'encombrement limité n'entraîne pas de perte notable d'activité sur le modèle endocrinien en comparaison avec les analogues 7-chloro. En fonction de la nature du groupement alkyle en position 3, la sélectivité tissulaire (pancréas vs aorte) peut même être améliorée. C'est une nouvelle fois le groupement isopropylamino en position 3 qui semble donner les meilleurs résultats.

Le 3-isopropylamino-7-méthoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**400**) a par ailleurs été étudié plus en détails au niveau pharmacologique [Dabrowski et al. 2002]. Son action sur les canaux potassiques de type SUR1 a été démontrée par l'utilisation de différentes techniques électrophysiologiques.

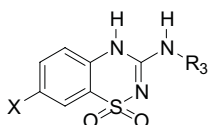
Le changement du profil électronique du substituant en position 7 influence sensiblement le profil pharmacologique et, mises à part quelques molécules qui dénotent quelque peu, la plupart des composés porteurs d'un groupement électrocapteur ou d'une fonction acide ou dérivée se révèlent être de médiocres inhibiteurs de la sécrétion d'insuline (Cf. Tableau 9).

Seul le 3-isopropylamino-7-trifluorométhyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**599**) et son analogue 7-nitro (**607**) exhibent sur ce modèle une activité supérieure à celle du diazoxide et, pour le composé **599**, proche de celle du BPDZ 73.

Au niveau aortique, la série 7- CF_3 (composés **598** à **600**) donne de bons résultats avec, de manière assez surprenante, une activité proche du μM pour le composé 3-propylamino (**598**). Le fait que, probablement, ces molécules soient très partiellement ionisées au pH physiologique ne semble pas supprimer leur activité.

En série 7-nitro (composés **606** à **609**), c'est le composé 3-sec-butylamino (**608**) qui est le plus actif en tant que myorelâchant.

Tableau 9 : Effets des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués par un groupement électroattracteur en position 7 sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Droque	X	R ₃	IC ₅₀ ^a en µM	EC ₅₀ ^b en µM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
598	CF ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	61.7	2.9 ± 0.5 (4)	0.05
599	CF ₃	CH(CH ₃) ₂	1.9	13.1 ± 3.4 (6)	6.9
600	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	148	8.9 ± 2.6 (4)	0.06
601	CN	CH(CH ₃) ₂	23.4	42.7 ± 2.9 (4)	1.8
602	CN	CH(CH ₂) ₃ ^d	66	57.9 ± 6.6 (4)	0.87
603	SO ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	> 50	> 300	-
604	SO ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	> 50	127.2 ± 17.9 (4)	-
605	SO ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	> 50	126.1 ± 19.5 (4)	-
606	NO ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₃	> 50	15.7 ± 3.0 (7)	-
607	NO ₂	CH(CH ₃) ₂	13.3	23.1 ± 3.5 (4)	1.7
608	NO ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	> 50	6.1 ± 0.9 (4)	-
609	NO ₂	CH(CH ₂) ₃ ^d	79	13.8 ± 1.6 (4)	0.17
610	NHCOCH ₃	CH(CH ₃) ₂	> 50	> 300	-
611	COOH	CH(CH ₃) ₂	> 50	> 300	-
612	COOCH ₃	CH(CH ₃) ₂	> 50	> 200	-
613	CONH ₂	CH(CH ₃) ₂	> 10	175.2 ± 35.2 (4)	-
Diazoxide	-	-	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1
BPDZ 73	-	-	0.7	36.3 ± 2.2 (6)	52

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclobutyle.

Outre leur activité médiocre sur le tissu pancréatique, la grande majorité des composés de ces séries n'exhibent pas une sélectivité tissulaire favorable au tissu pancréatique. Certaines drogues (i.e. **598** et **600**) seraient même plutôt sélectives du tissu aortique.

En conclusion, malgré quelques résultats favorables, il apparaît que l'introduction en position 7 d'un groupement électroattracteur soit un facteur extrêmement défavorable à l'activité et à la sélectivité pour le tissu pancréatique.

4.8.3.4. Les 2-alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- et pyridothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 5].

Nous regrouperons dans ce chapitre les données pharmacologiques relatives aux composés 2-méthylés et 2-éthylés recueillies en série 3-alkylaminobenzo- et 3-alkylaminopyridothiadiazine 1,1-dioxydes [Ouedraogo et al. 2002]. Cette pharmacomodulation avait pour but d'évaluer l'impact du positionnement de la double liaison du cycle thiadiazine en position 3,4 et donc la perte du proton N-H en position 4 sur l'activité.

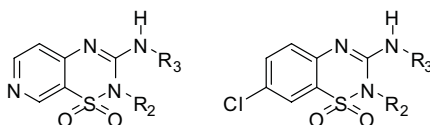
Les résultats sur pancréas et sur aorte sont présentés dans le tableau 10.

A la concentration de 50 μ M, aucune des drogues méthylées ou éthylées en position 2 n'inhibe de manière significative la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Par rapport aux références que sont le BPDZ 44, en série pyridinique et le BPDZ 73, en série benzénique, le passage d'une forme 4H à une forme 2H semble relativement défavorable au niveau de l'activité sur les cellules B pancréatiques.

A contrario, et exception faite de l'analogue 2-méthylé du BPDZ 73 (**621**), cette pharmacomodulation engendre, par rapport aux dérivés non substitués en position 2, une augmentation de l'activité myorelâchante. Cependant, celle-ci reste faible et le niveau d'activité est équivalent à celui du diazoxide.

De plus, des études pharmacologiques complémentaires réalisées sur les composés les plus actifs au niveau de l'activité myorelâchante démontrent que ces drogues maintiennent leur effet que ce soit en présence de doses croissantes de glibenclamide (un bloqueur des canaux K_{ATP} censé inhiber l'action des activateurs) ou d'une concentration importante de KCl (80 mM). Ces données sont en contradiction avec un mécanisme d'action impliquant l'activation des canaux K_{ATP} . Il semble donc que ces composés provoquent une diminution de la contraction aortique induite au KCl via une autre cible pharmacologique qui pourrait être des canaux calciques [Ouedraogo et al. 2002].

Tableau 10 : Effets des 2-alkyl-3-alkylamino-2H-1,2,4-benzo- et pyridothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Drogue	R ₂	R ₃	% résiduel à 50 µM ^a	EC ₅₀ ^b en µM
Série 5-aza				
614	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	109.5 ± 3.9 (13)	42.3 ± 3.8 (11)
615	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	113.1 ± 7.7 (16)	23.0 ± 4.9 (10)
616	CH ₃	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	88.4 ± 6.7 (14)	26.9 ± 3.8 (9)
617	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	73.5 ± 4.0 (15)	38.8 ± 11.8 (6)
618	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	80.5 ± 6.6 (15)	22.0 ± 3.8 (6)
619	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	89.5 ± 3.5 (16)	35.3 ± 2.6 (4)
Série benzénique				
620	CH ₃	CH ₂ CH ₃	79.5 ± 3.0	30.3 ± 2.9 (7)
621	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	107.1 ± 6.7 (23)	144.4 ± 18.2 (6)
622	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	46.4 ± 1.9 (30)	39.6 ± 2.8 (9)
Diazoxide	-	-	28.8 ± 2.4 (21)	19.3 ± 1.5 (21)
BPDZ 44	-	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	7.1 ± 0.6 (14)	154.4 ± 14.5 (8)
BPDZ 73	-	CH(CH ₃) ₂	5.7 ± 0.5 (35)	36.3 ± 2.2 (6)

^a Pourcentage résiduel de sécrétion d'insuline libérée à partir d'îlots pancréatiques de rat incubés en présence de 16.7 mM de glucose ± SEM (n). ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3).

4.8.3.5. Modulation de la position du chlore sur le noyau benzénique des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Jusqu'à présent, seule la position 7 du cycle benzothiadiazine avait été explorée. Il nous est dès lors apparu opportun de moduler la position de l'atome de chlore sur le cycle benzénique et d'explorer quelques composés en séries 5-chloro, 6-chloro et 8-chloro. Les chaînes latérales choisies sont celles qui ont donné jusqu'ici les meilleurs résultats au niveau pancréatique à savoir de courtes chaînes alkyles ou

cycloalkyles. Les résultats sur ces composés sont encore partiels et sont présentés dans le tableau 11.

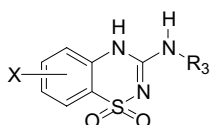
Un survol rapide des résultats permet de relever quelques faits relativement marquants. En effet, la présence d'un atome de chlore en position 5 (composés **623** à **626**) est tout à fait défavorable à l'activité, que ce soit au niveau pancréatique ou vasculaire. La plupart des drogues de cette série sont complètement inactives sur l'inhibition de la sécrétion d'insuline à une concentration de 50 μM et largement moins actives que le diazoxide sur la relaxation d'aorte de rat.

Par contre, le positionnement de l'atome de chlore en 6 (composé **627** à **632**) induit un effet d'inhibition quasi maximal dans le modèle endocrinien pour l'ensemble des molécules testées à la concentration de 10 μM . L'activité sur fibre musculaire lisse est dépendante de la chaîne latérale en position 3 mais est en général inférieure à celle mesurée avec le diazoxide et le BPDZ 73. Le cas des isomères *R* et *S* du 6-chloro-3-(1-hydroxy-2-propyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**631** et **632**) est intéressant. En effet, comme cela avait été relevé en série 7-chloro, l'isomère *R* (**631**) semble beaucoup plus puissant sur le modèle pancréatique que son antipode *S* (**632**). L'évaluation de l'activité de ces deux dérivés sur la contraction aortique devrait apporter d'autres informations intéressantes sur l'influence de la stéréochimie.

Les composés 8-chloro (**633** à **635**) possèdent sur cellules B pancréatiques une activité moindre que celle des composés 6-chloro et du BPDZ 73 mais toujours supérieure à celle du diazoxide. Ils perdent par contre toute efficacité dans le modèle aortique.

Compte tenu du profil pharmacologique des drogues des séries 6-chloro, des expériences complémentaires ont été menées de manière à définir les valeurs d' IC_{50} pancréatiques et de calculer l'indice de sélectivité.

Tableau 11 : Effets des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués par un atome de chlore en position 5, 6 ou 8 sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



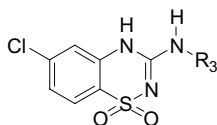
Drogue	R ₃	% résiduel à 50 μ M ^a	% résiduel à 10 μ M ^a	EC ₅₀ ^b en μ M
Série 5-chloro				
623	CH ₂ CH ₃	80.4 $\pm$ 4.4 (15)	-	90.4 $\pm$ 9.0 (4)
624	CH ₂ CH ₂ CH ₃	94.6 $\pm$ 4.7 (16)	-	179.5 $\pm$ 14.2 (4)
625	CH(CH ₃) ₂	96.9 $\pm$ 5.3 (16)	-	211.0 $\pm$ 36.0 (3)
626	CH(CH ₂) ₃ ^c	102.5 $\pm$ 3.7 (22)	-	125.5 $\pm$ 14.7 (5)
Série 6-chloro				
627	CH ₂ CH ₃	-	9.5 $\pm$ 0.5 (30)	54.8 $\pm$ 5.1 (4)
628	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-	14.5 $\pm$ 0.6 (15)	73.2 $\pm$ 3.6 (4)
629	CH(CH ₂) ₂ ^d	-	12.7 $\pm$ 1.9 (14)	> 300
630	CH(CH ₂) ₃ ^c	-	11.3 $\pm$ 0.6 (23)	22.0 $\pm$ 3.8 (6)
631	<i>R</i> -CH(CH ₃)CH ₂ OH	-	5.0 $\pm$ 0.3 (13)	-
632	<i>S</i> -CH(CH ₃)CH ₂ OH	-	99.1 $\pm$ 5.9 (16)	-
Série 8-chloro				
633	CH ₂ CH ₃	-	37.5 $\pm$ 1.4 (21)	> 300
634	CH(CH ₃) ₂	-	33.2 $\pm$ 1.5 (23)	> 300
635	CH(CH ₂) ₃ ^c	-	30.23 $\pm$ 1.6 (22)	> 30 ^e
Diazoxide	-	28.8 $\pm$ 2.4 (21)	73.9 $\pm$ 4.4 (16)	19.3 $\pm$ 1.5 (21)
BPDZ 73	CH(CH ₃) ₂	-	5.7 $\pm$ 0.5 (35)	36.3 $\pm$ 2.2 (6)

^a Pourcentage résiduel de sécrétion d'insuline libérée à partir d'îlots pancréatiques de rat incubés en présence de 16.7 mM de glucose $\pm$ SEM (n). ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c cyclobutyle. ^d cyclopropyle. ^e précipitation

Le tableau 12 reprend les valeurs d'IC₅₀ et de sélectivité tissulaire des dérivés 6-chloro. Comme attendu, les résultats sont excellents et ces composés apparaissent comme de puissants inhibiteurs de la sécrétion d'insuline. Cette puissante activité pancréatique, couplée à une faible inhibition de l'activité contractile font donc de ces

composés, et plus spécifiquement des dérivés **627** et **631**, des candidats au profil pharmacologique intéressant.

Tableau 12 : Effets des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués par un atome de chlore en position 6 sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Drogue	R ₃	IC ₅₀ ^a en μM	EC ₅₀ ^b en μM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
627	CH ₂ CH ₃	0.5	54.8 ± 5.1 (4)	109.6
628	CH ₂ CH ₂ CH ₃	2.1	73.2 ± 3.6 (4)	34.8
629	CH(CH ₂) ₂ ^d	3.8	> 300	79
630	CH(CH ₂) ₃ ^c	1.5	22.0 ± 3.8 (6)	14.6
631	R-CH(CH ₃)CH ₂ OH	0.7	-	-
Diazoxide		22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1
BPDZ 73		0.7	36.3 ± 2.2 (6)	52

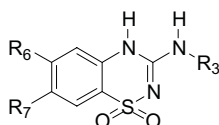
^a Concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^c cyclobutyle. ^d cyclopropyle.

Ces pharmacomodulations ont été extrêmement constructives puisqu'elles ont permis de définir les positions favorables et défavorables à l'activité. Ainsi, la présence d'un atome de chlore en position 5 entraîne une perte drastique d'activité sur les deux modèles tandis que la substitution en position 8 et surtout 6 est plutôt favorable. Nous ne disposons cependant pas encore de l'ensemble des résultats pharmacologiques nécessaires pour tirer des conclusions définitives sur l'intérêt de certains composés.

4.8.3.6. Les 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 6 et 7 [Cf. annexe 11].

Forts des résultats pharmacologiques et des informations retirées de l'analyse des relations structure-activité des différentes séries étudiées jusqu'ici, nous avons donc envisagé la polysubstitution du noyau benzénique [de Tullio et al. 2005].

Tableau 13 : Effets des 3-alkylamino-6,7-dichloro- et 3-alkylamino-7-bromo-6-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Droque	R ₆	R ₇	R ₃	IC ₅₀ ^a en µM	EC ₅₀ ^b en µM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
636	Cl	Cl	CH ₂ CH ₃	0.25	1.0 ± 0.1 (8)	4
637	Cl	Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.37	4.7 ± 0.5 (4)	3.4
401	Cl	Cl	CH(CH ₃) ₂	0.28	2.3 ± 0.2 (8)	8.2
638	Cl	Cl	CH ₂ CH=CH ₂	1.89	1.2 ± 0.2 (4)	0.63
639	Cl	Cl	CH(CH ₂) ₂ ^d	3.34	> 30	> 9
640	Cl	Cl	CH(CH ₂) ₃ ^e	1.25	12.6 ± 2.0 (5)	10.1
641	Cl	Cl	CH(CH ₃)CH ₂ OH	1.36	-	-
642	Cl	Br	CH ₂ CH ₃	0.27	3.3 ± 0.6 (6)	12.2
643	Cl	Br	CH(CH ₃) ₂	0.26	5.6 ± 0.7 (6)	21.5
644	Cl	Br	CH(CH ₂) ₃ ^e	1.21	6.6 ± 0.5 (6)	5.5
569	H	Br	CH(CH ₃) ₂	0.47	4.8 ± 2.2 (6)	10.2
BPDZ 73	H	Cl	CH(CH ₃) ₂	0.73	36.3 ± 2.2 (6)	49.7

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclopropyle. ^e cyclobutyle.

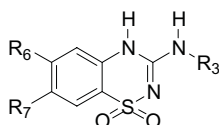
Les composés 6- ou 7-halogéno, et plus spécifiquement 6-chloro, 7-chloro ou 7-fluoro étant apparus comme les plus intéressants pour l'activité et la sélectivité sur le tissu pancréatique, les premières pharmacomodulations qui ont été réalisées ont concerné des composés 6,7-disubstitués de type : 6,7-dichloro, 6-chloro-7-fluoro, 7-bromo-6-chloro et 6,7-difluoro. Le groupement méthoxy étant également un substituant qui est apparu comme favorable au profil que nous recherchions, nous l'avons donc associé à un atome de chlore en position 6 pour donner la série 6-chloro-7-méthoxy. Les chaînes latérales substituant la position 3 sont celles qui ont donné les meilleurs résultats dans les séries 7-substituées, c'est-à-dire alkylamino courte ou cycloalkylamino.

Débutons l'analyse des résultats par une remarque générale qui concerne l'ensemble des séries. Tous les composés testés se sont révélés être de puissants inhibiteurs de la sécrétion d'insuline ; la plupart sont même légèrement plus actifs que les drogues que nous considérons comme « leads » jusque là (i.e. BPDZ 73 et composé **557**). Les meilleures chaînes latérales semblent toujours être les groupements éthylamino et isopropylamino.

Continuons par l'analyse du tableau 13 et de la série 6,7-dichloro (composés **636** à **641** et **401**). Si nous comparons les résultats sur le modèle pancréatique de la plupart des composés de cette série avec la drogue 7-chloro de référence à savoir le BPDZ 73, nous constatons que l'introduction d'un second atome de chlore sur le noyau benzénique en position 6 entraîne, comme nous l'espérions, le maintien voire l'amélioration de l'activité. Si cette amélioration est faible sur le modèle endocrinien, elle est, par contre, très importante sur le modèle vasculaire. En effet, tous les composés évalués démontrent une activité myorelâchante à des concentrations proches du μM , ce qui en rapport aux résultats générés par leurs analogues 7-chloro, représente un gain notable de puissance. Malheureusement, cette montée en puissance de l'activité va de paire avec une perte totale de la sélectivité tissulaire comme le montrent les valeurs de « IS » obtenues avec ces composés. Les drogues de cette série sont donc des « super-diazoxide », c'est-à-dire des composés puissants sur le modèle endocrinien et sur le modèle vasculaire. Le dérivé **401** a cependant été étudié sur un modèle *in vitro* d'îlots pancréatiques appartenants à des patients souffrant d'hyperinsulinisme où il se révèle être extrêmement actif [Cosgrove et al. 2002].

Le remplacement de l'atome de chlore en position 7 par un atome de brome donne des composés (**642** à **644**) présentant le même profil pharmacologique. La seule différence est que, par rapport à la série 7-bromo et au dérivé de référence de cette série (**569**), l'activité vasculaire n'augmente pas mais se maintient. Dans cette série, il est à noter que la disubstitution n'amène pas de gain notable d'activité.

Tableau 14 : Effets des 3-alkylamino-6-chloro-7-fluoro-, 3-alkylamino-6,7-difluoro-, 3-alkylamino-6-chloro-7-méthoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte de rat.



Droque	R ₆	R ₇	R ₃	IC ₅₀ ^a en μM	EC ₅₀ ^b en μM	IS EC ₅₀ /IC ₅₀ ^c
645	Cl	F	CH ₂ CH ₃	0.20	42.4 ± 2.8 (6)	212
646	Cl	F	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.52	45.3 ± 2.5 (5)	87.1
647	Cl	F	CH(CH ₃) ₂	0.16	41.5 ± 1.4 (6)	259
402	Cl	F	CH(CH ₂) ₃ ^d	0.23	39.9 ± 1.3 (6)	173
648	F	F	CH ₂ CH ₃	0.37	66.7 ± 8.5 (4)	180
403	F	F	CH(CH ₃) ₂	0.30	102.4 ± 15.2 (4)	341
649	F	F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	5.68	> 30	> 5.3
650	Cl	OCH ₃	CH ₂ CH ₃	0.48	8.1 ± 0.9 (5)	16.9
651	Cl	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	0.24	37.0 ± 2.7 (6)	154
652	Cl	OCH ₃	CH(CH ₂) ₃ ^d	0.51	23.4 ± 1.4 (5)	45.9
557	H	F	CH(CH ₃) ₂	0.76	43.1 ± 10.7 (5)	56.7
400	H	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	1.75	274.0 ± 19.0 (5)	156.6

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose. ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile au KCl 30 mM (n > 3). ^c Indice de sélectivité estimé. ^d cyclobutyle.

L'atome de fluor a déjà démontré les avantages qu'il pouvait apporter, surtout au niveau de la sélectivité envers le tissu pancréatique (Cf. composé **557**, tableau 5). Son introduction en position 7 va de nouveau démontrer l'intérêt de cet atome dans la recherche de composés puissants et sélectifs des canaux K_{ATP} de type SUR1. Comparé à la monosubstitution (dérivé **557**), la disubstitution 6-chloro-7-fluoro (composés **645** à **647** et **402**) engendre des drogues identifiées comme étant les plus actives que nous ayons découvertes sur le modèle pancréatique (i.e. dérivé **402** et **647**). De plus, le remplacement de l'atome de chlore en position 7 par un atome de fluor entraîne une perte sensible d'activité au niveau vasculaire [comparaison **401** (tableau 13) et **647**].

Cette pharmacomodulation apparaît donc comme extrêmement favorable.

Qu'en est-il maintenant de la présence de deux atomes de fluor en position 6 et 7 (composés **648**, **649** et **403**). Nous avons vu dans le chapitre consacré à la synthèse de ces dérivés les complications de préparation que présentait ce type de structure. Ces difficultés ne nous ont pas permis d'obtenir tous les dérivés espérés. Par rapport aux composés 6-chloro-7-fluoro (**645** à **647** et **402**), les drogues de la série 6,7-difluoro présentent approximativement le même profil pharmacologique à savoir : excellente activité sur tissu pancréatique couplée à une faible action myorelâchante. Le dérivé **403** apparaît même comme une des drogues les plus sélectives envers le tissu pancréatique que nous ayons synthétisé.

Les dérivés 7-méthoxy que nous avons évalué présentaient un profil intéressant (Cf. **400**) ; la question était : l'introduction d'un atome de chlore supplémentaire en position 6 améliore-t-elle ce profil ? L'analyse des résultats pharmacologiques obtenus avec les composés de cette série (**650** à **652**) montre qu'il y a, en effet, amélioration de l'activité mais sur les deux tissus étudiés. De ce fait, l'impact de cette substitution complémentaire sur le profil d'activité n'est pas aussi important que dans les séries porteuses d'un ou deux atomes de fluor.

L'introduction de deux halogènes en position 6 et 7 du noyau benzothiadiazine 1,1-dioxyde nous a conduits à la découverte de drogues qui sont actuellement parmi les plus actives et les plus sélectives du tissu pancréatique jamais décrites [i.e. **647**, **402** et **403**]. Ces résultats découlent d'une approche rationnelle du « drug design » et de l'analyse des nombreuses relations structure-activité obtenues à travers les pharmacomodulations entreprises autour des noyaux 1,2,4-pyrido- et benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

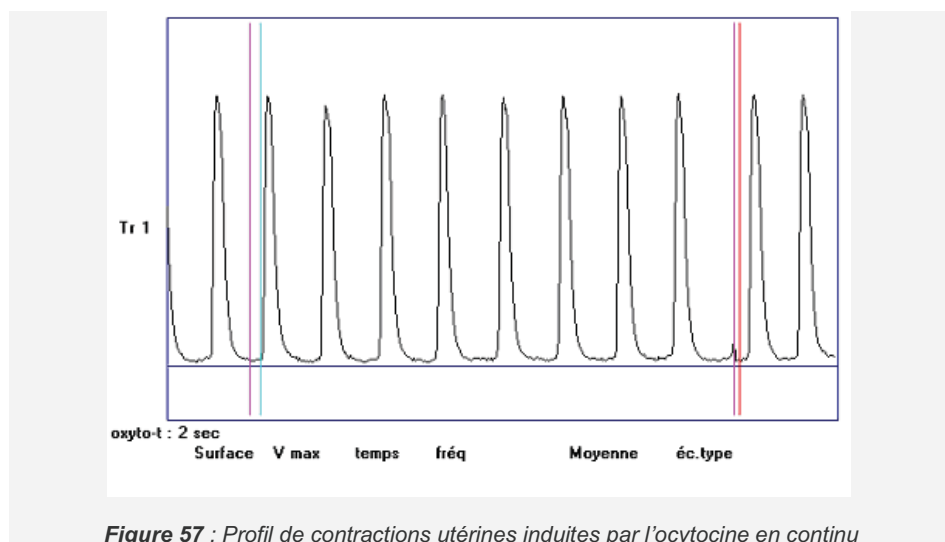
4.8.3.7. Les 3-alkylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Nous avons également envisagé le remplacement de l'atome d'azote exocyclique par un atome de soufre. Les composés ont été préparés en série 7-chloro pour être comparés par rapport au BPDZ 73 [Boverie 2004].

L'analogue 3-isopropoxy du BPDZ 73 (**663**) a également été synthétisé et évalué conjointement aux composés alkylsulfanylés.

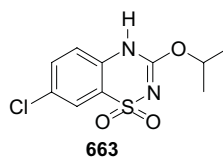
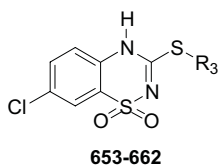
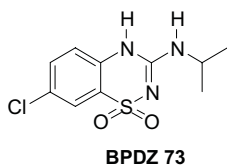
Outre les deux modèles pancréatique et aortique classiquement utilisés pour l'évaluation de nos composés, ces dérivés ont été étudiés sur un autre modèle de fibre

musculaire lisse : l'utérus de rate. Il a en effet été prouvé que certains activateurs des canaux K_{ATP} étaient capables de diminuer la contraction utérine induite à l'ocytocine. Le modèle choisi a été développé au sein de notre laboratoire et consiste en l'utilisation de cornes utérines de rate superfusées avec une solution de tyrode additionnée d'ocytocine (50 mU/l). Cette adjonction provoque l'apparition de contractions sous forme de « bouffées » comme cela apparaît sur la figure 57. L'adjonction de drogue en concentration croissante provoque ou non une diminution de la fréquence et/ou de l'intensité des contractions. L'aire totale sous la surface des contractions est mesurée pendant une période de 15 minutes et comparée à l'aire mesurée sous les contractions avant adjonction de drogues durant la même période. A la fin de l'expérience, la corne utérine est rincée au tyrode et remise en contraction à l'ocytocine seule afin d'évaluer le bon état de l'organe. Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme d' EC_{50} qui correspond à la concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la surface de la contraction de l'utérus de rate induite à l'ocytocine à une concentration de 50 mU/l.



L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 15.

Tableau 15: Effets des 3-alkylsulfanyl- et 3-aralkylsulfanyl-7-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sur la sécrétion d'insuline pancréatique de rat et l'activité contractile d'aorte et d'utérus de rat.



Drogue	R ₃	% résiduel à 10 µM ^a	EC ₅₀ ^b en µM Aorte	EC ₅₀ ^c en µM Utérus
653	CH ₂ CH ₃	76.7 ± 3.9 (15)	-	> 32
654	CH(CH ₃) ₂	104.0 ± 5.8 (23)	23.0 ± 5.6 (4)	> 32
655	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	90.1 ± 7.4 (13)	6.1 ± 0.6 (4)	14.3 ± 1.9 (4)
656	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	51 % à 50 µM	6.2 ± 0.9 (4)	13.5 ± 1.8 (4)
657	CH ₂ CH(CH ₂) ₂ ^d	70.1 ± 4.4 (15)	18.1 ± 2.4 (4)	13.5 ± 3.4 (4)
658	CH(CH ₂) ₄ ^e	73.4 ± 3.8 (14)	5.8 ± 0.4 (4)	13.7 ± 0.7 (4)
659	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₁₁	76.1 ± 5.4 (22)	2.4 ± 0.4 (4)	> 32
660	CH ₂ C ₆ H ₅	75.9 ± 4.3 (29)	5.4 ± 0.1 (4)	11.7 ± 0.5 (4)
661	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	71.0 ± 4.2 (24)	5.4 ± 0.1 (4)	9.6 ± 0.6 (4)
662	CH ₂ (CH ₃)C ₆ H ₅	73.0 ± 4.9 (30)	5.4 ± 0.1 (4)	4.4 ± 0.3 (12)
663	-	77.3 ± 2.0 (11)	22.7 ± 1.9 (7)	-
Diazoxide	-	73.9 ± 4.4 (16)	19.3 ± 1.5 (21)	> 32
BPDZ 73	-	4.9 ± 0.4 (32)	36.3 ± 2.2 (6)	> 32
Pinacidil	-	99.3 ± 8.0 (14)	1.2 ± 0.3 (4)	1.3 ± 0.3 (18)

^a Pourcentage résiduel de sécrétion d'insuline libérée à partir d'îlots pancréatiques de rat incubés en présence de 16.7 mM de glucose ± SEM (n). ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile d'aorte de rat au KCl 30 mM (n > 3). ^c concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la surface de la contraction utérine induite par l'ocytocine. ^d cyclopropylméthyle. ^e cyclopentyle.

L'analyse des résultats sur le modèle pancréatique nous permet de constater que la nature de l'hétéroatome en position 3 influence l'activité pancréatique. En effet, le passage de la fonction 3-alkylamino aux fonctions 3-alkoxy et 3-alkylsulfanyl entraîne, à la concentration de 10 µM, une perte très importante d'activité. Quelque

soit la nature de la chaîne alkyle, les composés exhibent une activité inhibitrice de la sécrétion d'insuline proche de celle du diazoxide.

Cette ressemblance avec le diazoxide se vérifie également au niveau aortique. En effet, la plupart des drogues évaluées possèdent une activité myorelâchante proche de celle du diazoxide et même supérieure à celui-ci. L'introduction en position 3 d'un groupement aromatique semble légèrement augmenter l'activité. Là où le profil pharmacologique de ces composés diffère de celui du diazoxide, c'est au niveau du modèle utérin puisque contrairement au diazoxide et au BPDZ 73, la plupart des drogues inhibent les contractions utérines induites à l'ocytocine. Seules les chaînes éthyle et isopropyle semblent plutôt défavorables. Le meilleur composé est le 7-chloro-3-[(1-phényléthyl)sulfanyl]-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**662**) qui possède une valeur de EC_{50} sur utérus de 4.4 μ M proche de celle montrée par le pinacidil.

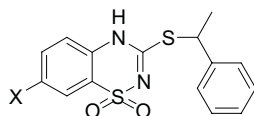
Ces composés se montrent donc pratiquement aussi efficaces sur la fibre musculaire vasculaire que sur la fibre musculaire utérine et n'ont donc, dans ce sens, aucune sélectivité envers l'un ou l'autre des tissus musculaires lisses. Seul le composé **659** présente un profil pharmacologique particulier puisqu'il est très actif au niveau vasculaire mais qu'il ne semble pas efficace à inhiber les contractions utérines induites à l'ocytocine.

Sur base de l'activité intéressante du **662** sur utérus, nous avons entrepris d'examiner l'influence de la modulation de l'atome de chlore en position 7 sur l'activité au niveau aortique et utérin (tableau 16).

La présence en position 7 de groupements électrodonneurs (composés **667** et **668**) semble défavorable à l'activité sur fibre musculaire tandis que les différents halogènes (composés **662**, **664** à **666**) semblent plutôt favorables, en ce compris l'atome de fluor. L'atome de chlore reste cependant le meilleur choix. Le cas du composé 7-méthoxy (**668**) est cependant un peu particulier puisque il est inactif sur le modèle vasculaire au delà de 30 μ M mais présente une valeur d' IC_{50} sur le modèle utérin de 16 μ M et serait donc peut-être sélectif du tissu utérin.

Par ailleurs, l'ensemble de ces composés s'est révélé inactif sur le modèle endocrinien d'inhibition de la sécrétion statique d'insuline.

Tableau 16: Effets des 3-[(1-phényléthyl)sulfanyl]-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7 sur l'activité contractile d'aorte et d'utérus de rat.



Drogue	X	EC ₅₀ ^a en μM	EC ₅₀ ^b en μM
664	F	15.0 ± 0.6 (4)	20.9 ± 0.6 (4)
662	Cl	5.4 ± 0.1 (4)	4.4 ± 0.3 (12)
665	Br	11.9 ± 1.9 (6)	14.9 ± 0.7 (4)
666	I	5.4 ± 0.1 (4)	9.4 ± 0.5 (4)
667	CH ₃	> 30	> 32
668	OCH ₃	> 30	16.4 ± 0.6 (4)

^a concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la réponse contractile d'aorte de rat au KCl 30 mM (n > 3). ^b concentration en drogue provoquant une diminution de 50 % de la surface de la contraction utérine induite par l'ocytocine

Le remplacement de la fonction alkylamino par une fonction alkylsulfanyle en position 3 entraîne un changement du profil pharmacologique. Cette pharmacomodulation induit en effet un retour vers un profil « pinacidil like » puisque les composés sont actifs sur fibres musculaires lisses vasculaires mais également utérines et peu actifs sur le modèle endocrinien.

4.9. Analyse Quantitative des Relations Structure-Activité (QSAR) [Cf. annexe 15].

Plus de deux cents molécules en séries pyrido et benzothiadiazines ont été synthétisées et évaluées dans ce projet. De nombreuses variations structurales ont été envisagées tant sur le noyau aromatique que sur le cycle thiadiazine. L'ensemble des données pharmacologiques et structurales sont propices à une analyse quantitative des relations structure-activité, aussi nommée QSAR.

Nous avons donc sélectionné une large série de composés porteurs en position 3 de chaînes alkylamines variées. Ces composés ont été modélisés et ont été introduits dans une analyse de QSAR 3D de type CoMFA (comparative molecular field

analysis) et CoMSIA (comparative molecular similarity indices analysis) utilisant trois types de données pharmacologiques comme variables indépendantes : les valeurs d' IC_{50} du modèle pancréatique, les valeurs d' EC_{50} du modèle vasculaire et les indices de sélectivité (pancréas vs aorte) [de Tullio et al. 2006]. La modélisation de l'ensemble des composés a été réalisée à l'aide du logiciel SYBYL 7.0 et à partir des données cristallographiques de 27 composés. Les charges et leur répartition ont été calculées en utilisant MOPAC (méthode AM1). Pour éviter la problématique liée aux centres stéréogéniques, seuls les composés ne possédant pas de centre de chiralité ou les mélanges racémiques ont été introduits dans les analyses. L'information concernant l'impact de la stéréochimie sur l'activité a donc dû être complètement négligée dans cette approche.

L'ensemble des composés a été aligné dans la grille CoMFA ou CoMSIA tout d'abord en utilisant une simple superposition géométrique puis en alignant les champs électrostatiques sur un champ de référence (« field fitting »). A chaque point d'une grille fictive, un certain nombre de paramètres descripteurs a été calculé pour chaque molécule (i.e. paramètres électroniques, stériques, hydrophobiques et accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogènes). Ces paramètres constituent les variables dépendantes. Ces variables sont mises en relation avec les variables indépendantes et de manière schématique une régression linéaire multivariée est recherchée. Celle-ci ne peut avoir lieu directement puisque le nombre de variables indépendantes est largement supérieur au nombre de molécules rentrant dans l'analyse. Il s'agit donc de réduire ce nombre à quelques composantes principales qui sont, en fait, des combinaisons linéaires de ces variables.

La méthode CoMFA, moins riche en informations au final, a été utilisée pour la détermination de certains paramètres d'analyse importants ; la méthodologie CoMSIA a ensuite été utilisée.

Ces études, qui ont fait l'objet d'une publication scientifique, ont permis d'obtenir une visualisation 3D des zones favorables et défavorables à l'activité sur tissu pancréatique ou vasculaire, ainsi qu'à la sélectivité tissulaire en termes de propriétés électrostatiques, stériques, hydrophobiques et accepteurs de liaisons hydrogènes (exemple figure 58) [de Tullio et al. 2006]. De plus, comme l'indique le terme « quantitative » du QSAR, cette analyse fournit également un modèle prédictif capable, après modélisation, de donner l'activité d'une drogue non encore synthétisée tant au niveau du tissu pancréatique que du tissu vasculaire. A ce stade, il convient

d'être prudent et de rappeler que les modèles développés ne peuvent s'appliquer qu'aux composés de structure proche de ceux étudiés dans cette approche. Il reste dangereux de vouloir extrapoler et il convient de maintenir l'application des résultats dans un cadre connu et maîtrisé.

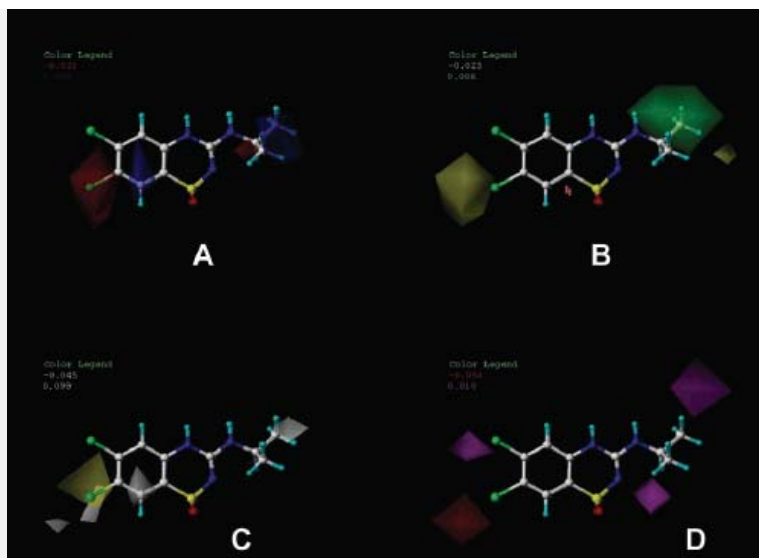


Figure 58 : cartes des contours CoMSIA définis pour le modèle pancréatique.

A : propriétés électrostatiques, les régions en bleues sont les zones où la présence de charges positives est favorable à l'activité ; les zones rouges sont celles où les groupements chargés négativement favorisent l'activité. B : propriétés stériques avec les zones favorables en vert et défavorables en jaune. C : propriétés hydrophobiques, les polyèdres jaunes indiquent des régions où la présence de groupes hydrophobiques augmente l'activité tandis que les polyèdres blancs décrivent des zones hydrophiliques favorables. D : propriétés accepteurs de liaisons hydrogènes, les zones d'isocontours magenta représentent les positions où des accepteurs de liaisons hydrogènes au niveau de la molécule augmentent l'activité, les zones défavorables sont en rouges.

L'analyse des données récoltées nous a amenés à définir, pour chaque position modulée, une série de requis structuraux favorisant ou défavorisant l'activité et/ou la sélectivité tissulaire. Nous avons ainsi pu proposer des modèles de pharmacophores pour l'activité inhibitrice de la sécrétion d'insuline et pour l'inhibition de l'activité contractile des aortes de rat applicables aux 3-alkylamino-4H-pyrido- et benzothiadiazine 1,1-dioxydes. Les informations qui y sont reprises synthétisent et améliorent l'ensemble des données extraites des relations structure-activité des

multiples séries étudiées. Elles devraient être très utiles pour les futurs développements chimiques d'activateurs puissants et sélectifs des canaux K_{ATP} de type SUR1 ou SUR2.

Les figures 59 et 60 présentent les modèles de pharmacophores qui donnent les requis structuraux expliquant l'activité sur tissu pancréatique et vasculaire.

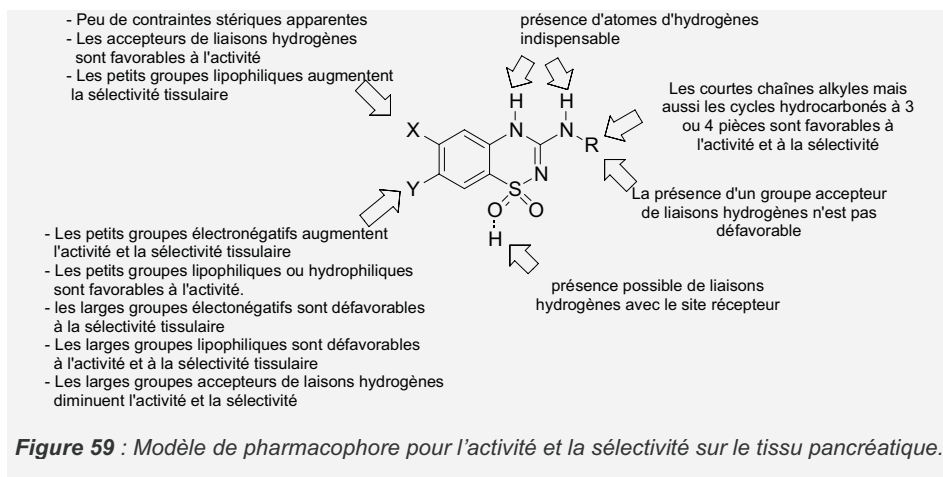


Figure 59 : Modèle de pharmacophore pour l'activité et la sélectivité sur le tissu pancréatique.

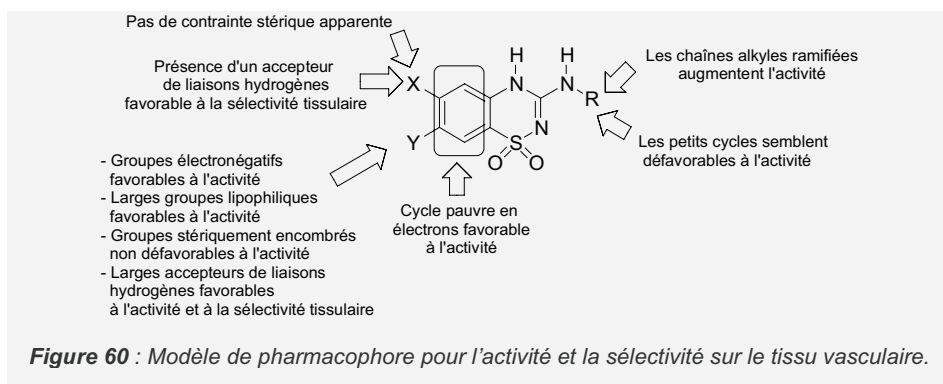


Figure 60 : Modèle de pharmacophore pour l'activité et la sélectivité sur le tissu vasculaire.

Même si les résultats que nous avons obtenu sont assez satisfaisants, il semble néanmoins qu'une des principales faiblesses rencontrées dans ce type d'approche provienne de la problématique de description structurale des composés, que ce soit de manière bi- ou tridimensionnelle. En effet, il est rare de pouvoir introduire, dans les paramètres descripteurs, des données mesurées pour chaque drogue. Ainsi, dans la

majorité des cas, ces données sont estimées, calculées ou évaluées « *in silico* » et donc manquent peut-être d'une certaine « réalité ». L'introduction de données spectrales provenant de l'analyse RMN des dérivés à décrire dans une approche QSAR pourrait, selon nous, donner des résultats intéressants tant il est vrai qu'intrinsèquement un spectre proton contient toute une série d'informations relatives à la lipophilie, à l'encombrement stérique, à l'environnement électronique et bien sur à la structure chimique des composés. Ces données facilement mesurables et surtout physiquement pertinentes seraient à même, dès lors, de remplacer certains paramètres calculés ou estimés. Cette approche demande bien sur à être validée tant au niveau des conditions expérimentales de prise de spectres que de leur incorporation au sein de l'étude QSAR. Il s'agit là d'une recherche que nous souhaiterions mener sur les composés utilisés pour cette approche CoMSIA et ce afin de comparer les résultats obtenus dans les deux modèles .

4.10. La métabolisation des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes [Cf. annexe 16].

Comme nous venons de le voir, les différentes pharmacomodulations entreprises autour des noyaux benzo et pyridothiadiazine 1,1-dioxydes ont permis de mettre en évidence des composés extrêmement puissants et sélectifs des canaux K_{ATP} de type SUR1 dans des modèles *in vitro*. Cependant, des expériences menées *in vivo* chez l'animal (rat) avec certaines drogues n'ont pas donné les résultats escomptés, soit que leur niveau d'activité ne soit pas en rapport avec les résultats *in vitro*, soit que le mode d'administration *per os* entraîne une perte d'activité ou encore que des effets inattendus soient observés sur la pression sanguine. Ces données relativement décevantes pourraient s'expliquer par de mauvais paramètres pharmacocinétiques (i.e. une mauvaise absorption ou distribution) ou encore par des phénomènes liés à la métabolisation des composés. Nous avons vu que quelques paramètres physico-chimiques de ces séries de dérivés tels que le pKa et le log P' ne semblaient pas *a priori* défavorables. L'étude de la métabolisation de quelques composés sélectionnés devrait nous permettre d'éclairer quelque peu cet aspect des choses et de vérifier l'influence que possède la métabolisation pour l'activité de nos drogues.

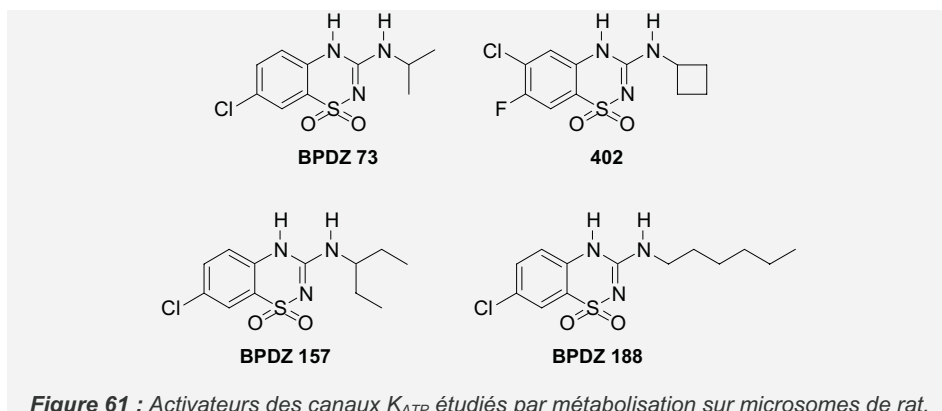
Lorsqu'un xénobiotique pénètre dans l'organisme, ce dernier met en place toute une série de mécanismes de métabolisation qui ont pour but de faciliter l'élimination de cette substance étrangère. En général, ces processus visent à l'augmentation du caractère hydrophile du composé. Ces biotransformations sont de caractère enzymatique et impliquent de nombreux types de réactions chimiques telles que l'hydrolyse, l'hydroxylation, la déalkylation, la désamination, l'oxydation, l'époxydation, la réduction, l'acétylation, la méthylation, la conjugaison, ... Les enzymes responsables de ces réactions sont localisées à plus de 90 % dans le foie et les tissus en contact direct avec l'environnement (intestin, peau et poumons) et peuvent être classés en 3 catégories :

- Les enzymes de phase I qui catalysent des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Ils sont présents dans le réticulum endoplasmique.
- Les enzymes de phase II qui catalysent la production de dérivés conjugués avec des composés endogènes ou exogènes. Ils sont localisés dans le cytosol.
- Les enzymes de phase III qui sont des protéines de transport intervenant dans le processus d'excrétion cellulaire. Elles sont principalement ancrées dans la membrane cytoplasmique.

Il est clairement admis que les processus de biotransformation de xénobiotiques au sein d'un organisme hôte sont des facteurs susceptibles d'influencer fortement les propriétés pharmacologiques (stabilité, biodisponibilité, temps de demi-vie, pharmacocinétique, interactions, toxicité, ...) d'une drogue. La connaissance du chemin de métabolisation *in vivo* (généralement déterminé via l'analyse des métabolites) est indispensable dans la recherche et l'optimisation des propriétés pharmacologiques d'un composé « leader ». En effet, la détermination de la structure des métabolites peut permettre de mettre en évidence les zones structurales sensibles à la métabolisation et d'imaginer ainsi de nouvelles pharmacomodulations afin de rendre les structures plus (ou moins) stables métaboliquement et donc d'optimiser leur efficacité, leur spécificité et/ou leur toxicité *in vivo*.

Dans le cadre d'une première approche de la métabolisation de nos composés, il semble que l'étude de la phase I via l'action des cytochromes P450 est généralement admise comme la plus intéressante. En effet, les cytochromes P450 apparaissent comme les principales enzymes de cette phase et constituent dès lors des sujets d'études intéressants lors de l'analyse du métabolisme des médicaments. Nous avons donc envisagé une approche étudiant la métabolisation de différentes

drogues d'intérêt sur microsomes de foie de rat. En effet, ce type de microsomes est considéré comme le plus susceptible de produire de grandes proportions de métabolites de phase I. Plusieurs composés de type 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde ont été choisis pour leur activité tels que les BPDZ 73 ou le dérivé **402** mais également pour leur structure tels que les BPDZ 157 et 188 (Figure 61). Ils ont été soumis à une étude préliminaire de métabolisation sur microsomes de rat (Figure 60) [de Tullio et al. 2006b] Cette étude a été réalisée en collaboration avec la société ATC dont les locaux sont situés au sein du CHU de l'Université de Liège et qui est spécialisée dans l'étude des métabolites par LC-MS/MS.



L'analyse des voies de métabolisation a été réalisée en trois phases :

- Production de métabolites : Les expériences de métabolisation ont été menées à 37°C durant 60 min. sur des microsomes de foie de rat induits au phénobarbital (connus pour augmenter fortement le niveau de certains cytochromes P450). La concentration finale en substrat à métaboliser est en général proche de 200 μ M par expérience. Le protocole expérimental a été développé et optimisé au sein de la société ATC.
- Séparation des métabolites : l'identification et la caractérisation des métabolites requièrent que tout composé (protéines, débris cellulaire) pouvant interférer avec les techniques d'analyse soit éliminé. La chromatographie liquide haute performance en phase inverse est généralement utilisée pour la séparation des métabolites et du composé parent.

- Détection et caractérisation des métabolites : la technique classiquement utilisée est la LC-MS (chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse). Elle permet en général de caractériser la structure des métabolites. Cependant, malgré la sensibilité de la technique, certaines indéterminations structurales peuvent subsister après analyse des données de spectrométrie de masse ; c'est pourquoi, nous avons décidé d'utiliser la LC-SPE-RMN, certes moins sensible, mais plus puissante quant à l'analyse structurale. La technique LC-SPE-RMN consiste en l'utilisation d'un système d'extraction en phase solide (SPE) comme interface entre la chromatographie liquide et un appareil de résonance magnétique nucléaire à haut champ (RMN).

4.10.1. Protocole d'incubation.

Le modèle expérimental retenu est celui des microsomes hépatiques de rats mâles induits au phénobarbital. Il s'agit de vésicules de réticulum endoplasmique hépatiques obtenues par fragmentation d'un pool de foies d'une population de 35 rats âgés de 8 à 9 semaines. Le protocole utilisé est le suivant :

Les drogues (substrats) sont dissoutes dans du méthanol de manière à obtenir une concentration finale de 20 mM. 10 µl de ce substrat sont prélevés et additionnés de tampon phosphate de manière à obtenir un volume total de 900 µl. Un volume de solution enzymatique de microsomes hépatiques est ensuite additionné de manière à obtenir une concentration finale en enzyme comprise entre 1 et 2 mg/ml. La réaction enzymatique est ensuite démarrée par addition de 100 µl de milieu d'incubation. Ce milieu contient du glucose-6-phosphate et du glucose-6-phosphate deshydrogénase qui forme un système régénérateur de NADPH à partir de NADP^+ et qui permet au système enzymatique de fonctionner de manière optimale. En effet, la réaction de base catalysée par tous les cytochromes P450 est une monooxygénation. Cette étape se réalise en présence d'un donneur d'électron tel que le NADPH qui est oxydé en NADP^+ et conduit à la dissociation d'une molécule d' O_2 suivie de l'incorporation d'un des deux atomes d'oxygène dans le substrat et de la réduction du second en une molécule d'eau [Degtyarenko 1995]. Sans entrer dans trop de détails, l'équation de monooxygénation est la suivante :



Le transfert d'électron se produit via l'intervention d'atome de fer hémique.

Après une heure d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée par ajout de 2 ml de méthanol. 4ml d'acétonitrile sont ensuite addionnés afin de compléter la précipitation des protéines. Après centrifugation, le surnageant est évaporé à siccité sous azote. Le résidu est alors repris par 300 µl de la phase mobile utilisée pour la séparation chromatographique.

Il est à noter que pour chaque drogue métabolisée, un échantillon n'ayant subi aucune dégradation enzymatique est préparé par ajout de 2 ml de méthanol avant adjonction des microsomes hépatiques. Cet échantillon sert de référence et de modèle de comparaison pour le système LC.

4.10.2. Analyse par LC-MS/MS.

Les analyses MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse «Waters Micromass Q-Tof-2 Quadrupole/Time-of-flight MS/MS» équipé d'une source d'ionisation par électrospray de type « z sprayTM » couplée à une chaîne LC Waters Alliance 2690 sous un mode d'ionisation positive. Les analytes ont été déterminés en utilisant une échelle de masse allant de 90 à 650 Da. Les ions moléculaires ont été fragmentés par dissociations induites par collision (l'argon a été utilisé comme gaz de collision avec une énergie de collision de 20 eV). Les températures de la source et de désolvatation ont été portées respectivement à 125 °C et 400 °C. Afin de séparer les composés parents de leurs produits de métabolisation, des conditions HPLC classiques en phase inverse sont utilisées (colonne C₁₈, acétonitrile (ACN) comme modificateur organique). Compte tenu de la grande sensibilité de la spectrométrie de masse, les volumes et les quantités de solution injectées peuvent être réduits (5 µl). De ce fait, l'analyse peut être réalisée à partir d'une seule expérience de métabolisation.

4.10.3. Analyse par LC-SPE-RMN.

La figure 62 décrit la configuration type d'un système LC-SPE-RMN. La configuration que nous avons utilisée est constituée d'une chaîne HPLC Agilent 1100 équipée d'un détecteur de type « diode array », d'une unité SPE Bruker/Spark Prospekt II et d'un spectromètre Bruker Avance 500 MHz équipé d'une sonde inverse ¹H / ¹³C avec gradient z de 60 µl.



Figure 62: configuration type d'un système LC-SPE-RMN

Après séparation par le système chromatographique et détection par le diode-array (DAD), les pics d'intérêt peuvent être collectés sur les cartouches d'un système d'extraction en phase solide (SPE) spécifiquement adapté à la RMN et couplé à la chaîne LC par l'intermédiaire d'une interface (BSFU). Différents types de cartouches d'extraction sont disponibles (C_8 , C_{18} , résine, ...). Dans le cas de structures hétérocycliques moyennement polaires, les cartouches de type « Hysphere resin GP » semblent donner d'excellents résultats.

L'adjonction d'eau à la phase mobile (2 ml/min) lors de la phase d'extraction permet en principe d'accentuer la phase d'extraction et d'éviter de trop fortes pertes en produit. Par ailleurs, de manière à augmenter la concentration en métabolites, plusieurs injections successives peuvent être réalisées et chaque pic d'intérêt collecté sur les mêmes cartouches. Dans le cas de ce travail, trois injections successives ont permis de concentrer les différents métabolites. Il faut néanmoins signaler que la RMN étant une technique relativement peu sensible, les volumes et les concentrations des solutions injectées (100 μ l) pour la séparation LC sont largement plus importants qu'en LC-MS. Ainsi, 20 expériences types de métabolisation ont été réalisées pour chaque drogue, les résidus de ces manipulations ont été ensuite mis en commun, et repris par 300 μ l de phase mobile. Les conditions de séparation chromatographique sont légèrement différentes de celles utilisés pour la LC-MS :

Une fois la séparation et la collecte par SPE effectuées, les cartouches d'extraction sont ensuite séchées sous flux d'azote durant 30 minutes. Ce séchage a pour but d'éliminer les solvants non deutérés du milieu et de permettre l'élution et le transfert des substances collectées dans la sonde LC de la RMN par de l'acétonitrile deutéré. L'avantage du système SPE est donc double : d'une part, il permet de concentrer les composés via la collecte multiple sur les cartouches et d'autre part, lors de la phase d'élution, le volume final dans lequel le composé se trouve en théorie est seulement de 60 μ l. Par ailleurs, le séchage des cartouches après collecte permet d'éliminer les solvants non deutérés du milieu ce qui rend la prise des spectres RMN plus confortable et évite l'utilisation d'eau deutérée lors de la séparation LC. Une fois les produits transférés dans la sonde LC, les spectres RMN, souvent 1D proton et 2D cosy (couplage homonucléaire proton-proton), peuvent être mesurés.

4.10.4. Métabolisation des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzo et pyridothiadiazine 1,1-dioxydes.

Deux composés pharmacologiquement intéressants ont été étudiés dans ce modèle de microsomes : le BPDZ 73 et le composé **402**. Parallèlement, la stabilité métabolique de deux autres composés benzéniques porteurs en position 3 de chaînes alkylaminées plus longues et ramifiées a également été évaluée.

Métabolisation du BPDZ 73 :

Le BPDZ 73 a été métabolisé par les microsomes hépatiques de rat selon la méthodologie décrite précédemment. Après une heure de réaction enzymatique, comme le montre le chromatogramme obtenu par analyse de l'incubat (Figure 63), deux métabolites principaux ont été identifiés et nommés M1 et M2. En supposant que les coefficients d'extinction molaire des métabolites sont semblables à celui du produit parent, nous pouvons estimer que les surfaces du produit parent et de M1 sont proches de 48% tandis que M2 ne représente que 4%. Le BPDZ 73 est donc largement et rapidement métabolisé par les microsomes de rat pour donner un composé principal M1.

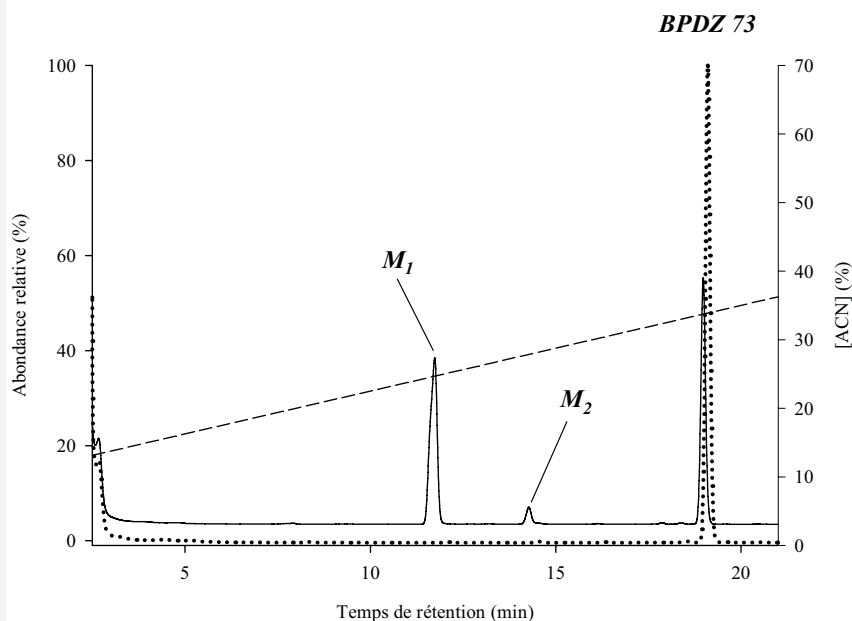


Figure 63 : Chromatogramme du profil métabolique du BPDZ 73 dans les conditions d'analyse LC-SPE-RMN. Légendes : ----- gradient en acétonitrile ; ——— BPDZ 73 métabolisé.

L'analyse LC-MS/MS permet de démontrer que le pic chromatographique supposé du composé parent possède un spectre de masse en mode d'ionisation positive cohérent avec la structure attendue puisqu'il montre un ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ au rapport m/z de 274 et différents fragments dont le plus important a un rapport m/z de 232 correspondant à la perte d'un groupement isopropyle (Figure 64).

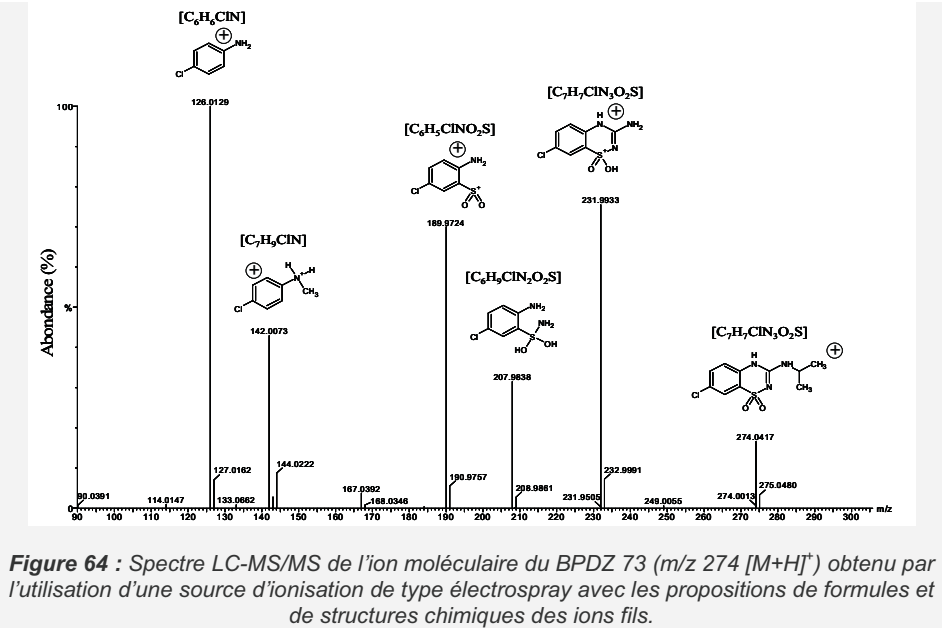


Figure 64 : Spectre LC-MS/MS de l'ion moléculaire du BPDZ 73 (m/z 274 $[M+H]^+$) obtenu par l'utilisation d'une source d'ionisation de type électrospray avec les propositions de formules et de structures chimiques des ions fils.

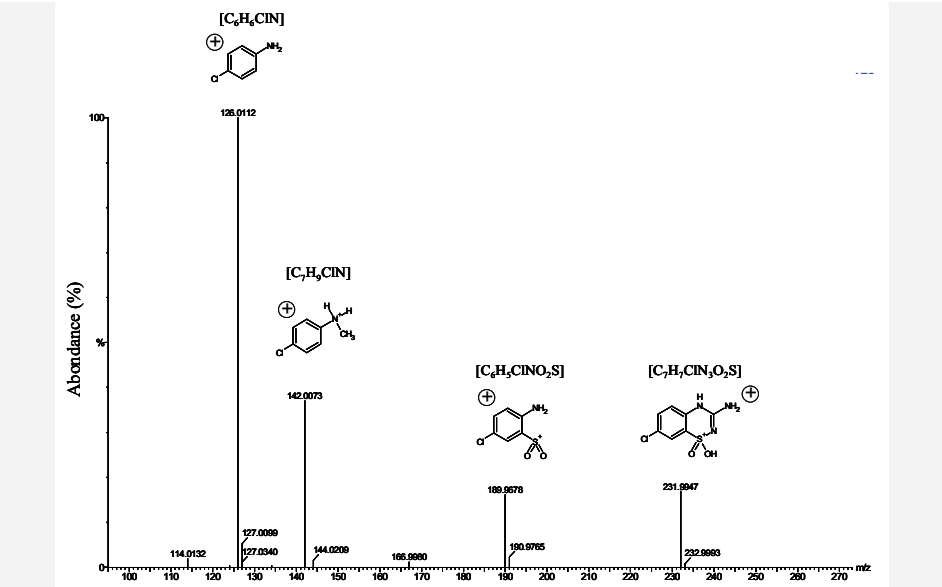


Figure 65 : Spectre LC-MS/MS de l'ion moléculaire du métabolite M1 (m/z 232 $[M+H]^+$) obtenu par l'utilisation d'une source d'ionisation de type électrospray avec les propositions de formules et de structures chimiques des ions fils.

L'analyse de M1, dans les mêmes conditions spectrales, entraîne l'apparition d'un ion moléculaire possédant un rapport m/z de 232 Da, ce qui équivaut à la perte d'une masse de 42 Da. La fragmentation de l'ion moléculaire de M1 génère une série de fragments communs avec ceux du produit parent. Ces fragments résultent donc du même mécanisme de fragmentation que le BPDZ 73 et il est dès lors vraisemblable que le composé parent soit métabolisé en un composé caractérisé par une perte du groupement isopropyle (Figure 65).

M2 par contre est caractérisé par un ion moléculaire supérieur de 16 Da à celui du BPDZ 73. La fragmentation de cet ion démontre que, comme M1, M2 suit probablement le même chemin que le composé parent. L'incrément de masse résulte donc probablement de l'introduction d'un atome d'oxygène sur la structure du BPDZ 73 et probablement sur la chaîne alkylamino en position 3. L'analyse des fragments permet d'éliminer toute oxygénation du noyau benzénique ou du cycle thiadiazine. Cependant, la position exacte de ce groupement oxygéné (généralement un hydroxyle) ne peut être obtenu par l'analyse des résultats de LC-MS/MS.

Dans le but de vérifier et/ou de compléter les structures de M1 et M2, une analyse de ces métabolites par LC-SPE-RMN a été entreprise. Le pic parent et les pics des deux métabolites ont été collectés sur cartouches SPE avant d'être élués par de l'acétonitrile- d_3 dans la sonde LC de l'appareillage RMN. Les spectres proton et cosy relatifs aux trois pics ont ensuite été enregistrés. Le spectre proton du pic parent (Figure 66) a permis de conforter les résultats de la LC-MS puisqu'il apparaît identique au spectre proton du BPDZ 73 de référence.

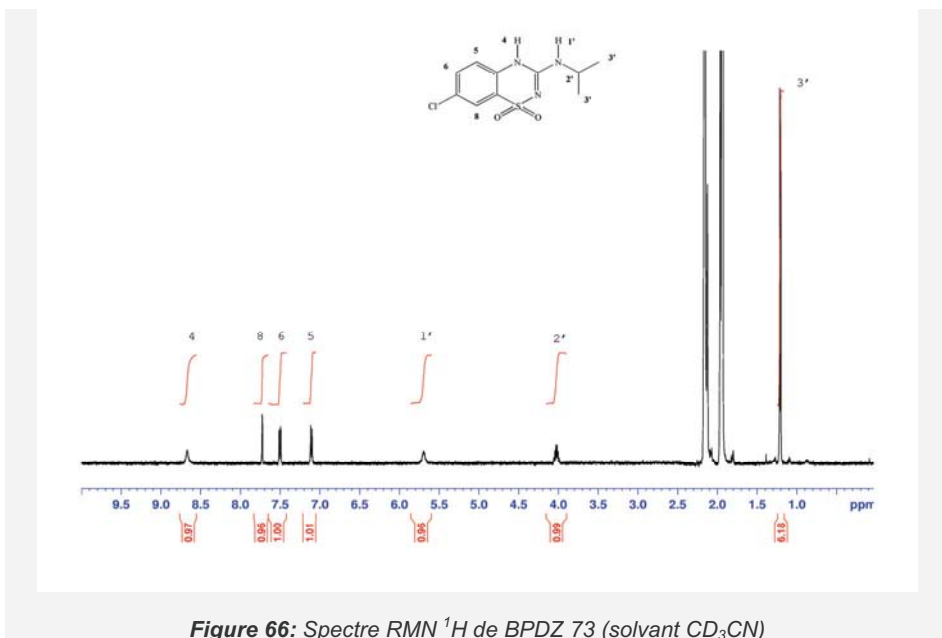


Figure 66: Spectre RMN ^1H de BPDZ 73 (solvant CD_3CN)

L'analyse du nombre de scans nécessaire pour obtenir un spectre utilisable (256 dans ce cas) et l'examen du rapport signal-bruit nous permet d'estimer grossièrement la quantité de produit présent dans la sonde à seulement quelques dizaines de μg , ce qui est relativement faible mais, compte tenu du volume de la sonde (60 μl), donne une concentration relativement élevée (0.5-1 g/l). Le spectre de couplage homonucléaire cosy de ce pic chromatographique confirme la structure du composé avec les deux couplages attendus d'une part entre les 2 CH_3 et le CH de l'isopropyle et d'autre part entre les protons 5 et 6 du cycle benzénique.

L'analyse du spectre proton obtenu avec le métabolite M1 indique clairement la disparition du groupement isopropyle concomitante avec l'augmentation du signal NH en position 3 (Figure 67).

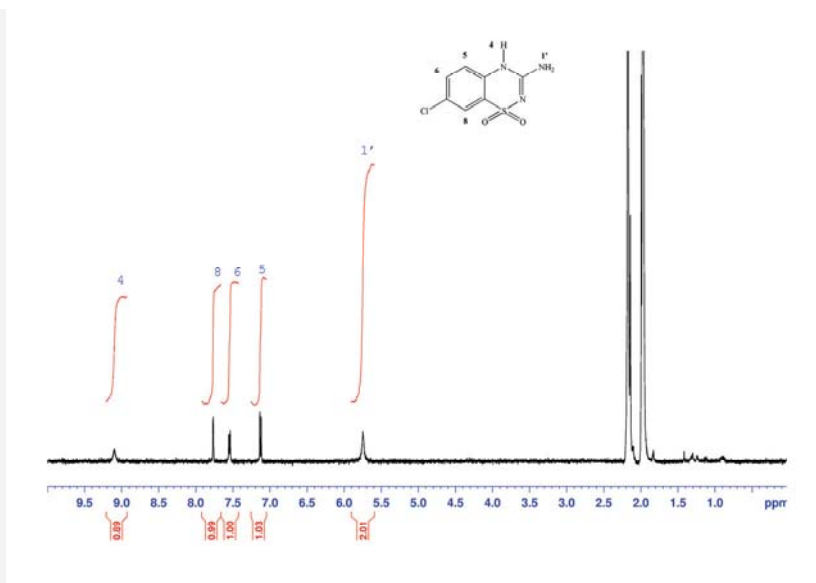


Figure 67: Spectre RMN ^1H du métabolite M1 (solvant CD_3CN)

Plus intéressante est l'analyse des spectres de M2. La quantité de ce métabolite étant beaucoup plus faible, la durée de prise des spectres protons et cosy est bien entendu plus élevée que pour le BPDZ 73 et M1 pour un rapport signal-bruit plus faible. Par ailleurs, les signaux relatifs au solvant (acétonitrile) et à l'eau résiduelle deviennent relativement importants. Cependant, l'application d'une séquence de suppression multiple de solvants permet d'obtenir des spectres tout à fait corrects et utilisables (Figure 68). Malgré la présence d'impuretés dans une zone comprise entre 1.5 et 1.8 ppm (probablement des résidus lourds des solvants HPLC non éliminés et que nous retrouvons dans quasiment tous les spectres de cette analyse), la position du groupement hydroxyle sur la chaîne isopropylamine a pu être définie. En effet, nous constatons la perte d'un signal relatif à un CH_3 et l'apparition de deux multiplets au-delà de 3.5 ppm. Ces deux signaux correspondent aux deux protons du nouveau groupement CH_2OH qui, du fait de l'introduction d'un centre d'asymétrie sur le carbone en α , deviennent inéquivalents magnétiquement et chimiquement (protons diastéréotopes). Confirmation est obtenue puisque ce composé avait été synthétisé et que la comparaison des spectres de ce produit et de M2 est concluante. Compte tenu de la faible quantité de M2, aucun spectre cosy n'a pu être obtenu.

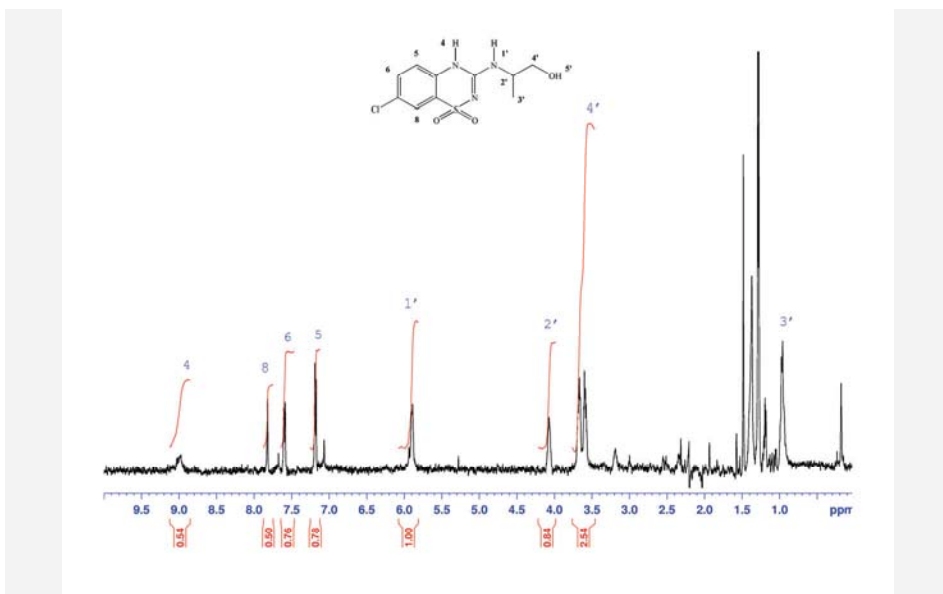


Figure 68 : Spectre RMN ^1H avec découplage des solvants du métabolite M2 (solvant CD_3CN)

La vitesse de métabolisation du BPDZ 73 a également été déterminée grâce à l'étude cinétique. La figure 69 reprend le suivi de l'évolution du produit parent et des deux métabolites M1 et M2.

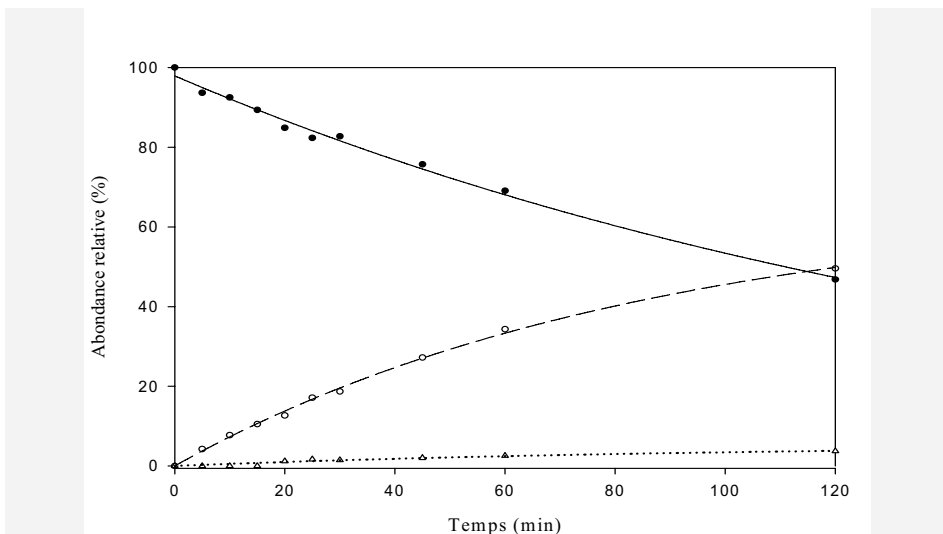


Figure 69 : Evolution de l'abondance relative du BPDZ 73 et des métabolites M1 et M2 en fonction du temps d'incubation. Légende : — BPDZ 73 ; ---- M₁ ; M₂.

Les résultats sont exprimés en abondance relative qui représente les aires des différents pics élués aux différents temps d'incubation divisés par l'aire initiale du substrat. Sur une durée de 120 min, il apparaît clairement qu'il y a parallélisme entre la diminution de la concentration en BPDZ 73 et l'augmentation de la concentration en M1 (cinétique d'ordre 1). M2 reste très minoritaire et ne semble pas être le composé intermédiairement formé entre le produit parent et M1.

Ces résultats sont extrêmement intéressants car d'une part ils nous permettent de mettre en évidence la métabolisation rapide d'une partie non négligeable du BPDZ 73 et d'autre part, ils soulignent l'apparition du métabolite principal M1 de structure 3-amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde. Cette *N*-déalkylation de la chaîne isopropyle qui semble rapide et importante pourrait être appliquée à d'autres molécules de cette série. Cette diminution importante de la concentration en produit parent concomitant à l'apparition du métabolite de *N*-déalkylation pourrait donc permettre d'expliquer les problèmes rencontrés par plusieurs drogues de type 3-isopropylamino dans des évaluations *in vivo* chez le rat. En effet, plusieurs composés de cette classe montrent des effets sur la glycémie du rat relativement décevants en rapport avec leur activité *in vitro* relevée sur le modèle d'inhibition de la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, un effet hypotenseur, inattendu au vu des résultats sur aorte de rat, est souvent noté ; or la littérature décrit une activité hypotensive et parfois bradycardisante non négligeable pour différents composés de type 3-amino-benzothiadiazine 1,1-dioxyde [Grana et al. 1962, Raffa et al. 1964 et 1965]. Il se pourrait donc que ces effets secondaires soient dus à un produit de métabolisation plutôt qu'au composé principal.

Métabolisation du composé 402.

Au vu de ses résultats *in vitro*, ce composé apparaît comme extrêmement intéressant. Cependant, des résultats *in vivo* générés lors de la collaboration avec la société Novo-Nordisk montrent que ce composé ne serait pas dénué d'effet sur la pression sanguine du rat. L'étude de la métabolisation de ce composé par les microsomes pourrait donc nous permettre, tout comme cela a été le cas avec le BPDZ 73, d'obtenir des informations sur la stabilité du composé et sur la structure de ces métabolites primaires. Malheureusement, ce composé est peu soluble dans le méthanol et il se révèle largement insoluble lors de la formation de la solution

méthanolique mère. Des études complémentaires visant à modifier éventuellement les conditions expérimentales devront être envisagées afin de palier cet inconvénient et permettre d'obtenir des informations sur la stabilité de la chaîne cyclobutylamino en position 3.

Métabolisation des BPDZ 157 et BPDZ 188.

Par l'étude de l'impact des microsomes sur les BPDZ 157 et 188, nous avons voulu d'une part étudier l'impact des cytochromes P450 sur des composés possédant des chaînes alkylaminées plus longues et plus complexe et d'autre part vérifier l'intérêt de coupler la LC-MS et la LC-RMN dans l'étude et l'identification structurale complète de métabolites. En effet, au niveau de l'activité pharmacologique pure, ces deux composés apparaissent comme moins intéressants, même s'ils ne sont pas dénués d'activité. Nous détaillerons l'approche et l'analyse réalisées avec le BPDZ 157 et ne donnerons pour le BPDZ 188 que les structures potentielles des métabolites.

La méthodologie utilisée tant au niveau de la métabolisation que de l'analyse LC-MS et LC-SPE-RMN est identique à celle décrite pour les autres composés.

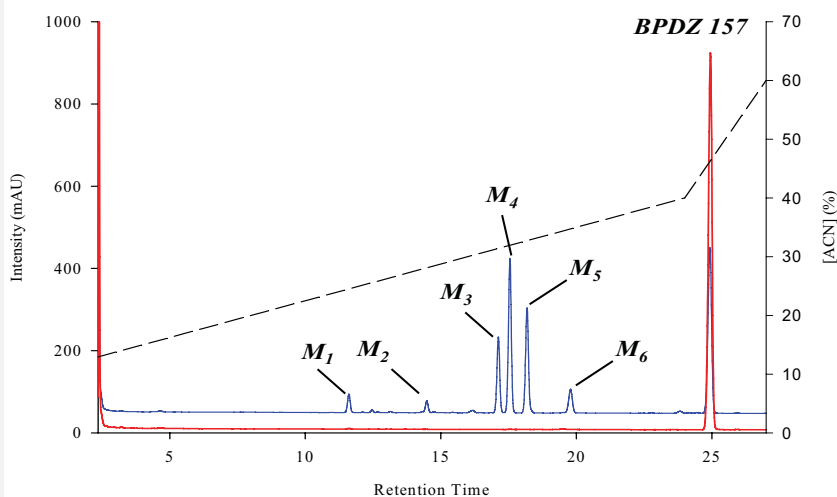


Figure 70 : Chromatogramme du profil métabolique du BPDZ 157 dans les conditions d'analyse LC-SPE-RMN. Légendes : ----- gradient en acétonitrile ; ——— BPDZ 157 métabolisé ; ——— BPDZ 157 non métabolisé

Le chromatogramme décrivant le profil métabolique du BPDZ 157 dans les conditions d'analyse LC utilisé pour la séparation en LC-SPE-RMN est repris dans la figure 70. Six métabolites principaux ont été identifiés après une heure de réaction enzymatique. Ils représentent, d'après l'aire des pics, approximativement 50 % de l'aire de l'ensemble des signaux, c'est-à-dire que 50 % du produit parent ont été dégradés lors de cette étape. M3, M4 et M5 sont les métabolites les plus importants en termes quantitatifs.

L'analyse de ces métabolites et du BPDZ 157 par LC-MS/MS et l'étude de la fragmentation de leurs ions parents a permis de vérifier que l'ensemble de ces composés possèdent un profil de fragmentation commun avec le produit parent (Cf. Figures 71 et 72). De ce fait, il apparaît clairement que les réactions d'oxygénation ou d'hydroxylation se sont produites sur la chaîne latérale en position 3 et non sur le noyau benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

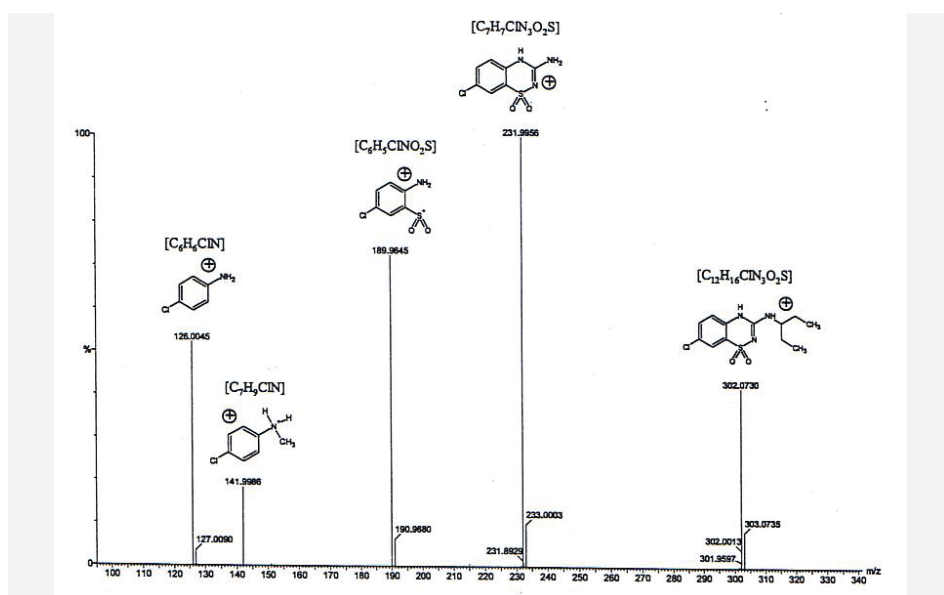


Figure 71 : Spectre LC-MS/MS de l'ion moléculaire du pic parent (m/z 302 [M+H]⁺) obtenu par l'utilisation d'une source d'ionisation de type électrospray avec les propositions de formules et de structures chimiques des ions fils.

Le dérivé M1 présente exactement le même spectre de fragmentation que le métabolite M1 obtenu avec le BPDZ 73. Il s'agit donc du dérivé 3-amino.

Le dérivé M2 avec une masse de rapport m/z égal à 334 est probablement un métabolite dihydroxylé sur la chaîne latérale en position 3.

Les métabolites M3, M4 et M5 seraient, quant à eux, des dérivés de type monohydroxylé sur la chaîne latérale en position 3.

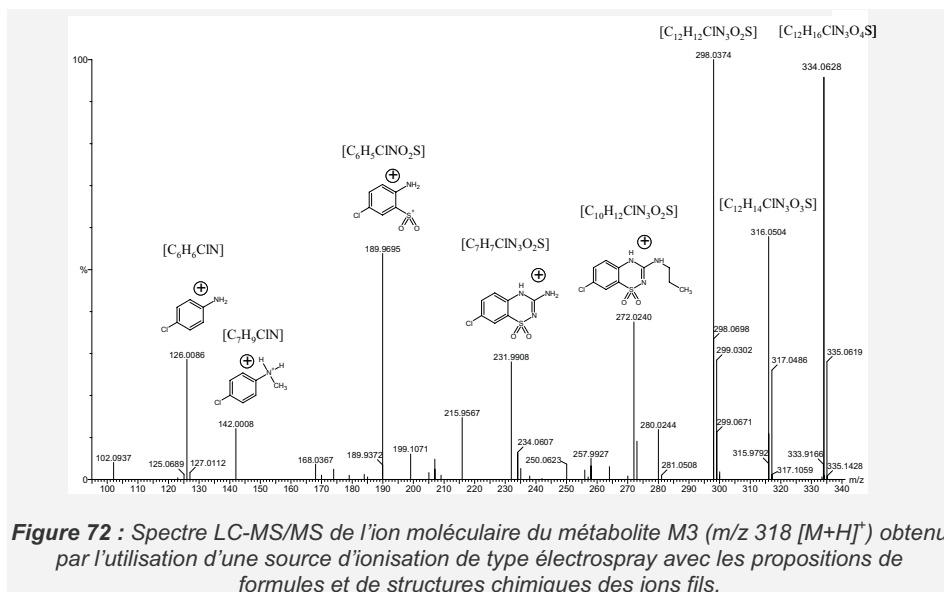
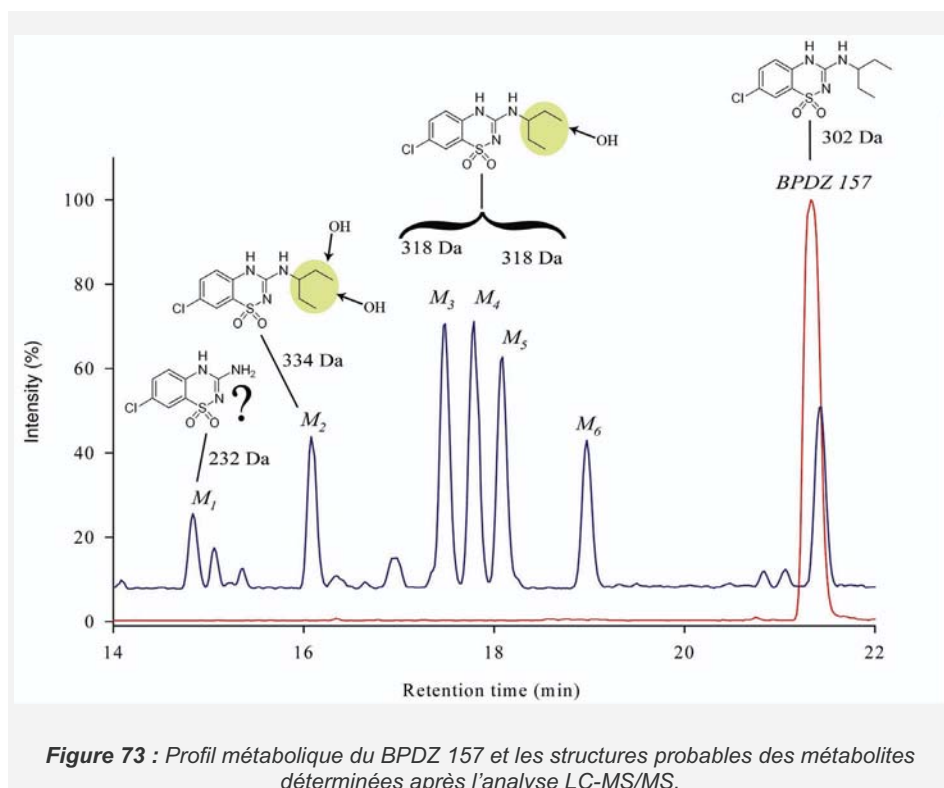


Figure 72 : Spectre LC-MS/MS de l'ion moléculaire du métabolite M3 (m/z 318 $[M+H]^+$) obtenu par l'utilisation d'une source d'ionisation de type électrospray avec les propositions de formules et de structures chimiques des ions fils.

Par comparaison aux dérivés M3, M4 et M5, la variation détectée (14 Da) pour M6 n'est pas exactement égale à la masse d'un atome d'oxygène mais peut s'expliquer par la formation d'un groupement cétonique.

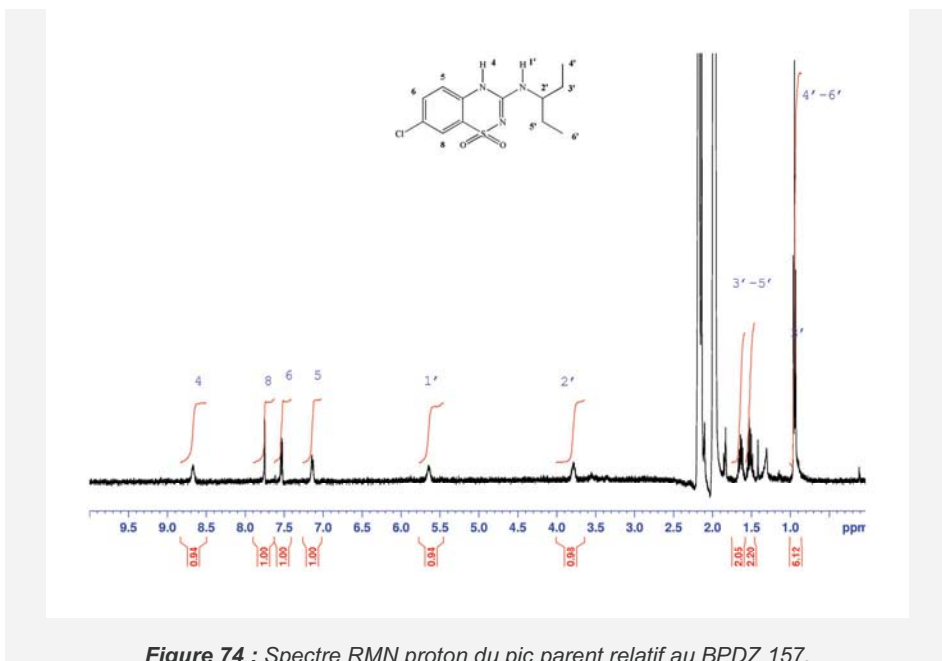
La figure 73 résume les informations pouvant être retenues de l'analyse par LC-MS/MS. Cette approche, si elle apporte certaines réponses laisse cependant de grandes indéterminations quant à la position exacte des groupements hydroxyles sur la chaîne latérale 3-pentylamino.



Afin de lever les indéterminations structurales non élucidées après l'analyse des données de spectrométrie de masse, les différents métabolites M1 à M6 et le pic parent ont été collectés sur cartouches SPE et les spectres RMN protons et cosy ont été mesurés. Tout comme pour les métabolites du BPDZ 73, les quantités introduites dans la sonde RMN sont de l'ordre de quelques dizaines de μg tout au plus. Ces faibles quantités posent bien évidemment des difficultés dans l'obtention de rapport signal-bruit acceptable pour l'intégration des signaux. Par ailleurs, à ce niveau de concentration, les impuretés provenant des solvants HPLC ou d'autres contaminations extérieures peuvent rapidement s'avérer gênantes. Ainsi, des signaux parasites se retrouvent presque systématiquement aux environs de 1.8 ppm.

Le spectre proton du pic parent est identique à celui du BPDZ 157 (Figure 74)., Outre les signaux aromatiques et le signal du NH situés dans la zone au delà de 5 ppm, ce spectre montre bien la structure de la chaîne alkyle. En effet, quatre signaux aliphatiques semblent coupler entre eux, l'un intégrant pour un proton aux environs de

4 ppm, le second et le troisième, près de 1.8 ppm, intégrant chacun pour deux protons et enfin un signal intégrant pour six protons vers 1 ppm. La durée de prise de ce spectre est de 15 minutes seulement pour un nombre de scan de 256. la qualité du rapport signal-bruit pourrait être améliorée par l'augmentation le nombre de scan.



Nous ne reviendrons pas sur les données RMN relatives au métabolite M1 qui sont identiques à celles recueillies avec le métabolite M1 du BPDZ 73 et confirme donc l'hypothèse d'une N-déalkylation.

M2 semble être un produit de dihydroxylation. Le spectre proton de ce composé montre clairement la disparition des deux groupements CH₂ au profit de deux signaux plus déblindés situés dans la zone des 4 ppm (figure 75). Les signaux des deux CH₃ sont toujours présents mais cette fois sous forme de deux massifs, preuve probable d'un agencement tridimensionnelle de la chaîne 3-alkylaminée non symétrique. La structure aromatique est conservée.

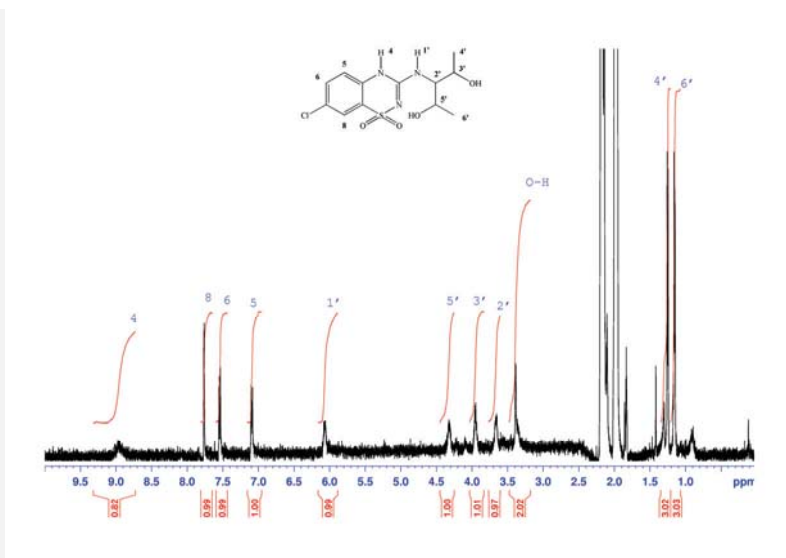


Figure 75 : Spectre RMN proton du métabolite M2.

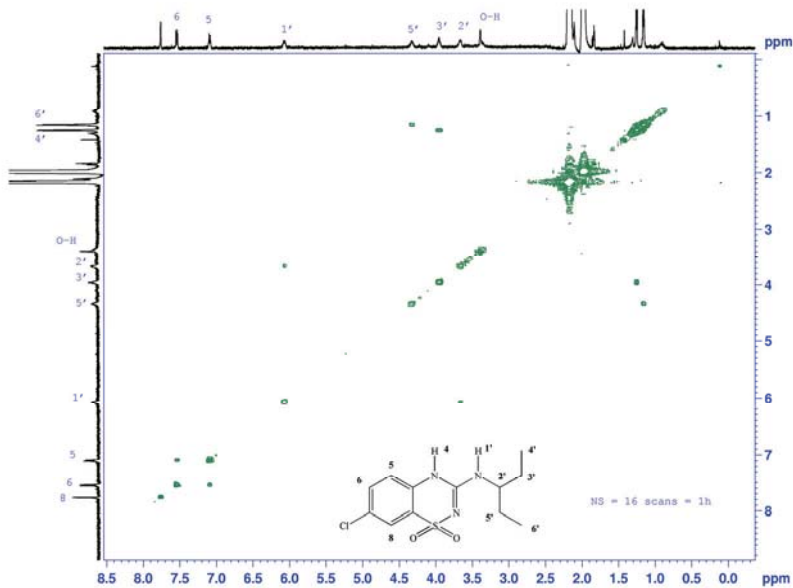
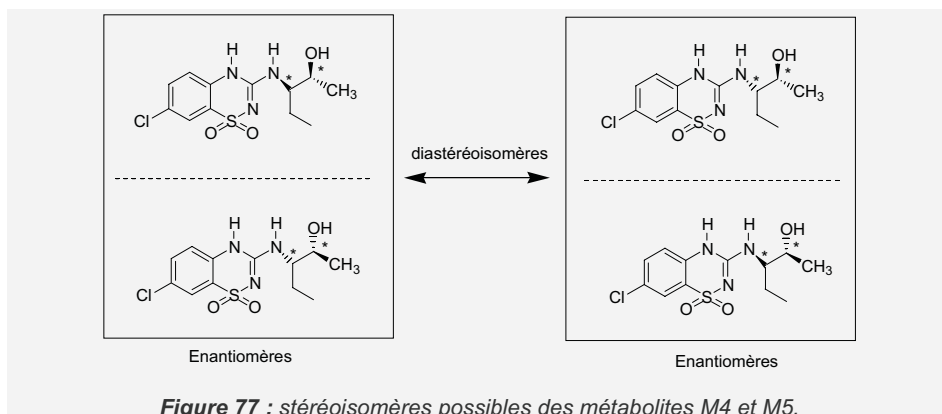


Figure 76 : Spectre RMN cosy du métabolite M2.

Le spectre 2D cosy visualise les couplages ^3J existant dans la molécule et permet de mieux attribuer les signaux (figure 76). Ainsi, les couplages entre le NH 1' et le CH en 2' sont bien visibles. Il en est de même entre les CHOH 3' et 5' et les CH₃ 4' et 6', ce qui confirme le positionnement des deux hydroxyles. Pas de trace par contre du couplage entre le CH 2' et les CH 3' et 5'.

M3 est plus que probablement un composé monohydroxylé. L'analyse des spectres proton et cosy de ce composé obtenu après la LC-SPE nous permet d'affirmer que le groupement hydroxyle est venu se greffer sur un des CH₃ terminaux au niveau de la chaîne latérale en position 3. Il y a en effet disparition d'un signal relatif aux CH₃ tandis que les signaux des deux CH₂ et du CH sont toujours présents. Les couplages proton-proton valident cette hypothèse. Cette introduction rend la structure disymétrique et introduit un centre d'asymétrie sur le carbone en α du NH. Les données RMN ne permettent pas de définir la stéréochimie du métabolite M3.

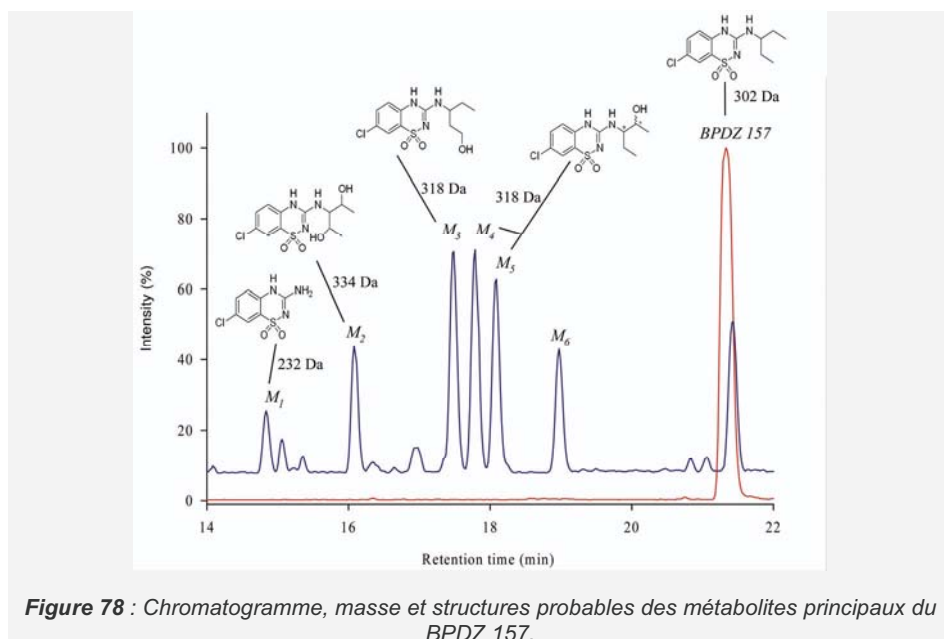
De stéréochimie, il en est également question pour les deux métabolites M4 et M5. en effet, les spectres RMN de ces deux composés sont extrêmement proches. La présence des CH₃ et la perte d'un signal CH₂ au profit d'un signal plus déblindé, couplé avec l'analyse des spectres cosy, plaident largement pour la présence d'un groupement hydroxyle en β du NH. L'introduction d'un OH dans cette position engendre l'apparition de deux centres stéréogéniques et dès lors la possible existence de 4 stéréoisomères sous la forme de deux couples d'énantiomères (Figure 77). M4 et M5 sont donc probablement diastéréoisomères entre eux.



Les techniques RMN utilisées dans ce cas ne permettent cependant pas de lever l'indétermination stéréochimique liée à ces deux métabolites. Les quantités isolées sont en effet trop faibles pour espérer obtenir des informations spatiales, par exemple par la prise de spectres 2D Noesy.

Malheureusement aucune information spectrale relevante n'a pu être obtenue avec le métabolite M6, la quantité isolée de ce métabolite est sans doute trop faible pour engendrer des données utilisables.

La figure 78 reprend les structures probables des différents métabolites du composé BPDZ 157.



Cette étude nous a montré que même si la RMN est une technique moins sensible que la spectrométrie de masse, elle fournit cependant des informations essentielles à la détermination structurale des composés organiques. L'utilisation combinée d'une plateforme de type LC-MS/MS (masse exacte) et d'un système LC-SPE-RMN a donc permis l'identification complète et la résolution structurale des métabolites du BPDZ 157 (exception faite de l'aspect stéréochimique) et ce sur seulement quelques µg de chaque métabolite.

La métabolisation du BPDZ 188 a également été étudiée. 5 métabolites principaux ont été identifiés comme le montre la figure 79.

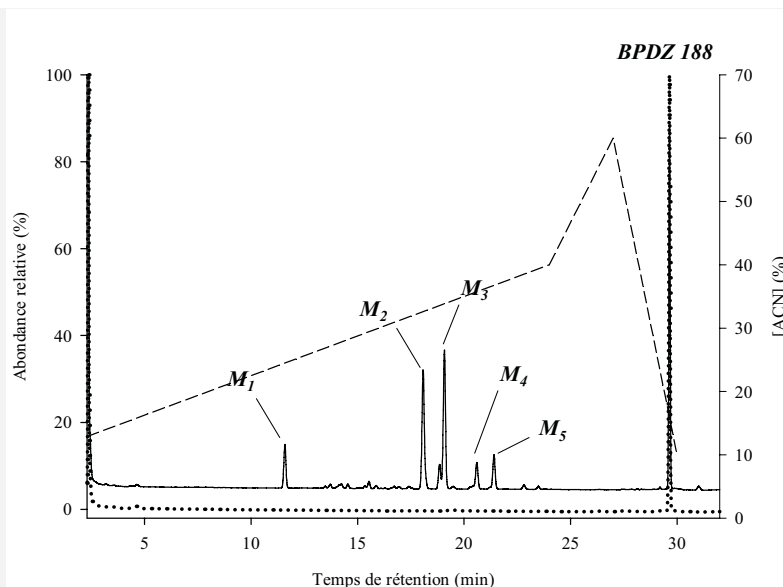


Figure 79 : Chromatogramme du profil métabolique du BPDZ 188 dans les conditions d'analyse LC-SPE-RMN. Légendes : BPDZ 188 non métabolisé ----- gradient en acétonitrile ; ——— BPDZ 188 métabolisé ;

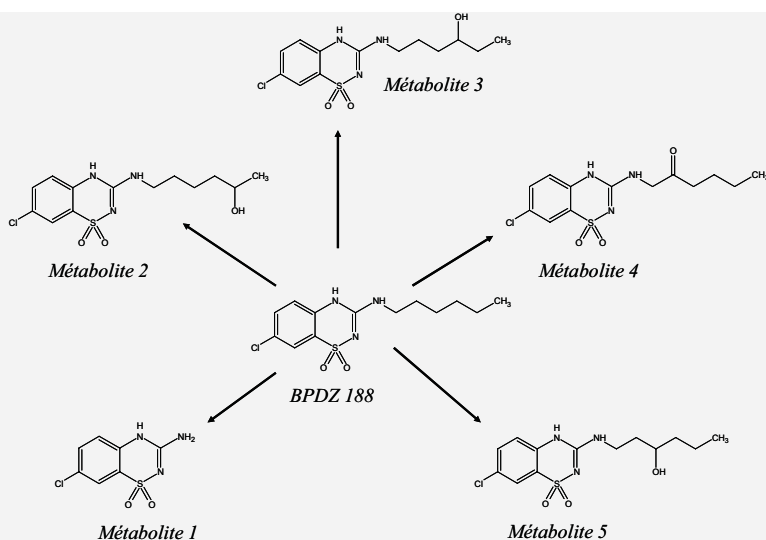


Figure 80 : structures potentielles des métabolites du BPDZ 188.

L'ensemble de ces composés a été analysé par LC-MS/MS et les trois premiers métabolites (M1-M3) par LC-SPE-RMN. Dans ce cas, c'est plus de 65 % de composé parent qui est métabolisé après 1 heure de réaction enzymatique.

Cette étude a donc permis de proposer les structures suivantes pour les métabolites du BPDZ 188 (Figure 80).

4.10.5 Conclusions de la métabolisation

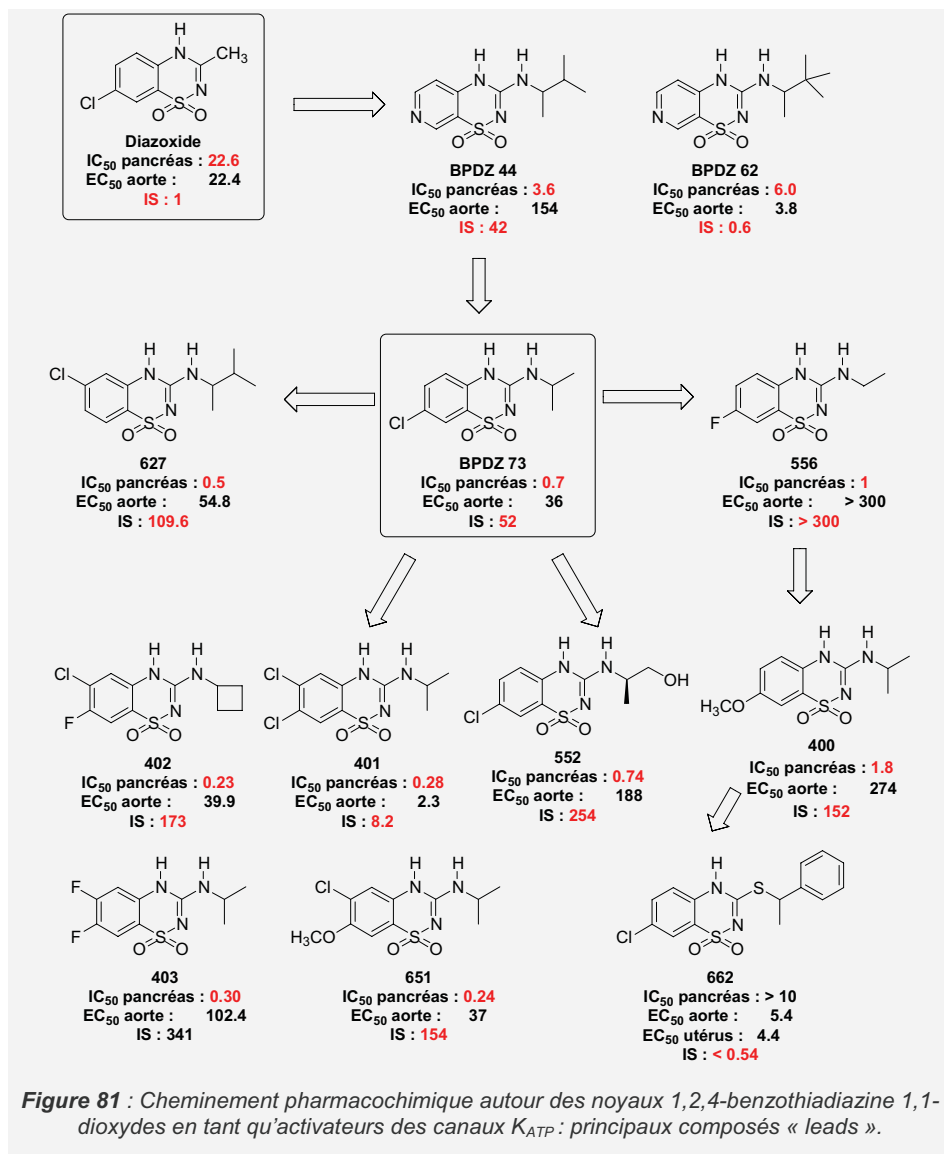
L'approche métabolique *in vitro* que nous avons envisagée sur certains 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1,-dioxides nous a permis dans un premier temps de mettre au point et de vérifier l'applicabilité de notre système LC-SPE-RMN à l'analyse de métabolites obtenus par action de microsomes. Par ailleurs, ces études ont parfaitement validé le concept de complémentarité entre les techniques LC-MS/MS et LC-SPE-RMN pour la détermination de structure de métabolites. Passé cet aspect purement technologique, cette étude nous a fourni des informations extrêmement importantes sur la stabilité métabolique de composés pharmacologiquement intéressants tels que le BPDZ 73. Les pôles de fragilité métabolique potentielle des composés de type 3-alkylamino ont donc pu être définis. Ces premières données, si elles doivent encore être confirmées par l'analyse d'autres composés de la même classe, vont nous amener à envisager de nouvelles pharmacomodulations destinées à augmenter la stabilité métabolique ou à modifier la voie de métabolisation des drogues. Ainsi, s'il s'avère que les dérivés de type 3-alkylamino perdent rapidement leur chaîne alkyle pour donner des métabolites de type 3-amino, dont le profil pharmacologique pourrait être responsable des effets secondaires négatifs de ces drogues, une stratégie visant à bloquer l'accès à cette chaîne lors de la métabolisation (par exemple en y introduisant un hétéroatome) pourrait s'avérer payante. Cette approche est donc d'une grande importance pour la meilleure compréhension de l'activité ou de la non-activité de nos composés *in vivo* et indispensable à la poursuite de leur développement en tant que médicament potentiel.

4.11. Les activateurs des canaux K_{ATP} : conclusions et perspectives.

Au départ de ce projet, il n'existait aucun composé décrit possédant une sélectivité pour les canaux potassiques sensibles à l'ATP du tissu pancréatique. Seul le diazoxide, une drogue relativement ancienne de la classe des benzothiadiazine 1,1-dioxydes, avait été présenté comme inhibant la sécrétion d'insuline *via* l'activation des canaux K_{ATP} des cellules B du pancréas. Malheureusement, cette drogue montrait parallèlement une activité antihypertensive importante. De ce fait, elle n'était donc pas « tissu-sélective ». Peu de développements pharmacochimiques avaient été entrepris dans la recherche d'activateurs des canaux potassiques de type SUR1, la plupart des travaux étant axés sur les sous-types SUR2 présents aux niveaux des fibres musculaires lisses et cardiaques.

L'intérêt grandissant pour les activateurs des canaux K_{ATP} pancréatiques dans le traitement potentiel de pathologies liées à une hypersécrétion d'insuline, les différents types de diabètes ou encore l'obésité, nous a confortés dans l'idée de rechercher des activateurs sélectifs du sous-type SUR1. Partant du diazoxide, peu actif sur les modèles pancréatique et aortique, les premiers travaux, par l'exploration de différentes modulations structurales autour du noyau 1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxyde, ont abouti à la découverte de composés présentant le profil espéré à savoir particulièrement puissants quand il s'agit d'inhiber la sécrétion d'insuline et peu actifs en tant qu'agents myorelâchants. Parmi ces drogues, les BPDZ 42, 44 et 62 sont apparus comme étant les premiers activateurs des canaux K_{ATP} puissants et sélectifs du tissu pancréatique décrits.

Sur base de ces composés « leads », nous avons envisagé le passage de la série pyridinique à la série benzénique. De larges pharmacomodulations ont été envisagées sur les différentes positions du noyau aromatique ainsi qu'en position 3 du cycle thiadiazine. La figure 81 schématise le cheminement pharmacochimique que nous avons suivi autour du noyau benzothiadiazine 1,1-dioxyde tout en présentant les composés les plus intéressants que nous avons découverts.



Cette recherche a non seulement permis d'atteindre largement les objectifs pharmacologiques que nous nous étions fixés, du moins dans les modèles *in vitro* mais nous a également amené à développer la chimie des benzothiadiazine 1,1-dioxydes insaturés. Les résultats encourageants nous ont également amenés à collaborer avec la société Novo-Nordisk qui s'est chargée d'étudier nos composés

dans d'autres modèles pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* tout en explorant les analogues thiophéniques de nos composés. Le développement et les bons résultats obtenus avec le composé thiophénique NN-414 a, par ailleurs, fait passer les séries pyridinique et benzénique au second plan. L'arrêt brutal et innattendu de cette drogue en phase clinique 2 a stoppé les recherches entreprises au sein de la société Novo-Nordisk sur ce sujet. Le fait qu'un thiénothiadiazine 1,1-dioxyde (NN-414) proche de la structure de nos meilleurs composés ait été développé jusqu'en phase clinique II pour le traitement du diabète et de l'obésité valide l'hypothèse de l'intérêt d'utiliser des activateurs des canaux K_{ATP} sélectifs dans le traitement de ces pathologies. Nous ne pensons pas que la toxicité relevée sur ce candidat médicament soit liée à un effet de classe car le diazoxide a été pendant très longtemps utilisé en clinique sans qu'un effet toxique soit relevé à ce niveau. Il nous semble donc possible de trouver au sein de nos séries de composés une drogue capable de donner les mêmes résultats positifs que le NN-414 tout en étant dénuée de l'hépatotoxicité supposée qui avait fait échoué ce candidat médicament.

Dans cette optique et compte tenu des informations que notre collaboration nous a livrées, il convient à présent d'optimiser la structure de nos composés « leads » afin d'en améliorer le profil pharmacocinétique et les paramètres ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion) tout en maintenant (ou en améliorant) leur profil pharmacodynamique. L'aspect « toxicité » des composés doit également être envisagé.

Nous avons vu par l'analyse de certains paramètres physico-chimiques mesurés avec les 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxydes que leur pKa et leur coefficient de partage ne semblaient pas particulièrement défavorables à une activité *in vivo*. En fonction de la cible pharmacologique visée, il est toujours possible de moduler certains de ces paramètres.

L'approche métabolique *in vitro* que nous avons envisagée par l'utilisation de microsomes de rats nous a, par contre, fourni des données extrêmement utiles dans l'analyse des résultats *in vivo* de nos composés. En effet, il semble que la chaîne latérale alkylamino soit particulièrement sensible à la métabolisation enzymatique des cytochrome P450 et qu'une *N*-déalkylation entraîne la formation en proportion plus ou moins importante de dérivés 3-amino qui pourraient potentiellement être responsables de l'activité hypotensive relevée avec plusieurs composés « leads » lors d'évaluation dans des modèles *in vivo*. Deux choses apparaissent dès lors intéressantes : d'une

part synthétiser ces métabolites de *N*-déalkylation et les évaluer dans les modèles pharmacologique *in vitro* et *in vivo* et d'autre part envisager de nouvelles pharmacomodulations orientées afin d'empêcher la métabolisation trop rapide de la chaîne alkylamino en position 3. Pour ce faire, nous pourrions nous appuyer sur l'analyse QSAR que nous avons effectuée sur une grande partie de nos composés et qui nous a fourni un modèle de pharmacophore pour les activités *in vitro* au niveau pancréatique et aortique mais également des données structurales importantes pour la sélectivité tissulaire. D'autres études de métabolisation doivent venir compléter la première analyse soit sur le même modèle de microsomes avec d'autres composés « leads », soit sur d'autres types de microsomes ou d'autres modèles.

Par ailleurs, une fois cet aspect métabolisation intégré, il conviendra de vérifier, notamment par des dosages plasmatiques la stabilité des drogues, ainsi que leur biodisponibilité.

Dans un second temps, la toxicité aiguë et chronique des nouveaux composés « leads » pourrait être mesurée chez l'animal.

Afin d'évaluer l'activité *in vivo* de nos dérivés, un modèle de mesures simultanées de la glycémie, de la pression sanguine et du rythme cardiaque doit être développé.

Enfin, il serait également intéressant d'investiguer l'action de plusieurs de nos drogues sur d'autres modèles pharmacologiques *in vitro* ou *ex vivo* par exemple au niveau des canaux K_{ATP} des mitochondries, du système nerveux central ou d'autres types de fibres musculaires lisses. En effet, ces cibles semblent présenter un intérêt thérapeutique important, comme le montrent des travaux récents.

Il apparaît donc clairement que l'histoire des arylthiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} , même si elle a déjà permis d'obtenir d'excellents résultats, n'est pas encore terminée. Compte tenu de l'utilité de découvrir des drogues actives dans le traitement de pathologies liées notamment à des désordres de l'homéostasie du glucose [de Tullio et al. 2006c] et de l'intérêt que certaines sociétés pharmaceutiques ont montré récemment pour nos séries, l'optimisation de nos composés « leads » en vue d'obtenir des produits potentiellement utilisables en tant que médicaments devient une priorité. Ce développement va nous demander d'intégrer dans notre approche pharmacochimique des paramètres tant pharmacocinétiques que pharmacodynamiques.

Chapitre 5 :

Les modulateurs allostériques positifs des récepteurs glutamatergiques de sous-type AMPA

5.1. Le système glutamatergique

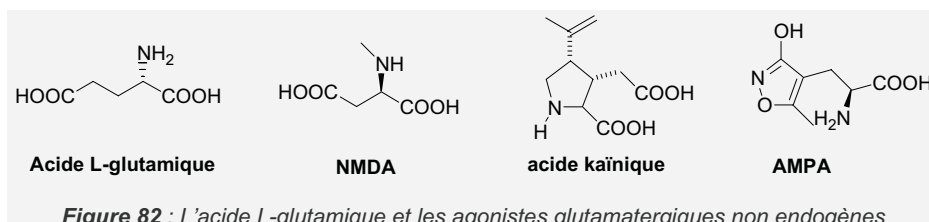
L'acide glutamique, plus connu sous le vocable L-glutamate (Figure 82), est avec le GABA (acide γ -aminobutyrique) et la glycine un des principaux neurotransmetteurs de la classe des acides aminés. Comme tous les neurotransmetteurs, il s'agit de molécules synthétisées et stockées dans un neurone présynaptique, libérées par la terminaison axonique de ce neurone après stimulation, et exerçant une action directe sur une cellule post-synaptique. Tandis

que le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur, le glutamate est, quant à lui, le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central [Headley et al. 1990]. Ensemble, le GABA et le glutamate maintiennent un équilibre entre inhibition et excitation neuronale.

Au glutamate sont bien évidemment associés des récepteurs qui sont principalement localisés au niveau du système nerveux central (SNC). Deux grands types de récepteurs glutamatergiques ont été décrits :

- D'une part les récepteurs métabotropiques (mGluRs) qui sont couplés à la phospholipase C ou à l'adénylate cyclase via les protéines G. Ils affectent divers processus métaboliques cellulaires, notamment ceux affectant la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} . Il existe au moins 8 sous-types différents de mGluRs, nommés mGluR1 à mGluR8 qui possèdent tous 7 domaines transmembranaires [Pin et al. 1995]. Ces récepteurs pourraient être impliqués dans la régulation de la transmission synaptique au niveau du système nerveux central, ainsi que dans la plasticité synaptique [Cooper et al. 2002]. D'autre part, des études ont montré que les récepteurs mGluR5s jouaient probablement un rôle essentiel dans les effets locomoteurs et la dépendance à la cocaïne [Chiamulera et al 2001].
- D'autre part les récepteurs ionotropiques (iGluRs) qui sont des canaux ioniques sensibles au glutamate. La liaison du glutamate à ce type de récepteurs provoque l'ouverture du canal ; la nature des ions qui passent au travers de celui-ci va dépendre du sous-type de récepteur, et influencera la fonction de ce récepteur.

Les iGluRs peuvent être scindés en trois sous-types principaux en fonction de leur affinité pour différents agonistes non endogènes : l'acide *N*-méthyl-D-aspartique (NMDA), l'acide kaïnique (KA) et l'acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-yl)propionique (AMPA) (Figure 62).



Les récepteurs à l'acide *N*-méthyl-D-aspartique ou récepteurs NMDA sont des canaux de haute conductance perméables aux ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Le courant ionique induit par les récepteurs NMDA dépend de la présence du ligand, mais aussi de l'absence d'ions Mg^{2+} qui obstruent le canal au potentiel de repos. En cas de dépolarisation membranaire, les ions Mg^{2+} libèrent le pore, ce qui permet le passage d'autres ions. Cela se produit généralement après l'activation des récepteurs AMPA situés au voisinage, dans les mêmes synapses [Bear et al. 2002]. L'activation des récepteurs NMDA jouerait un rôle crucial dans la plasticité synaptique, et serait impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation [Danyasz et al. 1995].

Les récepteurs à l'acide kaïnique ou récepteurs KA sont encore mal connus et difficilement distingués des récepteurs AMPA. Cela est dû à la colocalisation des récepteurs KA avec les autres sous-types de récepteurs glutamatergiques ionotropiques [Bleakman, 2002] ainsi qu'au manque d'agents pharmacologiques réellement spécifiques aux récepteurs KA [Bettler et al. 1995].

Les récepteurs à l'acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-yl)propionique ou récepteurs AMPA sont, quant à eux, impliqués dans la neurotransmission glutamatergique excitatrice rapide. Ils sont perméables à la fois aux ions Na^+ , K^+ et, dans une moindre mesure, Ca^{2+} . A des valeurs normales du potentiel de membrane, leur activation a pour principal effet de provoquer une entrée d'ions Na^+ dans la cellule, ce qui entraîne une dépolarisation rapide et massive [Bear et al. 2002]. Les récepteurs AMPA interviendraient également dans les processus neuronaux liés à la mémorisation.

Pour des raisons à la fois pharmacologiques et chimiques, c'est à ces derniers sous-types de récepteurs glutamatergiques que nous nous sommes particulièrement intéressés. C'est pourquoi nous continuerons par une description plus détaillée de la structure des récepteurs AMPA.

5.2. La structure des récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont des canaux ioniques résultant de l'assemblage homo ou hétéromérique de 4 sous-unités (GluR1, 2, 3 ou 4) (Figure 83). Le canal tétramérique fonctionnel est constitué de l'association de dimères de chaque

sous-unité GluRs dans une structure proche de celle des canaux potassiques [Robert et al. 2001, Doyle et al. 1998].

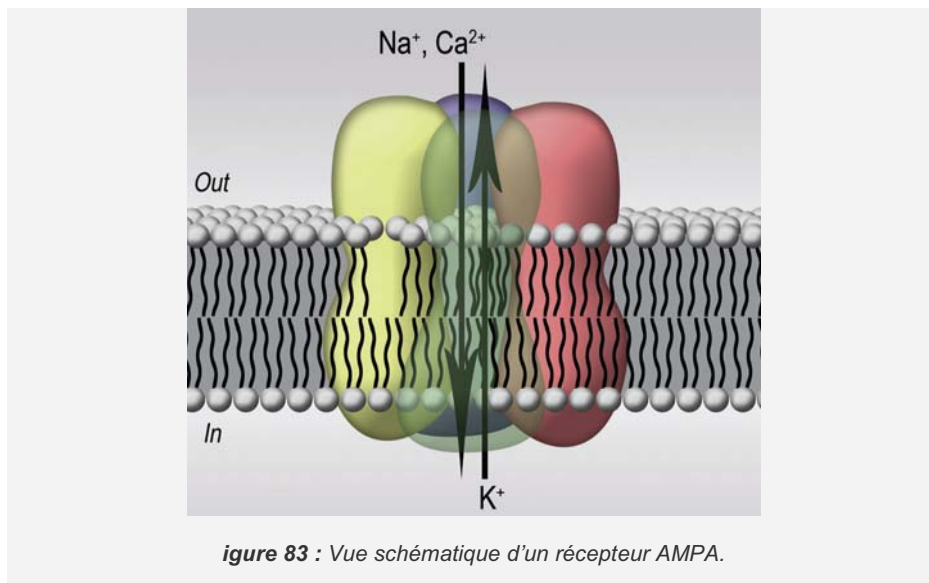


figure 83 : Vue schématique d'un récepteur AMPA.

Les sous-unités GluRs sont constituées de 900 à 1300 acides aminés. Comme représenté dans la figure 84, chaque sous-unité présente trois domaines transmembranaires (M1, M3, M4) ainsi qu'une boucle intramembranaire dénommée M2. Par ailleurs, deux domaines globulaires S1 et S2 s'associent en une poche formant ainsi le site de reconnaissance du ligand. L'extrémité *N*-terminale au delà de S1, composée d'environ 400 acides aminés, a été nommée ATD [Pasternack et al. 2002].

Pour chaque GluR, deux variantes appelées flip ou flop coexistent. Cette diversité provient du *splicing* alternatif du pré-ARN_m et amène à des différences dans la séquence d'acides aminés du domaine de structure hélicoïdale proche de S2 (domaine « flip/flop », Figure 84). Ces formes alternatives possèdent des propriétés pharmacologiques distinctes et ne sont pas exprimées de manière égale dans les régions du cerveau. Le domaine flip/flop pourrait permettre la stabilisation de la poche constituée par S1 et S2.

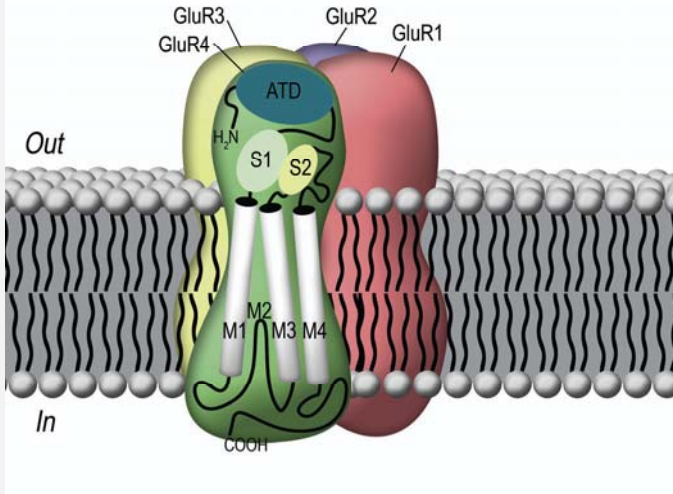


Figure 84 : Vue schématique d'une sous-unité GluR.

A côté du récepteur à l'AMPA ou au glutamate, plusieurs sites dits « allostériques » ont également été identifiés. Ces sites interagiraient directement avec le site glutamatergique et fournissent une cible de choix aux pharmacochimistes comme nous le verrons plus loin.

La liaison du glutamate au récepteur AMPA provoque l'ouverture du canal ionique et l'entrée d'ions sodium. Ce flux d'ions Na⁺ entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique avec l'apparition d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). La réponse glutamatergique peut se terminer soit par la dissociation du ligand du récepteur et fermeture du canal (désactivation), soit par la fermeture du canal en présence de l'agoniste (désensibilisation). Les cinétiques de désactivation et de désensibilisation influencent le modelage des signaux entre neurones (l'amplitude, la durée et la fréquence). Le phénomène de désensibilisation serait particulièrement important pour les récepteurs AMPA puisqu'il se produirait par un réarrangement au niveau de l'interface des dimères, provoquant ainsi un changement de conformation entre le pore du canal et la poche S1/S2 [Sun et al. 2002].

Vu la diversité structurale des récepteurs AMPA, la réponse postsynaptique au signal présynaptique varie selon la région cérébrale où se situe le récepteur

AMPA excité. En effet, il a été démontré que la perméabilité des canaux aux ions et la vitesse de désactivation et de désensibilisation des récepteurs pouvaient être influencées par divers facteurs tels que :

- La nature des sous-unités (les canaux imperméables au Ca^{2+} sont composés de GluR2 tandis que les canaux perméables au Ca^{2+} ne possèdent pas de GluR2) [Hollmann et al. 1991].
- Les modifications post-transcriptionnelles (*editing* de l'ARN ou *splicing* alternatif) : par exemple, la forme flip est moins vite désensibilisée dans les GluR3 et 4) [Brusa et al. 1995, Feldmeyer et al. 1999, Sommer et al. 1990].
- Les modifications post-transcriptionnelles telles que la glycosylation [Mayer et al. 1989] et la phosphorylation de résidus sérine des récepteurs.

Les récepteurs AMPA exhibent donc un haut degré d'hétérogénéité.

5.3. Les implications physiologiques de la modulation des récepteurs AMPA.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les implications des récepteurs glutamatergiques en thérapie sont nombreuses.

Le glutamate et ses récepteurs semblent, par exemple, impliqués de manière prépondérante dans le développement du SNC, dans la plasticité synaptique et dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire [Maren et al. 1995]. Ils joueraient aussi un rôle trophique dans la croissance de nouveaux neurones [Crair 1999]. Il a également été démontré qu'un désordre dans la stimulation de ces récepteurs pouvait avoir des conséquences extrêmement sérieuses. Une stimulation excessive des récepteurs entraîne des effets neurotoxiques (décrits sous le terme « excitotoxicité ») conduisant à la mort neuronale [Beal 1992]. Cette suractivation est décrite comme étant, au moins partiellement, impliquée dans diverses neuropathologies parmi lesquelles l'ischémie cérébrale, l'épilepsie et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Huntington et la maladie d'Alzheimer. C'est pour cette raison que bon nombre d'études ont été menées afin de découvrir des antagonistes compétitifs, notamment des récepteurs AMPA [Stendbøl et al. 2002].

Plusieurs familles chimiques de drogues capables d'antagoniser de manière sélective et compétitive les récepteurs AMPA ont d'ailleurs été synthétisées. Citons dans le désordre :

- Les composés structurellement proches de l'AMPA tel que l'AT PO (Figure 85).
- Les décahydroisoquinolines tels que le LY293558 (Figure 85).
- Les quinoxalinediones tels que le CNQX et le NBQX (Figure 85).
- Les isatines oximes tels que le SPD502 (Figure 85).
- Les indenoimidazones tels que le RPR117824 (Figure 85).

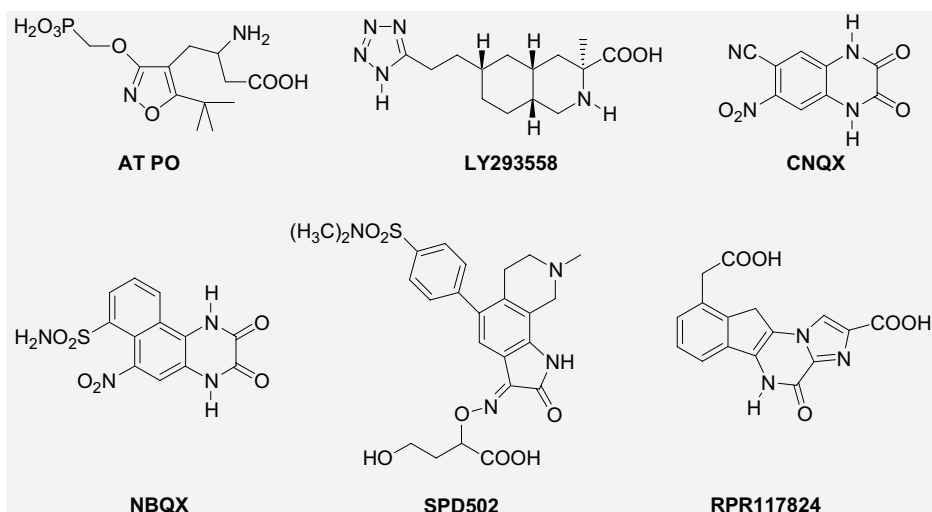
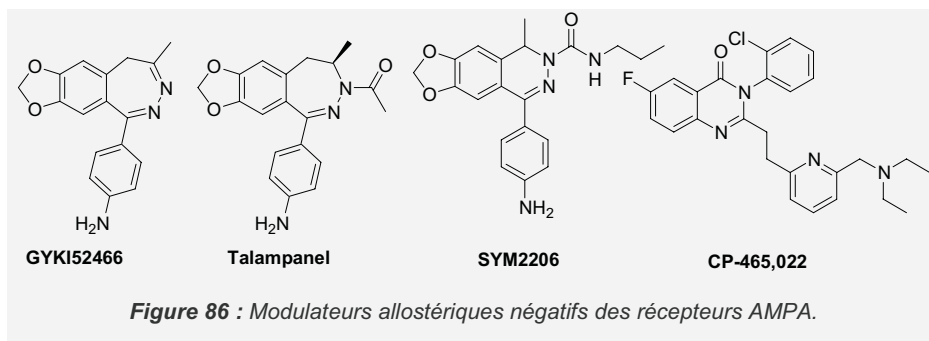


Figure 85 : Antagonistes des récepteurs AMPA.

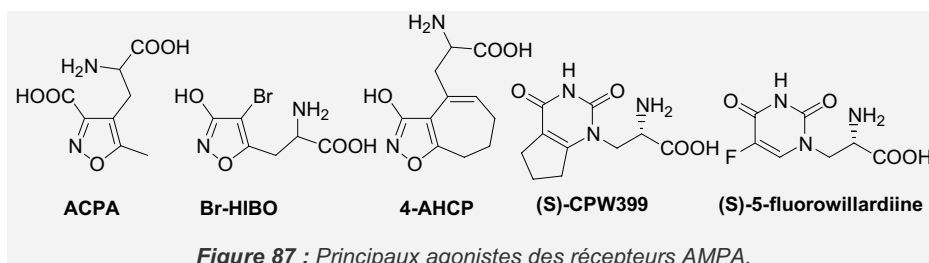
Testées dans des modèles *in vivo* animaux, certaines de ces drogues se sont montrées efficaces comme antiépileptiques [Chapman et al. 1991 ; De Sarro et al. 1998]. Par ailleurs, il a été démontré que des composés de cette classe pharmacologique pouvaient montrer des propriétés neuroprotectrices [McCracken et al. 2002, Mignani et al. 2002].

A côté des antagonistes AMPA compétitifs, il existe des composés capables d'antagoniser l'effet de l'AMPA mais de manière non compétitive : il s'agit de modulateurs allostériques négatifs dont le site de fixation est différent du site principal [Solyom et al. 2002]. Ces modulateurs possèderaient des activités

anticonvulsivantes, myorelâchantes et neuroprotectrices [Tarnawa 2001]. Parmi les principales familles chimiques des modulateurs allostériques négatifs des récepteurs AMPA, il y a les 2,3-benzodiazépines avec par exemple le GYKI52466 et le talampanel (Figure 86) qui est actuellement testé en phase clinique en tant qu'agent antiépileptique potentiel [Langan et al. 2003]. Signalons encore dans d'autres familles le SYM2206 et le CP-465,022 (Figure 86).



Au vu du rôle physiologique du glutamate et de ses récepteurs, il a été postulé qu'un hypofonctionnement glutamatergique peut être responsable de déficits cognitifs liés à l'âge ou à des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [Francotte et al. 2004]. L'effet bénéfique d'une activation des récepteurs glutamatergiques pourrait également se marquer dans des pathologies telles que la schizophrénie ou la dépression [Lynch et al. 1998]. L'augmentation des courants glutamatergiques, et plus spécifiquement AMPA, a donc également constitué un axe important de recherches pharmacologiques. C'est pourquoi une série de puissants agonistes AMPA a été développée ; citons par exemple l'ACPA, l'acide bromoboténique (Br-HIBO), le 4-AHCP, le (S)-CPW399 et la (S)-5-fluorowillardiine (Figure 87).



Malheureusement, malgré leur intérêt thérapeutique, les agonistes AMPA semblent provoquer une importante excitotoxicité. Ils sont, de ce fait, difficilement utilisables en thérapeutique et demeurent pour l'instant d'intéressants outils pharmacologiques.

De même qu'il existe des sites allostériques permettant la liaison de modulateurs négatifs, il est également possible de moduler allostériquement et positivement les récepteurs AMPA. Cette perspective semble plus appropriée que l'utilisation d'agonistes purs et ce pour plusieurs raisons. D'une part, pour être actifs et augmenter les courants AMPA, les modulateurs allostériques positifs requièrent la présence de l'agoniste endogène ce qui permet une modulation plus fine du signal exciteur. D'autre part, cette approche entraîne une toxicité nettement moindre que la stimulation directe. Les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA (ou « potentialisateurs AMPA ») agiraient principalement en réduisant ou en supprimant le phénomène de désensibilisation, ce qui augmente les courants synaptiques excitateurs rapides. Sans que le mécanisme d'action précis ne soit connu, il semble que les potentialisateurs AMPA augmentent également l'affinité du glutamate pour les récepteurs AMPA.

5.4. Les différentes familles chimiques constituant les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.

Compte tenu des intérêts thérapeutiques des potentialisateurs AMPA, plusieurs familles chimiques ont été développées au cours de cette dernière décennie. Cet intérêt a bien entendu amené de nombreuses compagnies pharmaceutiques à s'intéresser aux modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. La majorité des développements récents se fait donc à l'ombre de nombreux brevets. Nous conformant à l'optique de ne pas parler des brevets, nous ne présenterons ci-après que les recherches ayant fait l'objet de publications scientifiques. Plusieurs revues récentes documentent cependant assez bien les développements industriels [Francotte et al. 2006].

5.4.1. Les biarylpropylsulfonamides

Grâce à une étude de « high-throughput screening » effectuée à partir de sa base de données chimiques, la société Eli Lilly a pu identifier la famille chimique des biarylpropylsulfonamides comme potentiellement intéressante en tant que nouvelle classe de potentialisateurs AMPA. Parmi les drogues issues de ces recherches, il est possible de citer les deux composés « leads » que sont le LY392098 et le LY404187 (Figure 88) [Gates et al. 2001, Miu et al. 2001, Baumbarger et al. 2001, Vandergriff et al. 2001]. Ces deux dérivés augmentent la fonction cognitive dans différents modèles animaux [Quirk et al. 2002] et seraient potentiellement actifs dans des tests évaluant l'effet antidépresseur [Li et al. 2003].

Par ailleurs, le LY404187 augmenterait *in vivo* l'expression du BDNF (« brain derived neurotrophic factor »), un agent neurotrophique cérébral impliqué dans les troubles bipolaires et de l'humeur [Mackowiak et al. 2002, Hashimoto et al. 2004].

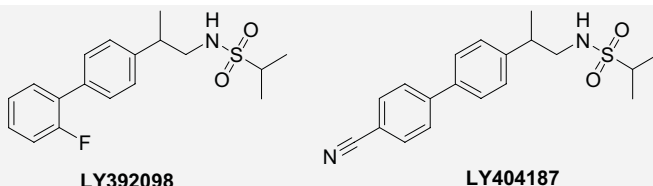


Figure 88: Principaux modulateurs allostériques positifs AMPA de la série biarylpropylsulfonamide.

5.4.2. Les dérivés benzamides ou ampakines.

Les dérivés benzamides, aussi appelés « ampakines », représentent une autre famille chimique de potentialisateurs AMPA. L'aniracétam (Figure 89) est le composé « lead » de cette série. Proche du piracétam (Nootropil®) déjà proposé comme potentialisateur glutamatergique, l'aniracétam module positivement les récepteurs AMPA, même si sa puissance semble limitée. Des essais cliniques montrent qu'à fortes doses, il aurait un effet bénéfique chez des patients souffrant de déficits cognitifs [Lee et al. 1994]. Dans un test chez le rat, il a été également démontré qu'il pouvait présenter des propriétés antidépresseurs [Nakamura et al. 2001].

Les ampakines agiraient par ralentissement de la désactivation des récepteurs AMPA [Arai et al. 1998].

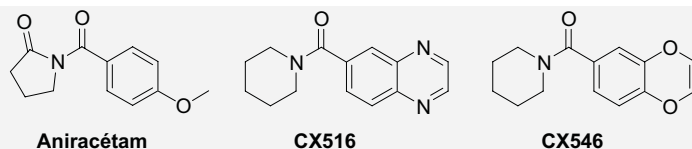


Figure 89: Principaux modulateurs allostériques positifs AMPA de la famille des ampakines.

D'autres composés de cette famille ont également été développés tels que le CX516 et le CX546 (Figure 89) [Arai et al. 2002]. Ces deux composés, dont le mode d'action et le site d'action sont différents, sont capables dans divers tests animaux d'augmenter *in vivo* les performances cognitives [Granger et al. 1996, Hampson et al. 1998]. Suite à des résultats encourageants en essais cliniques chez des volontaires sains et des personnes âgées, le CX516 est entré en essai clinique sur des patients souffrant de déficits cognitifs [Johnson et al. 2002].

5.4.3. Le PEPA et le GT005.

Il s'agit ici de composés isolés qui ne forment pas à proprement parler une nouvelle famille de potentialisateurs AMPA.

Le PEPA (Figure 90) est une molécule découverte récemment, structuralement proche de benzothiadiazine 1,1-dioxydes ouverts et qui a pour principal intérêt de potentialiser spécifiquement les récepteurs AMPA d'isoformes flop [Sekiguchi et al. 2002].

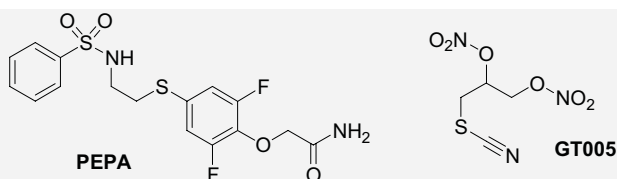


Figure 90: PEPA et GT005.

Le GT005 (Figure 70) est un dérivé apparenté à la nitroglycérine et de la famille des organonitrés. Il a été décrit comme modulateur allostérique positif du

courant AMPA mais semble dénué d'intérêt thérapeutique vu les effets périphériques attribués généralement à la classe des organonitrés [Toong et al. 2001].

5.4.4. Les benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Nous terminerons cette partie introductive par les benzothiadiazine 1,1-dioxydes. Cette famille de potentialisateurs du courant AMPA, que nous avons par ailleurs déjà décrite dans le chapitre 2, est en fait la plus importante. La naissance de cette série est basée sur la découverte de l'activité potentialisatrice de plusieurs composés tels que le cyclothiazide et le diazoxide (Figure 91) sur le courant AMPA [Partin et al. 1993, Impagnatiello et al. 1997]. Les premières pharmacomodulations ont permis de mettre en évidence que la réduction de la liaison double du diazoxide donnait naissance à l'IDRA-21, un composé, sensiblement plus puissant que son homologue insaturé [Bertolino et al. 1993, Zivkovic et al. 1995].

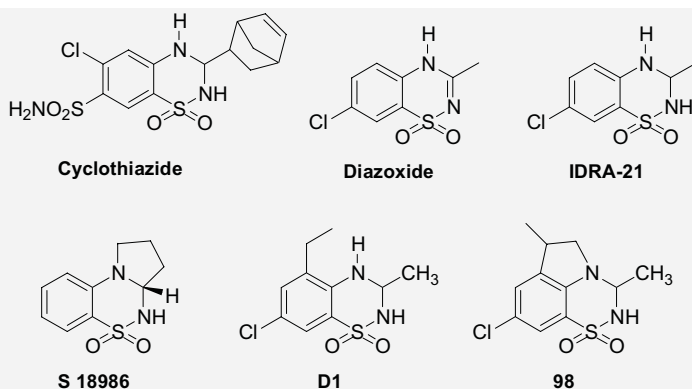


Figure 91 : La famille des benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant que potentialisateurs AMPA.

La société Servier a par ailleurs développé une série d'analogues « pyrrolo » de l'IDRA-21 [Desos et al. 1996]. Le composé S 18986 (Figure 91), et qui est l'énantiomère S, apparaît comme le composé « lead » de cette série. Des études *in vivo* ont démontré qu'il pouvait faciliter une forme de mémoire

épisode chez le rat. Sa bonne biodisponibilité et sa longue durée d'action l'ont amené jusqu'en phase clinique II [Lebrun C. et al. 2000].

Citons enfin les travaux de Chamberlain et de son équipe qui ont mis en évidence les potentialités de composés substitués en position 5, cycliques ou non [Phillips et al. 2002]. Les deux composés les plus puissants sont les dérivés D1 et **98** (Figure 91).

5.5. Le développement de modulateurs allostériques positifs au sein du laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège.

Ainsi que le montrent les travaux réalisés autour des activateurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP, notre laboratoire possède une solide expérience dans la chimie des arylthiadiazine 1,1-dioxydes. Compte tenu de l'intérêt thérapeutique potentiel des récepteurs AMPA et de la structure benzothiadiazinique de certains modulateurs allostériques positifs, il nous est apparu relativement évident de nous intéresser au développement de nouveaux potentialisateurs AMPA structuralement proches du diazoxide et de l'IDRA-21. Ces travaux ont été entrepris dans le cadre d'une collaboration avec la société pharmaceutique Servier qui se charge de l'évaluation pharmacologique de l'ensemble de nos composés. Cette collaboration est plus que jamais active et a engendré la prise de nombreux brevets (Cf. Annexe 19). Pour des raisons de confidentialité et compte tenu de l'intérêt démontré par plusieurs séries de dérivés, il ne nous a pas été possible de présenter dans ce manuscrit l'ensemble des structures et des résultats pharmacologiques générés dans cette classe. De même, la publication des résultats est retardée.

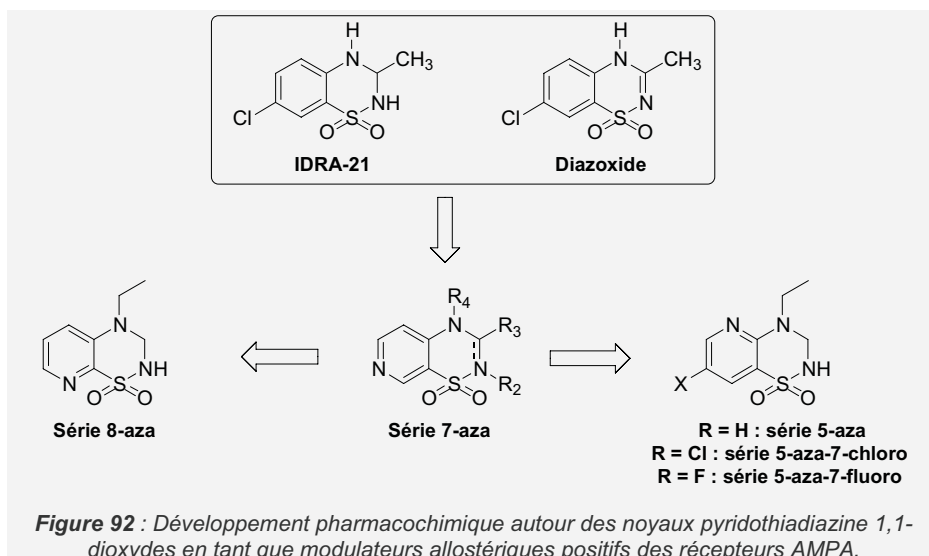
Au début de ces recherches, seule l'action du cyclothiazide, du diazoxide et de l'IDRA-21 avait été décrite. Peu de travaux de pharmacomodulations avaient donc été réalisés et nous ne disposions que de très peu d'informations sur les requis structuraux nécessaires dans cette série chimique pour augmenter de manière allostérique le courant lié aux récepteurs AMPA.

Tout comme cela a été le cas pour les activateurs des canaux K_{ATP} , nous avons débuté les premières investigations par la préparation et l'évaluation

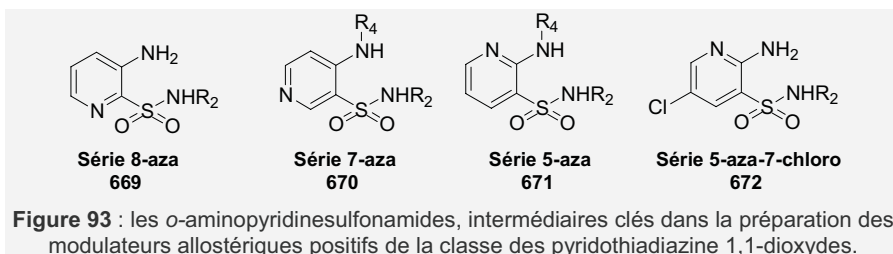
pharmacologique d'analogues pyridiniques du diazoxide et de l'IDRA-21. Ces travaux préliminaires ayant déjà fait l'objet d'une présentation dans la thèse d'agrégation du Professeur Pirotte, nous nous contenterons de résumer les stratégies de synthèse utilisées, de commenter les résultats pharmacologiques les plus pertinents et d'en tirer les relations structure-activité qui nous ont été utiles pour le développement des séries benzéniques.

5.6. La pharmacochimie des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.

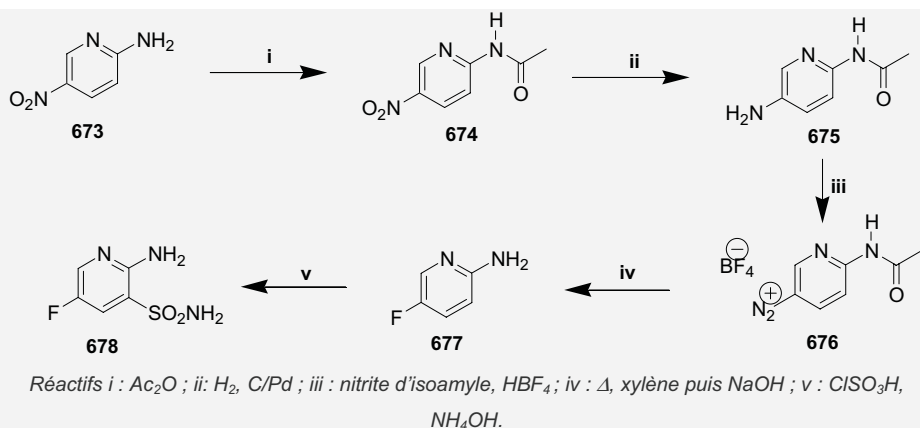
Comme cela est schématisé sur la figure 92, ce sont les séries pyridiniques 5-aza, 7-aza et 8-aza qui ont tout d'abord été investiguées. Des composés saturés et insaturés proches du diazoxide et de l'IDRA-21 ont été synthétisés et évalués surtout en série 7-aza. Les positions 2, 3 et 4 ont été modulées en y introduisant principalement des chaînes alkyles courtes. L'azote pyridinique a ensuite été placé en positions 5 et 8. La série 6-aza, comme signalé dans le chapitre 4, n'a pas été développée pour des raisons d'instabilité potentielle des intermédiaires de synthèse.



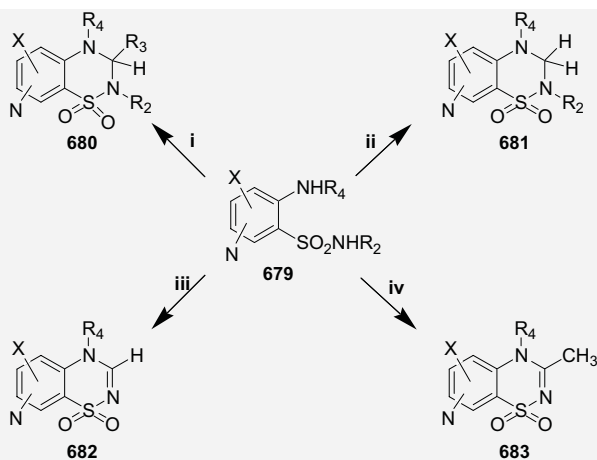
Dans les stratégies de synthèse applicables à la préparation de ces séries de composés, les *o*-aminopyridinesulfonamides apparaissent comme étant les intermédiaires clés. En fonction des schémas employés, ils peuvent être non-substitués, substitués sur la fonction amine ou sur la fonction sulfonamide (**669** à **672**, Figure 93). Ils sont obtenus suivant des méthodes mises au point au sein de notre laboratoire et déjà utilisées pour la préparation des activateurs des canaux K_{ATP} [de Tullio et al. 1995a, 1995b et 1996].



La synthèse de la 2-amino-5-fluoropyridine (**678**, Schéma 80), qui permet d'aboutir à la série 5-aza-7-fluoro, a été entreprise beaucoup plus récemment et suit un procédé décrit dans la littérature [Hand et al. 1989]. Quatre étapes sont nécessaires pour l'obtention du dérivé **677**. La 2-amino-5-nitropyridine (**673**) commerciale sert de point de départ à ce schéma ; par acétylation dans l'anhydride acétique, elle donne l'intermédiaire **674** qui peut subir une réduction de la fonction nitro en amino par hydrogénation au charbon palladié. L'amine primaire du composé ainsi obtenu (**675**) peut alors subir une réaction de diazotation selon les conditions de Balz-Schieman au moyen du nitrite d'amyle comme agent nitrosant et en présence d'acide tétrafluoroborique. Le sel de diazonium ainsi synthétisé (**676**) est fortement stabilisé par le groupement acétamido en para ainsi que par le contre-ion tétrafluoroborate [Sykes 1986] et peut donc être isolé du milieu réactionnel par simple filtration. Il peut ensuite subir une thermolyse dans le xylène (substitution nucléophile en *ipso*), dans laquelle N_2 , bon groupement partant, est substitué par un fluor de l'anion tétrafluoroborate suivie d'une hydrolyse alcaline pour aboutir au composé voulu (**677**).

**Schéma 80** : Synthèse de la 2-amino-5-fluoropyridine.

L'étape suivante consiste en une chlorosulfonation classique suivant une méthode décrite dans la littérature. Elle s'est cependant révélée être particulièrement ardue et délicate à mettre au point dans cette série. En effet, le noyau aromatique est fortement désactivé et l'attaque sur l'électrophile nécessite un chauffage long et soutenu pour des rendements finaux relativement faibles.



Réactifs i : R_3COH , H^+ ; ii : HCOH , H^+ ; iii : HCOOCOCH_3 ou $\text{HC}(\text{OEt})_3$; iv : Ac_2O ou $\text{CH}_3\text{C}(\text{OEt})_3$.

Schéma 81 : Cyclisation des différentes o-aminopyridinesulfonamide

Une fois les *o*-aminopyridinesulfonamides obtenues (**679**, Schéma 81), la préparation des pyridothiadiazine 1,1-dioxydes dans les différentes séries est réalisée de manière tout à fait classique par action de divers agents de cyclisation [de Tullio et al. 1995b et Pirotte al 1998]. Ces agents peuvent être :

- L'orthoformiate d'éthyle ou l'anhydride mixte formique-acétique : ce qui fournit des composés insaturés non-substitués en position 3 (**682**).
- l'orthoacétate d'éthyle ou l'anhydride acétique : ce qui permet d'obtenir des composés insaturés méthylés en position 3 (**683**).
- Le formaldéhyde ou le paraformaldéhyde en catalyse acide : ce qui aboutit à des composés saturés non-substitués en position 3 (**681**).
- Différents aldéhydes aliphatiques : ce qui nous conduit aux dérivés saturés diversement substitués en position 3 (**680**).

Le schéma 81 reprend les différentes possibilités de cyclisation des *o*-aminopyridinesulfonamides envisagées.

L'évaluation pharmacologique *in vitro* de ces composés pyridiniques en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA a été réalisée sur ovocyte de *Xenopus* selon le protocole décrit plus loin pour les composés benzéniques. Les résultats sont exprimés sous forme d'EC2X ou d'EC5X qui représentent la concentration en drogue qui respectivement double ou quintuple le courant induit par l'AMPA. Les résultats complets obtenus avec les drogues de référence que sont le diazoxide et l'IDRA-21 seront détaillés au début du chapitre relatif à l'évaluation pharmacologique mais les valeurs d'EC2X de ces composés sont présentées dans la figure 93.

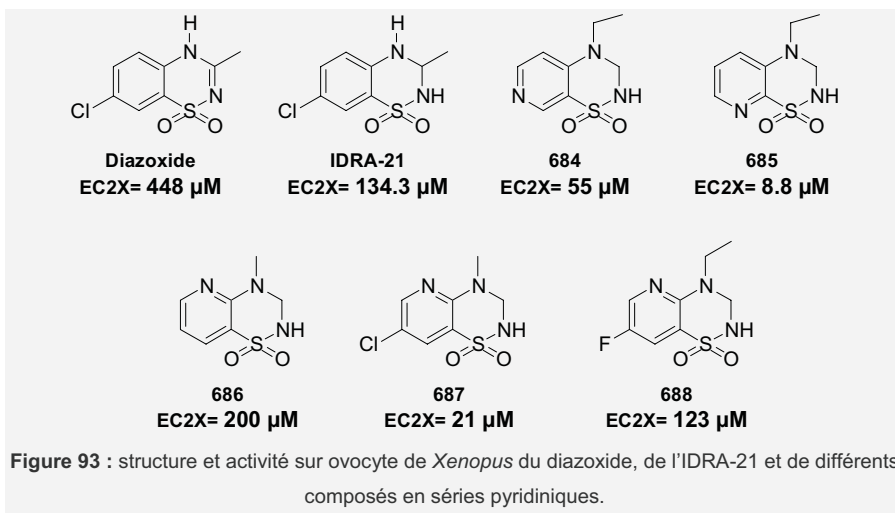
Bon nombre des premières relations structure-activité ont été établies à partir des résultats obtenus en série 7-aza avant d'être appliquées et vérifiées dans les autres séries pyridiniques et benzéniques [Pirotte et al. 1998].

Les constations principales relevées sont les suivantes :

- La « non-substitution » du noyau thiadiazine semble très défavorable à l'activité.
- Les analogues stricts du diazoxide et de l'IDRA-21 en série 7-aza sont légèrement moins actifs que leurs homologues chlorobenzéniques.

- Les composés saturés sont largement plus puissants que leurs analogues insaturés ; c'est pourquoi la plupart des modulations des positions 2, 3 et 4 ont été réalisées en série 3,4-dihydro.
- En position 3, l'augmentation de la taille et de l'encombrement de la chaîne alkyle au delà d'un groupement méthyle entraîne une baisse significative de l'effet des drogues dans le modèle pharmacologique choisi.
- le passage du substituant de la position 3 à la position 4 apparaît comme extrêmement favorable à la potentialisation des récepteurs AMPA. En effet, la présence d'un groupement méthyle, éthyle, voire isopropyle en position 4 semble encore très favorable à l'activité. Par contre, au delà de cet encombrement stérique, il est relevé une décroissance de la puissance des composés proportionnelle à la taille du substituant.
- Le passage du substituant de la position 4 vers la position 2, toujours en série « saturée » s'accompagne, une nouvelle fois, d'une forte diminution d'activité.
- Les disubstitutions par deux groupements méthyles en positions 2 et 3, 2 et 4 ou 3 et 4 ne semblent pas complètement défavorables à l'activité.

Le meilleur produit de cette série 7-aza est le composé 4-éthyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**684**, Figure 93) qui est, avec un EC2X de 55 μ M, largement plus actif que le diazoxide et l'IDRA-21.



La série 8-aza a ensuite été explorée. Les groupements placés en position 2, 3 et/ou 4 ont été restreints, en fonction des résultats de la série 7-aza, aux seuls méthyles et éthyles. Quelques composés insaturés ont été également synthétisés ; ils se montrent en général largement moins actifs que leurs homologues saturés. Le dérivé le plus actif de la série est encore une fois celui porteur en position 4 d'un groupement éthyle (**685**, Figure 93). Comme le montre sa valeur d'EC2X (8.8 μ M), le passage de la série 7-aza à la série 8-aza entraîne un gain sensible de puissance. La disubstitution 2,4 par deux groupements méthyles ou un groupement méthyle et un éthyle entraîne, certes une perte d'activité, mais ne semble pas complètement défavorable avec des EC2X proches de 40 μ M. De manière assez intéressante, plusieurs dérivés de cette série semblent capables d'agir tant sur l'amplitude que sur la durée du potentiel post-synaptique excitatoire (PPSE) induit par stimulation électrique sur tranches d'hippocampe de rat ; ce qui démontre donc que ces drogues sont capables d'agir sur les récepteurs AMPA post-synaptiques. Malheureusement, dans une évaluation de toxicité *in vivo* chez le rat, le composé **685** a provoqué, à des doses relativement élevées (> 30 mg/kg), la convulsion suivie de la mort des animaux. Cette constatation nuit bien évidemment à son indice de sécurité et a empêché son entrée en pré-développement clinique.

Le passage de la série 8-aza à la série 5-aza entraîne une perte drastique d'activité puisque le meilleur composé de cette série (**686**, Figure 93) exhibe un EC2X de seulement 200 μ M. L'introduction d'un atome de chlore en position 7 (série 5-aza-7-chloro) permet de regagner en puissance en atteignant une valeur d'EC2X de 21 μ M pour le dérivé 2-méthylé (**687**, Figure 93). Malheureusement, malgré ces résultats *in vitro* encourageants, cette drogue, évaluée *in vivo* sur le modèle de reconnaissance d'objet chez le rat ne réitère pas ses bonnes performances. En effet, s'il se montre actif lorsqu'il est injecté de manière intrapéritonéale, ce composé perd toute activité lorsqu'il est administré *per os*. Cette perte d'activité suggère que cette drogue ne possède probablement pas les paramètres physico-chimiques adéquats.

Afin de pallier cet inconvénient, nous avons alors imaginé le remplacement de l'atome de chlore par un atome de fluor, souvent présenté comme un atome intéressant quant à son impact sur divers paramètres pharmacocinétiques. De manière assez décevante, le remplacement de l'atome de chlore par un atome de

fluor induit une baisse significative d'activité quelque soit la chaîne positionnée en 4. L'EC_{2X} de la meilleure drogue (**688**, Figure 23) est supérieure à 100 µM.

Au terme de l'étude des relations structure-activité obtenues sur les séries pyridiniques, plusieurs éléments peuvent être relevés :

- Les composés « saturés » sont toujours largement plus actifs que leurs homologues « insaturés »
- La substitution en position 4 par un groupement méthyle ou éthyle est le meilleur choix concernant l'activité. L'augmentation de la taille du substituant va de paire avec la diminution de l'effet modulateur.
- Les substitutions en position 2 ou 3 sont plutôt défavorables.
- Les disubstitutions 2,4 ou 3,4 par des groupements méthyle ou éthyle entraînent une perte de puissance par rapport aux composés 4-méthylé ou éthylé.
- L'ordre d'activité des séries semble être le suivant : 8-aza > 5-aza-7-chloro > 7-aza > 5-aza-7-fluoro > 5-aza.

Par ailleurs, afin de vérifier que les composés « saturés » développés dans cet axe thérapeutique ne possédaient pas d'activité modulatrice des canaux K_{ATP} et que des 3-alkylamino-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes connus pour activer ces canaux n'interagissaient pas non plus avec les récepteurs AMPA, des composés « leads » de chaque série pharmacologique ont été évalués dans le modèle d'inhibition de la sécrétion d'insuline et dans le modèle d'augmentation du courant induit par l'AMPA. Les résultats montrent clairement que, comme espéré au vu des différences structurales, il n'y a pas chevauchement des activités [Pirrotte et al. 1998]

Compte tenu de leur cible thérapeutique, il semblait important que les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA possèdent une bonne balance hydrophilie/lipophilie. Le bon passage de la barrière hémato-méningée des drogues est en effet crucial pour espérer une distribution au niveau du système nerveux central. Le ratio entre la quantité de composé présente dans ce système et celle qui reste localisée au niveau sanguin ne doit pas être trop déséquilibré, que ce soit dans un sens ou dans l'autre.

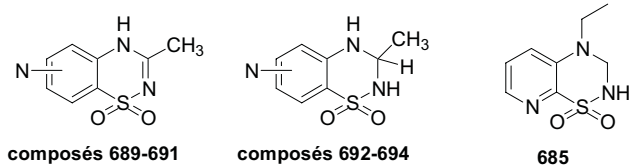
Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la détermination du coefficient de partage apparent (log P') permet d'estimer la lipophilie d'une molécule. Une petite série de dérivés 5, 6 et 8-aza, proches du diazoxide et de

l'IDRA-21, a été étudiée dans la méthode dite statique de mesure du log P' à pH 7.4 [Pirotte et al. 1998]. Le tableau 17 reprend les quelques résultats de cette étude parcellaire. Plusieurs constatations peuvent être rapidement faites :

- Le passage de la série 7-chlorobenzénique aux différentes séries pyridiniques (cf. diazoxide vs composés **689-691**) induit une baisse très sensible de la lipophilie.
- La saturation de la liaison double en position 2,3 engendre par contre un regain de lipophilie (composés **689-691** vs **692-694**).
- L'ordre de lipophilie est le suivant 5-aza > 7-aza > 8-aza que ce soit en série saturée ou insaturée.
- La série la plus active (8-aza) est aussi la plus hydrophile.

Ainsi, le composé « lead » **685** possède un log P' de seulement 0.12, c'est-à-dire une valeur fort éloignée de la valeur de log P' théorique de 1.5 à 2.5 généralement recommandée pour toute drogue à visée centrale.

Tableau 17 : Valeurs de log P' de quelques pyridothiadiazine 1,1-dioxydes.



Drogue	Position de l'azote pyridinique	Log P' ^a
689	5	-0.25
690	7	-0.41
691	8	-0.91
692	5	+ 0.35
693	7	+ 0.13
694	8	-0.20
685	8	+0.12
diazoxide		+1.21

^a Logarithme du coefficient de partage entre l'octan-1-ol et une solution aqueuse tamponnée à pH 7.4.

5.7. La pharmacochimie des benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.

C'est à ce stade que nous reprendrons la description des développements pharmacochimiques entrepris sur les modulateurs AMPA.

Après avoir obtenu quelques résultats préliminaires probants avec des composés de la classe des 2,3-dihydro-4*H*-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes, le retour en série benzénique, tout d'abord 7-halogéné a dès lors été envisagé et ce pour plusieurs raisons. Il nous fallait d'une part continuer de manière rationnelle les pharmacomodulations autour du noyau arylthiadiazine afin d'améliorer le profil pharmacodynamique de nos composés et d'autre part essayer de répondre aux questions soulevées par l'évaluation des dérivés pyridiniques *in vivo*. Compte tenu de notre cible thérapeutique, le passage du noyau pyridine à un noyau benzène nous semblait, au niveau de certaines propriétés physico-chimiques, une stratégie adéquate.

L'ensemble des pharmacomodulations que nous avons envisagées et qui seront présentées ici se devaient d'intégrer, outre les classiques paramètres pharmacodynamiques, tout une série d'autres paramètres allant de la toxicité à la distribution en passant par l'activité *in vivo* et les effets secondaires éventuels. Pour des raisons de confidentialité et parce que plusieurs composés ou séries de composés présentent des profils extrêmement prometteurs, nous ne pourrions, malheureusement, développer l'ensemble de ces données, ni présenter toutes les molécules synthétisées. Il nous est cependant possible de retracer les étapes, de donner la structure, les grands axes et les principaux résultats pharmacologiques de ce projet.

La figure 94 schématise le cheminement pharmacochimique que nous avons suivi dans le développement des séries benzéniques. Sur base des relations structure-activité dégagées de l'étude des séries pyridiniques, il nous est apparu que la position la plus intéressante à substituer était la position 4 et qu'il valait mieux y placer des groupements alkyles faiblement encombrés. Quelques composés 2,4-disubstitués ont également été préparés. La saturation de la liaison double du cycle thiadiazine semble également un pré-requis nécessaire à la bonne activité des drogues.

C'est le noyau 7-chlorobenzénique qui a été utilisé préférentiellement pour étudier l'impact de la nature du substituant en position 4. Les meilleurs substituants étant toujours les courtes chaînes alkyles ou fluoroalkyles, ces dernières ont été utilisées dans les pharmacomodulations ultérieures. La position 7 a été ensuite modulée avec l'introduction des autres halogènes puis de groupements électrocaptants ou électrodonneurs. De cette étude, il ressort que les atomes d'halogènes de petite taille (chlore et fluor) semblent être les meilleurs choix au niveau de l'activité sur récepteurs AMPA.

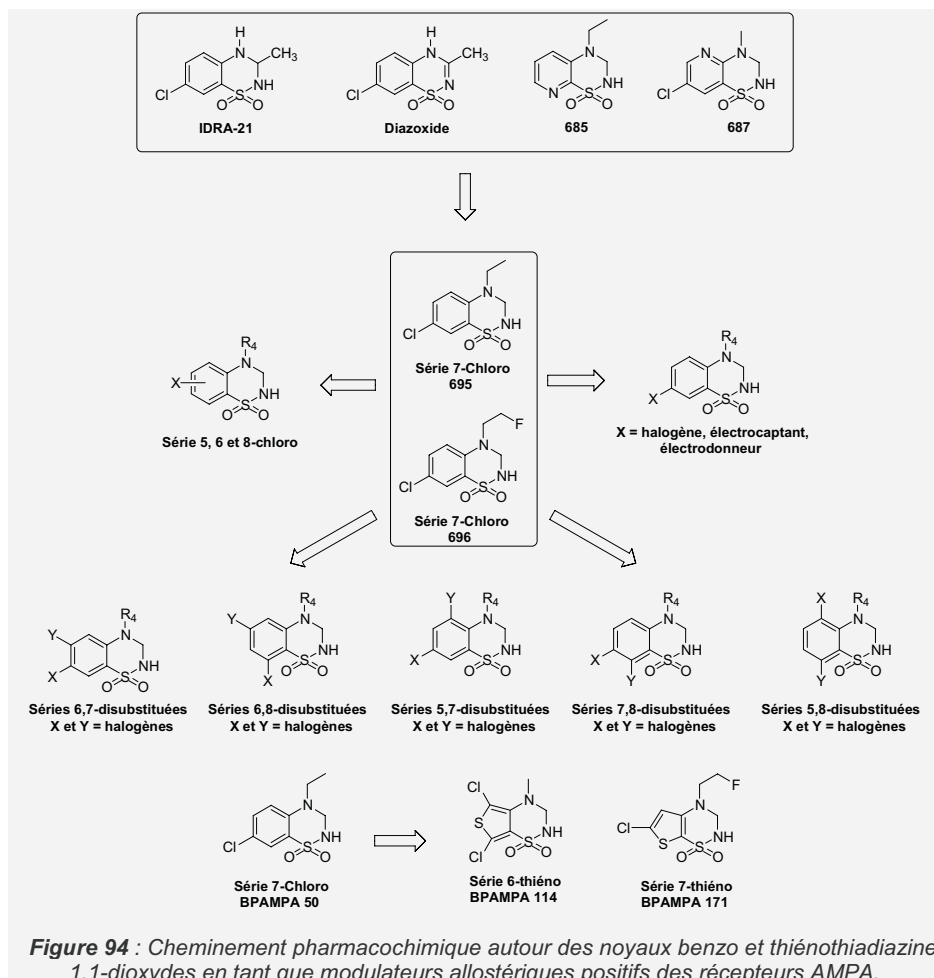


Figure 94 : Cheminement pharmacochimique autour des noyaux benzo et thiénothiadiazine 1,1-dioxydes en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.

L'étape suivante a consisté à vérifier quelle était la meilleure position de substitution du noyau benzénique. En effet, en se fiant aux résultats de la série pyridinique, les composés 5-aza et 8-aza se sont révélés être bien meilleurs que ceux de la série 7-aza. Donc, les atomes de Cl et de F ont été introduits en positions 5, 6 et 7 tout en conservant les meilleurs substituants sur le noyau thiadiazine.

Les mêmes atomes de fluor et de chlore ont également été utilisés afin de préparer des composés disubstitués, tout d'abord en position 6 et 7 puis en positions 6 et 8, 5 et 7, 7 et 8 et enfin 5 et 8. Ces dernières pharmacomodulations avaient pour but d'étudier l'impact des différentes disubstitutions sur l'activité modulatrice de l'activité AMPA.

Puisque nous avons envisagé la préparation de composés en séries pyridinique et benzénique, il nous est également apparu intéressant d'explorer la série thiophénique. Des composés de la famille des 6-chloro-3,4-dihydro-2*H*-thiéno[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes et des 5,7-dichloro-3,4-dihydro-2*H*-thiéno[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes ont été synthétisés et évalués en tant que modulateurs AMPA.

5.7.1. La synthèse des dérivés benzéniques

L'examen de la littérature chimique autour de ce type de composés et l'expérience acquise en série pyridothiadiazine 1,1-dioxyde montrent que les intermédiaires clés dans l'obtention des 2,3-dihydro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes sont le plus souvent les *o*-aminobenzènesulfonamides. Ces derniers sont généralement cyclisés soit avec des dérivés d'acides carboxyliques pour permettre l'obtention des composés « insaturés », soit avec des dérivés d'aldéhydes ou de cétones pour permettre l'obtention des composés « saturés ». Des étapes d'alkylation suivent, dans la plupart des cas, afin de compléter les substitutions du noyau thiadiazine 1,1-dioxyde. La liaison double du cycle thiadiazine doit être, quant à elle, réduite pour donner les composés « saturés ». Si certains intermédiaires sont communs avec la chimie que nous avons développée pour les activateurs des canaux K_{ATP} , les réactions chimiques, les stratégies utilisées ainsi que la nature des structures envisagées dans ces deux axes diffèrent assez sensiblement.

5.7.2. Les 7-chloro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes

La série 7-chlorobenzénique a été utilisée pour étudier l'impact du retour en série benzénique sur l'activité. L'ensemble des composés préparés dans cette série est de type « saturé ».

La préparation de ces composés passe par un schéma tout à fait classique et déjà décrit dans la littérature, du moins partiellement. En effet, la 4-chloroaniline (**697**, schéma 82) mise en réaction avec l'isocyanate de chlorosulfonyle dans les conditions de Girard fournit sans difficultés l'intermédiaire 3-oxo (**698**) qui est ensuite hydrolysé par chauffage dans une solution d'acide sulfurique à 50% pour donner le 2-amino-5-chlorobenzènesulfonamide (**699**). L'action de l'orthoformate d'éthyle ou de méthyle sur ce composé entraîne la fermeture du cycle (**700**). L'alkylation du dérivé « insaturé » se fait préférentiellement en position 4, confirmant par la même l'hypothèse d'une tautomérie 4*H*. Le composé 4-alkylé (**701**) est alors réduit au borohydrure de sodium pour aboutir aux drogues attendues (**702**). La position 2 de ces composés peut également effectuer une attaque nucléophile sur différents agents alkylants et fournir des dérivés substitués en position 2 et 4 (**703**).

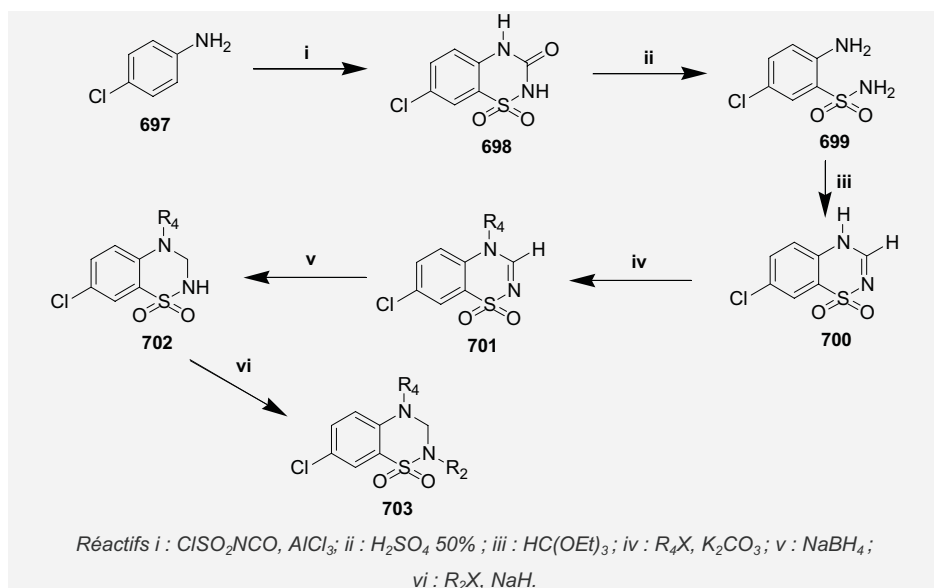


Schéma 82 : Synthèse des 7-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

L'étape d'alkylation de la position 4 ne pose généralement aucun problème avec les halogénures d'alkyle classiques. Elle est un peu plus longue et difficile que lors de l'introduction d'une chaîne 2-fluoroéthyle au moyen de bromure ou d'iodure de 2-fluoroéthane. Par contre, lorsque le groupement alkylant possède deux ou trois atomes de fluor en α du carbone électrophile, aucune réaction significative n'a été relevée dans les conditions classiquement utilisées ou dans des conditions de températures plus drastiques. Ce manque de réactivité est pour le moins surprenant compte tenu du caractère fortement électrophile du carbone porteur de l'halogène. Les atomes de fluor étant fortement électroattracteurs, les groupements difluorométhyle et trifluorométhyle greffés sur le centre de réactivité pourraient exercer un effet négatif sur la formation et la stabilisation de l'état de transition dans la réaction de type S_N2 . D'autres stratégies ont donc dû être adoptées pour la préparation de ces composés.

En ce qui concerne le dérivé 4-(2,2,2-trifluoroéthyle) (**708**, schéma 83), nous avons choisi d'introduire ce groupement au début du schéma de synthèse sur l'intermédiaire 2-chloro-5-nitrobenzènesulfonamide (**442**) qui est obtenu ainsi que décrit dans le schéma 64.

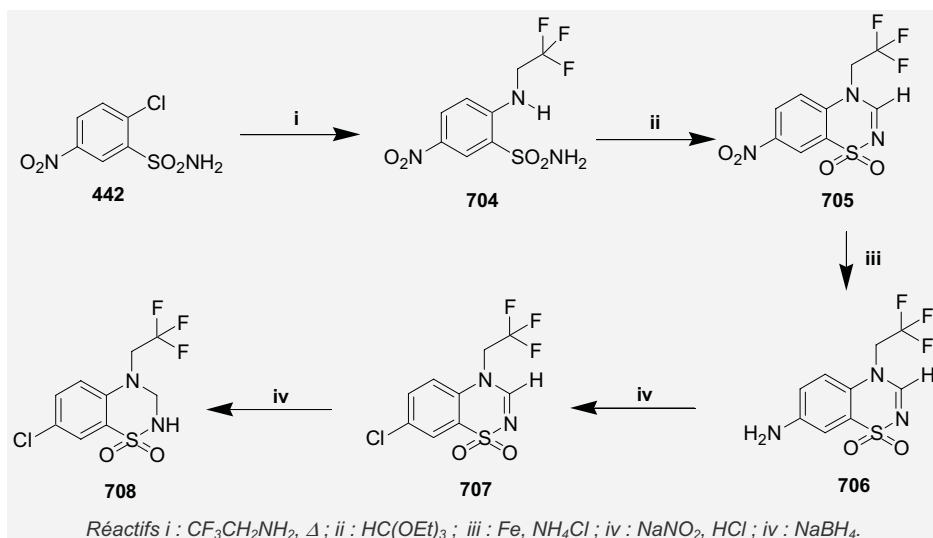
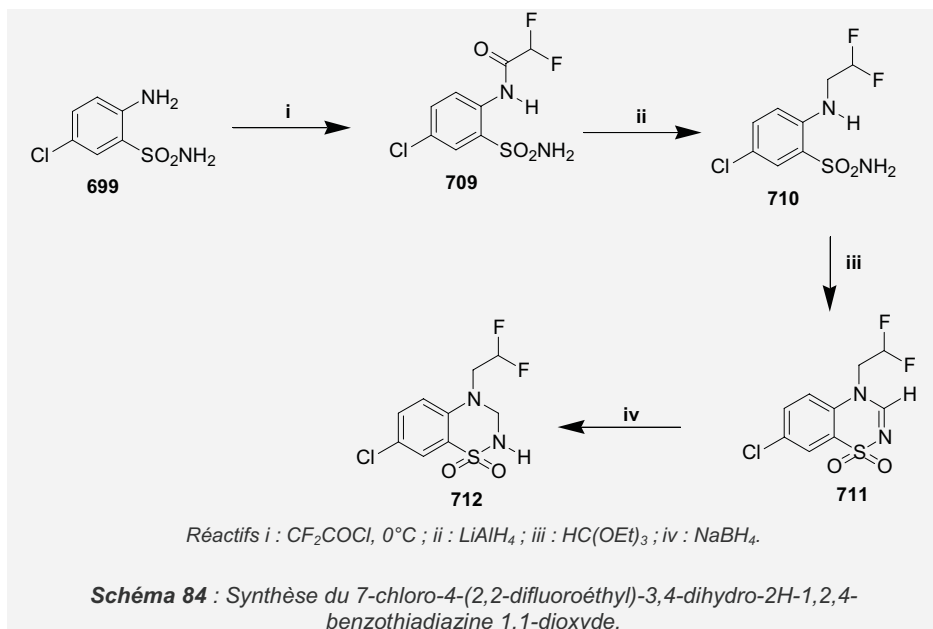


Schéma 83 : Synthèse du 7-chloro-4-(2,2,2-trifluoroéthyl)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

Le chlore de ce dérivé est rendu extrêmement labile par la présence de deux groupements électroattracteurs en ortho et en para, il peut donc être aisément substitué par la 2,2,2-trifluoroéthylamine.

Le composé ainsi obtenu (**704**) peut ensuite être cyclisé classiquement à l'orthoformiate d'éthyle. Le 7-nitro-4-(2,2,2-trifluoroéthyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**705**) ainsi obtenu peut subir une réduction de la fonction nitro en position 7 au moyen de fer en présence de chlorure ammonique. La fonction amino est ensuite diazotée et transformée en groupement chloro. La double liaison du 7-chloro-4-(2,2,2-trifluoroéthyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**707**) est alors réduite au NaBH₄ pour donner le composé final (**708**).

La stratégie de synthèse du 7-chloro-4-(2,2-difluoroéthyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**712**, schéma 84) est un peu différente. Il est connu que les aminobenzènesulfonamides peuvent être acylés de manière plus ou moins sélective sur la fonction amine au moyen de chlorure d'acide ou d'anhydride.



Les premiers essais d'acylation réalisés sur le 2-amino-5-chlorobenzènesulfonamide (**699**) au moyen d'anhydride acétique ou de chlorure

d'acétyle ont montré que l'anhydride étant moins réactionnel nécessitait de travailler légèrement au dessus de la température ambiante. Cette augmentation provoquait malheureusement l'apparition rapide du produit de cyclisation, en l'occurrence le diazoxide. Cela n'est évidemment pas surprenant en se basant sur les données de la littérature.

L'utilisation du chlorure d'acétyle, plus réactionnel permet de travailler à plus basses températures et d'éviter l'étape de cyclisation. Le composé *N*-acétylé peut ainsi être isolé. Compte tenu de ces résultats préliminaires, nous avons donc entrepris de mettre en réaction l'aminobenzènesulfonamide et le chlorure de l'acide 2,2-difluoroacétyle. L'intermédiaire 2-(2,2-difluoroacétamido)-5-chlorobenzènesulfonamide (**709**) a ainsi pu être isolé sans que l'étape de cyclisation intramoléculaire ne vienne interférer pour autant que la température soit proche de 0°C. La littérature décrit également qu'il est possible de réduire la fonction acétamido en fonction éthylamine au moyen de LiAlH_4 . L'utilisation de ce réactif permet également dans notre cas de réduire la fonction amide en une fonction amine. Disposant de l'intermédiaire 4-(2,2-difluoroéthylamino) (**710**), le reste du schéma d'accès au composé désiré est tout à fait habituel et repris dans le schéma 84.

Nous avons également envisagé la préparation du dérivé 4-fluorométhylé. L'action du bromure de fluorométhane sur l'intermédiaire 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**700**, Schéma 85) permet d'accéder sans trop de difficultés au 7-chloro-4-fluorométhyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**713**).

L'étape de réduction de la liaison double du cycle thiadiazine pose par contre problème. En effet, lorsque l'agent réducteur est le NaBH_4 dans l'isopropanol, deux produits sont isolés dont l'un est le composé 4-méthyle (**714**) et l'autre un dérivé identifié comme porteur en position 4 d'un groupement 1-isopropoxyméthyl (**715**) résultant de la substitution de l'atome de fluor par une molécule de solvant. Divers changements de solvants mais également d'agents de réduction (i.e. LiAlH_4 , BH_3 , DIBAL , ...) ne nous ont pas permis d'obtenir la drogue espérée. La forte réactivité de l'atome de fluor du groupement 4-fluorométhyle n'est cependant pas un signe favorable puisqu'elle postule l'hypothèse d'une possible action alkylante de cette partie de la molécule. Les investigations concernant ce type de dérivés ont donc été abandonnées.

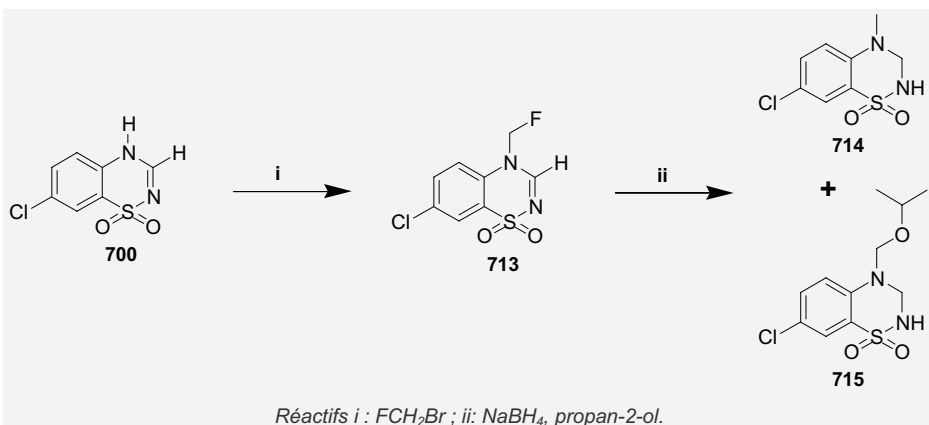


Schéma 85 : Tentative de synthèse du 7-chloro-4-fluorométhyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

La chaîne 2-hydroxyéthyle a également été placée sur l'atome d'azote en position 4 du cycle thiadiazine. L'action de l'ester méthylique de l'acide 2-bromoacétique sur le 7-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**700**, schéma 86) permet dans un premier temps d'obtenir un intermédiaire porteur en position 4 du groupement ester méthylique (**716**). Cette fonction ester, tout comme la liaison double du cycle thiadiazine subissent alors en une seule étape une réduction simultanée pour donner la drogue attendue (**717**).

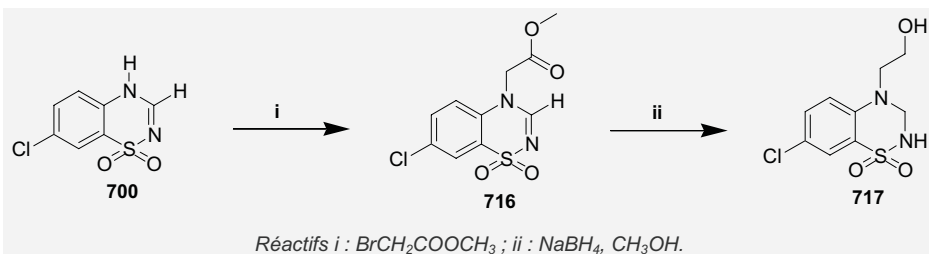


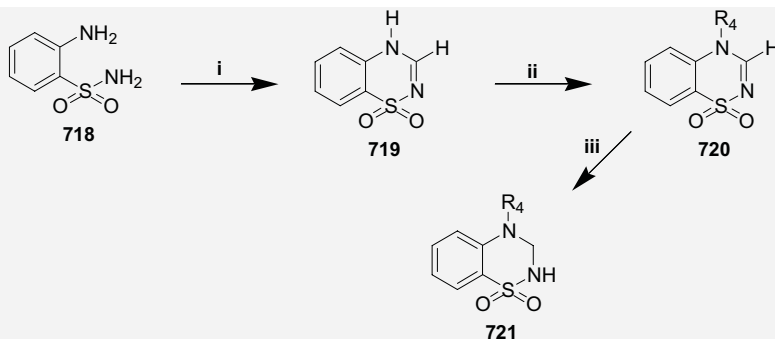
Schéma 86: Synthèse du 7-chloro-4-(2-hydroxyéthyl)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

5.7.3. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7.

Plusieurs séries de composés porteurs en position 4 des groupements alkyles et fluoroalkyles les plus intéressants pour l'activité, non substituées en position 2 et 3 et modulant la nature du substituant en position 7 ont été préparées. Les stratégies de synthèse et les schémas appliqués diffèrent parfois de ceux décrits pour la série 7-chloro.

5.7.3.1. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués en position 7.

Ces composés, préparés pour vérifier l'impact de la substitution en position 7, sont synthétisés suivant un schéma tout à fait classique sachant que le 2-aminobenzènesulfonamide (**718**, Schéma 87) est commercialement disponible. La cyclisation s'effectue à l'orthoformiate d'éthyle, l'alkylation dans les conditions habituelles au moyen d'iodure d'alkyle et la réduction au NaBH₄.



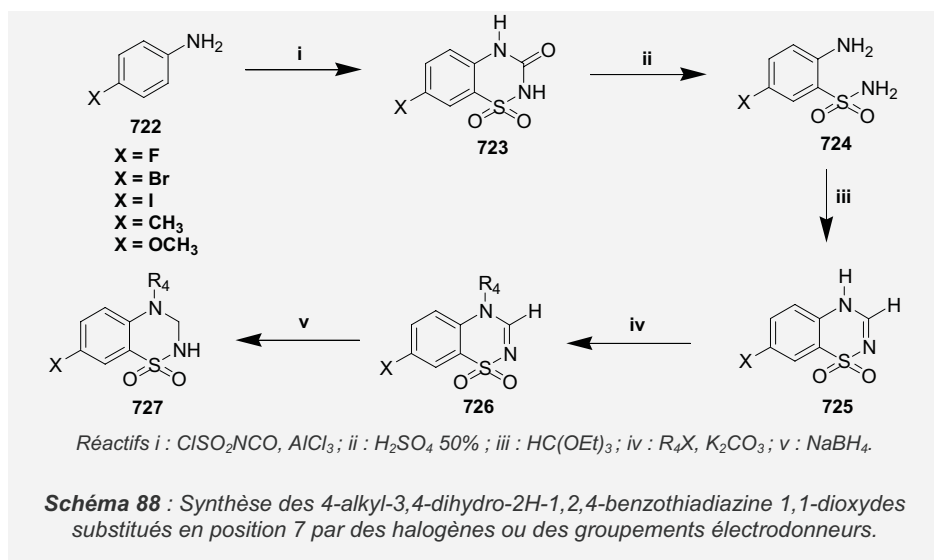
Réactifs i : HC(OEt)₃; ii : R₄X, K₂CO₃; iii : NaBH₄.

Schéma 87 : Synthèse des 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

5.7.3.2. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par d'autres halogènes que le chlore et des groupements électrodonneurs.

Ces séries sont fortement similaires au niveau de leur méthode de préparation à celles des composés 7-chloro. L'intermédiaire o-

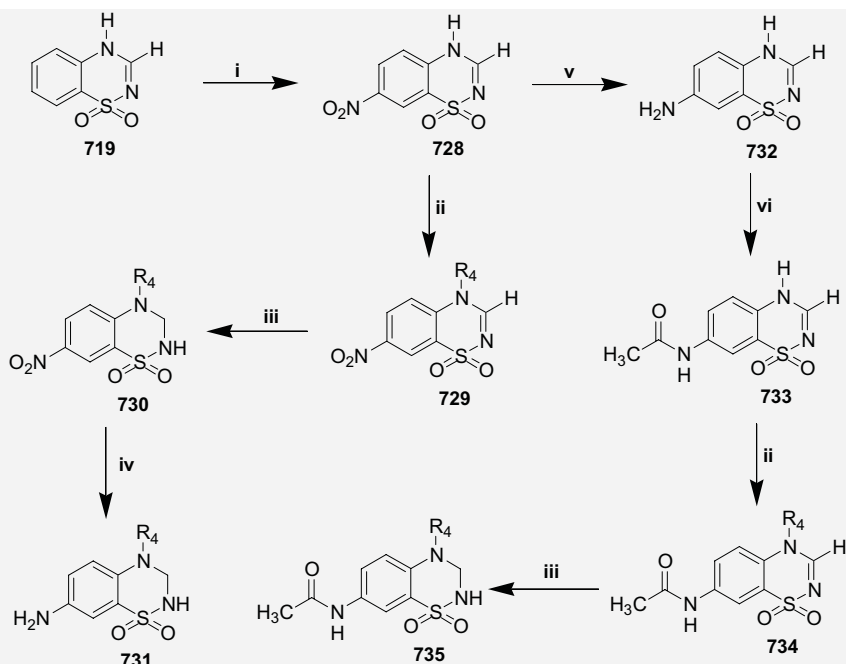
aminobenzènesulfonamide (**724**, schéma 88) est obtenu après hydrolyse acide du composé cyclique 3-oxo (**723**), lui-même synthétisé par action de l'isocyanate de chlorosulfonyle sur l'aniline appropriée (**722**). Seuls les groupements halogènes ou électrodonneurs sont capables de faciliter la réaction intramoléculaire de Friedel-Crafts. Le reste du schéma est, quant à lui, habituel avec les étapes de cyclisation, d'alkylation en position 4 et de réduction de la liaison double du cycle thiadiazine.



5.7.3.3. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement nitro, amino ou acétamido.

La présence d'un groupement électroattracteur fort tel que le nitro rend difficile l'approche passant par une réaction à l'isocyanate de chlorosulfonyle. Nous avons vu dans le chapitre concernant les activateurs des canaux K_{ATP} qu'il était possible d'obtenir le 2-amino-5-nitrobenzènesulfonamide par une réaction de diazotation de type Sandmeyer variante de Meerwein suivie d'une double substitution des atomes de chlore de la fonction chlorure de sulfonyle et du chlore aromatique (Cf. Schéma 64). Cette option n'est pas celle que nous avons choisi dans ce cas. En effet, l'accès au 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**719**, Schéma 89) est relativement aisé puisque l'o-aminobenzènesulfonamide est

commercial. L'action d'acide nitrique concentré en présence d'acide sulfurique concentré sur ce composé entraîne l'introduction d'un groupement nitro en position 7 de l'hétérocycle. L'intermédiaire 7-nitro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**728**) peut, soit être alkylé en position 4 puis réduit au NaBH₄ pour donner son analogue « saturé » et alkylé (**730**), soit réduit par hydrogénation au formiate ammonique en présence de charbon palladié pour donner l'analogue 7-amino (**732**). Ce dernier peut alors être acétylé sur la fonction aminée la plus réactionnelle au moyen d'anhydride acétique avant d'être alkylé en position 4. Le composé 4-alkylé et 7-acétylé (**734**) peut ensuite subir une réduction de sa liaison double au moyen de borohydrure sodique pour aboutir au composé attendu (**735**). Le dérivé final 7-amino (**731**) est obtenu, quant à lui, par réduction de son analogue nitré (**730**).

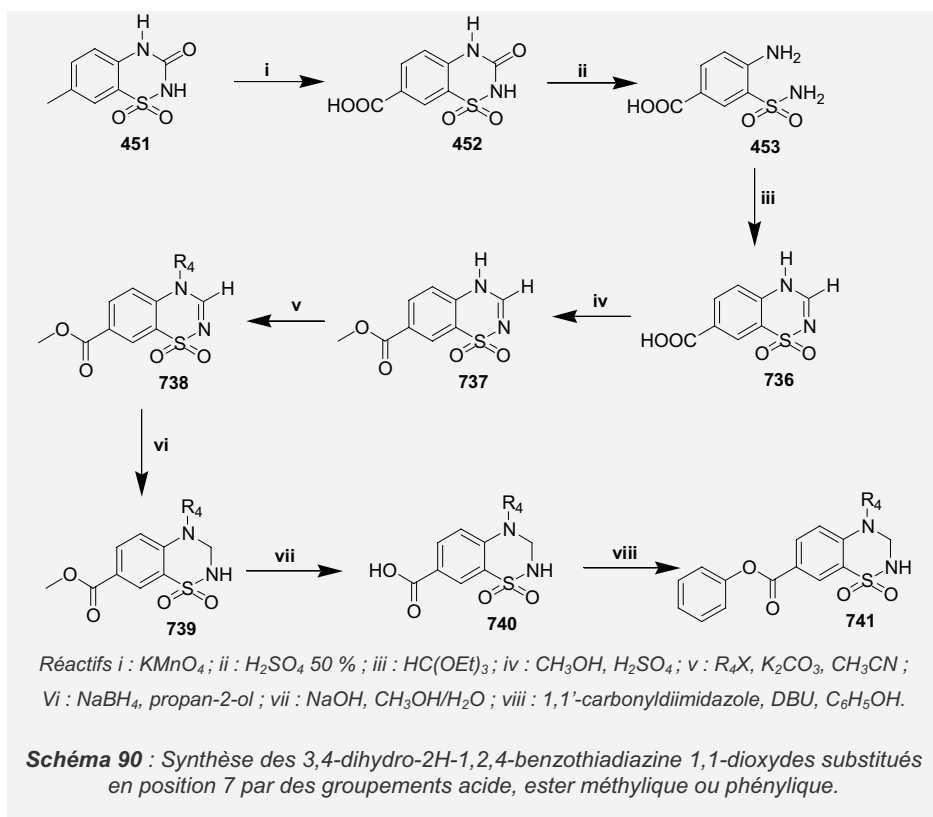


Réactifs i : HNO₃, H₂SO₄; ii : R₄X, K₂CO₃, CH₃CN; iii : NaBH₄, propan-2-ol; iv : H₂, C/Pd;
V : HCOONH₄, C/Pd; vi: Ac₂O.

Schéma 89 : Synthèse des 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par des groupements nitro, amino et acétamido.

5.7.3.4. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement acide carboxylique ou dérivé.

Les dérivés substitués en position 7 par un groupement acide carboxylique ou ses esters méthylique et phényle peuvent être obtenus suivant un schéma dont le début ressemble à celui développé en série « activateurs des canaux K_{ATP} » (Cf. schéma 67) et qui débute par l'oxydation au permanganate potassique du groupement méthyle du 7-méthyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**451**, schéma 90). Le dérivé 7-carboxylique (**452**) ainsi obtenu est hydrolysé au moyen d'acide sulfurique 50 % pour donner l'o-aminobenzènesulfonamide (**453**). L'orthoformate d'éthyle provoque ensuite la fermeture du cycle.

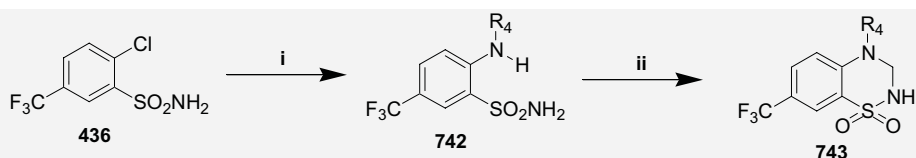


Afin d'éviter des problèmes lors de la réaction avec des agents alkylants, la fonction acide est ensuite protégée sous forme d'ester méthylique (**737**). L'alkylation de cet intermédiaire permet l'introduction d'un groupement alkyle en position 4 (**738**).

La réduction qui suit donne le composé « saturé » (**739**) porteur en position 7 d'une fonction ester méthylique. Une hydrolyse alcaline dans un mélange eau/méthanol restitue la fonction acide (**740**). L'ester phénylique (**741**) est, quant à lui, obtenu après activation de l'acide carboxylique au carbonyldiimidazole en présence de DBU et mise en réaction de l'amide imidazolé obtenu avec du phénol.

5.7.3.5. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement trifluorométhyle.

Les composés 7-trifluorométhylés ont également été préparés selon une méthode un peu similaire aux dérivés 7-chloro-3-(2,2,2-trifluoroéthyle) (**708**, Schéma 83). En effet, le 2-chloro-5-trifluorométhylbenzènesulfonamide (**436**, schéma 91) est facilement obtenu par action de l'ammoniaque sur le chlorure de sulfonyle correspondant. Le chlore en *ortho* de la fonction sulfonamide et en *para* du groupement trifluorométhyle est relativement labile et peut être substitué par chauffage en autoclave par différentes amines. L'intermédiaire ainsi préparé (**742**) peut ensuite être cyclisé au moyen de formaldéhyde en catalyse acide.



Réactifs i : R_4NH_2 , Δ ; ii : $HCHO$, HCl , propan-2-ol.

Schéma 91 : Synthèse des 7-trifluorométhyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

5.7.3.6. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement cyano.

L'introduction du groupement cyano en position 7 de l'hétérocycle benzothiadiazine 1,1-dioxyde se réalise, comme cela est décrit en série

activateurs des canaux K_{ATP} (Cf. Schéma 66), par substitution de l'atome d'iode des 4-alkyl-7-iodo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**744**, schéma 92).



Schéma 92 : Synthèse des 4-alkyl-7-cyano-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes.

Cette substitution est effectuée au moyen de cyanure de cuivre dans la DMF sous atmosphère inerte. Les rendements de cette réaction restent cependant faibles.

5.7.3.7. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement méthylsulfonyle.

Le 2-amino-5-méthylsulfonylbenzènesulfonamide (**446**, schéma 93) peut être assez aisément obtenu selon un schéma décrit précédemment (Cf. schéma 65). Cet intermédiaire clé peut ensuite facilement être cyclisé à l'orthoformate d'éthyle puis alkylé en position 4 avant d'être réduit. Cette série ne présente donc pas de difficultés majeures une fois que le composé **446** est obtenu.

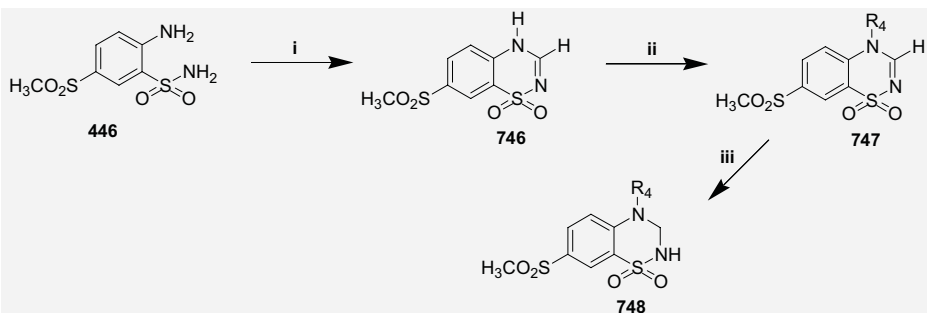


Schéma 93 : Synthèse des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 7 par un groupement méthylsulfonyle.

5.7.4. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversément substitués en position 6.

Des composés substitués en position 6 au lieu de la position 7 par des groupements halogènes (Cl et F) et méthyle ont également été envisagés. La stratégie de synthèse est classique, connue et développée, du moins en série activateurs des canaux K_{ATP} (Cf. schéma 69). Lorsque une aniline substituée en *méta* par un atome de chlore ou de fluor ou un groupement méthyle (**749**, Schéma 94) est mise en réaction avec l'isocyanate de chlorosulfonyle, deux isomères de position 3-oxo se forment : le premier est l'isomère 8-substitué (**751**) et le second l'isomère 6-substitué (**750**). Ce dernier est, en général, facilement isolable par simple cristallisation dans l'eau en bonne quantité et très pur. Une fois l'aminobenzène sulfonamide obtenu, le reste est tout à fait classique et ne présente plus de difficultés majeures si ce n'est celles reprises pour les composés substitués en position 7.

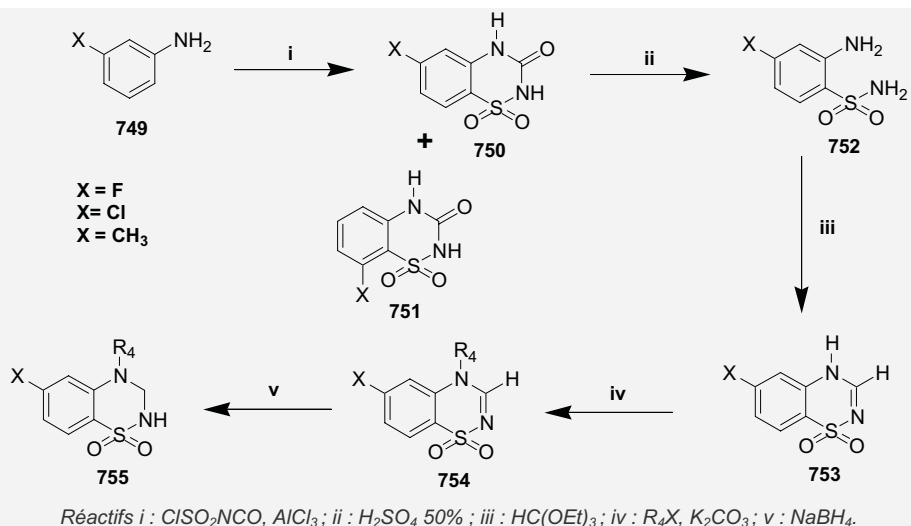
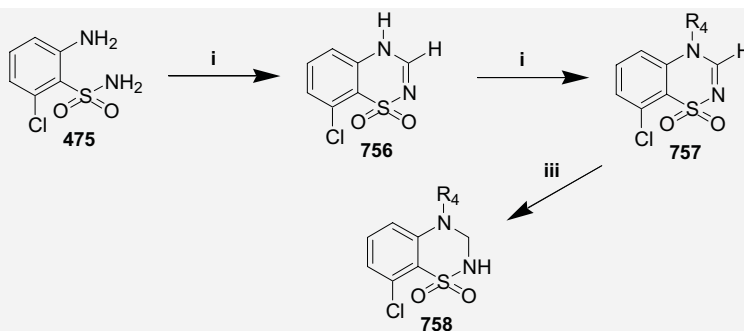


Schéma 94 : Synthèse des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 6 par un atome de chlore, de fluor ou un groupe méthyle.

5.7.5. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 8.

Comme nous l'avons déjà constaté, l'intermédiaire 3-oxo-8-substitué (**751**, schéma 94) est généré lors de la réaction à l'isocyanate de chlorosulfonyle. Malheureusement, il n'est pas isolable par cette voie. Des travaux réalisés précédemment dans le cadre de la synthèse d'activateurs des canaux K_{ATP} nous ont permis de mettre au point la préparation du 2-amino-6-chlorobenzènesulfonamide (**475**, Cf schéma 70) suivant un schéma comptant cinq étapes. Cet intermédiaire clé obtenu, le reste du schéma est connu et aboutit dans cette série aux produits finaux attendus (Schéma 95).



Réactifs i : $HC(OEt)_3$; ii: R_4X , K_2CO_3 ; iii : $NaBH_4$.

Schéma 95 : Synthèse des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes substitués en position 8 par un atome de chlore.

5.7.6. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 5.

Le cas des composés substitués en position 5 est un peu particulier. Deux séries ont été développées avec un substituant dans cette position : la série 5-chloro et la série 5-fluoro. En effet, en série 5-chloro, l'obtention aisée du 2-amino-3-chlorobenzènesulfonamide **759** (Schéma 96) par action de l'isocyanate de chlorosulfonyle sur l'o-chloroaniline (**459**) en présence de chlorure d'aluminium suivie d'une hydrolyse du composé 3-oxo obtenu (**460**), laissait présager un schéma relativement aisé. L'étape de fermeture de cycle à l'orthoformiate d'éthyle

se passe sans grand problème. Cependant, une difficulté surgit liée à l'encombrement stérique induit par l'atome de chlore sur une position proche de l'azote destiné à être alkylé. Cet encombrement rend extrêmement difficile l'approche des agents alkylants classiques, qu'il s'agisse d'halogénures d'alkyles courts (bromure ou iodure de méthyle ou d'éthyle), de tosylates ou de mésylates de méthyle ou d'éthyle. Lorsque les conditions réactionnelles sont forcées, il est souvent obtenu le composé méthylé ou éthylé en position 2 (**765**) en lieu et place des dérivés 4-alkylés, preuve qu'il existe bel et bien une tautomérie possible entre les formes *2H* et *4H*. L'utilisation du sulfate de diméthyle en large excès et à reflux permet d'obtenir un mélange de dérivés contenant le composé 4-méthylé (**761**) et son isomère 2-méthylé (**762**), qui une fois réduits sont aisément séparables puisque seul le composé 4-méthylé (**763**) possède encore un proton labile en position 2 et peut être soluble en solution aqueuse basique.

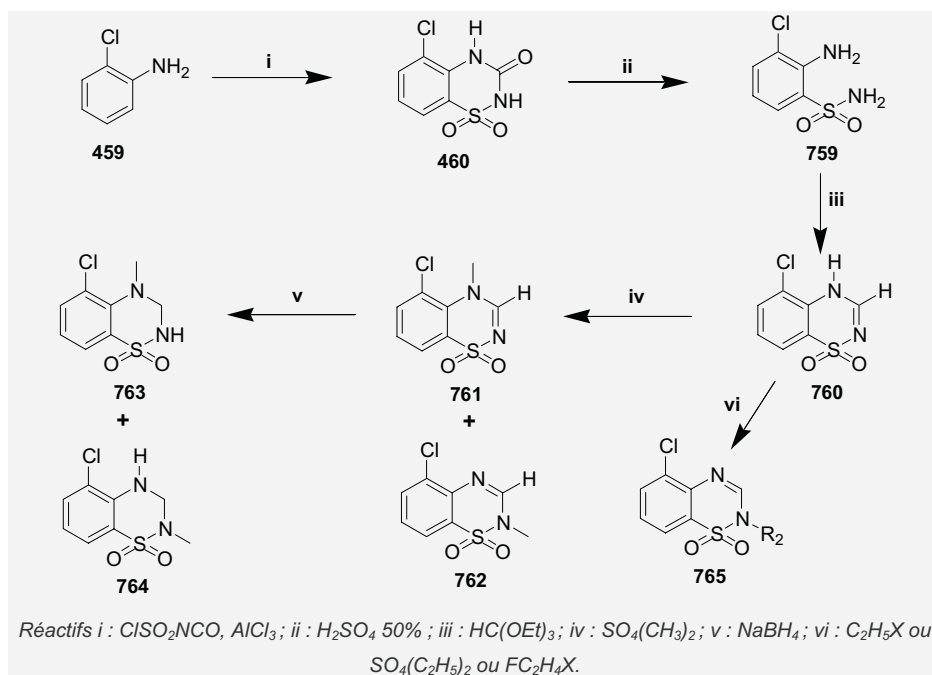
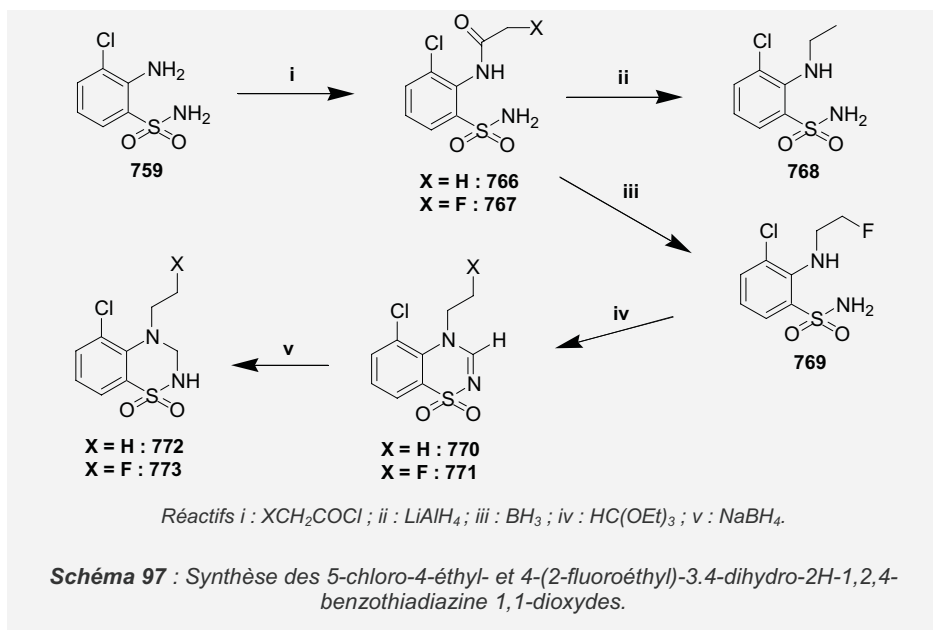


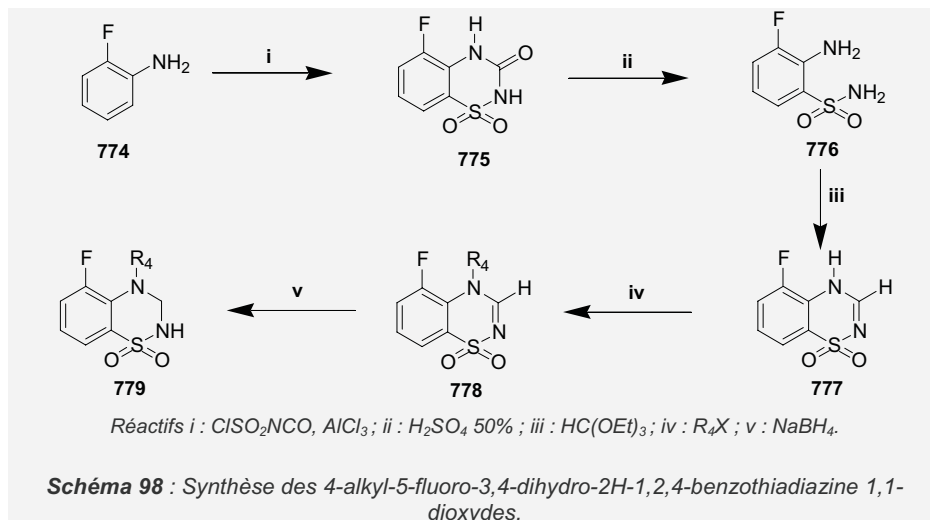
Schéma 96: Synthèse du 5-chloro-4-méthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde.

Cependant, pour des chaînes plus longues ou substituées, toutes les tentatives ont échoué en donnant à chaque fois le produit substitué en position 2.

Nous avons alors envisagé une approche similaire à celle du 7-chloro-4-(2,2-difluoroéthyl)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (Cf. Schéma 84), à savoir acylation de la fonction aminée en ortho du chlore au moyen des chlorures d'acides appropriés, réduction de l'amide à l'aide de LiAlH_4 , puis cyclisation à l'orthoformiate d'éthyle et traitement au NaBH_4 . Le traitement de l'o-aminobenzènesulfonamide (**759**, schéma 97) avec le chlorure d'acétyle et le chlorure de l'acide 2-fluoroacétique permet d'obtenir les intermédiaires voulus (**766** et **767**). L'étape de réduction se passe sans problème avec le composé acétylé **766** pour donner l'éthyle correspondant (**768**). Il n'en est pas de même pour le composé 2-fluoroacétylé **767** qui, lors du traitement au LiAlH_4 , perd l'atome de fluor. Des recherches dans la littérature nous ont alors permis de découvrir que l'utilisation de BH_3 en tant qu'agent réducteur protégeait « l'intégrité » du fluor. C'est donc avec ce réactif que nous sommes parvenus à obtenir l'intermédiaire désiré (**769**). La suite du schéma est aussi relativement classique avec une cyclisation à l'orthoformiate d'éthyle suivie d'une réduction au NaBH_4 .



La série 5-fluoro n'a, quant à elle, pas posé les mêmes soucis d'alkylation en position 4, preuve que l'encombrement stérique (un atome de fluor est moins encombré qu'un atome de chlore) est le principal responsable de la faible réactivité de la position 4 en série 5-chloro.



Le schéma appliqué pour l'obtention des 4-alkyl-5-fluoro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (**779**, Schéma 98) est identique à celui décrit pour le 5-chloro-4-méthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde. Les chaînons méthyle, éthyle et 2-fluoroéthyle ont cependant pu être introduits en position 4 par simple alkylation de l'intermédiaire 5-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (**777**).

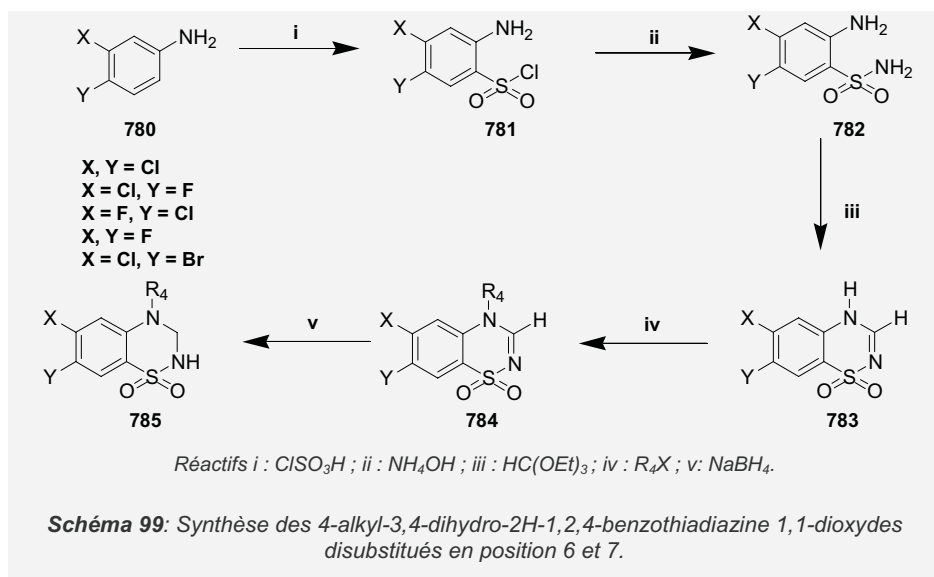
5.7.7. Les 2,3-dihydro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 6 et 7.

Suite aux résultats pharmacologiques des composés substitués en position 6 ou 7, la disubstitution du noyau aromatique dans ces deux positions a également été envisagée.

L'analyse des résultats des relations structure-activité nous a orientés vers le choix d'halogènes et plus spécifiquement des atomes de chlore et de fluor comme substituants de l'hétérocycle. Ainsi, nous avons préparé des drogues

substituées en position 4 par un groupement alkyle court ou fluoroéthyle dans les séries suivantes :

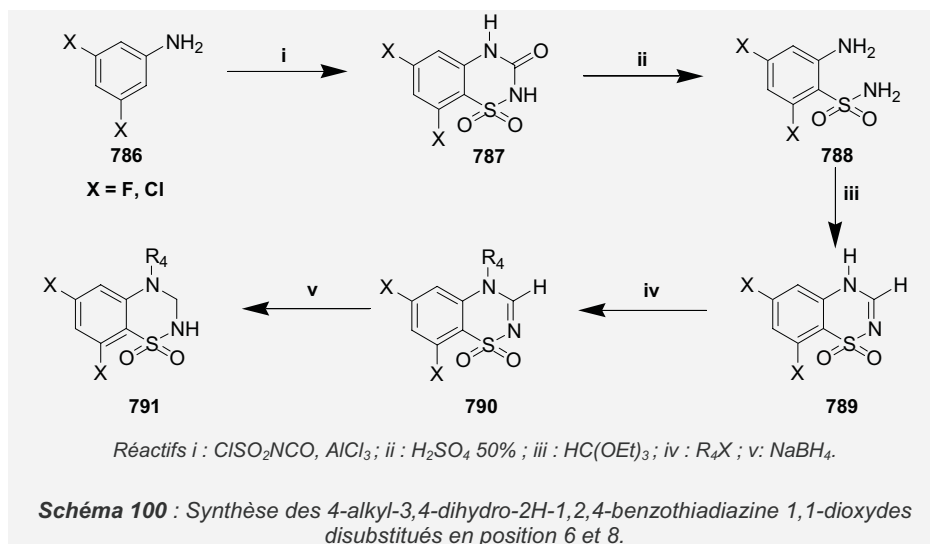
- 6,7-dichloro
- 6-chloro-7-fluoro
- 7-chloro-6-fluoro
- 6,7-difluoro
- 7-bromo-6-chloro



La synthèse des composés de ces différentes séries suit un schéma réactionnel commun (schéma 99) à partir du moment où les intermédiaires clés o-aminobenzènesulfonamides (**782**) sont obtenus. Une chlorosulfonation des anilines correspondantes (**780**) permet, en général, d'aboutir à ces intermédiaires avec des rendements variables suivant la nature des substituants.

5.7.8. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 6 et 8.

Toujours en conservant les atomes d'halogènes (et principalement les atomes de chlore et de fluor) comme substituants du noyau aromatique, nous avons également entrepris l'exploration de la disubstitution en position 6,8. Encore une fois, ce schéma ne présente pas de difficultés puisque l'intermédiaire 3-oxo peut être facilement préparé par action de l'isocyanate de chlorosulfonyle sur des 3,5-dichloro ou 3,5-difluoroaniline (**786**, schéma 100). Il convient juste de signaler qu'aucune possibilité d'isomérisation de position lors de la cyclisation selon Friedel-Crafts n'existe dans le cas des produits de départ choisis puisqu'ils sont symétriques. Il n'en serait pas de même si les deux substituants étaient différents. L'hydrolyse en milieu H_2SO_4 50% donne accès aux *o*-aminobenzènesulfonamides (**788**) qui rentrent alors dans une série d'étapes déjà décrite dans d'autres synthèses.



5.7.9. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 5 et 7 ou 5 et 8.

Poursuivant notre étude de l'influence de la disubstitution sur l'activité, nous avons donc synthétisé des composés substitués par deux atomes de chlore en

positions 5 et 7 ou 5 et 8. Nous avons regroupé ces deux séries car leurs stratégies de synthèse sont similaires, de même que les difficultés rencontrées lors des étapes d'alkylation en position 4.

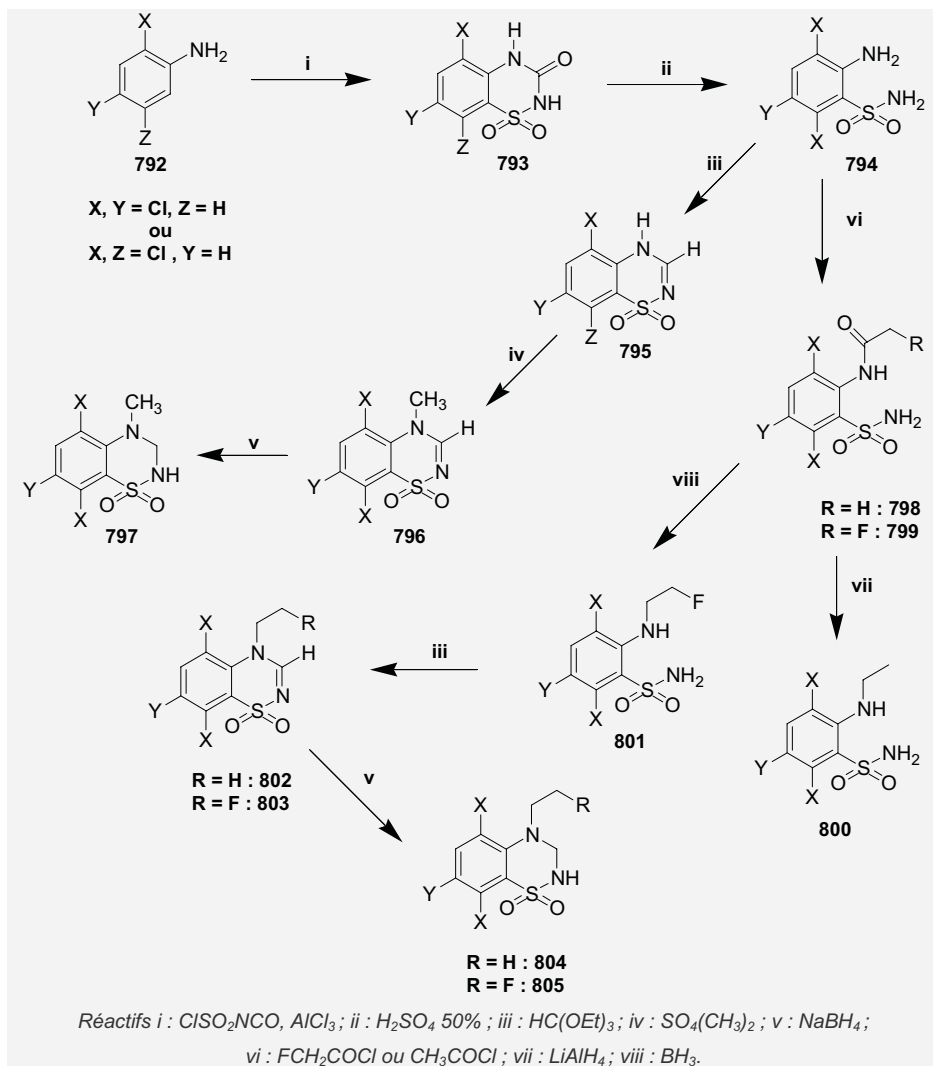
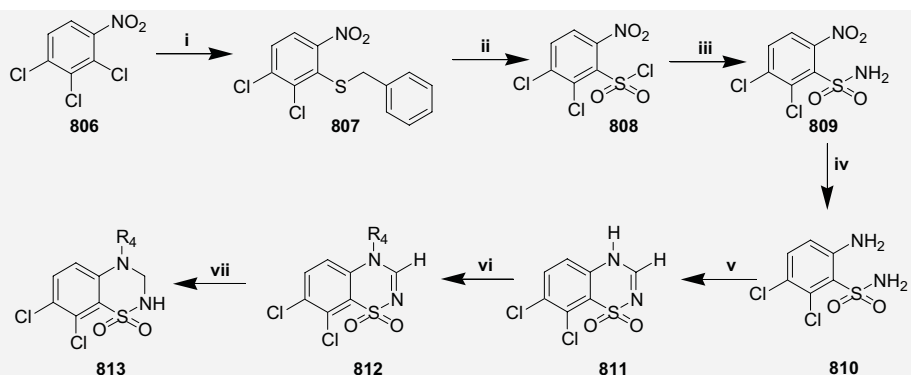


Schéma 101: Synthèse des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 5 et 7 ou 5 et 8.

Les produits de départ étant les 2,4-dichloro et 2,6-dichloroanilines (**792**, Schéma 101), c'est la voie de synthèse selon Girard qui a été choisie ici tout comme en série 6,8-disubstituée (Cf. Schéma 100). Il n'y a pas de possibilité d'isomérisie dans les cas qui nous occupent. La problématique se situe, tout comme en série 5-chloro dans l'étape d'alkylation qui est largement gênée par la présence de l'atome de chlore sur la position proche du centre nucléophile. Nous avons donc appliqué les mêmes solutions que pour les composés 5-chloro dans ces deux séries, à savoir l'utilisation du sulfate de diméthyle pour l'obtention des dérivés 4-méthylés et le passage par une acétylation (composés **798** et **799**) suivie d'une réduction au LiAlH_4 ou au BH_3 pour les dérivés 4-éthylés (**800**) et 4-fluoroéthylés (**801**).

5.7.10. Les 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 7 et 8.

La dernière modulation réalisée autour de la disubstitution est le positionnement de deux atomes de chlore en positions 7 et 8. La stratégie de synthèse employée dans ce cas est proche de celle proposée pour les dérivés 8-chloro. Le produit de départ est dans ce cas le 2,3,4-trichloronitrobenzène (**806**, schéma 102).



Réactifs i : thiourée, chlorure de benzyle ; ii : Cl_2 ; iii : NH_4OH ; iv : Fe , NH_4Cl ; v : $\text{HC}(\text{OEt})_3$; vi : R_4X , K_2CO_3 ; vii : NaBH_4 .

Schéma 102 : Synthèse des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en position 7 et 8.

A cause de la présence du groupement nitro, les atomes de chlore en position 2 et 4 sont potentiellement labiles et substituables par le benzylthiol généré *in situ* par action de thiourée et de chlorure de benzyle.

En pratique, seul le chlore en *ortho* du nitro semble réagir et il se forme donc un seul intermédiaire benzylthioéther (**807**). Ce composé peut ensuite subir une rupture oxydative au moyen de chlore gazeux en présence d'acide acétique. Le chlorure de sulfonyle ainsi obtenu (**808**) est ensuite mis en contact avec de l'ammoniaque pour donner le nitrobenzènesulfonamide (**809**). Une réduction de la fonction nitro au fer en présence de chlorure ammonique permet d'aboutir à l'intermédiaire clé (**810**). La suite de la synthèse est tout à fait classique avec l'étape de cyclisation à l'orthoformiate d'éthyle, l'alkylation en position 4 et la réduction de la liaison double du cycle thiadiazine.

5.7.11. Les 4*H*-1,2,4-thiénothiadiazine 1,1-dioxydes.

Le noyau thiophénique a souvent été considéré comme bioisostère du noyau benzénique. Par ailleurs, dans le cadre des travaux entrepris sur les activateurs des canaux K_{ATP}, nous avons pu constater que le remplacement du système hétérocyclique 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde par son homologue 1,2,4-thiénothiadiazine 1,1-dioxyde avait donné d'excellents résultats pharmacologiques. Nous avons donc souhaité appliquer ce remplacement bioisostérique à la série des modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. Comme nous avons pu le constater dans le chapitre 3, la littérature chimique autour de ces thiénothiadiazines est bien moins abondante que celle des composés benzéniques. Seuls des analogues thiophéniques stricts du diazoxide ont été synthétisés récemment [Vega et al. 2004]. Peu d'*o*-aminothiophènesulfonamides, qui sont pourtant les intermédiaires clés de nos schémas de synthèse habituels, ont été décrits, sauf exceptionnellement dans des brevets.

Tout comme cela est le cas en série pyridinique, la variation de la position du soufre thiophénique donne naissance à trois séries distinctes, trivialement nommées 5-, 6- et 7-thiéno. Nous avons tenté d'explorer ces trois séries en plaçant en position 4 les groupements alkyles courts qui ont donné les meilleurs résultats dans les séries benzéniques et pyridiniques ; les positions 2 et 3 restant

dans un premier temps libres. Il s'agit donc des premiers thiénothiadiazine 1,1-dioxydes saturés décrits possédant cette structure 4-alkylées. Pour ce faire, nous avons adapté différents schémas réactionnels déjà présentés sur ce type de composés. Ces séries sont actuellement toujours en cours de développement et nous ne présenterons ci-après que les stratégies ayant déjà abouti à l'obtention de composés pharmacologiquement évaluable.

5.7.11.1. Les 6-chloro-4H-thiéno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Cette série a pu être développée grâce aux travaux réalisés par l'équipe de Nielsen dans la recherche d'activateurs des canaux K_{ATP} de la classe des 3-alkylamino-6-chloro-4H-thiéno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes proches du BPDZ 73 [Nielsen et al. 2002].

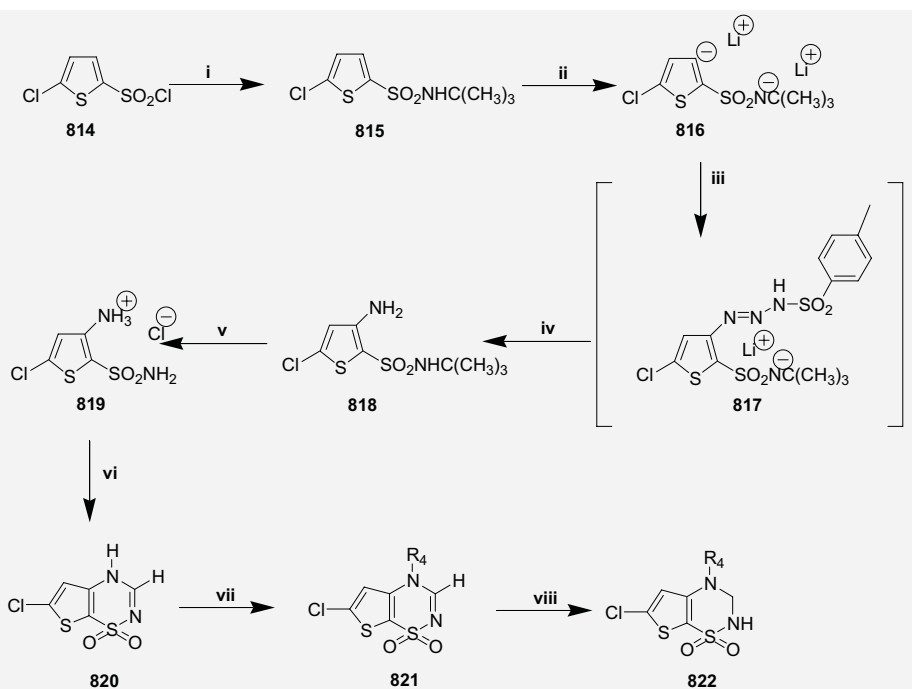


Schéma 103 : Synthèse des 4-alkyl-6-chloro-3,4-dihydro-2H-thiéno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Ces travaux décrivent la préparation du chlorhydrate de 3-amino-5-chlorothiophène-2-sulfonamide (**819**) à partir du *N-tert*-butyl-5-chlorothiophène-2-sulfonamide (**815**).

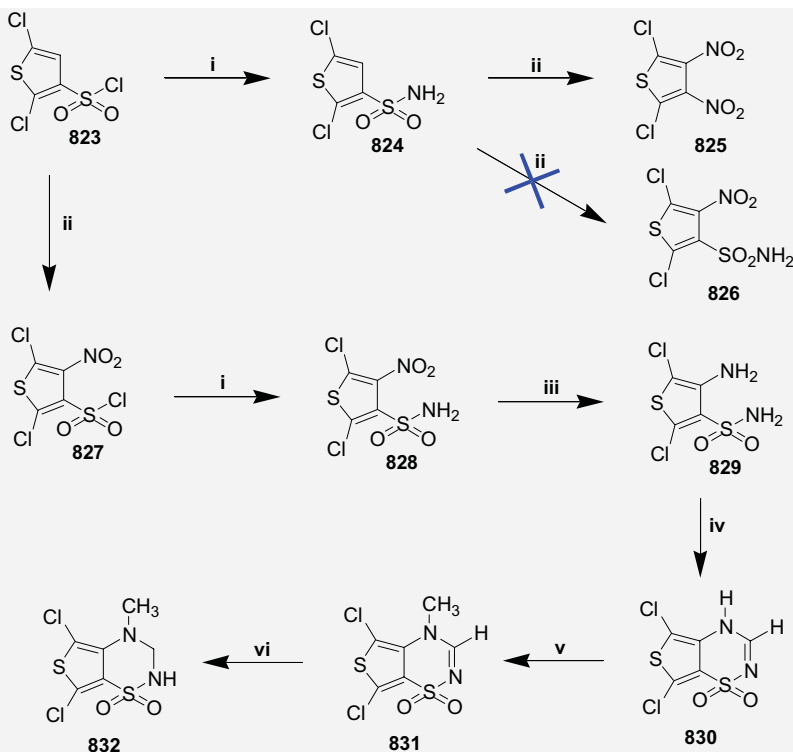
Le schéma 103 reprend les différentes étapes de cette synthèse. Le produit de départ est le chlorure de 5-chlorothiophène-2-sulfonyle (**814**) qui mis en réaction avec la *tert*-butylamine donne le composé **815**.

L'action d'une base forte non nucléophile telle que le butyllithium provoque d'une part la déprotonation de l'azote de la fonction sulfonamide mais également la déprotonation sélective de la position en α de cette fonction. La présence d'un groupement *tert*-butyle semble nécessaire non pour empêcher la déprotonation de la fonction sulfonamide mais pour rendre plus soluble dans les solvants organiques le composé déprotoné (**816**) [Graham et al. 1991]. Ce dernier est alors mis en réaction avec l'azide de *p*-toluènesulfonyl généré par action du chlorure de *p*-toluènesulfonyl sur l'azide sodique. La fonction azide se fixe alors dans la position 3 pour donner un composé instable (**817**) qui n'est pas isolé mais réduit directement en milieu biphasique par du NaBH₄ en présence d'un agent de transfert. Le *N-tert*-butyl-3-amino-5-chlorothiophène-2-sulfonamide (**818**) est ensuite traité à l'HCl et aboutit à l'intermédiaire attendu (**819**) avec libération d'isobutène. L'amine base est ensuite libérée par traitement à la soude et extraction par le diéthyléther avant d'être cyclisée à l'orthoformiate d'éthyle. La thiénothiadiazine obtenue (**820**) est alors alkylée avec divers halogénures d'alkyle et réduite au NaBH₄.

5.7.11.2. Les 5,7-dichloro-4H-thiéno[3,4-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Le schéma réactionnel choisi pour cette série n'utilise pas les intermédiaires 3-oxo décrits dans cette série car les procédés de synthèse permettant de les obtenir semblent longs et délicats [Arranz et al. 1997, 1998, 1999 et 2000, Vega et al. 2004]. Dans l'optique exploratoire que nous nous étions fixés, il nous est apparu plus opportun d'opter pour une nouvelle stratégie basée sur un produit de départ, commercialement disponible qui est le chlorure de 2,5-dichlorothiophène-3-sulfonyl (**823**, Schéma 104). Ce composé a tout d'abord été transformé en sulfonamide correspondant (**824**) par action d'ammoniaque diluée.

Une seule position de substitution électrophile est alors disponible sur le noyau thiophénique. L'action d'un agent nitrant à froid sur ce composé devait, en principe, nous donner le composé 4-nitro attendu (**826**). Cependant, il apparaît que sous l'effet du mélange acide nitrique/acide sulfurique, une réaction assez violente se produise et qu'en lieu et place du dérivé **826**, il est obtenu le dérivé 3,4-dinitro (**825**) après la perte du groupement sulfonamide. La même réaction de nitration, dans des conditions similaires de concentrations et de températures mais effectuée sur le chlorure de sulfonyle **823** et non plus sur le sulfonamide **824** donne heureusement les résultats escomptés avec, si la température est rigoureusement contrôlée, l'accès au chlorure de 2,5-dichloro-4-nitrothiophène-3-sulfonyle (**827**).



Réactifs. I : NH_4OH ; ii : $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; iii : $\text{Fe}/\text{NH}_4\text{Cl}$; iv : $\text{HC}(\text{OEt})_3$; v : CH_3I ; vi : NaBH_4 .

Schéma 104 : Synthèse des 4-alkyl-5,7-dichloro-3,4-dihydro-2H-thiéno[3,4-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Le chlorure de sulfonyl est ensuite transformé en sulfonamide (**828**) au moyen d'ammoniaque. Le 4-amino-2,5-dichlorothiophène-3-sulfonamide (**829**) est ensuite préparé par réduction au fer de la fonction nitro. Cet intermédiaire clé ayant été obtenu, le reste du schéma aboutissant aux composés finis relève d'une série d'étapes connues.

La première est évidemment l'étape de fermeture de cycle à l'orthoformiate d'éthyle et ne pose pas de problème dans ce cas. Par contre, l'étape suivante qui consiste à alkyler la position 4 est plus délicate. En effet, tout comme en série benzénique substituée en position 5, il semble qu'il s'agisse d'un problème d'encombrement stérique empêchant l'approche de réactifs trop encombrés. La méthylation à l'iodure de méthyle se produit sans trop de difficultés et le composé 4-méthylé (**831**) est isolé et réduit au NaBH_4 . L'utilisation d'iodure d'éthyle est déjà plus problématique puisqu'aucun produit de réaction n'apparaît. Le 5,7-dichloro-4-éthyl-4*H*-thiéo[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**833**, Schéma 105) a cependant été obtenu de manière fortuite. En effet, lors de l'étape de cyclisation à l'orthoformiate d'éthyle de l'*o*-aminothiophènesulfonamide, un chauffage du milieu au delà de 150°C nous a fourni un composé différent de celui attendu. Après analyse, il est apparu que ce dérivé était en réalité le composé **833**. Cette action « alkylante » de l'orthoformiate d'éthyle n'a, à notre connaissance, jamais été relevée dans la littérature.

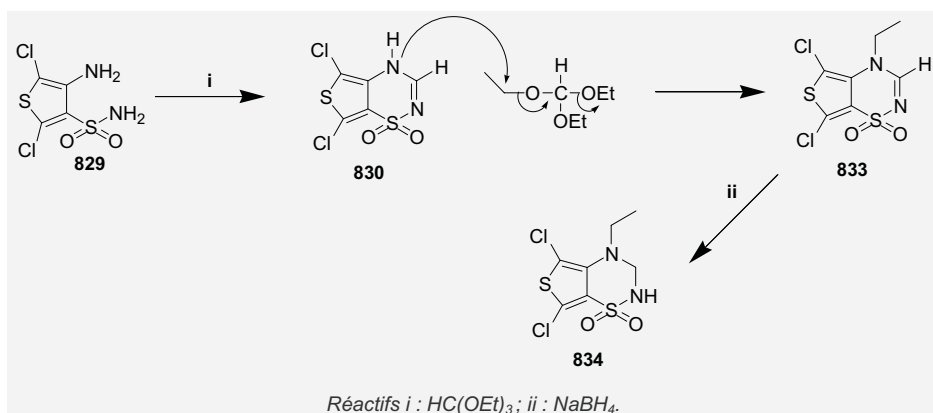
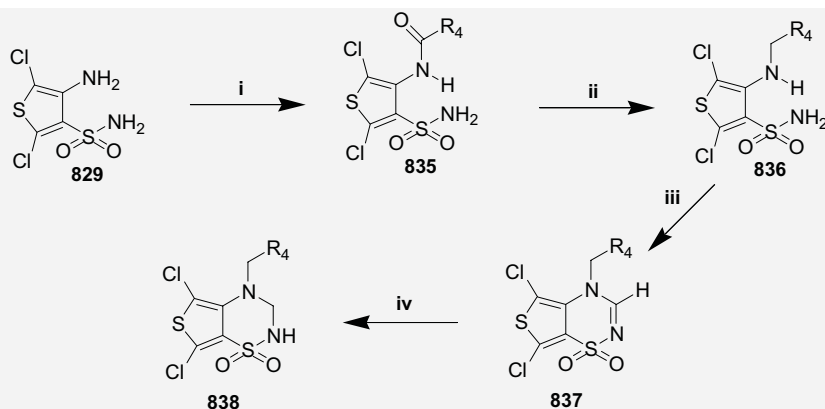


Schéma 105 : Synthèse du 4-éthyl-5,7-dichloro-3,4-dihydro-2*H*-thiéo[3,4-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde.

Il est possible d'imaginer plusieurs mécanismes réactionnels potentiels. L'un d'eux pourrait être une attaque nucléophile du doublet de l'azote en position 4 sur le carbone électrophile de l'éthanol libéré lors de l'étape de cyclisation mais compte tenu de la volatilité de l'éthanol et surtout du faible pouvoir nucléofuge du groupement hydroxyle, cette hypothèse semble peu probable. Par contre l'attaque à haute température de ce même doublet de l'azote en position 4, non plus sur le carbone central de l'orthoformiate d'éthyle, mais sur un des carbones électrophiles des groupements O-éthyles est possible. Cette attaque entraînerait le départ de l'ester éthylique de l'acide formique (Schéma 105). Il ne s'agit cependant que d'une supposition et aucun élément matériel ne nous permet d'étayer cette thèse.

Une voie de préparation alternative pour les composés porteurs d'autres groupements alkyles en position 4 a donc été envisagée. Il s'agit de la même que celle appliquée aux séries benzéniques 5-substituées à savoir l'acylation de l'amine de l'*o*-aminothiophènesulfonamide (**829**, Schéma 106). L'intermédiaire acylamine obtenu (**835**) est ensuite réduit soit au LiAlH_4 soit au BH_3 pour donner le 4-alkylamino-2,5-dichlorothiophène-3-sulfonamide (**836**) qui peut être cyclisé à l'orthoformiate d'éthyle puis réduit au NaBH_4 .



Réactifs. i : R_4COCl ; ii : LiAlH_4 ou BH_3 ; iii : HC(OEt)_3 ; iv : NaBH_4 .

Schéma 106 : Synthèse des 4-alkyl-5,7-dichloro-3,4-dihydro-2H-thiéno[3,4-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

5.7.11.3. Les 4*H*-thiéno[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Cette série semble la plus difficile d'accès ; elle est la moins décrite des trois et semble fortement s'apparenter à la série 6-aza pyridinique qui est chimiquement la série dont l'accès est le plus complexe. Cela est probablement dû à une plus faible stabilité de certains intermédiaires de synthèse.

Notre première approche de cette série résulte de l'utilisation d'un produit commercial où le groupement sulfonamide est déjà bien positionné. Il s'agit, comme en série 6-thiéno, du chlorure de 2,5-dichlorothiophène-3-sulfonyl (**823**). Nous pensions que la présence d'un groupement électrocaptant pouvait favoriser la substitution d'un ou des deux atomes de chlore par différentes amines. Malheureusement, malgré toutes nos tentatives et les conditions drastiques parfois employées, aucune réaction de substitution n'a été mise en évidence. L'atome de chlore en position 2 semble donc particulièrement peu labile. Il peut cependant être substitué lors d'une réaction de cyclisation intramoléculaire de la 2,5-dichlorothiophène-3-sulfonylguanidine (**839**, schéma 107) que nous avons obtenu par action du carbonate de guanidine sur le chlorure de sulfonyl correspondant en milieu biphasique. Le chauffage à fusion de cette sulfonylguanidine donne avec de faibles rendements le 3-amino-4*H*-thiéno[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde (**840**). Ce schéma a d'ailleurs été décrit tout récemment par Nielsen pour l'obtention de dérivés 3-alkylamino dans cette série thiophénique [Nielsen et al. 2006]. Nous avons alors tenté d'hydrolyser cet intermédiaire dans différents milieux sans toutefois réussir à obtenir l'aminothiophènesulfonamide désiré (**841**).

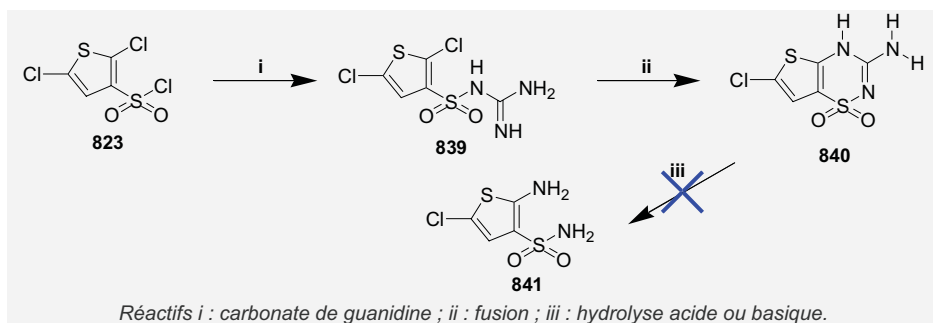
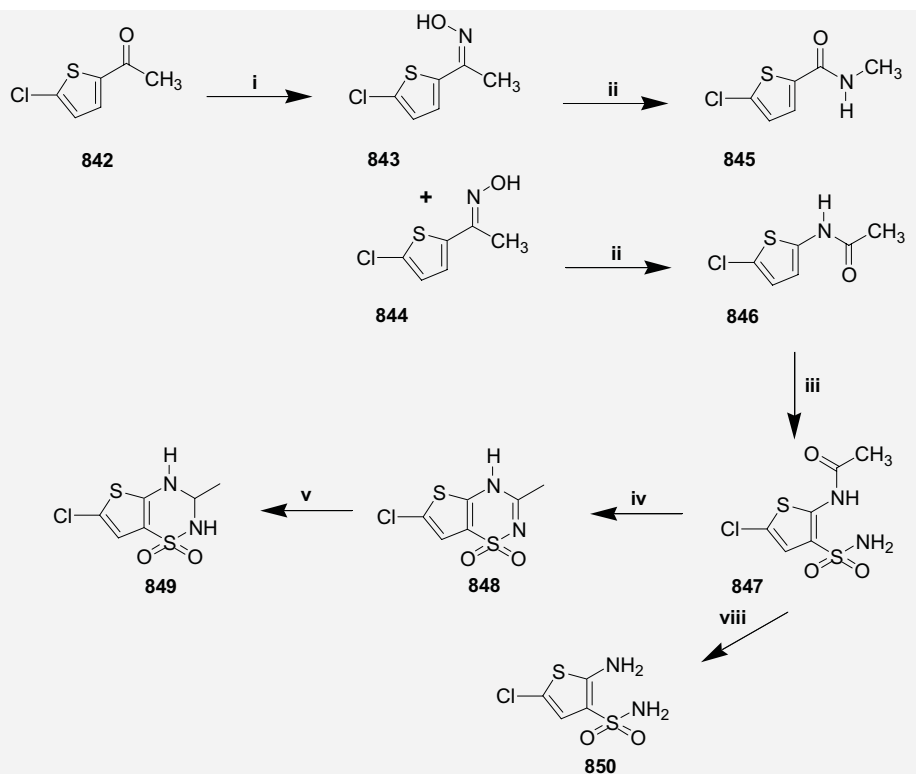


Schéma 107 : Préparation du 3-amino-4*H*-thiéno[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde et ses tentatives d'hydrolyse.

Nous avons dès lors envisagé une autre stratégie de synthèse basée sur un schéma réactionnel présenté dans des brevets anciens [Topliss et al. 1972b] qui décrivent la préparation d'analogues thiophéniques stricts du diazoxide. Ce schéma est cependant long et peu rentable au niveau des rendements. En effet, la première étape consiste à former l'oxime du 5-chloro-2-acétylthiophène (**842**, schéma 108) par action d'hydroxylamine ; les deux isomères de l'oxime (**843** et **844**) étant obtenus en mélange équimolaire. La seconde étape est en fait un réarrangement de Beckmann qui, suivant l'isomère de l'oxime considéré (syn ou anti), nous conduit soit au dérivé acétamido attendu (**846**), soit à son isomère méthylamido (**845**).



Réactifs. I : NH_2OH ; ii : PCl_5 ; iii : ClSO_3H ; NH_3 gaz ; iv : Δ ; v : DIBAL ; vi : LiAlH_4 ; vii : HCOH , H_3O^+ ; viii : HCl .

Schéma 108 : Préparation des 4H-thiéno[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes.

Il est donc nécessaire de séparer les deux formes oximes avant d'entreprendre le réarrangement. Cela a comme première conséquence la réduction drastique des rendements de la première étape. La suite n'est guère plus brillante au niveau des rendements puisque la chlorosulfonation de l'intermédiaire acétamido se réalise assez difficilement. Il convient, dans ce cas particulier, d'éviter le contact du chlorure de sulfonyle formé avec une solution aqueuse d'ammoniaque sous peine de décomposer totalement le dérivé. L'obtention de la fonction sulfonamide se réalise donc en milieu organique par « bullage » d'ammoniac gazeux. A ce stade, nous avons entrepris la cyclisation du 2-acétamido-5-chlorothiophène-3-sulfonamide (**847**) comme décrit pour obtenir l'analogue du diazoxide (**848**) qui a été réduit au DiBAL pour fournir l'analogue de l'IDRA-21 (**849**).

Contrairement au cas des composés non substitués en position 3, cette étape de réduction ne se passe généralement pas avec les hydrures classiques tels que le NaBH_4 , le LiAlH_4 ou le BH_3 ; il a fallu recourir au DIBAL (hydrure de diisobutylaluminium) pour que cette liaison double se réduise. Cette étape de réduction d'un composé 3-alkylé « insaturé » en dérivé « saturé » n'avait d'ailleurs jamais été décrite à notre connaissance. Par ailleurs, nous avons tenté une hydrolyse de l'intermédiaire **847** en milieu acide. Celle-ci s'avère difficile et, même si l'*o*-aminothiophènesulfonamide (**850**) a été obtenu, les rendements sont trop faibles pour espérer l'application de ce schéma à la préparation de composés finis. Afin toutefois d'obtenir des drogues proches de nos composés « leads » dans les séries benzénique et pyridinique, il serait possible d'effectuer la réduction de la fonction acétamido de l'intermédiaire **847** au moyen de LiAlH_4 comme cela avait déjà été entrepris dans d'autres schémas afin d'obtenir le 5-chloro-2-éthylaminothiophène-3-sulfonamide.

Il existe par ailleurs une approche assez particulière d'obtention du 2-aminothiophène basée sur la réaction de Gewald. Celle-ci consiste en une réaction de condensation multi-composantes entre le soufre, un méthylène α -carbonylé et un α -cyanoester. Il s'agirait dans un premier temps d'une réaction de type Knoevenagel suivie d'une réaction concertée avec inclusion du soufre [Sabnis 1994]. Une variante de cette réaction de Gewald a également été développée avec comme produit de départ des 2,5-dihydroxy-1,4-dithianes (adduits entre des cétones et du soufre) qui peuvent être mis en réaction avec un

méthylène α -cyané [Litvinov et al. 1986]. Lorsque ce méthylène est lui même substitué par une fonction sulfonamide, il est alors possible d'obtenir des 2-aminothiophène-3-sulfonamides, qui comme nous l'avons démontré sont des intermédiaires clés pour la synthèse des composés finis.

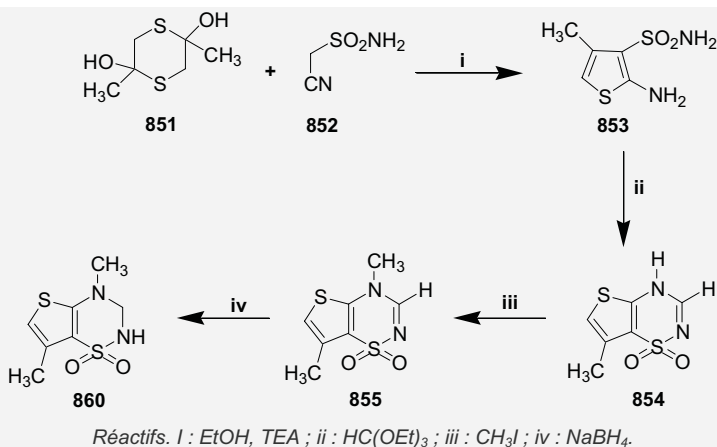


Schéma 109 : Préparation du 4,7-diméthyl-2,3-dihydro-4H-thiéno[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde.

Nous avons donc entrepris l'exploration de cette voie de synthèse en mettant en réaction le 2,5-dihydroxy-2,5-diméthyl-1,4-dithiane (**851**, schéma 109) et le 2-sulfamoylacétonitrile (**852**) (obtenu par action d'ammoniaque sur le chlorure de sulfonyle correspondant). Le 2-amino-4-méthylthiophène-3-sulfonamide (**853**) est ainsi obtenu mais avec un rendement inférieur à 10 %. Cet intermédiaire est ensuite cyclisé à l'orthoformiate d'éthyle avant d'être méthylé à l'iode de méthyle et réduit au NaBH₄.

Cette série, tout comme les autres séries thiophéniques, est encore en cours de développement et de nouvelles stratégies sont actuellement à l'étude.

5.8. Evaluation pharmacologique des drogues synthétisées en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.

Un grand nombre de composés a donc été synthétisé dans plusieurs séries chimiques différentes. Nous allons dans ce chapitre présenter les résultats du premier test de criblage utilisé pour évaluer la capacité de nos drogues à augmenter le courant induit par l'AMPA. Les études étant toujours en cours, certains composés n'ont pas encore pu être évalués. C'est le cas notamment des composés thiophéniques. Par ailleurs, sur quelques composés « leads », nous décrirons les quelques résultats pharmacologiques obtenus sur d'autres modèles *ex vivo* et *in vivo*.

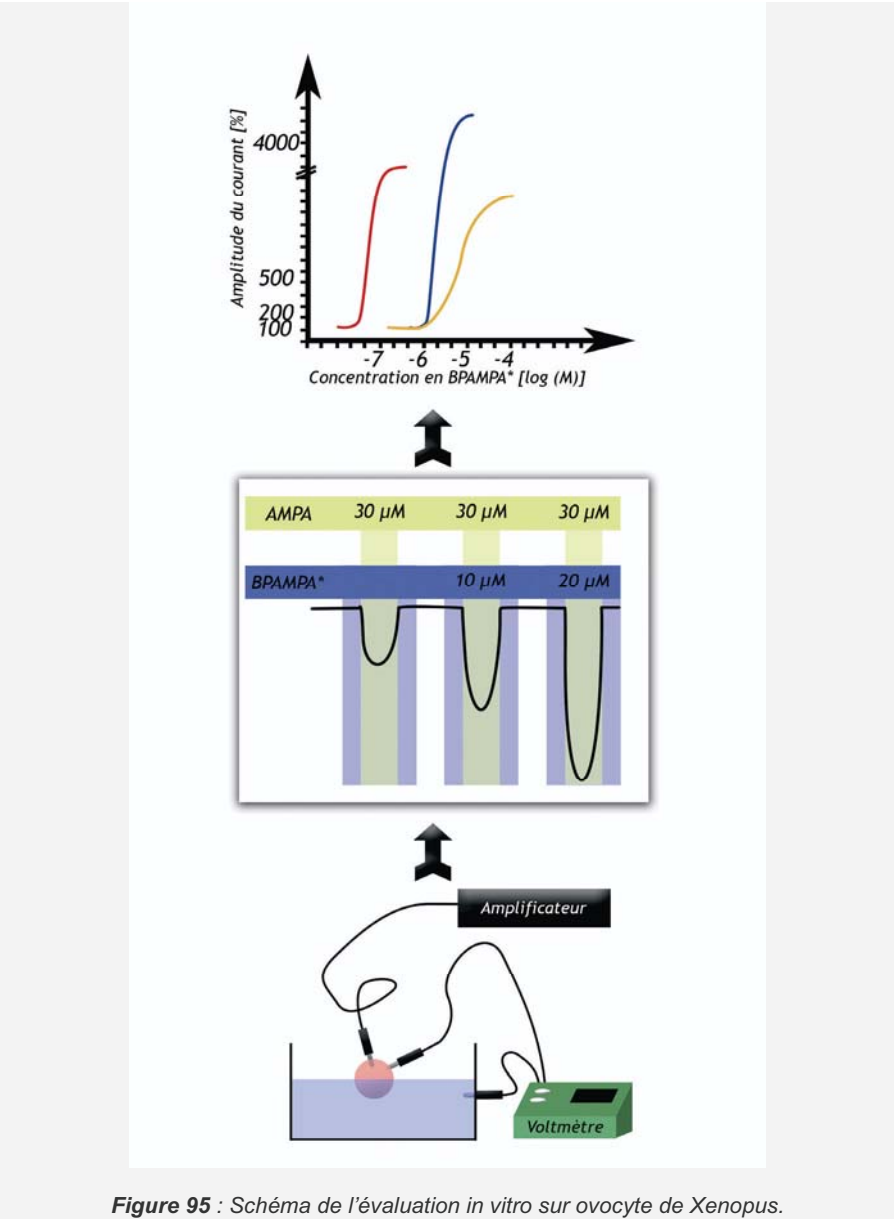
Ces évaluations ont été réalisées au sein des laboratoires Servier par l'équipe du Docteur Lestage.

Décrivons tout d'abord les différents tests pharmacologiques utilisés et les résultats qu'ils donnent sur les composés de la classe des 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes utilisés comme modèles de référence tels le cyclothiazide, le diazoxide, l'IDRA-21 et le S 18986.

Le modèle pharmacologique de « base » utilisé pour évaluer l'activité de nos drogues est l'étude des courants excitateurs induits par l'AMPA dans les ovocytes de *Xenopus*. Ces ovocytes sont injectés d'ARN messenger provenant de cortex de rat puis laissés 2 à 3 jours en incubation pour permettre l'expression des récepteurs AMPA. L'enregistrement électrophysiologique du courant induit est réalisé par la méthode du *Voltage Clamp* à 2 électrodes, une troisième étant placée dans le bain pour servir de référence. La figure 95 propose une schématisation de ce système ainsi que les résultats qu'il génère.

Toutes les drogues, ainsi que les concentrations d'AMPA sont appliquées *via* le milieu d'incubation et le courant électrique est mesuré à la fin de la période d'incubation. Il est débuté par l'adjonction de 30 μM d'AMPA, cet ajout provoque l'apparition d'un courant dont l'amplitude est mesurée. Il s'agit de la réponse basale à la stimulation des récepteurs. Après retour du signal à la normale, la drogue à évaluer est additionnée à la concentration la plus basse puis, après quelques temps, 30 μM d'AMPA sont à nouveau ajoutés. Ce décalage entre l'ajout de la drogue et de l'agent stimulant est nécessaire pour s'assurer que la drogue

n'agit pas seule mais qu'elle a besoin de l'AMPA pour provoquer une réaction physiologique. En d'autres termes, nous voulons nous assurer que le composé n'exerce pas une activité agoniste des récepteurs AMPA.



Une fois la drogue et l'AMPA ajoutés, l'amplitude du courant est de nouveau déterminée. Des concentrations croissantes de produits sont additionnées jusqu'à atteindre un plateau au delà duquel le courant induit par l'AMPA n'augmente plus.

Des courbes doses-réponses sont ainsi obtenues d'où trois valeurs sont extraites :

- La valeur d'EC_{2X} qui représente la concentration en drogue doublant le courant induit par 30 μ M d'AMPA.
- La valeur d'EC_{5X} qui représente la concentration en drogue quintuplant le courant induit par 30 μ M d'AMPA.
- L'EMax qui représente l'effet maximum de la drogue en pourcentage d'augmentation par rapport à la valeur basale.

Certains composés particulièrement actifs sur le modèle d'ovocyte ont également été étudiés sur la réponse post-synaptique au niveau de l'hippocampe. L'hippocampe a été choisi ici car c'est une région du cerveau particulièrement impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation [Bliss et al. 1993, Wallenstein et al. 1998].

Le test consiste à mesurer dans des coupes d'hippocampe de rat, au niveau de la région CA1 (corne d'anion), les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSEs) provoqués par la stimulation des collatérales de Schaffer (Cf. Figure 96).

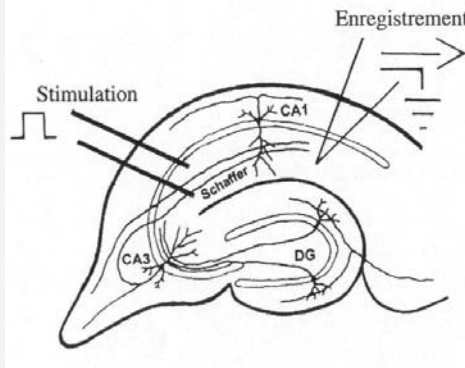


Figure 96 : schéma d'un hippocampe avec emplacement des électrodes

Les récepteurs NMDA sont bloqués par addition d'ion Mg^{2+} dans le bain : les potentiels mesurés résultent donc uniquement de l'activation des récepteurs post-synaptiques non-NMDA.

Cette évaluation pharmacologique permet d'étudier l'action de nos drogues à un niveau plus élevé (les circuits neuronaux locaux) que lors du premier test *in vitro* (action sur les récepteurs AMPA) ; de plus, cette méthodologie offre de nombreux avantages par rapport aux enregistrements *in vivo* :

- La composition du bain d'incubation peut être facilement modifiée selon les besoins de l'expérience ;
- Le placement des électrodes ne se fait pas en aveugle (contrôle visuel possible) ;
- Les tranches d'hippocampe contiennent les trois éléments prépondérants du circuit trisynaptique (gyrus dentatus → CA3 → CA1).

La réponse obtenue est une courbe de potentiel post-synaptique d'où peuvent être extraits plusieurs paramètres tels que l'aire sous la courbe, l'amplitude de la réponse et sa largeur. Ces paramètres sont présentés soit sous la forme de DE50 ou d'A50 qui représentent respectivement la concentration en drogue amenant une augmentation de 50 % de la durée et de l'amplitude du potentiel excitatoire postsynaptique, soit sous la forme du pourcentage d'augmentation de l'amplitude ou de la durée du potentiel à une concentration en drogue donnée.

D'autres modèles *in vitro* ou *in vivo* (i.e. modèle de reconnaissance d'objet chez le rat, étude de toxicité ...) ont également été envisagés pour les drogues d'intérêt. Nous ne présenterons pas dans ce travail les résultats de ces investigations, d'une part, parce qu'ils sont encore en cours et donc souvent fragmentaires, et d'autre part pour les raisons de confidentialité réclamées par la collaboration industrielle que nous entretenons sur ce sujet.

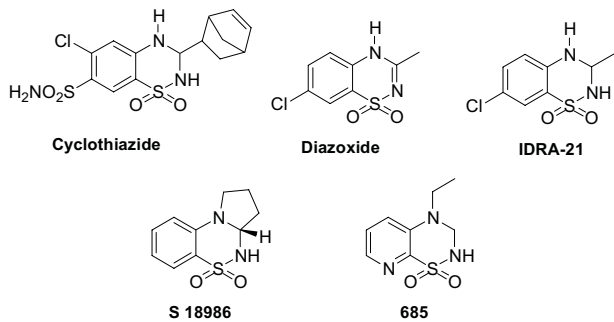
5.8.1. Evaluation des composés de références

Le cyclothiazide, le diazoxide, l'IDRA-21 et le S 18986 sont les benzothiadiazine 1,1-dioxydes de référence choisis lors de l'évaluation *in vitro*, nous y avons ajouté le composé 685 qui est le meilleur dérivé pyridinique. Le tableau 18 présente les résultats obtenus sur le modèle d'ovocyte. L'ESM

(*standard error to the mean*, erreur standard à la moyenne) est accolée à la moyenne calculée pour chaque EC2X et EC5X.

Il apparaît que le cyclothiazide est, parmi les benzothiadiazine 1,1-dioxydes de référence, le potentiateur AMPA le plus puissant. La concentration amenant le doublement du courant induit par l'AMPA est de l'ordre du μM . Le composé S 18986, qui est actuellement en phase clinique II, est moins actif en terme d'EC2X et d'EC5X ; il est cependant bien plus puissant que l'IDRA-21 et que le diazoxide, ce dernier ne montrant un effet qu'à des concentrations largement supérieures à celle à laquelle il agit en tant qu'activateur des canaux K_{ATP} . Le passage de la série « insaturée » à la série « saturée » semble dans ce cas provoquer un net gain d'activité. Le composé pyridinique **685** est, quant à lui, plus actif que les autres références, exception faite du cyclothiazide.

Tableau 18 : Effets des références sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μM) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Drogue	EC2X ^a	EC5X ^b	EMax ^c
Cyclothiazide	1.6 ± 0.3	9.8 ± 1.9	844
IDRA-21	134.3 ± 7.3	509 ± 64	> 782
Diazoxide	448 ± 76	>1000	-
S 18986	24.0 ± 2.9	78.2 ± 8.9	1263
685	8.8 ± 1.3	19 ± 3	1478

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μM) (moyenne ± ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c effet maximum sur le courant induit par l'AMPA.

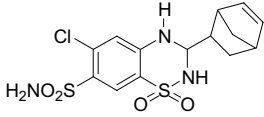
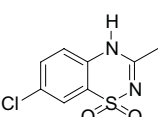
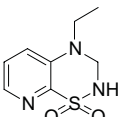
Au niveau de l'effet maximal provoqué par les drogues, il est à noter que pratiquement toutes multiplient par dix la valeur basale du courant induit par l'AMPA.

Par ailleurs, les molécules de référence ont également été étudiées dans le modèle mesurant les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) induits par stimulation électrique sur tranches d'hippocampe. Le tableau 19 reprend les valeurs de DE50, représentant la concentration en drogue qui augmente de 50% la durée du PPSE et les valeurs d'A50 représentant la concentration en drogue qui augmente de 50 % l'amplitude du PPSE.

Dans ce modèle, deux des références testées, à savoir le cyclothiazide et le diazoxide, n'affectent pas le PPSE, même à des doses élevées. Si cela peut se comprendre pour le diazoxide (déjà peu actif sur ovocyte de *Xenopus*), cela est plus surprenant pour le cyclothiazide qui se montrait très actif dans le modèle de criblage. Cela pourrait s'expliquer par l'incapacité du cyclothiazide à moduler les récepteurs AMPA situés sur les neurones post-synaptiques de l'hippocampe CA. Contrairement au cyclothiazide et au diazoxide, le composé **685** se montre relativement actif tant sur l'amplitude que sur la durée du PPSE prouvant donc que cette drogue est capable d'agir sur les récepteurs AMPA post-synaptiques.

Ces résultats sont en adéquation avec l'existence potentielle de plusieurs isoformes de récepteurs AMPA.

Tableau 19 : Effets des références sur la durée et l'amplitude du potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) induit par stimulation électrique sur tranches d'hippocampe de rat.

		
Cyclothiazide	Diazoxide	685
Drogue	DE50 ^a (μM)	A50 ^b (μM)
Cyclothiazide	> 300	> 300
Diazoxide	> 500	> 500
685	65 ± 7	97 ± 20

^{a, b} Concentration de drogue en μM qui respectivement augmente de 50% la durée et l'amplitude du PPSE

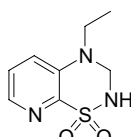
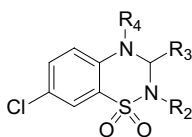
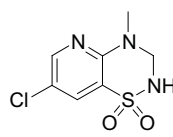
5.8.2. Evaluation des 4-alkyl-7-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes (série 7-chloro).

Tout comme nous l'avons fait en série « activateurs des canaux K_{ATP} », nous avons aussi exploré le passage des séries pyridiniques vers les séries benzéniques. Nous nous sommes attachés dans un premier temps à la préparation et à l'évaluation de composés substitués en position 7 par un atome de chlore tout comme cela est le cas pour le diazoxide et l'IDRA-21. Pour ce changement d'hétérocycle nous nous sommes bien évidemment basés sur les relations structure-activité déduites des séries pyridiniques en reprenant l'étude des pharmacomodulations en position 4 mais également en positions 2,4.

L'effet des drogues de cette série sur le courant induit par l'AMPA dans des ovocytes exprimant les récepteurs AMPA est présenté dans le tableau 20. La première constatation à relever est que la plupart des composés évalués se montrent plus puissant que l'IDRA-21 et dans une moindre mesure que le S 18986. Par ailleurs, la substitution en position 4 du noyau thiadiazine par un groupement méthyle ou éthyle (**861** et **695**) donne des composés aussi actifs voire plus actifs que les meilleurs composés pyridiniques **685** et **686**. Il a aussi été démontré que le composé **695** augmentait de près de 40 fois la valeur maximale du courant induit par l'AMPA, ce qui n'avait jamais été relevé pour aucune drogue (la plupart du temps, les meilleurs dérivés induisent une augmentation de seulement 10 fois la valeur du courant). Ce composé a donc été sélectionné pour différents tests supplémentaires *in vivo* tels que le test de reconnaissance d'objets. Malheureusement, tout comme certains dérivés pyridiniques, il n'a pas donné les résultats escomptés (pas d'effet *per os*). Il nous est apparu plausible que cela puisse être lié à une métabolisation rapide de la drogue.

- Nous avons donc souhaité explorer la possibilité d'introduire un hétéroatome sur la chaîne latérale en position 4 afin d'éventuellement empêcher ou ralentir la métabolisation pour autant que cette dernière ait lieu sur cette chaîne alkyle.

Tableau 20 : Effets des dérivés 7-chloro sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.

**685****686**

Composé	R ₂	R ₃	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
861	H	H	CH ₃	6.0 $\pm$ 0.6	18 $\pm$ 3
695	H	H	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	H	H	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6
862	H	H	CH ₂ CF ₃	19 ^c	38 ^c
863	H	H	CH ₂ CHF ₂	13.5 ^c	32.8 ^c
864	H	H	(CH ₂) ₃ F	22 ^c	38 ^c
865	H	H	(CH ₂) ₄ F	20 ^c	32 ^c
866	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	54	144
867	H	H	CH ₂ CHCl ₂	12 ^d	-
868	CH ₃	H	CH ₃	7 $\pm$ 3	17 $\pm$ 8
869	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	21 $\pm$ 10	64 $\pm$ 24
IDRA-21	-	-	-	134.3 $\pm$ 7.3	509 $\pm$ 64
S 18986	-	-	-	24.0 $\pm$ 2.9	78.2 $\pm$ 8.9
685	H	H	CH ₂ CH ₃	8.8 $\pm$ 1.3	19 $\pm$ 13
686	H	H	CH ₃	21 $\pm$ 4	81 $\pm$ 14

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^d insoluble à cette concentration. ^c : n = 2 ; ^d : pas d'Emax.

Le choix de l'atome de fluor s'est rapidement imposé. En effet, cet atome semble posséder des qualités qui le rendent particulièrement intéressant au niveau pharmaceutique [Cnubben et al. 1994, O'Hagan et al. 1997, Duniz et al. 1997, Smart 2001] :

- Il forme avec l'atome de carbone une liaison extrêmement forte (perte du caractère alkylant des autres halogènes).
- De plus, il est le moins polarisable des halogènes, ce qui le rend relativement peu réactionnel vis-à-vis d'un nucléophile (du moins en ce qui concerne les dérivés aliphatiques).

- Sa taille est petite et proche de celle de l'atome d'hydrogène, il n'induit pas d'augmentation importante d'encombrement stérique.
- Malgré son faible encombrement stérique, il peut modifier profondément les propriétés électroniques des composés et influencer ainsi toute une série de paramètres physico-chimiques.
- Il serait capable, tout comme les hydroxyles, d'accepter des liaisons hydrogènes.
- Il peut modifier voire supprimer certaines voies de métabolisation.

Ainsi, nous avons placé un ou plusieurs atomes de fluor sur la chaîne alkyle en position 4 en postulant que cette chaîne soit un site potentiel de métabolisation.

Le composé monofluoré **696** se montre particulièrement intéressant puisqu'il conserve des valeurs d'EC_{2X} et d'EC_{5X} semblables à celle de son homologue non fluoré **695**.

L'introduction d'un second puis d'un troisième atome de fluor sur le groupement éthyle entraîne une perte graduelle de la puissance modulatrice (composés **862** et **863**) mais donne des drogues qui maintiennent cependant une excellente activité. Il en est de même pour l'allongement de la chaîne éthyle. Le passage du dérivé 4-(2-fluoroéthyle) (**696**) au composé 4-(3-fluoropropyle) (**864**) et 4-(4-fluorobutyle) (**865**) se fait avec une perte minime d'activité au niveau de l'EC_{2X} mais un maintien de l'activité au niveau de l'EC_{5X}.

D'une manière générale, l'introduction de fluor sur le groupement en position 4 ne semble pas défavorable au pouvoir modulateur des récepteurs AMPA des composés.

Le dérivé **696** a été sélectionné pour subir des évaluations pharmacologiques complémentaires *in vitro* et *in vivo*. Les premiers résultats partiels sont encourageants puisque ce composé augmente de manière significative la durée et l'amplitude du potentiel post-synaptique excitatoire à une concentration de 50 µM. Il est, dans ce test, plus puissant que les composés de référence évalués jusqu'à ce jour. Par ailleurs, il semble également qu'il soit significativement actif dès la dose de 1 mg/kg *per os* dans le test de reconnaissance d'objets chez le rat Wistar. Ces constatations semblent confirmer l'hypothèse de la présence d'un site de métabolisation potentiel sur la chaîne latérale en position 4 et de sa possible désactivation par l'insertion d'un atome de fluor. Le composé **696** est donc un composé particulièrement intéressant et

prometteur. Il est actuellement toujours en cours d'étude tant au point de vue pharmacodynamique, qu'au niveau de ses paramètres ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion) et de sa toxicité.

Le remplacement de l'atome de fluor du composé **696** par un groupement hydroxyle ne permet pas de vérifier l'hypothèse d'une bioisostérie entre un OH et un fluor. En effet, le composé **866** se montre largement moins actif que son homologue fluoré. De même, le remplacement des deux atomes de fluor du **863** par deux atomes de chlore (composé **867**) donne un composé qui double la valeur du courant AMPA à 12 μM mais dont l'effet maximal n'a pu être déterminé. Cela signifie qu'il n'agit pas de manière puissante en tant que modulateur allostérique positif.

La diméthylation en position 2 et 4 conduit à un composé (**868**) d'activité similaire aux dérivés non substitués en position 2 (**695** et **696**). L'allongement de la chaîne en position 4 (**869**) conduit à une diminution de la puissance de la drogue.

Il semble donc que l'augmentation globale de l'encombrement stérique du noyau thiadiazine aille de paire avec une perte de l'activité.

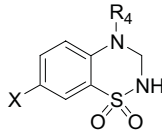
Tout comme en série pyridinique, il semble que les meilleurs choix de substituants du noyau thiadiazine soient les groupements méthyle, éthyle et 2-fluoroéthyle positionnés sur l'azote 4.

5.8.3. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes non substitués sur le noyau benzénique (série 7-H).

Avant de continuer les pharmacomodulations autour du système 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde, nous avons voulu vérifier l'impact que possédait l'atome de chlore en position 7 sur l'activité en préparant et en évaluant des composés non substitués sur le noyau benzénique.

Le tableau 21 compare les résultats sur ovocytes obtenus avec les composés « 7-H » aux résultats générés par leurs analogues 7-chloro. Sans que la perte ne soit sévère, il peut juste être relevé que l'insertion d'un chlore en position 7 conduit à des drogues légèrement plus puissantes. Cependant, les dérivés non substitués en position 7 conservent une activité du même ordre de grandeur que celle du S 18986.

Tableau 21 : Effets des dérivés « 7-H » sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	X	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
870	H	CH ₃	22 $\pm$ 4	46 $\pm$ 8
871	H	CH ₂ CH ₃	14 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3
872	H	CH ₂ CH ₂ F	15 ^c	33 ^c
861	Cl	CH ₃	6.0 $\pm$ 0.6	18 $\pm$ 3
695	Cl	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	Cl	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c insoluble à cette concentration. ^d : n = 2 ; ^d : pas d'E max.

5.8.4. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 7 sur le noyau benzénique.

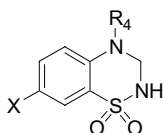
Dans la logique exploratoire du noyau benzothiadiazine au niveau de la modulation des récepteurs AMPA, il nous est apparu opportun de poursuivre dans un premier temps les modulations de la position 7 du noyau benzénique en y introduisant, outre les autres halogènes, des groupements électrodonneurs et électroattracteurs. En effet, aucune donnée de relations structure-activité ne nous permettait à ce stade d'écarter l'un ou l'autre type de substituant. Nous avons choisi pour cette approche de ne pas substituer le noyau thiadiazine en position 2 et 3 et de nous limiter aux chaînes éthyle et fluoroéthyle en position 4.

5.8.4.1. Les dérivés 7-halogénés

Nous avons tout d'abord préparé les composés 7-fluorés, 7-bromés et 7-iodés analogues des composés **695** et **696**.

L'analyse des résultats générés par l'évaluation sur ovocytes des différents composés 7-halogénés (tableau 22) est relativement limpide. Elle est en adéquation avec l'impression générale relevée pour l'ensemble des résultats à savoir que l'encombrement stérique global de la molécule est un facteur plutôt défavorable à l'activité. Par rapport aux dérivés chorés (**695** et **696**), l'introduction d'un atome de fluor entraîne plutôt un léger gain d'activité avec des composés (**873** et **874**) dont l'EC_{2X} se rapproche du μM et de la valeur obtenue avec le cyclothiazide.

Tableau 22 : Effets des dérivés substitués en position 7 par un halogène sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μM) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	X	R ₄	EC _{2X} (μM) ^a	EC _{5X} (μM) ^b
873	F	CH ₂ CH ₃	3.2 ± 0.1	7.3 ± 0.5
874	F	CH ₂ CH ₂ F	3.6 ± 0.4	9.1 ± 1.9
875	Br	CH ₂ CH ₃	29 ± 6	78 ± 16
876	Br	CH ₂ CH ₂ F	17 ^c	55 ^c
877	I	CH ₂ CH ₃	95 ± 31	-
878	I	CH ₂ CH ₂ F	120 ^c	-
695	Cl	CH ₂ CH ₃	5.1±2.1	16±3
696	Cl	CH ₂ CH ₂ F	6.7 ± 0.9	14.5 ± 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μM) (moyenne ± ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c insoluble à cette concentration. ^c : n = 2

Par ailleurs, il est à noter que le composé **873** augmente de plus de 40 fois la valeur du courant induit par l'AMPA, ce qui est la valeur la plus importante jamais notée dans ce test pour une drogue. C'est pourquoi il a été étudié plus en profondeur et notamment [Francotte et al. 2007] :

- Sur un modèle de libération de la noradrénaline (qui indique que le composé agit aussi de manière pré-synaptique).
- Sur le modèle de tranche d'hippocampe dans lequel, à une concentration de 30 μM , il augmente de 192 % l'amplitude du PPSE.
- Dans le modèle de reconnaissance d'objets chez le rat Wistar où le composé serait actif dès 0.3 mg/kg *per os*.

L'analogue 7-fluoré (**874**) du composé **696** est actuellement en cours d'évaluation complémentaire, principalement au niveau toxicité.

Le remplacement du fluor par un brome puis un iode engendre, par contre, une diminution d'activité proportionnelle à l'augmentation de l'encombrement stérique.

5.8.4.2. Les dérivés substitués en position 7 par un groupement électrodonneur.

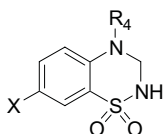
Les principaux groupements électrodonneurs que nous avons voulu greffer en position 2 sont les groupes méthyle, méthoxy et amino. Les résultats obtenus avec ces composés dans le modèle d'ovocyte de *Xenopus* sont présentés dans le tableau 23.

La présence en position 7 d'un groupement méthyle (composés **879** à **881**) est liée à une baisse d'activité par rapport aux composés 7-chloro (**695** et **696**). Cette baisse est plus marquée pour le composé 4-(2-fluoroéthylé) (**881**).

L'augmentation du pouvoir électrodonneur (effet +E) du substituant apparaît comme extrêmement défavorable à l'activité des drogues. Ainsi, les composés 7-méthoxy (**882** et **883**) sont approximativement trois fois moins actifs que les composés 7-méthylés et dix fois moins puissants que les composés de référence **695** et **696** tandis que les dérivés 7-aminés (**884** à **886**) se montrent incapables de doubler ou quintupler le courant induit par l'AMPA, même à des doses supérieures à 300 μM .

Il semble donc, au vu de ces résultats, que la présence d'un groupement électrodonneur en position 7 ne soit pas un facteur influençant positivement l'activité.

Tableau 23 : Effets des dérivés substitués en position 7 par un groupement électrodonneur sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	X	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
879	CH ₃	CH ₃	21 $\pm$ 9	47 $\pm$ 7
880	CH ₃	CH ₂ CH ₃	25 $\pm$ 8	95 $\pm$ 5
881	CH ₃	CH ₂ CH ₂ F	47.5 ^c	145.2 ^c
882	OCH ₃	CH ₂ CH ₃	68 $\pm$ 7	190 $\pm$ 10
883	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ F	71 ^c	166 ^c
884	NH ₂	CH ₃	> 300	> 300
885	NH ₂	CH ₂ CH ₃	> 300	> 300
886	NH ₂	CH ₂ CH ₂ F	-	-
695	Cl	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	Cl	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c : n = 2.

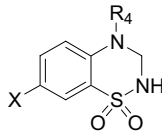
5.8.4.3 : Les dérivés substitués en position 7 par un groupement électroattracteur.

Le passage de substituants électrodonneurs placés en position 7 à des substituants électroattracteurs dans la même position relève toujours de notre souci d'explorer toutes les pistes possibles dans la recherche du meilleur modulateur AMPA. Les groupements introduits en position 7 sont des groupes électroattracteurs de type hydrophile comme les groupements nitro et cyano ou de

type lipophile comme le groupement trifluorométhyle. Nous avons également envisagé la présence d'une fonction acide ou dérivée.

Le tableau 24 reprend l'ensemble des résultats de ces séries. Ils sont parfois partiels ou fragmentaires et souvent très inégaux.

Tableau 24 : Effets des dérivés substitués en position 7 par un groupement électroattracteur sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	X	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
887	NO ₂	CH ₃	11 $\pm$ 1	26 $\pm$ 3
888	NO ₂	CH ₂ CH ₃	16 $\pm$ 1	45 $\pm$ 3
889	NO ₂	CH ₂ CH ₂ F	27 ^c	79 ^c
890	CN	CH ₂ CH ₃	-	-
891	CN	CH ₂ CH ₂ F	13 ^c	36 ^c
892	CF ₃	CH ₂ CH ₃	> 300	> 300
893	CF ₃	CH ₂ CH ₂ F	inactif	-
894	SO ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-	-
895	SO ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ F	inactif	-
896	NHCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	> 300	-
897	COOCH ₃	CH ₂ CH ₃	Inactif	-
898	COOH	CH ₂ CH ₃	> 100	-
899	COOC ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	32.4 $\pm$ 1.2	180 $\pm$ 18
695	Cl	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	Cl	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c insoluble à cette concentration. ^d : n = 2.

Ainsi, les dérivés 7-nitro (**887** à **889**) et 7-cyano (**890** et **891**) possèdent une activité non négligeable et relativement proche de celle des dérivés 7-chloro (**695** et **696**). Le passage en série trifluorométhyle (composés **892** et **893**) ou méthylsulfonyl (composés **894** et **895**) s'accompagne par contre d'une perte quasi-totale d'efficacité. Il en est de même pour le dérivé 7-COOH (**898**) et son homologue ester méthylique (**897**) ainsi que pour le dérivé acétamido (**896**).

Par contre, lorsqu'une fonction ester phénylique est placée en position 7, le composé obtenu (**899**) regagne en activité. Son EC_{2X}, sans être du niveau des meilleurs composés reste cependant tout à fait acceptable. Il n'est malgré tout pas certain que le profil pharmacologique de ce type de composé soit identique à ceux des autres drogues de la série benzothiadiazine 1,1-dioxyde. Ainsi, l'effet des groupements électroattracteurs sur l'activité est relativement mitigé et très dépendant de la nature de ce substituant. Certains groupes comme les fonctions nitro et cyano n'entraînent pas de perte drastique d'activité en comparaison aux dérivés chlorés. D'autres, par contre, apparaissent comme complètement défavorables.

En conclusion de cette étude sur l'importance de la nature du substituant en position 7 sur l'activité, nous pouvons dire que ce sont les atomes d'halogènes de petite taille (chlore et fluor) qui apportent les résultats les plus intéressants. Exception faite du composé **899**, l'augmentation de l'encombrement stérique dans cette position semble particulièrement défavorable à l'activité. Concernant l'aspect électronique des substituants, il ne semble pas qu'il y ait un effet rédhitoire sur l'activité de la part de substituants électroattracteurs ou électrodonneurs. Dans les deux séries, sont présentes des drogues qui possèdent une activité significative alors que d'autres sont totalement inactives. Les meilleurs groupements sont les groupes méthyle, nitro et cyano. Ils engendrent une activité plus faible que les groupes fluorés ou chlorés mais restent cependant intéressants au strict niveau pharmacodynamique. En effet, il convient de signaler que les dérivés « nitro » aromatiques n'ont en général pas bonne « réputation » au niveau pharmaceutique puisque certaines drogues possédant ce type de fonctionnalité sont connues pour être potentiellement toxiques.

5.8.5. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement substitués en position 5, 6 et 8 sur le noyau benzénique.

Les positions 4 et 7 ayant été explorées, nous avons voulu déplacer sur le noyau aromatique la position des meilleurs substituants que sont les atomes de chlore et de fluor et le groupement méthyle. Il n'était, en effet, pas forcément évident que ce soit la substitution en position 7 qui représente le meilleur choix.

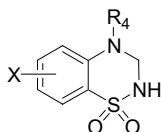
Nous avons donc préparé des composés en série 5-fluoro (**900** à **902**), 5-chloro (**903** à **905**), 6-fluoro (**906** à **908**), 6-chloro (**909** à **911**), 6-méthyle (**912** à **914**) et 8-chloro (**915** à **917**). Le choix de la chaîne latérale en position 4 reste limité aux groupements méthyle, éthyle et 2-fluoroéthyle. Les résultats que nous avons obtenus avec ces composés sont encore partiels et parfois difficilement interprétables (Tableau 25). Il est souvent délicat à ce stade de tirer des relations structure-activité cohérentes, quelque soit la position de substitution du groupement sur le noyau benzénique.

Débutons cependant le tour d'horizon des données par la série 5-fluoro (**900** à **902**). Il semble que la présence d'un fluor en position 5 ne soit pas défavorable à l'activité du moins en ce qui concerne les composés substitués en position 4 par un méthyle ou un éthyle (**900** et **901**). Comparés à leurs analogues 7-chlorés (**695** et **696**), ces drogues se montrent toutes aussi actives dans le modèle choisi. De manière assez surprenante par contre, la substitution par le groupe 2-fluoroéthyle (**902**), qui habituellement donne plutôt des résultats satisfaisants, entraîne une chute drastique d'activité.

Le seul composé 5-chloro évalué (**905**) jusqu'à présent se montre totalement inactif. Ce résultat doit être confirmé avec les deux autres molécules de cette série.

La série 6-fluoro (**906** à **908**) semble, quant à elle, plus cohérente. Certes, une baisse d'activité peut être notée par rapport à leurs analogues 7-fluorés et 7-chlorés, mais les composés de cette série maintiennent une activité du même niveau que celle du S 18986. Cette fois, il n'y a pas de différence « inexplicable » entre le composé 4-éthyle (**907**) et le composé 4-(2-fluoroéthyle) (**908**).

Tableau 25 : Effets des dérivés substitués en position 5, 6 et 8 sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	X	R4	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
900	5-F	CH ₃	10.15 ^c	-
901	5-F	CH ₂ CH ₃	6 ^c	-
902	5-F	CH ₂ CH ₂ F	188 ^c	-
903	5-Cl	CH ₃	-	-
904	5-Cl	CH ₂ CH ₃	-	-
905	5-Cl	CH ₂ CH ₂ F	> 300	> 300
906	6-F	CH ₃	-	-
907	6-F	CH ₂ CH ₃	35.5 ^c	106 ^c
908	6-F	CH ₂ CH ₂ F	20.9 $\pm$ 9.0	61.8 $\pm$ 20.2
909	6-Cl	CH ₃	30 ^c	83 ^c
910	6-Cl	CH ₂ CH ₃	85 ^c	191 ^c
911	6-Cl	CH ₂ CH ₂ F	18.5 $\pm$ 11.8	118 $\pm$ 10
912	6-CH ₃	CH ₃	-	-
913	6-CH ₃	CH ₂ CH ₃	-	-
914	6-CH ₃	CH ₂ CH ₂ F	123 ^c	> 300
915	8-Cl	CH ₃	-	-
916	8-Cl	CH ₂ CH ₃	46.5 ^c	> 100
917	8-Cl	CH ₂ CH ₂ F	30 ^c	61 ^c
695	7-Cl	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	7-Cl	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c : n = 2.

Lorsque l'atome de chlore remplace le fluor (composés **909** à **911**), il semble que le même niveau d'activité soit retrouvé, exception faite du dérivé 4-éthyle (**910**) qui, de manière surprenante, semble beaucoup moins puissant.

Seul le composé **914** a été testé en série 6-méthyle. Ce dérivé montre une perte d'activité par rapport aux autres composés substitués en position 6.

Les dérivés 8-chloro (**915** à **917**) semblent également moins actifs que leurs homologues 7-chloro, même s'ils montrent une activité acceptable.

La modulation de la position du substituant sur le noyau aromatique semble confirmer le fait que la position 7 reste, dans le modèle de *screening* choisi, la meilleure position de substitution en terme de résultats purement pharmacodynamiques. L'obtention et/ou la confirmation de certains résultats devraient nous permettre rapidement d'affiner les premières conclusions de cette étude.

5.8.6. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes diversement disubstitués en position 6 et 7 sur le noyau benzénique.

Plusieurs séries de composés disubstitués en position 6 et 7 par différents halogènes (exception faite de l'iode qui semble un atome trop volumineux) ont été synthétisées afin d'étudier l'impact de ces modulations sur l'augmentation du courant induit par l'AMPA. En position 4, nous avons conservé les mêmes groupements que dans les autres séries.

Les données sont présentées dans le tableau 26.

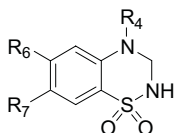
Les premiers composés testés sont des analogues dichlorés du dérivé **695**. Il est à noter immédiatement que l'introduction d'un second atome de chlore en position 6 ne modifie pas fondamentalement l'activité des composés qui se montrent aussi efficaces et puissants dans l'augmentation du courant induit par l'AMPA que leurs homologues 7-chlorés ou 7-fluorés.

Comme cela avait été également constaté dans les séries substituées en position 6 ou 7, l'atome de fluor semble un peu plus favorable à l'activité, du moins dans la série 6,7-difluoro (**920** à **922**). Cela ne semble pas tout à fait se vérifier lorsqu'un des deux atomes de fluor est remplacé par un atome de chlore (série 6-chloro-7-fluoro, **923**).

Les composés préparés et évalués en séries 7-chloro-6-fluoro (**924**), 7-bromo-6-fluoro (**925**) et 6-bromo-7-fluoro (**926** à **928**) sont encore trop partiels pour en tirer des informations valables sur le plan des relations structure-activité de ces composés. Il semble juste que quelques évidences, déjà constatées en séries monosubstituées, se dessinent. En effet, si la présence d'un atome de fluor

apparaît comme plutôt favorable, l'introduction d'un atome de brome, plus volumineux entraînerait, par rapport aux composés 7-chloro, une diminution de l'activité tout en n'amenant pas une perte totale de celle-ci.

Tableau 26: Effets des dérivés disubstitués en position 6 et 7 sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	R ₆	R ₇	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
918	Cl	Cl	CH ₃	-	-
919	Cl	Cl	CH ₂ CH ₂ F	10.5 $\pm$ 4.3	22 $\pm$ 4
920	F	F	CH ₃	3.4 $\pm$ 0.6	10.4 $\pm$ 2.0
921	F	F	CH ₂ CH ₃	8 ^c	15.8 ^c
922	F	F	CH ₂ CH ₂ F	6.1 ^c	15 ^c
923	Cl	F	CH ₂ CH ₂ F	25.5 $\pm$ 8.5	52.3 $\pm$ 9.9
924	F	Cl	CH ₂ CH ₂ F	5.4 ^c	15.5 ^c
925	F	Br	CH ₂ CH ₂ F	26.5 ^c	131 ^c
926	Br	F	CH ₃	-	-
927	Br	F	CH ₂ CH ₃	-	-
928	Br	F	CH ₂ CH ₂ F	35 ^c	92 ^c
695	-	7-Cl	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	-	7-Cl	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; n = 2 (pas de ESM), sinon n>2. ^c : n = 2.

D'une manière générale, et même si les résultats doivent être complétés, force est de constater, en première analyse, que la disubstitution 6,7 par des halogènes non volumineux ne conduit pas à une diminution nette de l'activité au

niveau pharmacodynamique. Il est par contre évident que cette disubstitution modifie les paramètres ADME des composés, ce qui dans l'optique de la recherche d'un candidat médicament, peut prendre toute son importance.

5.8.7. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes disubstitués en positions 5,7 - 5,8 - 6,8 et 7,8 sur le noyau benzénique.

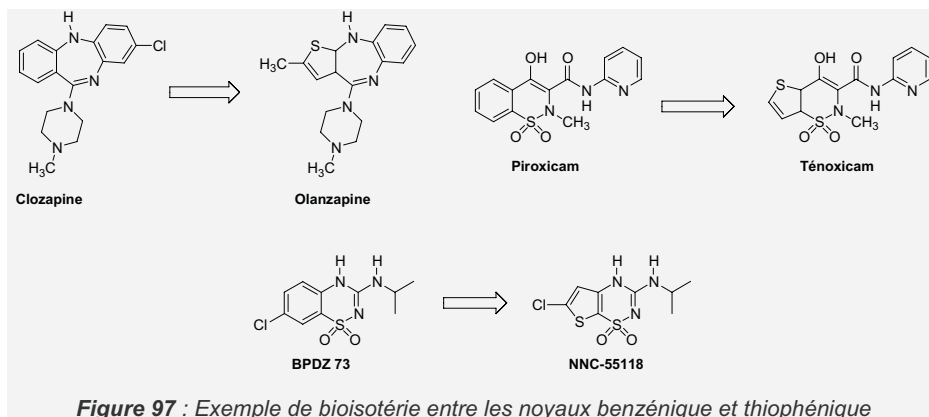
Puisque la disubstitution en position 6 et 7 par des atomes de chlore ou de fluor ne semblait pas trop défavorable, il nous fallait continuer l'exploration de ces disubstitutions dans les autres positions du cycle benzénique. Les séries suivantes ont été synthétisées et sont actuellement en cours d'évaluation :

- Les 4-alkyl-5,7-dichloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes
- Les 4-alkyl-5,8-dichloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes
- Les 4-alkyl-5,8-difluoro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes
- Les 4-alkyl-6,8-dichloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes
- Les 4-alkyl-6,8-difluoro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes
- Les 4-alkyl-7,8-dichloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes

Nous ne disposons pas à ce stade de suffisamment d'éléments et de résultats pour discuter plus avant de ces séries. Il semble se confirmer, comme cela était attendu, que la substitution en position 5 ne soit pas un facteur favorable à l'activité.

5.8.8. Evaluation des 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-thiénythiadiazine 1,1-dioxydes.

Les exemples de remplacement biosisotérique entre le noyau benzénique et le noyau thiophénique sont nombreux dans le domaine pharmaceutique. Citons par exemple la clozapine et son isomère l'olanzapine (Figure 97), le piroxicam et le ténoxycam (Figure 97). En série arylthiadiazine, nous avons vu également l'intérêt du NNC-55118 qui est l'analogue thiophénique stricte du BPDZ 73 (Figure 97).



Il nous est dès lors apparu opportun d'envisager également l'évaluation d'analogues thiophéniques des meilleurs modulateurs allostériques AMPA développés en séries pyridinique et benzénique.

Les trois positions possibles de l'atome de soufre ont été envisagées : les séries 5-thiéno, 6-thiéno et 7-thiéno. Dans la mesure du possible, une plus large gamme de chaînes alkyles a été placée en position 4.

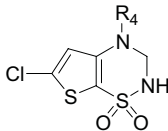
Ces séries sont toujours en cours de développement chimique et d'évaluation pharmacologique. Nous présenterons donc les résultats dont nous disposons actuellement.

Le tableau 27 présente les résultats pharmacologiques obtenus avec les composés de la série 7-thiéno.

L'analyse des résultats des composés 7-thiéno montre que, dans le modèle choisi, le passage de la série 7-chlorobenzénique vers la série 6-chlorothiophénique n'entraîne pas de modification importante de l'activité. Comme en série benzénique, l'absence de substituant en position 4 semble extrêmement défavorable (composé **929**). Par contre, la plupart des drogues porteuses d'une chaîne alkyle courte en position 4 (exception faite du dérivé méthylé **930**) sont relativement puissantes avec des EC_{2X} s'échelonnant entre 2.0 μ M et 15 μ M. Il semble que la latitude, quant à l'encombrement stérique permis dans cette position, soit plus importante qu'en série chlorobenzénique. Cette constatation joue en faveur de l'hypothèse d'une limite d'encombrement globale de la molécule. Le passage d'un noyau benzénique à un noyau thiophénique engendre une diminution de l'encombrement stérique permettant une augmentation de la

taille de la chaîne latérale en position 4. Ainsi, le passage d'un groupement éthyle à un groupement isopropyle se fait sans perte d'activité. Le composé **934**, porteur de la chaîne 2-fluoroéthyle apparaît comme la drogue la plus puissante que nous ayons découverte dans ces séries de composés. L'allongement de la chaîne semble, par contre, un peu moins favorable (i.e. **933**).

Tableau 27 : Effets des dérivés 7-thiéno sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



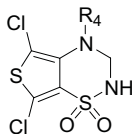
Composé	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
929	H	216	-
930	CH ₃	36.0 $\pm$ 4.4	234 $\pm$ 44
931	CH ₂ CH ₃	3.6 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.7
932	CH(CH ₃) ₂	4.2 $\pm$ 0.7	11 $\pm$ 3
933	(CH ₂) ₂ CH ₃	15 ^c	36 ^c
934	CH ₂ CH ₂ F	2.0 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.6
695	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; ^c n = 2 (pas de ESM), sinon n>2.

Le tableau 28 présente les résultats pharmacologiques obtenus avec les composés de la série 6-thiéno. Contrairement à leurs homologues 7-thiéno, la plupart des composés de cette série 6-thiéno se montrent moyennement à faiblement actifs. Une exception doit être faite pour le composé 4-méthylé (**936**) qui possède une activité similaire à celle de l'analogue 7-chlorobenzénique 4-éthylé (**695**). L'activité de ce composé se démarque de manière surprenante de celle des autres composés de la série. Il est fort possible que la présence d'un atome de chlore en position 5 soit, tout comme en série benzénique, un facteur influençant négativement l'activité. Il serait dès lors intéressant de préparer et

d'évaluer des composés de cette série dépourvus de substituants dans cette position.

Tableau 28 : Effets des dérivés 6-thiéno sur l'amplitude du courant induit par l'AMPA (30 μ M) mesuré sur ovocyte de *Xenopus* exprimant les récepteurs AMPA.



Composé	R ₄	EC2X(μ M) ^a	EC5X(μ M) ^b
935	H	72 $\pm$ 18	150 $\pm$ 4
936	CH ₃	5.4 $\pm$ 2.8	11.3 $\pm$ 4.9
937	CH ₂ CH ₃	71 $\pm$ 14	154 $\pm$ 21
938	CH(CH ₃) ₂	> 300	-
939	CH ₂ CH ₂ F	113 ^c	
940	CH ₂ CHF ₂	235 ^c	> 300
695	CH ₂ CH ₃	5.1 $\pm$ 2.1	16 $\pm$ 3
696	CH ₂ CH ₂ F	6.7 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.6

^{a, b} Concentration de drogue qui respectivement double et quintuple l'amplitude du courant induit par l'AMPA seul (30 μ M) (moyenne $\pm$ ESM) ; ^c n = 2 (pas de ESM), sinon n>2.

La série 5-thiéno est toujours en cours de synthèse et les quelques composés finaux qui ont été obtenus n'ont pas encore été évalués.

Les premiers résultats de ces séries montrent qu'il est possible d'obtenir des composés extrêmement puissants et que le passage de la série benzénique à la série thiophénique semble relativement favorable en se référant au seul test pharmacologique de *screening*. Il est cependant clair que d'autres investigations tant pharmacologiques que pharmacochimiques doivent encore être entreprises sur ces séries afin d'en définir le profil voire d'améliorer celui-ci.

5.9. Les modulateurs allostériques positifs du courant AMPA : conclusion et perspectives.

L'intérêt thérapeutique de moduler positivement le courant induit par l'AMPA en agissant sur ses récepteurs de manière allostérique semble avoir affirmé, au cours de ces dernières années, sa crédibilité. Preuve en est, s'il le faut, le nombre de sociétés pharmaceutiques importantes impliquées dans le sujet. En examinant les différentes séries chimiques développées jusqu'il y a quelques années, peu de molécules réellement puissantes ou agissant de manière non équivoque sur les récepteurs AMPA avaient été décrites. La série benzothiadiazine nous est cependant parue intéressante et ce, pour plusieurs raisons. La première était que certains composés, tels que le cyclothiazide, se montraient relativement actifs. La seconde se rapportait au diazoxide et à l'IDRA-21, certes moins puissants, mais dont les structures étaient fort proches de celles des composés que nous développons dans d'autres axes pharmacologiques. Nous avons donc décidé d'explorer la chimie des arylthiadiazine 1,1-dioxydes proches de ces deux références en débutant, tout comme en série activateurs des canaux K_{ATP} , par les séries pyridiniques. Cette première approche nous a permis de découvrir des composés largement plus actifs *in vitro* que l'IDRA-21 (i.e. **685** et **686**, Figure 98) . Cependant, l'évaluation *in vivo* de ces composés a laissé apparaître des problèmes soit d'inefficacité *per os*, soit de toxicité. Nous avons donc décidé d'élargir notre champ d'exploration aux séries benzéniques et thiophéniques (ce sont ces deux séries qui sont présentées dans ce manuscrit). Par rapport aux séries arylthiadiaziniques que nous avons développées dans les autres axes biologiques, nous nous sommes cette fois-ci surtout intéressés aux composés « saturés » et substitués par des groupements alkyles essentiellement en position 4 du cycle thiadiazine. De plus, cette étude nous a permis, pour la première fois, d'explorer le remplacement du noyau benzénique par un noyau thiophénique.

La figure 98 schématise le cheminement pharmacochimique que nous avons entrepris dans ce domaine de recherche en prenant comme point de départ les meilleurs dérivés pyridiniques. Les différents composés « leads » que nous

avons découverts au cours de ces travaux dans les séries étudiées sont également présentés.

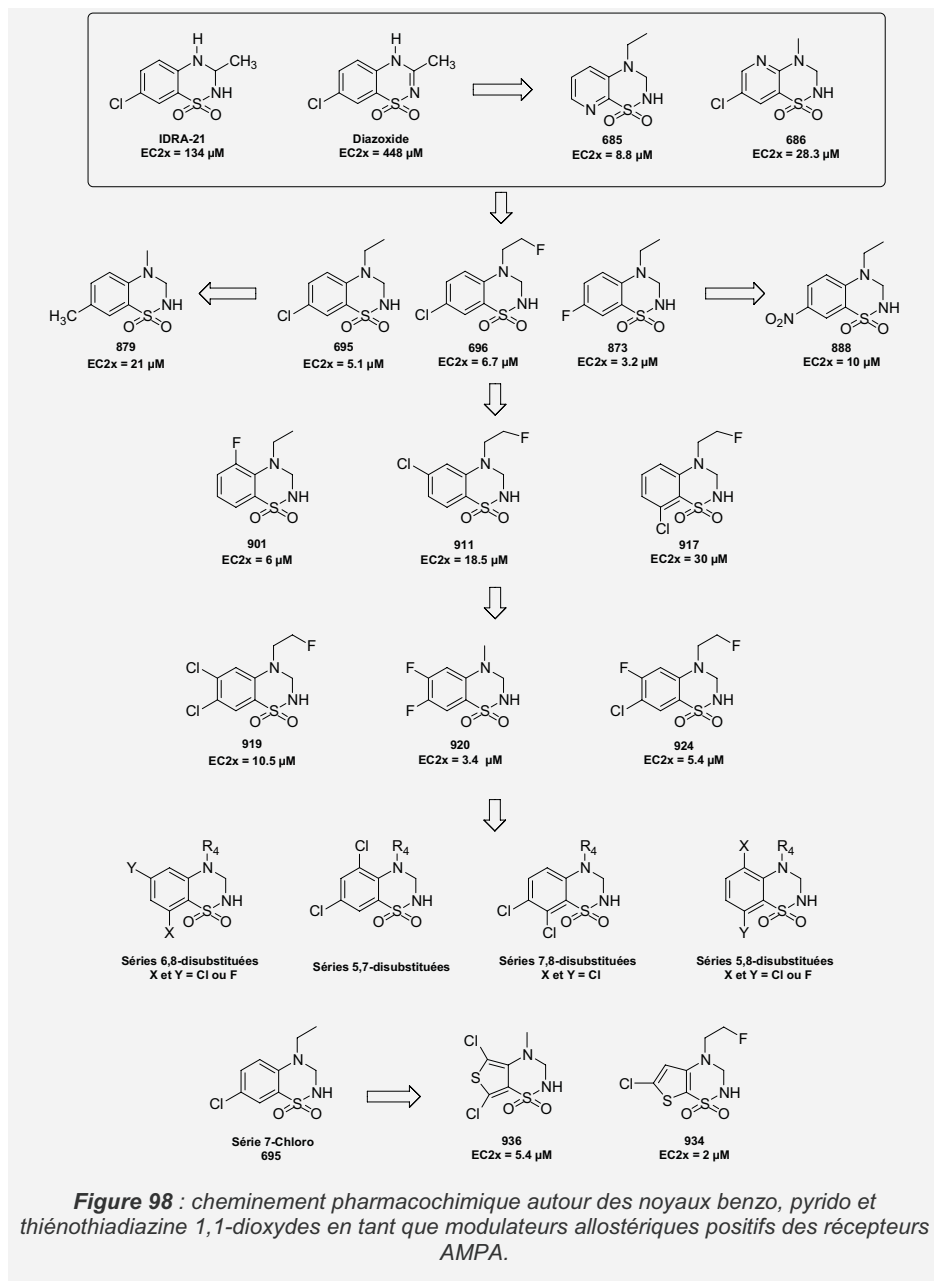
Parallèlement au développement de nos séries, les laboratoires Servier entreprenaient des recherches autour du S 18986 qui allaient mener ce composé jusqu'à l'évaluation en phase clinique II, stade où, à notre connaissance, il est encore à l'heure actuelle.

Les pharmacomodulations que nous avons envisagées dans les différentes séries de ce travail utilisent les résultats des relations structure-activité générés en série pyridinique et implémentés dans la série 7-chlorobenzénique. Le remplacement du noyau pyridine par un noyau benzène a permis d'augmenter encore l'activité jusqu'à obtenir des molécules dont l'EC₅₀ se situe dans une gamme de concentration proche du μM (i.e. composés **695**, **696** et **873**). Par ailleurs, ce changement d'hétérocycle devrait entraîner une augmentation de la lipophilie des composés. Plusieurs de drogues, issues de ces développements, ont été étudiées plus en détails et montrent un profil pharmacologique particulièrement intéressant et spécifique avec une activité tant au niveau pré que post-synaptique et un effet sur la mémoire dans un test *in vivo* chez le rat (*i.p.* ou *per os* selon les composés). L'introduction d'un atome de fluor sur la chaîne alkyle en position 4 semble particulièrement intéressante pour l'efficacité *in vivo* des composés. Exception faite de quelques dérivés 7-méthyle et 7-nitro (i.e. **879** et **888**), la présence en position 7 de groupements électrodonneurs ou électroattracteurs autres qu'un chlore ou un fluor semble défavorable. La modulation de la position du substituant sur le noyau aromatique montre qu'outre la position 7, la présence d'un atome de fluor en 5 (i.e. **901**) n'est pas défavorable à l'activité *in vitro*.

Par différentes modulations, principalement centrées autour du noyau benzénique, nous avons ainsi pu améliorer l'activité, mais également défini un certain nombre de relations structure-activité importantes pour la suite des pharmacomodulations à envisager. Plusieurs drogues de ces séries apparaissent d'ores et déjà comme potentiellement très intéressantes et ont engendré la prise de quelques brevets (Cf. annexes 19).

Les disubstitutions ont aussi été étudiées et même si elles n'ont pas encore livré toutes leurs données, un certain nombre d'informations a déjà pu être

retirées. Ainsi, la présence simultanée en position 6 et 7 d'atomes de fluor ou de chlore n'entraîne pas de perte d'activité notable (i.e. composés **919**, **920** et **924**).



Enfin, la bioisostérie potentielle entre les noyaux benzénique et thiophénique a pu être vérifiée, encore une fois, dans cette classe puisque certains thiénothiadiazine 1,1-dioxydes montrent une activité *in vitro* très intéressante, tout en maintenant probablement une lipophilie comparable à leurs homologues benzéniques.

Comme nous l'avons déjà signalé, ce projet est encore en plein développement tant au niveau pharmacochimique, qu'au niveau de l'évaluation pharmacologique des drogues. La détermination des paramètres ADME et l'étude de la toxicité éventuelle des composés est également envisagée. Le but avoué est d'identifier dans un avenir proche les composés présentant les meilleurs profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques et capables d'entrer dans une phase de développement. Plusieurs composés de nos séries ont d'ailleurs déjà été sélectionnés pour une évaluation en phase pré-clinique ou sont en phase de présélection.

Au simple examen de l'aspect concernant les pharmacomodulations potentielles, il est facile de constater que plusieurs pôles n'ont pas encore été complètement explorés.

Ainsi et en ne citant que quelques exemples il s'agirait de :

- Poursuivre l'exploration des différentes séries thiophéniques
- Développer la série pyridinique 6-aza.
- Changer la nature du cycle thiadiazine en explorant les différentes bioisostéries possibles (quinazolinone, thiazine 1,2 et thiazine 1,4, ...).

Pour des raisons de confidentialité aisées à comprendre, nous ne pouvons malheureusement développer plus avant toutes les pharmacomodulations envisageables.

Nous disposons à l'heure actuelle d'un panel relativement important et divers, tant dans les structures que dans les résultats pharmacologiques, de composés testés. Ces données devraient nous permettre d'entreprendre une étude des relations structure-activité quantitatives (QSAR). Nous envisageons donc, dans un avenir proche, d'appliquer des techniques telles que les analyses CoMFA ou CoMSIA à nos modulateurs allostériques positifs du courant AMPA.

Compte tenu de la cible thérapeutique de nos composés, nous savons que certains paramètres physico-chimiques tels que le log P et le pKa sont importants

afin que nos drogues présentent le bon profil pharmacologique. Le degré d'ionisation des dérivés de ces séries au pH physiologique ne devrait pas poser de problème. En effet, les composés de type 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde sont au mieux des acides faibles, si toutefois la position 2 est non substituée. Le pKa de la fonction sulfonamide étant en général supérieur à 10, ils ne devraient pas être ionisés à pH 7.4.

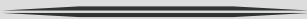
Par contre, la lipophilie des drogues est un facteur essentiel. Elle peut être estimée en mesurant la valeur du logarithme du coefficient de partage ($\log P'$) et s'il faut passer la barrière hémato-méningée, une valeur de $\log P'$ située de 1.5 à 2.5 est souhaitable. Nous avons établi lors de précédentes mesures que les dérivés les plus actifs en série pyridinique possédaient des $\log P'$ légèrement supérieurs à 0. Il apparaît cependant que le remplacement d'un noyau pyridinique par un noyau benzénique permet d'augmenter sensiblement la valeur du coefficient de partage. Nous pouvons donc espérer que les composés les plus intéressants récemment développés exhibent des valeurs de $\log P'$ plus en adéquation avec leur cible thérapeutique. La détermination exacte de ces valeurs devra néanmoins être entreprise dans un avenir proche. Si cela s'avère possible, notre choix ira bien entendu, vers les méthodes dynamiques de mesure des $\log P'$.

Enfin, il est clair que le processus de métabolisation peut jouer un rôle déterminant dans l'activité *in vivo* de nos drogues. Une métabolisation trop rapide, trop lente ou inadéquate pourrait d'une part nuire à l'efficacité des composés et d'autre part être responsable d'effets secondaires et/ou de toxicité marquée des drogues. Dans le chapitre concernant les activateurs des canaux K_{ATP} , nous avons démontré que la mise en réaction des composés avec des microsomes et l'analyse des métabolites formés par l'utilisation combinée de plateformes LC/MS-MS et LC-SPE-RMN pouvaient nous fournir des informations importantes sur les voies de métabolisation de nos composés et nous permettre d'identifier les métabolites principaux. Forts de cette expérience, nous allons dès lors envisager d'étudier quelques modulateurs allostériques positifs du courant AMPA dans les mêmes conditions de métabolisations via microsomes. Cette étape devrait nous permettre de valider, par exemple, l'impact de l'introduction d'un atome de fluor en position 4 sur la stabilité métabolique des composés. La préparation et l'évaluation biologique des métabolites principaux des drogues sélectionnées

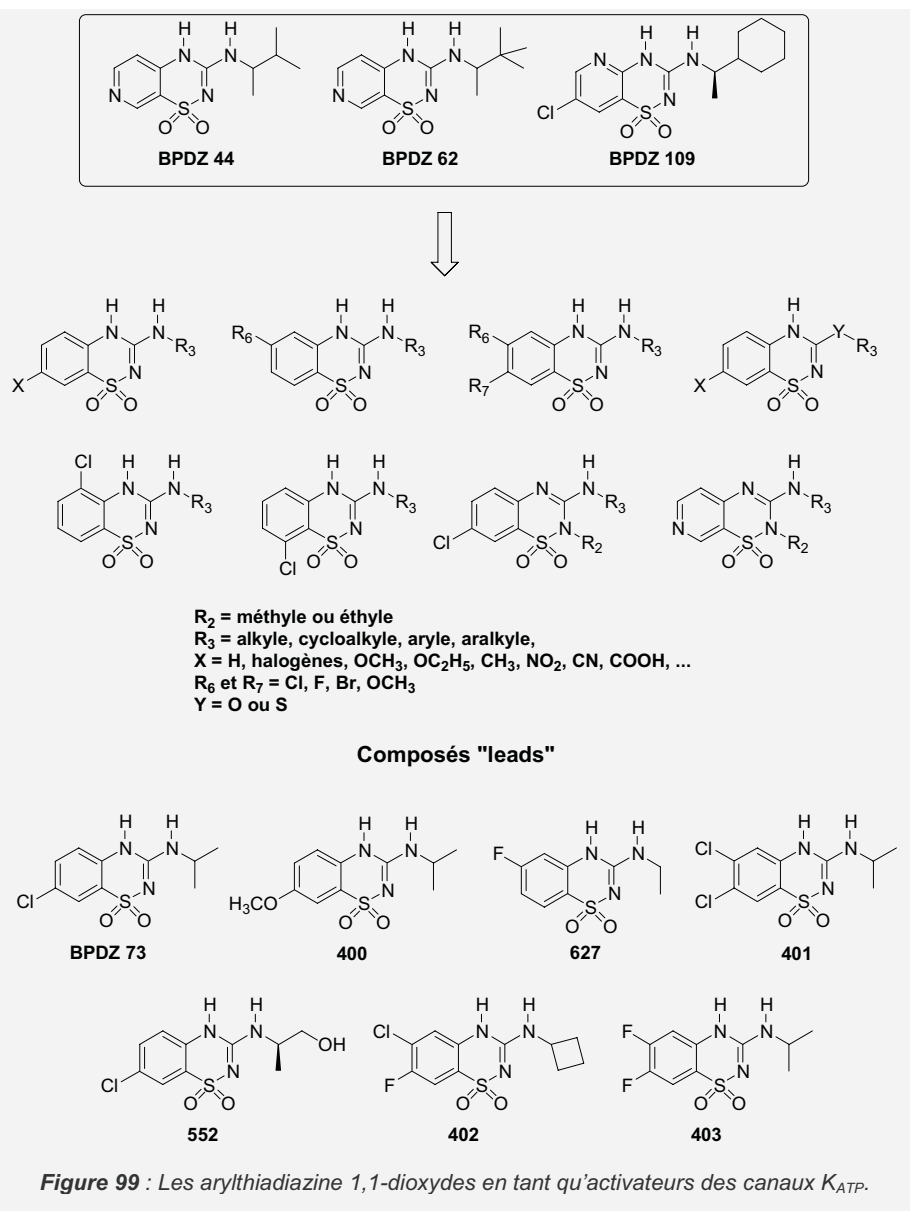
peuvent nous amener par ailleurs à envisager la possibilité que les effets secondaires de certains dérivés soient dûs à un ou plusieurs métabolites plutôt qu'au produit parent. Il nous serait dès lors possible de tenter d'agir structuralement afin de bloquer certaines voies de métabolisation.

Pour conclure, il apparaît évident qu'à ce stade, nous devons poursuivre nos recherches dans deux directions : la première consiste en l'optimisation des composés « leads » afin de trouver les profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques susceptibles de permettre leur développement en phase clinique et la seconde est de continuer l'exploration de nouvelles structures chimiques dans le but de découvrir de nouveaux composés actifs. Ces deux tâches peuvent apparaître comme sensiblement différentes et pourtant elles ne le sont pas vraiment. En effet, dans le processus de « drug design », nous ne pouvons nous contenter de pharmacomodulations classiques, à savoir définir des relations structure-activité en fonction de paramètres pharmacologiques *in vitro* et les utiliser pour sélectionner les modifications structurales à apporter. L'introduction précoce dans ce processus de données relatives à l'activité *in vivo*, à la toxicité et aux paramètres ADME en général est essentielle à la découverte rapide et efficace de drogues présentant le profil requis pour devenir un médicament.

Conclusion générale



S'il nous faut en guise de conclusion synthétiser l'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit, c'est tout d'abord en reprenant les principales structures chimiques et les différents composés « leads » développés au départ des séries pyridothiadiazine 1,1-dioxydes qu'il nous semble opportun de procéder. Ainsi, les figures 99 et 100 schématisent les différentes structures générales et les composés d'intérêt découverts lors de nos recherches tant au niveau des activateurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP que des modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA.



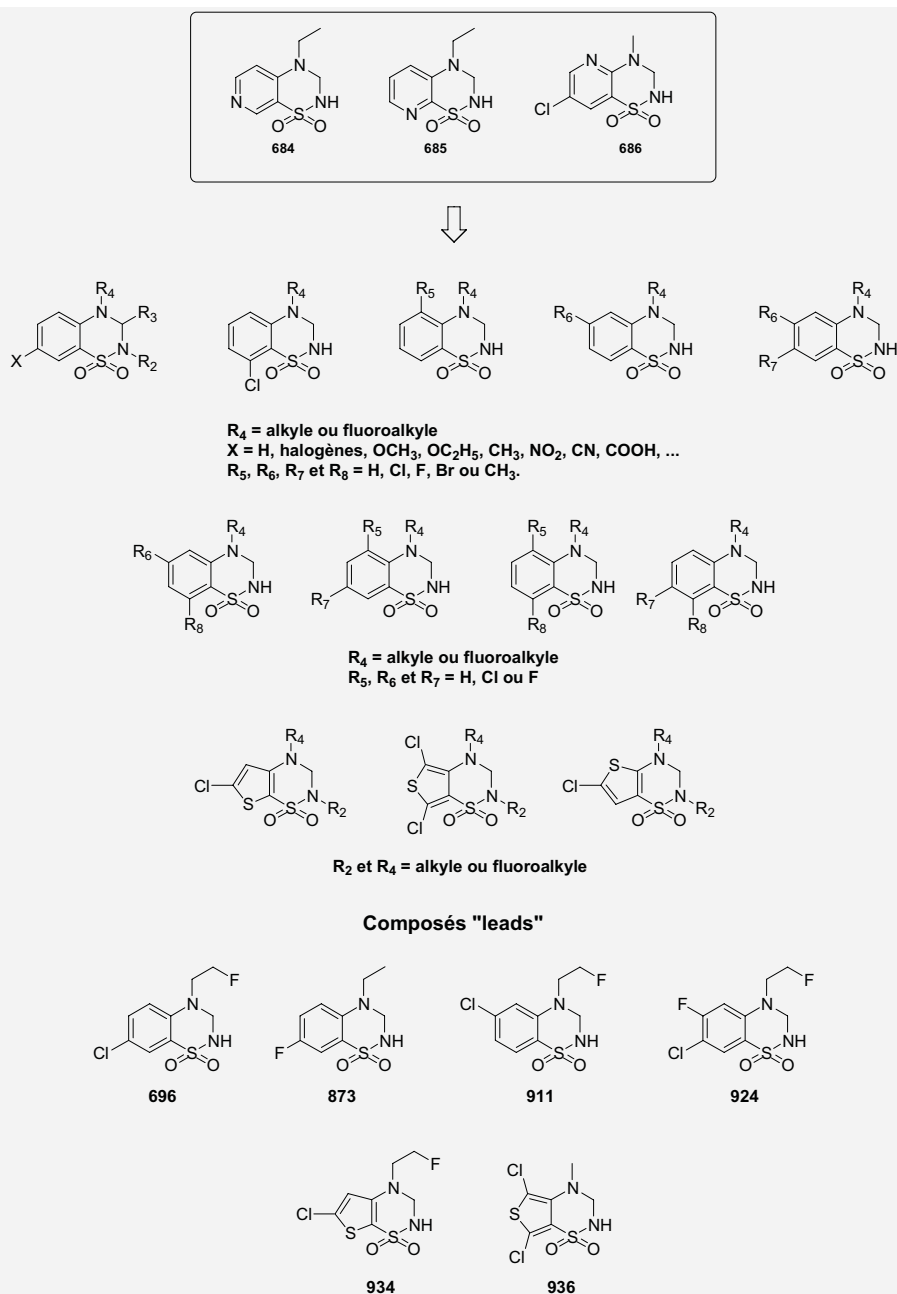


Figure 100 : Les arylthiadiazine 1,1-dioxydes en tant que modulateurs allostériques des récepteurs AMPA.

Au point de vue chimique, après avoir largement contribué au développement des séries 1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes, qui jusqu'alors n'étaient que peu décrites dans la littérature, nous avons exemplifié de manière importante la série 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde en préparant un grand nombre de composés originaux. Par ailleurs, nous avons entrepris l'exploration de nouvelles molécules en série 1,2,4-thiénothiadiazine 1,1-dioxyde, elle aussi peu décrite dans la littérature.

Si nous examinons tout d'abord les résultats pharmacologiques obtenus dans nos recherches sur les activateurs des canaux K_{ATP} , nous pouvons affirmer que les différentes pharmacomodulations envisagées au niveau du noyau benzothiadiazine 1,1-dioxyde nous ont permis d'améliorer non seulement l'activité inhibitrice de la sécrétion d'insuline mais également d'atteindre un niveau de sélectivité tissulaire (pancréas vs aorte) parmi les plus élevés. Seuls quelques composés thiénothiadiaziniques découverts par la société Novo-Nordisk durant notre collaboration, se montrent aussi actifs et aussi sélectifs. Cette découverte est marquante compte tenu de l'intérêt thérapeutique réel que représente les activateurs des canaux K_{ATP} sélectifs du sous-type SUR 1 pour le développement de nouveaux médicaments dans le traitement de pathologies telles que le diabète, l'obésité et l'hyperinsulinémie. Cependant, si de nombreux composés « leads » apparaissent comme prometteurs dans les modèles pharmacologiques *in vitro*, ils ne semblent pas toujours reproduire cette activité et/ou cette sélectivité dans des modèles *in vivo*. C'est pourquoi les travaux actuels dans cet axe de recherche visent principalement à améliorer les paramètres ADME et si nécessaire toxicologiques de nos meilleures séries. Pour ce faire, nous pouvons nous appuyer sur des données physico-chimiques mais également sur les premiers résultats de métabolisation et envisager de nouvelles modulations structurales susceptibles d'améliorer l'efficacité et la biodisponibilité de nos drogues.

Ces aspects pharmacocinétiques et toxicologiques sont également au centre des recherches que nous menons sur les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. L'intérêt de cette classe dans le traitement de pathologies entraînant une déficience cognitive est maintenant bien établi. En effet, tout comme dans le cas des activateurs des canaux K_{ATP} , les pharmacomodulations que nous avons menées autour des noyaux 3,4-dihydro-1,2,4-benzo et thiénothiadiazine 1,1-dioxydes nous ont permis d'identifier de nombreux

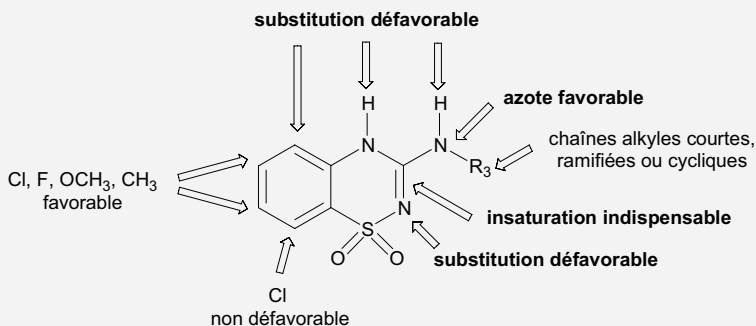
composés présentant des profils pharmacologiques relativement intéressants. Cependant, la cible thérapeutique étant située au niveau du système nerveux central, il est impératif que les drogues susceptibles d'entrer en développement clinique possèdent des paramètres pharmacocinétiques optimaux et un indice de sécurité élevé. C'est pourquoi, en collaboration avec la Société Servier, de nombreux efforts sont entrepris pour introduire très tôt dans le processus de modulation des paramètres liés à l'activité des composés *in vivo*, à leur distribution, à leur toxicité et à leur métabolisation. Plusieurs dérivés appartenant aux séries que nous avons explorées sont actuellement en cours d'évaluation (stade pré-clinique). Ce projet suit donc deux axes de développement : l'un visant à optimiser les composés « leads » déjà identifiés et le second explorant d'autres pharmacomodulations afin de découvrir de nouvelles molécules actives.

Si ces deux projets utilisent un noyau hétérocyclique commun, le noyau 1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxyde, les relations structure-activité déduites de l'analyse des résultats pharmacologiques apparaissent comme sensiblement différentes.

La figure 101 présente deux modèles de pharmacophore simplifiés pour l'activité des séries benzothiadiazine 1,1-dioxydes en tant qu'activateurs des canaux K_{ATP} pancréatiques et en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. La comparaison de ces modèles laisse apparaître des différences importantes dans les requis structuraux nécessaires à une bonne activité. La plus marquante est que dans le cas des activateurs des canaux K_{ATP} , nous nous trouvons avec un noyau thiadiazine insaturé tandis que la saturation de cette liaison double est indispensable à l'activité sur les courants induits par l'AMPA. Par ailleurs, la substitution de la position 4 est très défavorable à l'effet modulateur des canaux potassiques tandis qu'elle permet d'augmenter sensiblement la puissance des composés dans l'axe « AMPA ». De plus, les meilleures drogues activatrices des canaux K_{ATP} pancréatiques possèdent en position 3 des chaînes alkylaminées tandis que la présence de substituants plus encombrés que le groupement méthyle est, dans cette position, défavorable à l'activité sur les récepteurs AMPA. Comme nous venons de le constater, il y a suffisamment de différences structurales entre les deux séries pour qu'il y ait peu de risques de chevauchement d'activités aux concentrations habituelles d'utilisation. Cette « non-interférence » a d'ailleurs été vérifiée par l'évaluation de

quelques activateurs des canaux K_{ATP} parmi les plus puissants dans le modèle d'ovocytes de *Xenopus* et inversement par l'examen de l'effet sur l'inhibition de la sécrétion d'insuline de plusieurs modulateurs AMPA très actifs. Aucune des drogues testées n'a en effet montré d'activité significative dans l'autre modèle pharmacologique.

Activateurs des canaux K_{ATP} pancréatiques



Modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA

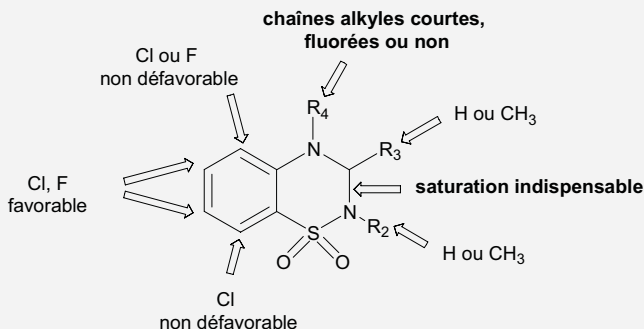


Figure 101 : Modèles de pharmacophores simplifiés pour l'activité modulatrice des canaux K_{ATP} et des récepteurs AMPA des séries benzothiadiazine 1,1-dioxydes que nous avons développées.

Compte tenu des excellents résultats déjà obtenus et des nombreuses possibilités de développements et d'optimisation de nos composés « leads », il apparaît que cette histoire est loin d'être terminée. Elle est en continuelle modification et devrait, nous l'espérons, nous permettre d'aboutir au passage de certains composés dans des stades d'évaluation clinique et pourquoi pas à la mise sur le marché d'un nouveau médicament.

Bibliographie



- Abele A., Miller R. 1990, Potassium channel activators abolish excitotoxicity in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* **115**, 195-200.
- Adesogan K., Alo B. 1979, New synthesis of sultams *via* readily generated iminium ions. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **22**, 673-674.
- Aguilar-Bryan L., Bryan J. 1999, Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr. Rev.* **20**, 101-135.
- Albasini A., Melegari M. 1967, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotriadiazina : nota XLIII. *Il Farmaco.* **23**, 546-533.

- Albert A., Serjeant E. 1971, Determination of ionization constants by spectrophotometry. Dans : *The determination of ionization constants*. Eds. Chapman & Hall Ltd, London, 44-64.
- Alemzadeh R., Langley G., Upchurch L., Smith P., Slonim A.E. 1998, Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1911-1915.
- Alemzadeh R., Tushaus K. 2004, Modulation of adipoinular axis in prediabetic Zucker diabetic fatty rats by diazoxide. *Endocrinol.* **145**, 5476-5484.
- Allard B., Lazdunski M. 1993, Pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ Channels in mammalian skeletal muscles cells. *Eur. J. Pharmacol.* **236**, 419-426.
- Alo B., Adegoke E., Ligali-Ali M., Adesogan E. 1986, Synthesis of 1,2,4-benzothiadiazine dioxides via readily generated iminium ions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **5**, 805-808.
- Alo B., Familoni O. 1990, *N*-(arylsulphonyl)tetrahydropyridinium salts : intermediates for multi-ring heterocycles. Part 1. Synthesis of hexahydropyrido[1,2-*b*][1,2,4]-benzothiadiazine dioxides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **7**, 1835-1838.
- Amoroso S., Schimid-Antomarchi H., Fosset M., Lazdunski M. 1990, Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release : role of ATP-sensitive K⁺ channels. *Science.* **247**, 852-854.
- Andrisano M., Di Bella M., Ferrari P., Raffa L., Baggio G. 1981, Acidi eteroarilalcanoici a possibile azione antiinfiammatoria : nota II. *Il Farmaco.* **36**, 905-915.
- Angeletti E. 1960, Nuova sintesi nel campo della benzo-1,2,4,tiodiazina-1 diossido. *Gazz. Chim. It.* **90**, 841-847.
- Angeletti E. 1963. Nuovi derivati tiodiazinici. *Boll. Chim. Pharm.* **102**, 716-720.
- Antoine M.-H., Pirotte B., Hermann M., de Tullio P., Delarge J., Herschuelz A., Lebrun P. 1994, Cationic and secretory effects of BPDZ 44 and diazoxide in rat pancreatic islets. *Experientia.* **50**, 830-832.

- Arai A., Lynch G. 1998, The waveform of synaptic transmission at hippocampal synapses is not determined by AMPA receptor desensitization. *Brain Res.* **799**, 230-234.
- Arai A., Xia Y., Rogers G., Lynch G., Kessler M. 2002, Benzamide-type AMPA receptor modulators form two subfamilies with distinct modes of action, *J. Pharmacol.Exp. Ther.* **303**, 1075-1085.
- Arranz E., Vega S., Diaz J. 1997, Synthesis of hetero[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxides. *Heterocycles.* **45**, 1767-1774.
- Arranz E., Diaz J., Ingate S., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., De Clercq E., Vega S. 1998, Novel 1,1,3-trioxo-2*H*,4*H*-thieno[3,4-*e*][1,2,4]thiadiazine derivatives as non nucleoside reverse transcriptase inhibitors that inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Med. Chem.* **41**, 4109-4117.
- Arranz E., Diaz J., Ingate S., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., De Clercq E., Vega S. 1999, Synthesis and anti-HIV activity of 1,1,3-trioxo-2*H*, 4*H*-thieno[3,4-*e*][1,2,4]thiadiazines (TTDs) : a new family of HIV-1 specific non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med. Chem.* **7**, 2811-2822.
- Arranz E., Diaz J., Vega S., Campos-Toimil M., Orallo F., Cardelus I., Ilenas J., Fernandez A. 2000, Synthesis and pharmacological evaluation of 2,3-dihydro-3-oxo-4*H*-thieno[3,4-*e*][1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxides as voltage-dependant calcium channel blockers. *Eur. J. Med. Chem.* **35**, 751-759.
- Ashcroft F., Rorsman P. 1990, ATP-sensitive K⁺ channels : a link between B-cell and metabolism and insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 109-111.
- Ashcroft F. 1997, Fresh Insights into the interactions of drugs with ATP-sensitive K-channels. *Ion Channel Modulators-ID Research Alert.* **2**, 43-47.
- Atwal K. 1992, Modulation of potassium channels by organic molecules. *Med. Res. Rev.* **12**, 569-591.
- Audus K., Chikhale P., Miller D., Thompson S., Borchardt R. 1992, Brain uptake of drugs : the influence of chemical and biological factors. Dans : *Advances in drug research*. Ed. Testa B., Academic Press, London, **23**, 1-64.

- Aynsley-Green A., Hussain K., Hall J., Saudubray J., Nihoul-Fekete C., De Lonlay-Debeney P., Brunelle F., Otonkoski T., Thornton P., Lindley K. 2000, Practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal Ed.* **82**, F98-F107.
- Babenko A., Aguilar-Bryan L., Bryan J. 1998, A view of SUR/Kir6.x K_{ATP} channels. *Ann. Rev. Physiol.* **60**, 667-687.
- Baillargeon J.P., Nestler J. 2006, Polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin ? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 22-24.
- Bandoli G., Nicolini M. 1977, Crystal structure and molecular structure of diazoxide, an antihypertensive agent. *J. Cryst. Mol. Struct.* **7**, 229-240.
- Barnes P., 1996, New drugs for asthma. *Clin. Exp. Allergy.* **26**, 738-745.
- Barrett W., Chart J., Renzi A. 1961, Pharmacology of cyclopentiazide, a sulfonamide diuretic. *Arch. Int. Pharmacodynam. Ther.* **131**, 325-38.
- Baumbarger P., Muhlhauser M., Yang C., Nisenbaum E. 2001, LY392098, a novel AMPA receptor potentiator : electrophysiological studies in prefrontal cortical neurons. *Neuropharmacology.* **40**, 992-1002.
- Beal M. 1992, Role of excitotoxicity in human neurological disorders. *Curr. Op. Neurobiol.* **2**, 657-662.
- Bear M., Connors B., Paradiso M. 2002, Neurotransmetteurs: organisation anatomo-biochimique du système nerveux central, dans *Neurosciences- à la découverte du cerveau*, 2^{nde} édition, Ed. Pradel, paris, 157-158.
- Beech D., Zhang H., Nakao K., Bolton T. 1993, Single channel and whole-cell K-currents evoked by levromakalim in smooth muscle cells from the rabbit portal veine. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 583-590.
- Bell S., Wei P., Childress S. 1964, Fused-ring systems containing 1,2,4-benzothiadiazines. I. The reaction of o-aminobenzenesulfonamides with dibasic acid anhydrides. *J. Org. Chem.* **29**, 3206-3209.
- Bell S., Conklin G. 1968, Ring closure reactions with nitriles. I. Formation of Pyrrolo[2,1-c][1,2,4]benzothiadiazines and pyrrolo[1,2-a]quinazolines. *J. Het. Chem.* **5**, 172-189.
- Bell S., Gochman C., Wei P. 1975, Synthesis of heterocyclic fused thiazolecarboxylic acids I. *J. Het. Chem.* **12**, 1207-1210.

- Ben-Ari Y., Krnjevic C., Crepel V. 1990, Activators of ATP-sensitive K⁺ channels reduce anoxic depolarization in CA3 hippocampal neurons. *Neurosci.* **37**, 55-60.
- Berliner R., Orloff J. 1956, Carbonic anhydrase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **8**, 137-174.
- Bernabei M., Cameroni R., Gamberini G., Ferioli V. 1976, Sistemi eteropolociclici. Nota V. *Il Farmaco.* **31**, 508-516.
- Bernardi H., Fosset M., Lazdunski M. 1988, Characterization, purification, and affinity labelling of the brain [³H]glibenclamide-binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 9816-9820.
- Bertolino M., Baraldi M., Parenti C., Braghiroli D., Di Bella M., Vicini S., Costa E. 1993, Modulation of AMPA/kainate receptors by analogs of diazoxide and cyclothiazide in thin slices of rat hippocampus. *Receptor Channel.* **1**, 267-278.
- Bettler B., Mulle C. 1995, Neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainite receptors. *Neuropharmacol.* **34**, 123-139.
- Bierbaum B., Traverso J., Whitehead C. 1963, Hypotensive 1,2,4-benzothiadiazine. *J. Med. Chem.* **6**, 272-275.
- Björk E., Kampe O., Karlsson F., Pipeleers D., Andersson A., Hellerstrom C., Eizirik D. 1992, Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 1574-1576.
- Björk E., Berne C., Kämpe O., Wibell P., Oskarsson P., Karlsson F.A. 1996, Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes.* **45**, 1427-1430.
- Björk E., Berne C., Karlsson F. 1998, Induction of beta-cell rest in type 1 diabetes. Studies on the effects of octreotide and diazoxide. *Diabetes Care.* **21**, 427-430.
- Bjorklund A., Bondo Hansen J., Falkmer S., Grill V. 2004, Openers of ATP-dependent K⁺-channels protect against a signal-transduction-linked and not freely reversible defect of insulin secretion in a rat islet transplantation model of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* **47**, 885-891.
- Black J. 1968, Diazoxide and the treatment of hypoglycemia : an historical review. *Am. New-York Acad. Sci.* **150**, 194-203.

- Blackburn C., Achab A., Elder A., Ghosh S., Guo J., Harriman G., Jones M. 2005, Synthesis of 3-amino-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides via a Tandem Aza-Wittig/heterocumulene annulation. *J. Org. Chem.* **70**, 10206-10209.
- Bleakman D., Gates M., Odgen A., Mackowiack M. 2002, Kainate receptor agonists, antagonists and allosteric modulators. *Curr. Pharm. Design.* **8**, 873-885.
- Bliss T., Collingridge G. 1993, A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **361**, 31-39.
- Boverie S., Antoine M.-H., de Tullio P., Somers F., Becker B., Lebrun P., Pirotte B. 2001, Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73): introduction of the heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 973-980.
- Boverie S. 2004, Synthèse de nouveaux activateurs potentiels des canaux K_{ATP} et évaluation de leur activité pharmacologique sur le tissu pancréatique, le tissu musculaire lisse vasculaire et le tissu musculaire lisse utérin, Thèse de Doctorat, Université de Liège.
- Boverie S., Antoine M.-H., Somers F., Becker B., Sebille S., Ouedraogo R., Counerotte S., Pirotte B., Lebrun P., de Tullio P. 2005, Effect on K_{ATP} channel activation properties and tissue selectivity of the nature of the substituent in the 7- and the 3-position of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **48**, 3492-3503.
- Boyd A. 1988, Sulfonylurea receptors, ion channels and fruit flies. *Diabetes.* **37**, 847-850.
- Braghiroli D., Di Bella M., Zanolli P., Truzzi C., Baraldi M. 1990, Rigid analogs of taurine as potential antagonists. *Il Farmaco.* **45**, 631-645.
- Braghiroli D., Puia G., Cannazza G., Tait A., Parenti C., Losi G., Baraldi M. 2002, Synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives as potential allosteric modulators of AMPA/Kainate receptors. *J. Med. Chem.* **45**, 2355-2357.
- Brayden J. 2002, Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscles. *Clinic. Experiment. Pharma. Physiol.* **29**, 312-316.

- Brusa R., Zimmerman F., Koh D., Feldmeyer D., Gass P., Seeburg P., Sprengel R. 1995, Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science*. **270**, 1677-1680.
- Bryan J., Crane A., Vila-Carriles W., Babenko A., Aguilar-Bryan L. 2005, Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr Pharm Des*. **11**, 2699-2716.
- Buckheit R., Fliaskas-Boltz V., Decker W., Robertson J., Pyle C., White E., Bowdon B., McMahon J., Boyd M., Bader J., Nickell D., Barth H., Antonucci T. 1994, Biological and biochemical anti-HIV activity of the benzothiadiazine class of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Res*. **25**, 43-56.
- Cameroni R., Ferioli V., Bernabei M. 1972a, Sistemi eteropoliciclici : Nota I. *Il Farmaco*. **27**, 574-581.
- Cameroni R., Ferioli V., Bernabei M. 1972b, Sistemi eteropoliciclici : Nota II. *Il Farmaco*. **27**, 670-679.
- Cameroni R., Gamberini G., Bernabei M., Ferioli V. 1972c, Sistemi eteropoliciclici: Nota III. *Il Farmaco*. **27**, 1104-1112.
- Cavero I., Premmureur J. 1994, ATP-sensitive potassium channel openers are potential benefit in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res*. **28**, 32-33.
- Chan W., Berthelette C. 2002, A mild, efficient method for the synthesis of aromatic and aliphatic sulfonamides. *Tetrahedron Lett*. **43**, 4537-4540.
- Chapman A.G., Smith S.E., Meldrum B.S. 1991, The anticonvulsant effect of the non-NMDA antagonists, NBQX and GYKI 52466, in mice. *Epilepsy Res*. **9**, 92-96.
- Chern J., Wu Y., Liu K. 1990a, 2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides 2[1]. A condensation of 2-aminobenzenesulfonamide with chloroalkyl isothiocyanates. *J. Het. Chem*. **27**, 1485-1488.
- Chern J., Ho C., Wu Y., Rong J., Liu K. 1990b, 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides 3. Reactions of 2-aminobenzenesulfonamide with chloroalkyl isocyanates [1]. *J. Het. Chem*. **27**, 1909-1915.
- Chern J., Shiao C., Wu Y. 1991, 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides, part 4 : Mitsunobu reactions of 3-hydroxylalkylamino- and 3-

- mercaptoalkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. A convenient synthesis of built-in guanidine and disulfides. *Synthesis*. **2**, 159-161.
- Chern J., Tao P., Wang K., Gutcait A., Liu S., Yen M., Chien S., Rong J. 1998, Studies on quinazolinones and 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. 8. Synthesis and pharmacological evaluation of tricyclic fused quinazolines and 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides potential α_1 -adrenoreceptor antagonists. *J. Med. Chem.* **41**, 3128-3141.
 - Cheuk J., Hollingsworth M., Hughes S., Piper I., Maresh M. 1993, Inhibition of the contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **168**, 953-960.
 - Chiamulera C., Epping-Jordan M., Zocchi A., Marcon C., Cottiny C., Tacconi S., Corsi M., Orzi F., Conquet F. 2001, Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice, *Nat. Neurosci.* **4**, 873-874.
 - Chiu H., Lin Y., Cheng C., Tsai M., Yu H. 2001, *N*-acyl-1,2,3,4a,5,10b-hexahydr[1]benzopyrano-[3,4-*b*][1,4]oxazine-9-carbonitriles as bladder-selective potassium channel openers. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 383-393.
 - Clement J.P., Kunjilwar K., Gonzalez G., Schwanstecher M., Panten U., Aguilar-Bryan J., Bryan J. 1997, Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron*. 1997. **18**, 827-838.
 - Close W., Swett L., Brady L., Short J., Vernsten M. 1960, Synthesis of potential diuretic agent. I. Derivatives of 3-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1132-1135.
 - Close W., Sweet L., Nordeen C. 1961, Synthesis of potential diuretic agents. III. Derivates of 6-chloro-3,4-dihydro-2-methyl-7-sulfamoyl-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *J. Org. Chem.* **26**, 3423-3428.
 - Cnubben N., Peelen S., Borst J., Vervoort J., Veeger C., Rietjens I., 1994, Molecular orbital based quantitative structure-activity relationship for the cytochrome P450-catalysed 4-hydroxylation of halogenated anilines. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 590-598.
 - Cobley C., Foucher E., Lecouve J.-P., Lennon I., Ramsen J., Thominet G. 2003, The synthesis of S 18986, a chiral AMPA receptor via catalytic asymmetric hydrogenation. *Tetrahedron : Asymmetry*. **14**, 3431-3433.

- Coghlan M., William A., Gopalakrishnan M. 2001, Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators : update from a decade of progress. *J. Med. Chem.* **44**, 1627-1653.
- Cook D., Hales C. 1984, Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*. **311**, 271-273.
- Cook N., Quast U. 1990, Potassium channel pharmacology dans: Potassium Channels, structure, classification, function and therapeutic potential, Cook N.S. (ed) Ellis Horwood Chichester U.K., 118-255.
- Cooper J., Bloom F., Roth R. 2002, Amino acid Transmitters, in *The biochemical basis of neuropharmacology*, 8th edition, Oxford University Press, New York, pp. 105-150.
- Cosgrove K., Antoine M.-H., Lee A., Barnes P., de Tullio P., Clayton P., McLoy R., De Lonlay P., Nihoul-Fékété C., Robert J.-J., Saudubray J.-M., Rahier J., Lindley K., Hussain K., Aynsley-Green A., Pirotte B., Lebrun P., Dunne M. 2002, BPDZ 154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels : *in vitro* studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **87**, 4860-4868.
- Cosgrove K., Shepherd R., Fernandez E., Natarajan A., Dunne M. 2004, Causes and therapy of hyperinsulinism in infancy. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes*. **11**, 31-38.
- Cragoe E., Nicholson J., Sprague J. 1961, The synthesis of 7-sulphamylpyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine-1,1-dioxide, 5-sulphamylpyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine-1,1-dioxide and certain of their derivatives. *J. Med. Pharm. Chem.* **4**, 369-383.
- Cragoe E., Woltersdorf O., Baer J., Sprague J. 1962, Synthesis and diuretic activity of 3,3-spiro-substituted hydrothiazides. *J. Med Pharm. Chem.* **5**, 896-912.
- Crair M. 1999, Neuronal activity during development : permissive or instructive? *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 88-93.
- Cronin T., Hess H. 1968, Some new 3-amino-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **11**, 136-138.
- Dabrowski M., Ashcroft F., Ashfield R., Lebrun P., Pirotte B., Egebjerg J., Hansen J.B., Wahl P. 2002, The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-

- 7-méthoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *Diabetes*. **51**, 1896-1906.
- Dabrowski M., Larsen T., Ashcroft F., Bondo-Hansen J., Wahl P. 2003, Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type K_{ATP} channel by two novel diazoxide analogues. *Diabetologia*. **46**, 1375-1382.
 - Danysz W., Zajackowski W., Parsons C. 1995, Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* **6**, 455-474.
 - Degtyarenko K. 1995, Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein. Eng.* **8**, 737-747.
 - Delarge J., Lapière C. 1974, Synthèse et propriétés pharmacologiques de quelques N-acylsulfonamides. *Ann. Pharm. Franç.* **32**, 657-667.
 - De Sarro G., Rizzo M., Sinopoli V., Gitto R., De Sarro A., Zappala M., Chimirri A. 1998, Relationship between anticonvulsant activity and plasma level of some 2,3-benzodiazepines in genetically epilepsy-prone rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **61**, 215-220.
 - Desos P., Serkiz B., Morain P., Lepagnol J., Cordi A. 1996, Enantioselective synthesis of a pyrrolobenzothiadiazine derivative S 18986, a new AMPA receptor positive modulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 3003-3008.
 - De Stevens G., Werner L., Halamandaris A., Ricca S. 1958, Dihydrobenzothiadiazine dioxides with potent diuretic effect. *Experientia*. **14**, 463.
 - de Tullio P. 1995a, Synthèse de dérivés originaux de la classe des 1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxydes : potentialités pharmacologiques et thérapeutiques, Thèse de doctorat, Université de Liège.
 - de Tullio P., Pirotte B., Dupont L., Masereel B., Laeckmann D., Podona T., Diouf O., Lebrun P., Delarge J. 1995b, Synthesis and structural studies of a new class of heterocyclic compounds : 1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides, pyridil analogues of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Tetrahedron*. **51**, 3221-3234.
 - de Tullio P., Pirotte B., Lebrun P., Fontaine J., Dupont L., Antoine M.-H., Ouedraogo R., Khelili S., Magetto C., Masereel B., Diouf O., Podona T., Delarge J. 1996, 3- and 4-Substituted 4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine

- 1,1-dioxides as potassium channel openers : synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **39**, 937-948.
- de Tullio P., Pirotte B., Neven P., Masereel B., Dewalque D., Diouf O., Podona T., Caignard D., Renard P., Delarge J. 1997, Synthesis and biological evaluation of new 3-alkylamino-2-aryl-2H-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides as potential CCK-receptor ligands. *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 463-471.
 - de Tullio P., Pirotte B., Somers F., Boverie S., Lacan F., Delarge J. 1998, Study of the ring closure reaction of o-aminoarylsulfonamides with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole. *Tetrahedron.* **54**, 4935-4942.
 - de Tullio P., Khelili S., Ouedraogo R., Somers F., Boverie S., Dupont L., Fontaine J., Antoine M.-H., Delarge J., Pirotte B. 1999a, 3-alkylamino-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potent K_{ATP}-Channel activators : structural study and influence of stereochemistry. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **5**, 195-198.
 - de Tullio P., Ouedraogo R., Dupont L., Somers F., Boverie S., Dogné J.M., Delarge J., Pirotte B. 1999b, Synthesis and structural studies of 3-alkylamino-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide : a new class of heterocyclic compounds with therapeutical promises. *Tetrahedron.* **55**, 5419-5432.
 - de Tullio P., Delarge J., Pirotte B. 1999c, Recent advances in the chemistry of the cholecystokinin receptor ligands (agonists and antagonists). *Curr. Med. Chem.* **6**, 433-455.
 - de Tullio P., Delarge J., Pirotte B. 2000, Therapeutic and chemical developments of the cholecystokinin receptor ligands. *Exp. Opin. Invest. Ther.* **9**, 129-146.
 - de Tullio P., Becker B., Boverie S., Dabrowski M., Wahl P., Antoine M.-H., Somers F., Sebille S., Ouedraogo R., Hansen J.B., Lebrun P., Pirotte B. 2003, Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **46**, 3342-3353.
 - de Tullio P., Boverie S., Becker B., Antoine M.-H., Nguyen Q.-A., Francotte P., Counerotte S., Sebille S., Pirotte B., Lebrun P. 2005, 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as ATP-sensitive potassium channel

- openers : effect of 6,7-disubstitution on potency and tissue selectivity. *J. Med. Chem.* **48**, 4990-5000.
- de Tullio P., Dupont L., Francotte P., Counerotte S., Lebrun P., Pirotte B. 2006a, Three dimensional quantitative structure-activity relationships of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel openers belonging to the 3-alkylamino-4*H*-benzo- and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides families. *J. Med. Chem.* **49**, 6779-6788.
 - de Tullio P., Chiap P., Francotte P., Gillotin F., Van Heugen J.-C., Frédéric M., Kremers P., Lebrun P., Pirotte B. 2006b, Combined use of LC-SPE-NMR and LC-MS for the metabolites characterization of ATP-sensitive potassium channel openers belonging to 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides. *Drugs Fut.* **31** (suppl. A), 143.
 - de Tullio P., Lebrun P., Florence X., Antoine M.-H., Francotte P., Pirotte B. 2006c, Selective pancreatic ATP-sensitive potassium channel openers for the treatment of glucose homeostasis disorders. *Drugs Fut.* **31**, 991-1001.
 - de Weille J. 1992a, Modulation of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Res.* **26**, 1017-1020.
 - de Weille J., Fosset M., Epelbaum J., Lazdunski M. 1992b, Effectors of ATP-modulated K^+ channels inhibit the regulatory effects of somatostatin and GH-releasing factor on growth hormone secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1007-1014.
 - Dhanak D., Duffy K., Johnston V., Lin-Goerke J., Darcy M., Shaw A., Gu B., Silverman C., Gates A., Nonnemacher M., Earnshaw D., Casper D., Kaura A., Baker A., Greenwood C., Gutshall L., Maley D., DelVecchio A., Macarron R., Hofmann G., Alnoah Z., Cheng H.-Y., Chan G., Khandekar S., Keenan R., Sarisky R. 2002, Identification and biological characterization of heterocyclic inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **277**, 38322-38327.
 - Di Bella M., Albasini A. 1966a, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina : nota XXXV. *Il Farmaco.* **21**, 631-636.
 - Di Bella M., Monzani A., Albasini A., Conti G. 1966b, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina : nota XXXVI. *Il Farmaco.* **21**, 830-838.
 - Di Bella M., Rinaldi M., Fabio U., Manicardi G. 1972, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. *Il Farmaco.* **27**, 990-998.

- Di Bella M., Rinaldi M., Fabio U., Manicardi G. 1973a, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota III. *Il Farmaco*. **28**, 411-417.
- Di Bella M., Rinaldi M., Fabio U., Manicardi G. 1973b, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota IV. *Il Farmaco*. **28**, 777-783.
- Di Bella M., Rinaldi M., Coppi G., Fabio U., Manicardi G. 1974a, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota VI. *Il Farmaco*. **29**, 915-922.
- Di Bella M., Monzani A., Rinaldi M., Pecorari P. 1974b, Iododerivati della 2-aminobenzensulfonamide e dell'1,2,4-benzotiadiazin-1,1-diossido. *Il Farmaco*. **30**, 47-57.
- Di Bella M., Ferrari P., Pizzirani V., Parenti C., Raffa L. 1978, Azione cardiovascolare di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota VII. *Il Farmaco*. **33**, 350-359.
- Di Bella M., Monzani A., Andrisano M., Fabio U., Quaglio G. 1979a, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota VII. *Il Farmaco*. **34**, 91-88
- Di Bella M., Monzani A., Andrisano M., Fabio U., Quaglio G. 1979b, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota VIII. *Il Farmaco*. **34**, 189-198.
- Di Bella M., Gamberini G., Tait A., Fabio U., Quaglio G. 1983, Synthesis and antimicrobial activity of monoalkylcarbamic and thiocarbamic esters of 3-mercaptop-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide and of its bz-derivatives. *Il Farmaco*. **38**, 466-472.
- Doyle D., Cabral J., Pfuetzner R., Kuo A., Gulbis J., Cohen S., Chait B., MacKinnon R. 1998, The structure of the potassium channel : molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. **280**, 69-77.
- Dunitz J., Taylor R. 1997, Organic fluorine hardly ever accepts hydrogen bonds. *Chem. Eur.* **3**, 89-98.
- Dunne M., Illot M., Peterson O. 1987, Interaction of diazoxide , tolbutamide and ATP4- on nucleotide-dependent K⁺ channels in an insulin-secreting cell line. *J. Membr. Biol.* **99**. 215-224.
- Dunne M., Kane C., Shepherd R., Sanchez J., James R., Johnson P., Aynsley-Green A., Lu S., Clement J., Lindley K., Seino S., Aguilar-Bryan L.

- 1997, Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med.* **336**, 703-706.
- Dupont L., Pirotte B., de Tullio P., Masereel B., Delarge J. 1995a, 3-methyl-4*H*-pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide. *Acta Cryst.* **C51**, 2064-2066.
 - Dupont L., Pirotte B., de Tullio P., Masereel B., Delarge J. 1995b, 3-amino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide monohydrate and 3-*tert*-utyl-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide. *Acta Cryst.* **C51**, 1385-1388.
 - Dupont L., Pirotte B., de Tullio P., Delarge J. 1996, 3-isopropylamino-4-methyl-4*H*-pyrido[4,3-*e*][1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxide. *Acta Cryst.* **C52**, 1741-1743.
 - Dupont L., Pirotte B., de Tullio P. 2005a, Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₂ClN₃O₂S. *Z. Krystallogr.* **220**, 1-2.
 - Dupont L., Boverie S., de Tullio P., Pirotte B. 2005b, Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₁ClN₂O₂S₂. *Z. Krystallogr.* **220**, 1-2.
 - Dupont L., Boverie S., Pirotte B., de Tullio P. 2005c, Crystal structure of 7-chloro-3-isopropoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₃ClN₂O₃S.H₂O. *Z. Krystallogr.* **220**, 1-2.
 - Edlin A., Kinnard W., Vogin E., Buckley J. 1965, Hypotensive activity of two benzothiadiazine derivatives. *J. Pharm. Sci.* **54**, 20-24.
 - Edwards G., Weston A. 1990, Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends in Pharmacol. Sci.* **11**, 417-422.
 - Edwards G., Weston A. 1993, The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 597-637.
 - Efrat S. 2004, Regulation of insulin secretion : insights from engineered β -cell lines. *Ann. N-Y Acad. Sci.* **1014**, 88-96.
 - El-Maghraby A., Aly F., Eyada H. 1985, Synthesis of some new methyl-N-acetyl-aminobenzene disulphonanilides, disulphonic esters and benzo-thiadiazine-1, 1-dioxides. *Egypt. J. Chem.* **2**, 163-170.
 - European patent application n° 268 990 A2, 01.06.1988.
 - Evans M., McCrimmon R., Flanagan D., Keshavarz T., Fan X., McNay E., Jacob R., Sherwin R. 2004, Hypothalamic ATP-sensitive K⁺ channels play a

key role in sensing hypoglycemia and triggering counterregulatory epinephrine and glucagon responses. *Diabetes*. **53**, 2542-2551.

- Feldmeyer D., Brusa R., Kornau H., Kolhekar R., Rozov A., Burnashev N., Jensen V., Hvalby O., Sprengel R., Seeburg P. 1999, Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nature Neurosci.* **2**, 57-64.
- Flatt P. 1990, Defective regulation of insulin secretion in diabetes and insulinoma. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 124-127.
- Ford R. 1960, comparative clinical effects of hydrochlorothiazide and methylclothiazide. *Curr. Ther. Res.* **2**, 430-435.
- Ford R. 1961, Clinical pharmacologic investigation of polythiazide , a potent oral diuretic agent. *Curr. Ther. Res.* **3**, 320-328.
- Fosset M., Epelbaum J., Lazdunski M. 1992, Antidiabetic sulfonylureas antagonize somatostatin inhibition of prolactin in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **220**, 273-274.
- Foster C., Fujii K., Kingdon J., Brading A. 1989, The effect of cromakalim on the smooth muscle of guinea-pig urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* **97**, 281-291.
- Franck H., Puschmann A., Schudziarra V., Allescher H. 1994, Functional evidence for a glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat ileal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **271**, 379-386.
- Francotte P., Graindorge E., Boverie S., de Tullio P., Pirotte B. 2004, New trends in the management of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **11**. 1757-1778.
- Francotte P., de Tullio P., Fraikin P., Counerotte S , Goffin E., Pirotte B. 2006, In search of novel AMPA potentiators. *Recent Pat. on CNS Disc.* **1**, 239-246.
- Francotte P., de Tullio P., Boverie S., Kempen I., Graindorge E., Fraikin P., Lestage P., Danober L., Thomas J.-Y., Caignard D.-H., Pirotte B. 2007, Design, Synthesis and Pharmacology of Novel 7-substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as Positive Allosteric Modulators of AMPA Receptors. *Accepté pour publication dans le J. Med. Chem.*
- Freeman J., Wagner E. 1951, 1,2,4-benzothiadiazine dioxides and 3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine dioxides. *J. Org. Chem.* **16**, 815-837.

- Frerichs H., Creutzfeldt W. 1976, Hypoglycemia. I. Insulin secreting tumors. *Clin. Endocrinol. Metab.* **5**, 747-767.
- Furst A., Berlo R., Hooton S. 1965, Hydrazine as reducing agent for organic compounds (catalytic hydrazine reductions). *Chem. Rev.* **65**, 51-68.
- Gamberini G., Costantino L., Parenti C., De Salvia M., Di Bella M., Raffa L., Rossi T. 1989a, Heteroalkanoic acid with possible antiinflammatory activities. Note VII. *Boll. Chim. Farm.* **128**, 101-105.
- Gamberini G., Parenti C., Costantino L., Di Bella M., Raffa L., Rossi T. 1989b, Heteroarylalkanoic acids with possible antiinflammatory activities. *Pharmazie*. **44**, 601-604.
- Gareau Y., Pellicelli J., Laliberté S., Gauvreau D. 2003, Oxidation of aromatic and aliphatic triisopropylsilanylsulfanyls to sulfonyl chlorides : preparation of sulfonamides. *Tetrahedron Lett.* **44**, 7821-7824.
- Garrino M., Henquin J. 1988, Highly potent and stereoselective effects of the benzoic acid derivative AZ-DF 265 on pancreatic B-cells. *Br. J. Pharmacol.* **93**, 61-68.
- Gates M., Ogden A., Bleakman D. 2001, Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology*. **40**, 984-991.
- Ghelardoni M., Russo F. 1968, Idrogenolisi di 3,4-dihidro-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-diossido. Nota V. *Annali di Chimica*. **58**, 1402-1415.
- Ghose A., Viswanadhan V., Wendoloski J. 1999, A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. *J. Combin. Chem.* **1**, 55-68.
- Gil G., Rauf O., MacFarlane I. 1997, Diazoxide treatment for insulinoma : a national UK survey. *Postgrad. Med. J.* **10**, 640-641.
- Girard Y., Atkinson J., Rokach J. 1979, a new synthesis of 1,2,4-benzothiadiazines and a selective preparation of o-aminobenzenesulphonamides. *J. Chem. Soc. Perkin I.* 1043-1047.
- Girard Y., Atkinson J., Haubrich D., Williams M., Yarbrough G. 1982, Aminomethyl-1,2,4-benzothiadiazines as potential γ -aminobutyric acid. Unexpected discovery of a Taurine antagonist. *J. Med. Chem.* **25**, 113-116.
- Golstein G., Betz A. 1986, The blood-brain barrier. *Sci. Am.* **255**, 74-83.

- Goodarzi M., Azziz R. 2006, Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. Metab.* **20**, 193-205.
- Goode P., Farndon J., Anderson J., Johnston I., Morte J. 1986, Diazoxide in the management of patients with insulinoma. *World J. Surg.* **10**, 586-592.
- Graham S., Scholz T. 1991, Preparation and utility of dianions from *N*-tert-butylthiophene-2-sulfonamide. *J. Org. Chem.* **56**, 4260-4263.
- Grana E., Lilla L., Raffa L. 1962, Azione cardiovascolare di derivati del 1,2,4-benzotiadiazin-1,1-diossido. *Il Farmaco.* **17**, 974-987.
- Granger R., Deadwyler S., Davis M., Moskovitz B., Kessler M., Rogers G., Lynch G. 1996, Facilitation of glutamate receptors reverses an age-associated memory impairment in rats. *Synapse.* **22**, 332-337.
- Greiner J., Bayer V., Pastor R., Cambon A. 1986, F-alkyl-3-benzothiadiazine-1,2,4 dioxides-1,1 : agents diurétiques et antihypertensifs potentiels. *Bull. Soc. Chim. de France.* **6**, 871-875.
- Grover G., Atwal K. 2002, Pharmacologic profile of the selective mitochondrial-K_{ATP} opener BMS-191095 for the treatment of acute myocardial ischemia. *Cardiovasc. Drug Rev.* **20**, 121-136.
- Gulbenkian A., Ornstein L., Tabachnick I. 1972, The use of diazoxide inhibition of insulin secretion as a tool to investigate insulin stimulation by other agent. *Horm. Metab. Res.* **4**, 57-58.
- Gupta R., Win T., Bittner S. 2005, Taurine analogues ; a new class of therapeutics : retrospect and prospects. *Curr. Med. Chem.* **12**, 2021-2039.
- Gylfe E., Hellman B., Sehlin J., Täljedal I. 1984, Interaction of sulfonylureas with the pancreatic B-cells. *Experientia.* **40**, 1126-1135.
- Hampson R., Rogers G., Lynch G., Deadwyler S. 1998, Facilitative Effects of the Ampakine CX516 on Short-Term Memory in Rats: Correlations with Hippocampal Neuronal Activity. *J. Neurosci.* **18**, 2748-2763.
- Hand E., Baker D. 1989, Synthesis of 2-chloro- and 2-amino-5-fluoropyridines and isolation of a novel difluoroboryl imide. *Synthesis.* **12**, 905-908.
- Hansen J.B. 2006. Towards selective Kir6.2/SUR1 potassium channel openers, medicinal chemistry and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* **13**, 361-376.

- Hashimoto K., Shimizu E., Iyo M. 2004, Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res. Rev.* **45**, 104-114.
- Hayao S., Strycker W., Phillips B., Fujimori H., Vidrio H. 1968, Sedative, antiadrenergic, and hypotensive 2-substituted 2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3(4*H*)-one 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **11**, 1246-1248.
- Headley P., Grillner S. 1990, Excitatory amino acids and synaptic transmission : the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 205-211.
- Heindel N., Ko H., Birrer R., Merkel J. 1971, Antibacterial activity of *o*-amino-*N*-hydroxybenzenesulfonamides. *J. Med. Chem.* **15**, 118-120.
- Heurteaux C., Lautitzen I., Widmann C., Lazdunski M. 1995, Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4666-4670.
- Hizi A., Tal R., Shaharabany M., Currens M., Boyd M., Hughes S., McMahon J. 1993, Specific inhibition of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 and the chimeric enzymes of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 by nonnucleoside inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1037-1042.
- Hoffmann H. 1965a, The preparation of the unstable toluene-*p*-sulphonates. *J. Chem. Soc.* 6748-6753.
- Hoffmann H. 1965b, The rate of displacement of toluene-*p*-sulphonates relative to bromide ion. A new mechanistic criterion. *J. Chem. Soc.* 6753-6761.
- Holdrege C., Babel R., Cheney L. 1959, Synthesis of trifluoromethylated compounds possessing diuretic activity. *J. Am. Chem. soc.* **81**, 4807-4810.
- Hollmann M., Hartley M., Heinemann S. 1991, Calcium permeability of KA-AMPA glutamate receptor channels depends on subunit composition, *Science*, **252**, 851-853.
- Hopkins W., Fatherazi S., Cook D. 1990, The oral hypoglycaemic agent, U-56234, inhibits the activity of ATP-sensitive potassium channels in cell-free membrane patches from cultured mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett.* **277**, 101-104.

- Ikemizu D., Matsuyama A., Takeura K., Mitsunobu O. 1997, Preparation of 2-(3-Hydroxyalkylthiol)benzoxazoles and their conversion into thietanes. *Synlett*, 1247-1248.
- Imai Y., Sato S., Takasawa R., Ueda M. 1981, Facile synthesis of 2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and 4-oxo-3,4-dihydroquinazolines from 2-aminobenzenesulfonamide or 2-aminobenzamide and aldehydes in the presence of sodium hydrogen sulfite. *Synthesis*. **1**, 35-36.
- Imai Y., Mochizuki A., Kakimoto M. 1983, A convenient synthesis of 2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides from 2-aminobenzenesulfonamide and carboxylic acids by using polyphosphoric acid trimethylsilyl ester as condensing agent. *Synthesis*, 851.
- Impagnatiello F., Oberto A., Longone P., Costa E., Guidotti A. 1997, 7-Chloro-3-methyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine *S,S*-dioxide: a partial modulator of AMPA receptor desensitization devoid of neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 7053-7058.
- Inagaki N., Gonio T., Clément J.-P. 1995, Reconstitution of I_{KATP}: an inward rectifier subunit plus a sulfonylurea receptor. *Science*. **270**, 1166-1170.
- Inagaki N., Gonoi T., Clément J.-P., Wang C., Aguilar-Bryan L., Bryan J., Seino S. 1996, a family of sulphonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*. **16**, 1011-1017.
- Inoue R., Okabe K., Kitamura K., Kuriyama H. 1986, A newly identified Ca²⁺-dependent K⁺ channel in the smooth muscle membrane of single cells dispersed from rat portal vein. *Pflügers Arch*. **406**, 138-143.
- Inoue I., Nagase H., Kishi K., Hihuti T. 1991, ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. **352**, 244-247.
- Iwakawa T., Tamura H., Hayase Y. 1990, Cycloaddition in synthesis of sulfonamide derivatives. III. Convenient synthesis of 3-alkylthio-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1075-1076.
- Iwakawa T., Tamura H., Murabayashi A., Hayase Y. 1991, Cycloaddition in synthesis of sulfonamide derivatives. IV. One-pot synthesis of 3-dimethylamino-4,1,2-benzoxathiazine 1,1-dioxides, 3-methoxy-4-methyl-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and 3-dimethyl-1,4,2-benzodithiazine 1,1-dioxides. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1939-1943.

- Jakobsen P., Treppendahl S. 1979, The structure of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Tetrahedron*. **35**, 2151-2153.
- Jensen K., Pedersen E. 1982, Phosphorous pentoxide in organic synthesis part 4. Synthesis of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-amine 1,1-dioxides. *Chem. Scripta*. **20**, 248-250.
- Jimonet P., Audiau F., Aloup J.-C., Barreau M., Blanchard J.-C., Bohme A., Boireau A., Chevé M., Damour D., Doble A., Lavayre J., Dutruc-Rosset G., Randle J., Rataud J., Stutzmann J.-M., Mignani S. 1994, Synthesis and SAR of 2*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-carboxylic acid derivatives as novel potent glycine antagonists of the NMDA receptor-channel complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2735-2740.
- Johnson J., Ascher P. 1987, Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. **325**, 529-531.
- Johnson S., Simmon V. 2002, Randomized, double-blind, placebo-controlled international clinical trial of the Ampakine CX516 in elderly participants with mild cognitive impairment. A progress report. *J. Mol. Neurosci.* **19**, 197-200.
- Kamal A., Reddy K., Ahmed S., Khan M., Sinha R., Yadav J., Arora S. 2006, Anti-tubercular-agents. Part 3. Benzothiadiazine as a novel scaffold for anti-*Mycobacterium* activity. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 650-658.
- Kane C., Lindley K., Johnson P., James R., Milla P., Aynsley-Green A., Dunne M. 1997, Therapy for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Understanding the responsiveness of beta cells to diazoxide and somatostatin. *J. Clin. Invest.* **100**, 1888-1893.
- Khelili S., de Tullio P., Lebrun P., Fillet M., Antoine M.-H., Ouedraogo R., Dupont L., Fontaine J., Felekidis A., Leclerc G., Delarge J., Pirotte B. 1999, Preparation and pharmacological evaluation of the *R*- and *S*-enantiomers of 3-(2'-butylamino)-4*H*- and 3-(3'-methyl-2'-butylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1513-1520.
- Kim D., Wang L., Caldwell C., Chen P., Finke P., Oates B., MacCoss M., Mills S., Malkowitz L., Gould S., DeMartino J., Springer M., Hazuda D., Miller M., Kessler J., Danzeisen R., Carver G., Carella A., Holmes K., Lineberger J., Schleif W., Emini E. 2001, Design, synthesis, and SAR of

- heterocycle-containing antagonists of the human CCR5 receptor for the treatment of HIV-1 infection. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **11**, 3103-3106.
- Kisel V., Kovtunen V. 2000, 7,12-dihydroisoquino[3,2-c]-1,2,4-benzothiadiazine, a new heterocyclic system. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. **36**, 1116-1117.
 - Kolb H. 1990, Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **15**, 51-79.
 - Kotovskaya S., Mokrushina G., Postovskii I., Pidémkii E., Goleneva A. Vysokova T. 1979, Synthesis and properties of pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides. *Khim. Pharm. Zh.* **13**, 389-392.
 - Krassas G., Kaltsas T., Pontikides N., Jacobs H., Blum W., Messinis I. 1998, Leptin levels in women with polycystic ovary syndrome before and after treatment with diazoxide. *Eur. J. Endocrinol.* **139**, 184-189.
 - Krueger C., Madigan D., Jiang W., Kati W., Liu D., Liu Y., Maring C., Masse S., McDaniel K., Middleton T., Mo H., Molla A., Montgomery D., Pratt J., Rockway T., Zhang R., Kempf D. 2006, Inhibitors of HCV NS5B polymerase : synthesis and structure-activity relationships of *N*-alkyl-4-hydroxyquinolon-3-yl-benzothiadiazine sulfamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 3367-3370.
 - Kullin M., Li Z., Hansen J.-B., Björk E., Sandler S., Karlsson F. 2000, K(ATP) channel openers protect rat islets against the toxic effect of streptozotocin. *Diabetes*. **49**, 1131-1136.
 - Kullin M., Li Z., Hansen J.-B., Welsh N., Karlsson F., Sandler S. 2003 Protection of rat pancreatic islets by potassium channel openers against alloxan, sodium nitroprusside and interleukin-1 β mediated suppression : possible involvement of the mitochondrial membrane potential. *Diabetologia*. **46**, 80-88.
 - Kumar G., Dastoor F., Robayo J., Razzaque M. 1976, Side effects of diazoxide. *J. Am. Med. Assoc.* **235**, 275-276.
 - Kumar C., Gopidas K., Bhattacharyya K., Das P., George M. 1986, Photoinduced ring enlargement reactions of 2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. Steady-State and laser flash photolysis studies. *J. Org. Chem.* **51**, 1967-1972.
 - Langan Y., Lucas R., Jewell H., Toublanc N., Schaefer H., Sander J., Patsalos P. 2003, Talampanel, a New Antiepileptic Drug : Single- and

- Multiple-dose Pharmacokinetics and Initial 1-Week Experience in Patients with Chronic Intractable Epilepsy. *Epilepsia*. **44**, 46-53.
- Lawson K. 2000, Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int*. **57**, 838-845.
 - Lazdunski M. 1990, Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ou les suites imprévues de l'étude des sulfamidés hypoglycémiants. *Médecine/Science*. **6**, 279-285.
 - Lebrun P., Fontaine J. 1990, Relaxation response to pinacidil and diazoxide in the mouse isolated distal colon. *Pharmacology*. **40**, 21-26.
 - Lebrun P., Antoine M.-H., Herchuelz A. 1992, Minireview : K⁺ channel openers and insulin release. *Life Sci*. **51**, 795-806.
 - Lebrun P. 1993, Flux cationiques dans les cellules B des îlots pancréatiques et investigations pharmacologiques. *Rev. Franç. Endocrinol. Clin*. **34**, 241-254.
 - Lebrun P., Antoine M.-H., Ouedraogo R., Kane C., Dunne M., Hermann M., Herchuelz A., Masereel B., Delarge J., de Tullio P., Pirotte B. 1996, Activation of ATP-dependent K⁺ channels and inhibition of insulin release : effect of BPDZ 62. *J. Pharm. Pharmacol. Exp. Ther*. **277**, 156-162.
 - Lebrun P., Arkhammar P., Antoine M.-H., Nguyen Q.A., Bondo Hansen J., Pirotte B. 2000, A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia*. **43**, 723-732.
 - Lebrun C., Pilliere E., Lestage P. 2000, Effects of S 18986-1, a novel cognitive enhancer, on memory performances in an object recognition task in rats. *Eur. J. Pharmacol*. **401**, 205-212.
 - Lee C., Benfield P. 1994, Aniracetam. An overview of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and a review of its therapeutic potential in senile cognitive disorders. *Drugs Aging*. **4**, 257-273.
 - Lejeune R., Delarge J., Thunus L. 1984, Preparation de disulfure de mercapto-3-pyridinesulfonamide-2. *J. Pharm. Bel*. **39**, 217-224.
 - Li X., Witkin J., Need A., Skolnick P. 2003, Enhancement of antidepressant potency by a potentiator of AMPA receptors. *Cell. Mol. Neurobiol*. **23**, 419-430.

- Lipinski C., Lombardo F., Dominy B., Feeney P. 2001, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.* **46**, 3-26.
- Liss B., Bruns R., Roeper J. 1999, Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K_{ATP} channels in dopaminergic midbrain neurons. *E.M.B.O.* **18**, 833-846.
- Litvinov V., Sharanin Y., Babichev F. 1986, Cyclisation of nitriles as synthetic route to 2- and 3-aminothiophenes. *Sulfur Reports.* **6**, 97-135.
- Liu Y., Ren G., O'Rourke B., Marban E., Seharaseyon J. 2001, Pharmacological comparison of native mitochondrial K_{ATP} channels with molecularly defined surface K_{ATP} channels. *Mol. Pharmacol.* **59**, 225-230.
- Lopez N., Basabe J., Grant A., Krees S., Terry V., Viktora J., Wolff F. 1971, AO44 [3,4-dimethyl-7-chloro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide]: an important hyperglycemic agent. *Metab. Clin. Exp.* **20**, 373-383.
- Lynch, G. 1998. Memory and the brain : unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiology of Learning and Memory.* **70**, 82-100.
- Mackowiak M., O'Neill M., Hicks C., Bleakman D., Skolnick P. 2002, An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. *Neuropharmacology.* **43**, 1-10.
- Magnien E., Tom W., Oroshnik W. 1964, The preparation of 4-substituted benzothiadiazines. *J. Med. Chem.* **7**, 821-823.
- Malaisse W., Lebrun P. 1990, Mechanism of sulfonylurea-induced insulin release. *Diabetes Care.* **13**, 9-17.
- Mannhold R. 2004, K_{ATP} channel openers : structure-activity relationships of K_{ATP} channel openers. *Curr. Topics Med. Chem.* **6**, 1031-1047.
- Mannhold R., Leclerc G. 2005, Second-generation K_{ATP} channel openers. *Mini-Rev. in Med. Chem.* **5**, 961-969.
- Mannhold R. 2006, Structure-activity relationships and therapeutical potential. *Med. Res. Rev.* **24**, 213-266.
- Marchetti G., Ferrari G., Merlo L., Casagrande C. 1964, Su alcuni diuretici della serie benzotiadiazinica. *Il Farmaco.* **19**, 661-674.
- Marchetti E., Donini P., Samuelli F. 1965, Attivita' farmacologica di alcune 2H-1,2,4-benzotiodiazine-1,1-diossido. *Boll. Chim. Farm.* **104**, 49-54.

- Maren S., Baudry M. 1995, Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain : relationships to learning and memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* **63**, 1-18.
- Mayer M.L., Vyklicky J. 1989, Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 1411-1415.
- McCall J. 1975, Liquid-liquid partition coefficients by high pressure liquid chromatography. *J. Med. Chem.* **18**, 549-552.
- McCracken E., Fowler J.-H., Dewar D., Morrison, S., McCulloch, J. 2002, Grey Matter and White Matter Ischemic Damage Is Reduced by the Competitive AMPA Receptor Antagonist, SPD 502, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 1090-1097.
- McManus J. 1968, Preparation of 1,2,4-benzothiadiazines. *J. Het. Chem.* **5**, 137-139.
- McPherson G., Angus J. 1990, Characterisation of responses to cromakalim and pinacidil in smooth and cardiac muscle by use of selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **100**, 201-206.
- Meech R. 1978, Calcium-dependant potassium activation in nervous tissues. *Am. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, 1-18.
- Meerwein H., Dittmar G., Gollner R., Hafner K., Mensch F., Steinfort O. 1957, Aromatic diazo compounds. II. Preparation of aromatic sulfonyl chlorides, a new modification of the Sandmeyer reaction. *Chem. Ber.* **90**, 841-852.
- Meisheri K., Fosset M., Humphrey S., Lazdunski M. 1995, Receptor binding characterization in kidney membrane of [3H]-U37883, a novel ATP-sensitive K⁺ channel blocker with diuretic/natriuretic properties. *Mol. Pharmacol.* **47**, 155-163.
- Mignani S., Bohme G., Birraux G., Boireau A., Jimonet P., Damour D., Genevois-Borella A., Debono M., Pratt J., Vuilhorgne M., Wahl F., Stutzmann J.-M. 2002, 9-Carboxymethyl-5H,10H-imidazo[1,2-a]indeno[1,2-e]pyrazin-4-one-2-carboxylic Acid (RPR117824): Selective Anticonvulsive and Neuroprotective AMPA Antagonist. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1627-1637.

- Miki T., Liss B., Minami K., schiuchi T., Saraya A., Kashima Y., Horiuchi M. Ashcroft E., Roeper J., Seino S. 2001, ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci.* **4**, 507-512.
- Mitsunobu O. 1991, The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in the synthesis and transformation of natural products. *Synthesis.* 1-26.
- Miu P., Jarvie K., Radhakrishnan V., Gates M., Ogden A., Ornstein P., Zarrinmayeh H., Ho K., Peters D., Grabell J., Gupta A., Zimmerman D., Bleakman D. 2001, Novel AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 : effects on recombinant human AMPA receptors *in vitro*. *Neuropharmacology.* **40**, 976-983.
- Möhrle H., Niefenthaler H., Schinke J. 1990, 3,4-Substituierte hydro-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxide. *Arch. Pharm.* **323**, 911-913.
- Monzani A., Di Bella M., Fabio U., Manicardi G. 1973, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. *Il Farmaco.* **28**, 149-156.
- Monzani A., Di Bella M., Fabio U., Manicardi G. 1974, Azione antimicrobia di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota V. *Il Farmaco.* **29**, 910-914.
- Monzani A., Di Bella M., Ferrari P., Parenti C., Raffa L. 1979, Azione cardiovascolare di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota VIII. *Il Farmaco.* **34**, 876-883.
- Moreau C., Prost A.L., Dérand R., Vivaudou M. 2005, SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 951-963.
- Morren H., Zivkovic D., Linz R., Strubbe H. 1961, Diurétiques : nouveaux dérivés de la benzothiadiazine. *J. Pharm. Bel.* **16**, 323-329.
- Morrison J., Ashfor M., Khan R., Smith S. 1993, The effects of potassium channel openers on isolated human myometrium before and after the onset of labour. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **69**, 1277-1285.
- Mourre C., Widman C., Ladzunski M. 1990, Sulfonylurea binding sites associated with ATP-regulated K⁺ channels in the central nervous system : autoradiographic analysis of their distribution and ontogenesis, and their localization in the mutant mice cerebellum. *Brain Res.* **519**, 29-43.
- Murthy M., Nageswar Y., Reddy N., Ramalingam T., Sattur P. 1989, Synthesis of 3-carboethoxy-4,11-dihydro-11-alkyl/phenyl-4-oxopyrimido[1,2-

- b]-1,2,4-benzothiadiazine 6,6-dioxyde. A novel heterocyclic ring system [1]. *J. Heterocyclic Chem.* **26**, 473-474.
- Nagasawa H., Mitsunobu O. 1981, Alkylation of thioureas related compounds by use of alcohols, diethyl azodicarboxylate, and triphenylphosphine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 2223-2224.
 - Nakamura K., Tanaka Y. 2001, Antidepressant-like effects of aniracetam in aged rats and its mode of action. *Psychopharmacology*. **158**, 205-212.
 - Neill C., Preston P., Wightman R. 1998, Synthesis of pyrido-1,2,4-thiadiazines related to antihypertensive 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides. *Tetrahedron*. **54**, 13645-13654.
 - Nichols C., Shyng S., Nestorowicz A., Glaser B., Clément J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L. 1996, Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*. **272**, 1785-1787.
 - Nielsen-Kudsk J., Bang L., Bronsgaard A. 1990, Glibenclamide blocks the relaxant action of pinacidil and cromakalim in airways smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **180**, 291-296.
 - Nielsen F., Bodvarsdottir T., Worsaae A., MacKay P., Stidsen C., Boonen H., Pridal L., Arkhammar P., Whal P., Ynddal L., Junager F., Dragsted N., Tagmose T., Mogensen J., Koch A., Treppendahl S., Bondo Hansen J. 2002, 6-Chloro-3-alkylamino-4*H*-thieno[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic β -cells. *J. Med. Chem.* **45**, 4171-4187.
 - Nielsen F., Ebdrup S., Jensen A., Ynddal L., Bodvarsdottir T., Stidsen C., Worsaae A., Boonen H., Arkhammar P., Fremming T., Wahl P., Korno H. Bondo Hansen J. 2006, New 3-alkylamino-4*H*-thieno-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives activate ATP-sensitive potassium channels of pancreatic Beta cells. *J. Med. Chem.* **49**, 4127-4139.
 - Noma A. 1983, ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*. **305**, 147-148.
 - Notsu T., Tanaka I., Takano M., Noma A. 1992, blockage of ATP-sensitive K^+ channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 702-708.
 - Novello F., Sprague J. 1957, Benzothiadiazine dioxides as novel diuretics. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2028-2029.

- Novello F., Bell S., Abrams E., Ziegler C., Sprague J. 1960a, Diuretics : 1,2,4-benzothiadiazine -1,1-dioxides. *J. Org. Chem.* **25**, 970-981.
- Novello F., Bell S., Abrams E., Ziegler C., Sprague J. 1960b, Diuretics : aminobenzenedisulfonamides. *J. Org. Chem.* **25**, 965-970.
- O'Donnel M., Owen N. 1994, Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiol. Rev.* **74**, 683-721.
- O'Hagan D., Rzepa H. 1997, Some influences of fluorine in bioorganic chemistry. *Chem. Comm.* **7**, 645-652.
- O'Rourke B. 2004, Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res.* **94**, 420-432.
- Ouedraogo R., Becker B., Boverie S., Somers F., Antoine M.-H., Pirotte B., Lebrun P., de Tullio P. 2002, 2-Alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- et pyridothiadiazine 1,1-dioxides : from K⁺_{ATP} channel openers to Ca⁺⁺ channel blockers? *Biol. Chem.* **383**, 1759-1768.
- P'An S., Scriabine A., McKersie D. 1960. Diuretic action of benzothiazide. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmacologie.* **238**, 129-130.
- Parenti C., Di Bella M., Raffa L., Baggio G., Guarini S. 1983, Azione cardiovascolare di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazin-1,1-diossido : Nota IX. *Il Farmaco.* **38**, 738-749.
- Parenti C., Costantino L., Di Bella M., Raffa L., Baggio G., Rossi T. 1987, *Heteroarylalkanoic acids with possible antiinflammatory activities. Note IV.* *Boll. Chim. Farm.* **126**, 239-243.
- Parke D., Williams R. 1950, Derivatives of Benz-1 : 2 : 4-thiazine 1:1-dioxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1760-1763.
- Partin K., Patneau D., Winters C., Mayer M., Buonanno A. 1993, Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron.* **11**, 1069-1082.
- Pasternack A., Coleman S., Jouppila A., Mottershead D., Lindfors M., Pasternack M., Keinaänen K. 2002, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking the N-terminal domain. *J. Biochem.* **277**, 49662-49667.
- Peat A., Townsend C., Worley J., Allen S., Garrido D., Mertz R., Pfohl J., Terry C., Truax J., Veasey R., Thomson S. 2002, Synthesis and evaluation

- of 7-substituted-3-cyclobutylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide derivatives as K_{ATP} channel agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2977-2980.
- Peet N., Sunder S., Barbuch R., Huber E., Bargar E. 1987, Sulfonylcarbamic azides from sulfonyl chlorides and 5-aminotetrazole. *J. Heterocyclic Chem.* **24**, 1531-1535.
 - Petersen H. 1973, Synthesis of 3-amino and 3-substituted amino-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Acta Chem. Scand.* **27**, 2655-2660.
 - Petersen O., Dunne M. 1989, Regulation of K⁺ channels plays a crucial role in the control of insulin secretion. *Pflügers Arch.* **414**, S115-S120.
 - Phillips D., Sonnenberg J., Arai A., Vaswani R., Krutzik P., Kleisli T., Kessler M., Granger R., Lynch G., Chamberlin R. 2002, 5'-Alkyl-benzothiadiazides: a new subgroup of AMPA receptor modulators with improved affinity. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1229-1248.
 - Pin J., Duvoisin R. 1995, Review: neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions, *Neuropharmacology.* **34**, 1-26.
 - Pipper I., Minshall E., Downing S., Hollingsworth S., Sadraei H. 1990, effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 901-907.
 - Pirotte B., de Tullio P., Lebrun P., Antoine M.-H., Fontaine J., Masereel B., Schynts M., Dupont L., Herchuelz A., Delarge J. 1993, 3-(Alkylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerfull inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells : a new class of potassium channel openers. *J. Med. Chem.* **36**, 3211-3213.
 - Pirotte B., Antoine M.-H., de Tullio P., Hermann M., Herchuelz A., Delarge J., Lebrun P. 1994, A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1381-1386.
 - Pirotte B., de Tullio P., Neven P., Dewalque D., Delarge J. Caignard D.-H., Renard P. 1997, The chemistry of 3-phtalimidomethyl-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides and their use in the synthesis of potential cholecystikinin/Gastrin receptor ligands. *Bull. So. Chim. Bel.* **106**, 781-790.

- Pirotte B., Podona, T., Diouf O., de Tullio P., Lebrun P., Dupont L., Sommers F., Delarge J., Morain P., Lestage P., Lepagnol J., Spedding M. 1998a, 4*H*-1,2,4-Pyridothiadiazine 1,1-Dioxides and 2,3-Dihydro-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-Dioxides Chemically Related to Diazoxide and Cyclothiazide as Powerful Positive Allosteric Modulators of (R/S)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic Acid Receptors: Design, Synthesis, Pharmacology, and Structure-Activity Relationships, *J. Med. Chem.* **41**, 2946-2959.
- Pirotte B., de Tullio P., Podona T., Diouf O., Dewalque D., Neven P., Masereel B., Caignard D.-H., Renard P., Delarge J. 1998b. Pyridothiadiazinedioxides structurally related to quinazolinones cholecystokinin.gastrin receptor ligands: synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **7**, 29-40.
- Pirotte B., Ouedraogo R., de Tullio P., Khelili S., Somers F., Dupont L., Fontaine J., Damas J., Lebrun P. 2000, 3-Alkylamino-4*H*-pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells : design, synthesis, and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **43**, 1456-1466.
- Pirotte B. 2000, Les benzo- et les pyridothiadiazine dioxydes en chimie thérapeutique : conception, synthèse et évaluation pharmacologique. Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur.
- Pirotte B., de Tullio P., Antoine M.-H., Sebille S., Florence X., Lebrun P. 2005, New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers. *Expert Opin. Ther. Patents.* **15**, 497-504.
- Pisanti N., Cresci Mutti F. 1964, Effetti pressori di derivati del 6-chloro-7-metil-1,2,4-benzotiadiazina-1,-diossido. *Il Farmaco.* **19**, 1003-1011.
- Pocai A., Lam T., Gutierrez-Juarez R., Obici S., Schwartz G., Bryan J., Aguilar-Bryan L., Rossetti L. 2005a, Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature.* **434**, 1026-1031.
- Pocai A., Obici S., Schwartz G., Rossetti L. 2005b, A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell. Metab.* **1**, 53-61.
- Pongs O. 1992, Structural basis of voltage-gated potassium channel pharmacology. *Trends in Pharmacol. Sci.* **13**, 359-365.

- Pratt J., Donner P., McDaniel K., Maring C., Kati W., Mo H., Middleton T., Liu Y., Ng T., Xie Q., Zhang R., Montgomery D., Molla A., Kempf D., Kohlbrenner W. 2005, Inhibitors of HCV NS5B polymerase : synthesis and structure-activity relationships of N-1-heteroalkyle-4-hydroxyquinolon-3-yl-benzothiadiazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 1577-1582.
- Quirk J., Nisenbaum E. 2002, LY404187 : a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors. *CNS Drug Rev.* **8**, 255-282.
- Raffa L.1954a, Ricerche nel campo della Benzo-1,2,4-tiodiazina : Nota I. // *Farmaco.* **9**, 661-681.
- Raffa L.1954b, Ricerche nel campo della Benzo-1,2,4-tiodiazina : Nota II. // *Farmaco.* **9**, 682-690.
- Raffa L.1957a, Ricerche nel campo della Benzo-1,2,4-tiodiazina : Nota III. // *Farmaco.* **12**, 41-48.
- Raffa L.1957b, Ricerche nel campo della Benzo-1,2,4-tiodiazina : Nota VII. // *Farmaco.* **12**, 400-412.
- Raffa L.1957c, Ricerche nel campo della Benzo-1,2,4-tiodiazina : Nota IX. // *Farmaco.* **12**, 495-501.
- Raffa L.1957d, Ricerche nel campo della Benzo-1,2,4-tiodiazina : Nota V. // *Farmaco.* **12**, 279-292.
- Raffa L. 1957e, Richerche nel campo della benzo-1,2,4-tiodiazina. Nota VI. // *Farmaco.* **12**, 293-304.
- Raffa L., Di Bella M., Monzani A. 1960a, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina : Nota XIV. // *Farmaco.* **15**, 716-725.
- Raffa L., Di Bella M., Vampa G., Melegari M. 1960b, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina : Nota XII. // *Farmaco.* **15**, 668-678.
- Raffa L., Monzani A. 1961a, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XVII. // *Farmaco.* **16**, 14-22.
- Raffa L., Di Bella M., Melegari M., Vampa G. 1961b, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XVI. // *Farmaco.* **16**, 4-13.
- Raffa L., Di Bella M., Melegari M., Vampa G. 1962a, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XX. // *Farmaco.* **17**, 320-330.
- Raffa L., Monzani A.1962b, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XIX. // *Farmaco.* **17**, 244-251.

- Raffa L., Monzani, A., Di Bella M. 1962c, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina : Nota XVIII. *Il Farmaco*. **17**, 234-243.
- Raffa L., Di Bella M., Monzani, A. 1962d, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXIII. *Il Farmaco*. **17**, 548-555.
- Raffa L., Cameroni R., Bernabei M., Ferioli V. 1962e, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXII. *Il Farmaco*. **17**, 532-547.
- Raffa L., Di Bella M., Melegari M., Vampa G. 1962f, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXI. *Il Farmaco*. **17**, 331-339.
- Raffa L., Pecorari P. 1963, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXVIII. *Il Farmaco*. **18**, 957-963.
- Raffa L., Di Bella M., Monzani A. 1964, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXIX. *Il Farmaco*. **19**, 47-53.
- Raffa L., Lilla L., Grana E. 1965, Azione cardiovascolare di derivati del 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-diossido. Nota II. *Il Farmaco*. **20**, 647-661.
- Raffa L., Pecorari P. 1966a, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXXII. *Il Farmaco*. **21**, 16-29.
- Raffa L., Melegari M., Vampa G. 1966b, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XXXVII. *Il Farmaco*. **21**, 839-845.
- Raffa L., Pecorari P., Albasini A. 1967, Ricerche nel campo della 1,2,4-benzotiadiazina. Nota XL. *Il Farmaco*. **22**, 431-440.
- Raffa L., Pecorari P., Grana E., Zonta F. 1971, Azione cardiovascolare di derivati del 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-diossido. Nota III. *Il Farmaco*. **26**, 51-65.
- Raffa L., Pecorari P., Ferrari P. 1974a, Azione cardiovascolare di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota V. *Il Farmaco*. **29**, 647-653.
- Raffa L., Di Bella M., Ferrari P., Rinaldi M., Ferrari W. 1974b, Azione cardiovascolare di derivati dell'1,2,4-benzotiadiazina. Nota IV. *Il Farmaco*. **29**, 411-423.
- Raffa L., Di Bella M., Ferrari P., Monzani A., Andrisano M., Baggio G. 1979, Acidi Eteroarilalcanoici a possibile azione antiinfiammatoria. *Il Farmaco*. **34**, 199-210.
- Rasmussen S.B., Sorensen T.S., Hansen J.-B., Mandrup-Poulsen T., Hornum L., Markholst H. 2000, Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual beta-cells

- function and mass in acutely diabetic BB rats. *Horm. Metab. Res.* **32**, 294-300.
- Ravina E., Montanes J., Cobreros M., Tato F. 1973, 4,4-disubstituted cyclohexanes. V. Synthesis and diuretic activity of some 4'-methyl-4'-substituted halomethyl-6-chloro-3,3-spirohexanehydrothiazides. *Chimie Thérapeutique*. **3**, 290-296.
 - Reddy A., Kamal A., Sattur P. 1986, A new, facile synthesis of 4-alkyl- and aryl-substituted 3-amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Synthesis*. 864-865.
 - Renzi A., Chart J., Gaunt R. 1959, sulfonamide compounds with high diuretic activity. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* **1**, 406-416.
 - Ritzel R., Hansen J., Veldhuis J., Butler P. 2004, Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K(ATP)-channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 795-805.
 - Robertson J., Dusterhoft D., Mitchell T. 1965, Diuretics. 6-Substituted 3-ketoalkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and related anils, oximes, and hydrazones. *J. Med. Chem.* **8**, 90-95.
 - Robert A., Irirazzi S., Hughes T., Howe J. 2001, Subunit interactions and AMPA receptor desensitization. *J. Neurosci.* **21**, 5574-5586.
 - Rockway T., Zhang R., Liu D., Betebenner D., McDaniel K., Pratt J., Beno D., Montgomery D., Jiang W., Masse S., Kati W., Middleton T., Molla A., Maring C., Kempf D. 2006, Inhibitors of HCV NS5B polymerase : synthesis and structure-activity relationships of N-1-benzyl and N-1-[3-methylbutyl]-4-hydroxy-1,8-naphthyridon-3-yl benzothiadiazine analogs containing substituents on the aromatic ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 3833-3838.
 - Ronner P., Higgins T., Kimmich G. 1991, Glucose-dependent K⁺ channels in pancreatic beta-cells by nonsulfonylurea drug linogliride. *Diabetes*. **40**, 885-892.
 - Rubin A., Roth F., Winbury M., Topliss J., Sherlock M., Sperber N., Black J. 1961, New class of antihypertensive agents. *Science*. **133**, 2067.
 - Rudy B. 1988, Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*. **25**, 729-749.
 - Sabnis R. 1994, The Gewald Synthesis. *Sulphur Report*. **16**, 1-17.

- Schlittler E., Destevens G., Werner L. 1962, Recent developments in the non-mercurial diuretics. *Angew. Chem. Internat. edit.* **1**, 235-245.
- Schrader E. 1917, Über hydrazide und azide von sulfocarbonsäuren. *Journal fuer Praktische Chemie.* **95**, 392-396.
- Schwanstecher M., Schwanstecher C., Dickel C., Chudziak F., Moshiri A, Panten U. 1994, Location of the sulfonylurea receptor at the cytoplasmic face of the B-cell membrane. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 903-911.
- Sebillé S., de Tullio P., Boverie S., Antoine M.-H., Lebrun P., Pirotte B. 2004, Recent development in the chemistry of potassium channel activators: the cromakalim analogues. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1213-1222.
- Seino S. 1999, ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 337-362.
- Seino S., Miki T. 2003, Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**, 133-178.
- Sekiguchi M., Nishikawa K., Aoki S., Wada K. 2002, A desensitization-selective potentiator of AMPA-type glutamate receptors. *Brit. J. Pharmacol.* **136**, 1033-1041.
- Selleri R., Caldini O. 1960, Sintesi del 6-trifluorometil-7-solfaminil-3,4-diidro-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-diossido. *Ann. Chim.* **50**, 170-176.
- Severs W., Kinnard W., Buckley J. 1965, Evaluation of certain hypotensive agents VII. *J. Pharm. Sci.* **54**, 1025-1029.
- Sherlock M., Sperber N., Topliss J. 1960, 3-haloalkyl-dihydrobenzothiadiazine dioxides as potent diuretic agents. *Experientia.* **16**, 184-185.
- Shi Z., Luo W., Xiu Q., Ye Y., Zan Z., Zhu Q. 1999, Effects of BRL 55834 on allergen-induced bronchoconstrictor and airway inflammation in sensitized guinea pigs. *Chin. Med. J.* **112**, 988-991.
- Short J., Biermacher U. 1960, Synthesis of potential diuretic agent. II. Dichloro Derivatives of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1132-1135.
- Short J., Swett L. 1961, Synthesis of potential diuretic agent. IV. Bromo derivatives of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *J. Org. Chem.* **26**, 3428-31.

- Shyng S., Nichols C. 1997, Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J Gen Physiol.* **110**, 655-664.
- Simmons D., Dodsworth J., Chubb F. 1963, The synthesis of cyclic analogues of tolbutamide. *Can. J. Chem.* **41**, 804-807.
- Skak K., Gotfredsen C., Lundsgaard D., Bondo-Hansen J., Sturis J., Markkost H. 2004, Improved β -cell survival and reduced insulinitis in a type 1 diabetic rat model after treatment with a β -cell-selective K_{ATP} channel opener. *Diabetes.* **53**, 1089-1095.
- Smart B. 2001, Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem.* **109**, 3-11.
- Solyom S., Tarnawa I. 2002, Non competitive AMPA antagonists of 2,3-benzodiazepine type, *Curr. Pharm. Design.* **8**, 913-939.
- Somasekhara S., Dighe V., Suthar G., Mukherjee S. 1968, Chlorobenzenesulphonamides & some related benzothiadiazines. *Ind. J. Chem.* **6**, 19-23.
- Somers F., de Tullio P., Boverie S., Dogné J.M., de Leval X., Antoine M.-H., Lebrun P., Pirotte B. 2000, Synthesis and biological effects of new 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides on insulin-secreting cells. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 89-95.
- Somers F. 2001, Les 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes et les 3-alkylamino-1,2,4-benzodithiazine 1,1-dioxydes : conception, synthèse et évaluation pharmacologique en tant qu'activateurs potentiels des canaux potassiques ATP-dépendants, Thèse de Doctorat, Université de Liège.
- Sommer B., Keinänen K., Verdoorn T., Wisden W., Burnashev N., Herb A., Köhler M., Tagaki T., Sakmann B., Seeburg P. 1990, Flip and flop : a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science.* **249**, 1580-1585.
- Spruce A., Standen N., Stanfield P. 1985, Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature.* **316**, 736-738.
- Staab H., Walther G. 1962, Synthese von isothiocyannaten. *Ann.* **657**, 104-107.

- Standen N., Quayle J., Davies N., Brayden J., Huang Y., Nelson M. 1989, Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Sciences*. **245**, 177-180.
- Stendbøl T., Madsen U., Krosgaard-Larsen P. 2002, The AMPA receptor binding site : focus on agonists and competitive antagonists. *Curr. Pharm. Design*. **8**, 857-872.
- Sturgess N., Ashford M., Cook D., Hales C. 1985, The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet*. **2**, 474-475.
- Su W., Yang B., Shou C. 2003, Facile synthesis of 3,4-dihydro-(2H)-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides promoted by samarium diiodide. *J. Indian Chem. Soc.* **80**, 637-639.
- Sun Y., Olson R., Horning M., Armstrong N., Mayer M., Gouaux E. 2002, Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature*. **417**, 245-253.
- Sunkyung L., Yang Y., Soo-kyung K., Jeehee S., Sun-Ok K., Hong L. 2003, Cardiosensitive anti-ischemic ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers : benzopyranyl indoline and indole analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 459-471.
- Surwit R., Dixon T., Petro A., Daniel K., Collins S. 2000, Diazoxide restores beta3-adrenergic receptor function in diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinol.* **141**, 3630-3637.
- Sykes P. 1986, A guidebook to mechanism in organic chemistry, 6th edition, Pearson ED. Ltd (Longman), Harlow.
- Szewczyk A., Marban E. 1999, Mitochondria : a new target for K channel openers ? *Trends Pharmacol Sci.* **20**, 157-161.
- Szewczyk A., Wojtczak L. 2002, Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* **54**, 101-127.
- Tabachnick I., Gulbenkian A., Yannell A. 1965, The hyperglycemic activity of benzothiadiazine and other diuretics. *Life Sciences*. **4**, 1931-1936.
- Tait A., Ganzerli S., Di Bella M. 1996, Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1'-diméthylethyl)phenols. *Tetrahedron*. **52**, 12587-12596.
- Takano N., Noma A. 1993, The ATP-sensitive K⁺ channel. *Prog. Neurobiol.* **41**, 21-30.

- Taran S., Ukrainets I., Likhanova N., Gorokhova O., Bezugly P. 2001, 4-Hydroxy-2-quinolones. 47. Synthesis and diuretic activity of (2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)methylamides of 1R-4-hydroxy-2-oxoquinoline-3-carboxylic acid. *Chem. of Hetero. Comp.* **37**, 237-240.
- Tarnawa I. 2001, Allosterical modulation of AMPA receptors, *Biomed. Health Res.* **45**, 181-182.
- Tedesco R., Shaw A., Bambal R., Chai D., Concha N., Darcy M., Dhanak D., Fitch D., Gates A., Gerhardt W., Halegoua D., Han C., Hofmann G., Johnston V., Kaura A., Liu N., Keenan R., Lin-Goerke J., Sarisky R., Wiggall K., Zimmerman M., Duffy K. 2006, 3-(1,1-dioxo-2H-(1,2,4)-benzothiadiazine-3-yl)-4-hydroxy-2(1H)-quinolinones, potent inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **49**, 971-983.
- Thorens B. 2001, GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic glucose-detection. *Mol Membr Biol.* **18**, 265-273.
- Thuringer D., Cavero I. 1997, les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire : une aventure physiologique à suspense moléculaire. *Med. Sci.* **13**, 1049-1052.
- Toong S., Xiong Z., Zavorin S., Bai D., Orser B., Thatcher G., Reynolds J., MacDonald J. 2001, Modulation of AMPA receptors by a novel organic nitrate. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**, 422-429.
- Topliss J., Sherlock M., Clarke F., Daly M., Pettersen B., Lipski J., Sperber N. 1961, 3-substituted dihydrobenzothiadiazine 1,1-dioxides as diuretic agents. *J. Org. Chem.* **26**, 3842-3850.
- Topliss J., Sherlock M., Reimann H., Konzelman L., Shapiro E., Pettersen B., Schneider H., Sperber N. 1962, Antihypertensive Agent. I. Non-diuretic 2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **6**, 122-127.
- Topliss J., Konzelman L., Shapiro E. 1963a, A novel elimination reaction of o-acylaminobenzenesulfonamides. *J. Org. Chem.* **28**, 2595-2597.
- Topliss J., Konzelman L. 1963b, 3,4-dihydro-3-imino-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Org. Chem.* **28**, 2313-2319.
- Topliss J., Konzelman L., Shapiro E., Sperber N., Roth F. 1964, Antihypertensive Agent. II. 3-Substituted 2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **7**, 269-273.

- Topliss J., Yudis M. 1972a, Correlation of antihypertensive activity with structure in a series of 2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides using the substituent constant approach. *J. Med. Chem.* **15**, 394-403.
- Topliss J., Caldwell W. 1972b, US-patent 3,641,017.
- Trude G., Rorsman P., Ohno-Shosaku T. 1986, Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflügers Arch.* **407**, 493-499.
- Tsuchida A., Miura T., Tanno M., Sakamoto J., Mikki T., Kuno A., Shimamoto K. 2002, Infarct size limitation of nicorandil: roles of mitochondrial K_{ATP} channels, sarcolemmal K_{ATP} channels, and protein kinase. *J. Am. Cardiol.* **40**, 1523-1530.
- Unger C., Eibll H., Von Heyden H., Krisch B., Nagel G. 1985, Blood-brain barrier and the penetration of the cytostatic drugs. *Klin. Wochenschr.* **63**, 565-571.
- Vandergriff J., Huff K., Bond A., Lodge D. 2001, Potentiation of response to AMPA on central neurones by LY392098 and LY404187 *in vivo*. *Neuropharmacology.* **40**, 1003-1009.
- Vega S., Arranz M.E. 2004, 4*H*-thieno[3,4-*e*]- and 4*H*-pyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides. Synthesis, chemical properties and evaluation of their potential cardiovascular activity. *J. Heterocyclic Chem.* **41**, 45-50.
- Verkarre V., Fournet J.C., de Lonlay P., Gross-Morand M., Devillers M., Rahier J., Brunelle F., Robert J.J., Nihoul-Fekete C., Saudubray J.M., Junien C. 1998, Paternal mutation of the sulfonylurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J. Clin. Invest.* **102**, 1286-1291.
- Wales J., Krees S., Grant A., Viktora J., Wolff F. 1968, Structure-activity relationships of benzothiadiazine compounds as hyperglycemic agents, *J. Pharm. Pharmacol. Exp. Ther.* **164**, 421-432.
- Wallenstein G., Eichenbaum H., Hasselmo M., 1998, The hippocampus as an associator of discontiguous events, *Trends Neurosci.* **21**, 317-323.
- Wang Y., Haider H., Ahmad N., Ashraf M. 2005a, Mechanisms by which K_{ATP} channel openers produce acute and delayed cardioprotection. *Vasc. Pharmacol.* **42**, 253-264.

- Wang H., Long C., Zhang Y. 2005b, A new ATP-sensitive potassium channel opener reduces blood pressure and reverses cardiovascular remodelling in experimental hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1326-1333.
- Weller H., Miller A., Moquin R., Dickinson K., Hedberg S., Moreland S., Cohen R., Delaney C., Skwish S., Williams S. 1992, Benzothiadiazine dioxides : a new class of potent angiotensin-II (AT₁) receptor antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2**, 1115-1120.
- Wells G., Tao M., Josef K., Bihovsky R. 2001, 1,2-benzothiazine 1,1-dioxide P₂-P₃ peptide mimetic aldehyde calpain I inhibitors. *J. Med. Chem.* **44**, 3488-3503.
- Werner L., Halamandaris A., Ricca S., Dorfman L., de Stevens G. 1960, Dihydrobenzothiadiazine 1,1-dioxides and their diuretic properties. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1161-1166.
- Wertheim E. 1934, Preparation of N-benzoyl-o-aminobenzenesulfonamide. Condensation to heterocyclic compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 971-973.
- Wertheim E. 1948, Orthoanilic acid. *Org. Syn.* **2**, 471-473.
- Whitehead C., Traverso J., Sullivan H., Marshall F. 1961a, Diuretics. V. 3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Org. Chem.* **26**, 2814-2818.
- Whitehead C., Traverso J., Marshall F., Morrison D. 1961b, Diuretics. IV. 6-chloro-3-substituted 7-sulfamoyl-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Org. Chem.* **26**, 2809-2813.
- Wohl A. 1970, Electronic molecular pharmacology : the benzothiadiazine antihypertensive agents. II. Multiple regression analyses relating biological potency and electronic structure. *Molecular pharmacology.* **6**, 195-205.
- Wollweber H., Horstmann H., Stoepel K., Garthoff B., Puls W., Krause H., Krause H., Thomas G. 1981, 3-Amino-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide mit antihypertensiver und potentieller diabetogen wirkung. *Arzneim. Forsch.* **31**, 279-288.
- Yale H., Losee K., Bernstein J. 1960, 6-(Trifluoro)-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide-1,-dioxide and related compounds. *JACS.* **82**, 2042-2046.
- Yale H. 1968, The preparation of 2-hydroxyamino- α,α,α -trifluoro-*p*-toluenesulfonamide by catalytic hydrogenation and its use in the synthesis

of 2,3-dihydro-4*H*-1,2,4-thiadiazine-4-ol 1,1-dioxide. Studies in infrared and proton Magnetic resonance spectra. *J. Org. Chem.* **33**, 2382-84.

- Zdravkovic M., Kruse M., Rost K., Moss J., Kecskes A., Dyrberg T. 2005, The effects of NN414, a SUR1/Kir6.2 selective potassium channel opener, in healthy male subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 763-772.
- Zhong W., Chen X., Zhang Y. 2000a, Low-valent titanium induced reductive cyclisation of nitro compounds and aliphatic ketones: facile synthesis of 3,4-dihydro-(2*H*)-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides. *Chin. J. Chem.* **18**, 786-788.
- Zhong W., Chen X., Zhang Y. 2000b, Samarium diiodide induced reductive cyclisation of nitro compounds with ketones: a novel synthesis of 3,4-dihydro-(2*H*)-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides. *J. Chem. Res.* **6**, 292-293.
- Zivkovic I., Thompson D.M., Bertolino M., Uzunov D., Di Bella M., Costa E., Guidotti A. 1995, 7-chloro-3-methyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine S,S dioxide (IDRA21): a benzothiadiazine derivative that enhances cognition by attenuating DL-alpha-amino-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolepropanoic acid (AMPA) receptor desensitization, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 300-309.

Annexes

Listes des annexes :

Annexe 1 :

- de Tullio P., Pirotte B., Somers F., Boverie S., Lacan F., Delarge J. 1998, Study of the ring closure reaction of *o*-aminoarylsulfonamides with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole. *Tetrahedron*. **54**, 4935-4942.

Annexe 2 :

- Somers F., de Tullio P., Boverie S., Dogné J.M., de Leval X., Antoine M.-H., Lebrun P., Pirotte B. 2000, Synthesis and biological effects of new 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides on insulin-secreting cells. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 89-95.

Annexe 3 :

- Boverie S., Antoine M.-H., de Tullio P., Somers F., Becker B., Lebrun P., Pirotte B. 2001, Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73) : introduction of the heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 973-980.

Annexe 4 :

- Cosgrove K., Antoine M.-H., Lee A., Barnes P., de Tullio P., Clayton P., McLoy R., De Lonlay P., Nihoul-Fékété C., Robert J.-J., Saudubray J.-M., Rahier J., Lindley K., Hussain K., Aynsley-Green A., Pirotte B., Lebrun P., Dunne M. 2002, BPDZ 154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels : *in vitro* studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **87**, 4860-4868.

Annexe 5 :

- Ouedraogo R., Becker B., Boverie S., Somers F., Antoine M.-H., Pirotte B., Lebrun P., de Tullio P. 2002, 2-Alkyl-3-alkylamino-2*H*-benzo- et

pyridothiadiazine 1,1-dioxides : from K^+_{ATP} channel openers to Ca^{++} channel blockers? *Biol. Chem.* **383**, 1759-1768.

Annexe 6 :

- de Tullio P., Becker B., Boverie S., Dabrowski M., Wahl P., Antoine M.-H., Somers F., Sebille S., Ouedraogo R., Hansen J.B., Lebrun P., Pirotte B. 2003, Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **46**, 3342-3353.

Annexe 7 :

- Boverie S., Antoine M.-H., Somers F., Becker B., Sebille S., Ouedraogo R., Counerotte S., Pirotte B., Lebrun P., de Tullio P. 2005, Effect on K_{ATP} channel activation properties and tissue selectivity of the nature of the substituent in the 7- and the 3-position of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **48**, 3492-3503.

Annexe 8 :

- Francotte P., Graindorge E., Boverie S., de Tullio P., Pirotte B. 2004, New trends in the management of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1757-1778.

Annexe 9 :

- Graindorge E., Francotte P., Boverie S., de Tullio P., Pirotte B. 2004, New trends in the development of positive allosteric modulators of AMPA receptors. *Curr. Med. Chem.- Central Nervous System Agents.* **4**, 95-103.

Annexe 10 :

- Pirotte B., de Tullio P., Antoine M.-H., Sebille S., Florence X., Lebrun P. 2005, New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers. *Expert Opin. Ther. Patents.* **15**, 497-504.

Annexe 11 :

- de Tullio P., Boverie S., Becker B., Antoine M.-H., Nguyen Q.-A., Francotte P., Counerotte S., Seville S., Pirotte B., Lebrun P. 2005, 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as ATP-sensitive potassium channel openers : effect of 6,7-disubstitution on potency and tissue selectivity. *J. Med. Chem.* **48**, 4990-5000.

Annexe 12 :

- Dupont L., Boverie S., de Tullio P., Pirotte B. 2005, Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₁ClN₂O₂S₂. *Z. Kristallogr.* **220**, 1-2.

Annexe 13 :

- Dupont L., Pirotte B., de Tullio P. 2005, Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₂ClN₃O₂S. *Z. Kristallogr.* **220**, 1-2.

Annexe 14 :

- Dupont L., Boverie S., Pirotte B., de Tullio P. 2005, Crystal structure of 7-chloro-3-isopropoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₃ClN₂O₃S.H₂O. *Z. Kristallogr.* **220**, 1-2.

Annexe 15:

- de Tullio P., Dupont L., Francotte P., Counerotte S., Lebrun P., Pirotte B. 2006, Three dimensional quantitative structure-activity relationships of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel openers belonging to the 3-alkylamino-4*H*-benzo- and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides families. *J. Med. Chem.* **49**, 6779-6788.

Annexe 16:

- de Tullio P., Chiap P., Francotte P., Gillotin F., Van Heugen J.-C., Frédéric M., Kremers P., Lebrun P., Pirotte B. 2006, Combined use of LC-SPE-NMR and LC-MS for the metabolites characterization of ATP-sensitive potassium channel openers belonging to 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides. *Drugs Fut.* **31** (suppl. A), 143.

Annexe 17:

- de Tullio P. , Lebrun P., Florence X., Antoine M.-H., Francotte P., Pirotte B. 2006, Selective pancreatic ATP-sensitive potassium channel openers for the treatment of glucose homeostasis disorders. *Drugs Fut.* **31**, 991-1001.

Annexe 18:

- Brevets sur les activateurs des canaux K_{ATP}.

Annexe 19:

- Brevets sur les modulateurs allostériques AMPA.

Annexe 1

Study of the Ring Closure Reaction of *o*-Aminoarylsulfonamides with 1,1'-Thiocarbonyldiimidazole.

Pascal de Tullio*, Bernard Pirotte, Fabian Somers, Stéphane Boverie, Fabrice Lacan and Jacques Delarge.

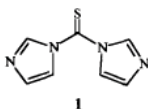
Department of Medicinal Chemistry, University of Liège, 3 rue Fusch, B-4000 Liège, Belgium.

Received 9 December 1997; accepted 23 February 1998

Abstract: 1,1'-Thiocarbonyldiimidazole was used as a ring closure agent for *o*-aminoarylsulfonamides. Beside the formation of the expected 3-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxide derivatives, a new kind of compound was also obtained, namely the 3-(imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides. The latter appeared to be good reaction intermediates. The use of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole opens a new synthetic route to 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides, a heterocyclic ring system expressing important pharmacological properties. This work is the first study on the ring closure properties of this reagent. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

1,1'-Thiocarbonyldiimidazole¹ **1** (TCDI) possesses a chemical reactivity which may be compared to that of thiophosgene. It is currently used in the stereospecific alkene synthesis and in multiple biochemical applications².



This reagent was employed only once in the literature as a ring closure agent for some *o*-alkylamino arylsulfonamides. This reaction was very briefly described and led, in the presence of caesium carbonate, to 4-alkyl-3-thioxo-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides by loss of two imidazole groups³. Such 3-thioxo derivatives, generally obtained *via* a two step reaction starting from *o*-aminoarylsulfonamides, have been reported as key intermediates in the approach to 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides^{4,5}. This heterocyclic ring system was found to be very important in several pharmacological fields^{5,6}. Indeed, some representatives of this class appear to be the most potent drugs acting on pancreatic K_{ATP} channels^{7,8}. For example, BPDZ 44 and BPDZ 62, two 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides (Figure 1), strongly inhibit the insulin release as a result of their K_{ATP} channel opening properties.

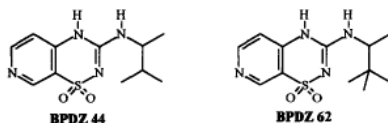


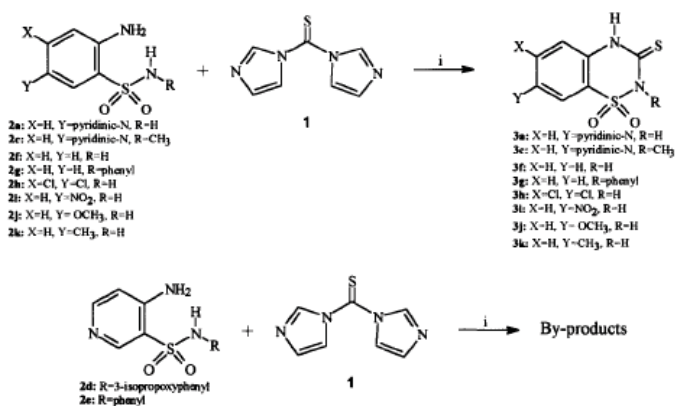
Figure 1 : BPDZ 44 and BPDZ 62, two potent pancreatic K_{ATP} channel openers.

* E-mail : P. DeTullio@ulg.ac.be. Fax : +32 04 232.29.61

Other previously reported arylthiadiazinedioxides exhibit interesting binding properties on cholecystokinin⁸ and AMPA¹⁰ receptors or exert a myorelaxant activity on different smooth muscle tissues^{11,12}. In order to improve the synthetic route to this class of drugs and to give the way to some series of these compounds, we decided to use 1,1'-thiocarbonyldiimidazole for the ring closure of some *o*-aminopyridine- and benzenesulfonamides.

Results and Discussion

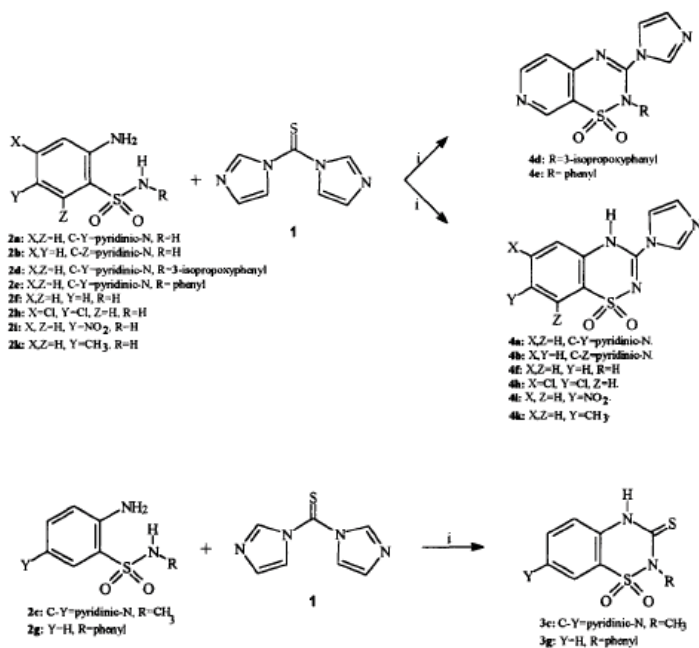
The experimental procedure reported above³ was very poorly detailed. So, a systematic study was made in order to determine the best conditions for ring closure. The use of caesium carbonate in DMF generally led to slow or incomplete reactions at room temperature, even using a large excess of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole, and to an important formation of by-products at higher temperature. Moreover, isolation of pure heterocyclic compounds was difficult. The main products were identified and characterized by mass spectrometry data or by comparison with similar derivatives synthesized following classical synthetic routes^{3,5,13}. All of them corresponded to the expected 3-thioxo intermediates (Scheme 1).



Scheme 1 : reagents : i : TCDI (1.5-3 equiv.), Cs₂CO₃, DMF, room temperature, 12-24 hours.

It was found that the suppression of the base, the use of a large excess of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole and the partial or total replacement of DMF by dioxane at reflux led to a rapid, complete and clean ring closure of the selected *o*-aminopyridine- and benzenesulfonamides (in the case of small excess of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole, the reaction occurred but was found to be very incomplete). Surprisingly, under these conditions and depending on the starting material, we obtained a new kind of compound identified as the corresponding 3-imidazol-1-yl substituted arylthiadiazinedioxide 4. In a few cases, however, the expected 3-thioxo intermediate was obtained as the main product (Scheme 2).

Schemes 1 and 2 show the results of this ring closure step with and without the use of the mineral base.



Scheme 2 : reagents : i : TCDI (3 equiv.), dioxane, reflux, 2-4 hours.

Such a difference in reactivity may probably be explained by the formation of the cyclic tetrahedral intermediate **5** (Figure 2). This intermediate should lead to the final product by loss of the most labile proton (S-H or N-H). In the case of the preferential departure of the S-H proton, the imidazole group became the leaving group and the reaction product was the 3-thioxo compound. However, when the N-H proton was the most acid, the second leaving group was the less basic S-H moiety and the reaction led to the 3-imidazol-1-yl-substituted compound with loss of H₂S. The lability of the different protons in the intermediate **5** was probably influenced by the substituents of both the aryl and the thiadiazine rings. In the majority of cases, the N-H protons appeared to be the most labile and the ring closure reaction led to the 3-imidazol-1-yl product.

The use of caesium carbonate probably allowed the deprotonation of the sulfonamide group and afforded in a first time the ring opened intermediate **6** (Figure 3). The formed « sulfonylthiourea » was probably ionized by the base and ring closure obviously occurred with departure of the second imidazole group.

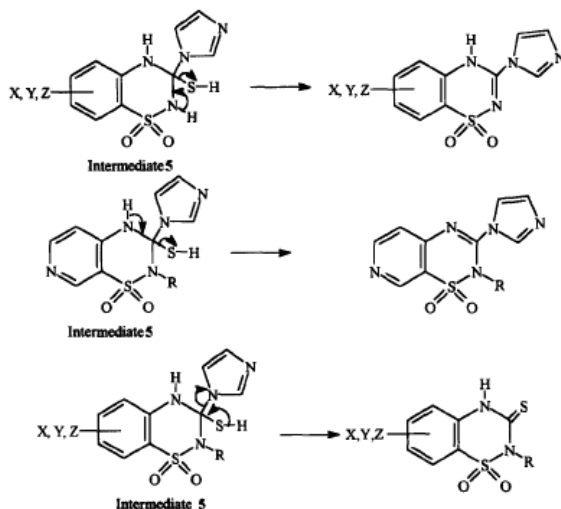


Figure 2 : possible intermediate and mechanism of the reaction of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (3 equiv.) and *o*-aminoarylsulfonamides without the presence of a base.

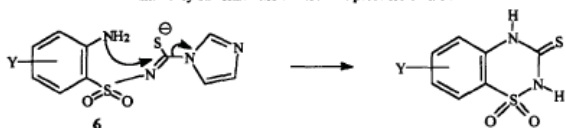


Figure 3 : possible intermediate and mechanism of the reaction of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (3 equiv.) and *o*-aminoarylsulfonamides in the presence of caesium carbonate.

It is interesting to note that the 3-imidazol-1-yl derivatives without a substituent on the thiadiazine ring appear to exist at least partially under the zwitterionic form 7. The IR spectra of all these compounds clearly show the presence of both NH⁺ and N-H vibration bands. These data seem to indicate the possible coexistence of the ionic form 7 and the neutral form 4 in the solid state (Figure 4). In the case of the pyridinic compounds, the NH⁺ IR bands were also observed but the real position of the labile proton remained to be established (competition between pyridinic and imidazolic nitrogens). Compounds 4d and 4e, which are devoid of acidic proton, do not exhibit absorption bands in the range of 2000 cm⁻¹.

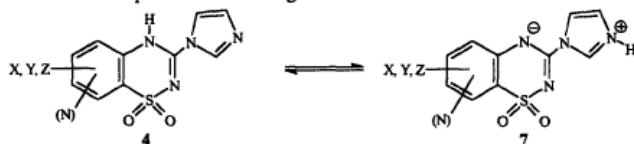
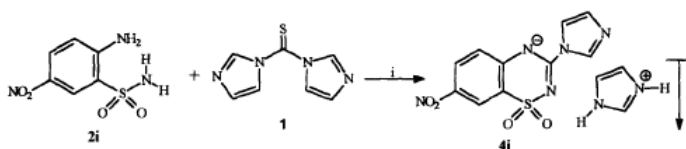


Figure 4 : probable zwitterionic equilibrium of 3-imidazol-1-yl derivatives.

The NMR data of all the compounds confirmed this hypothesis. Indeed, the probable existence of the tautomeric form 7 in solution led to a strong deshielding of the imidazole protons. Table I shows the chemical shifts of the 2-H, 4-H and 5-H of the imidazole group in different compounds 4. For compound 4i, the introduction of a 7-nitro substituent caused a severe increase of the acidity of the NH proton. As a result, 4i was isolated as its imidazole salt from the reaction medium in dioxane (Scheme 3).



Scheme 3 : reagents : i : dioxane, reflux, 4 hours.

So, in this case, protonation of the 3-imidazole group did not occur. By contrast, when the acid form of 4i (isolated by acidification of an aqueous solution of the imidazolium salt) was examined, the imidazole protons appeared at a lower field. Moreover, there is a relationship between the electron withdrawing effects of the groups placed on the aromatic ring, which directly influences the lability of the thiadiazinic N-H proton, and the chemical shifts of the imidazole protons.

Table I : Chemical shifts (DMSO- d_6) (in ppm) of the imidazole protons in the 3-imidazole derivatives 4.

Comps	Substituent of the aryl ring	δ 2-H imidazole	δ 4-H imidazole	δ 5-H imidazole
4a	7-pyridinic nitrogen	9.15	7.4	7.95
4b	8-pyridinic nitrogen	9.5	7.4-7.7	8.1
4d	7-pyridinic nitrogen	8.3	6.8-7.3	7.55
4e	7-pyridinic nitrogen	8.3	6.9	7.55
4f	H	9.3	7-7.8	8.05
4h	6-Cl, 7-Cl	9.45	7.6	8.1
4i (salt)	7-NO ₂	8.45	7.0	7.7
4i' (acid)	7-NO ₂	9.7	7.7	8.25
4k	7-CH ₃	9.15	7.1-7.6	8.0

Interestingly, the 3-imidazol-1-yl compounds 4 appeared to react directly and easily with alkylamines and arylamines to give the corresponding 3-alkylamino- or 3-arylamino- substituted derivatives in good yields by the loss of the 3-imidazole moiety. For example, 3-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-(3-isopropoxyphenyl)-2*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide 4d heated under reflux with benzylamine or aniline gave in a few hours the corresponding 3-benzylamino or 3-phenylamino derivatives⁹.

On the contrary, the 3-thioxo compounds 3 should be first converted into the corresponding 3-methylsulfanyl derivatives before reacting with the appropriate amines⁷. As a result, the formation of the 3-imidazol-1-yl intermediates 4 clearly improved the previously reported synthetic route to 3-alkylamino-4*H*-

1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides. Indeed, the use of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole without caesium carbonate, as yet described, directly led, in one step, to a suitable synthetic intermediate. Moreover, in some cases (i.e. for compounds **2b**, **2d** and **2e**), the use of this ring closure agent provided the unique solution for having access to the expected 3-alkylamino compounds.

In conclusion, this work is the first systematic study on the reactivity of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole as a ring closure agent for *o*-aminoarylsulfonamides. Modifications of the experimental procedure previously reported³ led to substantial reaction improvements (yield, product purity, time reaction...). Application of the modified reaction conditions led as rule to a new kind of compounds: the (3-imidazol-1-yl)-4H-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides. These compounds appeared to be interesting intermediates for the synthesis of 3-alkylaminoarylthiadiazine dioxides. The latter contain a very important heterocyclic ring system having well-known applications in several pharmacological fields.

Experimental

Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FT-spectrophotometer. The ¹H NMR spectra were taken on a Bruker AW-80 (80 MHz) in DMSO-*d*₆. Chemical shifts are reported in δ units (ppm) with HMDS as the internal standard; the abbreviations s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet and b=broad are used throughout. Mass spectra were performed on an Electrospray MS (VG platform Fission) following the FAB procedure. Elemental analyses were carried out on a Carlo-Erba EA 11008-elemental analyser. All the reactions were routinely checked by TLC on silica gel Merck 60F 254.

2-Methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide (3c): *N*-methyl-4-aminopyridine-3-sulfonamide¹⁴ (**2c**) (0.5 g, 2.7 mmol) was dissolved in a mixture dioxane-DMF 2:1 (5 mL). 1,1'-Thiocarbonyldiimidazole (0.75 g, 4.2 mmol) was added to the solution. The mixture was heated between 80 and 90 °C for 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in a 0.5N NaOH solution (20 mL). The solution was treated with charcoal and the filtrate was adjusted to pH 4 with formic acid. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (86 %), mp: 195–198 °C, Anal. Calc. for C₇H₇N₃O₂S₂: C 36.67, H 3.08, N 18.33, S 27.97; found: C 36.92, H 3.17, N 18.66, S 27.72; ν_{max} 3207 (N-H), 1590, 1526 (C=N, C=C, N-H), 1329, 1195 (S=O) cm⁻¹; δ (DMSO-*d*₆) 3.5 (s, 3H, 2-N-CH₃), 7.3 (d, 1H, 5-H), 8.75 (d, 1H, 6-H), 9.0 (s, 1H, 8-H).

2-Phenyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (3g): Obtained as described for compound **3c** starting from *N*-phenyl-2-aminobenzenesulfonamide (**2g**) (75 %), mp: 198–201 °C, Anal. Calc. for C₁₃H₁₀N₂O₂S₂: C 53.78, H 3.47, N 9.65, S 22.08; found: C 53.85, H 3.27, N 9.42, S 22.41; ν_{max} 3467 (N-H), 1597, 1532 (C=C, N-H), 1353, 1170 (S=O) cm⁻¹; δ (DMSO-*d*₆) 7.4 (bm, 7H, 2-phenyl + 5-H + 7-H), 7.6–7.8 (bm, 2H, 6-H + 8-H).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-4H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide (4a): *4*-aminopyridine-3-sulfonamide³ (**2a**) (1 g, 5.8 mmol) was partly dissolved in dioxane (10 mL). DMF was added dropwise to complete the dissolution of the former. 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (3.1 g, 17.4 mmol) was added to the solution and the mixture was heated under reflux for 4 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was triturated with water. The solution was adjusted to pH 12 with diluted NaOH and treated with charcoal. After filtration, the filtrate was adjusted to pH 3 with diluted HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (60 %), mp > 300 °C, Anal. Calc. for C₉H₇N₅O₂S: C 43.37, H 2.83, N 28.10, S 12.86; found: C 43.26, H 3.09, N 27.92, S 12.96; ν_{max} 3436 (N-H), 2014 (NH⁺), 1634, 1539, 1522 (C=N, C=C, N-H), 1287, 1153 (S=O) cm⁻¹; δ (DMSO-*d*₆) 7.3 (d, 1H, 5-H), 7.4 (bs, 1H, 4-H imidazole), 7.95 (bs, 1H, 5-H imidazole), 8.45 (d, 1H, 6-H), 8.9 (s, 1H, 8-H), 9.15 (s, 1H, 2-H imidazole).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-4H-pyrido[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide (4b): Obtained as described for compound **4a** starting from *3*-aminopyridine-2-sulfonamide¹⁴ (**2b**) (60 %), mp > 300 °C, Anal. Calc. for C₈H₇N₅O₂S: C 43.37, H 2.83, N 28.10, S 12.86; found: C 43.56, H 2.99, N 27.84, S 13.02; ν_{max} 3189 (N-H), 1933 (NH⁺), 1604, 1571, 1537, 1522 (C=N, C=C, N-H) 1272, 1159 (S=O) cm⁻¹; δ (DMSO-*d*₆) 7.4–7.7

(bm, 3H, 5-H + 7-H pyridine + 4-H imidazole) 8.1 (bs, 1H, 5-H imidazole), 8.3 (bt, 1H, 6-H pyridine), 9.5 (s, 1H, 2-H imidazole).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-2-(3-isopropoxyphenyl)-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide (4d): The title compound was obtained as described in the literature⁹ starting from *N*-(3-isopropoxyphenyl)-4-aminopyridine-3-sulfonamide (**2d**), mp 145–147 °C; $\nu_{\max}$ 1613, 1574, 1528 (C=N, C=C, N-H), 1349, 1186 (S=O) cm^{-1} ; δ (DMSO- d_6) 1.15 (d, 6H, O-CH(CH₃)₂), 4.55 (m, 1H, O-CH(CH₃)₂), 6.8–7.3 (m, 5H, phenyl + 4-H imidazole), 7.6 (bs, 1H, 5-H imidazole), 7.75 (d, 1H, 5-H), 8.3 (s, 1H, 2-H imidazole), 8.95 (d, 1H, 6-H), 9.1 (s, 1H, 8-H).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-2-phenyl-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide (4e): Obtained as described in the literature⁹ starting from *N*-phenyl-4-aminopyridine-3-sulfonamide (**2e**) (54 %), mp 213–215 °C; $\nu_{\max}$ 1616, 1592, 1574, 1543, 1525 (C=N, C=C, N-H), 1312, 1173 (S=O) cm^{-1} ; δ (DMSO- d_6) 6.9 (bs, 1H, 4-H imidazole), 7.35 (bs, 5H, phenyl), 7.55 (bs, 1H, 5-H imidazole), 7.75 (d, 1H, 5-H), 8.3 (bs, 1H, 2-H imidazole), 9.0 (d, 1H, 6-H), 9.1 (s, 1H, 8-H).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4f): *o*-Aminobenzenesulfonamide¹² (**2f**) (0.3 g, 1.7 mmol) was dissolved in dioxane (9 mL). 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (0.96 g, 5.3 mmol) was added to the solution and the mixture was heated under reflux for 6 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was triturated with water. The solution was adjusted to pH 12 with diluted NaOH and treated with charcoal. After filtration, the filtrate was adjusted to pH 5 with formic acid. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (60 %), mp 299–301 °C, Anal. Calc. for C₁₀H₈N₄O₂S: C 48.38, H 3.25, N 22.57, S 12.91; found: C 47.85, H 3.13, N 22.82, S 12.98; $\nu_{\max}$ 3447 (N-H), 1983 (NH⁺), 1621, 1607, 1585, 1550, 1529 (C=N, C=C, N-H), 1306, 1165 (S=O) cm^{-1} ; δ (DMSO- d_6) 7–7.8 (bm, 5H, H phenyl + 4-H imidazole), 8.05 (bs, 1H, 5-H imidazole), 9.3 (s, 1H, 2-H imidazole).

6,7-Dichloro-3-(1H-imidazol-1-yl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4h): 2-amino-4,5-dichlorobenzenesulfonamide (**2h**) (1 g, 4.15 mmol) and 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (2.2 g, 12.5 mmol) were dissolved in dioxane (20 mL). The mixture was heated under reflux for 3 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was triturated with water. The solution was adjusted to pH 12 with concentrated NaOH. The sodium salt of the title compound was collected by filtration. The precipitate was dissolved in water and added with diluted HCl. The product was collected by filtration, washed with water and dried (80 %), mp > 300 °C, $\nu_{\max}$ 3430 (N-H), 2028 (NH⁺), 1601, 1584, 1556, 1520 (C=N, C=C, N-H), 1252, 1154 (S=O) cm^{-1} ; δ (DMSO- d_6) 5.5 (bs, H₂O + 4-NH), 7.4 (s, 1H, 5-H phenyl), 7.6 (s, 1H, 4-H imidazole), 7.8 (s, 1H, 8-H phenyl), 8.1 (s, 1H, 5-H imidazole), 9.45 (s, 1H, 2-H imidazole).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide imidazolium salt (4i): 2-amino-5-nitrobenzenesulfonamide¹⁶ (**2i**) (0.8 g, 4.3 mmol) was dissolved in hot dioxane (20 mL). 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (1.5 g, 8.6 mmol) was added to the solution and the mixture was heated under reflux for 4 hours. After cooling, a yellow precipitate was collected by filtration and washed with dioxane. The product was identified as the imidazolium salt of the title compound (57 %), mp 246–248 °C, Anal. Calc. for C₁₃H₁₁N₇O₄S: C 43.22, H 3.07, N 27.14, S 8.87; found: C 43.46, H 3.02, N 27.30, S 8.91; $\nu_{\max}$ 3276, 3179 (N-H), 1606, 1572, 1493 (C=N, C=C, N-H), 1265, 1106 (S=O) cm^{-1} ; δ (DMSO- d_6) 7.0 (s, 1H, 4-H imidazole), 7.3 (d, 1H, 5-H phenyl), 7.55 (s, 2H, 4-H + 5-H imidazolium), 7.7 (s, 1H, 5-H imidazole), 8.15 (d, 1H, 6-H phenyl), 8.35 (s, 1H, 8-H phenyl), 8.45 (bs, 1H, 2-H imidazole), 8.9 (s, 1H, 2-H imidazolium), 10.9 (bs, NH⁺ imidazolium). The acidic form of **4i** was isolated by acidification of an aqueous solution of the imidazolium salt with diluted HCl. The resulting precipitate **4i'** was collected by filtration, washed with water and dried; δ (DMSO- d_6) 7.25 (d, 1H, 5-H phenyl), 7.65 (bs, 1H, 4-H imidazole), 8.2 (bs, 1H, 5-H imidazole), 8.25 (d, 1H, 6-H phenyl), 8.40 (s, 1H, 8-H phenyl), 9.7 (bs, 1H, 2-H imidazole).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-7-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4k): Obtained as described for compound **4h** starting from 2-amino-5-methylbenzenesulfonamide¹³ (**2k**) (45 %), mp: 223–226 °C; Anal. Calc. for C₁₁H₁₀N₄O₂S: C 50.32, H 3.84, N 21.34, S 12.21; found: C 49.97, H 3.67, N 21.06, S 12.49; $\nu_{\max}$ 3522 (N-H), 2120 (NH⁺), 1624, 1592, 1596, 1498 (C=N, C=C, N-H), 1298, 1158 (S=O) cm^{-1} ; δ (DMSO- d_6) 2.3 (s, 1H, 7-CH₃), 7.1–7.6 (bm, 4H, H phenyl + 4-H imidazole), 8.0 (s, 1H, 5-H imidazole), 9.15 (s, 1H, 2-H imidazole).

Acknowledgements

This study was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium) to which B. Pirotte is Senior Research associate. The assistance of M. L. Pirard, D. Dewalque and P. Neven is gratefully acknowledged.

References

1. Staab H. A., Walther G., *Ann.*, **1962**, 657, 98.
2. Harpp D. N., *Can. J. Chem.*, **1985**, 63, 951.
3. Weller H. N., Miller A., Moquin R., Dickinson K., Hedberg A., Moreland S., Cohen R., Delaney C., Skwish S., Williams S., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2, 1115.
4. Raffa L., Di Bella M., Melegari M., Vampa G., *Il Farmaco*, **1962**, 18, 331.
5. Pirotte B., de Tullio P., Lebrun P., Antoine M. H., Fontaine J., Masereel B., Schynts M., Dupont L., Herchuelz A., Delarge J., *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 3211.
6. Di Bella M., Ferrari P., Pizzirani V., Parenti C., Raffa L., *Il Farmaco*, **1978**, 27, 990.
7. de Tullio P., Pirotte B., Lebrun P., Fontaine J., Dupont L., Antoine M. H., Ouedraogo R., Khelili S., Magetto C., Masereel B., Diouf O., Podona T., Delarge J., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 937.
8. Antoine M.H., Pirotte B., Hermann M., de Tullio P., Delarge J., Herchuelz A., Lebrun P., *Experientia*, **1994**, 50, 830.
9. de Tullio P., Pirotte B., Neven P., Masereel B., Dewalque D., Diouf O., Podona T., Caignard D., Renard P., Delarge J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1997**, 49, 463.
10. Diouf O., Pirotte B., Podona T., de Tullio P., Masereel B., Delarge J., Morain P., Lepagnol J., *J. Pharm. Bel.*, **1995**, 51, 20.
11. Wollweber H., Horstmann H., Stoepel K., Garthoff B., Puls W., Krause H.P., Thomas G., *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.*, **1981**, 31, 279.
12. Edwards G., Weston A.H., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1993**, 33, 597.
13. Di Bella M., Rinaldi M., Fabio U., Manicardi G., *Il Farmaco*, **1972**, 27, 990.
14. de Tullio P., Pirotte B., Dupont L., Masereel B., Laeckmann D., Podona T., Diouf O., Lebrun P., Delarge J., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 3221.
15. Girard Y., Atkinson J.G., Rokach J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1979**, 1043.
16. Fischer P., *Ber.*, **1892**, 24, 3790.

Annexe 2

Synthesis and Biological Effects of New 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin-secreting Cells

F. SOMERS, P. DE TULLIO, S. BOVERIE, J. M. DOGNÉ, X. DE LEVAL, M. -H. ANTOINE*, P. LEBRUN* AND B. PIROTTE

Department of Medicinal Chemistry, Université de Liège, 1 Avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège and

**Department of Pharmacology, Université Libre de Bruxelles, 808 route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium*

Abstract

3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides with nitro, amino or acetylamino groups in the 7-position have been synthesized in an attempt to discover new tissue-selective K_{ATP} -channel openers.

The compounds were tested as putative pancreatic β -cells K_{ATP} -channel openers by measuring their inhibitory activity on the insulin releasing process. The influence of the substituent in the 7-position on the acidic character (pK_a) and on biological activity is discussed.

The nitrobenzene derivatives were biologically active, but less so than the un-derivatized parent pyridothiadiazine dioxides.

Potassium channels, proteinic trans-membrane structures involved in the movement of potassium ions, are crucially important in controlling cell membrane potential (Cook 1988). Among these, ATP-sensitive potassium channels (or K_{ATP} channels) have been the focus of intensive research in the last decade. They have been identified in a large variety of cells, for example cardiac cells (Noma 1983), pancreatic β -cells (Cook & Hales 1984), skeletal and smooth muscle cells (Standen et al 1989; Allard & Lazdunski 1993) and central neurons (Bernardi et al 1988). Depending on their location, K_{ATP} channels are involved in important physiological processes. In pancreatic β -cells, they have been shown to mediate glucose-induced insulin secretion (Henquin 1990; Lebrun 1993) and in smooth muscle cells they control muscle tone and contractility (Cook & Quast 1990; O'Donnell & Owen 1994; Quayle et al 1997).

Hypoglycaemic sulphonylureas such as tolbutamide or glibenclamide are known to be K_{ATP} -channel blockers (Gylfe et al 1984; Schmid-Antomarchi et al 1987; Boyd 1988). In contrast, compounds such as diazoxide, cromakalim, pinacidil and nicorandil are regarded as K_{ATP} -channel openers (Lebrun et al 1988, 1989; Hamilton & Weston 1989; Antoine et al 1992; Longman & Hamilton 1992).

Correspondence: Fabian Somers, University of Liège, Department of Medicinal Chemistry, 1 Avenue de l'Hôpital, tour 4 (+5), B-4000 Liège, Belgium

Pinacidil and cromakalim have greater activity on smooth muscle cells (relaxation) than on pancreatic β -cells (inhibition of insulin release). Diazoxide, however, is equipotent on both tissues.

We previously synthesized 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides, with different aminoalkyl side-chains in the 3-position (Pirotte et al 1993, 1994; de Tullio et al 1996; Lebrun et al 1996), which can be regarded as hybrid compounds between diazoxide and pinacidil (Figure 1). Pharmacological investigation has recently shown that compounds such as BPDZ 42 (3-(2'-butylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide) and BPDZ 44 (3-(3'-methyl-2'-butylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide) have the pharmacological profiles of K_{ATP} -channel openers (Pirotte et al 1994; Khelili et al 1999). In contrast with diazoxide, which is devoid of tissue selectivity, these two pyridothiadiazine dioxides seemed to be more active on endocrine pancreatic tissue (inhibition of insulin release) than on vascular tissue.

To discover new tissue-selective K_{ATP} -channel openers, we have synthesized and characterized the biological effects of new 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides bearing a nitro group in the 7-position and different short and branched aminoalkyl side chains in the 3-position (Figure 1). Such compounds are expected to be good analogues of the pyridothiadiazine dioxides, because a

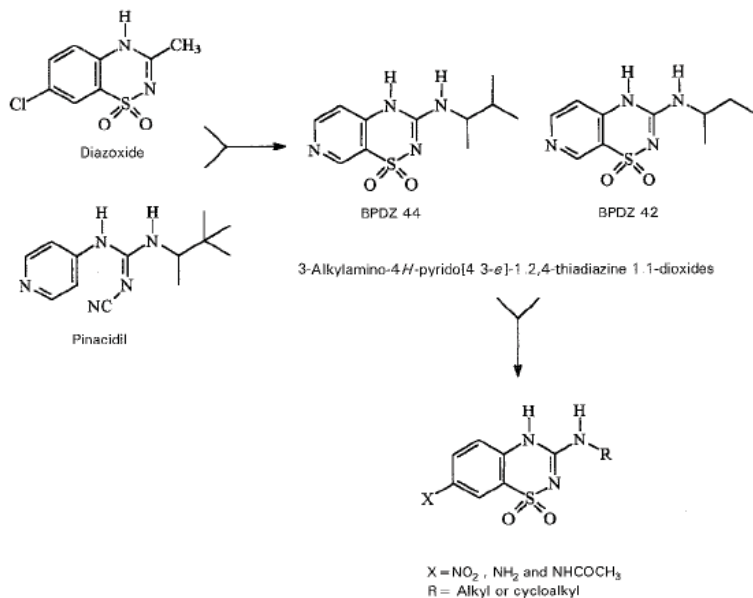


Figure 1. Diazoxide, pinacidil, 3-alkylamino-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides and 7-nitro-, 7-amino-, 7-acetamido-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides related to BPDZ 42 or BPDZ 44

benzene ring with a nitro group is usually considered to be a classical isostere of the pyridinic ring. Reduction of the nitro group to the amino group, and subsequent acetylation, have also been performed to give the 7-amino- and 7-acetamido-substituted derivatives.

Materials and Methods

Chemistry

Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FT spectrophotometer. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AW-80 (80 MHz) using d₆-DMSO as solvent. Chemical shifts (δ ppm) are relative to hexamethyldisiloxane, which was used as internal reference. NH signals appeared as broad singlets exchangeable with D₂O. In the data below, s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, b = broad.

2-Chloro-5-nitrobenzenesulphonamide

Glacial acetic acid (160 mL) was saturated with gaseous sulphur dioxide and then mixed with an aqueous solution of cupric chloride (7 g/20 mL).

A solution of 2-chloro-5-nitroaniline (10 g) in glacial acetic acid (160 mL) and 12 M HCl (40 mL) was cooled to -5°C and a solution of sodium nitrite (4 g) in water (20 mL) was then added dropwise, with stirring, to the cold solution.

The diazonium salt formed was added, with stirring, to the cold solution of sulphur dioxide in acetic acid prepared previously. After 10 min the mixture was poured on ice (200 g). The resulting precipitate was collected by filtration, washed with water and suspended in 10% aqueous ammonia (200 mL). After stirring at room temperature for 30 min the mixture was concentrated to half the volume by evaporation under reduced pressure. The resulting suspension was adjusted to pH 1 with 12 M HCl. The insoluble material was collected by filtration, washed with water and crystallized from methanol-water (yield 8.8 g; mp 174–176°C).

2-Amino-5-nitrobenzenesulphonamide

A suspension of 2-chloro-5-nitrobenzenesulphonamide (8 g) in concentrated aqueous ammonia (80 mL) was saturated with ammonia just before its introduction to a sealed vessel. It was then placed in an autoclave and heated at 120°C for 5 h. The reaction mixture was then concentrated to half its volume by evaporation under reduced pressure and the resulting precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (yield 6.1 g; mp 202–204°C).

3-(1H-Imidazol-1-yl)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide imidazolium salt

Thiocarbonyldiimidazole (14 g) was added to a hot solution of 2-amino-5-nitrobenzenesulphonamide (5 g) in dioxane (150 mL) and the mixture was heated under reflux for 5 h. After cooling, the precipitate of the title compound was collected by filtration, washed with dioxane and dried (yield 5.7 g; mp 246–248°C).

General procedure for preparation of 3-alkylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides

A mixture of 3-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (0.5 g) and the appropriate alkylamine (5 mL) was heated in a sealed vessel at 150°C for 5 to 6 h until completion of the reaction as monitored by thin-layer chromatography (TLC). Excess amine was removed by distillation under reduced pressure and the oily residue was dispersed in water. NaOH (2.5 M) was added to the suspension until dissolution was complete. The resulting solution was treated with charcoal, filtered, and the filtrate was adjusted to pH 5–6 with 6 M HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and recrystallized from methanol–water (yield 60–70%).

3-Isopropylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (5)

mp 311–313°C. IR (KBr): 3363, 3221, 2980, 1657, 1646, 1615, 1601, 1572, 1532, 1494, 1339, 1284, 1267, 1155, 1106 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 1.10 (d, 6H, 2 $\times$ CH₃), 3.90 (m, 1H, NH-CH), 7.35 (m, 2H, 5-H + NH-CH), 8.35 (m, 2H, 6-H + 8-H), 10.90 (bs, 1H, NH).

3-(2-Butylamino)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (6)

mp 287–288°C. IR (KBr): 3354, 3223, 3111, 2969, 2935, 2877, 2853, 2361, 1601, 1573, 1529, 1489, 1452, 1401, 1383, 1280, 1245, 1178, 1130, 1104,

1056 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 0.80 (t, 3H, CH₂-CH₃), 1.10 (d, 3H, CH-CH₃), 1.50 (m, 2H, CH₂-CH₃), 3.70 (m, 1H, NH-CH), 7.30 (m, 2H, 5-H + NH-CH), 8.30 (m, 2H, 6-H + 8-H), 10.90 (bs, 1H, NH).

3-(3-Methyl-2-butylamino)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7)

mp 308–311°C. IR (KBr): 3294, 3199, 3101, 2965, 1636, 1600, 1566, 1538, 1497, 1485, 1349, 1252, 1166, 1153, 1107 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 0.80 (d, 6H, CH-CH₃), 1.10 (d, 3H, CH-CH₃), 1.70 (m, 1H, CH-CH₃), 3.65 (m, 1H, NH-CH), 7.20 (m, 2H, 5-H + NH-CH), 8.30 (m, 2H, 6-H + 8-H), 10.80 (bs, 1H, NH).

3-(Cyclopropylmethylamino)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (8)

mp 276–278°C. IR (KBr): 3290, 3193, 3104, 2994, 1635, 1603, 1564, 1539, 1499, 1486, 1347, 1276, 1251, 1153, 1111 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 0.50–1.30 (bm, 5H, 2 $\times$ CH₂ + CH), 3.10 (t, 2H, NH-CH₂-CH), 7.35 (m, 2H, 5-H + NH-CH), 8.30 (m, 2H, 6-H + 8-H), 11.15 (bs, 1H, NH).

7-Nitro-3-propylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9)

mp 268–270°C. IR (KBr): 3307, 3192, 3166, 3086, 3018, 2971, 2882, 1642, 1600, 1561, 1533, 1498, 1486, 1399, 1339, 1280, 1245, 1167, 1111 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 0.85 (t, 3H, CH₃-CH₂), 1.50 (m, 2H, CH₂-CH₃), 3.10 (m, 2H, NH-CH₂), 7.35 (m, 2H, 5-H + NH-CH), 8.30 (m, 2H, 6-H + 8-H), 11.10 (bs, 1H, NH).

3-Cyclobutylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (10)

mp 298–301°C. IR (KBr): 3305, 3192, 3087, 2998, 1640, 1598, 1567, 1532, 1497, 1484, 1400, 1341, 1283, 1249, 1163, 1113 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 1.30–2.60 (bm, 6H, 3 $\times$ CH₂), 4.20 (m, 1H, NH-CH), 7.35 (d, 1H, 5-H), 7.70 (bd, 1H, NH-CH), 8.30 (m, 2H, 6-H + 8-H), 10.95 (bs, 1H, NH).

3-Alkylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (11)

mp 233–236°C. IR (KBr): 3308, 3186, 3092, 2992, 1636, 1599, 1562, 1533, 1497, 1484, 1426, 1397, 1340, 1280, 1246, 1162, 1112 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 3.90 (bt, 2H, NH-CH₂), 5.15 (m, 2H, CH=CH₂), 5.60–6.10 (m, 1H,

$\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.30 (d, 1H, 5-H), 7.60 (m, 1H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 8.30 (m, 2H, 6-H + 8-H), 11.20 (bs, 1H, NH).

7-Amino-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (12)

Pd/C (10%, 0.06 g) was added to a solution of 3-isopropylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **5** (0.6 g) in hot methanol (25 mL) and the mixture was treated with hydrogen gas under pressure (4 bar) for 1 h at 40°C. Insoluble material was removed by filtration and the filtrate was concentrated to dryness by evaporation under reduced pressure. The residue of the crude title compound was recrystallized from methanol–water (yield 0.45 g).

mp 278–283°C. IR (KBr): 3455, 3363, 3216, 2972, 1618, 1575, 1510, 1298, 1255, 1174, 1146, 1113 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 1.10 (d, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 3.85 (m, 1H, $\text{NH}-\text{CH}$), 5.15 (bs, 2H, NH_2), 6.50–6.95 (bm, 4H, 5-H + 6-H + 8-H + $\text{NH}-\text{CH}$), 9.75 (bs, 1H, NH).

7-Acetylamino-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (13)

A mixture of 3-isopropylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **5** (0.18 g) and acetic anhydride (0.6 mL) in dioxane (2 mL) was stirred at room temperature. The mixture was then mixed with water (5 mL) and stirred for 1 h. The solvents were removed by distillation under reduced pressure and the residue of the crude title compound was recrystallized from methanol–water (yield 0.16 g).

mp 260–262°C. IR (KBr): 3353, 3316, 3240, 3101, 3069, 2974, 1672, 1624, 1608, 1581, 1546,

1497, 1467, 1391, 1279, 1159, 1142, 1123, 1104 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 1.10 (d, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.00 (s, 3H, COCH_3), 3.90 (m, 1H, $\text{NH}-\text{CH}$), 6.85 (bd, 1H, $\text{NH}-\text{CH}$), 7.05 (d, 1H, 5-H), 7.60 (bd, 1H, 6-H), 8.00 (bs, 1H, 8-H), 10.00 (bs, 1H, CONH), 10.10 (bs, 1H, NH).

Results and Discussion

Chemistry

2-Amino-5-nitrobenzenesulphonamide, a key intermediate in the preparation of the final products, was obtained in a two-step reaction starting from 2-chloro-5-nitroaniline (**1**) (Figure 2). The aniline (**1**) was transformed by diazotization into the corresponding 2-chloro-5-nitrobenzenesulphonamide (**2**) and subsequent substitution of the chlorine atom in the 2-position, with concentrated ammonia under pressure at 150°C, led to the key intermediate (**3**). The synthesis of the 3-(1H-imidazol-1-yl)-substituted intermediate (**4**) was achieved by reaction of 2-amino-5-nitrobenzenesulphonamide (**3**) with excess 1,1-thiocarbonyldiimidazole in dioxane.

The 3-alkylamino-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**5–11**) were obtained by reaction of 3-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**4**) with excess of the appropriate alkylamine (Figure 2). The reaction occurs with good yields in a hermetically closed autoclave heated at 150°C for 4 to 6 h.

The 7-amino-substituted derivative (**12**) was prepared from **5** by reduction of the nitro function under hydrogen gas, with palladium on activated carbon as catalyst (Figure 3). Subsequent acetylation of **12** with acetic anhydride led to the corre-

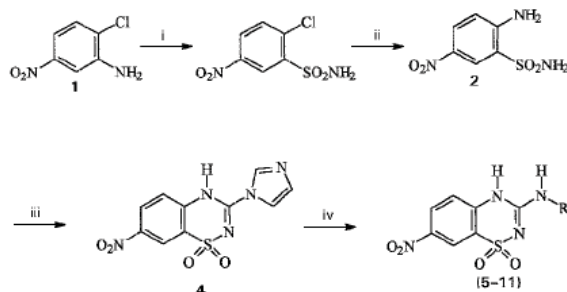


Figure 2. Synthesis of 3-aminoalkyl-7-nitro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. i. NaNO_2 , HCl; CH_3COOH , SO_2 , CuCl_2 , NH_2OH dil.; ii. NH_4OH conc., 150°C; iii. 1,1-thiocarbonyldiimidazole; dioxane; iv. RNH_2 .

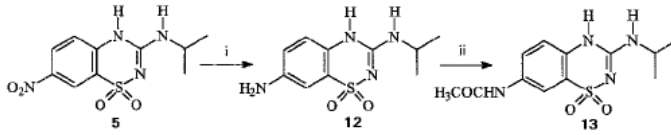


Figure 3 Synthesis of the 7-amino- and 7-acetamido-substituted derivatives i H_2 , 4 bar, palladium; ii $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$

sponding 7-acetamido-substituted compound (**13**) (Figure 3).

Pharmacological evaluation

The different compounds reported in Table 1 were tested as inhibitors of insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of an insulinotropic glucose concentration (16.7 mM). The drugs were tested at a concentration of $50 \mu\text{M}$ and the most active compounds were also examined at $10 \mu\text{M}$. Results were compared with those obtained by use of three reference drugs—pinacidil, diazoxide and BPDZ 44 (a pyridothiadiazine dioxide).

It is apparent from Table 1 that with the exception of compound **5** the activity of the newly synthesized 3-alkylamino-7-nitro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides on pancreatic β -cells was moderate or poor. Two compounds, **6** and **10**, were more potent than pinacidil but less potent than

diazoxide and BPDZ 44. Comparison of the 7-nitro-substituted derivative (**5**) with its 7-amino- and 7-acetamido-substituted counterparts (**12** and **13**) showed the biological activity of **12** and **13** to be substantially lower. Thus, reduction of the nitro group does not seem to be a suitable means of maintaining or increasing their activity as inhibitors of insulin release.

The most potent compound of the series, the 3-isopropylamino-7-nitro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivative (**5**), markedly inhibited insulin release. At a concentration of $10 \mu\text{M}$, however, the drug was less potent than BPDZ 44.

It can be concluded that an isopropylamino side-chain in the 3-position of the benzothiadiazine ring constitutes, in this series, one of the best choices of lateral substituent.

Determination of pK_a

The hydrogen atom in the N-4 position of the thiadiazine ring is expected to be labile and can be

Table 1 Effects of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides, diazoxide, pinacidil and BPDZ 44 on insulin release from pancreatic β -cells, and pK_a values of selected compounds

Compound	X	R	% RIS $\pm$ s.e.m. (n)		pK_a
			50 μM	10 μM	
5	NO_2	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	4.8 ± 0.6 (14)	64.0 ± 3.8 (37)	7.91
6	NO_2	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	63.3 ± 3.8 (18)	ND	ND
7	NO_2	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	90.4 ± 5.2 (16)	ND	ND
8	NO_2	CH_2 -cyclopropyl	95.7 ± 6.0 (16)	ND	ND
9	NO_2	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	88.9 ± 4.6 (16)	ND	ND
10	NO_2	Cyclobutyl	59.6 ± 4.9 (13)	ND	ND
11	NO_2	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	82.7 ± 5.8 (15)	ND	ND
12	NH_2	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	85.8 ± 4.3 (15)	ND	10.49
13	NHCOCH_3	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	89.3 ± 5.8 (16)	ND	9.80
Diazoxide	—	—	28.8 ± 2.5 (21) ^a	70.0 ± 3.6 (22) ^a	8.62 ^b
Pinacidil	—	—	92.7 ± 8.0 (14) ^a	99.3 ± 8.9 (13) ^a	ND
BPDZ 44	—	—	7.1 ± 0.6 (14) ^a	26.7 ± 1.8 (21) ^a	≈ 8.1

RIS is the percentage residual insulin secretion from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose. ND, not determined. ^aPublished results.

removed by aqueous alkali. The pK_a of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides is modulated by the nature and position of the substituent on the benzene ring. Electron-withdrawing groups should increase acidity whereas electron-donor groups should reduce it.

The pK_a values of compounds **5**, **12** and **13** were determined by UV spectrophotometry, using the Debye-Hückel (Albert & Serjeant 1971) relationship linking pK_a with the experimental optical density. The results are reported in Table 1. As expected, the pK_a values correlated directly with the electron-withdrawing character of the substituent in the 7-position. The 7-nitro-substituted derivative (**5**), representative of the nitrobenzene isosteres, was found to be more acidic (pK_a 7.91) than diazoxide (pK_a 8.62). Compared with 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides (pK_a values $\approx$ 8.1) (de Tullio et al 1996), at physiological pH (7.4) the nitrobenzene isosteres (**5**–**11**) are probably present in solution to a greater extent as ionic species. Such species are expected to be ineffective because it can be predicted that only the non-ionic form of the drug should be able to interact favourably with the receptor binding site (de Tullio et al 1996). Thus, except for the 3-isopropylamino-substituted compound (**5**), the poor biological activity of the 3-alkylamino-7-nitro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**6**–**11**) could be explained, at least in part, by their more pronounced acidity than their pyridothiadiazine isosteres.

The 7-amino-substituted compound (**12**) had the highest pK_a (10.49). Thus, reduction of the nitro group to the amino electron-donor group reduces the acidic character of the molecule. Finally, the 7-acetamido-substituted derivative (**13**) with intermediate electron-withdrawing character was found to have an intermediate pK_a (9.80). Although these two compounds (**12**, **13**) would exist in solution mainly as non-ionized species, they are poorly active in contrast with their 7-nitro-substituted counterpart (**5**). Thus **12** and **13** are not acceptable bioisosteres of the active pyridothiadiazines.

Conclusions

Some of the newly synthesized 3-alkylamino-7-nitro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides inhibit insulin release and could thus be considered as putative K_{ATP} -channel openers. Their biological activity is modulated by the nature of the amino-alkyl side chain. Short branched chains result in the maximum effect (isopropyl > cyclobutyl $\approx$ 2-butyl). Biological activity is also affected by the nature of the substituent in the 7-position. Indeed,

an electron-withdrawing group seems to promote activity.

In conclusion, although the nitrobenzene analogues of the active 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides are acceptable bioisosteres, their biological activity on β -cells was less pronounced.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium) of which P. Lebrun is Director of Research, and B. Pirotte and P. de Tullio are Senior Research associates. The assistance of Mrs P. Neven, D. Dewalque, M.-L. Pirard, J. Sergeoris and M. Hermann is gratefully acknowledged.

References

- Albert, A., Serjeant, E. P. (1971) Determination of ionization constants by spectrometry. In: *The Determination of Ionization Constants* Chapman & Hall, London, 44–64.
- Allard, B., Lazdunski, M. (1993) Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 236: 419–426.
- Antoine, M.-H., Berkenboom, G., Fang, Z.-Y., Fontaine, J., Hercheulz, A., Lebrun, P. (1992) Mechanical and ionic response of rat aorta to diazoxide. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 299–306.
- Bernardi, H., Fosset, M., Lazdunski, M. (1988) Purification and affinity labelling of brain (^3H) glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9816–9820.
- Boyd, A. E. (1988) Sulfonylurea receptors, ion channels and fruit flies. *Diabetes* 37: 847–850.
- Cook, D. L., Hales, C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311: 271–273.
- Cook, N. S. (1988) The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 21–28.
- Cook, N. S., Quast, U. (1990) Potassium channels pharmacology. In: Cook, N. S. (ed) *Potassium Channels, Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential*, Ellis Horwood, Chichester, UK, pp 181–255.
- de Tullio, P., Pirotte, B., Lebrun, P., Fontaine, J., Dupont, L., Antoine, M. H., Ouedraogo, R., Khelili, S., Maggietto, C., Masereel, B., Diouf, O., Podona, T., Delage, J. (1996) 3- and 4-Substituted 4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium-channel openers: synthesis, pharmacological evaluation and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 39: 937–947.
- Gylfe, E., Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I. B. (1984) Interaction of sulfonylureas with the pancreatic β -cell. *Experientia* 40: 1126–1135.
- Hamilton, T. C., Weston, A. H. (1989) Cromakalim, nicorandil and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* 20: 1–9.
- Henquin, J. C. (1990) Les mécanismes cellulaires du contrôle de la sécrétion d'insuline. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 98: A61–A81.

- Khelili, S., de Tullio, P., Antoine, M.-H., Ouedraogo, R., Dupont, I., Fontaine, J., Felekidis, A., Leclerc, G., Delarge, J., Pirotte, B. (1999) Preparation and pharmacological evaluation of the *R* and *S* enantiomers of 3-(2'-butylamino)-4*H*- and 3-(3'-methyl-2'-butylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue-selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 1513-1520.
- Lebrun, P. (1993) Flux cationiques dans les cellules B des îlots pancréatiques et investigations pharmacologiques. *Rev. Franç. Endocrinol. Clin.* 34: 241-254.
- Lebrun, P., Devreux, V., Hermann, M., Herchuelz, A. (1988) Pinacidil inhibits insulin release by increasing K⁺ outflow from pancreatic β -cells. *Eur. J. Pharmacol.* 156: 283-286.
- Lebrun, P., Devreux, V., Hermann, M., Herchuelz, A. (1989) Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 1011-1018.
- Lebrun, P., Antoine, M.-H., Ouedraogo, G., Dunne, M., Kane, C., Hermann, M., Herchuelz, A., Masereel, B., Delarge, J., de Tullio, P., Pirotte, B. (1996) Activation of ATP-dependent K⁺ channels and inhibition of insulin release: effect of BPDZ 62. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 156-162.
- Longman, S. D., Hamilton, T. C. (1992) Potassium channel activator drugs: mechanism of action, pharmacological properties, and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 12: 73-148.
- Noma, A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148.
- O'Donnell, M. E., Owen, N. E. (1994) Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiol. Rev.* 74: 683-721.
- Pirotte, B., de Tullio, P., Lebrun, P., Antoine, M. H., Fontaine, J., Masereel, B., Schynts, M., Dupont, I., Herchuelz, A., Delarge, J. (1993) 3-(Alkylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic β -cells: a new class of potassium channel openers? *J. Med. Chem.* 36: 3211-3213.
- Pirotte, B., Antoine, M. H., de Tullio, P., Hermann, M., Herchuelz, A., Delarge, J., Lebrun, P. (1994) A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1381-1386.
- Quayle, J. M., Nelson, M. T., Standen, N. B. (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 77: 1165-1232.
- Schmid-Antomarchi, H., de Weille, J., Fosset, M., Lazdunski, M. (1987) The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 262: 15840-15844.
- Standen, N. B., Quayle, J. M., Davies, N. W., Brayden, J. E., Huang, Y., Nelson, M. T. (1989) Hyperpolarising vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245: 177-180.

Annexe 3

Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium-channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73): introduction of heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring

S. Boverie, M.-H. Antoine, P. de Tullio, F. Somers, B. Becker, S. Sebillie, P. Lebrun and B. Pirotte

Abstract

7-Chloro-3-pyridyl(alkyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and 3-alkylamino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides containing one or more heteroatoms on the side chain in the 3 position have been synthesized in an attempt to discover new potent K_{ATP} -channel openers. The compounds were tested as putative pancreatic B-cells K_{ATP} -channel openers by measuring their inhibitory activity on the insulin releasing process. The influence on the biological activity of the nature of the side chain in the 3 position is discussed.

Laboratoire de Chimie
Pharmaceutique, Université de
Liège, 1 avenue de l'hôpital
B-4000 Liège, Belgium

S. Boverie, P. de Tullio,
F. Somers, S. Sebillie, B. Pirotte

Laboratoire de
Pharmacodynamie et de
Thérapeutique, Université Libre
de Bruxelles, 808, route de
Lennik, B-1070 Bruxelles,
Belgium

M.-H. Antoine, B. Becker,
P. Lebrun

Correspondence: S. Boverie,
Laboratoire de Chimie
Pharmaceutique, Université de
Liège, 1, avenue de l'hôpital,
B-4000 Liège, Belgium.

**Acknowledgements and
Funding:** This study was
supported by grants from the
National Fund for Scientific
Research (F.N.R.S. Belgium) from
which P. Lebrun is Research
Director and P. de Tullio and B.
Pirotte Senior Research
Associates. B. Becker was
supported by a grant-in-aid
from the Université Libre de
Bruxelles. The assistance of M.
Hermann, D. Dewalque, M. L.
Pirard and J. Sengois is
gratefully acknowledged

Introduction

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) play a crucial role in controlling cell membrane potential (Cook 1988; Bryan & Aguilar-Bryan 1997) and many cell types link membrane excitability to their metabolic state via K_{ATP} channels. These channels have been characterized in numerous cell types such as cardiac cells (Noma 1983), pancreatic B-cells (Cook & Hales 1984), skeletal muscle cells (Allard & Lazdunski 1993), smooth muscle cells (Standen et al 1989; Quayle et al 1997) and central neurons (Bernardi et al 1988). Over the past few years there has been an increasing interest in drugs (diazoxide, pinacidil, cromakalim) involved in the activation of K_{ATP} channels. Such compounds, named potassium-channel openers, mainly exert their biological effects by promoting membrane hyperpolarisation (Lebrun et al 1988, 1989; Hamilton & Weston 1989). Thus, potassium-channel openers are able to interfere with several physiological processes such as insulin release from pancreatic B-cells (Lebrun et al 1992) and contractile activity from different smooth muscle cells (Cook & Quast 1990). Previous work performed in our laboratories led to the development of original 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides. These compounds could be regarded as hybrid compounds between diazoxide and pinacidil. In this series, BPDZ 44 (3-(3'-methyl-2'-butylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide) was found to be much more potent than diazoxide at reducing the glucose-induced insulin release

from rat pancreatic islets (Piroette et al 1993, 1994; de Tullio et al 1996). To discover new K_{ATP} -channel openers, we have prepared and tested benzenic counterparts of BPDZ 44 series (Figure 1). From those, it appeared that BPDZ 73 (7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) was the most potent pancreatic K_{ATP} -channel activator reported to date (Lebrun et al 2000). In the search for original benzothiadiazine dioxides acting as potassium-channel openers, we have now synthesized new 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides bearing a chlorine atom in the 7 position and different pyridyl(alkyl)amino- or chemically diverse heteroatom(s)-containing alkylamino- side chains in the 3 position. These original compounds were examined as potassium-channel openers on rat pancreatic islets.

Materials and Methods

Chemistry

Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FT spectrophotometer. The ^1H NMR spectra were taken on a Bruker AW-80 (80 MHz) instrument in $DMSO-d_6$ with HMDS (hexamethyldisiloxane) as internal standard; chemical shifts are reported in δ values (ppm) relative to internal HMDS. In the data below, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, b = broad. All reactions were routinely checked by TLC on silica gel Merck 60F 254.

7-Chloro-3-(2',2',2'-trifluoroethyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7)

A mixture of 7-chloro-3-(methylsulfanyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (Di Bella et al 1972) (0.5 g, 2.02 mmol) and 5 mL of 2,2,2-trifluoroethylamine was heated in a sealed vessel at 160°C for 8 h. The excess of 2,2,2-trifluoroethylamine was removed under reduced pressure and the residue was dispersed in water. NaOH (2.5 M) was added to the suspension until dissolution was complete. The resulting solution was treated with charcoal, filtered and the filtrate was adjusted to pH 3–4 with 6 M HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and recrystallized from methanol-water (50:50) (yield 60%). Mp 302–304°C. IR (KBr): 3283, 3186, 1627, 1582, 1483, 1265, 1161 cm^{-1} . ^1H NMR ($DMSO-d_6$, HMDS; δ ppm): 4.00 (q, 2H, $NHCH_2$), 7.20 (d, 1H, 5-*H*), 7.60 (d + s, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 11.00 (bs, 1H, NH).

3-(2-Aminoethyl)amino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (8)

A mixture of 7-chloro-3-(methylsulfanyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 5 mL of ethylenediamine was heated at 160°C until completion of the reaction as monitored by TLC. The excess of amine was removed by distillation under reduced pressure and the residue was dissolved in methanol and then supplemented with ether. The precipitate was collected by filtration and dissolved in 40 mL of hot water. The solution was treated with charcoal. After filtration, the solution was concentrated by distillation under reduced pressure and cooled at 4°C for 4 h. The title compound was collected by filtration, washed with cold water and dried (yield 77%). Mp 200–204°C. IR (KBr): 3498, 1637, 1560, 1481, 1264, 1163 cm^{-1} . ^1H NMR ($DMSO-d_6$, HMDS; δ ppm): 2.70 (t, 2H, $CH_2CH_2NH_2$), 3.20 (t, 2H, $NHCH_2CH_2NH_2$), 5.25 (b, 6H, $2 \times NH + H_2O + NH_2$), 6.95 (d, 1H, 5-*H*), 7.30 (d, 1H, 6-*H*), 7.45 (s, 1H, 8-*H*).

7-Chloro-3-(2-formylaminoethyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (15)

Formic acid (1 mL) and acetic anhydride (2 mL) were heated at 50°C for 20 min. After cooling, 3-(2-aminoethyl)amino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (8) (0.5 g, 1.8 mmol) was added to the solution and stirred for 2 h at room temperature. After addition of water (20 mL) and stirring for 15 min, the crude precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (yield 89%). Mp 245–247°C. IR (KBr): 3374, 1662, 1646, 1571, 1485, 1274, 1178 cm^{-1} . ^1H NMR ($DMSO-d_6$, HMDS; δ ppm): 3.10–3.60 (b, 4H, $NH(CH_2)_2$), 7.25 (d, 2H, 5-*H* + $NHCH_2CH_2$), 7.60 (dd, 1H, 6-*H*), 7.90 (d, 1H, 8-*H*), 8.05 (s, 1H, $NHCOH$), 10.90 (bs, 1H, NH).

7-Chloro-3-(2-acetylaminoethyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (16)

The title compound was obtained from 3-(2-aminoethyl)amino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (8) (0.5 g, 1.8 mmol) and acetic anhydride (3 mL) by following the experimental conditions described for 7-chloro-3-(2-formylaminoethyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (15) (yield 87%). Mp 295–297°C. IR (KBr): 3333, 1663, 1625, 1576, 1483, 1273, 1180 cm^{-1} . ^1H NMR ($DMSO-d_6$, HMDS; δ ppm): 1.70 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 3.05–3.40 (b, 4H, $NH(CH_2)_2NH$), 7.15 (d, 2H, 5-*H* + $NHCH_2CH_2$), 7.50 (dd, 1H, 6-*H*), 7.60 (d, 1H, 8-*H*), 7.90 (bs, 1H, $NHCOCH_3$), 10.80 (s, 1H, NH).

7-Chloro-3-(pyrid-2-yl)methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (11)

A mixture of 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 4 mL of (pyrid-2-yl)methylamine was heated at 140°C for a few hours. After addition of 20 mL of water, the suspension was adjusted to pH 4 with formic acid and the resulting precipitate was collected by filtration, washed and dried. The precipitate was dissolved in hot methanol and the solution was discoloured with charcoal, filtered and cooled. The title compound, which precipitated, was collected by filtration, washed and dried (yield 45%). Mp 244–262°C (KBr): 3317, 1634, 1530, 1481, 1265, 1163 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 4.50 (d, 2H, NHCH_2), 6.95–7.80 (m, 7H, NHCH_2 , 5-*H*, 6-*H*, 8-*H* benzene + 3-*H*, 4-*H*, 5-*H* pyridine), 8.50 (d, 1H, 6-*H* pyridine), 10.95 (bs, 1H, *NH*).

7-Chloro-3-(pyrid-3-yl)methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (12)

The title compound was obtained from 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 4 mL of (pyrid-3-yl)methylamine by following the experimental conditions described for the synthesis of 7-chloro-3-(pyrid-2-yl)methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (11) (yield 49%). Mp 260–266°C. IR (KBr): 3362, 1647, 1547, 1478, 1288, 1163 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 4.40 (bs, 2H, NHCH_2), 7.00–7.80 (m, 6H, NHCH_2 + 5-*H*, 6-*H*, 8-*H* benzene + 3-*H*, 4-*H* pyridine), 8.40 (d, 1H, 6-*H* pyridine), 8.50 (bs, 1H, 2-*H* pyridine).

7-Chloro-3-(pyrid-4-yl)methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (13)

The title compound was obtained from 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 4 mL of (pyrid-4-yl)methylamine by following the experimental conditions described for the synthesis of 7-chloro-3-(pyrid-2-yl)methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (11) (yield 40%). Mp 274–279°C. IR (KBr): 3435, 3293, 1627, 1571, 1474, 1250, 1159 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 4.40 (bd, 2H, NHCH_2), 7.00–7.80 (m, 6H, NHCH_2 + 5-*H*, 6-*H*, 8-*H* benzene + 3-*H*, 5-*H* pyridine), 8.40 (d, 2H, 2-*H* + 6-*H* pyridine), 10.90 (bs, 1H, *NH*).

7-Chloro-3-[2-(pyrid-2-yl)ethyl]amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (14)

The title compound was obtained from 7-chloro-3-

(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 4 mL of 2-(pyrid-2-yl)-ethylamine by following the experimental conditions described for the synthesis of 7-chloro-3-(pyrid-2-yl)methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (11) (yield 51%). Mp 180–182°C. IR (KBr): 3507, 3363, 1637, 1587, 1476, 1266, 1168 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 2.80–3.70 (m, 6H, NHCH_2CH_2 + H_2O), 6.90–7.80 (m, 7H, NHCH_2 + 5-*H*, 6-*H*, 8-*H* benzene + 3-*H*, 4-*H*, 5-*H* pyridine), 8.45 (d, 1H, 6-*H* pyridine), 10.70 (bs, 1H, *NH*).

7-Chloro-3-[(*R,S*)-1'-methoxy-2'-propyl]amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9)

A mixture of 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 5 mL of (*R,S*)-1-methoxy-2-propylamine was heated at 150°C for a few hours. After addition of 20 mL of water, the suspension was adjusted to pH 9–10 with NaOH (5%). The resulting solution was treated with charcoal, filtered and the filtrate was adjusted to pH 2 with 6 M HCl. The precipitate was collected by filtration, washed and dried (yield 70%). Mp 150–153°C. IR (KBr): 3294, 1631, 1582, 1480, 1250, 1162 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 1.05 (d, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 3.00–3.40 (m, 5H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OCH}_3$ + OCH_3), 3.90 (m, 1H, NHCH), 6.95 (b, 1H, NHCH), 7.10 (d, 1H, 5-*H*), 7.50 (d + s, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.45 (s, 1H, *NH*).

7-Chloro-3-(pyrid-2-yl)amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (6)

A mixture of 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (5) (Wollweber et al 1981) (0.5 g, 1.96 mmol) and *o*-aminopyridine (0.5 g, 5.32 mmol) in 5 mL of 3-chlorotoluene was heated at 150°C. The precipitate was collected by filtration and dissolved in aqueous NaOH (5%). The solution was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 4 with 6 M HCl, and the precipitate of crude 6 was collected by filtration, washed with water and dried. Recrystallization occurred from hot methanol (yield 45%). Mp > 300°C. IR (KBr): 3285, 3216, 3087, 1631, 1570, 1538, 1460, 1286, 1163, 1107 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , HMDS; δ ppm): 7.10–8.00 (m, 7H, *NH* + 5-*H*, 6-*H*, 8-*H* benzene + 3-*H*, 4-*H*, 5-*H* pyridine), 8.40 (m, 1H, 6-*H* pyridine), 11.00 (b, 1H, *NH*).

7-Chloro-3-(2,2'-diethoxyethyl)amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (10)

A mixture of 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (4) (0.5 g, 2.02 mmol) and 5 mL of 2-aminoacetaldehyde diethyl acetal was heated

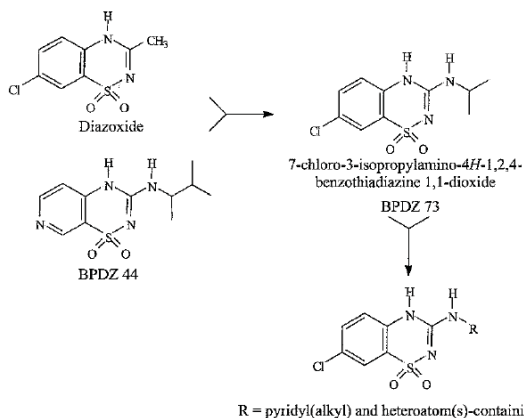


Figure 1 Diazoxide, BPDZ 44, BPDZ 73, 7-chloro-3-pyridyl(alkyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and 3-alkylamino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides containing one or more heteroatoms on the side chain in the 3 position

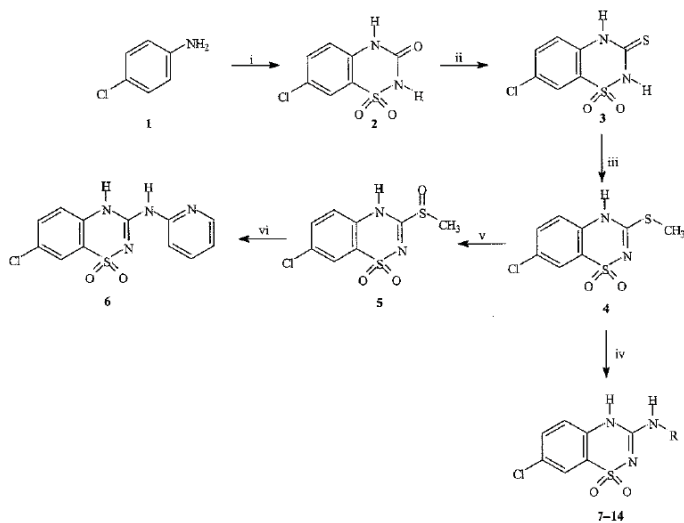


Figure 2 Synthesis of 7-chloro-3-pyridyl(alkyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (6, 11–14) and 3-alkylamino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides containing heteroatoms on the side chain (7–10). Reagents: i, ClSO₂NCO, AlCl₃; ii, P₂S₅, pyridine; iii, CH₃I, NaHCO₃, H₂O, CH₃OH; iv, NH₂R; v, Br₂, Na₂CO₃; vi, *o*-aminopyridine.

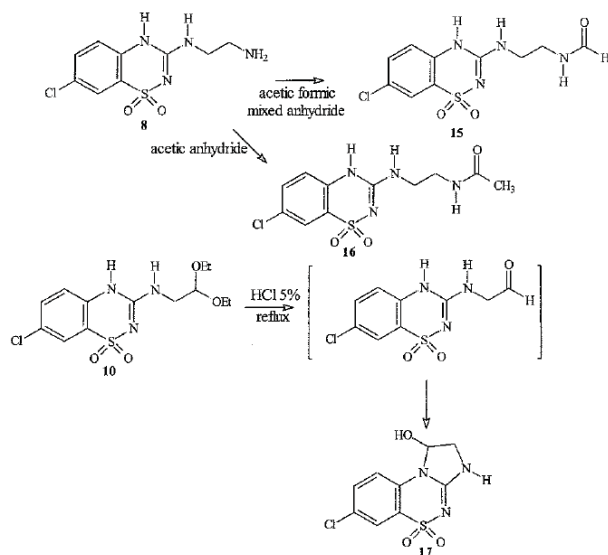


Figure 3 Synthesis of the 3-(2-formylaminoethyl)- (15), 3-(2-acetylaminooethyl)-7-chloro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (16) and 7-chloro-1-hydroxy-2,3-dihydro-1H-imidazo[2,1-c]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxide (17)

at 150°C for 40 min. After addition of 20 mL of water, the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (yield 75%). Mp 219–220°C. IR (KBr): 3367, 3194, 3092, 2978, 1627, 1611, 1585, 1570, 1486, 1251, 1169, 1135, 1105, 1066 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 1.05 (t, 6H, 2 x OCH₂CH₃), 3.25 (bm, 2H, NHCH₂CH), 3.55 (q, 4H, 2 x OCH₂CH₃), 4.55 (t, 1H, NHCH₂CH), 7.00 (b, 1H, NHCH₂CH), 7.10 (d, 1H, 5-H), 7.55 (d + s, 2H, 6-H, 8-H), 10.65 (b, 1H, NH).

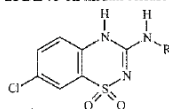
(R/S)-7-Chloro-1-hydroxy-2,3-dihydro-1H-imidazo[2,1-c]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxide (17). A mixture of 7-chloro-3-(2',2'-diethoxyethyl)amino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (10) (0.54 g, 1.97 mmol) and 10 mL 1 M HCl was heated under reflux for 45 min. The solution was concentrated under reduced pressure and the crude product which precipitated was collected by filtration, washed with water and dried. The compound was recrystallized from chloroform-methanol (70:30) (yield 48%). Mp 258°C (dec). IR (KBr): 3430, 1626, 1473, 1453, 1272, 1161, 1121,

1092 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDS; δ ppm): 3.30 (dd*, 1H, 4-H_a imidazole), 3.85 (dd, 1H, 4-H_b imidazole), 6.05 (dd*, 1H, 5-H imidazole), 7.10 (b, 1H, NH), 7.30 (d, 1H, 5-H), 7.60 (d + s, 2H, 6-H + 8-H), 8.60 (bs, 1H, OH). (*After addition of CF₃COOD).

Measurements of insulin release from incubated pancreatic islets

Pancreatic islets were isolated by the collagenase method from fed female Wistar rats, 180–220 g (Pirrotte et al 1993, de Tullio et al 1996, Lebrun et al 2000). Groups of 10 islets, each derived from the same batch of islets, were pre-incubated for 30 min at 37°C in 1 mL of a physiological salt medium containing (in mM) NaCl 115, KCl 5, CaCl₂ 2.56, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24, supplemented with 2.8 mM glucose, 0.5% (w/v) dialysed albumin (Sigma) and equilibrated against a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%).

The islets were then incubated at 37°C for 90 min in 1 mL of the same medium containing 16.7 mM glucose

Table 1 Effects of functionalized 3-alkyl- and pyridyl(alkyl)amino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, diazoxide, BPDZ 44 and BPDZ 73 on insulin release from pancreatic B-cells

Compound	R	Residual insulin secretion (%) ^a	
		50 μ M	10 μ M
6	Pyrid-2-yl	107.4 $\pm$ 4.8 (16)	ND ^b
7	CH ₂ CF ₃	14.3 $\pm$ 1.9 (22)	74.1 $\pm$ 5.6 (12)
8	CH ₂ CH ₂ NH ₂	108.7 $\pm$ 6.0 (16)	ND
9	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃	49.1 $\pm$ 3.3 (15)	ND
10	CH ₂ CH(OC ₂ H ₅) ₂	76.7 $\pm$ 5.7 (15)	ND
11	CH ₂ -pyrid-2-yl	104.4 $\pm$ 5.8 (15)	ND
12	CH ₂ -pyrid-3-yl	98.2 $\pm$ 7.1 (15)	ND
13	CH ₂ -pyrid-4-yl	95.1 $\pm$ 3.9 (16)	ND
14	CH ₂ CH ₂ -pyrid-2-yl	81.3 $\pm$ 5.7 (23)	ND
15	CH ₂ CH ₂ NHCOH	94.3 $\pm$ 4.6 (22)	ND
16	CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₃	98.6 $\pm$ 5.4 (23)	ND
17	Cyclic imidazolidine	94.7 $\pm$ 5.6 (22)	ND
Diazoxide	—	28.8 $\pm$ 2.5 (21)	70.0 $\pm$ 3.6 (22)
BPDZ 44	—	7.1 $\pm$ 0.6 (14)	26.8 $\pm$ 1.8 (21)
BPDZ 73	—	5.7 $\pm$ 0.5 (35)	4.8 $\pm$ 0.4 (32)

^aPercentage of residual insulin secretion from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose; values are expressed as means $\pm$ s.e.m. (n) ^bNot determined

and, in addition, the reference compound or the benzothiadiazine derivative. The release of insulin was measured radioimmunologically using rat insulin as a standard (Leclercq-Meyer et al 1985).

Results and Discussion

Chemistry

3-(Methylsulfonyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**4**), the key intermediate in the preparation of the final products, was obtained in a three-step reaction starting from 4-chloroaniline (**1**; Figure 2) (Di Bella et al 1972; Pirotte et al 1993). The aniline was converted with chlorosulfonyl isocyanate into the corresponding 7-chloro-2,3-dihydro-3-oxo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**2**) (Girard et al 1979). Subsequent thionation with P₂S₅ in pyridine of the oxo-derivative (**2**) led to 7-chloro-2,3-dihydro-3-thioxo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**3**). The synthesis of 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide was achieved by reaction of the thioxo-derivative

with methyl iodide in a water-methanol solution containing NaHCO₃.

The 7-chloro-3-alkyl- and pyridylalkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**7–14**) were obtained by reaction of the key intermediate (**4**) with an excess of the appropriate amine (Figure 2). Compound **6** was obtained by action of *o*-aminopyridine on the 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**5**) intermediate (Wollweber et al 1981). The former was prepared by oxidation of 7-chloro-3-(methylsulfonyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**4**) with bromine (Figure 2). Compounds **15** and **16** were synthesized, respectively, by formylation or acylation of 3-(2-aminoethyl)amino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**8**) (Figure 3). Surprisingly, acid hydrolysis of compound **10** led not to the expected aldehydic derivative, but to a compound identified as being 7-chloro-1-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[2,1-*c*]-1,2,4-benzothiadiazine 5,5-dioxide (**17**) (Figure 3). The IR spectrum of compound **17** did not exhibit an absorption band in the range of 1700 cm⁻¹ and clearly showed the presence of a O-H vibration

band (3430 cm^{-1}). The NMR data of compound **17** indicated that the isolated structure was the cyclic form, as suggested by the presence of a chemical shift corresponding to the O-H proton (δ 60 ppm, exchangeable with CF_3COOD) and the lack of the peak corresponding to the $\text{N}_\alpha\text{-H}$ proton (near 10.5–11.0 ppm).

Pharmacological evaluation

The compounds reported in Table 1 were tested as inhibitors of insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of an insulintropic glucose concentration (16.7 mM). The drugs were tested at a $50\text{ }\mu\text{M}$ concentration and the most active compound was also examined at $10\text{ }\mu\text{M}$. Diazoxide, BPDZ 44 and BPDZ 73 were used as reference drugs.

As shown in Table 1, none of the 7-chloro-3-pyridyl(alkyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**6**, **11–14**) were found to express a marked activity as inhibitors of insulin release. Except for compounds **7** and **9**, none of the drugs bearing a heteroatom(s)-containing alkylamino chain in the 3 position (**8**, **10**, **15–17**) exhibited a clear inhibitory activity on pancreatic B-cells. 7-Chloro-3-(2',2',2'-trifluoroethyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**7**) was found to be as potent as diazoxide but less potent than BPDZ 44 or BPDZ 73. Compared with BPDZ 73, the presence of a strong electron-withdrawing group (CF_3) on the side chain strongly influenced the electronic distribution. This feature should be responsible for a loss of biological activity.

By examining the 3-pyridyl(alkyl)amino-substituted compounds (**6**, **11–14**), no improvement on biological activity was observed when the distance separating the pyridine ring from the thiadiazine ring or the position of the nitrogen atom in the pyridine ring was varied.

Compared with reference drugs, the enhancement of the steric hindrance in the 3 position could also explain in part the loss of activity.

One may expect the basic NH_2 group on the side chain of **8** to be protonated at physiological pH (7.4) and such an event could explain the lack of biological activity observed with **8**. However, even if this NH_2 function was acylated, and therefore not ionized at pH 7.4, no activity was recovered (see compounds **15** and **16**).

Conclusion

From these results, it clearly appears that the nature of the side chain in the 3 position of the benzothiadiazine ring affects the biological activity on pancreatic B-cells.

The introduction of a pyridyl-, a pyridylmethyl- or a pyridylethylamino group in the 3 position generates compounds inactive or poorly active on the insulin-releasing process. Except for compounds **7** and **9**, the introduction of heteroatoms on the side chain in the 3 position also induced a marked decrease in biological activity.

However, these two compounds (**7** and **9**) were found to be less active than the reference molecule BPDZ 73.

Beside the possible impact of heteroatom(s) on electronic distribution, the enhancement of the steric hindrance by bulky groups in the 3 position could explain in part the lack of measurable biological activity with some of the new compounds.

It appears that, to develop compounds acting as inhibitors of insulin release, a short branched alkylamino side chain in the 3 position of the benzothiadiazine ring (like for BPDZ 73) constitutes, in this series, the best choice of substituent.

References

- Allard, B., Iazdunski, M. (1993) Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **236**: 419–426.
- Bernardi, H., Fosset, M., Iazdunski, M. (1988) Purification and affinity labelling of brain [^3H] glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9816–9820.
- Bryan, J., Aguilar-Bryan, L. (1997) The ABC of ATP-sensitive potassium channels: more pieces of the puzzle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 553–559.
- Cook, N. S. (1988) The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**: 21–28.
- Cook, D. L., Hales, C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**: 271–273.
- Cook, N. S., Quast, U. (1990) Potassium channel pharmacology. In: Cook, N. S. (ed.) *Potassium Channels, Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential*. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 181–255.
- de Tullio, P., Pirotte, B., Lebrun, P., Fontaine, J., Dupont, L., Antoine, M.-H., Ouedraogo, R., Khelili, S., Maggetto, C., Masereel, B., Dionf, O., Podona, T., Delarge, J. (1996) 3- and 4-substituted 4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **39**: 937–948.
- Di Bella, M., Rinaldi, M., Fabio, U., Manicardi, G. (1972) Azione antimicrobica di derivati dell'1,2,4-benzothiadiazina-1,1-diossido. *Il Farmaco* **27**: 990–998.
- Girard, Y., Atkinson, J. G., Rokach, J. (1979) A new synthesis of 1,2,4-benzothiadiazine and selective preparation of *o*-aminobenzenesulphonamides. *J. Chem. Soc. Perkin I*: 1043–1047.
- Hamilton, I. C., Weston, A. H. (1989) Cromakalim, nicorandil and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* **20**: 1–9.

- Lebrun, P., Devreux, V., Hermann, M., Herchuelz, A. (1988) Pinacidil inhibits insulin release by increasing K^+ outflow from pancreatic B-cells. *Eur. J. Pharmacol.* **156**: 283–286
- Lebrun, P., Devreux, V., Hermann, M., Herchuelz, A. (1989) Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**: 1011–1018
- Lebrun, P., Antoine, M.-H., Herchuelz, A. (1992) Minireview: K^+ channel openers and insulin release. *Life Sci.* **51**: 795–806
- Lebrun, P., Arkhammar, P., Antoine, M.-H., Nguyen, Q.-A., Bondo Hansen, J., Pirotte, B. (2000) A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K^+ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* **43**: 723–732
- Leclercq-Meyer, V., Marchand, J., Woussen-Colle M. C., Giroix, M. H., Malaisse W. J. (1985) Multiple effects of leucine on glucagon, insulin and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **116**: 1168–1174
- Noma, A. (1983) ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**: 147–148
- Pirotte, B., de Tullio, P., Lebrun, P., Antoine, M.-H., Fontaine, J., Masereel, B., Schynts, M., Dupont, L., Herchuelz, A., Delarge, J. (1993) 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-c]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells: a new class of potassium channel openers? *J. Med. Chem.* **36**: 3211–3213
- Pirotte, B., Antoine, M.-H., de Tullio, P., Hermann, M., Herchuelz, A., Delarge, J., Lebrun, P. (1994) A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K^+ channels. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1381–1386
- Quayle, J. M., Nelson, M. T., Standen, N. B. (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* **77**: 1165–1232
- Standen, N. B., Quayle, J. M., Davies, N. W., Brayden, J. E., Huang, Y., Nelson, M. T. (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**: 177–180
- Wollweber, H., Horstmann, H., Stoepel, K., Garthoff, B., Puls, H., Krause, H. P., Thomas, G. (1981) 3-Amino-2H-benzothiadiazine-1,1-dioxide mit antihypertensiver und potentieller diabetogener Wirkung. *Arzneim. Forsch.* **31**: 279–288

Annexe 4

Special Features

BPDZ 154 Activates Adenosine 5'-Triphosphate-Sensitive Potassium Channels: *In Vitro* Studies Using Rodent Insulin-Secreting Cells and Islets Isolated from Patients with Hyperinsulinism

KAREN E. COSGROVE¹
MARIE-HÉLÈNE ANTOINE²
ANNE T. LEE¹
PHILIPPA D. BARNES¹
PASCALE DE TULLIO³
PETER CLAYTON⁴
RORY MCCLOY⁵
PASCAL DE LONLAY⁶
CLAIRE NIHOUL-FÉKÉTÉ⁶
JEAN-JACQUES ROBERT⁶
JEAN-MARIE SAUDUBRAY⁶
JACQUES RAHIER⁷
KEITH J. LINDLEY⁸
KHALID HUSSAIN⁸
AL AYNLEY-GREEN⁸
BERNARD PIROTTE³
PHILIPPE LEBRUN²
MARK J. DUNNE¹

¹ Institute of Molecular Physiology and Department of Biomedical Science (K.E.C., A.T.L., P.D.B., M.J.D.), University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S10 2TN, United Kingdom;

² Laboratory of Pharmacology (M.-H.A., P.L.), Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles 1070, Belgium;

³ Department of Medicinal Chemistry (P.d.T., B.P.), Université de Liège, Liège 4000, Belgium;

⁴ Manchester Children's Hospital (P.C.), Manchester M27 4MA, United Kingdom;

⁵ Department of Surgery (R.M.), Department of Medicine, Manchester Royal Infirmary, Manchester M13 9WL, United Kingdom;

⁶ Department of Pediatrics, Hôpital Necker-Enfants Malades (P.D.L., C.N.-F., J.-J.R., J.-M.S.), 75743 Paris, France;

⁷ Université Catholique de Louvain (J.R.), Bruxelles, Belgium;

⁸ Institute of Child Health (K.J.L., K.H., A.A.-G.), Great Ormond Street Hospital, London WC1N 1EH, United Kingdom

Received March 20, 2002.

Accepted August 14, 2002.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. M. J. Dunne, Institute of Molecular Physiology and Department of Biomedical Science, The University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S10 2TN, United Kingdom. E-mail: m.j.dunne@sheffield.ac.uk.

This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Fund (to K.E.C. and M.J.D.), University of Sheffield (to P.D.B. and M.J.D.), Wellcome Trust (to A.T.L. and M.J.D.), and National Fund for Scientific Research, Belgium (to P.D.T., B.P., and P.L.). Collaborative initiatives were supported by a European Union-funded Concerted Action Grant (Treatment of Hyperinsulinism in Infancy, THQLG1-2000-00513).

Copyright © 2002 by The Endocrine Society

Abbreviations:

Di-HI	Diffuse hyperinsulinism in infancy
DMSO	dimethylsulfoxide
Fo-HI	focal hyperinsulinism in infancy
HI	hyperinsulinism in infancy
INS	insulinoma
K _{ATP}	ATP-sensitive K ⁺
Kir	inwardly rectifying K ⁺ channel
P _o	open-state probability
SUR	sulfonylurea receptor

A novel ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) channel agonist, BPDZ 154 (6,7-dichloro-3-isopropylamino-4 H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide), was synthesized, and its effects on insulin-secreting cells were evaluated using electrophysiology,⁸⁸ Rb⁺ and ⁴⁵Ca²⁺ efflux, and RIA determinations of insulin secretion. BPDZ 154, an analog of diazoxide, inhibited both glucose-induced insulin secretion from isolated perfused islets and the secretion of insulin induced by glucose and tolbutamide. These effects were mediated by the activation of ATP-sensitive potassium channels because BPDZ 154 induced a concentration-dependent increase in channel activity that was inhibited by the sulfonylurea tolbutamide and the imidazoline efaroxan. In β -cells isolated from patients with either nontypical hyperinsulinism (preserved K_{ATP} channel function) or from the control areas of the pancreas of patients with focal hyperinsulinism, BPDZ 154 activated K_{ATP} channels and was found to be more effective and less readily reversible than diazoxide. By contrast, it was not possible to activate K_{ATP} channels by either diazoxide or BPDZ 154 in β -cells from patients with hyperinsulinism as a consequence of defects in K_{ATP} channel function. In β -cells isolated from a patient with pancreatic insulinoma, K_{ATP} channels were readily recorded and modulated by BPDZ 154. These data suggest that BPDZ 154 or BPDZ 154-like compounds may have therapeutic potential in the treatment of certain forms of hyperinsulinism. (*J Clin Endocrinol Metab* 87: 4860–4868, 2002)

HYPERINSULINISM IN INFANCY (HI) is the most common cause of persistent hypoglycemia in infancy and childhood. The most severe forms of this condition arise from gene defects in pancreatic β -cell ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channel subunits SUR1 (sulfonylurea receptor 1 encoded by *ABCC8*) and inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.2 (encoded by *KCNJ11*) at Ch 11p15^[3]. Two major histopathologically diverse forms of HI predominate^[2]: diffuse disease (Di-HI), in which all β -cells of the pancreas express the gene defect, and focal disease or Fo-HI^[3]^[4]. In this condition loss of maternal heterozygosity leads to expression of K_{ATP} channel gene defects in cells derived from the focal regions^[5]^[6]^[7]. *ABCC8* and *KCNJ11* mutations have currently been identified in approximately 50% of patients with HI, and defects that influence the function of SUR1 are

found throughout the *ABCC8* gene [11, 8]. Other identified causes of hyperinsulinism include mutations in glucokinase [*GCK1*, Ch 7p15-13 [9]], glutamate dehydrogenase [*GLUD1*, Ch 10q23.3 [10]], and short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Ch4q22-q26 [11]].

In β -cells K_{ATP} channels are composed of four Kir6.2 subunits forming the ion channel pore and four SUR1 subunits that regulate the conductance of Kir6.2. Under normal conditions, K_{ATP} channels regulate the β -cell resting membrane potential and couple glucose metabolism to insulin secretion through changes in the cell membrane potential. Defects in *ABCC8* or *KCNJ11* cause HI because they are responsible for loss of channel function, which leads to spontaneous depolarization of the membrane, unregulated Ca^{2+} influx, and uncontrolled insulin release [12, 13]. If untreated, hyperinsulinemia-induced hypoglycemia is potentially lethal because of neurological complications associated with low blood glucose levels [14].

4861

Diazoxide is used in the treatment of hyperinsulinism because it acts to inhibit insulin release through activation of K_{ATP} channels [14]. However, the clinical effectiveness of diazoxide is variable [15] and as a consequence of adverse side effects, which include fluid retention leading to cardiac failure, hyperuricemia, thrombocytopenia, hypotension, facial changes, and generalized hypertrichosis, the compound can be poorly tolerated *in vivo* [14, 16]. As a result, patients that do not respond to diazoxide treatment require surgery in the form of a pancreatectomy to alleviate hypoglycemia.

To generate more active and selective inhibitors of insulin release, we have recently developed a series of diazoxide-like molecules, which include 3-alkylamino-4 *H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (*i.e.* BPDZ 73) [17, 18] and 3-alkylamino-4 *H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides (*i.e.* BPDZ 44) [19, 20]. In this study, we examined the actions of a new synthetic diazoxide analog, 6,7-dichloro-3-isopropylamino-4 *H*-1,2,4-benzothiadiazine,1-dioxide (BPDZ 154), and evaluated the effects of this compound using rodent insulin-secreting cells and β -cell lines and tissues isolated from patients following surgery for hyperinsulinism as a consequence of HI and pancreatic insulinoma (INS). We show that BPDZ 154 is an activator of K_{ATP} channels in control and disease tissues and that this is the principal mechanism by which BPDZ 154 leads to the inhibition of insulin release *in vitro*.

Patients and Methods

Patients

Studies were performed using tissues isolated from seven patients with HI and one patient with hyperinsulinism as a consequence of INS. Patients N80, N89, N92, and N93 were diagnosed as having HI as a consequence of diffuse disease, whereas patients N88, N90, and N91 suffered from focal hyperinsulinism (Table 1). All HI patients presented with typical symptoms of the disease, which were defined by hypoglycemia (blood glucose, <2.6 mmol/liter; normal range, 3.5–5.5 mmol/liter) in association with hyperinsulinism (insulin >480 ng/ml in association with a raised C-peptide at the time of hypoglycemia; normal insulin value, <160 ng/ml). These and other established criteria confirmed the diagnosis of HI [11]. All patients failed to respond adequately to medical therapy involving diazoxide (7.5–20 mg/kg·d) (Table 1), and a subtotal or near total (95%) pancreatectomy was performed to prevent persistent hypoglycemia. Patient INS3 presented symptoms of hypoglycemia later in life and after failure to respond to diazoxide underwent a limited pancreatectomy to remove a benign pancreatic INS. Patient N89 was found to carry a gene mutation in *ABCC8* (Table 1), but the

TABLE 1 -- Summary of patient information

Patient	Age at surgery	Sex	Histology	Diazoxide therapy	Genotyping	K_{ATP} channel function
N80	24 wk	Female	Diffuse HI	No response to 15 mg·kg·d	Not determined	Yes
N88	24 wk	Male	Focal HI	No response to 15 mg·kg·d	Not determined	Focal lesion, no Control area, yes
N89	8 wk	Male	Diffuse HI	No response to 20 mg·kg·d	Homozygous	No

N90	14 wk	Male	Focal HI	No response to 15–20 mg•kg•d	SUR1-USHC Not determined	Focal lesion, no Control area, yes
N91	3 yr	Female	Focal HI	Initially responded to 15 mg•kg•d	Not determined	Focal lesion, no Control area, yes
N92	12 wk	Female	Diffuse HI	No response to 20 mg•kg•d	Not determined	Yes
N93	5 wk	Female	Diffuse HI	No response to 20 mg•kg•d	Not determined	No
INS3	14 yr	Male	Insulinoma	No response to 7.5 mg•kg•d	Not determined	Yes

Tissue was obtained after surgery for hyperinsulinism as a consequence of either focal or diffuse HI, or pancreatic insulinoma as indicated

Genotyping studies of patient N89 revealed the presence of a contiguous HI-related mutation in *ABCC8* on the short arm of Ch. 11p15 [31]

genetic basis of hyperinsulinism in all other patients has not been determined.

Methods

Measurements of insulin release, $^{86}\text{Rb}^+$ efflux, and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow from perfused pancreatic islets.

All experiments were performed with pancreatic islets isolated by the collagenase method from fed Wistar rats. The methods used to measure $^{86}\text{Rb}^+$ ($^{42}\text{K}^+$ substitute) outflow, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow, and insulin release from perfused islets have been described previously [21] [22] [23]. In brief, batches of 100 islets were incubated in a bicarbonate-buffered medium (115 mmol/liter NaCl, 5 mmol/liter KCl, 2.56 mmol/liter CaCl_2 , 1 mmol/liter MgCl_2 , and 24 mmol/liter NaHCO_3) containing 16.7 mmol/liter glucose and either $^{86}\text{Rb}^+$ (0.15–0.25 mmol/liter; 50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) or $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0.02–0.04 mmol/liter; 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) for 60 min. After incubation, islets were submitted to four washes with a nonradioactive medium to remove extracellular radioactivity. Groups of 100 islets were then placed on a cellulose filter (SCWP01300, Millipore Corp., Saint Quentin, France) that was inserted in a perfusion chamber (Swinnex SX00 01300, Millipore Corp.) connected to two reservoirs through a three-way valve. The reservoirs contained media kept at 38°C and continuously mixed with O_2 (95%) and CO_2 (5%). The perfusate was delivered at a constant rate (1.0 ml/min) by means of a peristaltic pump (Minipulse 2, Gilson, Villiers le Bel, France). The temperature in the perfusion chamber averaged 37°C, and the inside pressure corresponded to the atmospheric pressure with no significant variation during the experiment. After a stabilization period of 30 min, from the 31st to the 90th minute of the perfusion, the effluent was continuously collected over successive periods of 1 min each. An aliquot of this effluent (0.5 ml) was then used for scintillation counting, and the remainder was stored at –20°C for determination of insulin release by RIA, as described previously [24]. At the end of the perfusion, the radioactive content of islets was measured. To determine the effect of the experimental conditions on $^{86}\text{Rb}^+$ or $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow, the fractional outflow rate for $^{86}\text{Rb}^+$ or $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was determined as that percentage of the instantaneous islet content released per minute [21] [22] [23].

Electrophysiological measurements.

Pancreatic islets and β -cells were isolated from human cadaver organ donors and postoperatively from patients with HI, as described previously [12] [25]. For studies related to Fo-HI, lesions of focal adenomatous hyperplasia of β -cells were first identified by pancreatic venous sampling [24] [26] and then surgically isolated from the remainder of the pancreas. All preparations of islets and cells were maintained under standard tissue culture conditions in RPMI 1640 medium (Sigma, Poole, UK) supplemented with 10% (vol/vol) newborn calf serum, 100 IU/ml penicillin G, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The glucose-responsive rat-derived β -cell line BRIN-BD11 was maintained under standard tissue culture conditions, as described [28].

K_{ATP} channel currents were recorded using the cell-attached and inside-out recording configurations of the patch-clamp technique [27]. Data were obtained using a List L/M EPC-7 patch clamp amplifier (List Electronic, Darmstadt, Germany) and recorded for subsequent replay and analysis using a digital tape recorder (Biologic, Echirrolles, France).

All experiments were performed at room temperature. Glass micropipettes with a resistance of 5–10 M Ω were filled with a Na⁺-rich solution composed of 140 mmol/liter NaCl, 4.7 mmol/liter KCl, 1.13 mmol/liter MgCl₂, 2.5 mmol/liter CaCl₂, 2.5 mmol/liter glucose, and 10 mmol/liter HEPES (pH 7.4). The cells were bathed and perfused in a K⁺-rich solution of composition 140 mmol/liter KCl, 10 mmol/liter NaCl, 1.13 mmol/liter MgCl₂, 1 mmol/liter EGTA, 2.5 mmol/liter glucose, and 10 mmol/liter HEPES (pH 7.2). K_{ATP} channel open-state probability (P_o) was estimated off-line by analysis of a minimum of 30-sec stretches of continuous data using a CED 1401 interface and designated software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) as described previously [29]. Alternatively, where determination of P_o was not possible because of large numbers of single K_{ATP} channel currents, data were expressed as the fractional peak K_{ATP} channel current value relative to the control value [12] [25]. All current traces were displayed according to the convention with outward current events represented as upward deflections from the baseline.

Drugs

BPDZ 154 was synthesized at the Department of Medicinal Chemistry (Université de Liège, Liège, Belgium). The compound (6,7-dichloro-3-isopropylamino-4 H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) results from the reaction of 6,7-dichloro-3-(1 H-imidazol-1-yl)-4 H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, as described [29] with an excess of isopropylamine (Fig. 1). Typically, 6,7-dichloro-3-(1 H-imidazol-1-yl)-4 H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (0.5 g, 1.6 mmol) and isopropylamine (10 ml) were heated together at 150 °C in a sealed vessel for 4–5 h. The excess of amine was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was dissolved in an aqueous 5% wt/vol solution of NaOH (20 ml) supplemented with methanol (10 ml). The alkaline solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 6 with formic acid. The precipitate was collected by filtration, washed with distilled water, and dried. The compound recrystallized in methanol-water was isolated as a monohydrate; yield: 0.31 g (59%); melting point greater than 280 °C [literature: 289–291 °C, [30]]; infrared (KBr): 3529 (O-H), 3316 (N-H), 3089 (C-H aromatic), 2977 (C-H aliphatic), 1631, 1577, 1457 (C = C, N-H), 1289, 1160 (S = O) cm⁻¹; nuclear magnetic resonance [dimethylsulfoxide (DMSO)-d₆, hexamethyldisiloxane, δ ppm]: 1.10 [d, 6H, CH(C H₃)₂], 3.20 (s, H₂O), 3.80 [m, 1H, C H(CH₃)₂], 7.30 (bd, 1H, N-H exocyclic), 7.45 (s, 1H, 5-H), 7.80 (s, 1H, 8-H), 10.35 (bs, 1H, N-H intracyclic). BPDZ 154, diazoxide, glibenclamide, and tolbutamide (Sigma) were dissolved in DMSO and were added to test solutions to give a final concentration of DMSO less than 0.1%. There were no actions of DMSO on K_{ATP} channels or islet function at this concentration [22] [28].

Statistics

All results are expressed as the mean $\pm$ SE of the mean. Comparisons were made using *t* tests or ANOVA, followed by Tukey's tests, where data were normally distributed. Mann-Whitney rank sum tests were used for pair-wise comparisons where data were non-normally distributed.

Results

Modulation of insulin release, ⁸⁶Rb⁺ efflux, and ⁴⁵Ca²⁺ efflux by BPDZ 154

Figure 2 shows the effects of BPDZ 154 on glucose and sulfonylurea-induced insulin release from perfused rat pancreatic

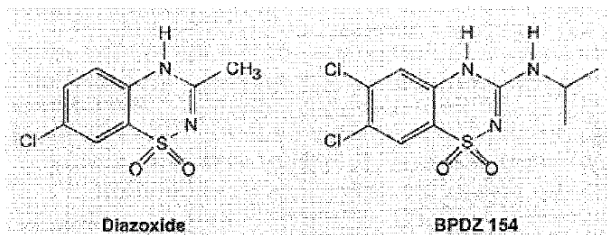


Figure 1. Comparison of the structures of diazoxide and BPDZ 154

islets. Insulin secretion induced by 16.7 mmol/liter glucose was inhibited by approximately 85% by 10 μ mol/liter BPDZ 154; insulin release averaged 90 ± 12 pg/islet $\cdot$ min before (40th to 44th minute) and 14.4 ± 1.6 pg/islet $\cdot$ min after (60th to 68th minute) the addition of BPDZ 154, with little recovery of secretion for 20 min following removal of the drug ($n = 4$, Fig. 2A). In addition, we also found that insulin secretion induced by a combination of 8.3 mmol/liter glucose and 100 μ mol/liter tolbutamide was inhibited by approximately 80% by 10 μ mol/liter BPDZ 154 (six experiments, Fig. 2B); insulin release averaged 68.4 ± 5.2 pg/islet $\cdot$ min before (40th to 44th minute) and 15.2 ± 2.8 pg/islet $\cdot$ min after (60th to 68th minute) the addition of BPDZ 154. Measurements of insulin output from islets incubated for 90 min revealed a concentration-dependent inhibitory effect of BPDZ 154 on 16.7 mmol/liter glucose-induced insulin release. After the addition of 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, and 50 μ M BPDZ 154 to the incubation medium, the residual insulin release represented $95.40 \pm 5.09\%$ ($n = 22$), $84.90 \pm 4.50\%$ ($n = 21$), $13.19 \pm 0.98\%$ ($n = 26$), $6.29 \pm 0.67\%$ ($n = 12$), and $4.96 \pm 0.41\%$ ($n = 12$) of the control value (100%, no added drug), respectively. This indicates an IC_{50} value of 0.28 μ M. Because we have previously reported under identical experimental conditions that the corresponding value for diazoxide was approximately 20 μ mol/liter [i.e. 24.8 ± 3.4 μ mol/liter ^[17] and 18.4 ± 2.2 μ mol/liter ^[23]], these data indicate that BPDZ 154 is a far more potent antagonist of β -cell function than diazoxide. Our findings also reveal that BPDZ 154 was more potent than the parent molecule BPDZ 73 ^[17].

Diazoxide is an agonist of K_{ATP} channels in β -cells, and we, therefore, examined the modulation of islet $^{86}Rb^+$ -efflux by BPDZ 154. Figure 3 summarizes the actions of 10 μ mol/liter BPDZ 154 on the fractional outflow rate of $^{86}Rb^+$ from preloaded rat islets perfused in the presence of 5.6 mmol/liter glucose. Under these conditions, a marked increase in $^{86}Rb^+$ efflux was induced by BPDZ 154 ($n = 3$), which was completely abolished when the basal medium was enriched with the sulfonylurea 10 μ mol/liter glibenclamide ($n = 4$). Figure 4 documents the actions of BPDZ 154 on Ca^{2+} efflux from perfused islets. In the presence but not the absence of extracellular Ca^{2+} , BPDZ 154 was found to inhibit Ca^{2+} efflux induced by either 16.7 mmol/liter glucose or 8.3 mmol/liter glucose and 100 μ mol/liter tolbutamide. Because these effects were dependent on extracellular Ca^{2+} availability, they suggest, by analogy with previous studies ^[17] ^[21] ^[22], that the inhibitory effect of BPDZ 154 on Ca^{2+} efflux is the result of a reduction in Ca^{2+} entry and not as a consequence of the modulation of intracellular calcium. Together these findings show that the BPDZ 154-induced inhibition of insulin release was correlated with increased K^+ channel activity, leading to a reduction in Ca^{2+} entry. The role of BPDZ 154 on K_{ATP} channel activity was, therefore, directly investigated by patch-clamp experiments.

Effect of BPDZ 154 on K_{ATP} channels

Cell-attached and inside-out patch recordings from the rat pancreatic β -cell line BRIN-BD11 were used to study the actions of BPDZ 154 on K_{ATP} channels. In six intact cells and

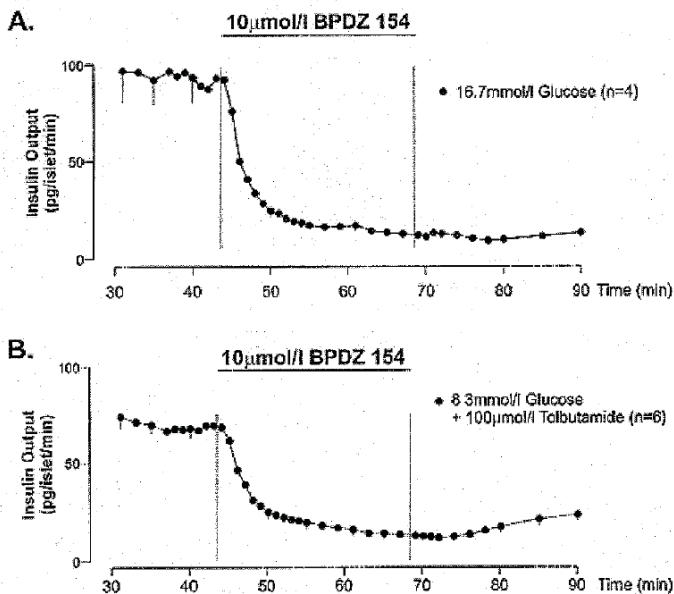


Figure 2. Inhibition of insulin secretion by BPDZ 154 in perfused rat pancreatic islets. Effect of 10 μ mol/liter BPDZ 154 on insulin release from rat pancreatic islets perfused in the presence of 16.7 mmol/liter glucose (A) or 8.3 mmol/liter glucose and 100 μ mol/liter tolbutamide (B). Under basal conditions insulin output was between 4 and 8 pg/islet per minute. All media contained 2.56 mmol/liter CaCl_2 . Mean values ($\pm$ SE) refer to four to six individual experiments.

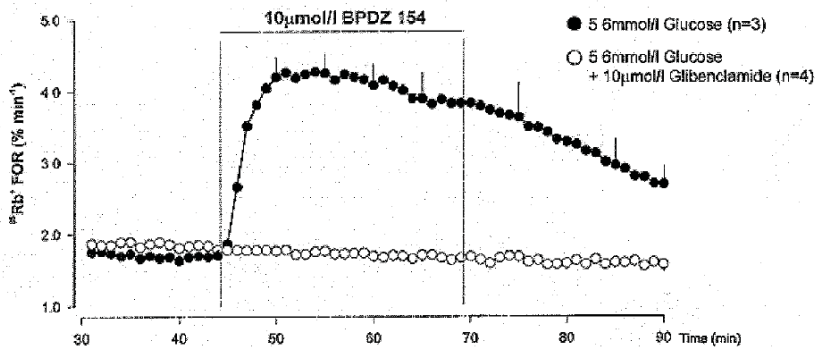


Figure 3. Effect of BPDZ 154 on $^{86}\text{Rb}^+$ outflow from rat pancreatic islets perfused in the presence of 5.6 mmol/liter glucose and absence (○) or presence (•) of 10 μ mol/liter glibenclamide. Basal media contained 2.56 mmol/liter CaCl_2 . Mean values ($\pm$ SE) refer to three to four individual experiments.

excised patches in the presence of internally applied ATP (500 μ mol/liter), BPDZ 154 consistently activated ATP-sensitive K^+ channels. Figure 5A shows typical data from seven separate inside-out patch recordings when K_{ATP} channels were exposed to a range of concentrations of BPDZ 154. In these experiments, both ATP and BPDZ 154 were applied

to the inside face of the membrane. BPDZ 154-induced activation was concentration dependent with increasing levels of K_{ATP} channel activity being recorded as the concentration of BPDZ 154 was raised from 0.1 $\mu\text{mol/liter}$ to 10 $\mu\text{mol/liter}$ ($n = 7$). The approximate EC_{50} for activation of K_{ATP} channels in the presence of 500 $\mu\text{mol/liter}$ ATP was estimated to occur between 0.1 and 1 $\mu\text{mol/liter}$ (Fig. 5B). Activation of K_{ATP} channels by 1 $\mu\text{mol/liter}$ BPDZ 154 in the presence of 500 $\mu\text{mol/liter}$ ATP was inhibited by the imidazoline efaroxan (100 $\mu\text{mol/liter}$, $n = 6$, $P < 0.001$), and the sulfonylureas tolbutamide (100 $\mu\text{mol/liter}$, $n = 6$, $P < 0.01$) and glibenclamide (1 $\mu\text{mol/liter}$, $n = 8$, $P < 0.001$, Fig. 6). Similar effects were also found in human β -cells (patient N90) with 25 $\mu\text{mol/liter}$ BPDZ 154 ($n = 13$).

BPDZ 154 and K_{ATP} channels in β -cells isolated from patients with Fo-HI

The effects of BPDZ 154 and diazoxide on K_{ATP} channels in β -cells isolated from Fo-HI patients was investigated in 22 experiments using three donor preparations in which samples of tissue were available from both the focal lesion and the adjacent portions of the pancreas. In experiments on all control cells, K_{ATP} channel function was apparently normal ($n = 12$ of 12), and 10 $\mu\text{mol/liter}$ diazoxide activated 500 $\mu\text{mol/liter}$ ATP-inhibited channels in inside-out recordings ($n = 11$ of 12). BPDZ 154 (10 $\mu\text{mol/liter}$) was also effective but evoked a more pronounced activation of channels when applied to the same patches of membrane ($n = 12$ of 12, Fig. 7, top). On average we found that diazoxide caused a 1.56 ± 0.3 -fold increase in channel activity in the presence of ATP ($n = 9$), whereas the equivalent value for BPDZ 154 was 2.96 ± 0.3 ($n = 9$, $P < 0.001$). In contrast, K_{ATP} channel currents were not recorded from cells isolated from the focal lesions, and there were no responses to either BPDZ 154 or diazoxide ($n = 10$, Fig. 7, bottom).

4864

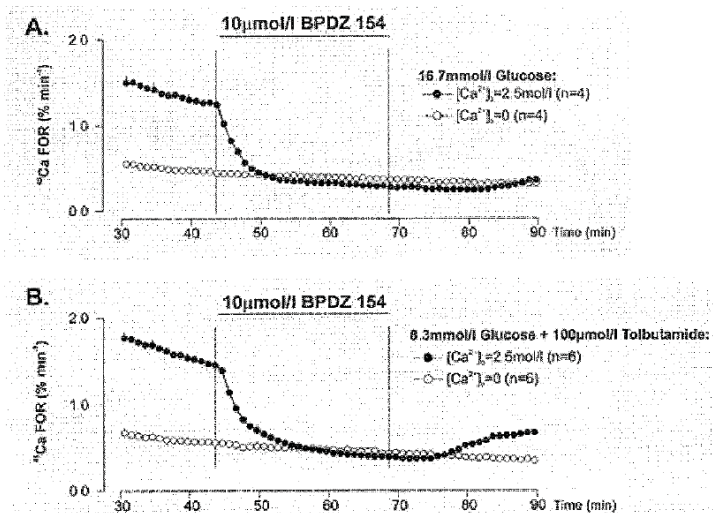


Figure 4. Effect of 10 $\mu\text{mol/liter}$ BPDZ 154 on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow from rat pancreatic islets perfused in the presence of 16.7 mmol/liter glucose (A) or 8.3 mmol/liter glucose and 100 $\mu\text{mol/liter}$ tolbutamide (B). Basal media either contained 2.56 mmol/liter CaCl_2 (●) or CaCl_2 was omitted and 0.5 mmol/liter EGTA was added (○). The rate of ^{45}Ca outflow before drug administration (min 31–44) was lower in islets exposed to calcium depleted media. Mean values ($\pm$ SE) refer to four to six individual experiments.

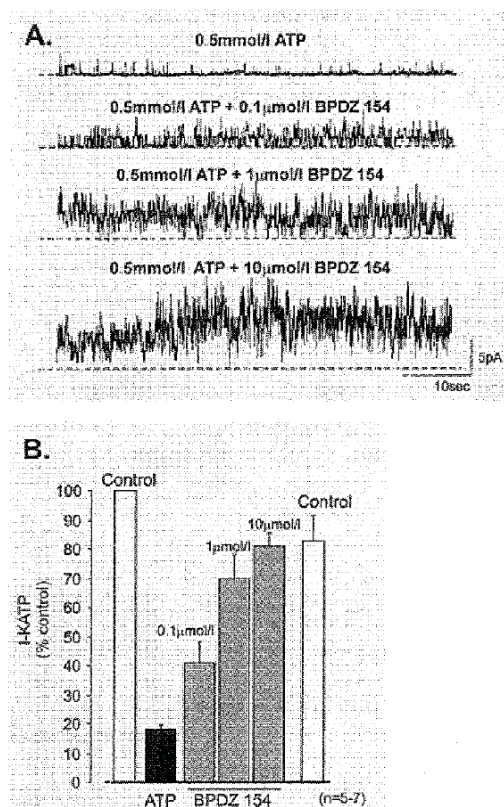


Figure 5. Concentration-dependent activation of K_{ATP} channels in BRIN-BD11 β -cells by BPDZ 154. **A**, Typical inside-out patch recording. BPDZ 154 activated K_{ATP} channels in the presence of 500 μ mol/liter ATP in a concentration-dependent manner. **B**, Summary of data from seven similar recordings. Results are expressed as a percentage of the peak K_{ATP} channel current measured under basal conditions at the start of the sequence. In this and other figures, control values refer to the level of K_{ATP} channel activity recorded in the absence of test substances. Half maximal activation of K_{ATP} channels under these conditions was achieved between 0.1 μ mol/liter and 1 μ mol/liter BPDZ 154.

Effects of BPDZ 154 on K_{ATP} channels in β -cells isolated from patients with Di-HI

Although principally associated with *ABCC8* or *KCNJ11* gene mutations, not all patients with Di-HI have identified gene defects in K_{ATP} channel subunits. In this series of experiments, β -cells isolated from two of the four patients with Di-HI had fully operational K_{ATP} channels in more than 87% of the experiments carried out (patients N80 and N92, 49 of 56 experiments). Our studies were, therefore, undertaken on tissues isolated from both groups of patients. Patients N89^[31] and N93 had typical Di-HI in which loss of K_{ATP} channel function was directly correlated with β -cell pathophysiology (Table 1). Figure 8A shows a representative recording of 23 experiments of ionic events in β -cells isolated from this group of patients; K_{ATP} channel activity was abnormal (compare Fig. 8A with 8B), and there were no actions of 500 μ mol/liter ATP, 10 μ mol/liter diazoxide, or 10 μ mol/liter BPDZ 154 ($n = 7-13$). In contrast to these data, when recordings were made from the β -cells of patients with nontypical Di-HI (patients N80 and N92, Fig. 8B), K_{ATP} channels were found in the majority of cells, and they were readily inhibited by ATP and activated by either diazoxide or BPDZ 154 ($n = 12$). On average, BPDZ 154 increased K_{ATP} channel activity in the presence of ATP by 4.3 ± 0.4 -fold,

compared with 2.9 ± 0.5 -fold for diazoxide ($n = 7$, $P < 0.05$). In addition to increasing the degree of K_{ATP} channel activation, BPDZ 154 was also found to be less readily reversible than diazoxide. The time taken for the peak current to decline to 50% of its maximum value following removal of the drug was 10 ± 4 sec for diazoxide vs. 58 ± 12 sec for BPDZ 154 (six separate recordings, $P < 0.01$). This was comparable with values obtained using rodent-derived β -cells under the same conditions (5 ± 3 sec vs. 24 ± 1 sec for diazoxide and BPDZ 154, respectively; $n = 4$, $P < 0.01$).

4865

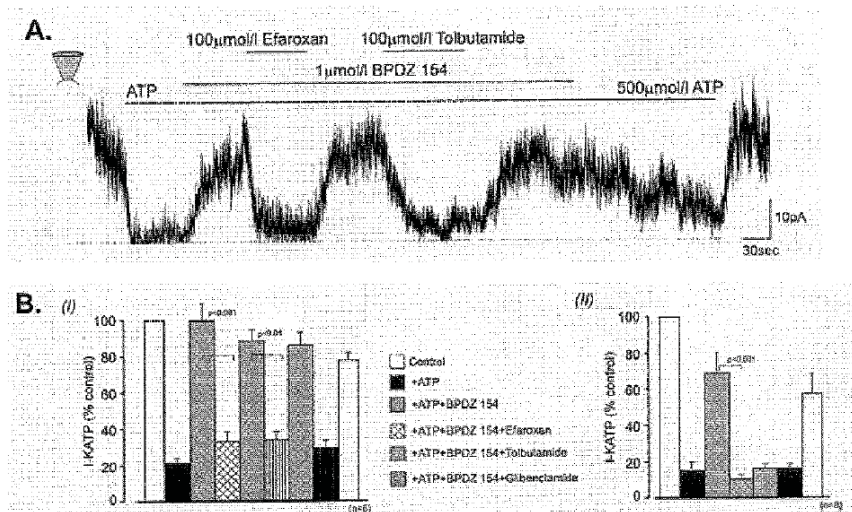


Figure 6. Inhibition of BPDZ 154-activated K_{ATP} channels by efaroxan, tolbutamide, and glibenclamide. **A.** Illustration of an inside-out patch recording from a BRIN-BD11 β -cell, typical of five others. On each occasion the activation of K_{ATP} channels elicited by 1 μ M BPDZ 154 in the presence of 500 μ M ATP could be reversed by the addition of either 100 μ M efaroxan or 100 μ M tolbutamide. **B.(I)**, Summary of data from six experiments. Peak K_{ATP} channel current values under each condition were evaluated and are expressed as a percentage of the initial control current measured at the start of the sequence. Both efaroxan and tolbutamide significantly attenuated 1 μ M BPDZ 154-induced channel activation ($n = 6$, Student's paired t tests, $P < 0.001$, $P < 0.01$, respectively). **B.(II)**, Summary of the actions of 1 μ M glibenclamide on 1 μ M BPDZ 154-induced channel activation ($n = 8$).

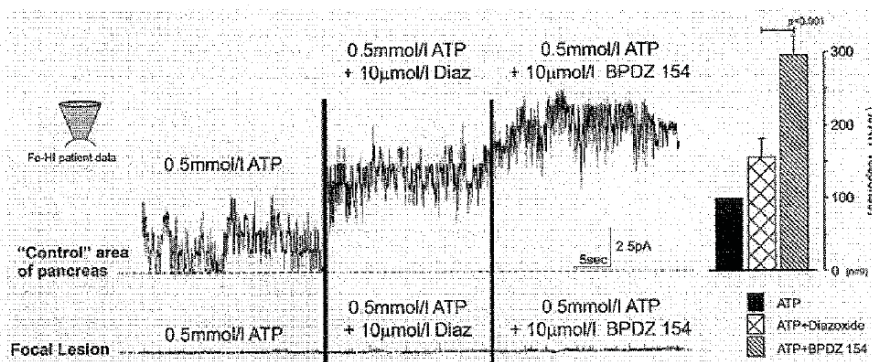


Figure 7. Activation of K_{ATP} channels in β -cells isolated from the control area of the pancreas of patients with Fo-HI. The upper trace is representative of 12 recordings from control β -cells of three patients (N88, N90, and N91). Analysis of nine experiments showed that BPDZ 154 produced a more significant increase in channel activity than diazoxide (Diaz) in the same cells. By contrast, in cells isolated from the focal lesions of the same patients K_{ATP} channels were nonfunctional and neither BPDZ 154 nor diazoxide caused the activation of channels. The record illustrated in the bottom panel is typical of 10 recordings from focal lesions.

Effects of BPDZ 154 on K_{ATP} channels in β -cells isolated from patients with pancreatic INS

The molecular pathophysiology of pancreatic INS is incompletely resolved. Here, we found that although all recordings of patient tissues possessed K_{ATP} channels, there were some differences when compared with controls. First, there was a significant decrease in the magnitude of K_{ATP} channel currents generated on formation of inside-out patches (12.7 ± 3.8 pA, $n = 11$ vs 25.5 ± 1.5 pA, $n = 269$, in INS3 and human control β -cells, respectively, $P < 0.05$). Second, we also found that there was a decrease in the sensitivity of K_{ATP} channels to ATP in INS β -cells. In control tissue, 500 μ mol/liter ATP typically reduced the P_o to $5 \pm 1\%$ of the initial value (100%) in 19 experiments from three cadaver donors, compared with only $74 \pm 7\%$ in INS3 β -cells ($n = 6$, $P < 0.001$). Despite this, in INS3 β -cells we consistently found that both diazoxide and BPDZ 154 readily activated K_{ATP} channels and that when compared with 10 μ mol/liter diazoxide, 10 μ mol/liter BPDZ 154 was found to be significantly more effective at increasing K_{ATP} channel activity in the presence of ATP (4.2 ± 0.5 -fold vs 2.0 ± 0.2 -fold for diazoxide, $n = 4$, $P < 0.05$, Fig. 9). In INS β -cells

4866

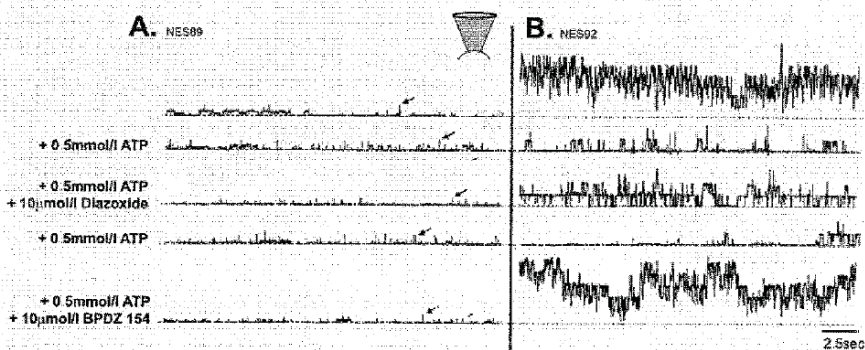


Figure 8. Effects of BPDZ 154 on K_{ATP} channels in patients with diffuse HI. A, Illustration of typical data from patients with DI-HI as a

consequence of K_{ATP} channel defects. In this β -cell, which is representative of 22 other experiments, K_{ATP} channel openings were rare and open events were typically brief in duration, indicated by the arrows, and there were no effects of diazoxide or BPDZ 154 in 7 and 13 experiments respectively. B, An inside-out patch from a patient with nontypical DI-HI in which K_{ATP} channels were readily recorded. Activation of 500 $\mu\text{mol/liter}$ ATP-inhibited channels by BPDZ 154 was more pronounced than that observed for diazoxide. In this experiment BPDZ 154 increased P_o from 0.001 to 0.47 compared with diazoxide, which increased P_o from 0.017 to 0.16.

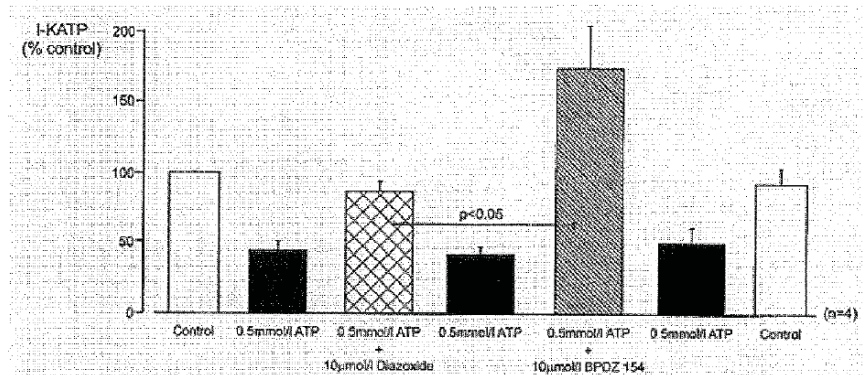


Figure 9. Activation of K_{ATP} channels by BPDZ 154 in β -cells from patients with pancreatic insulinoma. Summary of data from four separate inside-out patches in INS3 β -cells. Compared with 10 $\mu\text{mol/liter}$ diazoxide, 10 $\mu\text{mol/liter}$ BPDZ 154 produced a more significant increase in the activation of K_{ATP} channels.

we also found that the actions of BPDZ 154 were less readily reversible than those of diazoxide (39 ± 7 sec vs. 4 ± 1 sec, respectively, $n = 4$, $P < 0.05$).

Discussion

Disorders of glucose homeostasis resulting in hyperinsulinism and hypoglycemia are potentially devastating conditions that present a challenge for clinical management because of the lack of effective and selective inhibitors of insulin secretion. For cases of both HI and INS, activation of K_{ATP} channels by diazoxide often fails to control the insulin secretion *in vivo*, and surgical removal of either the discrete lesion or up to 95% of the pancreas is then required to prevent hypoglycemia [14]. Here, we investigated the effects of a novel diazoxide analog, BPDZ 154, on rodent tissue and tissues isolated from patients with hyperinsulinism.

BPDZ 154 was found to be a potent inhibitor of insulin release with an EC_{50} of 0.28 $\mu\text{mol/liter}$, compared with approximately 20 $\mu\text{mol/liter}$ for diazoxide [17] [28], and caused a sulfonylurea-sensitive increase in $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from preloaded islets. These data suggested that BPDZ 154 was a K_{ATP} channel agonist, and this was confirmed using patch-clamp techniques that revealed BPDZ 154 (0.1–10 $\mu\text{mol/liter}$)-induced activation of K_{ATP} channels and inhibition of these effects by efargoxan and sulfonylureas [32]. Consistent with the actions of glibenclamide on BPDZ 154-enhanced $^{86}\text{Rb}^+$ efflux, we also found that closure of K_{ATP} channels by glibenclamide in the presence of BPDZ 154 was poorly reversible (Fig. 6). When compared with diazoxide, equivalent concentrations of BPDZ 154 were found to be more effective, and although there were no obvious differences in the time for onset of activation of K_{ATP} channels by diazoxide or BPDZ 154, the novel agent was consistently found to be less readily reversible than diazoxide. A similar pharmacokinetic profile of slow reversibility was also seen when insulin release, $^{86}\text{Rb}^+$ efflux, and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow rates were monitored using perfused rodent islets.

In vitro studies of human β -cells were also performed. First, in cells isolated from three patients with Fo-HI, we showed that in those regions unaffected by loss of heterozygosity, K_{ATP} channel activity was normal, and both diazoxide and BPDZ 154 were agonists of the channel. However, when parallel studies were carried out on β -cells isolated from the focal lesions from the same patients, K_{ATP} channels were

defective, and there were no actions of either agent. Next, the effects of BPDZ 154 were examined on ion channels in β -cells isolated from two groups of patients with Di-HI. Although a small minority of patients with Di-HI retain functional β -cell K_{ATP} channels, approximately 95% of all cases arise through loss of K_{ATP} channel function^[33]. In these cases the degree of K_{ATP} channel deficiency ranges from a total loss of function^[13] to abnormal channel operation as a result of defects in nucleotide-sensing^[34] or subunit trafficking^[36]. In this patient group, which was typified by studies involving patients N93 and N89^[31], when K_{ATP} channels were absent from β -cells, BPDZ 154 and diazoxide failed to induce channel activity. By contrast, in Di-HI patients with nontypical disease (patients N80 and N92), K_{ATP} channels were retained and despite the fact that diazoxide was ineffective *in vivo*, both diazoxide and BPDZ 154 activated K_{ATP} channels *in vitro*. Similar findings were also observed in β -cells from a patient with pancreatic INS. Collectively, these findings suggest that when there is a severe loss of K_{ATP} channel function, neither diazoxide nor BPDZ 154 are likely to modulate insulin release *in vivo*. However, in those cases of HI or INS in which K_{ATP} channel function is preserved, our data show that despite the fact that there were no beneficial effects of diazoxide *in vivo*, BPDZ 154 was able to activate K_{ATP} channels *in vitro*. These findings are potentially relevant to the clinical management of such patients because they imply that increasing the concentrations of diazoxide *in vivo* may prove beneficial.

Apart from hyperinsulinism, diazoxide-induced inhibition of insulin release has also been implicated in the treatment of both obesity and diabetes. In the Zucker rat (*fa/fa*), an animal model of hyperinsulinemic obesity^[37], the administration of diazoxide was found to prevent glucose-induced insulin release, reduce weight gain, improve glucose uptake, and modify central neuropeptide Y levels of both free-fed and fasted obese animals^[38]^[39]^[40]. Diazoxide was also found to prevent type 1 diabetes in diabetes-prone BioBreeding rats^[41], and short-term administration was shown to improve insulin secretion in diabetic subjects^[42], preserve endogenous insulin production in newly diagnosed patients^[43], and reduce body fat in hyperinsulinemic obese adults^[44]. These observations have, therefore, led to the suggestion that by inducing β -cell rest^[45], diazoxide used in combination with intensive insulin therapy may prolong β -cell survival and preserve endogenous insulin release for several months following diagnosis of diabetes.

In summary, we have presented data related to the actions of a novel antagonist of pancreatic β -cell function. BPDZ 154 is more effective than diazoxide at both inhibiting insulin release from isolated intact islets and inducing the activation of K_{ATP} channels. We have also demonstrated that BPDZ 154 will modulate K_{ATP} channels in β -cells isolated from a human pancreatic INS and in those cases of HI in which the condition appears not to be directly related to defects in K_{ATP} channels. Our data suggest that benzothiadiazine 1,1-dioxides, or other diazoxide analogs^[46] may prove useful as therapeutic utilities or in the development of new compounds for disorders of glucose homeostasis.

Acknowledgments

We thank Drs. Roger James, Seran Hill, and Sue Swift of the University of Leicester and Dr. Kate Hinchliffe of the University of Sheffield for preparation of control and HI β -cells. Some of this work involved patient tissues originating from Great Ormond Street Hospital for Children NHS Trust, which received a portion of its funding from the NHS Executive. The views expressed in this publication are those of the authors and are not necessarily those of the NHS Executive.

References

- 1 Glaser B, Thornton PS, Otonkoski T, Junien C 2000 The genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child* 82:79–86. Abstract

- 2 Sempoux C, Guiot Y, Lefevre A, Nihoul-Fekete C, Jaubert F, Saudubray JM, Rahier J 1998 Neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia: heterogeneity of the syndrome and keys for differential diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1455–1461 [Full Text](#)
- 3 de Lonlay-Debeney P, Poggi-Trovert F, Fournet JC, Sempoux J, Vici AD, Brunelle F, Touati G, Rahier J, Junien C, Nihoul-Fékété C, Robert JJ, Saudubray JM 1999 Clinical features of 52 neonates with hyperinsulinism. *N Engl J Med* 340:1169–1175 [Abstract](#)
- 4 de Lonlay P, Fournet JC, Touati G, Groos MS, Martin D, Sevin C, Delagne V, Mayaud C, Chigot V, Sempoux C, Brusset MC, Laborde K, Bellane-Chantelot C, Vassault A, Rahier J, Junien C, Brunelle F, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Robert JJ 2002 Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. A series of 175 cases. *Eur J Pediatr* 161:37–48 [Abstract](#)
- 5 de Lonlay P, Fournet JC, Rahier J, Gross-Morand MS, Poggi-Travert F, Foussier V, Bonnefont JP, Brusset MC, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Junien C 1997 Somatic deletion of the imprinted 11p15 region in sporadic persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy is specific of focal adenomatous hyperplasia and endorses partial pancreatectomy. *J Clin Invest* 100:802–807 [Abstract](#)
- 6 Verkarre V, Fournet JC, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Junien C 1998 Paternal mutation of the sulfonylurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest* 102:1286–1291 [Abstract](#)
- 7 Fournet JC, Mayaud C, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Verkarre V, Castanet M, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Junien C 2001 Unbalanced expression of 11p15 imprinted genes in focal forms of congenital hyperinsulinism: association with a reduction to homozygosity of a mutation in ABCC8 or KCNJ11. *Am J Pathol* 158:2177–2184 [Abstract](#)
- 8 Glaser B, Furth J, Stanley CA, Baker L, Thornton PA, Landau H, Permutt MA 1999 Intragenic single nucleotide polymorphism haplotype analysis of SUR1 mutations in familial hyperinsulinism. *Hum Mutat* 14:23–29 [Abstract](#)
- 9 Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC 1998 Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 338:226–230 [Citation](#)
- 10 Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, Poncz M 1998 Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 338:1352–1357 [Abstract](#)
- 11 Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, Datta V, Malingre HE, Berger R, van den Berg IE 2001 Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of β -oxidation in insulin secretion. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of β -oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* 108:457–465 [Abstract](#)
- 12 Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PRV, James RFL, Milla PJ, Aynsley-Green A, Lindley KJ, Dunne MJ 1998 Loss of functional K_{ATP} channels in β -cells causes persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Nat Med* 2:1344–1347 [Abstract](#)
- 13 Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez G, James RFL, Johnson PRV, Aynsley-Green A, Lu S, Clement JP, Lindley KJ, Seino S, Aguilar-Bryan L

- 14 **Aynsley-Green A, Hussain K, Hall J, Saudubray JM, Nihoul-Fékété C, De Lonlay-Debeney P, Brunelle F, Otonkoski T, Thornton P, Lindley JK** 2000 The practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch Dis Child* 82:F98–F107
- 15 **Touati G, Poggi-Travert F, Ogier de Baulny H, Rahier J, Brunelle F, Nihoul-Fekete C, Czernichow P, Saudubray JM** 1998 Long-term treatment of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy with diazoxide: a retrospective review of 77 cases and analysis of efficacy-predicting criteria. *Eur J Pediatr* 157:628–633 [Abstract](#)
- 16 **Sadeghi-Nejad A, Graeme-Cook FM** 2001 Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 39-2001. A new-born girl with seizures and persistent hypoglycaemia. *N Engl J Med* 345:1833–1839 [Citation](#)
- 17 **Lebrun P, Arkhammar P, Antoine M-H, Nguyen QA, Bondo-Hansen J, Pirotte B** 2000 A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* 43:723–732 [Abstract](#)
- 18 **Boverie S, Antoine MH, de Tullio P, Somers F, Becker B, Sebille S, Lebrun P, Pirotte B** 2001 Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium-channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1, 2, 4benzothiadiazine 1, 1-dioxide (BPDZ 73): introduction of heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1, 1-dioxide ring. *J Pharm Pharmacol* 53:973–980 [Abstract](#)
- 19 **Pirotte B, Antoine MH, de Tullio P, Hermann M, Herchuelz A, Delarge J, Lebrun P** 1994 A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochem Pharmacol* 47:1381–1386 [Abstract](#)
- 20 **Antoine MH, Pirotte B, Hermann M, de Tullio P, Delarge J, Herchuelz A, Lebrun P** 1994 Cationic and secretory effects of BPDZ 44 and diazoxide in rat pancreatic islets. *Experientia* 50:830–832 [Abstract](#)
- 21 **Lebrun P, Malaisse WJ, Herchuelz A** 1982 Evidence for two distinct modalities of Ca²⁺ influx into pancreatic B cell. *Am J Physiol* 242:E56–E66 [Abstract](#)
- 22 **Lebrun P, Antoine M-H, Ouedraogo R, Kane C, Dunne MJ, Hermann M, Herchuelz A, Masereel B, Delarge J, de Tullio P, Pirotte B** 1996 Activation of ATP-dependent K⁺ channels and inhibition of insulin release: effect of BPDZ 62. *J Pharmacol Exp Ther* 277:156–162 [Abstract](#)
- 23 **Becker B, Antoine M-H, Nguyen QA, Rigo B, Cosgrove KE, Barnes PD, Dunne MJ, Pirotte B, Lebrun P** 2001 Synthesis and characterization of a quinolinonic compound activating ATP-sensitive K⁺ channels in endocrine and smooth muscle tissues. *Br J Pharmacol* 134:375–385 [Abstract](#)
- 24 **Leclercq-Meyer V, Marchand J, Woussen-Colle M-C, Giroix M-H, Malaisse WJ** 1985 Multiple effects of leucine on glucagon, insulin and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 116:1168–1174 [Abstract](#)
- 25 **Straub SG, Cosgrove KE, Åmmälä C, Shepherd RM, O'Brien RE, Barnes PD, Kuchinski N, Chapman JC, Schaeppl M, Glaser B, Lindley KJ, Sharp GWG, Aynsley-Green A, Dunne MJ** 2001 Hyperinsulinism of infancy: the regulated release of insulin by K_{ATP} channel-independent pathways. *Diabetes* 50: 329–339 [Abstract](#)
- 26 **Chapman JC, McClenaghan NH, Cosgrove KE, Hashmi MN, Shepherd RM, Giesberts AN, White SJ, Åmmälä C, Flatt PR, Dunne MJ** 1999 ATP-sensitive potassium channels and efaroxan-induced insulin release in the electrofusion-derived BRIN-BD11 β-cell line. *Diabetes* 48:2349–2357 [Abstract](#)
- 27 **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ** 1981 Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85–100 [Abstract](#)
- 28 **Dunne MJ, Illot MC, Petersen OH** 1987 Interactions of diazoxide, tolbutamide and ATP⁴⁻ on nucleotide-

dependent K⁺ channels in an insulin-secreting cell line. *J Membr Biol* 99:215–224 [Abstract](#)

29 **De Tullio P, Pirotte B, Somers F, Boverie S, Lacan F, Delarge J** 1998 Study of the ring closure reaction of o-aminoarylsulfonamides with 1, 1'-thiocarbonyldiimidazole. *Tetrahedron* 54:4935–4942

30 **Raffa L, Di Bella M, Ferrari P, Rinaldi M, Ferrari W** 1974 Cardiovascular effect of the 1, 2, 4-benzothiadiazine-1, 1-dioxide. *IV Farmaco* 29:411–423 [Citation](#)

31 **Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P, Blaydon D, Smith VV, Milla PJ, Hussain K, Furth-Lavi J, Cosgrove KE, Shepherd RM, Barnes PD, O'Brien RE, Farndon PA, Liu X, Sowden J, Malcolm S, Dunne MJ, Aynsley-Green A, Glaser B** 2000 A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher Type 1C gene. *Nat Genet* 26:56–60 [Abstract](#)

32 **Lawson K, Dunne MJ** 2001 Peripheral channelopathies as targets for potassium channel openers. *Expert Opin Investig Drugs* 10:1345–1359 [Abstract](#)

33 **Cosgrove KE, Barnes PD, O'Brien RE, Rahier J, Fournet J-C, Junien C, Nihoul-Fekete C, Swift SM, Lindley KJ, Glaser B, Saudubray J-M, Aynsley-Green A, Dunne MJ** 2001 Typing hyperinsulinism of infancy from a cohort of 68 patients. *Pediatr Res* 49:44A

34 **Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement 4th JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J** 1996 Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 272:1785–1787 [Abstract](#)

35 **Otonkoski T, Ämmälä C, Huopio H, Cote GJ, Chapman JC, Cosgrove KE, Ashfield R, Huang E, Komulainen J, Ashcroft FM, Dunne MJ, Kere J, Thomas PM** 1999 A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy in Finland. *Diabetes* 48:408–415 [Abstract](#)

36 **Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA, Shyng S-L** 2001 Defective trafficking and function of K_{ATP} channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2882–2887 [Abstract](#)

37 **Zucker LM, Antoniadou HN** 1972 Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty." *Endocrinology* 90:1320–1330 [Citation](#)

38 **Alemzadeh R, Slonim AE, Zadnowicz MM, Maturo J** 1993 Modification of insulin resistance by diazoxide in obese Zucker rats. *Endocrinology* 133:705–712 [Abstract](#)

39 **Alemzadeh R, Jacobs W, Pitukcheewanont P** 1996 Anti-obesity effect of diazoxide in obese Zucker rats. *Metabolism* 45:334–351 [Abstract](#)

40 **Hensley IE, Lawler JE, Alemzadeh R, Holshouser SJ** 2001 Diazoxide effects on hypothalamic and extra-hypothalamic NPY content in Zucker rats. *Peptides* 22:899–908 [Abstract](#)

41 **Rasmussen SB, Sorensen TS, Hansen JB, Mandrup-Poulsen T, Hornum L, Markholst H** 2000 Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual β -cell function and mass in acutely diabetic BB rats. *Horm Metab Res* 32:294–300 [Abstract](#)

42 **Greenwood RH, Mahler RF, Hales CN** 1976 Improvement in insulin secretion in diabetes after diazoxide. *Lancet* 1:444–447 [Abstract](#)

43 **Bjork E, Berne C, Kampe O, Wibell L, Oskarsson P, Karlsson FA** 1996 Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* 45:1427–1430 [Abstract](#)

44 **Alemzadeh R, Langley G, Upchurch L, Smith P, Slonim AE** 1998 Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1911–1915

45 **Leahy JL, Bumbalo LM, Chen C** 1994 Diazoxide causes recovery of β -cell glucose responsiveness in 90% pancreatectomized diabetic rats *Diabetes* 43: 173–179 [Abstract](#)

46 **Wahl P, Dabrowski M, Boonen H, Olsen HR, Kofod H, Bondo-Hansen J** 2002 A novel diazoxide analogue selectively activates SUR1/Kir6.2 channels *Diabetes* 50:A352–A353

Annexe 5

2-Alkyl-3-Alkylamino-2H-Benzo- and Pyridothiadiazine 1,1-Dioxides: From K^+_{ATP} Channel Openers to Ca^{++} Channel Blockers?

Raogo Ouedraogo¹, Bénédicte Becker¹,
Stéphane Boverie², Fabian Somers²,
Marie-Hélène Antoine¹, Bernard Pirotte²,
Philippe Lebrun¹ and Pascal de Tullio^{2,*}

¹Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808 route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium

²Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Université de Liège, 1 avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium

* Corresponding author

A series of 2-alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- and 2-alkyl-3-alkylamino-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides, structurally related to BPDZ 44 and BPDZ 73, two potent pancreatic B-cells K^+_{ATP} channel openers, were synthesized and tested on rat pancreatic islets (endocrine tissue) as well as on rat aorta rings (vascular smooth muscle tissue). Alkylation of the 2-position led to double bond tautomerization and formation of compounds with a 2H-conformation. In contrast to the previously described pyridothiadiazine dioxides, such as BPDZ 44, and 7-chlorobenzo-thiadiazine dioxides, such as BPDZ 73, the 2-alkyl-substituted analogs were found to be poorly active on the insulin releasing process although most drugs exhibited a vasorelaxant activity. As a result, the new 2-alkyl-substituted pyridinic compounds expressed a selectivity profile (vascular smooth muscle tissue vs pancreatic tissue) opposite to that of their non-alkyl-substituted counterparts, *i.e.* BPDZ 44. Additional investigations revealed that, in contrast to their non 2-alkyl-substituted analogs, the most interesting 2-methyl-substituted derivatives did not express the pharmacological profile of classical K^+_{ATP} channel openers. The pharmacological results rather suggest that alkylation of the 2-position of the thiadiazine ring led to drugs that could act as Ca^{2+} channel blockers rather than as potassium channel openers.

Key words: BPDZ 44/BPDZ 73/Inhibition of insulin release/Potassium channel openers/Vasorelaxant activity

Introduction

In recent years there has been increasing interest in the study of potassium channels and particularly for those regulated by changes in intracellular levels of adenosine triphosphate (K^+_{ATP} channels; Ashcroft *et al.*, 1998; Seino *et al.*, 1999). K^+_{ATP} channels, which play a crucial role in controlling the membrane potential (Edwards *et al.*, 1993), have been identified in a wide range of cell types including pancreatic B-cells (Cook *et al.*, 1984), vascular and non-vascular smooth muscle cells (Quayle *et al.*, 1997), skeletal muscle cells (Allard *et al.*, 1993), cardiac cells (Noma, 1983) and central neurons (Bernardi *et al.*, 1988). Several drugs were found to activate the K^+_{ATP} channels (cromakalim, diazoxide, pinacidil, aprikalim *etc.*; Robertson *et al.*, 1990). Such compounds, named potassium channel openers (PCOs), were shown to hyperpolarize the cytoplasmic membrane of excitable cells which, in turn, reduced the activity of voltage-dependent calcium channels (Kolb *et al.*, 1990; Longman *et al.*, 1992). As a result, PCOs are able to inhibit insulin release from pancreatic B-cells (Lebrun *et al.*, 1992) and to provoke the relaxation of different smooth muscles (Quast, 1993). In the search for new PCOs, we previously reported the synthesis and biological evaluation of 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides (**3**) bearing short and branched alkylamino side chains at the 3-position (Figure 1; Pirotte *et al.*, 1993; de Tullio *et al.*, 1996). These derivatives might be regarded as hybrid compounds be-

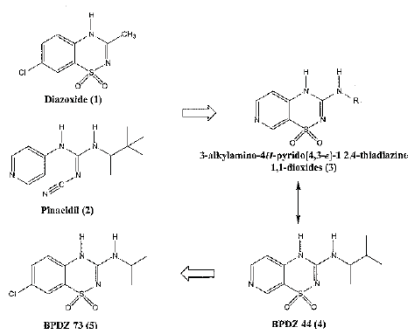


Fig. 1 Derivatization of Diazoxide and Pinacidil.
R = short and branched alkyl side chain.

tween diazoxide (1) and pinacidil (2), two potent PCOs (Figure 1). Among drugs of this original series, BPDZ 44 (4) (Figure 1) appeared to be more active on the endocrine pancreatic tissue than on the vascular tissue (de Tullio *et al.*, 1996). Moreover, pharmacological investigations revealed that the cytoplasmic membrane K_{ATP} channels were the target sites for these new compounds (Pirodda *et al.*, 1994; Lebrun *et al.*, 1996). Keeping in mind the therapeutic interest of drugs inhibiting insulin secretion, pancreatic B-cell-selective PCOs may be expected to be promising compounds for the treatment of several metabolic disorders (type I and type II diabetes, obesity etc.; Björk *et al.*, 1996; Lebrun *et al.*, 2000). In the continuation of our previous works, we recently synthesized 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, BPDZ 73 (5) (Figure 1; Lebrun *et al.*, 2000). While this drug was found to be much more potent than BPDZ 44 and diazoxide in interfering with the endocrine pancreatic function, BPDZ 73 was also poorly active at reducing the contractile activity of aorta rings (Lebrun *et al.*, 2000). Moreover, it was demonstrated that the inhibitory effect of the drug on the insulin-releasing process was related to its ability to activate pancreatic B-cells K_{ATP} channels (Lebrun *et al.*, 2000).

In order to evaluate the effect of the introduction of an alkyl substituent in the 2-position of the thiadiazine ring, we prepared 2-methyl- and 2-ethyl-substituted analogs of the most active drugs in the 4*H*-benzo- and the 4*H*-pyridothiadiazine 1,1-dioxide series. This modulation led to double bond tautomerization and formation of compounds with a 2*H*-conformation. The 2-alkyl-3-alkylamino-2*H*-benzo- and 2-alkyl-3-alkylamino-2*H*-pyridothiadiazine 1,1-dioxides (6 and 7, Figure 2) synthesized were evaluated in two pharmacological models: rat pancreatic B-cells and rat aorta rings. Moreover, further biological investigations were conducted in order to elucidate whether the physiological actions of the drugs were related to the modulation of K_{ATP} channels.

Results and Discussion

Chemistry

The 3-alkylamino-2-methyl- and 3-alkylamino-2-ethyl-2*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides (14 to 22), as well as the 3-alkylamino-7-chloro-2-methyl-2*H*-

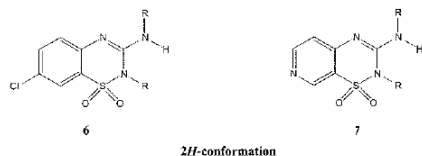


Fig. 2 2-Alkyl-3-Alkylamino-2*H*-Benzo- and 2-Alkyl-3-Alkylamino-2*H*-Pyridothiadiazine 1,1-Dioxides.

R = methyl or ethyl; R' = short and branched alkyl side chain.

1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (29 to 32), were obtained by nucleophilic substitution conducted with the appropriate alkylamine on 3-methylsulfonyl-substituted intermediates (12, 13 or 28, Figures 3 and 4). In the pyridinic series, these intermediates (12 and 13) were pre-

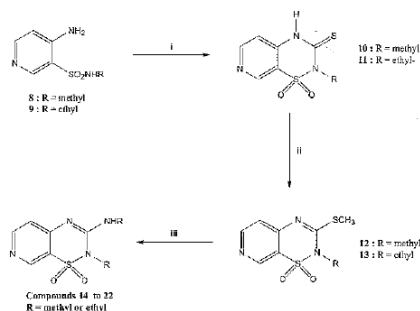


Fig. 3 Synthesis of the Pyridinic Series of Compounds

Reagents: (i) *N,N*-thiocarbonyldiimidazole, dioxane, DMF; (ii) CH_3I ; (iii) alkylamine, Δ

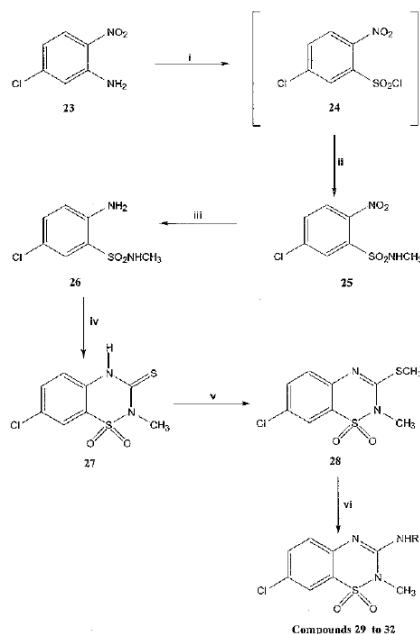


Fig. 4 Synthesis of the Benzenic Series of Compounds

Reagents: (i) 1. NaNO_2 , HCl ; 2. CuCl_2 , HOAc , SO_2 ; (ii) CH_3NH_2 ; (iii) NH_4Cl , Fe ; (iv) *N,N*-thiocarbonyldiimidazole; (v) CH_3I ; (vi) alkylamine.

pared starting from *N*-methyl- (de Tullio *et al.*, 1995) and *N*-ethyl-4-aminopyridine-3-sulfonamide (**8** and **9**). Compounds **8** and **9** were treated with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole to give the corresponding 2-methyl- (de Tullio *et al.*, 1998) and 2-ethyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides (**10** and **11**). Subsequent treatment with methyl iodide led to the expected 3-methylsulfanyl-substituted intermediates (**12** and **13**; de Tullio *et al.*, 1999). It should be noted that these 2-alkyl-3-methylsulfanyl-substituted intermediates exhibited a higher reactivity toward nucleophilic substitution than their non alkyl-substituted counterparts. Such a feature could be related to the higher electrophilicity of the carbon atom bearing the leaving group in the 2-alkyl-substituted compounds.

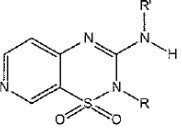
In the 7-chloro-benzenic series, the starting material was 5-chloro-2-nitroaniline (**23**) (Figure 4). A Sandmeyer-Meerwein reaction led to 5-chloro-2-nitrobenzenesulfonyl chloride (**24**). The corresponding *N*-methylbenzenesulfonamide (**25**) was obtained by treatment of compound **24** with an aqueous solution of methylamine. The nitro function was reduced by iron powder and the ring closure of *N*-methyl-5-chloro-2-aminobenzenesulfonamide (**26**), leading to **27**, occurred by reaction with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (de Tullio *et al.*, 1998). The corresponding 3-methylsulfanyl-substituted intermediate (**28**; Di Bella *et al.*, 1973) was prepared from the 3-

thioxo derivative (**27**) by methylation with methyl iodide. The methylsulfanyl group was subsequently substituted with different alkylamines. This reaction needed to be conducted in moderate heating conditions and led to the formation of many by-products. Several purification steps such as crystallisation and flash chromatography were required to obtain the pure final compounds.

Pharmacological Evaluation

We introduced short and branched alkylamino side chains (methylamino-, isopropylamino-, 2-butylamino-, 3-methyl-2-butylamino-, 3,3-dimethyl-2-butylamino-) in the 3-position of the 2-alkyl-2*H*-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides. This choice was suggested by our previous investigations, with 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides devoid of an alkyl substituent in the 2-position, indicating that such alkylamino chains were of particular interest for revealing K_{ATP} channel opening properties (Pirrotte *et al.*, 1993; de Tullio *et al.*, 1996). Moreover, in the 2-methyl-substituted pyridinic series, we also explored in the present study the introduction of a cyclohexylmethylamino side chain as an example of more bulky substituent. The ability of these different compounds to inhibit the glucose-induced insulin secretion was evaluated on isolated rat pancreatic islets. Table 1 reports the *in vitro* results expressed as the percentage of

Table 1 Effects of 2-Alkyl-3-Alkylamino-2*H*-Benzo- and 2-Alkyl-3-Alkylamino-2*H*-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Release from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of Rat Aorta Rings.

Compound no			% RIS $\pm$ SEM (n) at 50 μ M ^a	EC ₅₀ values in μ M $\pm$ SEM (n) ^b
	R	R'		
Diazoxide	—	—	28.8 $\pm$ 2.4 (21) ¹⁴	19.3 $\pm$ 1.5 (21) ²⁰
BPDZ 44	—	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	7.1 $\pm$ 0.6 (14) ²⁰	154.4 $\pm$ 14.5 (8) ²⁰
BPDZ 73	—	CH(CH ₃) ₂	5.7 $\pm$ 0.5 (35) ²⁰	36.3 $\pm$ 2.2 (6) ²⁰
14	CH ₃	CH ₃	90.2 $\pm$ 3.2 (30)	189.8 $\pm$ 24.3 (5)
15	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	109.5 $\pm$ 3.9 (13)	42.3 $\pm$ 3.8 (11)
16	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	113.1 $\pm$ 7.7 (16)	23.0 $\pm$ 4.9 (10)
17	CH ₃	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	88.4 $\pm$ 6.7 (14)	26.9 $\pm$ 3.8 (9)
18	CH ₃	CH(CH ₃)C(CH ₃) ₃	108.4 $\pm$ 6.5 (16)	23.5 $\pm$ 4.8 (11)
19	CH ₃	CH ₂ -cyclohexyl	63.4 $\pm$ 4.2 (17)	21.3 $\pm$ 2.8 (6)
20	C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	73.5 $\pm$ 4.0 (15)	38.8 $\pm$ 11.8 (6)
21	C ₂ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	80.5 $\pm$ 6.6 (15)	22.0 $\pm$ 3.8 (6)
22	C ₂ H ₅	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	89.5 $\pm$ 3.5 (16)	35.3 $\pm$ 2.6 (4)
29	CH ₃	CH ₃	79.5 $\pm$ 3.0 (30)	30.3 $\pm$ 2.9 (7)
30	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	107.1 $\pm$ 6.7 (23)	144.4 $\pm$ 18.2 (6)
31	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	46.4 $\pm$ 1.9 (30)	39.6 $\pm$ 2.8 (9)
32	CH ₃	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	12.7 $\pm$ 0.6 (32)	26.8 $\pm$ 3.0 (11)

^aPercentage of residual insulin secretion (RIS) from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose

^bDrug concentration giving 50% relaxation of 30 mM KCl-induced contraction of rat aorta ring

residual insulin release at a drug concentration of 50 μM . The 3-alkylamino derivatives BPDZ 44 (pyridinic series) and BPDZ 73 (7-chlorobenzenic series), as well as diazoxide, were used as reference compounds.

As shown in Table 1, and except for compound **32**, none of the 2-alkyl-substituted derivatives exhibited a marked activity at inhibiting insulin secretion from rat pancreatic islets. By comparison with the non-alkyl-substituted compounds (**17** versus BPDZ 44 and **30** versus BPDZ 73), our data mainly indicated that alkylation of the 2-position of the thiadiazine ring is unfavorable for activity (Table 1). However, in the benzothiadiazine series, we have noted an increase of activity with the enhancement of the steric hindrance of the alkylamino side chain in the 3-position (see Table 1, compounds **29–32**). At this stage, we do not know if the activity in this series could be related to their ability to open the K_{ATP} channels or to another mechanism of action.

The myorelaxant activity of the new compounds was evaluated on KCl-contracted aorta rings. The results are expressed as the EC_{50} values (Table 1).

In the pyridinic series (compounds **14** to **22**), and compared to the reference compound BPDZ 44, an increase in the myorelaxant activity of the 2-alkyl-substituted drugs was generally observed. Most compounds exhibited a vasorelaxant effect similar to that of diazoxide (19 μM) (Ouedraogo *et al.*, 2000). An increase in the size of the alkyl substituent in the 2-position (ethyl versus

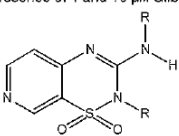
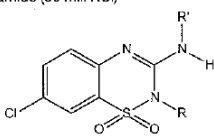
methyl) failed to exert major impact on both the myorelaxant and the pancreatic activity.

Taken together, these results indicate that the new 2-alkyl-substituted pyridinic compounds possess a tissue selectivity (vascular smooth muscle versus pancreatic tissue) opposite to that of their non-alkyl-substituted counterparts (*i.e.* BPDZ 44).

In the 7-chlorobenzenic series (compounds **29** to **32**), except for the strict 2-methyl-substituted analog of BPDZ 73 (compound **30**), the new derivatives exhibited a myorelaxant activity roughly of the same amplitude than that of diazoxide, BPDZ 73 and their pyridinic counterparts. Thus, the bioisosteric replacement of the pyridinic ring with a chlorobenzene ring associated with the alkylation in the 2-position failed to exert any marked effect on their vasodilator potency. The weak vasorelaxant activity of compound **30** remained, however, surprising.

In order to define whether the vasorelaxant properties of these new drugs were related to their ability to activate K_{ATP} channels, additional pharmacological studies were performed. First, diazoxide and selected 2-alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- and 2-alkyl-3-alkylamino-2H-pyrido [4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides were tested on 30 mM KCl-depolarized rat aorta rings in the presence of 1 and 10 μM glibenclamide, a specific blocker of K_{ATP} channels (Edwards *et al.*, 1993). Glibenclamide provoked a concentration-dependent rightward shift of the dose-response curve for diazoxide (increase in EC_{50} values),

Table 2 Myorelaxant Effects of Selected 2-Alkyl-3-Alkylamino-2H-Benzo- and 2-Alkyl-3-Alkylamino-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxides on 30 mM and 80 mM KCl-Precontracted Rat Aorta Rings, in the Absence or Presence of 1 and 10 μM Glibenclamide (30 mM KCl)

				
	15 to 18		29, 31 and 32	
Compound no	EC_{50} values in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ (n) ^a 0 μM glib	EC_{50} values in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ (n) 1 μM glib ^b	EC_{50} values in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ (n) 10 μM glib ^c	EC_{50} values in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ (n) 80 mM KCl ^c
Diazoxide	19.5 $\pm$ 2.7 (6) ²⁵	85.8 $\pm$ 22.2 (6) ²⁶	163.4 $\pm$ 41.2 (6) ²⁵	> 300 (6) ²⁵
Verapamil	0.06 $\pm$ 0.02 (4) ²⁵	0.07 $\pm$ 0.02 (4) ²⁵	0.07 $\pm$ 0.02 (4) ²⁵	0.05 $\pm$ 0.02 (4) ²⁵
15	41.5 $\pm$ 4.9 (7)	38.5 $\pm$ 7.5 (7)	39.0 $\pm$ 5.5 (7)	50.6 $\pm$ 14.1 (4)
16	15.9 $\pm$ 3.9 (6)	20.5 $\pm$ 2.8 (6)	27.5 $\pm$ 2.0 (6)	44.1 $\pm$ 2.8 (4)
17	18.1 $\pm$ 1.7 (5)	24.3 $\pm$ 6.0 (5)	22.2 $\pm$ 5.7 (5)	50.1 $\pm$ 6.8 (5)
18	20.0 $\pm$ 6.8 (6)	25.3 $\pm$ 5.8 (6)	33.0 $\pm$ 6.4 (6)	11.1 $\pm$ 1.4 (6)
29	32.3 $\pm$ 2.8 (4)	34.6 $\pm$ 4.0 (4)	32.6 $\pm$ 4.0 (4)	31.1 $\pm$ 4.4 (4)
31	39.4 $\pm$ 2.9 (4)	53.9 $\pm$ 9.3 (4)	53.4 $\pm$ 9.3 (4)	30.4 $\pm$ 4.8 (4)
32	25.1 $\pm$ 3.4 (6)	35.9 $\pm$ 6.8 (5)	51.7 $\pm$ 9.2 (4)	23.0 $\pm$ 6.1 (4)

^aDrug concentration giving 50% relaxation of 30 mM KCl-induced contraction

^bDrug concentration giving 50% relaxation of 30 mM KCl-induced contraction in the presence of 1 or 10 μM glibenclamide

^cDrug concentration giving 50% relaxation of 80 mM KCl-induced contraction

the reference PCO (Table 2). By contrast, the vasorelaxant activity of the 2-methyl-substituted derivatives was unaffected by the presence of 1 μ M glibenclamide in the physiological medium ($p > 0.05$). At a higher concentration, the K_{ATP} channel blocker only interfered with the myorelaxant effect of compound **16** and **32** ($p < 0.05$).

Second, the myorelaxant activity of these compounds was further examined on rat aorta rings precontracted with a high potassium ion concentration (80 mM). Under these experimental conditions, the vasodilator efficiency of pure PCOs should be markedly reduced while that of drugs interfering directly at the level of Ca^{2+} channels (i.e. Ca^{2+} entry blockers) should persist (Ousdraogo *et al.*, 2000). As shown in Table 2, the effect of diazoxide, the reference PCO, was completely suppressed. The vasorelaxant properties of the Ca^{2+} entry blocker verapamil were, however, unaffected (Table 2). Incidentally, the presence of glibenclamide in the incubation medium also failed to interfere with the myorelaxant effect of verapamil (Table 2). In the presence of 80 mM KCl in the external solution, the vasorelaxant activity of the 2-methyl-substituted derivatives was clearly maintained although the effects of compounds **16** and **17** were reduced ($p < 0.05$) (Table 2).

Taken as a whole, these results indicate that, in contrast to diazoxide, none of the new compounds exhibit the pharmacological profile of pure K_{ATP} channel openers. Our data rather suggest that most of the 2-methyl-substituted analogues of the 3-alkylamino-benzo- and 3-alkylamino-pyridothiadiazine 1,1-dioxides could act as Ca^{2+} channel blockers or as mixed K_{ATP} and Ca^{2+} channels modulators. Further pharmacological experiments are needed to completely elucidate the mechanism of action of these drugs.

Incidentally, some of the evaluated compounds carry a stereogenic centre on the alkylamino side chain in the 3-position. Since the chiral configuration seems to be important for the activation of vascular smooth muscle K_{ATP} channels by pyridothiadiazine dioxides (i.e. *R*-BPDZ 44 is more active on the vascular smooth muscles than *S*-BPDZ 44; Khelili *et al.*, 1999), it would be interesting to study the influence of the stereochemistry of the alkylamino side chain on the myorelaxant activity of the drugs. Such data could be of interest for the understanding of the biological targets of these derivatives.

Crystallographic data obtained with the 3-methylamino-substituted compounds **14** (de Tullio *et al.*, 1999) and **29** (Dupont *et al.*, 2001) clearly indicated that these derivatives exist as 2*H*-tautomers (II, Figure 5). Moreover, a difference of 180° was noted for the dihedral angle N(2)-C(3)-N(exocyclic)-C(alkyl) between non 2-substituted derivatives (de Tullio *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 1999) (I, Figure 5) and 2-alkyl-substituted derivatives (II, Figure 5; opposite orientation of the alkyl chain in the 3-position). Such a structural change could explain the significant modification of the pharmacological profile of the 2-alkyl-3-alkylamino-2*H*-benzo- and the 2-alkyl-3-alkylamino-2*H*-pyridothiadiazine 1,1-dioxides compared

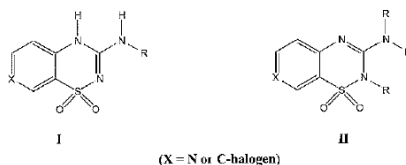


Fig. 5 Main Tautomeric Forms Adopted by Non-2-Substituted 3-Alkylamino-4*H*-Benzo- and 3-Alkylamino-4*H*-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxides (I) as well as by 2-Alkyl-Substituted 3-Alkylamino-2*H*-Benzo- and 3-Alkylamino-2*H*-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxides (II).

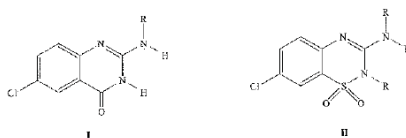


Fig. 6 3*H* Tautomer of 2-Alkylamino-6-Chloroquinazolin-4-Ones (I) and 2*H* Tautomer of 3-Alkylamino-2-Alkyl-7-Chloro-Benzothiadiazine 1,1-Dioxides (II)
R and R' = alkyl chains

with their previously described non-2-alkyl-substituted counterparts. The chemical structure of these 2-alkyl derivatives is quite different from that of the main Ca^{2+} entry blockers (i.e. verapamil, nifedipine, diltiazem). However, due to their 2*H*-tautomeric forms, the 2-alkyl drugs appeared to be very similar to the recently described 2-alkylamino-6-halogenoquinazolin-4(3*H*)-ones (I, Figure 6; Somers *et al.*, 2001). The latter compounds were presented as PCOs at the pancreatic level but their vasorelaxant properties resulted from a more complex mechanism of action including a blocking effect of the Ca^{2+} channels.

Conclusions

In summary, we have synthesized 2-methyl-substituted and 2-ethyl-substituted analogs of previously reported 3-alkylamino-4*H*-benzo- and 3-alkylamino-4*H*-pyridothiadiazine 1,1-dioxides, such as BPDZ 44 and BPDZ 73, known to be very active as pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers. This chemical modulation yielded molecules without a hydrogen atom in the 4-position and for which the 2*H*-conformation was constrained. Alkylation of the 2-position of the thiadiazine ring generally led to a strong decrease of the ability of the drugs to inhibit insulin release, while their vasorelaxant activity was maintained or even increased when compared to that of the non-alkyl-substituted analogs. Further pharmacological studies have shown that, on the vascular model, the 2-methylated drugs did not act through activation of K_{ATP} channels but could rather interfere at the Ca^{2+} channels level.

Thus, a small structural modification elicited important changes in both the mechanism of action and the pharmacological profile of the drugs. Our data further confirm the previously reported pharmacophoric model for an agonistic activity on the pancreatic K_{ATP} channel (de Tullio *et al.*, 1996). Indeed, the presence of a hydrogen atom at the 4-position and the orientation of the alkyl chain located on the exocyclic nitrogen atom in the 3-position are key features for activity on B-cells. Finally, the present results suggest that, at the vascular level, there is a thin structural frontier between the 3-alkylamino-arylthiadiazine 1,1-dioxides acting mainly as PCOs and the 2-alkyl-3-alkylamino-arylthiadiazine 1,1-dioxides acting mainly through other mechanisms (probably as Ca^{2+} entry blockers). Additional investigations are required to fully elucidate the mechanism(s) of action of these new drugs.

Materials and Methods

Synthesis of Compounds

Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FT spectrophotometer (Perkin-Elmer). ^1H NMR spectra were taken on a Bruker AW-80 instrument (Bruker Belgium, Brussels, Belgium) in $DMSO-d_6$ with HMDS as internal standard. Chemical shifts are reported in δ units (ppm) relative to internal HMDS (key: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, b = broad). Elemental Analysis (C, H, N, S) were performed on a Carlo-Erba EA 1108-elemental analyser (and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values). All reactions were routinely checked by TLC on silica gel Merck 60F 254 (Merck, Darmstadt, Germany).

2-Methyl-3-Thioxo-3,4-Dihydro-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (10)

The title compound was obtained as described in the literature (de Tullio *et al.*, 1998) starting from *N*-methyl-4-aminopyridine-3-sulfonamide **8** (86%).

2-Ethyl-3-Thioxo-3,4-Dihydro-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (11)

A solution of *N*-ethyl-4-aminopyridine-3-sulfonamide **9** (3 g, 15 mmol) and *N,N'*-thiocarbonyldiimidazole (5.3 g, 30 mmol) in dioxane (20 ml) and DMF (10 ml) was refluxed for 2 h. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was dissolved in a 5% w/v aqueous solution of NaOH (20 ml, 0.025 mol). The solution was treated with charcoal, filtered and the filtrate was adjusted to pH 4 with formic acid. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (66%); mp 168–171°C. IR (KBr) 3437 (N–H), 1589, 1524, 1479 (N–H, C–N, C=C), 1329, 1116 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 1.2 (t, 3H, 2- CH_2 - CH_3), 4.3 (q, 2H, 2- CH_2 - CH_3), 7.3 (d, 1H, 5-H), 8.7 (d, 1H, 6-H), 9.0 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($C_8H_8N_4O_2S_2$) C, H, N, S.

2-Methyl-3-Methylsulfanyl-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (12)

The title compound was obtained as described in the literature (de Tullio *et al.*, 1999), starting from 2-methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **10** (85%).

2-Ethyl-3-Methylsulfanyl-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (13)

2-Ethyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **11** (3 g, 12.3 mmol) was dissolved in dry acetonitrile (50 ml) and supplemented with anhydrous potassium carbonate (3 g, excess) and methyl iodide (3 ml). The mixture was stirred during 30 min at room temperature. Water (200 ml) was added to the solution and the pH was adjusted to pH 7 with formic acid. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (63%); mp 177–180°C. IR (KBr) 3452 (N–H), 1586, 1519, 1468 (N–H, C=N, C=C), 1334, 1184 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 1.3 (t, 3H, 2- CH_2 - CH_3), 2.6 (s, 3H, S- CH_3), 4.0 (q, 2H, 2- CH_2 - CH_3), 7.3 (d, 1H, 6-H), 8.7 (d, 1H, 6-H), 8.9 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($C_{10}H_{11}N_4O_2S_2$) C, H, N, S.

2-Methyl-3-Methylamino-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (14)

The title compound was obtained as described in the literature (de Tullio *et al.*, 1999), starting from 2-methyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **12** (75%).

3-(Isopropylamino)-2-Methyl-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (15)

2-Methyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **12** (0.2 g, 0.88 mmol) and isopropylamine (2 ml) were stirred at room temperature for 2 h. The excess of the amine was removed under reduced pressure. Water (15 ml) was added to the residue and the precipitate was collected by filtration, washed with water and crystallized in methanol-water 1:1 (46%); mp 117–118°C. IR (KBr) 3207 (N–H), 1531, 1479 (N–H, C=N, C=C), 1337, 1165 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 1.1 (d, 6H, 3-NH- $CH(CH_3)_2$), 3.2 (s, 3H, 2-N- CH_3), 4.2 (m, 1H, 3-NH- $CH(CH_3)_2$), 7.0 (d, 1H, 5-H), 7.5 (bs, 1H, N-H), 8.4 (d, 1H, 6-H), 8.7 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($C_{10}H_{14}N_4O_2S_2$) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-2-Methyl-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (16)

The title compound was prepared as described for **15** starting from 2-methyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **12** and 2-butylamine (77%); mp 128–129°C. IR (KBr) 3231 (N–H), 1551, 1529, 1479 (N–H, C=N, C=C), 1335, 1169 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 0.8 (t, 3H, 3-NH- $CH(CH_2CH_2CH_3)_2$), 1.1 (d, 3H, 3-NH- $CH(CH_2CH_2CH_3)_2$), 1.5 (m, 2H, 3-NH- $CH(CH_2CH_2CH_3)_2$), 3.2 (s, 3H, 2-N- CH_3), 4.0 (m, 1H, 3-NH- $CH(CH_2CH_2CH_3)_2$), 7.0 (d, 1H, 5-H), 7.55 (bs, 1H, N-H), 8.4 (d, 1H, 6-H), 8.7 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($C_{11}H_{16}N_4O_2S_2$) C, H, N, S.

R/S-2-Methyl-3-(3-Methyl-2-Butylamino)-2H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide Hydrochloride (17)

The mixture of 2-methyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **12** (0.5 g, 2 mmol) and 3-methyl-2-butylamine (3 ml) was refluxed for 3 h. The excess of the amine was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using silica gel (Kieselgel 60 Merck 230–400 mesh) and $AcOEt$. The crude oily product was triturated with a solution of diethylether saturated with gaseous HCl. The white precipitate was collected by filtration, washed with diethylether and dried (86%); mp 85–90°C. IR (KBr) 3188 (N–H), 1577, 1521 (N–H, C=N, C=C), 1353, 1172 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 0.9 (d, 6H, 3-NH- $CH(CH_3)CH(CH_2CH_3)_2$), 1.2 (d, 3H, 3-NH- $CH(CH_3)CH(CH_2CH_3)_2$), 1.8 (m, 1H, 3-NH- $CH(CH_3)CH(CH_2CH_3)_2$), 3.4 (s, 3H, 2-N- CH_3), 4.1 (m, 1H, 3-NH- $CH(CH_3)CH(CH_2CH_3)_2$).

(CH₃)₂, 7.3 (d, 1H, 5-*H*), 8.5 (d, 1H, 6-*H*). 8.8 (bs, 1H, *N-H*), 9.1 (s, 1H, 8-*H*). Element anal. (C₁₂H₁₃N₄O₂S·HCl) C, H, N, S.

R/S-3-(3,3-Dimethyl-2-Butylamino)-2-Methyl-2H-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide Hydrochloride (18)

The title compound was obtained as described for compound **16**, starting from 2-methyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **12** and 3,3-dimethyl-2-butylamine (60%); mp 110–118°C; IR (KBr) 3190 (N-H), 1574, 1522, 1483 (N-H, C=N, C=C), 1355, 1172 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.9 (s, 9H, 3-NH-CH(CH₃)₂CH₃), 1.1 (d, 3H, 3-NH-CH(CH₃)₂CH₃), 3.4 (s, 3H, 2-N-CH₃), 4.0 (bs, 1H, 3-NH-CH(CH₃)₂CH₃), 7.3 (d, 1H, 5-*H*), 8.3 (bs, 1H, *N-H*), 8.5 (d, 1H, 6-*H*), 9.0 (s, 1H, 8-*H*). Element anal. (C₁₈H₂₆N₄O₂S·HCl) C, H, N, S.

3-(Cyclohexylmethylamino)-2-Methyl-2H-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (19)

2-Methyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **12** (0.5 g, 2 mmol) was dissolved in dry dioxane (2.5 ml). Cyclohexylmethylamine (0.5 ml) was added to the mixture and the solution was refluxed until completion (monitored by TLC). The solvent and the excess of the amine were removed under reduced pressure. Water (50 ml) was added to the residue and the solution was adjusted to pH 4 with formic acid. The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, dissolved in methanol (15 ml), treated with charcoal and supplemented with water (50 ml). The final product was collected by filtration, washed with water and dried (65%); mp 122–124°C; IR (KBr) 3220 (N-H), 1559, 1536, 1478 (N-H, C=N, C=C), 1334, 1169 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.7–1.1 (m, 11H, C₆H₁₁), 3.2 (bm, 5H, 2-N-CH₃, NH-CH₂-C₆H₁₁), 7.0 (d, 1H, 5-*H*), 7.8 (bs, 1H, *N-H*), 8.5 (d, 1H, 6-*H*), 8.7 (s, 1H, 8-*H*). Element anal. (C₁₄H₂₀N₄O₂S) C, H, N, S.

2-Ethyl-3-(Isopropylamino)-2H-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (20)

2-Ethyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **13** (0.5 g, 1.95 mmol) and isopropylamine (5 ml) were refluxed for a few hours. The excess of the amine was removed under reduced pressure. Water (30 ml) was added to the residue and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (82%); mp 155–160°C; IR (KBr) 3221 (N-H), 1564, 1532, 1475 (N-H, C=N, C=C), 1343, 1161 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.9 (t, 3H, 2-N-CH₂-CH₃), 1.1 (d, 6H, 3-NH-CH(CH₃)₂), 3.9 (q, 2H, 2-N-CH₂-CH₃), 4.2 (m, 1H, 3-NH-CH(CH₃)₂), 7.0 (d, 1H, 5-*H*), 7.7 (bs, 1H, *N-H*), 8.4 (d, 1H, 6-*H*), 8.6 (s, 1H, 8-*H*). Element anal. (C₁₇H₁₈N₄O₂S) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-2-Ethyl-2H-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide (21)

The title compound was prepared as described for **20**, starting from 2-ethyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **13** and 2-butylamine (55%); mp 136–137°C; IR (KBr) 3202 (N-H), 1528, 1477 (N-H, C=N, C=C), 1339, 1157 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.8 (t, 3H, 2-N-CH₂-CH₃), 1.0 (t, 3H, 3-NH-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.1 (d, 3H, 3-NH-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.5 (m, 2H, 3-NH-CH(CH₃)CH₂CH₃), 3.8 (q, 2H, 2-N-CH₂-CH₃), 4.0 (m, 1H, 3-NH-CH(CH₃)CH₂CH₃), 7.0 (d, 1H, 5-*H*), 7.7 (bs, 1H, *N-H*), 8.4 (d, 1H, 6-*H*), 8.6 (s, 1H, 8-*H*). Element anal. (C₁₇H₂₄N₄O₂S) C, H, N, S.

R/S-2-Ethyl-3-(3-Methyl-2-Butylamino)-2H-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-Thiadiazine 1,1-Dioxide Hydrochloride (22)

2-Ethyl-3-methylsulfanyl-2H-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide **13** (0.5 g, 1.95 mmol) and 3-methyl-2-butylamine (5 ml) were refluxed for a few hours. The excess of the amine was removed under reduced pressure. The crude oily product was triturated with a solution of diethylether saturated with gaseous HCl. The white precipitate was collected by filtration, washed with diethylether and dried. The final product was recrystallized in hot nitromethane (60%); mp 180–183°C; IR (KBr) 3178 (N-H), 1570, 1521, 1479 (N-H, C=N, C=C), 1359, 1161 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.8–1.2 (m, 9H, 3-NH-CH(CH₃)CH(CH₃)₂ + 2-N-CH₂-CH₃), 2.0 (m, 1H, 3-NH-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 4.1 (q, 2H, 2-N-CH₂-CH₃), 4.3 (bm, 4H, 3-NH-CH(CH₃)CH(CH₃)₂ + CH₃NO₂), 7.3 (d, 1H, 5-*H*), 8.5 (d, 1H, 6-*H*), 8.9 (bs, 1H, *N-H*), 9.0 (s, 1H, 8-*H*). Element anal. (C₁₇H₂₆N₄O₂S·HCl·CH₃NO₂) C, H, N, S.

5-Chloro-2-Nitrobenzenesulfonyl Chloride (24)

5-Chloro-2-nitroaniline **23** (25 g, 0.155 mol) was dissolved in a mixture of glacial acetic acid and 12 N HCl (2.5:1, 350 ml). An aqueous solution of NaNO₂ (17.5 g, 0.254 mol, 25%) was added dropwise to the cooled nitroaniline solution (t < 5°C). A solution of glacial acetic acid saturated with SO₂ (400 ml) was mixed with an aqueous solution of CuCl₂ (10 g, 0.074 mol, 25%). Maintaining the temperature below 5°C, this mixture was rapidly added to the diazonium salt solution. The solution was poured on ice (600 g). The resulting precipitate was collected by filtration, washed with cold water and dried under reduced pressure. The crude product was used without further purification (45%).

5-Chloro-N-Methyl-2-Nitrobenzenesulfonamide (25)

A solution of 5-chloro-2-nitrobenzenesulfonyl chloride **24** (15 g, 0.062 mol) in dioxane (75 ml) was supplemented dropwise with a 40% (w/v) aqueous solution of methylamine (150 ml). After 45 min, the solvent and the excess of amine were removed under reduced pressure. Water (75 ml) was added to the residue and the solution was adjusted to pH 2 with diluted HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (97%); mp 142–145°C; IR (KBr) 3356, 3110 (N-H), 1589, 1568, 1535 (N-H, C=N, C=C), 1330, 1169 (S=O) cm⁻¹. Element anal. (C₇H₇ClN₂O₂S) C, H, N, S.

2-Amino-5-Chloro-N-Methylbenzenesulfonamide (26)

A mixture of 5-chloro-N-methyl-2-nitrobenzenesulfonamide **25** (7 g, 0.028 mol), iron powder (15 g, excess) and ammonium chloride (2.8 g, 0.052 mol) in methanol-water (50:50, 250 ml) was refluxed for 5–10 min. The solid residue was removed by filtration and the solution was supplemented with sodium hypophosphite (0.7 g). After treatment with charcoal and filtration, methanol was distilled under reduced pressure. After cooling, the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (68%); mp 73–74°C (lit: 77°C; Di Bella *et al.*, 1974); IR (KBr) 3446, 3360, 3307 (N-H), 1635, 1598, 1558 (N-H, C=N, C=C), 1311, 1150 (S=O) cm⁻¹. Element anal. (C₇H₈ClN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Chloro-2-Methyl-3-Thioxo-3,4-Dihydro-2H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide (27)

2-Amino-5-chloro-N-methylbenzenesulfonamide **26** (3 g, 0.0136 mol) was dissolved in a mixture of DMF and dioxane (1:2, 30 ml). The solution was supplemented with 1,1-thiocarbonyldiimidazole (4.5 g, 0.025 mol) and refluxed for 3 h. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was dis-

solved in a 5% w/v aqueous solution of NaOH (200 ml, 0.25 mol). The solution was treated with charcoal, filtered and the filtrate was adjusted to pH 2 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (86%); mp: 121–123°C; IR (KBr) 3163 (N-H), 1598, 1525, 1480 (N-H C=N, C=C), 1337, 1183 (S=O) cm^{-1} . Element anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}_2$) C, H, N, S.

7-Chloro-2-Methyl-3-Methylsulfonyl-2H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide (28)

7-Chloro-2-methyl-3-thio-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **27** (5.2 g, 0.0198 mol) was dissolved in a mixture of methanol (100 ml) and an aqueous solution of NaHCO_3 (3 g, 100 ml). The solution was supplemented with methyl iodide (8 ml) and stirred at room temperature for 3 h. Methanol was removed under reduced pressure and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried. The final product was crystallized in hot methanol and water (1:3) (85%); mp: 121–122°C (lit.: 123–124°C; Di Bella *et al.*, 1974).

7-Chloro-2-Methyl-3-Methylamino-2H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide (29)

A mixture of 7-chloro-2-methyl-3-methylsulfonyl-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **28** (0.6 g, 2.2 mmol) and a 33% w/v solution of methylamine in methanol (15 ml) was heated in a sealed vessel for 4 h at 100°C. The excess of amine was removed under reduced pressure and the residue was supplemented with water (40 ml). The suspension was stirred for 15 min and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried. Crystallization occurred in a mixture of hot methanol and water (60%); mp: 183–184°C; IR (KBr) 3407 (N-H), 1605, 1570, 1471 (N-H, C=N, C=C), 1277, 1165 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 80 MHz) δ 3.0 (s, 3H, NHCH_3), 3.3 (s, 3H, NCH_3), 7.2 (d, 1H, 5-H), 7.5 (bs, 1H, N-H), 7.6 (d, 1H, 6-H), 7.7 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-Isopropylamino-2-Methyl-2H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide (30)

A mixture of 7-chloro-2-methyl-3-methylsulfonyl-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **28** (0.6 g, 2.2 mmol) and isopropylamine (6 ml, excess) was heated at 100°C for 36 h. The excess of amine was removed under reduced pressure and the residue was supplemented with water (30 ml). The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried. Crystallization occurred in hot methanol (25%); mp: 126–130°C; IR (KBr) 3405 (N-H), 1604, 1569, 1474 (N-H, C=N, C=C), 1311, 1162 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 80 MHz) δ 1.1 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.2 (s, 3H, NCH_3), 4.1 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.1 (d, 1H, 5-H), 7.3 (bs, 1H, N-H), 7.6 (d, 1H, 6-H), 7.6 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-7-Chloro-2-Methyl-2H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide (31)

The mixture of 7-chloro-2-methyl-3-methylsulfonyl-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **28** (0.6 g, 2.2 mmol) and sec-butylamine (6 ml) was heated at 60–70°C for a few days. The excess of amine was removed under reduced pressure and the residue was supplemented with water (30 ml) and NaOH (10%). The crude product was collected by filtration, washed with water and dried. Crystallization occurred in hot hexane. The product was further purified by flash chromatography using silica gel (Kieselgel 60 Merck 230–400 mesh) and a mixture of CHCl_3 and n-hexane (1:1) as eluent. After concentration under reduced pressure, the white precipitate was collected by filtration, washed

with diethylether and dried (20%); mp: 87–90°C; IR (KBr) 3397 (N-H), 1603, 1569, 1471 (N-H, C=N, C=C), 1318, 1163 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 80 MHz) δ 0.8 (t, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.1 (d, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.4 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.2 (s, 3H, NCH_3), 4.0 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7.1 (d, 1H, 5-H), 7.2 (bs, 1H, N-H), 7.5 (d, 1H, 6-H), 7.6 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

R/S-7-Chloro-2-Methyl-3-(3-Methyl-2-Butylamino)-2H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide (32)

The mixture of 7-chloro-2-methyl-3-methylsulfonyl-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **28** (0.8 g, 2.9 mmol) and 3-methyl-2-butylamine (5 ml, excess) was heated at 80°C for a few days. The excess of amine was removed under reduced pressure and the residue was supplemented with methanol (10 ml). The crude product was collected by filtration, washed with cold methanol and dried. The precipitate was purified by flash chromatography using silica gel (Kieselgel 60 230–400 mesh) and a mixture of CHCl_3 and n-hexane (1:1). After concentration under reduced pressure, the white precipitate was collected by filtration, washed with diethylether and dried (15%). mp: 93–96°C; IR (KBr) 3374 (N-H), 1605, 1574, 1470 (N-H, C=N, C=C), 1316, 1162 (S=O) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 80 MHz) δ 0.8 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.1 (d, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.7 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.2 (s, 3H, NCH_3), 3.9 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.1 (bd, 2H, 5-H + N-H), 7.6 (d, 1H, 6-H), 7.65 (s, 1H, 8-H). Element anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

Pharmacological Studies

Measurements of Insulin Release from Incubated Rat Pancreatic Islets

Pancreatic islets were isolated by the collagenase method from fed Wistar rats (180–220 g). Groups of 10 islets, each derived from the same batch of islets, were preincubated for 30 min at 37°C in 1 ml of a physiological salt medium (115 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.56 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 24 mM NaHCO_3) supplemented with 2.8 mM glucose, 0.5% (w/v) dialyzed albumin (Sigma, Bornem, Belgium) and equilibrated against a mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%).

The islets were then incubated at 37°C for 90 min in 1 ml of the same medium containing 16.7 mM glucose and, in addition, the reference compound or the pyrido- or the benzothiadiazine derivative. The release of insulin was measured radioimmunoassay using rat insulin as a standard (Piotte *et al.*, 2000).

Measurements of Tension in Rat Aorta

All experiments were performed in aorta removed from fed Wistar rats (250–300 g). A section of the aorta was cleared of adhering fat and connective tissue and was cut into transverse rings (3–4 mm long). The endothelium was removed by rubbing the intimal surface with forceps. The segments were suspended under 1 g tension by means of steel hooks in an organ bath containing 20 ml of a Krebs-bicarbonate-buffered solution of the following composition: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 5 mM glucose. The physiological solutions were maintained at 37°C and bubbled continuously with a mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%). The isometric contractions of the aortic rings were measured with a force-displacement transducer. After 60 min of equilibration, the rings were exposed to 30 mM KCl or to 80 mM KCl. When the tension had stabilized (plateau tension between 1 and 2 g), the drugs were added to the bath at increasing concentrations until

maximal relaxation (or until 1 mM). Identical experiments were repeated in the presence of glibenclamide throughout (1 and 10 μ M). The relaxation response was expressed as the percentage of the contractile response to KCl. The ED_{50} value was graphically assessed for each dose response curve as the concentration evoking 50% inhibition of the plateau induced by KCl.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S. Belgium), from which B. Pirotte and P. de Tullio are Research Associates and P. Lebrun Research Director. R. Ouedraogo and B. Becker were supported by a grant-in-aid from the Université Libre de Bruxelles. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Mrs. D. Dewalque, M.-L. Pirard, J. Sengcois and A. Van Praet.

References

- Allard, B. and Lazdunski, M. (1993). Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 236, 419–426.
- Ashcroft, F.M. and Gribble, M. (1998). Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosci.* 21, 288–294.
- Bernardi, H., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1988). Purification and affinity labelling of brain [^3H] glibenclamide binding protein: a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9816–9820.
- Björk, E., Berne, C., Kämpfe, O., Wibell, P., Oskarsson, P. and Karlsson, F.A. (1996). Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* 45, 1427–1430.
- Cook, D.L. and Hales, C.N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311, 271–273.
- De Tullio, P., Pirotte, B., Dupont, L., Masereel, B., Laeckmann, D., Podona, T., Diouf, O., Lebrun, P. and Delarge, J. (1995). Synthesis and structural studies of a new class of heterocyclic compounds: 1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides, pyridyl analogues of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Tetrahedron* 51, 3221–3234.
- De Tullio, P., Pirotte, B., Lebrun, P., Fontaine, J., Dupont, L., Antoine, M.-H., Ouedraogo, R., Khellil, S., Maggetto, C., Masereel, B., Diouf, O., Podona, T. and Delarge, J. (1998). 3- and 4-substituted 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 39, 937–948.
- De Tullio, P., Pirotte, B., Somers, F., Boverie, S., Lacan, F. and Delarge, J. (1998). Study of the ring closure reaction of α -aminosulfonamides with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole. *Tetrahedron* 54, 4935–4942.
- De Tullio, P., Ouedraogo, R., Dupont, L., Somers, F., Boverie, S., Dogné, J.-M., Delarge, J. and Pirotte, B. (1999). Synthesis and structural studies of 3-alkylamino-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides: a new class of heterocyclic compounds with therapeutic promises. *Tetrahedron* 55, 5419–5432.
- Di Bella, M., Rinaldi, M., Fabio, U. and Manicardi, G. (1973). Azione antimicrobica di derivati dell'1,2,4-benzothiadiazina-1,1-diossido. *Il Farmaco* 28, 411–417.
- Di Bella, M., Albasini, A., Monzani, A. and Rinaldi, M. (1974). Ricerche nel campo della 1,2,4-benzothiadiazina. *Il Farmaco* 29, 424–433.
- Dupont, L., Somers, F., Boverie, S., Pirotte, B., Tinant, B. and de Tullio, P. (2001). 7-Chloro-2-methyl-2-methylamino-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *Acta Cryst.* E57, 652–654.
- Dupont, L., Pirotte, B. and de Tullio, P. (1999). 7-Iodo-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *Acta Cryst.* C55, 1152–1154.
- Edwards, G. and Weston, A.H. (1993). The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 597–637.
- Khellil, S., de Tullio, P., Lebrun, P., Fillet, M., Antoine, M.-H., Ouedraogo, R., Dupont, L., Felekidis, A., Leclerc, G., Delarge, J. and Pirotte, B. (1999). Preparation and pharmacological evaluation of the R- and S-enantiomers of 3-[2'-butylamino]-4H- and 3-[3'-methyl-2'-butylamino]-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 1513–1520.
- Kolb, H.A. (1990). Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 15, 51–79.
- Lebrun, P., Antoine, M.-H. and Herchuelz, A. (1992). K^+ channel openers and insulin release. *Life Sci.* 51, 795–806.
- Lebrun, P., Antoine, M.-H., Ouedraogo, R., Kane, C., Dunne, M., Hermann, M., Herchuelz, A., Masereel, B., Delarge, J., de Tullio, P. and Pirotte, B. (1996). Activation of ATP-dependent K^+ channels and inhibition of insulin release: effect of BPDZ 62. *J. Pharm. Exp. Ther.* 277, 156–162.
- Lebrun, P., Arkhammar, P., Antoine, M.-H., Nguyen, Q.-A., Bond-Hansen, J. and Pirotte, B. (2000). A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K^+ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* 43, 723–732.
- Longman, S.D. and Hamilton, T.C. (1992). Potassium channel activator drugs: mechanism of action, pharmacological properties, and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 12, 73–148.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147–148.
- Ouedraogo, R., Fontaine, J., Antoine, M.-H., Pirotte, B. and Lebrun, P. (2000). Effects of 3-alkylamino-7-chloro-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides on smooth muscle contraction. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 6, 97–100.
- Quayle, J.M., Nelson, M.T. and Standen, N.B. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 77, 1165–1232.
- Pirotte, B., de Tullio, P., Lebrun, P., Antoine, M.-H., Fontaine, J., Masereel, B., Schyns, M., Dupont, L., Herchuelz, A. and Delarge, J. (1993). 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells: a new class of potassium channel openers? *J. Med. Chem.* 36, 3211–3213.
- Pirotte, B., Antoine, M.-H., de Tullio, P., Hermann, M., Herchuelz, A., Delarge, J. and Lebrun, P. (1994). A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K^+ channels. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1381–1386.
- Pirotte, B., Ouedraogo, R., de Tullio, P., Khellil, S., Somers, F., Boverie, S., Dupont, L., Fontaine, J., Damas, J. and Lebrun, P. (2000). 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: design, synthesis and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* 43, 1456–1466.
- Quast, U. (1993). Do the K^+ channel openers relax smooth muscle by opening K^+ channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 332–337.
- Robertson, D.W. and Steinberg, M.I. (1990). Potassium channel modulators: scientific applications and therapeutic promise. *J. Med. Chem.* 33, 1529–1541.

- Seino, S. (1999). ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 337–362.
- Somers, F., Quedraogo, R., Antoine, M.-H., de Tullio, P., Becker, B., Fontaine, J., Damas, J., Dupont, L., Rigo, B., Delarge, J.,

Lebrun, P. and Pirotte, B. (2001). Original 2-alkylamino-6-halogenoquinazolin-4(3*H*)-ones and K_{ATP} channel activity. *J. Med. Chem.* **44**, 2575–2585.

Received January 17, 2002; accepted April 22, 2002

Annexe 6

Toward Tissue-Selective Pancreatic B-Cells K_{ATP} Channel Openers Belonging to 3-Alkylamino-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides

Pascal de Tullio,[†] Bénédicte Becker,* Stéphane Boverie,[†] Michael Dabrowski,[‡] Philip Wahl,[§] Marie-Hélène Antoine,* Fabian Somers,[†] Sophie Sebillé,[†] Raogo Ouedraogo,* John Bondo Hansen,[§] Philippe Lebrun,* and Bernard Pirotte*[†]

Centre de Recherche en Pharmacochimie des Substances Naturelles et Synthétiques, Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Université de Liège, 1, Avenue de l'Hôpital, CHU, Tour 4, B-4000 Liège, Belgium, University Laboratory of Physiology, Parks Road, Oxford, OX1 3PT, U.K., Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808, Route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgium, and Discovery, Novo Nordisk A/S, Novo Nordisk Park, DK-2760 Malov, Denmark

Received December 16, 2002

3-(Alkylamino)-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides were synthesized, and their activity on rat-insulin-secreting cells and rat aorta rings was compared to that of the K_{ATP} channel activators diazoxide and pinacidil. Structure–activity relationships indicated that an improved potency and selectivity for the pancreatic tissue was obtained by introducing a fluorine atom in the 7-position and a short linear (preferably ethyl) or cyclic (preferably cyclobutyl) hydrocarbon chain on the nitrogen atom in the 3-position. By contrast, strong myorelaxant activity was gained by the introduction of a halogen atom different from the fluorine atom in the 7-position and a bulky branched alkylamino chain in the 3-position. Thus, 3-(ethylamino)-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**11**) expressed a marked inhibitory activity on pancreatic B-cells ($IC_{50} = 1 \mu M$) associated with a weak vasorelaxant effect ($ED_{50} > 300 \mu M$), whereas 7-chloro-3-(1,1-dimethylpropyl)amino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**27**), which was only slightly active on insulin-secreting cells ($IC_{50} > 10 \mu M$), was found to be very potent on vascular smooth muscle cells ($ED_{50} = 0.29 \mu M$). Radioisotopic and electrophysiological investigations performed with 7-chlorinated, 7-iodinated, and 7-fluorinated 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides confirmed that the drugs activated K_{ATP} channels. The present data revealed that subtle structural modifications of 3-(alkylamino)-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides can generate original compounds activating K_{ATP} channels and exhibiting different in vitro tissue selectivity profiles.

Introduction

Potassium channels sensitive to intracellular levels of adenosine triphosphate (ATP-sensitive K^+ channels or K_{ATP} channels), which link the membrane potential to the metabolic state of the cell, have been described in a wide range of cell types including pancreatic B-cells¹ and smooth muscle cells.² In pancreatic B-cells (insulin-secreting cells), these channels have been shown to be involved in the insulin secretory process.^{3,4} In the vascular tissue, the K_{ATP} channels play an important role in controlling muscle tone and contractility.⁵

Recent progress in molecular biology indicated that K_{ATP} channels consist of octameric complexes of two unrelated subunits: a pore-forming subunit (Kir6.x) and a regulatory subunit, the sulfonylurea receptor (SURx).⁶ According to their tissue localization, K_{ATP} channels exist in different isoforms resulting from the assembly of the SUR and Kir subunits in multiple combinations. The combination of the SUR1 with the Kir6.2 subunits (SUR1/Kir6.2) forms the pancreatic B-cell type K_{ATP} channels, whereas the SUR2A/Kir6.2 and the SUR2B/

Kir6.2 or Kir6.1 combinations form the cardiac type and the smooth muscle type K_{ATP} channels, respectively.⁶

A variety of compounds have been reported to activate K_{ATP} channels. Those drugs, named potassium channel openers/activators (or PCOs), are potentially of great value as new therapeutic agents.⁷ Indeed, pancreatic B-cells K_{ATP} channel activators could find a considerable therapeutic interest in the prevention or treatment of several diseased states involving altered endocrine pancreatic function, such as type 1 and type 2 diabetes.^{8–10} However, because of the ubiquitous distribution of K_{ATP} channels, and in order to reduce the side effects of PCOs, the development of novel compounds should be linked to a high selectivity for a single channel subtype. Although the K_{ATP} channel activator diazoxide was found to preserve endogenous insulin production in patients with newly manifested autoimmune diabetes⁸ and was found to reduce body fat in hyperinsulinaemic obese adults,¹⁰ the drug was also responsible for marked side effects such as hypertrichosis, oedema, headache, and hypotension as a result of its lack of tissue selectivity. Those side effects considerably limit the interest of diazoxide in clinical practice and encourage the development of pancreatic B-cells selective PCOs for such therapeutic indications.

We recently reported that 3-(alkylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides such as BPDZ 44

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +32 4 366 43 65. Fax: +32 4 366 43 62. E-mail: B.Pirotte@ulg.ac.be.

[†] Université de Liège.

[‡] Université Libre de Bruxelles.

[§] University Laboratory of Physiology.

[§] Novo Nordisk A/S.

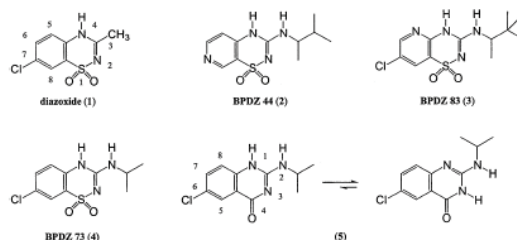


Figure 1. Chemical structure of diazoxide and several analogues described as potassium channel openers: BPDZ 44, BPDZ 83, BPDZ 73 and its quinazolinone isostere (5) in two possible tautomeric forms.

(2), structurally related to the K_{ATP} channel activator diazoxide (1) (Figure 1), were powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells.^{11,12} Compound 2 was identified as a pancreatic B-cell K_{ATP} channel activator^{13,14} and was also found to be far less potent than diazoxide at relaxing smooth muscle tissue.^{12,15}

In the search for a novel series of pyridothiadiazine dioxides acting as PCOs, we also developed 3-alkylamino-7-chloro-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides such as BPDZ 83 (3)¹⁶ (Figure 1). These compounds may be regarded as isomers of 3-alkylamino-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides ("7-aza" compounds) bearing the nitrogen atom of the pyridine ring in the 5- instead of the 7-position of the heterocycle ("5-aza" compounds) and bearing a chlorine atom in the 7-position such as the PCO prototype diazoxide (7-chlorobenzothiadiazine dioxide) (1, Figure 1). Compound 3 was found to be much more potent as a vasodilator than as an inhibitor of insulin secretion, revealing that this "5-aza" (3) and related compounds exhibited an opposite tissue selectivity.¹⁶ Moreover, further investigations indicated that compound 3 expressed, on the vascular tissue, the pharmacological profile of a typical K_{ATP} channel activator.¹⁶

Recently, we have prepared 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73) (4) and its 7-methoxy analogue, 7-methoxy-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 216), which were revealed to be potent and quite tissue-selective pancreatic B-cell K_{ATP} channel activators.^{8,17} In addition, we also synthesized quinazolinone isosteres of BPDZ 73 (for example, compound 5). The latter compounds lacked tissue selectivity and were active on pancreatic and vascular tissues.¹⁸

The present work aimed at developing new analogues of BPDZ 73 (4) by varying the nature of the halogen atom in the 7-position and the size as well as the branching of the alkylamino chain in the 3-position. Particular attention was paid to the identification of structural requirements leading to improvement of potency and pancreatic B-cell selectivity. The new compounds were examined as putative potassium channel openers on rat pancreatic islets (inhibition of glucose-induced insulin release) as well as on rat aorta (myorelaxant effect on 30 mM KCl-precontracted aorta rings). From the biological data collected, tissue selectivity linked to structure-activity relationships was discussed. Finally, radioisotopic and electrophysiological

investigations were performed in order to elucidate the mechanism of action of the newly synthesized compounds.

Chemistry

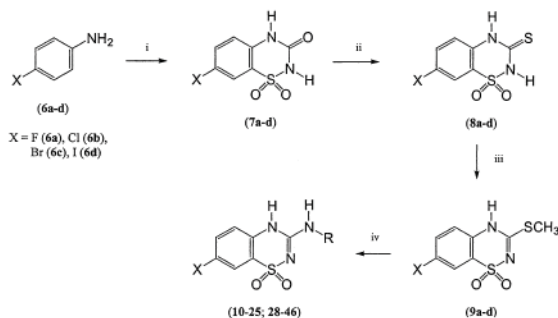
3-(Alkylamino)-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (10–25, 28–46) were obtained in four steps starting from the appropriate para halo-substituted aniline (Scheme 1). The first step was the synthesis of 7-halo-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (7a–d) from the reaction of different anilines (6a–d) with chlorosulfonyl isocyanate, according to a previously described procedure.¹⁹ The 3-oxo compounds (7a–d) were converted into the corresponding 3-thioxo derivatives (8a–d) by means of phosphorus pentasulfide in pyridine, as previously described.⁸ 7-Halo-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (8a–d) reacted with methyl iodide in a hydromethanolic solution of sodium bicarbonate to give the corresponding 7-halo-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (9a–d). The 3-methylsulfanyl-substituted intermediates (9a–d) were heated in a sealed vessel with an excess of the appropriate alkyl/cycloalkylamine to give the desired 3-(alkylamino)-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (10–25, 28–46).

Compounds with a more bulky alkylamino group in the 3-position, such as 7-chloro-3-(*tert*-butylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (26) and 7-chloro-3-(1,1-dimethylpropylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (27), could not be obtained from the reaction between 9b and the amine because of the steric hindrance of the alkyl moiety and because of the poor reactivity of the 3-methylsulfanyl intermediate. Reactivity toward nucleophilic substitution was improved by converting 7-chloro-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9b) into the corresponding 3-methylsulfinyl intermediate (49),²⁰ which reacted with the bulky alkylamines to give the expected final compounds (26, 27) (Scheme 2).

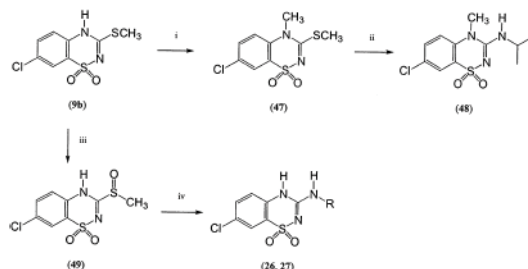
Last, 7-chloro-3-(isopropylamino)-4-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (48) (or "4-methyl-substituted BPDZ 73") was obtained from the reaction of the 4-methyl-substituted 3-methylsulfanyl intermediate (47) with isopropylamine.

Results and Discussion

Biological results revealed that most compounds were powerful inhibitors of the glucose-induced insulin re-

Scheme 1^a

^a (i) $ClSO_2NCO$, CH_3NO_2 , $AlCl_3$; (ii) P_2S_5 , pyridine, Δ ; (iii) $NaHCO_3$, CH_3I , CH_3OH/H_2O ; (iv) RNH_2 , Δ .

Scheme 2^a

^a (i) K_2CO_3 , CH_3I , CH_3CN/DMF ; (ii) $(CH_3)_2CHNH_2$, Δ ; (iii) Na_2CO_3 , Br_2 , H_2O ; (iv) RNH_2 , Δ .

lease from incubated rat pancreatic islets (see Tables 1–4), some of them (**22**, **34**, **36**) being 25–50 times more potent than the reference compound diazoxide. Except for the 7-fluoro-substituted compounds (Table 1), the size and the branching of the alkyl chain introduced on the exocyclic nitrogen atom in the 3-position markedly affected the activity on insulin-secreting cells. Thus, for the 7-chloro- (Table 2), 7-bromo- (Table 3), and 7-iodo-substituted (Table 4) benzothiadiazine dioxides, the inhibitory activity on the insulin-releasing process decreased with an increase in the size of the hydrocarbon chain. More precisely, the rank order of potency appeared to be the following: methyl < ethyl $\leq$ isopropyl > propyl $\geq$ *sec*-butyl > 1,2-dimethylpropyl. The most potent drugs had a short linear or branched hydrocarbon chain such as ethyl or isopropyl (see **22**, **4**, **34**, **36**, and **42**). For the 7-fluoro-substituted derivatives, the influence of the size and the branching of the alkyl chain was less pronounced (see **10–15**) although the best choice for the hydrocarbon moiety was again ethyl or isopropyl (see **11** and **13**). Bulky hydrocarbon chains such as *tert*-butyl and 1,1-dimethylpropyl (quaternary carbon atoms) were responsible for a marked decrease of activity on B-cells (compare **26** with **4** and **27** with **24**).

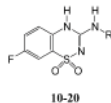
When cycloalkyl groups were present, the most potent compounds were obtained with the cyclobutyl rather

than with the cyclopropyl moiety (compare **17**, **30**, and **40** with **16**, **29**, and **39**). The activity of the 3-cyclobutylamino-substituted derivatives was close to that of the ethylamino- and isopropylamino-substituted compounds in their respective series of 7-halobenzothiadiazine dioxides.

The nature of the halogen atom in the 7-position was found to have little influence on the activity on B-cells, although 7-iodo-substituted compounds were less potent than the 7-fluoro-, 7-chloro-, and 7-bromo-substituted drugs.

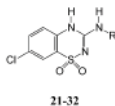
The myorelaxant activity of the benzothiadiazine dioxides was affected by the nature of the hydrocarbon chain on the exocyclic nitrogen atom in the 3-position but also by the nature of the halogen atom in the 7-position.

In marked contrast to the biological effects on B-cells, a more pronounced myorelaxant activity was observed when the size and the branching of the hydrocarbon chain in the 3-position were increased (see compounds **10–15** in Table 1, compounds **21–27** in Table 2, compounds **33–38** in Table 3, and compounds **42–44** in Table 4). Thus, whatever the nature of the halogen atom in the 7-position, the weaker vasorelaxing effect was obtained in each series with a methylamino substituent in the 3-position (see **10**, **21**, and **33**), whereas the stronger myorelaxant potency was observed with a

Table 1. Effects of 3-Alkylamino-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

Cpd	R	Rat pancreatic B-cells				Rat aorta rings		
		% RIS ^a				IC ₅₀ ^b (μM)	ED ₅₀ ^c (μM)	ED ₅₀ /IC ₅₀ ^d
		50 μM	10 μM	1 μM	0.1 μM			
10	CH ₃	5.7 ± 0.9 (20)	7.7 ± 0.6 (15)	76.1 ± 5.6 (21)	n.d.	2.2	> 300 (4)	> 136
11	CH ₂ CH ₃	6.3 ± 0.5 (14)	8.6 ± 1.1 (18)	50.8 ± 3.9 (14)	n.d.	1.0	> 300 (4)	> 300
12	CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.7 ± 0.7 (16)	15.1 ± 1.5 (19)	69.2 ± 3.7 (24)	n.d.	2.0	166 ± 15 (4)	83
13	CH(CH ₃) ₂	3.3 ± 0.7 (13)	3.7 ± 0.6 (13)	47.3 ± 3.7 (23)	96.9 ± 4.9 (16)	0.8	43.1 ± 10.7 (5)	54
14	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	5.9 ± 0.5 (15)	6.9 ± 0.6 (15)	64.6 ± 3.6 (13)	n.d.	1.6	39.2 ± 6.1 (4)	25
15	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.9 ± 0.6 (15)	10.6 ± 1.4 (15)	87.7 ± 5.2 (16)	n.d.	2.8	26.4 ± 4.3 (5)	9
16	CH(CH ₃) ₂ ^e	7.5 ± 0.7 (22)	32.5 ± 2.3 (15)	104.5 ± 7.3 (14)	n.d.	5.1	> 300 (4)	> 58
17	CH(CH ₃) ₂ ^f	5.9 ± 0.5 (15)	7.8 ± 1.0 (21)	58.2 ± 3.9 (16)	n.d.	1.3	71.8 ± 19.3 (9)	55
18	CH(CH ₃) ₂ ^g	5.4 ± 0.4 (15)	6.6 ± 0.6 (19)	68.8 ± 3.5 (20)	n.d.	1.8	58.0 ± 10.0 (5)	32
19	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^h	6.4 ± 0.3 (15)	39.8 ± 4.1 (21)	n.d. ⁱ	n.d.	<10	146 ± 6 (4)	> 15
20	CH ₂ CH=CH ₂	4.1 ± 1.1 (15)	12.8 ± 1.1 (11)	84.1 ± 5.2 (15)	n.d.	2.7	> 300 (4)	> 111
Diazoxide		26.7 ± 1.6 (16)	73.9 ± 4.4 (16)	87.5 ± 5.0 (15)	n.d.	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1.0
Pinacidil		88.8 ± 4.5 (13)	92.1 ± 3.9 (13)	97.7 ± 6.7 (19)	n.d.	>100	0.35 ± 0.02 (11)	< 0.0035

^a % RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (*n*)). ^b IC₅₀: drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^c ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (*n*)). ^d ED₅₀/IC₅₀: estimated selectivity ratio. ^e Cyclopropyl. ^f Cyclobutyl. ^g Cyclopentyl. ^h Cyclopropylmethyl. ⁱ Not determined.

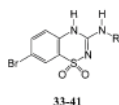
Table 2. Effects of 3-Alkylamino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

Cpd	R	Rat pancreatic B-cells				Rat aorta rings		
		% RIS ^a				IC ₅₀ ^b (μM)	ED ₅₀ ^c (μM)	ED ₅₀ /IC ₅₀ ^d
		50 μM	10 μM	1 μM	0.1 μM			
21	CH ₃	2.4 ± 0.5 (10)	4.4 ± 0.6 (12)	55.1 ± 4.7 (14)	n.d.	1.1	142 ± 15 (4)	129
22	CH ₂ CH ₃	2.1 ± 0.4 (11)	10.7 ± 1.1 (12)	29.2 ± 3.5 (13)	n.d.	< 1.0	39.9 ± 6.3 (4)	> 40
23	CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.6 ± 0.8 (14)	14.2 ± 1.1 (11)	83.4 ± 3.6 (15)	n.d.	2.7	55.5 ± 3.8 (5)	21
4	CH(CH ₃) ₂	5.7 ± 0.5 (35) ^h	4.9 ± 0.4 (32) ^h	36.2 ± 2.4 (31) ^h	90.4 ± 3.5 (23) ^h	0.7 ^h	36.3 ± 2.2 (6) ^h	52
24	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	5.5 ± 0.4 (16) ^h	19.9 ± 1.4 (14)	85.4 ± 3.7 (15)	n.d.	3.1	15.5 ± 1.7 (6)	5
25	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₃	11.0 ± 0.8 (16)	62.7 ± 3.6 (15)	88.1 ± 4.8 (21)	n.d.	>10	1.2 ± 0.2 (6)	< 0.12
26	C(CH ₃) ₃	n.d. ⁱ	64.4 ± 4.4 (26)	n.d.	n.d.	>10	1.4 ± 0.2 (4)	< 0.14
27	C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃	n.d.	83.2 ± 4.4 (16)	n.d.	n.d.	>10	0.29 ± 0.05 (5)	< 0.029
28	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂	8.1 ± 1.0 (12)	31.7 ± 1.8 (28)	93.7 ± 4.2 (16)	n.d.	4.5	93.6 ± 26.0 (6)	21
29	CH(CH ₃) ₂ ^f	5.8 ± 0.9 (13)	26.6 ± 3.0 (18)	84.0 ± 4.6 (16)	n.d.	3.4	190 ± 19 (5)	56
30	CH(CH ₃) ₂ ^f	8.1 ± 1.7 (11)	6.4 ± 0.3 (14)	60.2 ± 5.5 (11)	n.d.	1.3	34.9 ± 4.4 (5)	27
31	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^g	15.2 ± 1.3 (14)	65.9 ± 3.9 (23)	n.d.	n.d.	>10	41.2 ± 12.2 (5)	< 4
32	CH ₂ CH=CH ₂	7.8 ± 0.6 (10)	17.3 ± 1.3 (21)	87.9 ± 3.8 (24)	n.d.	3.1	28.9 ± 5.5 (4)	9
Diazoxide		26.7 ± 1.6 (16)	73.9 ± 4.4 (16)	87.5 ± 5.0 (15)	n.d.	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1.0
Pinacidil		88.8 ± 4.5 (13)	92.1 ± 3.9 (13)	97.7 ± 6.7 (19)	n.d.	>100	0.35 ± 0.02 (11)	< 0.0035

^a % RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (*n*)). ^b IC₅₀: drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^c ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (*n*)). ^d ED₅₀/IC₅₀: estimated selectivity ratio. ^e Cyclopropyl. ^f Cyclobutyl. ^g Cyclopentyl. ^h Published results (ref 8). ⁱ Not determined.

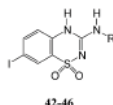
1,2-dimethylpropylamino (see **15**, **25**, **38**, and **44**), a *tert*-butylamino (see **26**), or a 1,1-dimethylpropylamino (see **27**) group. As a result, compound **27** with an ED₅₀ value

below 0.5 μM was found to be as potent as the reference PCO pinacidil. Such an observation is in accordance with the structure–activity relationships previously

Table 3. Effects of 3-Alkylamino-7-bromo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

Cpd	R	Rat pancreatic B-cells				Rat aorta rings		
		% RIS ^a				IC ₅₀ ^b (μM)	ED ₅₀ ^c (μM)	ED ₅₀ /IC ₅₀ ^d
		50 μM	10 μM	1 μM	0.1 μM			
33	CH ₃	6.4 ± 1.1 (13)	7.3 ± 0.6 (16)	69.9 ± 4.0 (15)	n.d.	1.8	31.0 ± 4.6 (4)	17
34	CH ₂ CH ₃	4.6 ± 0.6 (14)	6.5 ± 0.4 (15)	38.1 ± 2.9 (14)	n.d.	< 1.0	6.2 ± 0.4 (5)	> 6
35	CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.1 ± 0.7 (15)	34.7 ± 1.6 (16)	n.d. ^e	n.d.	< 1.0	5.9 ± 0.9 (4)	> 0.6
36	CH(CH ₃) ₂	6.7 ± 1.7 (12)	8.1 ± 0.8 (12)	34.9 ± 2.8 (12)	91.0 ± 5.3 (13)	0.5	4.8 ± 0.7 (5)	9.6
37	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	4.0 ± 0.3 (15)	26.8 ± 2.7 (14)	92.5 ± 3.8 (16)	n.d.	4.0	5.6 ± 0.8 (6)	1.4
38	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	21.4 ± 1.3 (16)	98.4 ± 4.2 (15)	97.2 ± 4.3 (15)	n.d.	> 10	2.6 ± 0.8 (4)	< 0.26
39	CH(CH ₃) ₂ ^f	4.6 ± 1.1 (14)	21.1 ± 1.5 (16)	85.1 ± 5.0 (15)	n.d.	3.1	89.4 ± 13.1 (5)	29
40	CH(CH ₃) ₂ ^g	6.1 ± 1.2 (15)	9.6 ± 0.6 (15)	54.8 ± 2.3 (14)	n.d.	1.1	21.7 ± 4.3 (4)	20
41	CH ₂ CH=CH ₂	4.8 ± 0.5 (13)	23.7 ± 1.6 (13)	77.2 ± 4.4 (15)	n.d.	2.8	3.0 ± 0.4 (4)	1.1
Diazoxide		26.7 ± 1.6 (16)	73.9 ± 4.4 (16)	87.5 ± 5.0 (15)	n.d.	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1.0
Pinacidil		88.8 ± 4.5 (13)	92.1 ± 3.9 (13)	97.7 ± 6.7 (19)	n.d.	> 100	0.35 ± 0.02 (11)	< 0.0035

^a % RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (*n*)). ^b IC₅₀: drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^c ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (*n*)). ^d ED₅₀/IC₅₀: estimated selectivity ratio. ^e Cyclopropyl. ^f Cyclobutyl. ^g Not determined.

Table 4. Effects of 3-Alkylamino-7-iodo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

Cpd	R	Rat pancreatic B-cells				Rat aorta rings		
		% RIS ^a				IC ₅₀ ^b (μM)	ED ₅₀ ^c (μM)	ED ₅₀ /IC ₅₀ ^d
		50 μM	10 μM	1 μM	0.1 μM			
42	CH(CH ₃) ₂	5.6 ± 0.3 (15)	9.6 ± 0.8 (31)	74.8 ± 3.2 (31)	99.2 ± 5.3 (15)	2.1	7.7 ± 1.6 (4)	3.7
43	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	22.5 ± 1.3 (14)	64.8 ± 4.2 (16)	84.2 ± 3.7 (15)	n.d.	> 10	1.3 ± 0.2 (6)	< 0.13
44	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	51.7 ± 3.0 (16)	86.2 ± 3.8 (16)	91.9 ± 3.9 (8)	n.d.	> 50	0.94 ± 0.41 (4)	< 0.02
45	CH(CH ₃)CH ₂	17.0 ± 1.4 (15)	67.0 ± 4.1 (14)	n.d. ^f	n.d.	> 10	79.1 ± 20.6 (6)	< 7.9
46	CH(CH ₃) ₂ ^f	n.d.	30.6 ± 1.7 (15)	n.d.	n.d.	< 10	22.2 ± 4.4 (4)	> 2.2
Diazoxide		26.7 ± 1.6 (16)	73.9 ± 4.4 (16)	87.5 ± 5.0 (15)	n.d.	22.6	22.4 ± 2.1 (11)	1.0
Pinacidil		88.8 ± 4.5 (13)	92.1 ± 3.9 (13)	97.7 ± 6.7 (19)	n.d.	> 100	0.35 ± 0.02 (11)	< 0.0035

^a % RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (*n*)). ^b IC₅₀: drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^c ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (*n*)). ^d ED₅₀/IC₅₀: estimated selectivity ratio. ^e Cyclobutyl. ^f Not determined.

established for pinacidil analogues for which the 1,2,2-trimethylpropyl and the 1,1-dimethylpropyl side chains were recognized as the most interesting hydrocarbon chains for improving myorelaxant activity.^{21,22}

The introduction of a short cycloalkylamino group in the 3-position provoked a marked decrease of activity in rat aorta rings. The cyclopropyl derivatives (see **16**, **29**, and **39**) were systematically found to be less active than their corresponding cyclobutyl analogues (see **17**, **30**, and **40**).

The nature of the halogen atom in the 7-position also strongly affected the activity on the vascular tissue. The introduction of a fluorine atom in the 7-position decreased the myorelaxant activity of benzothiadiazine dioxides. The rank order of potency was defined as follows: 7-fluoro compounds < 7-chloro compounds ≤ 7-bromo compounds ≤ 7-iodo compounds.

An ED₅₀/IC₅₀ ratio can be calculated in order to assess the tissue selectivity (vascular versus pancreatic tissue) of the new compounds (see Tables 1–4). Diazoxide,

which is known to be poorly selective,¹² was found to exhibit a selectivity ratio of about 1 (see Tables 1-4), indicating that the compound was almost equipotent on both tissues. Not surprisingly, pinacidil was found to be clearly selective for the vascular tissue with a selectivity ratio lower than 0.005 (see Tables 1-4).

The 7-fluoro-substituted benzothiadiazine dioxides (see Table 1) may be regarded as the most interesting series of drugs in terms of tissue selectivity. These compounds were very potent as inhibitors of the insulin-releasing process (all drugs were more potent than diazoxide), while their myorelaxant activity was weak (all drugs were less potent than diazoxide). In the linear hydrocarbon side chain series, the 7-methylamino- and the 7-(ethylamino)-substituted derivatives **10** and **11** markedly inhibited insulin release (IC_{50} = 2.2 and 1.0 μ M, respectively) and were found to be essentially inactive as myorelaxants (ED_{50} > 300 μ M). As a result, these drugs were at least 135- to 300-fold more potent on B-cells than on vascular smooth muscle cells. Likewise, the cyclobutyl derivative **17** exhibited a pronounced activity on pancreatic B-cells (IC_{50} = 1.3 μ M) associated with a weak myorelaxant activity on vascular smooth muscle cells (ED_{50} = 72 μ M). Although the allyl derivative **20** also expressed a marked tissue selectivity, its efficiency on the pancreatic tissue was less pronounced (IC_{50} = 2.7 μ M).

As expected, the selectivity of the 7-fluoro-substituted compounds for the pancreatic versus the vascular smooth muscle tissue decreased with an increase in the size and the branching of the hydrocarbon side chain in the 3-position (see selectivity ratio in Table 1). Such an observation can also be made for the other series of 7-halo-substituted benzothiadiazine dioxides (see Tables 2-4). The selectivity ratio of the 7-chloro-substituted compounds was between 129 for the methylamino derivative **21** and <0.03 for the 1,1-dimethylpropylamino derivative **27**. With a selectivity ratio greater than 40 and an IC_{50} value on pancreatic B-cells near or below 1 μ M, compounds **21** (methyl), **22** (ethyl), and **4** (isopropyl) are examples of 7-chloro compounds expressing an attractive pancreatic B-cell selectivity and potency. In this series of chlorinated derivatives, compound **27**, with a bulky quaternary carbon atom located on the 3-alkylamino side chain, was the most potent and vascular smooth muscle selective drug.

In the series of 7-bromo- and 7-iodo-substituted benzothiadiazine dioxides, as a result of their more pronounced myorelaxant activity, only a few drugs expressed selectivity for the pancreatic tissue (see Tables 3 and 4). However, the cyclobutylamino side chain in the 3-position again conferred a marked effect on B-cells associated with a weak activity on aorta rings (see compound **40**).

The introduction of a methyl group in the 4-position of compound **4** (leading to compound **48**) was responsible for a complete loss of activity on pancreatic B-cells and on vascular smooth muscle cells [% RIS at 50 μ M is 96.5 ± 5.1 (n = 14); ED_{50} on aorta rings is >100 μ M (n = 4)]. Such a feature is in accordance with our previous data reporting the effect of 3-(alkylamino)-4-methyl-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides¹² and reflects the critical importance, for biological activity, of the

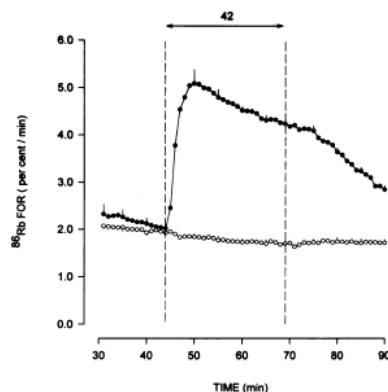


Figure 2. Effect of compound **42** (50 μ M) on ^{86}Rb outflow from rat pancreatic islets perfused in the absence (●) and presence (○) of glibenclamide (10 μ M) throughout. Mean values ($\pm$ SEM) refer to four individual experiments.

presence of a hydrogen atom in the 4-position of the heterocycle.

Taken as a whole, the present pharmacological data give important insights into the structural requirements leading to potency and tissue selectivity (pancreatic versus vascular smooth muscle). Looking at the nature of the halogen atom in the 7-position and the alkylamino side chain in the 3-position, selectivity for the pancreatic tissue is obtained by introducing a fluorine atom in the 7-position and a short linear (preferably ethyl) or cyclic (preferably cyclobutyl) hydrocarbon chain on the nitrogen atom in the 3-position. An improvement in myorelaxant activity is gained by the introduction of a halogen atom different from the fluorine atom in the 7-position and a bulky branched alkylamino chain in the 3-position. The presence of a hydrogen atom in the 4-position is also required for biological activity.

Chlorinated, iodinated, and fluorinated compounds exhibiting a marked inhibitory effect on the insulin secretory rate were selected for further pharmacological investigations. The aim of these studies was to ascertain that the biological effects of the drugs (and their analogues) on pancreatic B-cells were related to K_{ATP} channel activation.

In the first series of experiments, using the efflux of ^{86}Rb (^{42}K substitute) as an index of K^+ permeability,^{8,13,14,23} we have characterized the effects of compounds **4**, **24**, and **42** on ^{86}Rb outflow from prelabeled and perfused rat pancreatic islets. Figure 2 illustrates the effects of compound **42**, but all three drugs provoked a pronounced and sustained increase in the rate of ^{86}Rb outflow. When the same experiments were repeated in the presence of the K_{ATP} channel blocker glibenclamide in the perfusing medium, the stimulatory effects of compound **4**, **24**, and **42** were completely abolished (Figure 2 and data not shown). Such data suggest that the drugs activated K_{ATP} channels in rat islet cells.

In a second set of experiments, we investigated the effect of **18** (BPDZ 176) on K_{ATP} channels heterologously

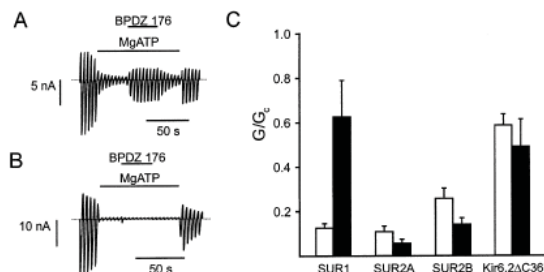


Figure 3. Effects of BPDZ 176 (**18**) on SUR1/Kir6.2, SUR2A/Kir6.2, SUR2B/Kir6.2 or Kir6.2ΔC36 currents. Macroscopic currents were recorded from inside-out patches in response to a series of voltage ramps from -110 to $+100$ mV from oocytes coexpressing Kir6.2 and either SUR1 (A) or SUR2A (B). $100 \mu\text{M}$ MgATP and $100 \mu\text{M}$ BPDZ 176 were added to the intracellular solution as indicated by the bars. (C) Mean macroscopic slope conductances (G) in the presence of $100 \mu\text{M}$ MgATP (white columns) or $100 \mu\text{M}$ BPDZ 176 and $100 \mu\text{M}$ MgATP (black columns) in excised patches from oocytes expressing either Kir6.2 and SUR1, SUR2A, SUR2B, or Kir6.2ΔC36 alone. Data are expressed as a fraction of the mean slope conductance in control solution (no additions) (G_p). The vertical bars indicate 1 SEM ($n = 3-6$ in each column).

expressed in *Xenopus* oocytes. Figure 3 shows that the compound activated the pancreatic B-cell type K_{ATP} channel (Kir6.2/SUR1) but not the cardiac (Kir6.2/SUR2A) or the smooth muscle (Kir6.2/SUR2B) type. The mean data are presented in Figure 3C showing that, in the presence of $100 \mu\text{M}$ MgATP, $100 \mu\text{M}$ BPDZ 176 only activated SUR1 comprising K_{ATP} channels. A small inhibition on SUR2A or SUR2B comprising K_{ATP} channels was also observed, suggesting that the compound interacted with SUR2A and SUR2B without activating any currents. Moreover, the effects seen on the K_{ATP} channels expressed in oocytes were likely to be mediated by the SUR rather than the Kir6.2 subunits because compound **18** had no effect on Kir6.2 expressed in the absence of SUR (Figure 3C).

As performed with 3-(alkylamino)-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides such as **2**¹² and 3-(alkylamino)-4*H*-pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides such as **3**,¹⁶ the pK_a value of representative 7-halo-substituted 3-(alkylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides was determined in order to predict the ionization state of the drugs at the physiological pH of 7.4. By analogy with pyridothiadiazine dioxides, the acidic character of the benzothiadiazine dioxides should also be linked to the lability of the hydrogen atom in the 4-position of the heterocycle. Previous studies on pyridothiadiazine dioxides indicated that the active form of the drugs in aqueous solution was the nonionized species and that a partial ionization of the drugs at physiological pH could be responsible for a loss of biological activity.^{12,16}

The pK_a values of **13**, **4**, **36**, and **42** (the 3-isopropylamino-substituted derivatives in each series of 7-halobenzothiadiazine dioxides) determined by UV spectrophotometry amounted to 9.63, 9.51, 9.41, and 9.28, respectively. By comparison, the pK_a value of diazoxide has been reported to be 8.62.²⁴ As observed with pyridothiadiazine dioxides,^{12,16} the replacement of the alkyl chain in the 3-position with an alkylamino chain (compare diazoxide and **4**) provoked an increase in the pK_a value. Such an effect probably results from the lone pair delocalization of the exocyclic nitrogen atom into the guanidinic system. Incidentally, the acidic character

of 7-halobenzothiadiazine dioxides appears to be correlated with the electronic impact of the substituent in the 7-position (para position relative to the nitrogen atom bearing the labile proton), as reflected by its Hammett σ_p constant ($\sigma_p = 0.15, 0.24, 0.26$, and 0.28 for the fluorine, the chlorine, the bromine, and the iodine atoms, respectively).²⁵ Taking into account their pK_a values, the 7-halo-substituted benzothiadiazine dioxides are expected to be present as nonionized species in aqueous solution at physiological pH.

Crystallographic studies conducted with typical examples of 3-alkylaminopyridothiadiazine dioxides^{12,16,26} led to the conclusion that those compounds, whatever the position of the nitrogen atom in the pyridine ring, adopted in the solid state a 4*H*-tautomeric form. In the latter form, the two N-H groups of the "guanidine" moiety were in the same spatial configuration as the guanidinic N-H groups of pinacidil. X-ray data previously obtained with the 3-isopropylamino-substituted benzothiadiazine **42**²⁷ suggested that in the solid state 3-(alkylamino)-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides also adopted the same 4*H*-tautomeric conformation and the same spatial disposition of the guanidinic N-H groups as 3-(alkylamino)-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides.

Conclusions

Several 3-(alkylamino)-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides were synthesized and examined as putative PCOs on two different tissues: rat pancreatic B-cells and rat aorta rings. The nature of the alkylamino side chain in the 3-position and the nature of the halogen atom in the 7-position were found to considerably affect both the potency and the in vitro tissue selectivity. Selectivity for the pancreatic tissue was obtained by introducing a fluorine atom in the 7-position and a short linear (preferably ethyl) or cyclic (preferably cyclobutyl) hydrocarbon chain on the nitrogen atom in the 3-position. By contrast, strong myorelaxant activity was reached after the introduction of a halogen atom different from the fluorine atom in the 7-position and the addition of a bulky branched alkylamino chain in the 3-position.

Radioisotopic and electrophysiological investigations performed with different 3-(alkylamino)-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides indicated that the drugs activated K_{ATP} channels and further revealed the channel subtype selectivity of the fluorinated compound **18** (Kir6.2/SUR1 versus Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B).

Pancreatic B-cells selective K_{ATP} channel activators could be of high therapeutic value for the prevention and/or treatment of type 1 and type 2 diabetes. Thus, the present data contribute to the identification of new compounds expected to become appropriate substitutes for diazoxide in the treatment of glucose homeostasis disorders.

Experimental Section

Chemistry. Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a FTIR Perkin-Elmer Spectrum 1000 spectrophotometer. UV data and spectra were obtained with a Hitachi U 3010 spectrophotometer. The ^1H NMR spectra were taken on a Bruker AW-80 (80 MHz) instrument in $DMSO-d_6$ with HMDS as an internal standard; chemical shifts are reported in δ values (ppm) relative to internal HMDS. The abbreviations s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint. = quintuplet, m = multiplet, and b = broad are used throughout. Elemental analyses (C, H, N, S) were realized on a Carlo-Erba EA 1108 elemental analyzer and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. All reactions were routinely checked by TLC on silica gel Merck 60F 254.

7-Fluoro-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7a). Chlorosulfonyl isocyanate (16.8 mL, 0.193 mol) and nitromethane (160 mL) were mixed together in a closed dried vessel. The mixture was cooled at $-5^\circ C$ (ice and salt bath) and protected from moisture during the slow addition, under vigorous stirring, of 4-fluoroaniline (17.8 g, 0.16 mol) dissolved in nitromethane (50 mL). At the end of addition (~ 15 min), anhydrous $AlCl_3$ (28.0 g, 0.21 mol) was added to the resulting suspension and the mixture was refluxed for 30–45 min. The hot solution was poured onto ice (800 g), and after stirring and complete melting of ice, the resulting precipitate was collected by filtration and washed twice with water (75 mL). The insoluble crude material was suspended in an aqueous solution of sodium bicarbonate (10 g/200 mL) and heated until most of the precipitate was solubilized. The suspension was treated with charcoal and was filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 by means of 12 N HCl. The white product, which precipitated, was collected by filtration, washed with water, and dried (21.8 g, 63%): mp $>300^\circ C$; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 7.10–7.70 (m, 3H, 5-H + 6-H + 8-H), 9.55 (b, 1H, N–H), 11.25 (bs, 1H, SO_2NH). Anal. ($C_7H_5FN_2O_5S$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7b). The title compound was obtained from 4-chloroaniline (20.4 g, 0.16 mol) by following the experimental conditions described for 7a (24.2 g, 65%): mp $>300^\circ C$ (lit., 316–318 $^\circ C$).¹⁹

7-Bromo-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7c). The title compound was obtained from 4-bromoaniline (27.7 g, 0.16 mol) by following the experimental conditions described for 7a except that the crude material was dissolved in a hydromethanolic 1:1 solution of sodium bicarbonate (10 g/400 mL) instead of an aqueous solution (31.0 g, 70%): mp $>300^\circ C$ (lit., 335 $^\circ C$).²⁸

7-Iodo-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7d). The title compound was obtained from 4-iodoaniline (35.3 g, 0.16 mol) by following the experimental conditions described for 7c (29.6 g, 57%): mp $>300^\circ C$ (lit., 311–313 $^\circ C$).²⁹

7-Fluoro-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8a). A mixture of 7-fluoro-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7a, 20.3 g, 95 mmol)

and phosphorus pentasulfide (40 g) in anhydrous pyridine (250 mL) was refluxed for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in an aqueous solution of NaOH (50 g/500 mL). The alkaline solution was treated with charcoal and was filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 by means of 12 N HCl. The compound, which precipitated, was collected by filtration, washed with water, and suspended in an aqueous solution of sodium bicarbonate (20 g/400 mL). The suspension was heated until most of the insoluble material dissolved and was then treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 1 with 12 N HCl, and the white precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and dried (16.4 g, 75%): mp 193–195 $^\circ C$; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 7.25–7.80 (m, 3H, 5-H + 6-H + 8-H). Anal. ($C_7H_5FN_2O_2S_2$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8b). The title compound was obtained from 7-chloro-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7b, 22.0 g, 95 mmol) by following the experimental conditions described for 8a (17.7 g, 75%): mp 229–232 $^\circ C$ (lit., 217–218 $^\circ C$).³⁰

7-Bromo-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8c). The title compound was obtained from 7-bromo-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7c, 26.0 g, 95 mmol) by following the experimental conditions described for 8a. After acidification of the alkaline solution, the insoluble material was suspended in a hydromethanolic 1:1 solution of sodium bicarbonate (10 g/400 mL) and the mixture was heated until most of the insoluble material dissolved. The suspension was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 0–1 with 12 N HCl, and the white precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and dried (18.9 g, 68%): mp 209–211 $^\circ C$ (lit., 223–225 $^\circ C$).³¹

7-Iodo-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8d). The title compound was obtained from 7-iodo-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7d, 30.8 g, 95 mmol) by following the experimental conditions described for 8c (25.5 g, 79%): mp 219–222 $^\circ C$ (lit., 217–218 $^\circ C$).³⁰

7-Fluoro-3-methylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (9a). 7-Fluoro-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (8a, 12 g, 52 mmol) was dissolved in a 1:1 hydromethanolic solution of sodium bicarbonate (7 g/280 mL), and an excess of methyl iodide (12 mL) was added. After the mixture was stirred for 30 min, the resulting suspension was adjusted to pH 5–6 by means of 6 N HCl. The suspension was concentrated under reduced pressure to half of the volume, and the white precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried (12.2 g, 89%): mp 265–268 $^\circ C$; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 2.45 (s, 3H, SCF_3), 7.10–7.50 (m, 2H, 5-H + 6-H), 7.60 (d, 1H, 8-H), 12.50 (bs, 1H, N–H). Anal. ($C_8H_7FN_2O_2S_2 \cdot H_2O$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-methylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (9b). The title compound was obtained from 7-chloro-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (8b, 12 g, 48 mmol) by following the experimental conditions described for 9a (12.6 g, 85%): mp 287–290 $^\circ C$ (lit., 290–291 $^\circ C$).³⁰

7-Bromo-3-methylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (9c). The title compound was obtained from 7-bromo-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (8c, 12 g, 41 mmol) by following the experimental conditions described for 9a (12.6 g, 82%): mp 282–284 $^\circ C$; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 2.45 (s, 3H, SCF_3), 7.15 (d, 1H, 5-H), 7.75 (d, 1H, 6-H), 7.85 (s, 1H, 8-H), 12.55 (bs, 1H, N–H).

7-Iodo-3-methylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (9d). The title compound was obtained from 7-iodo-3-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (8d, 12 g, 35 mmol) by following the experimental conditions described for 9a (12.4 g, 79%): mp 271–273 $^\circ C$; ^1H NMR ($DMSO-d_6$, 80 MHz) δ 2.45 (s, 3H, SCF_3), 7.00 (d, 1H, 5-H),

7.90 (d + s, 2H, 6-H + 8-H), 12.50 (bs, 1H, N-H). Anal. (CaH₇IN₂O₂S) C, H, N, S.

General Procedures for the Synthesis of 3-(Alkylamino)-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides (10–25, 28–46). Method A. A mixture of the appropriate 7-halo-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9a–d) (0.5 g) and the appropriate alkylamine (or if not commercially available, a concentrated aqueous solution of the amine) (5 mL) was heated in a sealed vessel for 4 h at 140 °C. The excess of amine was eliminated by distillation under reduced pressure, and the residue was dissolved in an aqueous 2% w/v solution of NaOH (20 mL). The alkaline solution was treated with charcoal and was filtered, and the filtrate was adjusted to pH 4–5 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The compound was recrystallized in methanol/water.

Method B. A mixture of the appropriate 7-halo-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9a–d) (0.5 g), the appropriate alkylamine (1 mL), and dioxane (5 mL) was heated in a sealed vessel for 4 h at 140 °C. After removal of the solvent and the excess of amine under reduced pressure, the compound was isolated and purified as described in method A.

Method C. A mixture of the appropriate 7-halo-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9a–d) (0.5 g) and the appropriate alkylamine (5–10 mL) was refluxed for 72 h. After removal of the excess of amine under reduced pressure, the compound was isolated and purified as described in method A.

The following compounds were obtained according to the synthetic procedures described above.

7-Fluoro-3-methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (10). Method A Using a 40% w/v Aqueous Solution of Methylamine. Yield 0.35 g (75%); mp 275–277 °C; IR (KBr) 3324 (N–H), 1637, 1597, 1494 (C=C, C=N, N–H), 1271, 1148 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 2.75 (d, 3H, NHCH₃), 7.10 (m, 2H, 5-H + NHCH₃), 7.30 (dd, 1H, 6-H), 7.45 (d, 1H, 8-H), 9.65 (s, 1H, NH). Anal. (CaH₈FN₂O₂S·H₂O) C, H, N, S.

7-Fluoro-3-(ethylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11). Method A Using a 70% w/v Aqueous Solution of Ethylamine. Yield 0.36 g (79%); mp 235–237 °C; IR (KBr) 3289 (N–H), 1636, 1593, 1491 (C=C, C=N, N–H), 1260, 1144 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.05 (t, 3H, CH₂CH₃), 3.15 (m, 2H, NHCH₂CH₃), 6.80–7.55 (m, 4H, 5-H + 6-H + 8-H + NHCH₂). Anal. (C₉H₁₀FN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Fluoro-3-propylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (12). Method A. Yield 0.39 g (80%); mp 199–202 °C; IR (KBr) 3304 (N–H), 1636, 1595, 1494 (C=C, C=N, N–H), 1257, 1144 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.80 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1.50 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 3.15 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 6.80–7.55 (m, 4H, 5-H + 6-H + 8-H + NHCH₂). Anal. (C₁₀H₁₂FN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Fluoro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (13). Method A. Yield 0.36 g (74%); mp 242–244 °C; IR (KBr) 3304 (N–H), 1639, 1568, 1509, 1493 (C=C, C=N, N–H), 1267, 1148 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.10 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 3.90 (m, 1H, NHCH(CH₃)₂), 7.00 (bs, 1H, NHCH(CH₃)₂), 7.10–7.50 (m, 3H, 5-H + 6-H + 8-H), 10.25 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₀H₁₂FN₂O₂S) C, H, N, S.

R,S-3-(2-Butylamino)-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (14). Method A. Yield 0.41 g (75%); mp 203–205 °C; IR (KBr) 3492 (N–H), 1651, 1595, 1568, 1498 (C=C, C=N, N–H), 1267, 1159 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.80 (t, 3H, CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.05 (d, 3H, CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.40 (m, 2H, CH(CH₃)CH₂CH₃), 3.60 (m, 1H, NHCH₂CH₃), 7.00 (bd, 1H, NHCH₂CH₃), 7.10 (d, 1H, 5-H), 7.30 (d, 1H, 6-H), 7.40 (s, 1H, 8-H), 10.35 (s, 1H, NH). Anal. (C₁₁H₁₄FN₂O₂S·H₂O) C, H, N, S.

R,S-7-Fluoro-3-(3-methyl-2-butylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (15). Method C. Yield 0.38 g (70%); mp 193–198 °C; IR (KBr) 3298 (N–H), 1636, 1593,

1504, 1494 (C=C, C=N, N–H), 1258, 1168 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.80 (d, 6H, CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 1.00 (d, 3H, CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 1.65 (m, 1H, CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3.60 (m, 1H, NHCH₂CH₃), 6.90 (bd, 1H, NHCH₂CH₃), 7.15 (d, 1H, 5-H), 7.30 (d, 1H, 6-H), 7.45 (s, 1H, 8-H), 10.15 (s, 1H, NH). Anal. (C₁₂H₁₆FN₂O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclopropylamino-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (16). Method A. Yield 0.34 g (70%); mp 242–245 °C; IR (KBr) 3274 (N–H), 1620, 1530, 1483 (C=C, C=N, N–H), 1245, 1158 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.40–1.00 (m, 4H, CH(CH₂)₂), 2.60 (m, 1H, NHCH₂CH₂), 7.00 (b, 1H, NHCH₂CH₂), 7.25 (d, 1H, 5-H), 7.40 (d, 1H, 6-H), 7.70 (s, 1H, 8-H), 10.50 (s, 1H, NH). Anal. (C₁₀H₁₀FN₂O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (17). Method B. Yield 0.36 g (70%); mp 252–253 °C; IR (KBr) 3288 (N–H), 1631, 1580, 1557, 1474 (C=C, C=N, N–H), 1258, 1153 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.00–2.35 (bm, 6H, CH(CH₂)₂), 4.15 (m, 1H, NHCH₂CH₂), 6.95–7.80 (m, 4H, 5-H + 6-H + 8-H + NHCH₂), 10.40 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₁H₁₂FN₂O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclopentylamino-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (18). Method B. Yield 0.41 g (76%); mp 237–239 °C; IR (KBr) 3299 (N–H), 1639, 1594, 1568, 1492 (C=C, C=N, N–H), 1257, 1161 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.00–2.15 (bm, 8H, CH(CH₂)₂), 4.00 (bm, 1H, NHCH₂CH₂), 6.95–7.55 (m, 4H, 5-H + 6-H + 8-H + NHCH₂), 10.15 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₂H₁₄FN₂O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclopropylmethylamino-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (19). Method A. Yield 0.31 g (60%); mp 221–222 °C; IR (KBr) 3295 (N–H), 1641, 1592, 1495 (C=C, C=N, N–H), 1240, 1153 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.30–1.30 (m, 5H, CH(CH₂)₂ + CH(CH₂)₂), 3.05 (t, 2H, NHCH₂CH₂), 7.00–7.60 (m, 4H, NH + 5-H + 6-H + 8-H), 10.50 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₁H₁₂FN₂O₂S) C, H, N, S.

3-Allylamino-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (20). Method A. Yield 0.30 g (62%); mp 209–210 °C; IR (KBr) 3353 (N–H), 1615, 1595, 1570, 1493 (C=C, C=N, N–H), 1259, 1164 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 3.80 (bm, 2H, CH₂CH=CH₂), 4.90–5.30 (m, 2H, CH₂CH=CH₂), 5.55–6.05 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 6.90–7.60 (m, 4H, NH + 5-H + 6-H + 8-H), 10.60 (s, 1H, NH). Anal. (C₁₀H₁₀FN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Chloro-3-methylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (21). Method A Using a 40% w/v Aqueous Solution of Methylamine. Yield 0.30 g (65%); mp > 300 °C (lit., 318–320 °C³²); IR (KBr) 3311 (N–H), 1636, 1596, 1477 (C=C, C=N, N–H), 1260, 1138 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 2.55 (d, 3H, NHCH₃), 7.55 (bd, 1H, 5-H), 7.60 (d, 1H, 6-H), 7.65 (s, 1H, 8-H), 8.45 (bm, 1H, NHCH₃), 10.55 (s, 1H, NH). Anal. (C₈H₈ClN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Chloro-3-(ethylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (22). Method A Using a 70% w/v Aqueous Solution of Ethylamine. Yield 0.30 g (60%); mp 252–253 °C (lit., 246–250 °C³²); IR (KBr) 3306 (N–H), 1635, 1585, 1483 (C=C, C=N, N–H), 1267, 1170 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.05 (t, 3H, CH₂CH₃), 3.15 (m, 2H, NHCH₂CH₃), 7.15 (d, 2H, 5-H + NHCH₂CH₃), 7.50 (d + s, 2H, 6-H + 8-H), 10.60 (bs, 1H, NH). Anal. (C₉H₁₀ClN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Chloro-3-propylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (23). Method A. Yield 0.36 g (70%); mp 211–218 °C (lit., 215–216 °C³²); IR (KBr) 3296 (N–H), 1631, 1584, 1482 (C=C, C=N, N–H), 1262, 1166 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.80 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1.45 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 3.10 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 7.10 (d, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 7.50 (d + s, 2H, 6-H + 8-H), 10.55 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₀H₁₂ClN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Chloro-3-(pentylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (28). Method C. Yield 0.34 g (60%); mp 233–236 °C; IR (KBr) 3290 (N–H), 1627, 1582, 1482 (C=C, C=N, N–H), 1242, 1158 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.75 (t, 6H, CH(CH₂CH₂)₂), 1.40 (m, 4H, CH(CH₂CH₂)₂), 3.55 (m, 1H, NHCH₂CH₂), 6.95 (bd, 1H, NHCH₂CH₂), 7.10 (d, 1H, 5-H),

7.50 (d, 1H, 6-*H*), 7.55 (s, 1H, 8-*H*), 10.30 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{12}H_{10}ClN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-cyclopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (29). Method A. Yield 0.36 g (69%); mp 261–262 °C (lit., 246–249 °C¹²); IR (KBr) 3307 ($\bar{\nu}$ -H), 1616, 1590, 1521, 1484 (C=C, C=N, N-H), 1263, 1144 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.40–0.90 (m, 4H, $CH(CH_2)_2$), 2.60 (m, 1H, $NHCH_2(CH_2)_2$), 7.30 (d, 2H, $NHCH_2(CH_2)_2 + 5\text{-}H$), 7.50 (d + s, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.50 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{10}ClN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-cyclobutylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (30). Method B. Yield 0.35 g (65%); mp 275–278 °C; IR (KBr) 3284 (N-H), 1633, 1575, 1479 (C=C, C=N, N-H), 1238, 1155 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.10–2.35 (bm, 6H, $CH(CH_2)_2$), 4.15 (m, 1H, $NHCH_2$), 7.15 (d, 1H, 5-*H*), 7.30–7.65 (m, 3H, 6-*H* + 8-*H* + $NHCH_2$), 10.25 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{11}H_{12}ClN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Chloro-3-cyclopropylmethylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (31). Method A. Yield 0.34 g (62%); mp 288–290 °C; IR (KBr) 3298 (N-H), 1635, 1582, 1483 (C=C, C=N, N-H), 1267, 1160 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.30–1.30 (m, 5H, $CH(CH_2)_2 + CH(CH_2)_2$), 3.05 (m, 2H, $NHCH_2$), 7.05 (s, 1H, *NH*), 7.15 (d, 1H, 5-*H*), 7.50 (d, 1H, 6-*H*), 7.60 (s, 1H, 8-*H*). Anal. ($C_{11}H_{12}ClN_3O_2S$) C, H, N, S.

3-Allylamino-7-chloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (32). Method A. Yield 0.32 g (62%); mp 220–222 °C; IR (KBr) 3310 (N-H), 1651, 1630, 1584, 1483 (C=C, C=N, N-H), 1239, 1164 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 3.80 (bm, 2H, $CH_2CH=CH_2$), 4.95–5.25 (m, 2H, $CH_2CH=CH_2$), 5.55–6.05 (m, 1H, $CH_2CH=CH_2$), 7.15 (d, 1H, 5-*H*), 7.30 (b, 1H, *NH*), 7.50 (d, 1H, 6-*H*), 7.60 (s, 1H, 8-*H*), 10.65 (s, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{10}ClN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Bromo-3-methylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (33). Method A. Using a 40% w/v Aqueous Solution of Methylamine. Yield 0.35 g (70%); mp 305–307 °C; IR (KBr) 3355 (N-H), 1641, 1581, 1547, 1477 (C=C, C=N, N-H), 1263, 1145 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 2.70 (d, 3H, $NHCH_3$), 7.10 (d, 2H, $NHCH_3 + 5\text{-}H$), 7.50–7.80 (m, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 9.70 (s, 1H, *NH*). Anal. ($C_8H_8BrN_3O_2S \cdot H_2O$) C, H, N, S.

7-Bromo-3-(ethylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (34). Method A. Using a 70% w/v Aqueous Solution of Ethylamine. Yield 0.31 g (63%); mp 267–268 °C; IR (KBr) 3305, 3189 (N-H), 1630, 1583, 1478 (C=C, C=N, N-H), 1249, 1159 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.00 (t, 3H, CH_2CH_3), 3.10 (m, 2H, $NHCH_2CH_3$), 7.15 (m, 2H, $NHCH_2CH_3 + 5\text{-}H$), 7.60 (d, 1H, 6-*H*), 7.70 (s, 1H, 8-*H*), 10.60 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_9H_{10}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Bromo-3-propylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (35). Method A. Yield 0.39 g (75%); mp 234–235 °C; IR (KBr) 3295 (N-H), 1631, 1580, 1567, 1479 (C=C, C=N, N-H), 1260, 1164 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.85 (t, 3H, $CH_2CH_2CH_3$), 1.50 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_3$), 3.15 (m, 2H, $NHCH_2CH_2CH_3$), 7.00 (s, 1H, *NHCH_2), 7.15 (s, 1H, 5-*H*), 7.55 (s, 1H, 6-*H*), 7.70 (s, 1H, 8-*H*), 10.60 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{12}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.*

7-Bromo-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (36). Method A. Yield 0.21 g (40%); mp 220–221 °C; IR (KBr) 3293 (N-H), 1619, 1578, 1480 (C=C, C=N, N-H), 1276, 1146 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.20 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 3.95 (m, 1H, $NHCH_2$), 7.15 (bd, 1H, $NHCH_2$), 7.20 (d, 1H, 5-*H*), 7.75 (m, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.45 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{12}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

***R,S*-7-Bromo-3-(2-butylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (37).** Method A. Yield 0.30 g (58%); mp 224–226 °C; IR (KBr) 3320 (N-H), 1622, 1579, 1490 (C=C, C=N, N-H), 1277, 1158 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.80 (t, 3H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1.10 (d, 3H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1.40 (m, 2H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 3.70 (m, 1H, $NHCH_2$), 6.95 (s, 1H, $NHCH_2$), 7.10 (d, 1H, 5-*H*), 7.60 (d, 1H, 6-*H*), 7.65 (s, 1H, 8-*H*), 10.35 (s, 1H, *NH*). Anal. ($C_{11}H_{14}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

***R,S*-7-Bromo-3-(3-methyl-2-butylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (38).** Method C. Yield 0.39 g

(69%); mp 254–256 °C; IR (KBr) 3319 (N-H), 1618, 1578, 1468 (C=C, C=N, N-H), 1252, 1151 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.90 (d, 6H, $CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 1.00 (d, 3H, $CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 1.65 (m, 1H, $CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3.60 (m, 1H, $NHCH_2$), 6.95 (bs, 1H, $NHCH_2$), 7.10 (d, 1H, 5-*H*), 7.65 (d, 1H, 6-*H*), 7.70 (s, 1H, 8-*H*), 10.30 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{12}H_{16}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Bromo-3-cyclopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (39). Method A. Yield 0.36 g (70%); mp 248–253 °C; IR (KBr) 3274 (N-H), 1621, 1528, 1483 (C=C, C=N, N-H), 1251, 1158 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.35–0.95 (m, 4H, $CH(CH_2)_2$), 3.60 (bs, 1H, $NHCH_2$), 7.20 (d, 1H, 5-*H*), 7.65 (m, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.50 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{10}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Bromo-3-cyclobutylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (40). Method B. Yield 0.34 g (63%); mp 279–281 °C; IR (KBr) 3288 (N-H), 1631, 1580, 1563, 1480 (C=C, C=N, N-H), 1258, 1153 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.00–2.35 (bm, 6H, $CH(CH_2)_2$), 4.15 (m, 1H, $NHCH_2$), 7.10 (d, 1H, 5-*H*), 7.55 (d, 1H, 6-*H*), 6.90–7.80 (b, $NHCH_2$), 8.70 (d, 1H, 8-*H*), 10.50 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{11}H_{12}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

3-Allylamino-7-bromo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (41). Method A. Yield 0.33 g (65%); mp 243–245 °C; IR (KBr) 3361 (N-H), 1631, 1582, 1477 (C=C, C=N, N-H), 1252, 1162 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 3.80 (bm, 2H, $CH_2CH=CH_2$), 4.95–5.25 (m, 2H, $CH_2CH=CH_2$), 5.55–6.05 (m, 1H, $CH_2CH=CH_2$), 7.10 (d, 1H, 5-*H*), 7.30 (bs, 1H, *NH*), 7.65 (m, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.70 (s, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{10}BrN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Iodo-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (42). Method A. Yield 0.34 g (67%); mp 306–308 °C; IR (KBr) 3286 (N-H), 1617, 1571, 1476 (C=N, C=C, N-H), 1245, 1174 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.15 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 3.90 (m, 1H, $NHCH_2$), 7.00 (d, 1H, 5-*H*), 7.15 (bd, 1H, $NHCH_2$), 7.75 (d, 1H, 6-*H*), 7.85 (s, 1H, 8-*H*), 10.45 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{10}H_{12}IN_3O_2S$) C, H, N, S.

***R,S*-7-Iodo-3-(2-butylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (43).** Method A. Yield 0.37 g (70%); mp 253–254 °C; IR (KBr) 3318 (N-H), 1618, 1573, 1476 (C=N, C=C, N-H), 1247, 1149 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.80 (t, 3H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1.10 (d, 3H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1.40 (m, 2H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 3.60 (m, 1H, $NHCH_2$), 6.80–7.10 (m, 2H, 5-*H* + $NHCH_2$), 7.60–7.90 (m, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.30 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{11}H_{14}IN_3O_2S$) C, H, N, S.

***R,S*-7-Iodo-3-(3-methyl-2-butylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (44).** Method C. Yield 0.33 g (60%); mp 267–270 °C; IR (KBr) 3317 (N-H), 1616, 1573, 1475 (C=N, C=C, N-H), 1248, 1156 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.75 (d, 6H, $CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 1.00 (d, 3H, $CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 1.65 (m, 1H, $CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3.60 (m, 1H, $NHCH_2$), 6.80–7.10 (m, 2H, 5-*H* + $NHCH_2$), 7.60–7.90 (bd, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.25 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{12}H_{16}IN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Iodo-3-(3-pentylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (45). Method C. Yield 0.33 g (60%); mp 210–220 °C; IR (KBr) 3314 (N-H), 1617, 1574, 1475 (C=C, C=N, N-H), 1277, 1151 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.75 (t, 6H, $CH(CH_2)_2CH_3$), 1.40 (m, 4H, $CH(CH_2)_2CH_3$), 3.60 (m, 1H, $NHCH_2$), 6.95 (bd, 2H, $NHCH_2 + 5\text{-}H$), 7.75 (d, 1H, 6-*H*), 7.85 (s, 1H, 8-*H*), 10.25 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{12}H_{18}IN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Iodo-3-cyclobutylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (46). Method B. Yield 0.32 g (60%); mp 295–297 °C; IR (KBr) 3297 (N-H), 1633, 1556, 1476 (C=C, C=N, N-H), 1241, 1148 (S=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.30–2.30 (m, 6H, $CH(CH_2)_2$), 4.10 (m, 1H, $NHCH_2$), 6.95 (d, 1H, 5-*H*), 7.50 (d, 1H, $NHCH_2$), 7.75 (d, 2H, 6-*H* + 8-*H*), 10.35 (bs, 1H, *NH*). Anal. ($C_{11}H_{12}IN_3O_2S$) C, H, N, S.

7-Chloro-4-methyl-3-methylsulfonyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (47). K_2CO_3 (0.96 g, 6.9 mmol) and an excess of methyl iodide (5 mL) were added to a solution of 7-chloro-3-methylsulfonyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-diox-

ide (9b, 2.0 g, 7.6 mmol) in acetonitrile/DMF, 4:1 (25 mL). The suspension was stirred for 10 h at room temperature. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the solid residue was taken up by water (40 mL). The resulting aqueous suspension was adjusted to pH 2 by means of formic acid, and the solid was collected by filtration and washed with water. The crude compound was recrystallized in methanol/water (1.87 g, 89%); mp 211–213 °C (lit., 219–220 °C).³² Anal. (C₁₄H₁₆ClN₂O₂S₂) C, H, N, S.

7-Chloro-3-isopropylamino-4-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide Hemihydrate (48). A mixture of 7-chloro-4-methyl-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (47, 0.4 g, 1.45 mmol) in isopropylamine (4 mL) was refluxed for 90 min. The amine was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was suspended in water (20 mL). After the mixture was stirred for 1 h at room temperature, the precipitate was collected by filtration, washed with water, and recrystallized in methanol/water (0.27 g, 63%); mp 176–183 °C; IR (KBr) 3321 (N–H), 1603, 1554, 1470 (C=N, C=C, N–H), 1283, 1171 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.10 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 3.20 (s, 3H, N–CH₃), 3.35 (s, 3H, N–CH₃), 3.95 (m, 1H, NHCH), 7.30–7.70 (m, 4H, NH + 5-H + 6-H + 8-H). Anal. (C₁₁H₁₄ClN₂O₂S·0.5H₂O) C, H, N, S.

7-Chloro-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (49). The suspension of 7-chloro-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (9b, 5.0 g, 19 mmol) in an aqueous solution of Na₂CO₃ (2.2 g/25 mL) was supplemented with 2 N NaOH until complete dissolution. Bromine (1.0 mL) was added under stirring at room temperature, and after the mixture was vigorously stirred for 10 min, the resulting suspension was adjusted to pH 2–3 by means of 6 N HCl. The insoluble portion was collected by filtration, washed with water, and suspended under stirring in methanol (20 mL). The precipitate was collected by filtration, washed with methanol, and dried (4.5 g, 85%); mp 260–261 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 2.95 (s, 3H, SOCH₃), 7.80–8.00 (m, 3H, 5-H + 6-H + 8-H). Anal. (C₁₁H₁₀ClN₂O₂S₂) C, H, N, S.

7-Chloro-3-*tert*-butylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (26). A mixture of 7-chloro-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (49, 0.5 g, 1.79 mmol) and *tert*-butylamine (8 mL) was heated in a sealed vessel for 2 h at 160 °C. The excess of amine was eliminated by distillation under reduced pressure, and the residue was dissolved in a hydromethanolic (1:1) 2% w/v solution of NaOH (20 mL). The alkaline solution was treated with charcoal and was filtered, and the filtrate was adjusted to pH 4–5 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The compound was recrystallized in methanol/water (0.28 g, 55%); mp 264–266 °C; IR (KBr) 3328 (N–H), 1627, 1576, 1481 (C=N, C=C, N–H), 1280, 1141 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 1.30 (s, 9H, C(CH₃)₃), 6.75 (bs, 1H, NH C(CH₃)₃), 7.05 (d, 1H, 5-*H*), 7.50 (d, 1H, 6-*H*), 7.60 (s, 1H, 8-*H*), 10.20 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₁H₁₄ClN₂O₂S) C, H, N, S.

7-Chloro-3-(1,1-dimethylpropylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (27). The compound was obtained as described for 26, starting from 7-chloro-3-methylsulfanyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (49, 0.5 g, 1.79 mmol) and using 1,1-dimethylpropylamine (8 mL) instead of *tert*-butylamine (0.22 g, 40%); mp 258–259 °C; IR (KBr) 3305 (N–H), 1629, 1566, 1479 (C=N, C=C, N–H), 1250, 1149 (S=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz) δ 0.75 (t, 3H, C(CH₃)₂-CH₂-CH₃), 1.20 (s, 6H, C(CH₃)₂-CH₂-CH₃), 1.70 (q, 2H, C(CH₃)₂-CH₂-CH₃), 6.65 (bs, 1H, NH C(CH₃)₂-CH₂-CH₃), 7.05 (d, 1H, 5-*H*), 7.50 (d, 1H, 6-*H*), 7.60 (s, 1H, 8-*H*), 10.20 (bs, 1H, NH). Anal. (C₁₂H₁₆ClN₂O₂S) C, H, N, S.

Ionization Constants. The p*K*_a values of compounds 4, 13, 36, and 42 were determined spectroscopically by means of a Perkin-Elmer UV/vis 554 spectrophotometer at 20 °C. UV spectra were taken in different aqueous buffers of pH ranging from 3 to 12. The p*K*_a values were calculated by the Debye–Hückel equation at the maximum basic form absorbance.¹⁶

Biological Assays. Measurements of Insulin Release from Incubated Pancreatic Islets. Pancreatic islets were isolated by the collagenase method from fed Wistar rats (180–220 g). Groups of 10 islets, each derived from the same batch of islets, were preincubated for 30 min at 37 °C in 1 mL of a physiological salt medium (in mM: NaCl 115, KCl 5, CaCl₂ 2.56, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24) supplemented with 2.8 mM glucose and 0.5% (w/v) dialyzed albumin (Sigma) and equilibrated against a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%).

The islets were then incubated at 37 °C for 90 min in 1 mL of the same medium containing 16.7 mM glucose and, in addition, the reference compound or the benzothiadiazine derivative. The release of insulin was measured radioimmunologically using rat insulin as a standard.³⁴

Residual insulin secretion was expressed as a percentage of the value recorded in control experiments (100%), i.e., in the absence of drug and presence of 16.7 mM glucose.

Measurements of Contractile Activity in Rat Aorta. All experiments were performed with aortae removed from fed Wistar rats (180–220 g). A section of the aorta was cleared of adhering fat and connective tissue and was cut into transverse rings (3–4 mm long). The endothelium was removed by rubbing the intimal surface with forceps. The segments were suspended under 1.5 g of tension by means of steel hooks in an organ bath containing 20 mL of a Krebs bicarbonate buffered solution of the following composition (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucose 5. The physiological solutions were maintained at 37 °C and bubbled continuously with a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%). The isometric contractions of the aortic rings were measured with a force–displacement transducer. After 60 min of equilibration, the rings were exposed to 30 mM KCl. When the tension had stabilized, the drugs were added to the bath at increasing concentrations until maximal relaxation (or until 0.3 mM). The relaxation response was expressed as the percentage of the contractile response to KCl. The ED₅₀ values (drug concentration evoking 50% inhibition of the plateau phase induced by KCl) were assessed from dose–response curves using Datanalyst software (EMKA Technologies, France).

Measurements of ⁸⁶Rb Outflow from Rat Pancreatic Islets. The method used for measuring ⁸⁶Rb (⁴²K substitute) outflow from prelabeled and perfused rat pancreatic islets was previously described in detail.^{3,13,23} Experiments were conducted in the absence and presence of glibenclamide in the basal medium.

Electrophysiology. Mouse Kir6.2 (Genbank D50581), rat SUR1 (Genbank L40624), SUR2A (Genbank D83598), and SUR2B (Genbank D86038) cDNAs were cloned in the pBF vector. A truncated form of Kir6.2 (Kir6.2ΔC36), which lacks the C-terminal 36 amino acids and forms functional channels in the absence of SUR, was prepared as described previously.³⁵ Capped mRNA was prepared using the mMESSAGE large scale in vitro transcription kit (Ambion, Austin, TX), as previously described.³⁶ Female *Xenopus laevis* were anesthetized with MS222 (2 g/L added to the water). One ovary was removed via a minilaparotomy; the incision was sutured, and the animal was allowed to recover. Once the wound had completely healed, the second ovary was removed in a similar operation and the animal was then killed by decapitation while under anaesthesia. Immature stages V–VI oocytes were incubated for 60 min with 1.0 mg/mL collagenase (Sigma, type V) and manually defolliculated. Oocytes were either injected with ~1 ng of Kir6.2ΔC36 mRNA or co-injected with ~0.1 ng Kir6.2 mRNA and ~2 ng of mRNA encoding wild-type SUR. The final injection volume was 50 nL/oocyte. Isolated oocytes were maintained in Barth's solution and studied 1–5 days after injection. Patch pipets were pulled from thick-walled borosilicate glass and had resistances of 250–500 kΩ when filled with pipet solution. Macroscopic currents were recorded from giant excised inside-out patches at a holding potential of 0 mV and at 20–24 °C. Currents were evoked by repetitive 3 s voltage ramps from –110 to +100 mV and recorded using an EPC7 patch-clamp amplifier (List Elektronik, Darmstadt, Germany). They were filtered at 0.2 kHz, digitized at 0.4 kHz

using a Digidata 1200 interface, and analyzed using pClamp software (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). The pipet (external) solution contained the following (mM): 140 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.6 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7.4 with KOH). The intracellular (bath) solution contained the following (mM): 107 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2 with KOH; final [K⁺] ≈ 140 mM). Compound 18 (BPDZ 176) was prepared as a 100 mM stock solution in DMSO. In control experiments, the maximal DMSO concentration applied (0.1%) had no effect on the K_{ATP} current. Solutions containing ATP were made up fresh each day.

Acknowledgment. This study was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium) from which P. de Tullio is a Research Associate, B. Pirotte is a Senior Research Associate, and P. Lebrun is a Research Director. The technical assistance of S. Counerotte, D. Dewalque, P. Neven, M. L. Pirard, A.-M. Vanbellinghen, and A. Van Praet is gratefully acknowledged.

References

- (1) Cook, D. L.; Hales, C. N. Intracellular ATP Directly Blocks K⁺ Channels in Pancreatic B Cells. *Nature* **1984**, *311*, 271–273.
- (2) Standen, N. B.; Quayle, J. M.; Davies, N. W.; Brayden, J. E.; Huang, Y.; Nelson, M. T. Hyperpolarizing Vasodilators Activate ATP-Sensitive K⁺ Channels in Arterial Smooth Muscle. *Science* **1989**, *245*, 177–180.
- (3) Ashcroft, F. M. Adenosine 5'-Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **1988**, *11*, 97–118.
- (4) Petersen, O. H.; Durne, M. J. Regulation of K⁺ Channels Plays a Crucial Role in the Control of Insulin Secretion. *Physiol. Rev.* **1989**, *69*, S15–S120.
- (5) Kolb, H. A. Potassium Channels in Excitable and Non-Excitable Cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1990**, *15*, 51–79.
- (6) Babenko, A. P.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J. A View of SUR/Kir 6.X K_{ATP} Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 667–687.
- (7) Robertson, D. W.; Steinberg, M. I. Potassium Channel Modulators: Scientific Applications and Therapeutic Promise. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1529–1541.
- (8) Lebrun, P.; Arkhammar, P.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Hansen, J. B.; Pirotte, B. A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* **2000**, *43*, 723–732.
- (9) Björk, E.; Berne, C.; Kämppe, O.; Wibell, P.; Oskarsson, P.; Karlsson, F. A Diazoxide Treatment at Onset Preserves Residual Insulin Secretion in Adults with Autoimmune Diabetes. *Diabetes* **1996**, *45*, 1427–1430.
- (10) Alenxadeh, R.; Langley, G.; Upchurch, L.; Smith, P.; Slonim, A. E. Beneficial Effect of Diazoxide in Obese Hyperinsulinemic Adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 1911–1915.
- (11) Pirotte, B.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Fontaine, J.; Masereel, B.; Schynts, M.; Dupont, L.; Herchuelz, A.; Delarge, J. 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-d]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as Powerful Inhibitors of Insulin Release from Rat Pancreatic B-Cells: A New Class of Potassium Channel Openers? *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3211–3213.
- (12) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Fontaine, J.; Dupont, L.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Khellil, S.; Maggetto, C.; Masereel, B.; Diouf, O.; Podona, T.; Delarge, J. 3- and 4-Substituted 4H-Pyrido[4,3-d]-1,2,4-thiadiazine 1,1-Dioxides as Potassium Channel Openers: Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 937–948.
- (13) Pirotte, B.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Hermann, M.; Herchuelz, A.; Delarge, J.; Lebrun, P. A Pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a New and Potent Activator of ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1381–1386.
- (14) Antoine, M.-H.; Pirotte, B.; Hermann, M.; de Tullio, P.; Delarge, J.; Herchuelz, A.; Lebrun, P. Cationic and Secretory Effects of BPDZ 44 and Diazoxide in Rat Pancreatic Islets. *Experientia* **1994**, *50*, 830–832.
- (15) Khellil, S.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Fillet, M.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Dupont, L.; Fontaine, J.; Felekidis, A.; Leclerc, G.; Delarge, J.; Pirotte, B. Preparation and Pharmacological Evaluation of the R- and S-Enantiomers of 3-(2'-Butylamino)-4H- and 3-(3'-Methyl-2'-butylamino)-4H-pyrido[4,3-d]-1,2,4-thiadiazine 1,1-Dioxide, Two Tissue Selective ATP-Sensitive Potassium Channel Openers. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1513–1520.
- (16) Pirotte, B.; Ouedraogo, R.; de Tullio, P.; Khellil, S.; Somers, F.; Boverie, S.; Dupont, L.; Fontaine, J.; Damas, J.; Lebrun, P. 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-Dioxides Structurally Related to Diazoxide and Pincadil as Potassium Channel Openers Acting on Vascular Smooth Muscle Cells: Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1456–1466.
- (17) Dabrowski, M.; Ashcroft, F. M.; Ashfield, R.; Lebrun, P.; Pirotte, B.; Egebjerg, J.; Hansen, J. B.; Wahl, P. The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes* **2002**, *51*, 1896–1906.
- (18) Somers, F.; Ouedraogo, R.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Becker, B.; Fontaine, J.; Damas, J.; Dupont, L.; Rigo, B.; Delarge, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Original 2-Alkylamino-6-halogenoquinazolin-4(3H)-ones and K_{ATP} Channel Activity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 16, 2575–2585.
- (19) Girard, Y.; Atkinson, J. C.; Rokach, J. A New Synthesis of 1,2,4-Benzothiadiazines and a Selective Preparation of o-Aminobenzenesulphonamides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 1043–1047.
- (20) Wollweber, H.; Horstmann, H.; Stoepel, K.; Garthoff, B.; Puls, W.; Krause, H. P.; Thomas, G. 3-Amino-2H-benzothiadiazine-1,1-dioxide mit Antihypertensiver und Potentieller Diabetogener Wirkung (3-Amino-2H-benzothiadiazine 1,1-dioxide with antihypertensive and potential diabetogenic effect). *Arzneim.-Forsch.* **1981**, *31*, 279–288.
- (21) Manley, P. W.; Quast, U. Structure–Activity Studies of Potassium Channel Opening in Pincadil-Type Cyanoguanidines, Nitroethenediamines, Thioureas, and Ureas. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2327–2340.
- (22) Quast, U.; Bray, K. M.; Andres, H.; Manley, P. W.; Baumlín, Y.; Dosogno, J. Binding of the K⁺ Channel Opener [HPI]075 in Rat Isolated Aorta: Relationship to Functional Effects of Openers and Blockers. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 474–481.
- (23) Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Durme, M.; Kane, C.; Hermann, M.; Herchuelz, A.; Masereel, B.; Delarge, J.; de Tullio, P.; Pirotte, B. Activation of ATP-Dependent K⁺ Channels and Inhibition of Insulin Release: Effect of BPDZ 62. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 156–162.
- (24) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Dupont, L.; Masereel, B.; Laeckmann, D.; Podona, T.; Diouf, O.; Lebrun, P.; Delarge, J. Synthesis and Structural Studies of a New Class of Heterocyclic Compounds: 1,2,4-Pyridothiadiazine 1,1-Dioxides, Pyridyl Analogues of 1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxides. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3221–3234.
- (25) March, J. *Advanced Organic Chemistry*, 3rd ed.; Wiley: New York, 1985.
- (26) Dupont, L.; de Tullio, P.; Tinant, B.; Pirotte, B. (R/S)-3-(3-Methyl-2-butylamino)-4H-pyrido[4,3-d]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide Monohydrate. *Acta Crystallogr.* **2001**, *E57*, o1050–o1051.
- (27) Dupont, L.; Pirotte, B.; de Tullio, P. 7-Iodo-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide. *Acta Crystallogr.* **1999**, *C55*, 1152–1154.
- (28) Di Bella, M.; Monzani, A.; Albasini, A.; Conti, G. Ricerche Nel Campo della 1,2,4-Benzothiadiazina (Searches in the Field of 1,2,4-Benzothiadiazines). *Farmaco* **1966**, *12*, 829–838.
- (29) Di Bella, M.; Rinaldi, M.; Coppi, G.; Fabio, U.; Manicardi, G. Azione Antimicrobica di Derivati dell'1,2,4-Benzothiadiazin-1,1-diossido (Antimicrobial action of derivatives of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide). *Farmaco* **1974**, *29*, 915–922.
- (30) Di Bella, M.; Rinaldi, M.; Fabio, U.; Manicardi, G. Azione Antimicrobica di Derivati dell'1,2,4-Benzothiadiazin-1,1-diossido (Antimicrobial action of derivatives of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide). *Farmaco* **1972**, *27*, 990–998.
- (31) Parenti, C.; Constantino, L.; Di Bella, M.; Raffa, L.; Baggio, G.; Rossi, T. Heteroaryl-alkanonic Acids with Possible Anti-inflammatory Activities IV. *Boll. Chim. Farm.* **1987**, *126*, 239–243.
- (32) Raffa, L.; Di Bella, M.; Ferrari, P.; Rinaldi, M.; Ferrari, N. Azione Cardiovascolare di Derivati dell'1,2,4-Benzothiadiazin-1,1-diossido. Nota IV (Cardiovascular Action of Derivatives of 1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide. Part IV). *Farmaco, Ed. Sci.* **1974**, *29*, 411–423.
- (33) Di Bella, M.; Rinaldi, M.; Fabio, U.; Manicardi, G. Azione Antimicrobica di Derivati dell'1,2,4-Benzothiadiazin-1,1-diossido (Antimicrobial Action of Derivatives of 1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide). *Farmaco* **1973**, *28*, 1169–1177.
- (34) Leclercq-Meyer, Y.; Marchand, J.; Woussier-Cotte, M. C.; Giroix, M.-H.; Malaise, W. J. Multiple Effects of Leucine on Glucagon, Insulin, and Somatostatin Secretion from the Perfused Rat Pancreas. *Endocrinology* **1985**, *116*, 1168–1174.
- (35) Tucker, S. J.; Gribble, F. M.; Zhao, C.; Trapp, S.; Ashcroft, F. M. Truncation of Kir6.2 Produces ATP-Sensitive K⁺ Channels in the Absence of the Sulphonylurea Receptor. *Nature* **1997**, *387*, 179–181.
- (36) Gribble, F. M.; Ashfield, R.; Ammälä, C.; Ashcroft, F. M. Properties of Cloned ATP-Sensitive K⁺-Currents Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Physiol.* **1997**, *498*, 87–98.

Annexe 7

Effect on K_{ATP} Channel Activation Properties and Tissue Selectivity of the Nature of the Substituent in the 7- and the 3-Position of 4*H*-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxides

Stéphane Boverie,[†] Marie-Hélène Antoine,[‡] Fabian Somers,[†] Bénédicte Becker,[‡] Sophie Sebillé,[†] Raogo Ouedraogo,[‡] Stéphane Counerotte,[†] Bernard Pirotte,[†] Philippe Lebrun,[‡] and Pascal de Tullio^{*,†}

Centre de Recherche en Pharmacochimie des Substances Naturelles et Synthétiques, Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Université de Liège, 1, avenue de l'Hôpital, CHU, Tour 4, B-4000 Liège, Belgium, and Laboratoire de Pharmacodynamie et de thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808, route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgium

Received December 11, 2003

The present work explored 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides diversely substituted in the 7-position. Those compounds, structurally related to previously described potassium channel openers such as the benzothiadiazine dioxides BPDZ 73, were tested as putative K_{ATP} channel activators on the pancreatic endocrine tissue and on the vascular smooth muscle tissue. The nature of the substituent introduced in the 7-position as well as the nature of the alkylamino side chain in the 3-position strongly affected both potency and tissue selectivity of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. Thus, compounds bearing in the 7-position a methyl or a methoxy group or devoid of a substituent in this position, and bearing an ethyl, an isopropyl, or a cyclobutylamino group in the 3-position were found to be potent and selective inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells (i.e. 10a, 10b, 12b, 12d, 22c). In contrast, 3-alkylamino-7-trifluoromethyl- (20a–c) and 3-alkylamino-7-pentyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (11a,b) expressed a marked myorelaxant activity on rat aorta ring. Among the latter compounds, the 3-alkylamino-7-pentyl derivative (11a) showed a clear selectivity for the vascular smooth muscle tissue. The present work gives new insights into the role of the substituent in both the 7- and the 3-position for the design of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide potassium channel openers exhibiting different tissue selectivity profiles.

Introduction

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) are involved in the transmembrane movement of potassium ions and the control of the cell membrane potential.¹ These channels are able to link the membrane excitability to the metabolic state of the cell. They have been characterized in numerous cell types such as cardiac, pancreatic B (insulin-secreting)-cells, skeletal muscles cells, smooth muscle cells, and central neurons.^{2–8} Over the past few years, an increasing interest in drugs (diazoxide (1), pinacidil (2), cromakalim (3), etc.) activating K_{ATP} channels has been observed (Figure 1). Such compounds, named potassium channel openers (PCOs), mainly exert their biological effects by promoting membrane hyperpolarization.^{9–11} They are able to interfere with several physiological processes such as insulin release from pancreatic B-cells and contractile activity from smooth muscle cells.^{12,13} The therapeutic interest of potassium channel openers is of significance since they provide efficient tools to interfere with the cell excitability. Clinical studies have shown that short-term treatment with the K_{ATP} channel activator diazoxide preserved endogenous insulin production in patients with newly manifested autoimmune diabetes and reduce body fat in hyperinsulinemic obese adults.^{14,15} However, the poor tissue selectivity of diazoxide impairs its

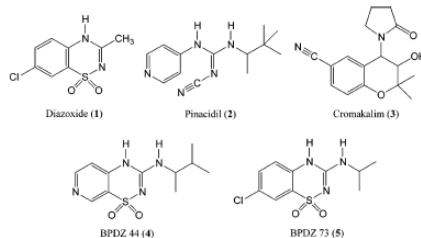


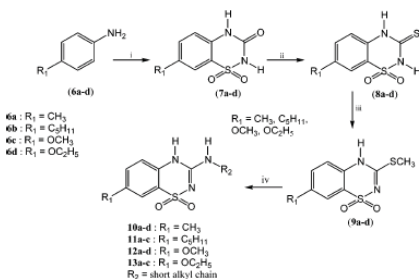
Figure 1. Chemical structure of several K_{ATP} channel openers.

clinical use due to marked side effects such as hypertrichosis, edema, and headache.¹⁶ K_{ATP} channels are large heteromultimers composed of two different protein subunits coassembled in a 4:4 stoichiometry to form an octameric channel.¹⁷ One subunit, the Kir6.x, is a traditional channel protein belonging to the inward rectifying potassium channel superfamily (Kir) while the second subunit refers to the sulfonylurea receptor (SUR). Tissue selectivity properties of PCOs are correlated to the identity of the SUR isoform expressed in the tissue. For instance, the Kir6.2/SUR1 channel, which is found in neuronal cells and pancreatic B-cells, is activated by diazoxide but only slightly by pinacidil.^{9,18} The Kir6.2/SUR2A channel, predominant in skeletal cardiac muscle cells, is activated by pinacidil but not by diazoxide while the Kir6.2/SUR2B channel,

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +32 4 366 43 69; fax: +32 4 366 43 62; e-mail: P.DeTullio@ulg.ac.be.

[†] Université de Liège.

[‡] Université Libre de Bruxelles.

Scheme 1^a

found in smooth muscle cells, is activated both by pinacidil and diazoxide.^{19–22} Thus, and due to the ubiquitous distribution of *K*_{ATP} channels, the development of novel PCOs should be linked to the expression of a high selectivity for a single channel subtype located on a single target tissue.

Previous works performed in our laboratories led to the development of original 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides, among which BPDZ 44 (4) was reported to be a more potent and more selective pancreatic B-cell *K*_{ATP} channel opener than diazoxide (Figure 1).^{23,24} To improve activity and selectivity for the pancreatic B-cell *K*_{ATP} channel, we also prepared the 7-halobenzenic counterparts of pyridothiadiazines. From those original compounds, BPDZ 73 (5) (7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, Figure 1) appeared to be one of the most potent pancreatic *K*_{ATP} channel activator reported to date.^{12,25,26}

In the present study, we examined different series of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides structurally related to BPDZ 73 (5). Particular attention was paid to the influence of the nature of the substituent in the 7-position (steric, lipophilic, electronic impact) and the size as well as the branching of the alkylamino side chain in the 3-position. The new compounds were examined as putative potassium channel openers on rat pancreatic islets and on rat aorta rings. The structure-activity relationships of these putative PCOs will also be discussed.

Chemistry

The synthetic pathways used to prepare the different 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides reported here are illustrated in Schemes 1–4.

The strategy described in Scheme 1 was based on previously reported synthetic procedures.²⁶ 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides bearing a methyl (10a–d), a pentyl (11a–d), a methoxy (12a–c), and an ethoxy group (13a–c) in the 7-position were obtained in a four-step reaction starting from the appropriate para-substituted aniline (6a–d). First of all, the anilines were transformed after reaction with chlorosulfonyl isocyanate into the corresponding 7-substituted 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (7a–d).²⁷ Subsequent thionation of the oxo

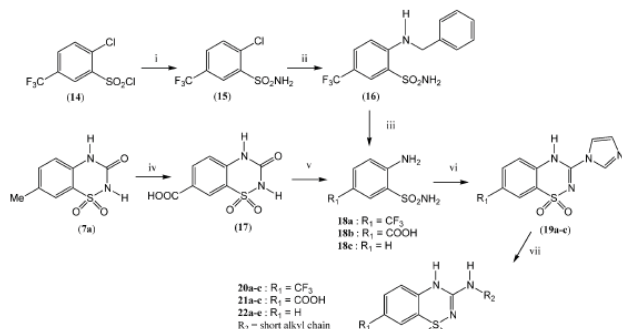
derivatives (7a–d) with phosphorus pentasulfide in pyridine led to 7-substituted 3-thio-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (8a–d). In the next step, the synthesis of 7-substituted 3-(methylsulfonyl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (9a–d)²⁸ was achieved, with an excellent yield, by reaction of the thio derivatives (8a–d) with methyl iodide in the presence of sodium hydrogenocarbonate. Finally, the different 7-substituted 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (10a–d, 11a–d, 12a–c, 13a–c) were obtained by heating the methylsulfonyl intermediates (9a–d) in a sealed vessel with an excess of the appropriate alkylamine.

2-Amino-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (18a) (Scheme 2) was prepared from commercially available 2-chloro-5-trifluoromethylbenzenesulfonyl chloride (14). The latter intermediate (14), by reaction with a diluted solution of ammonia, gave access to 2-chloro-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (15). Nucleophilic substitution of the chlorine atom was achieved by reaction of 15 with benzylamine to form the intermediate 16. Removal of the benzyl group by catalytic hydrogenolysis led to the desired key intermediate 2-amino-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (18a). The 4-amino-3-sulfamoylbenzoic acid synthesis (Scheme 2) started from 7-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7a) which was oxidized by means of potassium permanganate to the corresponding acid (17). Subsequent hydrolysis of 17 under acidic conditions led to the desired compound 18b.

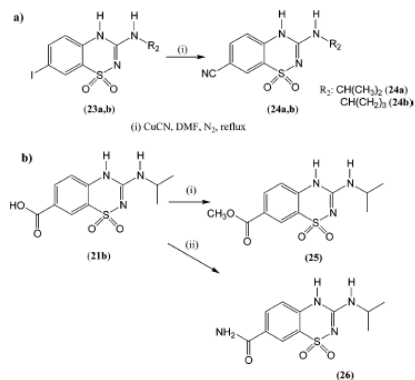
The ring closure reaction between 5-substituted 2-aminobenzenesulfonamides and 1,1'-thiocarbonyldiimidazole may give access, according to the starting materials and the experimental conditions used, either to 7-substituted 3-thio-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides or to 3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (19a–c).²⁹ In the case of 2-aminobenzenesulfonamides (18a–c), reaction with an excess of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole in dioxane gave access to the 3-(1*H*-imidazol-1-yl)-substituted intermediates. The latter were converted, with good yields, to the corresponding 7-substituted 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (20a–c, 21a–c, 22a–e) after reaction with the appropriate alkylamine.

As described in Scheme 3a, 3-alkylamino-7-cyano-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (24a,b) were obtained from the substitution of the iodine atom of the corresponding 3-alkylamino-7-iodo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (23a,b)²⁶ with cyanide ion as the cuprous salt in hot DMF. Compound 25 was obtained by reaction of 21b with MeOH in the presence of H₂SO₄ whereas compound 26 resulted from the reaction of 21b with carbonyldiimidazole in DMF followed by reaction of the activated intermediate with ammonia (Scheme 3b).

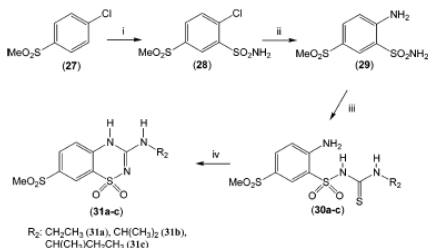
3-Alkylamino-7-methylsulfonyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (31a–c) were not obtained from the ring closure reaction of 2-amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonamide (29) with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole and subsequent reaction with an appropriate alkylamine due to low yields of the imidazolyl intermediate obtained in that case. An alternative route in a four-step reaction, starting from 4-chloro-1-methylsulfonylbenzene (29), was used to give access to the desired

Scheme 2^a

^a Reagents and conditions: (i) NH_4OH ; (ii) benzylamine, Δ ; (iii) Pd/C 5%, H_2 5 bars, MeOH; (iv) $KMnO_4$; (v) H_2SO_4 50%, Δ ; (vi) 1,1'-thiocarbonyldiimidazole, dioxane, DMF, Δ ; (vii) R_2NH , Δ .

Scheme 3^a

^a Reagents and conditions: (i) MeOH, H_2SO_4 ; (ii) 1: carbonyl-diimidazole; 2: NH_4OH .

Scheme 4^a

^a Reagents and conditions: (i) 1: $ClSO_3H$; 2: NH_4OH ; (ii) concd NH_4OH , Δ ; (iii) R_2NCS , K_2CO_3 , acetone; (iv) $N(C_2H_5)_3$, Cl_2CO , THF.

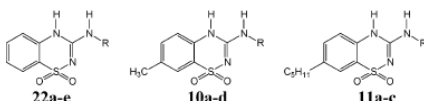
compounds (Scheme 4). Compound 28 was obtained from the reaction of 4-chloro-1-methylsulfonylbenzene

(27) with chlorosulfonic acid, followed by the reaction of the sulfonyl chloride intermediate with aqueous ammonia. Treatment of 28 with a saturated aqueous solution of ammonia in a sealed vessel gave 2-amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonamide (29). The latter was converted into the *N*-alkyl-*N'*-(2-amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-thioureas (30a–c) after reaction with the appropriate alkylisothiocyanates. The sulfonylthioureas were converted by ring closure into the corresponding 3-alkylamino-7-methylsulfonyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (31a–c) by treatment with a toluenic solution of phosgene in the presence of triethylamine at 0 °C.³⁰

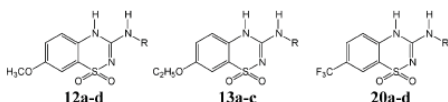
Results and Discussion

The ability of the newly synthesized compounds to inhibit the glucose-induced insulin secretion was evaluated on isolated rat pancreatic islets. Tables 1–4 report the *in vitro* results expressed as the percentage of residual insulin release at different drug concentrations. The data revealed that several drugs markedly inhibited the insulin releasing process. Moreover, some newly synthesized derivatives (10a–d, 12a–d, 20b, and 22a–e) were found to be more potent than diazoxide used as a reference PCO.²³

The nature of the substituent in the 7-position and in the 3-position strongly affected the activity on insulin secreting cells. 7-COOH-substituted compounds (21a–c) appeared to be completely inactive (Table 3). It is expected that the carboxylic group in the 7-position will be deprotonated at physiological pH (7.4), giving an anionic site in this position. Such an event could maybe explain the lack of biological activity. However, even when the carboxylic group was converted into the nonionic methyl ester group (25), the activity on B-cells remained to be negligible. Surprisingly, a carboxamido group (26) conferred a better activity. 7-Pentyl- (11a–c) (Table 1), 7-ethoxy- (13a,c) (Table 2), 7-cyano- (24a,b) (Table 3), 7-methylsulfonyl- (31a–c) (Table 3), 7-nitro- (32a,c–e)³¹ (Table 4), 7-amino- (33)³¹ (Table 4) and 7-acetamido- (34)³¹ (Table 4) substituted 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides were also found to express a weak activity as inhibitors of insulin release. The

Table 1. Effects of 7-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings


compd	R	rat pancreatic B-cells % RIS ^a			rat aorta rings ED ₅₀ ^b (μM)
		50 μM	10 μM	1 μM	
22a	CH ₂ CH ₃	N.D.	25.8 ± 2.0 (12)	77.4 ± 3.8 (23)	> 300 (4)
22b	CH ₂ CH ₂ CH ₃	N.D.	54.2 ± 3.2 (21)	93.8 ± 4.6 (16)	> 300 (4)
22c	CH(CH ₃) ₂	N.D.	34.9 ± 2.0 (16)	73.7 ± 5.2 (15)	> 300 (4)
22d	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	N.D.	42.7 ± 1.5 (16)	90.4 ± 5.0 (16)	precipitate
22e	CH(CH ₂) ₅ ^d	N.D.	29.8 ± 1.6 (14)	79.9 ± 4.5 (16)	precipitate
10a	CH ₂ CH ₃	N.D.	8.6 ± 0.9 (12)	83.8 ± 4.2 (23)	210.2 ± 32.2 (6)
10b	CH(CH ₃) ₂	3.5 ± 0.3 (13)	8.5 ± 0.7 (14)	71.3 ± 3.5 (15)	200.0 ± 47.6 (3)
10c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	N.D.	50.7 ± 3.1 (23)	93.6 ± 5.9 (22)	15.5 ± 3.2 (10)
10d	CH(CH ₂) ₅ ^d	3.7 ± 0.3 (11)	19.7 ± 1.3 (24)	99.5 ± 4.7 (23)	58.4 ± 7.0 (4)
11a	CH ₂ CH ₃	N.D.	104.6 ± 5.2 (16)	N.D.	6.6 ± 0.3 (4)
11b	CH(CH ₃) ₂	N.D.	106.0 ± 5.3 (16)	N.D.	20.1 ± 4.6 (4)
11c	CH(CH ₂) ₅ ^d	N.D.	95.3 ± 6.1 (15)	N.D.	> 30 (4)
	diazoxide	26.7 ± 1.6 (16) ^e	73.9 ± 4.4 (16) ^e	87.5 ± 5.0 (15) ^e	22.4 ± 2.1 (11) ^e
	BPDZ 44	8.6 ± 0.9 (23)	13.7 ± 1.2 (23)	70.5 ± 4.4 (19)	154.4 ± 14.5 (8) ^e
	BPDZ 73	5.7 ± 0.5 (35) ^e	4.9 ± 0.4 (32) ^e	36.2 ± 2.4 (31) ^e	36.3 ± 2.2 (6) ^e

^a RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (n)).^b ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (n)).^c Published results (ref 26). ^d Cyclohexyl.**Table 2.** Effects of 7-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings


compd	R	rat pancreatic B-cells, % RIS ^a			rat aorta rings ED ₅₀ ^b (μM)
		50 μM	10 μM	1 μM	
12a	CH ₂ CH ₂ CH ₃	6.3 ± 0.6 (12)	47.4 ± 3.6 (14)	101.7 ± 4.7 (16)	> 300 (4)
12b	CH(CH ₃) ₂ ^e	4.4 ± 0.7 (12)	8.5 ± 0.9 (24)	67.6 ± 3.4 (20)	274.0 ± 19.0 (5)
12c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	8.5 ± 1.4 (9)	23.4 ± 1.7 (15)	92.4 ± 5.8 (15)	17.5 ± 3.6 (4)
12d	CH(CH ₂) ₅ ^d	4.0 ± 0.2 (12)	14.1 ± 0.9 (15)	71.3 ± 3.8 (14)	157.3 ± 7.4 (6)
13a	CH ₂ CH ₃	N.D.	75.0 ± 4.0 (24)	N.D.	162.5 ± 12.8 (4)
13b	CH(CH ₃) ₂	N.D.	65.9 ± 4.4 (14)	N.D.	233.2 ± 29.2 (4)
13c	CH(CH ₂) ₅ ^d	N.D.	84.9 ± 4.0 (16)	N.D.	> 300 (4)
20a	CH ₂ CH ₂ CH ₃	52.0 ± 2.9 (14)	77.9 ± 4.4 (22)	N.D.	2.9 ± 0.5 (4)
20b	CH(CH ₃) ₂	7.1 ± 1.0 (13)	7.4 ± 0.6 (13)	71.5 ± 4.3 (14)	13.1 ± 3.4 (6)
20c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	28.6 ± 1.8 (15)	76.1 ± 4.2 (22)	N.D.	8.9 ± 2.6 (4)
	diazoxide	26.7 ± 1.6 (16) ^e	73.9 ± 4.4 (16) ^e	87.5 ± 5.0 (15) ^e	22.4 ± 2.1 (11) ^e
	BPDZ 44	8.6 ± 0.9 (23)	13.7 ± 1.2 (23)	70.5 ± 4.4 (19)	154.4 ± 14.5 (8) ^e
	BPDZ 73	5.7 ± 0.5 (35) ^e	4.9 ± 0.4 (32) ^e	36.2 ± 2.4 (31) ^e	36.3 ± 2.2 (6) ^e

^a RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (n)).^b ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (n)).^c Published results or previously reported compounds (refs 26, 35, 39). ^d Cyclohexyl.

reduced B-cell activity observed with 3-alkylamino-7-pentyl- and 3-alkylamino-7-ethoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides compared to that observed with 7-methyl- and 7-methoxy-substituted compounds (compare 11a, 11b, and 11c with 10a, 10b, and 10d, respectively), compare 13b and 13c with 12b and 12d, respectively), could be explained at least in part by the increase of the size of the hydrocarbon chain in the 7-position (steric effect).

The rank order of potency, as inhibitors of insulin release, for compounds bearing an isopropylamino side chain in the 3-position appeared to be: 7-COOH compound (21b) = 7-COOEt compound (25) = 7-C₅H₁₁ compound (12b) ≤ 7-SO₂CH₃ compound (31b) = 7-NH₂

compound (33) = 7-NHCOCH₃ compound (34) < 7-CN compound (24a) = 7-CONH₂ compound (26) ≤ 7-C₂H₅O compound (13b) = 7-NO₂ compound (32b) < 7-H compound (22c) < 7-CF₃ compound (20b) = 7-CH₃ compound (10b) = 7-CH₃O compound (12b) < 7-chloro compound (BPDZ 73) (Tables 1–4).

The effect of the introduction of an electron-withdrawing group in the 7-position remained, however, unclear (i.e. CN 24a and SO₂CH₃ 31b compared to CF₃ 20b). Indeed, the presence of a CN or a SO₂CH₃ group provoked a drastic decrease of activity on insulin-secreting B-cells. Such an effect has already been described in a previous work with 7-NO₂-substituted compounds.³¹ Surprisingly, the CF₃ group did not induce

Table 3. Effects of 7-Substituted 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

rat pancreatic B-cells % RIS ^a					
compd	R	50 μM	10 μM	1 μM	rat aorta rings ED ₅₀ ^b (μM)
21a	CH ₂ CH ₂ CH ₃	95.3 ± 3.3 (15)	97.6 ± 6.8 (15)	N.D.	>300 (4)
21b	CH(CH ₃) ₂	98.6 ± 3.5 (16)	96.6 ± 5.0 (23)	N.D.	>300 (4)
21c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	91.2 ± 4.8 (16)	93.0 ± 6.1 (23)	N.D.	>300 (4)
24a	CH(CH ₃) ₂	23.5 ± 1.2 (21)	82.2 ± 5.0 (15)	N.D.	42.7 ± 2.9 (4)
24b	CH(CH ₃) ₂ ^d	54.3 ± 4.3 (21)	102.6 ± 6.3 (15)	N.D.	57.9 ± 6.6 (4)
25	CH(CH ₃) ₂	94.3 ± 6.2 (20)	95.7 ± 4.9 (22)	N.D.	>200 (8)
26	CH(CH ₃) ₂	N.D.	76.6 ± 3.7 (23)	N.D.	175.2 ± 35.2 (4)
31a	CH ₂ CH ₃	N.D.	91.6 ± 3.4 (16)	N.D.	>300 (4)
31b	CH(CH ₃) ₂	N.D.	90.5 ± 4.8 (15)	N.D.	127.2 ± 17.9 (4)
31c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	N.D.	97.2 ± 3.9 (16)	N.D.	126.1 ± 19.5 (4)
	Diazoxide	26.7 ± 1.6 (16) ^e	73.9 ± 4.4 (16) ^e	87.5 ± 5.0 (15) ^e	22.4 ± 2.1 (11) ^e
	BPDZ 44	8.6 ± 0.9 (23)	13.7 ± 1.2 (23)	70.5 ± 4.4 (19)	154.4 ± 14.5 (8) ^f
	BPDZ 73	5.7 ± 0.5 (35) ^e	4.9 ± 0.4 (32) ^e	36.2 ± 2.4 (31) ^e	36.3 ± 2.2 (6) ^f

^a RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (n)).^b ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (n)).^c Published results (ref 26). ^d Cyclobutyl.**Table 4.** Effects of 7-Substituted 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets and Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

rat pancreatic B-cells % RIS ^a					
compd	R	50 μM	10 μM	1 μM	rat aorta rings ED ₅₀ ^b (μM)
32a	CH ₂ CH ₂ CH ₃	88.9 ± 4.6 (16) ^e	N.D.	N.D.	15.7 ± 3.0 (7)
32b	CH(CH ₃) ₂	4.8 ± 0.6 (14) ^e	64.0 ± 3.8 (37) ^e	N.D.	23.1 ± 3.5 (4)
32c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	63.3 ± 3.8 (18) ^e	N.D.	N.D.	6.1 ± 0.9 (4)
32d	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	90.4 ± 5.2 (16) ^e	N.D.	N.D.	2.8 ± 0.8 (4)
32e	CH(CH ₃) ₂ ^d	59.6 ± 4.9 (13) ^e	N.D.	N.D.	13.8 ± 1.6 (4)
33	CH(CH ₃) ₂	85.8 ± 4.3 (15) ^e	N.D.	N.D.	>300 (4)
34	CH(CH ₃) ₂	89.3 ± 5.8 (16) ^e	N.D.	N.D.	>300 (4)
	Diazoxide	26.7 ± 1.6 (16) ^e	73.9 ± 4.4 (16) ^e	87.5 ± 5.0 (15) ^e	22.4 ± 2.1 (11) ^e
	BPDZ 44	8.6 ± 0.9 (23)	13.7 ± 1.2 (23)	70.5 ± 4.4 (19)	154.4 ± 14.5 (8) ^f
	BPDZ 73	5.7 ± 0.5 (35) ^e	4.9 ± 0.4 (32) ^e	36.2 ± 2.4 (31) ^e	36.3 ± 2.2 (6) ^f

^a RIS: percentage of residual insulin release from rat pancreatic islets incubated in the presence of 16.7 mM glucose (mean ± SEM (n)).^b ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (n)).^c Published results (refs 26 and 31). ^d Cyclobutyl.

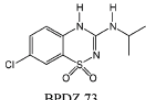
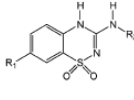
any marked reduction of activity on B-cells. The pronounced inhibitory effect of the trifluoromethyl-substituted derivative bearing an isopropylamino side chain in the 3-position (20b) may be compared to that of its 7-chloro-substituted counterpart BPDZ 73. Both compounds bear a small size lipophilic substituent in the 7-position which exerts either a moderate (Cl) or pronounced (CF₃) electron-withdrawing effect.³² By contrast, the CN, SO₂CH₃, and NO₂ substituents represent electron-withdrawing groups which rather increase hydrophilicity. The presence of an electron-donor group such as a methyl (i.e. 10a, 10b) or a methoxy moiety (i.e. 12b, 12d) appeared to increase activity on the pancreatic tissue (electronic effect). Derivatives having just an hydrogen atom in the 7-position (22a–e) were found to exhibit, on insulin-secreting cells, an intermediate activity between the electron-withdrawing group

(i.e. compounds 21, 24, 31) and the electron-donor group (i.e. compounds 10, 12).

The choice of the alkylamino side chains introduced in the 3-position of the 4*H*-benzothiadiazine 1,1-dioxides was inferred from our preliminary investigations with 3-alkylamino-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides.²⁶ As expected, the most potent inhibitors of insulin secretion carry a short linear or branched hydrocarbon chain such as ethyl and isopropyl (see 12b, 20b, 22a, 10a, 10b). In the same way, the activity of the 3-cyclobutylamino-substituted derivatives (see 10d, 12d and 22e) was close to that of the 3-ethyl (10a and 22a) or 3-isopropylamino-substituted (10b, 12b and 22c) compounds in their respective series.

The myorelaxant activity of the newly synthesized compounds as well as previously synthesized³¹ 7-NO₂, 7-NH₂ and 7-NHCOCH₃ compounds was evaluated on

Table 5. Tissue Selectivity Ratio: Pancreatic versus Aortic Tissue for Selected Compounds

		 BPDZ 73		 BPDZ 44	
compd	R ₁	R ₂	rat pancreatic B-cells: IC ₅₀ ^a (μM)	rat aorta rings: ED ₅₀ ^b (μM)	ED ₅₀ /IC ₅₀ ^c
22c	H	CH(CH ₃) ₂	3.8	>300 (4)	>79
10a	CH ₃	CH ₂ CH ₃	2.5	210.2 ± 32.2 (6)	84
10b	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	2.0	200.0 ± 47.6 (3)	100
10c	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	11.2	15.5 ± 3.2 (10)	1.4
10d	CH ₃	CH(CH ₃) ₂ ^e	5.6	58.4 ± 7.0 (4)	10
12a	CH ₃ O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	8.9	>300 (4)	>34
12b	CH ₃ O	CH(CH ₃) ₂	3.7	274.0 ± 19.0 (5)	74
12c	CH ₃ O	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	4.0	17.5 ± 3.5 (4)	4.4
12d	CH ₃ O	CH(CH ₃) ₂ ^e	2.2	157.3 ± 7.4 (6)	72
20b	CF ₃	CH(CH ₃) ₂	1.7	13.1 ± 3.4 (6)	7.7
	diazoxide		22.6 ^d	22.4 ± 2.1 (11) ^d	1.0
	BPDZ 73		0.7 ^d	36.3 ± 2.2 (6) ^d	52
	BPDZ 44		4.4 ^d	154.4 ± 14.5 (8) ^d	35

^a IC₅₀: drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^b ED₅₀: drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction of rat aortic rings (mean ± SEM (*n*)). ^c ED₅₀/IC₅₀: estimated selectivity ratio. ^d Published results (refs 26). ^e Cyclobutyl.

K⁺-depolarized rat aorta rings (Tables 1 to 4). As previously noted for the pancreatic model, the potency of the drugs was affected by the nature of the hydrocarbon chain on the exocyclic nitrogen atom in the 3-position but also by the nature of the substituent in the 7-position. Except for 7-CF₃-substituted (20a–c), 7-pentyl-substituted (11a,b), 7-NO₂-substituted (32a–e), and 3-sec-butylamino-substituted compounds (10c, 12c), most of the 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides exhibited a weaker vasorelaxant activity on rat aorta rings than diazoxide. As a rule, the introduction of an electron-withdrawing group (i.e. CF₃, NO₂, CN) rather than an electron-donor group (CH₃, OCH₃) in the 7-position appeared to improve the myorelaxant activity (compare 10b, 12b, and 13b with 20b, 24a, and 32b). 7-COOH-substituted compounds (21a–c) were found to be inactive, probably due at least in part to the same reason than that mentioned for the pancreatic model (deprotonation at physiological pH). The ester 25, which cannot be deprotonated at physiological pH, was also inactive, and the amide 26 only exhibited a poor myorelaxant activity. Likewise, the absence of a substituent in the 7-position was responsible for a lack of effect on rat aorta rings. The weak activity of 7-SO₂-CH₃-substituted compounds 31a–c and of the 7-carboxamido compound (26) could also be due to the drastic increase of hydrophilicity induced by the substituent introduced in the 7-position.³²

3-Alkylamino-7-trifluoromethyl- (20a–c) and 3-alkylamino-7-pentyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (11a,b) were found to express a marked myorelaxant activity on vascular smooth muscle cells. Thus, compared to 7-methyl-substituted compounds 10a, b, and d, the introduction of a trifluoromethyl or a pentyl group in the 7-position, which increased the lipophilicity, also improved the myorelaxant effect of the drugs.

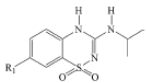
The myorelaxant activity was usually improved with the increase of the size and the branching of the alkylamino chain in the 3-position (see the 3-sec-butylamino-substituted compounds 10c and 12c compared to the corresponding 3-isopropylamino-substitut-

ed compounds 10b and 12b). Such a result is in accordance with previous structure–activity relationships reported for cyanoguanidines³³ and pyrido-²⁴ and benzothiadiazine 1,1-dioxides.²⁶ Surprisingly, in the 7-pentyl series of compounds (11a–c), the most potent compound has an ethylamino side chain in the 3-position. However, in this particular series of compounds (11a–c), and supporting the view that the global steric hindrance and the global lipophilicity of the drugs have to be limited, the presence of a large pentyl group in the 7-position could favor the myorelaxant activity of drug bearing a small alkylamino side chain in the 3-position.

ED₅₀/IC₅₀ ratios have been calculated in order to appreciate the apparent tissue selectivity (vascular versus pancreatic tissue) of some selected drugs (see Table 5). Diazoxide, which is known for its lack of tissue selectivity was found to be nearly equipotent on both tissues. BPDZ 73 (5), as previously described in the literature,^{12,26} was more selective for the pancreatic than the aortic tissue (selectivity ratio = 52).

7-Methyl-substituted and 7-methoxy-substituted 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides were found to be the most interesting drugs in terms of potency and selectivity for the pancreatic tissue. Indeed, such compounds, exhibiting an ethylamino (10a), an isopropylamino (10b, 12b), or a cyclobutylamino (10d, 12d) side chain in the 3-position, were potent inhibitors of the insulin releasing process while their myorelaxant activity was very less pronounced. The selectivity ratio for 10b was estimated to be 105. As expected, the loss of selectivity of the 7-Me and 7-MeO-substituted compounds for the pancreatic versus aortic smooth muscle tissue was linked to the increase of the size of the hydrocarbon chain in the 3-position (see 10c and 12c, Table 5).

The presence of an hydrogen atom in the 7-position (22c) was responsible for a lack of effect on rat aortic ring but appeared to further pancreatic B-cells activity. In contrast, the 7-trifluoromethyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide 20b, despite of a marked pancreatic

Table 6. pK_a Values of Selected 3-Isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides


compd	R ₁	pK_a value ^a
22c	H	9.98
BPDZ 138	F	9.63 ^b
BPDZ 73	Cl	9.51 ^b
BPDZ 135	Br	9.41 ^b
BPDZ 69	I	9.28 ^b
20b	CF ₃	8.96
24a	CN	8.56
10b	CH ₃	10.21
12b	CH ₃ O	10.11
BPDZ 145	NO ₂	7.91 ^b
BPDZ 212	NH ₂	10.49 ^b
BPDZ 213	CH ₃ CONH	9.80 ^b
diazoxide		8.62 ^b

^a The ionization constant was determined by UV spectroscopy in different aqueous buffers of pH ranking from 5 to 12. ^b Published results (refs 26, 31, 34).

activity, exhibited, like diazoxide, a poor tissue selectivity.

Biological results also indicated that the 7-pentyl-substituted compound 11a exhibited a tissue selectivity (vascular smooth muscle versus pancreatic tissue) opposite to that usually observed with 3-(ethylamino)-substituted compounds (i.e. 22a and 10a, Table 1). This finding suggests that a minor structural modification can reverse tissue selectivity.

As previously reported for diazoxide and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides, the acidity of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides is correlated with the presence of a labile proton in the 4-position of the thiadiazine ring.^{24,26,34} The presence of this hydrogen atom, and thus the nonionization of the 4-position, appeared to be required for biological activity on the pancreatic tissue.^{24,26,34} Using the UV spectrophotometry method, we have determined and compared with previously published values^{26,31} the pK_a values (Table 6) of a selection of 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine dioxides diversely substituted in the 7-position. When comparing diazoxide (8.69)³⁴ to BPDZ 73 (9.51), two 7-chloro-substituted benzothiadiazine 1,1-dioxides, it appeared that the introduction of an alkylamino side chain in the 3-position increased the pK_a value (Table 6). This was probably due to the lone pair delocalization of the exocyclic nitrogen atom into the guanidinic system. The pK_a values of previously synthesized halo-substituted compounds (BPDZ 69, BPDZ 73, BPDZ 135, BPDZ 138) showed that the increase of the acidic character (7-F: 9.63, 7-Cl: 9.51, 7-Br: 9.41, and 7-I: 9.28) can be satisfactorily correlated with the increase of the Hammett σ_p constant of the substituent (0.15, 0.24, 0.26, 0.28, respectively; compare to 7-hydrogen-substituted compound 22c with $\sigma_p = 0$ and pK_a value of 9.98).²⁶ As expected, the halo-substituted compounds should exist in more than 99% in the nonionized state at the physiological pH (7.4). Table 6 also reports derivatives bearing electron-withdrawing groups (20b, 24a, BPDZ 145, BPDZ 213) or electron-donating groups (10b, 12b, BPDZ 212) in the 7-position. Derivatives substituted with an electron-donating group were shown

to be less acidic than diazoxide and 7-hydrogen-substituted compound 22c. They should be mainly nonionized at physiological pH. In contrast, compounds 24a and BPDZ 145, two compounds bearing an electron-withdrawing group, were more acidic than diazoxide and compound 22c. The calculated ionized fraction at pH 7.4 was 23.6% for the nitro derivative (BPDZ 145) and 6.5% for the cyano derivative (24), respectively. To some extent, the weaker activity of 7-nitro compounds as inhibitors of insulin release, could be explained by a pK_a value lower than 8. In the same context, previously described 3-alkyl-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxide with a pK_a value close to 7.5–7.6 were shown to be inactive on the pancreatic tissue.²⁴

Taken as a whole, these results confirm that the nonionized form of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides is required, but insufficient, for optimal interaction with the receptor (hydrogen bond interaction between the N–H group in the 4-position and the receptor).

Radioisotopic experiments conducted with the pancreatic selective compound 12b indicated that the drug (50 μ M) was able to increase ⁸⁶Rb (⁴²K substitute) outflow from prelabeled and perfused rat pancreatic islets. Such an effect was completely abolished by the addition of glibenclamide (10 μ M) in the medium (data not shown). Those data, as well as previously reported results,³⁵ confirmed that the 7-methoxy compound expressed the classical pharmacological profile of an ATP-sensitive potassium channel opener.

Conclusions

The presence of an electron-donating group such as a methyl or a methoxy moiety or the absence of substituent in the 7-position of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzthiadiazine 1,1-dioxides appeared to be required for increasing activity and selectivity for the pancreatic tissue. The higher selectivity for the pancreatic endocrine tissue was obtained with derivatives bearing an isopropylamino, an ethylamino, or a cyclobutylamino side chain in the 3-position (10a, 10b, 10d, 12b, 12d, 22c).

In contrast, two series of compounds bearing an electron-withdrawing group such as CF₃ (20a–c) and NO₂ (32a–e) or a larger lipophilic hydrocarbon chain in the 7-position (11a,b) were found to express a marked myorelaxant activity on vascular smooth muscle cells. Compound 11a even exhibited a tissue selectivity (vascular smooth muscle vs pancreatic tissue) opposite to that usually observed with compounds bearing small groups such as an ethylamino side chain in the 3-position.

Taken as a whole, these results indicated that the modulation of the nature of the substituent in the 7-position can profoundly affect biological activity and tissue selectivity. The present work further indicated that parameters such as lipophilicity, electron-donating or -withdrawing properties and steric effect of the substituent in the 7-position notably influenced the pharmacological profile of the drugs.

Last, radioisotopic experiments conducted on rat pancreatic islets with a typical example of pancreatic B-cell selective drug (12b) confirmed that the target of such compounds was the K_{ATP} channel.

The structure-activity relationships deduced from this study will permit to further improve the pharmacophoric model initially proposed for drugs activating the pancreatic K_{ATP} channel.^{25,26}

Experimental Section

Chemistry. Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FT spectrophotometer. The ^1H NMR spectra were taken on a Bruker AW-80 (80 MHz) instrument in $\text{DMSO}-d_6$ with HMD-SO as internal standard or on a Bruker Avance 500 (500 MHz) instrument in $\text{DMSO}-d_6$ with TMS as internal standard; chemical shifts are reported in δ values (ppm) relative to internal HMDSO or TMS. All reactions were routinely checked by TLC on silica gel Merck 60F 254.

7-Methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7a). Chlorosulfonyl isocyanate (16.8 mL, 193.24 mmol) and nitromethane (160 mL) were mixed together in a closed dried vessel. The mixture was cooled at -5°C (ice-salt bath) and protected from moisture during the slow addition, under vigorous stirring, of 4-toluidine (17.8 g, 166.12 mmol) dissolved in nitromethane (50 mL). When the addition was completed, anhydrous AlCl_3 (28.0 g, 210.1 mmol) was added to the resulting suspension and the mixture was refluxed for 30 min. The hot solution was poured onto ice (800 g) and, after stirring and the complete melting of ice, the resulting precipitate was collected by filtration and washed with water (75 mL). The insoluble crude material was suspended in an aqueous solution of NaHCO_3 (10 g/200 mL) and heated until most of the precipitate was solubilized. The suspension was treated with charcoal, filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 with 6 N HCl. The resulting white product was collected by filtration, washed with water, and dried. (19.38 g, 55%; mp $298-302^\circ\text{C}$ (lit.: $316-318^\circ\text{C}$)²⁷).

7-Pentyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7b). The title compound was obtained from 4-pentylaniline (27.01 g, 166.00 mmol) by following the experimental conditions described for 7a, except that the crude material was dissolved in a hydromethanolic 1:1 solution of NaHCO_3 (30 g/600 mL). (23.16 g, 55%; mp $> 300^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$) C, H, N, S.

7-Methoxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7c). The title compound was obtained from 4-methoxyaniline (20.44 g, 166.00 mmol) by following the experimental conditions described for 7a (17.05 g, 45%; mp $275-277^\circ\text{C}$ (lit.: 300°C)²⁸).

7-Ethoxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (7d). The title compound was obtained from 4-ethoxyaniline (22.77 g, 166.00 mmol) by following the experimental conditions described for 7a (20.11 g, 50%; mp $243-244^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$) C, H, N, S.

7-Methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8a). The mixture of 7-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7a) (20.3 g, 95.65 mmol) and phosphorus pentasulfide (40 g, 179.95 mmol) in anhydrous pyridine (250 mL) was heated under reflux for 5 h. The resulting suspension was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in the minimum of 2 N NaOH. This solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 with 6 N HCl. The crystalline solid was collected by filtration, washed with water, and dried (14.75 g, 65%; mp $220-224^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$) C, H, N, O, S.

7-Pentyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8b). The title compound was obtained as described for 8a starting from 7b (25.7 g, 95.65 mmol) (16.32 g, 60%; mp $198-202^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$) C, H, N, S.

7-Methoxy-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8c). The title compound was obtained as

described for 8a starting from 7c (22 g, 95.15 mmol). The reflux was maintained during 3 h. (19.78 g, 66%; mp $219-222^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$) C, H, N, S.

7-Ethoxy-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8d). The title compound was obtained as described for 8a starting from 7d (28 g, 115.03 mmol). The reflux was maintained during 3 h. (22.87 g, 77%; mp $223-225^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$) C, H, N, S.

7-Methyl-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (9a). 7-Methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (8a) (12.0 g, 52.63 mmol) was dissolved in an aqueous solution of NaHCO_3 (7 g/280 mL). Under stirring, methanol (300 mL) and methyl iodide (12 mL, 192.34 mmol) were successively added to this solution. After 30 min under stirring at room temperature, the mixture was adjusted to pH 3 with 1 N HCl and methanol was removed under reduced pressure. After cooling, the title product was collected by filtration, washed with water and dried (10.93 g, 85%; mp $275-278^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$) C, H, O, S.

3-Methylsulfonyl-7-pentyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (9b). The title compound was obtained as described for 9a starting from 8b (12.0 g, 42.19 mmol) (10.70 g, 85%; mp $237-241^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$) C, H, O, S.

7-Methoxy-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (9c). The title compound was obtained as described for 9a starting from 8c (12.0 g, 49.12 mmol) (11.80 g, 93%; mp $270-276^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

7-Ethoxy-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (9d). The title compound was obtained as described for 9a starting from 8d (12.0 g, 46.45 mmol) (9.94 g, 78%; mp $243-248^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$) C, H, N, S.

2-Chloro-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (15). A suspension of 2-chloro-5-trifluoromethylbenzenesulfonyl chloride (14, 10.0 g, 38.4 mmol) in an aqueous solution of ammonia (10% w/v, 150 mL) was stirred at room temperature. After 1 h, the solution was treated with charcoal, the filtrate was concentrated by an half and adjusted to pH 1 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (8.97 g, 90%; mp $153-155^\circ\text{C}$ (lit.: $158.5-160^\circ\text{C}$)²⁹).

2-Benzylamino-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (16). A solution of 2-chloro-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (15, 3 g, 11 mmol) in benzylamine (30 mL) was heated at 100°C . Most of the amine was removed by distillation under reduced pressure and the residue was suspended in water (30 mL). An aqueous (5% w/v) solution of NaOH was added (30 mL). The alkaline solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 2 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (3.05 g, 80%; mp $125-127^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

3-Oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic acid 1,1-Dioxide Monohydrate (17). 7-Methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (7a, 5 g, 23.56 mmol) was suspended in water (500 mL) and dissolved by addition of 2.5 N NaOH. KMnO_4 (12 g, 75.95 mmol) was added portionwise, and the resulting mixture was stirred at 70°C for 3 h. The insoluble material was filtered off, and NaHSO_3 was added to the filtrate until the pink coloration disappeared. The solution was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 1 with 12 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried (3.76 g, 66%; mp $> 300^\circ\text{C}$; IR (KBr); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz). Anal. ($\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_5\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

2-Amino-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (18a). A solution of 2-benzylamino-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (16, 2 g, 6 mmol) in methanol (20 mL) was supplemented with Pd/C (0.2 g, 5%). The mixture was poured in a

hermetically closed autoclave under hydrogen atmosphere (5 bar). The insoluble material was filtered off and the solvent removed under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum aqueous NaOH solution (10% w/v), treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried (1.27 g, 85%); mp 142–142 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₇H₇F₃N₃O₂S) C, H, N, S.

4-Amino-3-sulfamoylbenzoic Acid (18b). 3-Oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic acid 1,1-dioxide (17, 5 g, 20.64 mmol) was suspended in an aqueous solution of sulfuric acid (50% w/v) and stirred under reflux. When the insoluble has disappeared, the solution was cooled to 0 °C and supplemented with an aqueous solution of NaOH (30% w/v) until pH 2. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried (4.06 g, 91%); mp 214–219 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₇H₆N₂O₄S) C, H, N, S.

3-(1H-Imidazol-1-yl)-7-trifluoromethyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (19a). A solution of 2-amino-5-trifluoromethylbenzenesulfonamide (18a, 5.5 g, 22 mmol) and *N,N'*-thiocarbonyldiimidazole (14.0 g, 78.22 mmol) in dioxane (55 mL) was refluxed for 4 h. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was suspended in water (150 mL). A solution of NaOH in water (2.5 g/20 mL) was added, and the solution was stirred at room temperature for 10 min. The alkaline solution was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 2 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried (4.87 g, 70%); mp 211–214 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₁₁H₇F₃N₄O₂S) C, H, N, S.

3-(1H-Imidazol-1-yl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic Acid 1,1-Dioxide (19b). The title compound was obtained as described for 19a starting from 18b (5.5 g, 25.44 mmol) (5.1 g, 68%); mp > 300 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₁₁H₆N₄O₄S) C, H, N, S.

3-(1H-Imidazol-1-yl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (19c). The title compound was obtained as described for 19a starting from 2-aminobenzenesulfonamide (5.5 g, 31.94 mmol) (6.26 g, 79%); mp 246–248 °C (Lit.: 246–248 °C²⁷); IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₁₀H₈N₄O₂S) C, H, N, S.

2-Chloro-5-methylsulfonylbenzenesulfonamide (28). Chlorosulfonic acid (25 mL) was cooled on an ice-salt bath and then carefully supplemented with 4-chloro-1-methylsulfonylbenzene (27, 5 g, 26.22 mmol). The mixture was heated under reflux for 1 h and thionyl chloride (1.5 mL) was added. After 2 h reflux, the reaction mixture was cooled and poured on ice (50 g) under stirring. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with cold water. The solid was suspended under stirring in an aqueous solution of ammonia (150 mL, 10 w/v). After 30 min, the alkaline suspension was concentrated under reduced pressure up to a volume of 75 mL. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dissolved in an aqueous solution of NaOH (50 mL, 10 w/v). The alkaline solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 5 with 6 N HCl. The crystalline precipitate was collected by filtration washed with water, and dried (3.54 g, 50%); mp 225–227 °C (Lit.: 227–229°); Anal. (C₇H₆ClNO₂S₂) C, H, N, S.

2-Amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonamide (29). The mixture of 2-chloro-5-methylsulfonylbenzenesulfonamide (28, 5 g, 18.54 mmol) in a saturated aqueous solution of ammonia (50 mL) was heated in a sealed vessel at 140 °C for 2 h. After cooling, the solution was concentrated to a small volume (20 mL) and the resulting mixture was adjusted to pH 5 with 6 N HCl. The crystalline precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried (4.17 g, 90%); mp 209–210 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₇H₁₀N₂O₄S₂) C, H, N, S.

***N*-(2-Amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-*N'*-ethylthiourea (30a).** K₂CO₃ (0.85 g, 6.2 mmol) was added to a solution of 2-amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonamide (29,

1.25 g, 5.0 mmol) in dry acetone (20 mL) under stirring at room temperature. Ethyl isothiocyanate (0.58 mL, 6.6 mmol) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at gentle reflux for 4 h. The cooled mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in water (25 mL). The pH was adjusted to 6 with 6 N HCl, and the solution was stirred at 0 °C until the product solidified. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried (1.01 g, 60%); mp 148–150 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₁₀H₁₂N₄O₄S₂) C, H, N, S.

***N*-(2-Amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-*N'*-isopropylthiourea (30b).** The title compound was obtained as described for 30a using isopropyl isothiocyanate (0.62 g, 6.1 mmol) (1.13 g, 60%); mp 149–151 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₁₁H₁₇N₄O₄S₂) C, H, N, S.

***R/S-N*-(2-Amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-*N'*-2-butylthiourea (30c).** The title compound was obtained as described for 30a using *R/S*-2-butyl isothiocyanate (0.66 g, 6.1 mmol) (1.28 g, 68%); mp 144–146 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz). Anal. (C₁₂H₁₉N₄O₄S₂) C, H, N, S.

General Procedure for the Synthesis of the 7-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides 10a–d, 11a–c, 12a–d, and 13a–c. The mixture of the appropriate 7-substituted 3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide intermediate (9a–d) (0.5 g) and the appropriate alkylamine was heated in a sealed vessel for 4 h at 140 °C. The excess of amine was eliminated by distillation under reduced pressure, and the residue was suspended in water (20 mL). An aqueous solution of NaOH (5% w/v) was added dropwise until dissolution of the residue. The alkaline solution was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 4–5 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The compound was recrystallized in the appropriate solvent.

3-Ethylamino-7-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (10a). The title compound was obtained from 9a (0.5 g) following the general procedure using an aqueous solution of ethylamine 70% (10 mL). Yield: 0.35 g (70%); mp 250–252 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₀H₁₃N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-7-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (10b). The title compound was obtained from 9a (0.5 g) following the general procedure using isopropylamine (5 mL). Yield: 0.40 g (76%); mp 266–268 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₁H₁₅N₃O₂S) C, H, N, S.

***R/S*-3-(2-Butylamino-7-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (10c).** The title compound was obtained from 9a (0.5 g) following the general procedure using *R/S*-2-butylamine (5 mL). Yield: 0.35 g (63%); mp 219–220 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₂H₁₇N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-7-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (10d). The title compound was obtained from 9a (0.5 g) following the general procedure using a solution of cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL). Yield: 0.43 g (79%); mp 289–290 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₂H₁₅N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Ethylamino-7-pentyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11a). The title compound was obtained from 9b (0.5 g) following the general procedure using an aqueous solution of ethylamine 70% (10 mL). Yield: 0.35 g (70%); mp 202–205 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₄H₂₁N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-7-pentyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11b). The title compound was obtained from 9b (0.5 g) following the general procedure using isopropylamine (5 mL). Yield: 0.34 g (65%); mp 198–202 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₅H₂₃N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-7-pentyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11c). The title compound was obtained from 9b (0.5 g) following the general procedure using a solution of cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL). Yield: 0.35 g (66%);

mp 239–241 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

7-Methoxy-3-propylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (12a). The title compound was obtained from **9c** (0.5 g) following the general procedure using propylamine (5 mL). Yield: 0.42 g (78%); mp 194–199 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (12b). The title compound was obtained from **9c** following the general procedure using a solution of isopropylamine (5 mL). Yield: 0.39 g (76%); mp 227–233 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (12c). The title compound was obtained from **9c** (0.5 g) following the general procedure using R/S-2-butylamine (5 mL). Yield: 0.38 g (70%); mp 197–202 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (12d). The title compound was obtained from **9c** (0.5 g) following the general procedure using a solution of cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL). Yield: 0.32 g (60%); mp 249–252 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) C, H, N, S.

7-Ethoxy-3-(ethylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (13a). The title compound was obtained from **9d** (0.5 g) following the general procedure using an aqueous solution of ethylamine 70% (10 mL). Yield: 0.38 g (78%); mp 243–248 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) C, H, N, S.

7-Ethoxy-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (13b). The title compound was obtained from **9d** (0.5 g) following the general procedure using isopropylamine (5 mL). Yield: 0.32 g (62%); mp 211–215 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-7-ethoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (13c). The title compound was obtained from **9d** (0.5 g) following the general procedure using a solution of cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL). Yield: 0.31 g (58%); mp 246–251 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) C, H, N, S.

General Procedure for the Synthesis of the 7-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides 20a–c, 21a–c, and 22a–c. The mixture of the appropriate 7-substituted 3-(1H-imidazol-1-yl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide intermediate (**19a–c**, 0.5 g) and the appropriate alkylamine (5 mL) was heated in a hermetically closed autoclave at 140 °C for 5 h. After cooling, the excess of the amine was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was suspended in water (20 mL). An aqueous solution of NaOH (5% w/v) was added dropwise until dissolution of the residue. The alkaline solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 4–5 (pH 2 for **21a–c**) with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The compound was purified by crystallization in an appropriate solvent.

3-Propylamino-7-trifluoromethyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (20a). The title compound was obtained from **19a** (0.5 g) following the general procedure using propylamine (5 mL). Yield: 0.26 g (54%); mp 241–243 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-7-trifluoromethyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (20b). The title compound was obtained from **19a** (0.5 g) following the general procedure using isopropylamine (5 mL). Yield: 0.32 g (66%); mp 287–289 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-7-trifluoromethyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (20c). The title compound was obtained from **19a** (0.5 g) following the general procedure using R/S-2-butylamine (5 mL). Yield: 0.34 g (68%); mp 234–236

°C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

3-Propylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic Acid 1,1-Dioxide (21a). The title compound was obtained from **19b** (0.5 g) following the general procedure using propylamine (5 mL). Yield: 0.34 (71%); mp 300 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic Acid 1,1-Dioxide (21b). The title compound was from **19b** (0.5 g) following the general procedure using isopropylamine (5 mL). Yield: 0.32 g (66%); mp > 300 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic Acid 1,1-Dioxide (21c). The title compound was obtained from **19b** (0.5 g) following the general procedure using (R/S)-2-butylamine (5 mL). Yield: 0.34 g (68%); mp > 300 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) C, H, N, S.

3-Ethylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (22a). The title compound was obtained from **19c** (0.5 g) following the general procedure using an aqueous solution of ethylamine 70% (10 mL). Yield: 0.27 g (60%); mp 227–232 °C (lit. 232–233 °C³⁸); IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

3-Propylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (22b). The title compound was obtained from **19c** (0.5 g) following the general procedure using propylamine (5 mL). Yield: 0.36 g (74%); mp 190–196 °C (lit. 195 °C³⁸); IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (22c). The title compound was obtained from **19c** (0.5 g) following the general procedure using isopropylamine (5 mL). Yield: 0.36 g (74%); mp 213–218 °C (lit. 222–223 °C³⁸); IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

R/S-3-(2-Butylamino)-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (22d). The title compound was obtained from **19c** (0.5 g) following the general procedure using (R/S)-2-butylamine (5 mL). Yield: 0.35 g (68%); mp 179–181 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (22e). The title compound was obtained from **19c** (0.5 g) following the general procedure using a solution of cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL). Yield: 0.30 g (60%); mp 239–242 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.³⁹

7-Cyano-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (24a). 7-Iodo-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide²⁸ (**23a**, 1.2 g, 3.28 mmol) and CuCN (0.6 g, 6.76 mmol) were suspended in anhydrous DMF (10 mL) under nitrogen, and the mixture was heated under reflux for 5 h. The mixture was supplemented with water (30 mL). The resulting suspension was adjusted to pH 12 by means of an aqueous solution of NaOH (10% w/v), and the alkaline solution was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 1 with 6 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, and recrystallized from hot methanol. Yield: 0.44 g (51%); mp > 300 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

7-Cyano-3-cyclobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (24b). The title compound was obtained as described for **24a** starting from 3-cyclobutylamino-7-iodo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide²⁸ (**23b**, 1.2 g, 3.18 mmol). Yield: 0.48 g (55%); mp 299–303 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$) C, H, N, S.

Methyl 3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylate 1,1-Dioxide (25). 3-Isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic acid 1,1-dioxide (**21b**, 0.35 g, 1.23 mmol) was suspended in a solution of H_2SO_4 (0.28 mL) and methanol (3.5 mL), and the mixture was heated under reflux for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was poured into water (20 mL). The

resulting suspension was adjusted to pH 8 by means of an aqueous solution of NaOH (10% w/v). The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, and recrystallized from hot methanol. Yield: 0.14 g (41%); mp 230–236 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxamide 1,1-Dioxide Monohydrate (26). 3-Isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-7-carboxylic acid 1,1-dioxide (21b, 0.35 g, 1.23 mmol) and carbonyldiimidazole (0.22 g, 1.35 mmol) were solubilized in DMF (4 mL), and the mixture was heated for 2 h at 60 °C. The mixture was added under stirring to an aqueous solution of ammonia (5 mL, 10% w/v). After 30 min., the suspension was adjusted to pH 5 with 6 N HCl. The crystalline precipitate was collected by filtration washed with water, and dried. Yield: 0.17 g (48%); mp > 280 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3-Ethylamino-7-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (31a). A solution of phosgene (0.52 mL) in toluene (20%) was added dropwise to a solution of *N*-(2-amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-*N'*-ethylthiourea (30a, 1 g, 2.9 mmol) and triethylamine (1 mL, 7.1 mmol) in dry THF (30 mL). The solution was stirred at 0 °C for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was poured into water (20 mL) and stirred for 40 min. The crude product was isolated by filtration, washed with water, dried, and recrystallized from MeOH/water. Yield: 0.54 g (60%); mp 264–270 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$) C, H, N, S.

3-Isopropylamino-7-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (31b). The title compound was obtained as described for 31a starting from *N*-(2-Amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-*N'*-isopropylthiourea (30b, 1 g, 2.8 mmol). Yield: 0.58 g (65%); mp 272–276 °C IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$) C, H, N, S.

***R/S*-(3-(2-Butylamino)-7-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (31c).** The title compound was obtained as described for 31a starting from *N*-(*R/S*)-(2-Amino-5-methylsulfonylbenzenesulfonyl)-*N'*-2-butylthiourea (30c, 1 g, 2.7 mmol). Yield: 0.60 g (66%); mp 244–245 °C; IR (KBr); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 80 MHz). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$) C, H, N, S.

Ionization Constants. The pK_a values of the compounds were determined by means of UV spectrophotometry using a Perkin-Elmer UV/Vis 554 spectrophotometer at 25 °C. UV spectra of compounds were taken in different aqueous buffers of pH ranking from 5 to 12. The pK_a values were calculated by the Debye–Hückel equation at the maximum basic form absorbance.⁴⁰

Biological Assays. Measurements of Insulin Release from Incubated Rat Pancreatic Islets. Pancreatic islets were isolated by collagenase method from fed Wistar rats (180–220 g). Groups of 10 islets, each derived from the same batch of islets, were preincubated for 30 min at 37 °C in 1 mL of a physiological salt medium (in mM: NaCl 115, KCl 5, CaCl_2 2.56, MgCl_2 1, NaHCO_3 24) supplemented with 2.8 mM glucose, 0.5% (w/v) dialyzed albumin (Sigma) and equilibrated against a mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%).

The islets were then incubated at 37 °C for 90 min in 1 mL of the same medium containing 16.7 mM glucose and, in addition, the reference compound or the benzothiadiazine derivative. The release of insulin was measured radioimmunologically using rat insulin as a standard.⁴¹ Residual insulin release was expressed as a percentage of the value recorded in control experiment (100%), i.e., in the absence of drug and presence of 16.7 mM glucose.

Measurement of the Contractile Activity in Rat Aorta. All experiments were performed with aorta removed from fed Wistar rats (180–200 g). A section of the aorta was cleared of adhering fat and connective tissue and was cut into transverse rings (3–4 mm long). The endothelium was removed by rubbing the intimal surface with forceps. The segments were suspended under 1.5 g of tension by means of steel hooks in

an organ bath containing 20 mL of a Krebs-bicarbonate-buffered solution of the following composition (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, glucose 5. The physiological solutions were maintained at 37 °C and bubbled continuously with a mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%). The isometric contractions of the aortic rings were measured with a force-displacement transducer. After 60 min of equilibration, the rings were exposed to 30 mM KCl. When the tension had stabilized, the drugs were added to the bath at increasing concentrations until maximal relaxation (or until 0.3 mM). The relaxation response was expressed as the percentage of the contractile response to KCl. The ED_{50} value (drug concentration evoking 50% inhibition of the plateau phase induced by KCl) were assessed from dose curves using Datanalyst software (EMKA Technologies, France).

Measurement of ^{86}Rb Outflow from Rat Pancreatic Islets. The method used for measuring ^{86}Rb (^{42}K substitute) outflow from prelabeled and perfused rat pancreatic islets was previously described in detail.^{12,23}

Supporting Information Available: Elemental analyses of the newly synthesized compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L. The ABCs of ATP-sensitive potassium channels: more pieces of the puzzle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 553–559.
- (2) Cook, N. S. The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.* **1988**, *9*, 21–28.
- (3) Noma, A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* **1983**, *305*, 147–148.
- (4) Cook, D. L.; Hales, C. N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **1984**, *311*, 271–273.
- (5) Allard, B.; Lazdunski, M. Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *236*, 419–426.
- (6) Standen, N. B.; Quayle, J. M.; Davies, N. W.; Brayden, J. E.; Huang, Y.; Nelson, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* **1989**, *245*, 177–180.
- (7) Quayle, J. M.; Nelson, M. T.; Standen, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 1165–1232.
- (8) Bernardi, H.; A., Fosset, P.; Lazdunski, M. Purification and affinity labeling of a brain $[\text{PH}]$ glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 9816–9820.
- (9) Lebrun, P.; Devreux, V.; Hermann, M.; Herchuelz, A. P. Insulin release by increasing K^+ outflow from pancreatic B-cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, *156*, 283–286.
- (10) Lebrun, P.; Devreux, V.; Hermann, M.; Herchuelz, A. Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *250*, 1011–1018.
- (11) Hamilton, T. C.; Weston, A. H. Cromakalim, nicorandil and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* **1989**, *20*, 1–9.
- (12) Lebrun, P.; Arkhammar, P.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Hansen, J. B.; Piroette, B. A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K^+ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* **2000**, *43*, 723–732.
- (13) Cook, N. S.; Quast, U. Potassium channel pharmacology. In *Potassium channels, structure, classification, function and therapeutic potential*; Cook, N. S., Ed.; Ellis Horwood: Chichester U. K, **1990**; pp 181–255.
- (14) Björk, E.; Berne, C.; Kampe, O.; Wibell, P.; Oskarsson, F. A. Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* **1996**, *45*, 1247–1250.
- (15) Alemzadeh, R.; Langley, G.; Upchurch, L.; Smith, P.; Slonim, A. E. Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 1911–1915.
- (16) Babenko, A. P.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J. A view of SUR/Kir X K^+ channels. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 667–687.
- (17) Dhahan, N.; Moreau, C.; Prost, A. L.; Jacquet, H.; Alekseev, A. E.; Terzie, A.; Vivaudou, M. Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 12162–12167.
- (18) Babenko, A. P.; Gonzalez, G.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J. Reconstructed human cardiac K-ATP channels-functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ. Res.* **1998**, *83*, 1132–1143.

- (19) Dhahan, N.; Jacquet, H.; Moreau, C.; Catty, P.; Vivaudou, M. A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 308–315.
- (20) Inagaki, N.; Gonoi, T.; Clement, J. P.; Namba, N.; Inazawa, J.; Gonzalez, G.; Aguilar-Bryan, L.; Seino, S.; Bryan, J. Reconstitution of I-K_{ATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **1995**, *270*, 1166–1170.
- (21) Inagaki, N.; Gonoi, T.; Clement, J. P.; Wang, C. Z.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J.; Seino, S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **1996**, *16*, 1011–1017.
- (22) Isomoto, S.; Kondo, C.; Yamada, M.; Matsumoto, S.; Higashiguchi, O.; Horio, Y.; Matsuzawa, Y.; Kurachi, Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24321–24324.
- (23) Pirotte, B.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Hermann, M.; Herchuelz, A.; Delarge, J.; Lebrun, P. A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1381–1386.
- (24) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Fontaine, J.; Dupont, L.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Khelili, S.; Magetto, C.; Masereel, B.; Diouf, O.; Podona, T.; Delarge, J. 3- and 4-substituted 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation and structure–activity relationships. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 937–948.
- (25) Boverie, S.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Somers, F.; Becker, B.; Sebille, S.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73): introduction of heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 973–980.
- (26) de Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Bondo Hanson, J.; Lebrun, P.; Pirotte, P. Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3342–3353.
- (27) Girard, Y.; Atkinson, J. G.; Rokach, J. A new synthesis of 1,2,4-benzothiadiazine and selective preparation of o-aminobenzene-sulfonamides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 1043–1047.
- (28) Di Bella, M.; Rinaldi, M.; Fabio, U.; Manicardi, G. Azione antimicrobica di derivati dell' 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-di-ossido. *Il Farmaco* **1972**, *27*, 990–998.
- (29) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Somers, F.; Boverie, S.; Lacan, F.; Delarge, J. Study of the ring closure reaction of o-aminoaryl-sulfonamides with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4935–4942.
- (30) Nielsen, F. E.; Bodvarsdottir, T. B.; Worsaae, A.; MacKay, P.; Stidsen, C. E.; Boonen, H. C.; Pridal, L.; Arkhammar, P. O.; Wahl, P.; Ynddal, L.; Junager, F.; Dragsted, N.; Tagmose, T. M.; Mogensen, J. P.; Koch, A.; Treppendahl, S. P.; Hansen, J. B. 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3, 2-e]-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic B-cells. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4171–4187.
- (31) Somers, F.; de Tullio, P.; Boverie, S.; Dogné, J. M.; De Leval, X.; Antoine, M.-H.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Synthesis and biological effects of new 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides on insulin-secreting cells. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **2000**, *6*, 89–95.
- (32) Hansch, C.; Leo, A.; Unger, S. H.; Ki Hwan Kim; Nikaitani, D.; Lien, E. J. "Aromatic" substituent constants for structure–activity correlation. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1207–1216.
- (33) Manley, P. W.; Quast, U. Structure–activity studies of potassium channel opening in pinacidil-like cyanoguanidines, nitroethenediamines, thioureas, and ureas. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2327–2340.
- (34) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Dupont, L.; Masereel, B.; Laeckmann, D.; Podona, T.; Diouf, O.; Lebrun, P.; Delarge, J. Synthesis and structural studies of a new class of heterocyclic compounds: 1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides, pyridyl analogues of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3221–3234.
- (35) Dabrowski, M.; Ashcroft, F. M.; Ashfield, R.; Lebrun, P.; Pirotte, B.; Egebjerg, J.; Hansen, J. B.; Wahl, P. The novel diazoxide analogue 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes* **2002**, *51*, 1896–1906.
- (36) Pitzer, K. K.; Werbovets, K. A.; Brendle, J. J.; Scovill, J. P. Synthesis and biological evaluation of 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride analogues as antileishmanial agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4885–4889.
- (37) Jackman, G. B.; Petrow, V.; Stephenson, O.; Wild, A. M. Studies in the field of diuretic agents. Part VI: some sulphamoylbenzoic acids. *J. Pharm. Pharmacol.* **1962**, 679–686.
- (38) Raffa, L.; Di Bella, M.; Melegari, M.; Vampa, G. Ricerche nel campo della 1,2,4-benzothiadiazina, Nota XXI – Derivati del 3-amino-1,2,4-benzothiadiazina-1,1-di-ossido. *Il Farmaco* **1962**, *XVII*, 331–339.
- (39) Peat, A. J.; Townsen, C.; Worley, J. F.; Scott, H. A.; Garrido, D.; Mertz, R. J.; Pföhl, J. L.; Terry, C. M.; Truax, J. F.; Veasey, R. L.; Thomson, S. A. Synthesis and evaluation of 7-substituted-3-cyclobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazines as K_{ATP} channel agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2977–2980.
- (40) Albert, A.; Serjeant, E. P. *The determination of ionization constants*; Chapman & Hall: London, 1971; pp 44–64.
- (41) Leclercq-Meyer, V.; Marchand, J.; Woussen-Cole, M. C.; Giroix, M.-H.; Malaisse, W. J. Multiple effects of leucine on glucagon, insulin and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **1985**, *116*, 1168–1174.

Annexe 8

New Trends in the Design of Drugs Against Alzheimer's Disease

P. Francotte^a, E. Graindorge^a, S. Boverie^a, P. de Tullio^a and B. Pirotte^a

^aNatural and Synthetic Drugs Research Center, Dept of Medicinal Chemistry, University of Liège, Av. de l'Hôpital, 1, B36, 4000 Liège, Belgium

Abstract: First described by Alois Alzheimer in 1907, Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia type, affecting approximately 20 million people worldwide. As the population is getting older, AD is a growing health problem.

AD is currently treated by symptomatic drugs, the acetylcholinesterase inhibitors, based on the cholinergic hypothesis (1976).

During the past decade, advances in neurobiology have conducted to the identification of new targets. Although some of these innovative approaches tend to delay onset of AD, others are still symptomatic.

In this review, we present an overview of the several strategies and new classes of compounds against AD.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder affecting the elderly and characterized by a slow insidious decline in learning ability and behavior, with a deadly outcome. The prevalence of the disease increases exponentially with age, it is estimated from 10 % at the age of 65 years to nearly 50 % at 85 years. As the life expectancy increases, AD is a major health problem in developed countries, together with cardiovascular disorders, cancers and stroke.

AD has multifactorial risk factors; besides the major one, which is age, genetic risk factors have been identified, some causing early-onset others rising the susceptibility for late-onset [1].

Although early clinical diagnosis of AD is pretty difficult and mainly depends on measure of global and cognitive function, no blood-test being available [2], histopathological AD hallmarks and their molecular bases are well known. The first histological features characterized by Alois Alzheimer himself in 1907 are lesions in the brain cortex, extracellular deposits of β -amyloid (A β) plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs). Another constant observation in *post mortem* AD brain is the loss of cholinergic markers such as acetylcholine (ACh) and choline acetyltransferase (ChAT). It has also been demonstrated that AD brain was the seat of excessive generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress.

Thanks to the elucidation of AD mechanism during the past 2 decades, a variety of etiology hypothesis emerged, leading to therapeutic strategies. Moreover additional approaches have been developed targeting other aspects of the disease.

Even if molecular bases of each histopathological characteristics have been defined, interconnections between them are not yet clear. Indeed the majority consensus posits

that lesions are central mediators of the AD pathogenesis, triggering excessive oxidation and neuronal cell death in the brain. Nevertheless, recent evidence showed A β plaques occur consequently to oxidative stress and function as a primary line of antioxidant defense; so, current effort targeted at their elimination will actually exacerbate the disease [3,4].

Research on AD is a fast moving area, so we thought interesting to give a broad overview of molecular basis of AD and to review the last developments in the pharmacotherapy during the past 2 years.

CHOLINERGIC HYPOTHESIS

First established in 1976, the cholinergic hypothesis postulates that many of the cognitive, functional and behavioral symptoms derive from a deficiency in cholinergic neurotransmission, linked to the loss of cholinergic neurons in the Nucleus Basalis of Meynert and other nuclei projecting to the hippocampus and mesial temporal regions [5,6].

As shown in (Fig. 1), several approaches have been explored, in order to restore the central cholinergic function: the use of acetylcholine (ACh) releasing agents, the stimulation of acetylcholine uptake, the activation of cholinergic receptors (postsynaptic M₁ muscarinic) by synthetic agonists, and the lowering of acetylcholine metabolic breakdown by inhibition of acetylcholinesterase (AChE). The use of acetylcholine precursors such as lecithin and choline was also presented as a possible strategy, but trials showed that these compounds were ineffective in AD; however this approach would have probably to be reconsidered with others molecules [7].

Therapeutic Approaches

ACh Release Enhancers

The release of ACh can be improved by voltage-gated ion channels (Ca⁺⁺ and K⁺) modulation, nicotinic agonists and M₂ muscarinic antagonists.

*Address correspondence to this author at the Natural and Synthetic Drugs Research Center, Dept of Medicinal Chemistry, University of Liège, Av. De l'Hôpital, 1, B36, 4000 Liège, Belgium; Tel: +3243664366; Fax: +3243664362; E-mail: Pierre.Francotte@ulg.ac.be

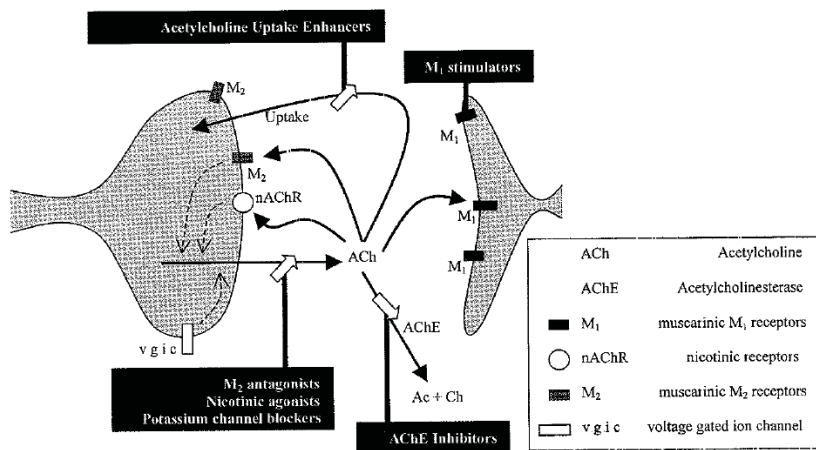


Fig. (1). The cholinergic hypothesis

ACh Release Enhancers: Voltage-Gated Ion Channel Modulators

Among the voltage-gated ion channels able to enhance ACh release, potassium channels are the most studied. Blockers of those channels currently developed are derived from 4-aminopyridine (1) and linopirdine (2) [8]. Andreani *et al* reported (3) and (4) as potent anti-amnesics compared to piracetam. DMP 543 (5) [9] may provide benefits in AD patients

ACh Release Enhancers: Nicotinic Stimulation

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are mainly represented in the neurons by the $\alpha 4\beta 2$ and the $\alpha 7$ subtypes. During AD development, the number of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs is reduced, impairing among others presynaptic ACh release and postsynaptic depolarization (signal transduction)

Enhancing nicotinic signals at the receptors can be achieved by two pharmacological classes of compounds: nicotinic agonists or allosterically potentiating agents.

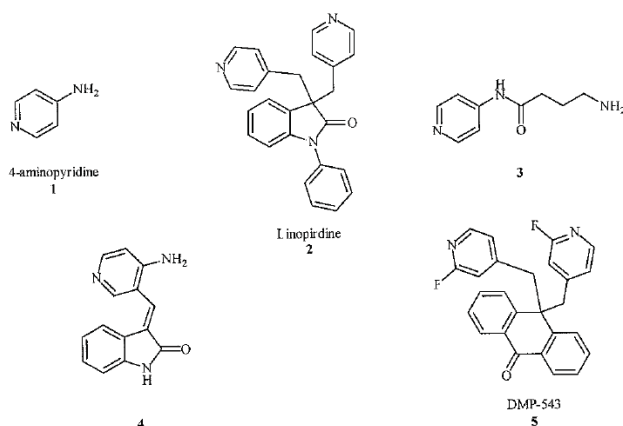


Fig. (2). Voltage-gated ion channel modulators

It has been shown that nicotinic agonists enhance ACh release, improving memory. Moreover, recent studies have demonstrated that A β interacts directly with the $\alpha 7$ nAChR subtype, suggesting that A β might have a function as an endogenous ligand for this receptor [10]. This was also suggested by the protection against A β -induced neuronal death by GTS-21, a $\alpha 7$ partial agonist [11]. So the approach of nicotinic stimulation could be useful not only for treating symptoms, but also the underlying causes of AD.

Nicotine (**6**) has been shown to have beneficial effects on memory in animals and in humans, but its abundant side-effects did not permit its use in therapy. So efforts have been done to synthesize nicotine-related drugs with improved pharmacological properties. Although the selective $\alpha 7$ partial agonist GTS-21 (**7**) (under phase I clinical trials) conserve the pyridine ring of nicotine, the potent $\alpha 4\beta 2$ agonists ABI-418 (**8**) [12], ABI-089 (**9**) [13] and SIB-1553A (**10**) [14] are compounds always bearing the pyrrolidine ring of nicotine.

Recently, the affinity of novel rigid analogs of arecoline (**11**) and isoarecoline (**12**) such as (**13**) for central nAChRs was evaluated *in vitro*, providing information on the molecular requirements for developing new active compounds [15]. On the other hand, new 3-substituted quinuclidines (**14**) were patented as nicotinic agonists [16].

Positive nicotinic modulators are codeine and the known AChE inhibitors galanthamine (see below) and physostigmine (see below) [17]. Recently, bis-indoles (**15**) were prepared, and were shown to be positive nicotinic modulators [18].

ACh Release Enhancers: M₂ Muscarinic Antagonists

By blocking M₂ autoreceptors, it has been shown in animals that ACh levels increase and that cognition was

improved. Since M₂ receptors are also found in cardiac tissue, M₂ antagonists may increase heart rate.

The major challenge is designing compounds that have selectivity for M₂ versus the other types of muscarinic receptors, especially the post-synaptic M₁ receptors. Only few compounds have this property.

Besides the older pyridobenzodiazepinone BIBN-99 (**16**), which is the benchmark selective M₂ antagonist [19], the SCH series was synthesized in the Schering-Plough Research Institute. The lead compound, termed SCH 57790 (**17**) [20], although showing promising *in vivo* results, was abandoned because of the presence of the chemically labile benzylic cyano group [21]. Based on the observation that the replacement of the cyclohexyl ring with a substituted piperidine moiety improved M₂ selectivity, several alternatives were done, giving SCH 72788 (**18**) with a M₂ Ki of 0.5 nM, a 84-fold M₁/M₂ selectivity and which had an interesting *in vivo* activity [22].

Also starting from SCH 57790, a series of compounds where sulfoxide and cyano moieties were replaced with sulfone and (S)-methyl has been recently described, from which emerged (**19**) displaying a M₁/M₂ selectivity of 109-fold with a M₂ Ki = 0.7 nM; moreover this compound induced a sustained increase in ACh levels when administered orally in the microdialysis paradigm, in rats [23]. Recently, additional data about the structural requirements have been reported [24].

Another structural modulation of SCH 57790 led to piperidinylpiperidine analogs from which emerged the potent and selective antagonist SCH 76050 (**20**). Further investigation showed that SCH 76050 had a poor pharmacokinetic profile (low plasma levels and extensive metabolism). Derivatives with enhanced bioavailability such

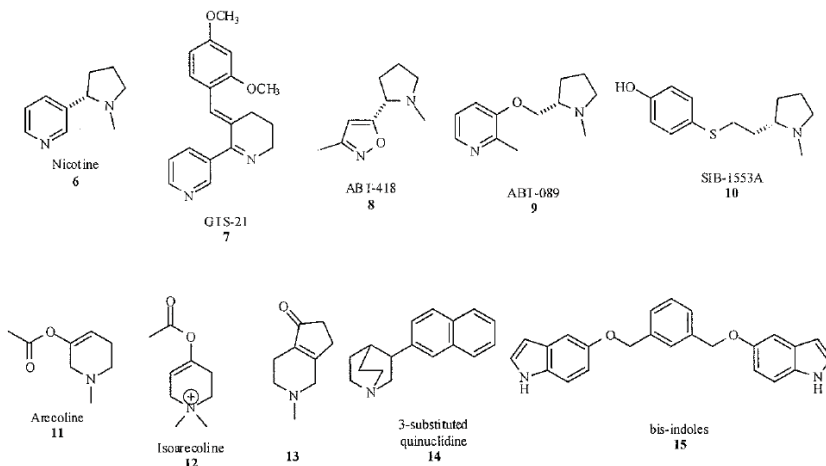


Fig. (3). Nicotinic agonists and allosterically potentiating agents

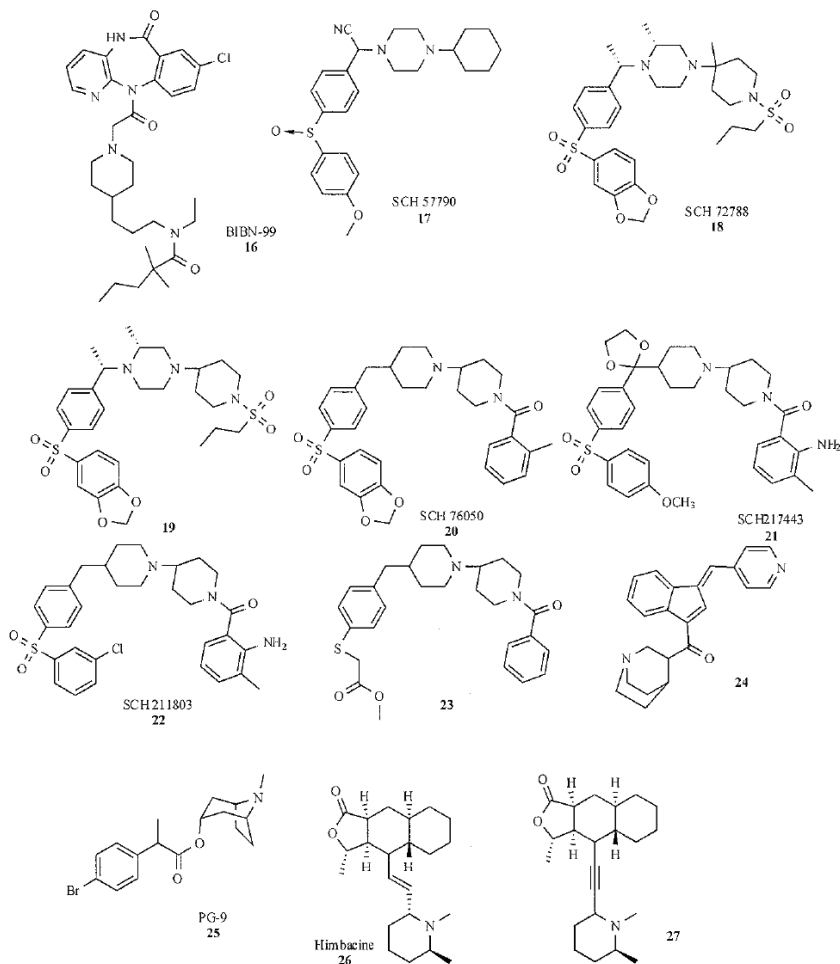


Fig. (4). M_2 muscarinic antagonists

as SCH 217443 (**21**) were synthesized resulting from the introduction of a ketal group and the replacement of the (2-methyl)benzamido group by an anthranilic amide. The tachycardic side effects were observed at doses 30-fold higher than those requested for activity on cognition in rats, showing how promising is this compound [25]. Attention has also turned to simplify the left hand portion of SCH 211803 (**22**), obtaining antagonists such as (**23**) with a

lower molecular weight [26] that can be considered as new lead compounds.

On the other hand, based on theoretical structure requirements for M_2 antagonism, compounds containing the benzofulvene core were synthesized; from this series emerge derivatives with a quinuclidine moiety and a pyridine residue such as (**24**) [27].

PG-9 (25), an M₂ antagonist structurally related to atropine, was recently reported to have central antinociceptive and anti-amnesic effects in mice and rats [28].

Another class of M₂ antagonists are derivatives from himbacine (26), which is a piperidine alkaloid originally extracted from *Galbulimima baccata* and showed potent and selective inhibition of M₂ receptors [29]. (27) was recently reported to be an M₂ antagonist, but exhibited lower affinity and showed a 10-fold selectivity for M₂/M₁ [30].

AChE Inhibitors (AChEIs)

AChE plays a key role in the hydrolysis of ACh. Moreover it has been shown that it could also play a role in accelerating A β plaques deposition [31], although investigation in APP-transgenic mice recently showed that long term administration of metrifonate (28), an irreversible AChEI, doesn't slow down the progression of A β pathology [32].

Some of the AChEIs described below differ in their mechanism of action (pseudo-irreversible, irreversible, reversible, transition state) [21]. Here we classified the AChEIs following their chemical structures.

Several AChEIs (such as rivastigmine) are able to inhibit another cholinesterase, the butyrylcholinesterase (BuChE); recently, the role of BuChE inhibition, additional to that of AChE was demonstrated [33,34].

Acridines

The prototype of this structural family is the first drug marketed for AD treatment, tacrine (29). Besides its interesting activity, tacrine showed adverse effects such as hepatotoxicity and gastrointestinal upset.

Since the demonstration of efficacy of tacrine, pharmacomodulations around tacrine structure gave several active derivatives, from which currently emerge amiridine (30) (under Phase III clinical evaluation), SM 10888 (31) [35] and CII002 (32) [36], the latter bearing halogen atoms.

Other tacrine derivatives have been recently designed, they are discussed below.

Carbamates

Carbamate compounds are pseudo-irreversible inhibitors, acting by carbamoylation of the serine residue of the active site. The first carbamate AChEI to date was the natural physostigmine (33) isolated from *Physostigma venenosum*, from which was also extracted the active alkaloid eseridine (34). Starting from physostigmine structure, many compounds have been designed giving *in vivo* active AChEIs currently under clinical investigation such as eptastigmine (35) [37], phenserine (36), quilostigmine (37) [38]. Recently, in order to develop potential AD therapeutics, novel analogs of physostigmine and phenserine were synthesized permitting to define structural requirements for differential inhibition between AChE and BuChE [39].

Eseridine has inspired the orally active CHF2819 (38) [40,41]; CHF2819 development prompted to evaluate other eseridine derivatives, but none of them were as potent nor selective as their physostigmine analogs [42].

Another template, miotine (39), led to the development of rivastigmine (40). New phenylcarbamates structurally

related to rivastigmine were recently reported [43]; among them, the orally active (41) emerged, and presented a good pharmacokinetic profile with low toxicity; moreover its synthesis is cheaper than that of rivastigmine.

On the other hand, a series of carbamates based on xanthostigmine (42) as a lead compound were designed in order to optimize the different fragments of the molecule, obtaining AChEIs such as (43) and butyrylcholinesterase inhibitors. A structure-activity relationships (SAR) study permitted to clarify the role of different moieties of this subclass of compounds. Moreover results from kinetic studies suggest potential development as drugs for the AD treatment [44].

Finally, in a search for less flexible analogs of caproctamine, Bolognesi *et al.* designed (44); *in vitro* evaluation permitted to show that it was as potent as physostigmine [45].

N-Benzylpiperidines

Donepezil (E2020) (45), the lead compound of N-benzylpiperidines, comes from pharmacomodulation on a N-benzylpiperazine compound found in a random screening for AChEIs [46]. Donepezil shows good pharmacological properties such as high selectivity for AChE, brain selectivity. Recently, additional clinical studies showed efficacy and safety of donepezil in advanced AD stages [47] and beneficial effects in the behavioral disturbances, characteristics of AD [48].

Large interest has been devoted to the design of new N-benzylpiperidines, principally by changing the indane core with other heterocyclic systems [49]. So, TAK-147 (46) is under phase II clinical trials. On the other hand, inventors of donepezil recently described halogeno-derivatives of donepezil such as (47) [50] and the benzylpyridinium salt (48) [51], both of these new derivatives have enhanced activity *in vitro* compared to donepezil.

2,5-Piperazinediones (DKP)

A series of DKP were synthesized using combinatorial techniques, in order to find highly AChE/BuChE selective inhibitors. This approach led to the identification of several lead compounds; among these, DKP80 (49) was the most active AChEI, with no significant inhibition on BuChE; moreover binding interactions of this compound to the active center of AChE were characterized [52].

Natural Derivatives

Intensive search is done in phytochemistry to find new compounds potentially active in AD treatment; the natural compounds present a wide variety of structures. If not active enough, natural products can play the role of hit compounds, and inspire medicinal chemistry for new potent compounds.

Galanthamine (50) is an alkaloid isolated from *Galanthus*, which acts by reversible competitive AChE inhibition and also allosterically modulates nicotinic ACh receptors and has been marketed in the E.U. and in the U.S. [53].

Knowing the efficacy of galanthamine, several pure *Amaryllidaceae* alkaloids and extracts from *Narcissus* were tested to find new AChEIs; among all, only a few showed inhibitory effects, the most effective were alkaloids with the

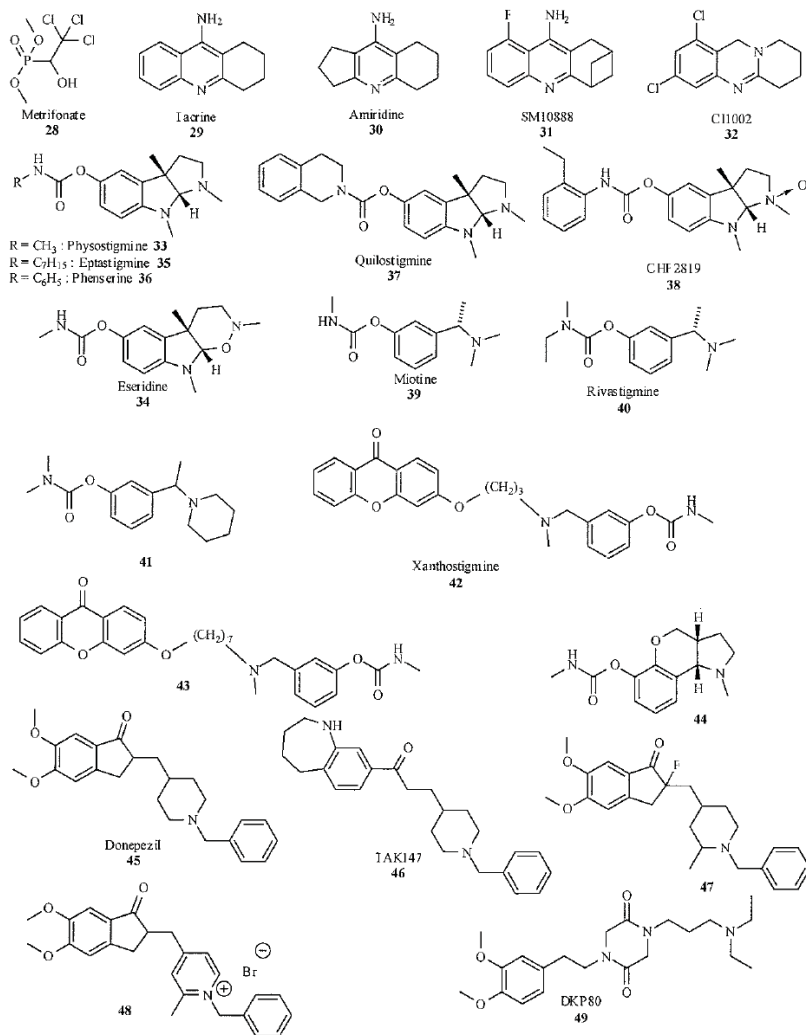


Fig. (5). Cholinesterase inhibitors, part 1

galanthamine structural type; other active alkaloids were lycorine-type, e.g. assoanine (**51**), which showed 4-times lower IC₅₀ value than galanthamine in a microplate assay for AChE activity; their activity could be explained by a certain planarity of the molecules [54]

Huperzine A (**52**) is an alkaloid isolated from the Chinese traditional herb *Huperzia serrata*, available on the U.S. market as a dietary supplement. This is a potent selective and long-acting AChEI, and it has high efficacy in

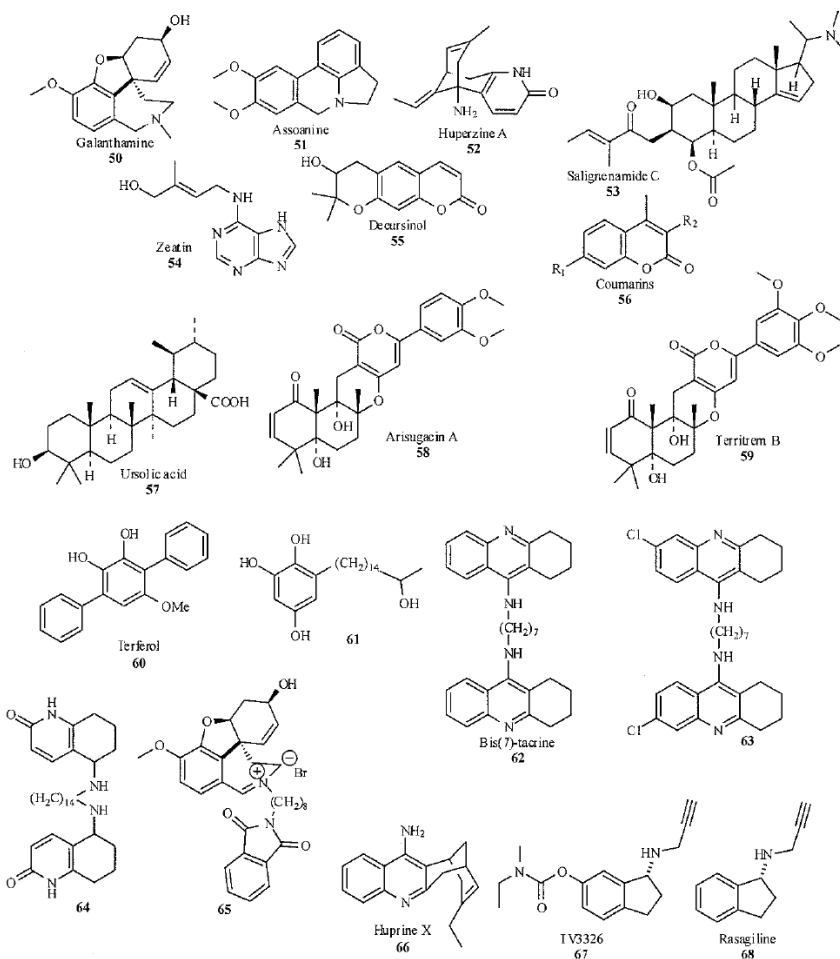


Fig. (6). Cholinesterase inhibitors, part 2

improving memory in different animal models and in clinical trials [55].

Other novel alkaloids are postulated to be potential lead compounds in AD treatment. Indeed new pregnane type steroidal alkaloids (such as saligenamide C, (53)) isolated from *Sarcococca saligna* were assayed for AChE and BuChE inhibition, and were shown to be more selective towards BuChE [56].

Fiatoua villosa emerged during the screening of plant extracts for their inhibiting effects on AChE; the active fraction was purified permitting the isolation of zeatin (54) [57].

Seeking novel natural AChEIs, a Korean team isolated coumarins from *Angelica gigas*; among these compounds, decursinol (55) showed the highest inhibitory effects *in vitro* [58]. Moreover, based on the finding that hybridation of an AChEI with an irreversible monoamine oxidase (MAO)

inhibitor inhibits both enzymes and using coumarinic MAO-B inhibitors, an exploratory study of AChE inhibition identified coumarins (56) as noncompetitive AChEIs. Although *in vivo* activity proof needs to be done, optimization of these novel structures could lead to a new potent family of compounds [59].

In another program search for AChEI coming from natural resources, extract of *Origanum majorana* L. was selected based on its high inhibitory effects. Further investigation led to the isolation of the active component, which was ursolic acid (57) [60].

Searching for new natural cognitive enhancers with low toxicity, Park *et al* recently reported a *Polygala tenuifolia* extract to have neuroprotective effects: this activity includes reduction of cell death induced by glutamate, A β , a C-terminal fragment of APP but also inhibition of AChE non-competitively [61].

Like higher plants, microorganisms are also studied for new AChEIs; *Penicillium* sp gave a series of compounds called arisugacins; among them, four showed substantial inhibition on AChE [62]. A great effort has been done towards total synthesis of arisugacin A (58), last year [63,64], and the total enantioselective synthesis of (-)-arisugacin A has been reported [65]. Structurally closed to arisugacins, the mycotoxin territrem B (59) is a noncovalent irreversible AChEI; its innovative mechanism could be useful for the design of a new class of AChEIs [66].

During a screening for new AChEIs derived from microorganisms, a team from China isolated a potent noncompetitive reversible AChEI, that was terferol (60),

already known as an inhibitor of the cyclic adenosine 3'5'monophosphate phosphodiesterase [67].

The last example is given by (61) isolated from *Chrysosporium* sp; even if not potent nor selective, this compound could be useful as a hit compound [68].

Bivalent compounds

This type of compounds lies on the concept of linking two active (similar or different) monomers by a spacer of suitable length. Based on the good results of Bis (7)-tacrine (62) [69], new bis-tacrine congeners such as (63) were designed [70]. The enhanced activity of this type of compounds seems to be due to the binding to active and peripheral sites of AChE [71]. Recently, (-)-huperzine A analogs dimers like (64) were studied with the *Torpedo californica* AChE, showing increased affinity than that of huperzine A. Nevertheless, when tested with rat AChE, such dimers showed less inhibitory potency [72]. The preparation of heterodimers based on galanthamine structure like (65) permitted to investigate SAR [73].

Hybrids

Huprines are synthetic hybrids combining the 4-aminoquinoline substructure of tacrine with the carbocyclic substructure of huperzine; among the 30 different compounds synthesized emerged huprine X (66), which is one of the most potent reversible inhibitor. *In vitro* investigations on newly synthesized regioisomeric ($\pm$)-syn-huprines showed that they were slightly less active than the corresponding *anti*-derivatives, this difference of effects is explained on the basis of an inverse solvation effect [74].

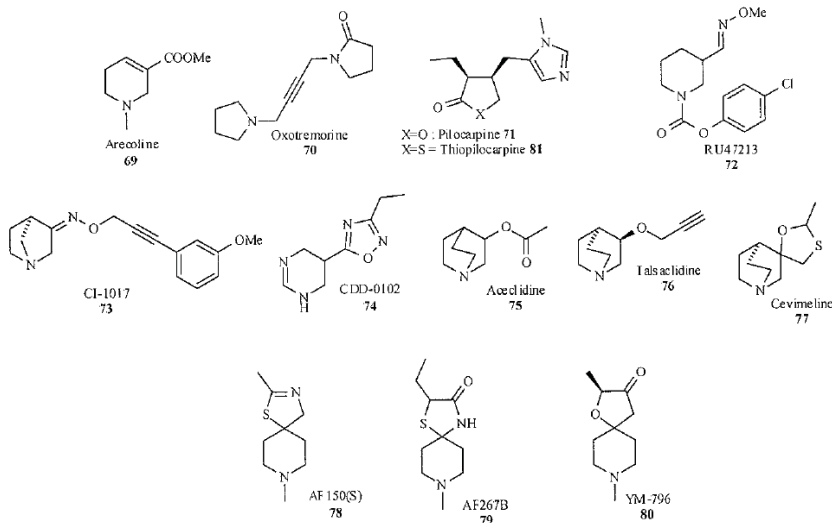


Fig. (7) M₁ agonists

TV3326 (67) results from the combination of the moieties from rasagiline (68) and rivastigmine, and exhibits interesting neuroprotective effects, including antiapoptotic activity, activation of α -secretase [75]; based on its administration in rat models of anxiety and depression, TV3326 seems to be a potential valuable drug for the treatment of dementia in patients with depression [76].

M_1 Stimulation

Development of M_1 agonists for AD treatment is explained by the cholinergic hypothesis, and also by their potential role in the regulation in $A\beta$ metabolism and tau phosphorylation [77]. This was recently shown *in vivo* with the reduction of $A\beta$ levels in the cerebro-spinal fluid after systemic administration of compounds synthesized by the A. Fisher team [78].

Initial trials with classical muscarinic agonists (arecoline (69), oxotremorine (70), pilocarpine (71)) were disappointing because of side effects (originating in their lack of activity and M_1 selectivity); so research effort has been devoted to the development of potent agonists with increased M_1 selectivity and lower toxicity. Another approach for M_1 signal enhancement is developing high-affinity positive allosteric modulators [79].

Several compounds currently under preclinical/clinical evaluation are derived from arecoline: RU47213 (72) [80], CI-1017 (PD-151831) (73) that is in Phase II, and amidine derivatives containing the 1,4,5,6-tetrahydropyrimidine moiety such as CDD-0102 (74), which is in preclinical development [81].

Pharmacomodulation around aceclidine (75) gave derivatives such as WAL 2014 (talsaclidine) (76). Although showing promising results (efficacy in models of learning and memory, good pharmacokinetic profile), talsaclidine failed to induce an improvement of cognitive symptoms in AD patients [82].

On the other hand, Abraham Fisher *et al.* developed a series of compounds including the spiroquinolindine AF102B (Cevimeline) (77), and the spiroperidines AF150 (S) (78) and AF267B (79) [83]. Although cevimeline is prescribed in U.S. and Japan for treatment of dry mouth in Sjogren's syndrome, its development for AD was halted because of cholinergic side-effects. The two others AFs may represent candidate drugs in AD. One other spiroperidone M_1 agonist currently under phase II is YM-796 (80) [84].

Thiopilocarpine (SDZ-ENS163) (81), an isosteric of pilocarpine, is a M_1 agonist, which showed M_2 antagonism. It is currently under clinical trials.

The successive failures during advanced development of M_1 agonists until now raise the question of the place of such compounds in AD therapy. It may be conceivable that, to show their full potential, M_1 agonists need to be administered in combination with other therapeutic agents [82].

AMYLOID HYPOTHESIS

The amyloid hypothesis posits that $A\beta$ accumulation is involved in the pathogenesis of AD; this was clearly established since the discovery of mutations within the APP gene in a small number of family with autosomal dominant familial AD.

Indeed β -amyloid plaques are made of $A\beta$ peptides ($A\beta$) [85,86], coming from the amyloid precursor protein (APP).

APP is a type I integral membrane glycoprotein with a large ectodomain, a single membrane spanning domain and a short cytosolic domain [87]. APP is sensitive to the cleavage by a set of proteases, called secretases (see Fig. 8).

The most important APP proteolysis (about 90%) is mediated by α -secretase, producing non amyloidogenic

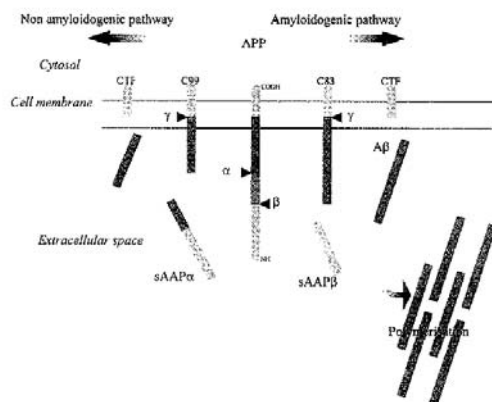


Fig. (8). The amyloid hypothesis.

sAPP α . The pathway leading to A β formation needs the cleavage of APP in two steps: first β -secretase acts in the extracellular domain, then γ -secretase cleaves within the transmembrane region [88].

The amyloidogenic pathway produces peptides varying in length from 39 to 43 amino acids; The 2 main A β s are A β 40 and A β 42, produced in the proportion of 9: 1. A β 42, more hydrophobic has a greater propensity to self aggregate and is more neurotoxic [89].

A β forms aggregates that eventually give rise to senile plaques. Mechanism of A β neurotoxicity is not yet clear, but several lines of evidence have recently converged to demonstrate that soluble A β oligomers (but not monomers or insoluble amyloid fibrils) may be responsible for triggering a neurotoxic cascade (such as tau phosphorylation [90], or intracellular accumulation of ROS in cultured nerve cells [91]) causing neurodegeneration in AD brains. So, A β plaques would represent inactive reservoirs of species in equilibrium with the smaller neurotoxic oligomers.

Therapeutic Approaches

From basics explained above, several therapeutic approaches emerge. The most important are limiting A β production, preventing A β oligomerization, enhancing A β clearance or inhibiting A β toxicity (antioxidants will be discussed in the "Oxidative stress hypothesis" section).

Other strategies can be related with amyloid hypothesis. For instance, epidemiological studies have shown a strong reduction of AD in patient treated with simvastatin, a cholesterol lowering drug. Indeed, recent evidences suggest an effect of cholesterol on APP processing [92,93]. Another example is given by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are known to reduce AD prevalence in epidemiological studies; Weggen has shown that NSAIDs affect A β 42 levels independently of COX activity [94,95]; see NSAIDs section.

Limiting A β Production: α -Secretase Stimulation

By enhancing α -secretase activity, less APPs are able to go through the amyloidogenic pathway. Moreover, the amount of sAPP α increases. sAPP α has been shown to have a beneficial neuroprotective effect [96].

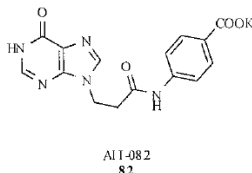


Fig (9) α secretase enhancer

Several classes of compounds are known to achieve α stimulation such as phorbol ester [7].

AIT-082 (leteprinim potassium) (82), an analog of hypoxanthine with memory-enhancing property, which is in phase II development and presented as a potential active drug

treatment of AD, stroke and motor neuron disease, is also thought to enhance α -secretase activity [98].

Limiting A β Production: β -Secretase Inhibition

β -secretase also termed memapsin 2 (membrane aspartyl protease of the statin family), ASP-2 or BACE (β -site APP cleaving enzyme), has been independently characterized as a membrane-tethered protease [99,100,101,102,103]. Although many structures are possible because of the non-stringent specificity of β -secretase, little information about β -inhibitors has been published. Compounds that showed inhibitory effects are transition state analogs.

Based on substrate specificity information of β -secretase, two peptidomimetic inhibitors (now termed as 1st generation inhibitors) were designed: OM99-1 (83) and OM99-2 (84) incorporate a non hydrolyzable hydroxyethylene transition state isostere (Ki values for human memapsin 2 of 36 nM and 1.6 nM, respectively) [104]. Moreover the crystal structure of memapsin 2 in complex with OM99-2 has been presented [105], leading to important structural information.

From this study, smaller peptidomimetic inhibitors were synthesized such as compound (85) showing a Ki of 2.5 nM [106]; OM00-3 (86) is a 2nd generation inhibitor, and exhibited a Ki of 0.3 nM; the structure of the catalytic domain bound to OM00-3 has been also determined [107]. In the patent literature, we found also a cyclohexyl hydroxyethylene isopropanol dipeptide isostere (87), which structure is closely related to that of OM99-2 [108].

On the other hand, several non peptidic compounds with an expected better oral bioavailability and a better penetration into the CNS can be found in the patent literature, such as relatively poor inhibitors like (88) reported with IC₅₀ < 50 μ M [109]. Compound (89) belongs to a series of tetralin derivatives, and shows IC₅₀ of 0.349 μ M in a test against recombinant β -secretase [110].

Finally, it has been shown by Steinhilb that MG132 (90), a peptide aldehyde known to inhibit γ -secretase, is also active on β -secretase [111].

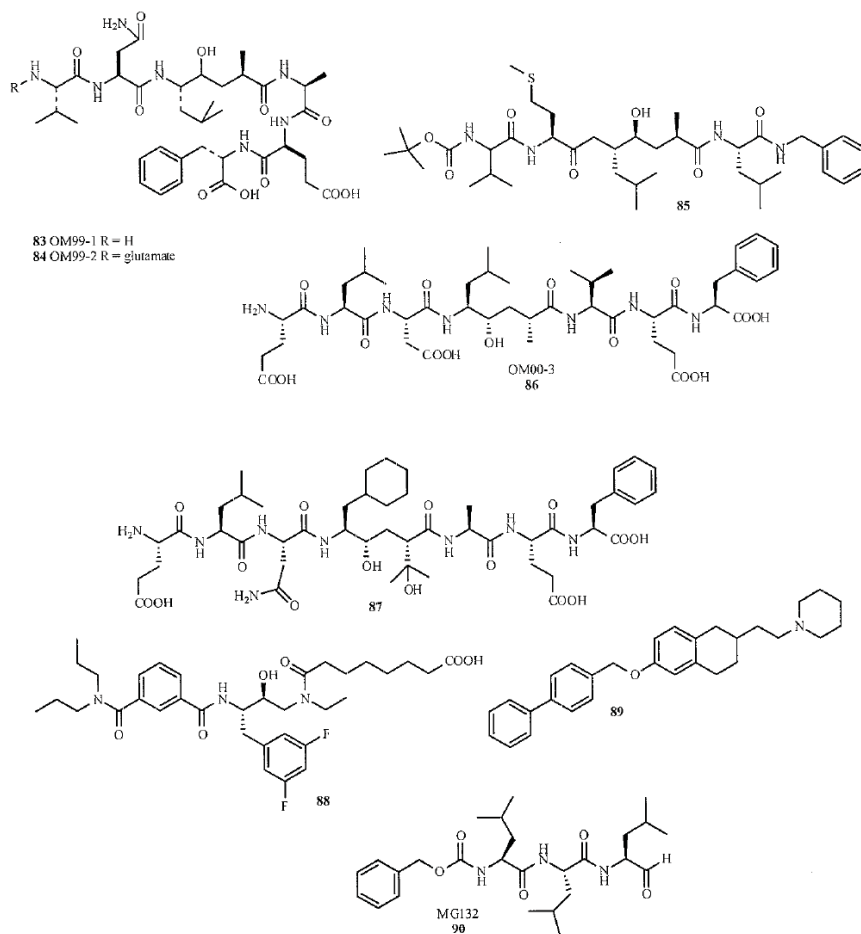
Limiting A β Production: γ -Secretase Inhibition

γ -Secretase is a high molecular weight multimeric protein, thought to be an aspartyl protease with its active site within or close to the membrane and containing in the active complex protein partners like nicastrin [112] or the presenilins (PS1 and PS2) [113]. The exact role of PS in γ -secretase is still unclear, but many results support that PS is either γ -secretase itself or an intimate and necessary cofactor.

Campbell *et al.* showed that γ -secretase inhibitors prevent the *de novo* generation of PS fragments [114].

The approach of γ -secretase inhibitors could have side-effects, since the finding that an intracellular fragment resulting from γ -cleavage of APP called AICD (for APP intracellular domain) has functional role in regulating phosphoinositide mediated calcium signaling [115].

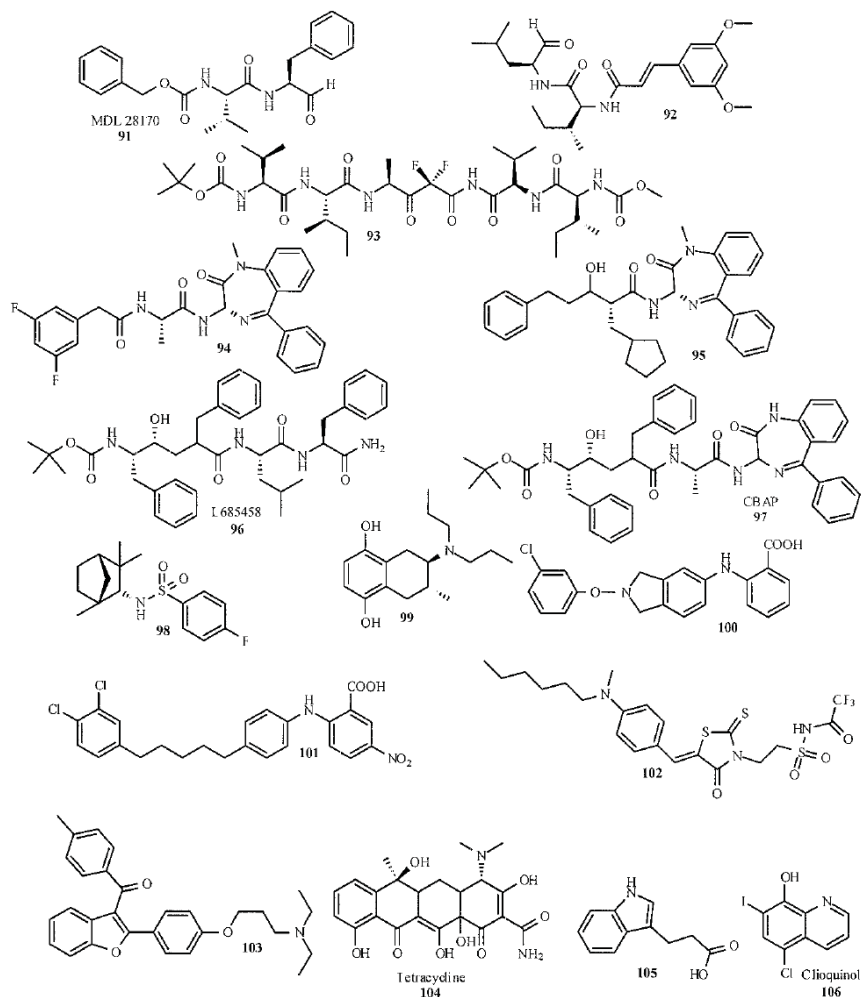
Taking into account that γ -secretase does not have a specific aminoacid sequence requirement for substrate recognition but rather has a loosely defined preference for hydrophobic amino acid sequences [116], many γ -secretase inhibitors have been reported [117].

Fig. (10) β -secretase inhibitorsPeptide Aldehydes

Peptide aldehydes are compounds able to inhibit serine, cysteine and aspartic acid proteases. At low concentrations, peptide aldehydes are reported to increase $A\beta$ production, and at higher concentrations to inhibit proteases [118]. Steinhilb explains this property by the inhibition, at low concentrations, of proteosomal degradation of β - and α -secretase-cleaved APP making more substrate available for γ -secretase cleavage; at higher concentrations, $A\beta$ secretion

would be explained by blocking cysteine proteases having roles in protein processing and trafficking in the secretory pathway [119].

Initially known to act on calpain, MG132 (90) was the most potent peptide aldehyde prototype with an IC_{50} of about 5 μ M against $A\beta_{40}$ and 25-50 μ M against $A\beta_{42}$ in a cell based assay

Fig. (11). γ -secretase inhibitors

Another calpain inhibitor, MDL 28170 (**91**) inspired the synthesis of a series of different aldehyde derivatives such as (**92**) [120].

Difluoroketone Peptidomimetics

(**93**) is a substrate-base inhibitor, structurally related to the sequence of the cleavage site leading to A β 42, and

shows inhibitory effects with IC_{50} of 13 μ M in a cell based assay [121]

Lactam Peptidomimetics

It has been shown that this series of compounds developed by Seiffert bind to the two PS1 and PS2; the most potent inhibitor (**94**) exhibited an IC_{50} of 0.3 nM on

A β production (cell-based assay) [122]. Other lactam compounds have recently been patented by the same team (e.g. compound (95) [123]).

L685458 Analogs

L685458 (96) was identified among libraries of aspartyl protease inhibitors as a potent inhibitor of γ -secretase with an IC₅₀ of 17 nM in a solubilized membrane assay of A β formation. This is a transition state analogue (containing a hydroxyethylene dipeptide isostere); its stereochemistry is opposite to that required for inhibition of the HIV-1 protease, which is another aspartyl protease [124].

Based on the good results shown by both L685458 and lactam compounds, CBAP (97) has been synthesized, and showed IC₅₀ of 0.1 nM [125].

Fenchylamine Sulfonamide

Thanks to cellular assays, which allow screening of small molecule inhibitors, a series of compounds with the original structure of fenchylamine sulfonamide have been developed; the most potent drug (98) of this series has an IC₅₀ 1.8 μ M in a cell based assay [126].

Since APP is not the only substrate of the secretases (e.g. γ -secretase is also involved in the processing of the Notch protein), side effects coming from the inhibition of either activity may prevent their ultimate therapeutic use. However, it has been shown that it was able to inhibit γ -secretase without affecting Notch's normal process [127,128]. Moreover any potential therapy that modifies APP processing may affect the normal functioning of APP and its metabolic derivatives.

Inhibiting A β Polymerization

A β polymerization provides another interesting target for potential therapeutic pathways; compounds acting in this way are called β -sheet breakers. Besides some short synthetic peptides such as KLVFF [129] or LPFFD [130], attention was paid to non-peptidic compounds. LeVine has recently reviewed this topic, presenting a large amount of inhibitors [131].

Using tifampicin as a template, the 2-aminotetralin compound (99) was identified in two assays as a potent A β polymerisation inhibitor [132].

Researchers have patented several benzoic acid derivatives with a micromolar concentration activity in an assay for inhibition of self-seeded amyloid fibril growth: (100) and (101) have IC₅₀ of 1.1 μ M [133] and 0.9 μ M [134], respectively in an assay for inhibition of self-seeded amyloid fibril growth.

Another series of A β polymerisation inhibitors is made of rhodanine derivatives from which emerged compound (102) with an IC₅₀ of 0.3 μ M, also in the assay for inhibition of self-seeded amyloid fibril growth [135].

Benzofurans have been evaluated in an immunoassay method in which (103) shows IC₅₀ of 20 μ M; moreover their activity was shown to be not due to a simple micellar/surfactant-based mechanism [136].

The classical antibiotics tetracyclins (e.g. tetracycline (104) and doxycycline) are also potentially useful for AD's

therapy since they inhibit A β -aggregates formation and disassemble the preformed fibrils [137].

In vitro investigations with indole-3-propionic acid (105) have shown that it was a potent inhibitor of amyloid fibril formation, with anti-oxidant, neuroprotective and cytoprotective activities. Phase I human studies were scheduled in 2001 [138].

Clioquinol (106), a retired USP antibiotic is an orally bioavailable Cu/Zn chelator that decreases A β deposition in transgenic mice [139]; clioquinol is under phase II double-blind clinical trials.

Immunotherapy Strategy

Another promising A β -related strategy is immunotherapy: vaccination with a synthetic version of β -amyloid causes an attack on β -amyloid plaques by the body's immune system. Although promising results during administration of AN-1792 (Elan Pharmaceuticals) to transgenic mice [140] and in Phase I trials, Phase IIa was halted in January 2002 because of nerve inflammation [141]. Despite this failure, AD vaccine could still be of first interest: refining the epitopes and avoiding the use of adjuvants might eliminate the side effects [142,143].

TAU HYPOTHESIS

The second histopathological hallmark of AD are intracellular neurofibrillary tangles (NFTs), composed of the microtubule-associated tau protein.

Tau proteins were originally isolated from brain by Cleveland, in 1977 [144,145]. Existing in 6 isoforms, they are mainly expressed in neural cells such as axons where they promote microtubule assembly and stabilize the structure of microtubules. Tau proteins contain numerous potential phosphorylation sites. When abnormally and hyperphosphorylated, tau proteins are less able to bind microtubules and self aggregate to form paired helical filaments (PHFs). As tau phosphorylation increases, so increase the density and numbers of NFTs.

Density of NFTs correlates well with the degree of dementia, and their progression permits the staging of the disease [146,147].

Phosphorylation of tau must be considered as a dynamic event in, which the addition and removal of phosphate groups is in a constant flux. Thus tau hyperphosphorylation results from an imbalance between kinase and phosphatase activity [148].

Tau glycosylation has been shown *in vitro* to be an early abnormality that can facilitate the subsequent abnormal hyperphosphorylation of tau in AD brain [149]. It has been also demonstrated that truncation of tau within its C terminus enhances the rate of tau polymerization [150].

Therapeutic Approaches

A set of different protein kinases are involved in tau phosphorylation including predominantly the Cdk5 (cyclin

dependant kinase 5) system [151], GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β), MAPK, MARK kinase and others

Since the finding that indirubins inhibit both Cdk5/p25 and GSK-3 β , question has raised on this dual activity. Cdk5 inhibitors were tested on purified GSK-3 β , and it was shown that, except butyrolactones and purines, all reported cdk5 inhibitors were potent inhibitors of GSK-3 β [152].

Selectivity of protein kinase inhibition is critical to avoid widespread effects in a potentially therapeutic use.

Cdk5

Cdk5 system is well known [153]. Cdk5 may be associated with its regulatory subunit p35 and so its activity is initiated, useful for neurite growth. When associated with a truncated fragment of p35 (p25), Cdk5 acts on tau causing morphological degeneration. Identified Cdk5 inhibitors include several families of compounds such as: hymenaldisine, paullones, indirubins, flavonoids (flavopiridol), purine derivatives (olomoucine, roscovitine), aminopurvalanol. All these compounds act by competing with ATP for binding to the catalytic site of the kinase; this was shown with the cocrystallization of several compounds with Cdk2; only roscovitine has been cocrystallized with Cdk5 [154]. Thanks to the useful work of Leclerc *et al.*, it is possible to compare potency of the main Cdk5 inhibitors [152].

Paullones Analogs

Paullones (107) are a new family of benzazepinones with promising antitumoral properties. They constitute potent and selective Cdk5/p25 and GSK-3 β inhibitors, with IC₅₀ (on purified kinase) ranging from 20 to 200 nM and 4 to 80 nM, respectively [155].

Derived from the lead structure kenpaullone (108), alsterpaullone (109) has been synthesized [156] and appeared to be the most potent compound of this family, with an

IC₅₀ of 4 nM against GSK3 β and 0.04 μ M against Cdk5. Moreover inhibitory effects of alsterpaullone has been confirmed *in vivo* [155].

Indirubins Family

Another interesting family of compounds with antitumoral activity is indirubins, bearing the bis-indole core. The most potent candidate is 5-iodoindirubin-3'-monooxime (110) [152].

GSK-3 β

GSK-3 β is considered as a pivotal kinase in AD evolution, because of its implication with many systems associated with AD such as tau, PS1, A β , APP, ACh [157].

As mentioned above, paullones and indirubins are potent GSK-3 β inhibitors.

Lithium

Lithium has also been reported to inhibit GSK-3 β [158], but its high IC₅₀ value did not allow its therapeutic use; this could be re-evaluated since the finding that lithium also reduces A β secretion in a dose-dependent manner [159].

Maleimide Derivatives

Compounds bearing a maleimide core are reported to have inhibitory effects on GSK-3 β . The maleimide can be substituted by 2 indoles or by an indole and a substituted benzene. In the patent literature, we found novel potent derivatives such as (111) [160], or (112) [161].

Thiadiazolidinones (TDZD)

This novel class is innovative since it is the first to act via a non-ATP competitive mechanism [162]. For instance, compound (113) inhibits selectively GSK-3 β with an IC₅₀ of 2 μ M (in a purified GSK-3 β assay).

Furthermore, we found in the patent literature several compounds with original structures: Bebbington's team

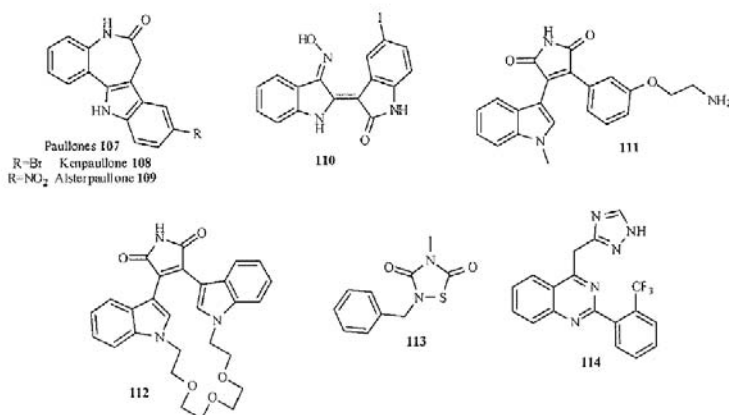


Fig. (12). Tau modulating agents

work on compounds containing a triazole moiety such as (114) [163]

OXIDATIVE STRESS HYPOTHESIS

Increasing experimental evidence indicates the importance of oxidative stress in pathology and neurotoxicity associated with aging and neurodegenerative diseases such as AD [164]. *In vitro* investigations have put forward the central role of

A β peptide [165]. Nevertheless, and as we said in the introduction, several researchers point excessive oxidation as the primary target to treat AD [3,4]

The oxidative stress hypothesis include many pathways such as protein and lipid peroxidation, increase in DNA oxidation products, and perturbation of the homeostasis of transition metals, with alteration in specific copper and iron containing metalloenzymes [166]

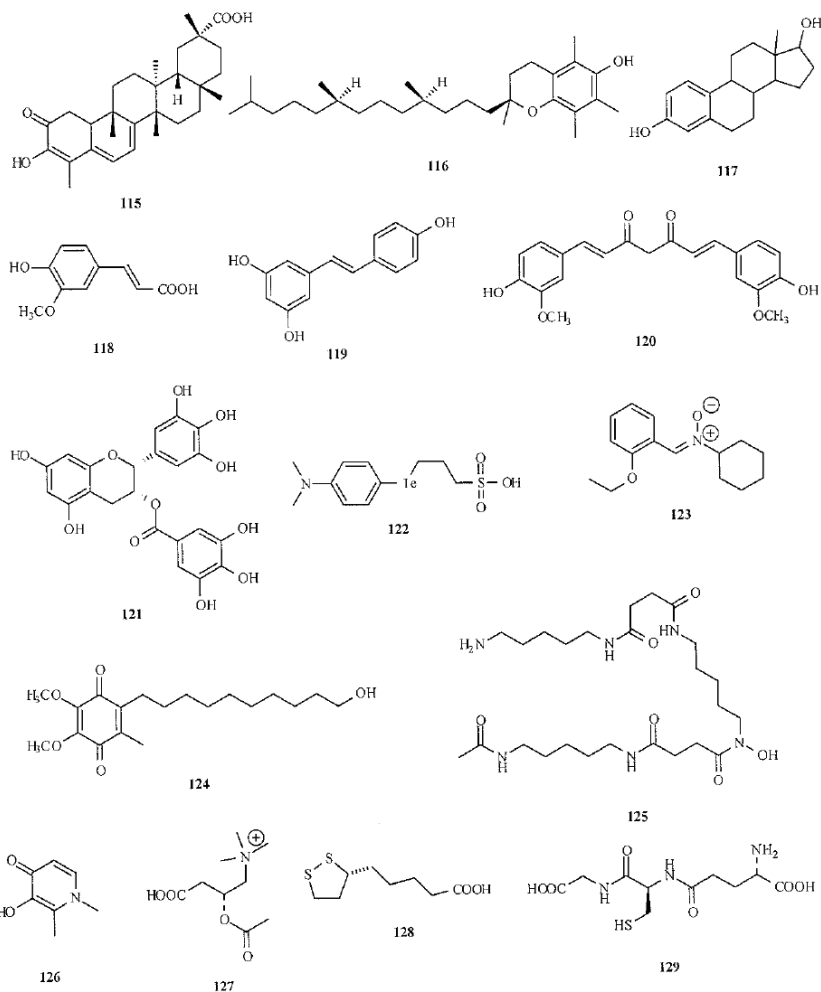


Fig. (13). Antioxidants

In the scientific literature, many compounds are reported to have antioxidant property and so are claimed for AD therapy. Antioxidants are able to counteract the effects of oxidative stress; according to their mode of action they may be distinguished as: direct antioxidants, indirect antioxidants and metabolic antioxidants [167].

Direct Antioxidants

Direct antioxidants interact with formed radicals. A series of aromatic amines and imines has recently been reported to possess excellent cytoprotective potential in diverse paradigms of oxidative neuronal cell death [168]. But the most important family of direct antioxidants is made of radical scavengers bearing a hydroxyl group at a mesomeric system [169]: the plant-derived triterpene celastrol (**115**) [170], monophenolic compounds such as vitamin E (**116**), 17 β -estradiol (**117**), ferulic acid (**118**) [171,172], and polyphenolic compounds including resveratrol (**119**) [173], curcumin (**120**) [174], and flavonoids [175] such as epigallocatechin gallate (**121**) [176]. Moreover flavonoids, besides terpenes, are found in the widely used *Ginkgo biloba* extract EGB761.

A double-blind placebo-controlled study using vitamin E demonstrated its beneficial effect on the course of AD [177], clinical studies with other antioxidants must still be carried out.

On the other hand, organotellurium compounds, such as NDBT (3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenecellurenyl]propane-sulfonic acid) (**122**) are potentially excellent antioxidants [178].

Nitrones such as CPI-1429 (**123**) have been shown to have antiaging activity, explained by the reduction of ROS. Moreover, they are also neuroprotective, due to the cessation of enhanced signal transduction processes associated with neuroinflammatory processes [179].

Safety and efficacy of the antioxidant idebenone was recently evaluated versus tacrine, showing higher benefit with idebenone (**124**) [180].

Indirect Antioxidants

Indirect antioxidants prevent free radical formation. Among these, we can find chelating agents such as deferoxamine (**125**) or deferiprone (**126**). Although deferoxamine showed significant slowing in the rate of dementia [181], its side effects (such as anemia) and its painful intramuscular administration diminished its interest [182].

Metabolic Antioxidants

This type of antioxidants acts by the reduction of the metabolic burden of increased levels of free radicals and include compounds such as acetyl-L-carnitine (**127**), which was recently showed as a well-tolerated and effective adjuvant treatment, especially in younger AD patients [183], α -lipoic acid (**128**) [184], glutathione (**129**) [185].

OTHER APPROACHES: ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

The rationale for using anti-inflammatory drugs against AD is based on the knowledge that AD brain is the seat of a

strong inflammatory reaction including microglia activation (source of ROS), secretion of inflammatory products. Moreover patients on chronic therapy with NSAIDs showed significant lower risk of developing AD. Nonselective NSAIDs (inhibiting the two isoforms COX-1 and COX-2) such as ibuprofen (**130**) and naproxen (**131**) are thought to be a possible preventive approach and are currently tested against AD [186].

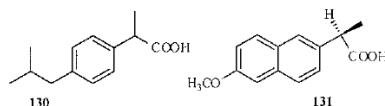


Fig. (14). Anti-inflammatory drugs.

OTHER APPROACHES: CARBONIC ANHYDRASE ACTIVATORS

Carbonic anhydrase (CA) catalyzes the interconversion between CO_2 and HCO_3^- . This reaction is implicated in many metabolic pathways (e.g. respiration, pH regulation, transport of CO_2) [187].

CA activation provides a rapid and efficient mechanism to raise HCO_3^- concentrations in memory-related neural structures; increased HCO_3^- flux through synaptic GABA_A receptor channels alters postsynaptic neuronal responses to GABA and thus neuronal responses to diverse signal inputs [188]. Recently, it has been shown that administration of a CA activator (CAA) produces an important pharmacological enhancement of synaptic efficacy, spatial learning and memory [189].

The CAs activation can be achieved by a multitude of physiologically relevant compounds such as biogenic amines (histamine, serotonin, phenylalanine, catecholamines), amino acids or oligopeptides/small proteins [190].

Several CAAs series have been synthesized considering histamine as a lead compound. Exploring types of moieties that might be attached at the aliphatic end of the molecule led to the synthesis of dipeptides (such as (**132**) or (**133**)), efficient *in vitro* activators of three CA isozymes [191]. On the other hand, histamine derivatives possessing carboxamido, ureido, thioureido or guanidino moieties in their molecule were also reported as CAAs, with affinities in the nanomolar range for the best compounds (e.g. (**134**)) [192].

Using histamine and histidine as lead compounds, carnosine derivatives were synthesized [193]; some of the new compounds, e.g. (**135**) and (**136**) showed very good activities against human and bovine isozymes.

Finally, the preparation of pyridinium salts incorporatingazole moieties (pyrazole, imidazole and tetrazole) such as (**137**), (**138**) and (**139**) have been recently reported; due to their cationic nature, the pyrazole and imidazole derivatives are interestingly membrane-impermeant CAAs, discriminating between cytosolic and membrane-bound CA isozymes [194].

All these compounds could lead to the development of drugs for the management of CA deficiency syndromes, as well as for the pharmacological enhancement of synaptic

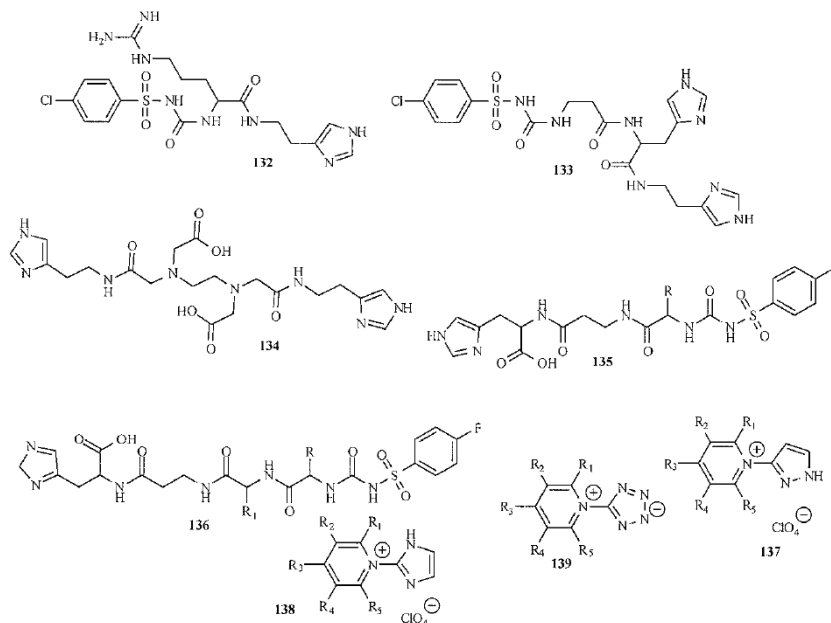


Fig (15). CA Activators

efficacy, spatial learning, and memory. This may constitute a novel approach for the treatment of AD and other conditions in need of achieving memory therapy.

OTHER APPROACHES: EXCITATORY AMINO ACIDS MODULATORS

L-glutamic acid is the main excitatory neurotransmitter in the CNS for which have been identified metabotropic (coupled to GTP proteins) and ionotropic glutamate (coupled to the opening of ion channels) receptors. Among the latter and besides the KA (kainic acid) subtype, the NMDA (N-methyl-D-aspartate) and the AMPA (α -amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate) subtypes have been shown to be involved in long term memory.

AMPA Potentiators

During the past decade, many studies supported the benefits of using AMPA potentiators in cognitive disorders [195]. Although AMPA agonists could show severe adverse effects such as neurotoxicity, allosteric positive modulators offer the advantage of reducing the desensitizing effect, a sort of "fine tuning" rather than direct stimulation of the receptor.

Several structural families are studied for their potential as candidate drugs in AD treatment [196].

1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide Compounds and Analogs

During last years, pharmacomodulation studies around the lead compounds (diazoxide (140), IDRA-21 (141) and cyclothiazide (142)) led to the identification of potent positive allosteric modulators such as (143) where the benzene ring was replaced by a pyridine nucleus [197]. Other substituents modifications (e.g. (144)) on the same heterocyclic system were patented by Pirotte [198]; on the other side, novel IDRA-21 derivatives were reported with alkyl substitution on the benzene ring, such as (145) [199,200]. Also derived from IDRA-21, S18986 (146) is a pyrrolo-benzothiadiazine currently under Phase I clinical trials [201].

Aniracetam Derivatives

Based on aniracetam (147), several compounds such as CX516 (148) were synthesized and tested *in vivo*, showing good results, representing so much potential candidates for clinical investigations.

Biarylpropylsulfonamide Compounds

LY392098 (149) was the first potent compound of a series developed by Ornstein *et al* [202] and has been shown to be orally active in rats [203]. Further investigation development permitted to identify an *in vitro* very active

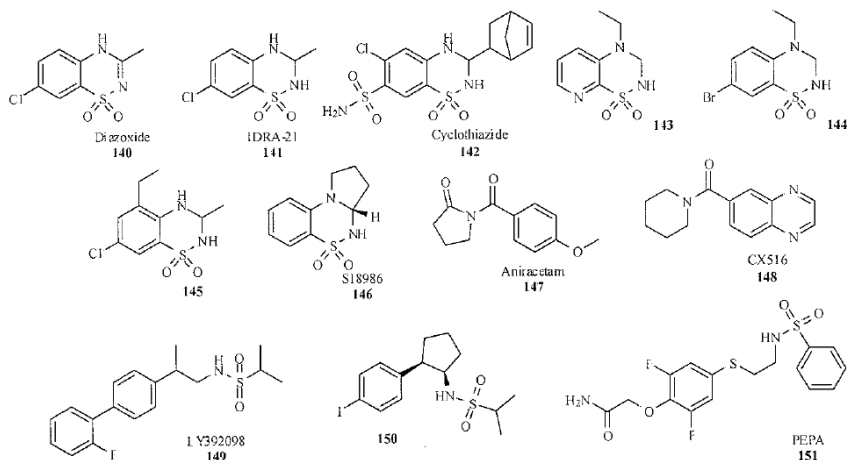


Fig. (16). AMPA potentiators

ring constrained analogue aryleclopentanesulfonamide (**150**) [204].

Finally, stands PEPA (**151**), which is unrelated with others developed active molecules; PEPA could be an effective compound for the treatment of impaired memory [205].

NMDA Modulators

NMDA receptor modulators are also thought as potential drugs in AD treatment and memory impairs [206].

NMDA antagonists are potential therapeutic agents in CNS disorders where neuronal loss is caused by glutamate-induced excitotoxicity (such as cerebral ischemia) or where there is overactivity of excitatory pathways (in epilepsy, e.g.). Memantine (**152**) is an NMDA antagonist that has been approved by the European Commission for the treatment of moderately-severe AD in 2002, and became available in Germany in August 2002.

On the other hand, NMDA potentiators would be interesting to treat cognitive disorders. The antibiotic D-cycloserine (**153**) has been shown to have such activities, due to enhancement of NMDA signal. Recently, a trial on healthy subjects pretreated with scopolamine to mimic AD suggested that D-cycloserine had no place in the treatment of AD patients [207].

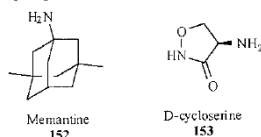


Fig. (17). NMDA modulating agents

CONCLUSIONS

This review tried to cover the very last advances in research around AD. As shown, all rational approaches are intensively investigated, and many compounds are being tested, some of which showing promising results. Besides "classical" pharmacomodulation of existing compounds, it is clear that works in phytochemistry will still provide new potential hit compounds to the medicinal chemists (see the AChEIs, the antioxidants). The importance of epidemiological studies with marketed drugs for the discovery of new targets is also worth mentioning here. For instance, it has been observed that patients treated with the cholesterol-lowering drugs statins presented a reduced risk of developing AD [208]. This observation offers a new possibility for AD treatment; the mechanisms how cholesterol may interfere in the course of AD are currently being investigated.

Among the currently investigated strategies, the most interesting seem to be the disease modifying approaches, which would be able to block AD progression and even reverse it: such goal could be achieved by the drugs targeting A β and tau formation, the NSAIDs, the antioxidants and statins. On the other hand, several approaches offer a more symptomatic treatment. The AMPA potentiators and the CAAs, although not clinically exploited up to now, seem to constitute a new revolutionary approach not only for the AD treatment but also to treat other neurodegenerative disorders in need of memory therapy.

AD appears as a complex multi-faceted disease; it is probable that future AD treatments will need to be also multi-faceted and so will involve more than one therapeutic approach. Clinical trials with such polytherapy should still be done.

ABBREVIATIONS

A β	=	β -amyloid
ACh	=	Acetylcholine
AChE	=	Acetylcholinesterase
AChEI	=	AChE inhibitor
AD	=	Alzheimer's disease
AICD	=	APP intracellular domain
AMPA	=	α -amino-3- (3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate
APP	=	Amyloid precursor protein
ATP	=	Adenosine triphosphate
BuChE	=	Butyrylcholinesterase
CA	=	Carbonic anhydrase
CAA	=	Carbonic anhydrase activator
Cdk2	=	Cyclin dependant kinase 2
Cdk5	=	Cyclin dependant kinase 5
ChAt	=	Choline acetyltransferase
CNS	=	Central nervous system
COX-1, COX-2	=	Cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2
DKP	=	2,5-piperazinediones
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GSK-3 β	=	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GTP	=	Guanosine triphosphate
KA	=	Kainic acid
MAO	=	Monoamine Oxidase
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
MARK	=	Microtubule affinity regulating kinase
nAChR	=	Nicotinic acetylcholine receptor
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NFTs	=	Neurofibrillary tangles
NSAIDs	=	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PHFs	=	Paired helical filaments
PS, PS1, PS2	=	Presenilin, presenilin 1, presenilin 2
ROS	=	Reactive oxygen species
sAAP α	=	Soluble APP, processed by α -secretase
SAR	=	Structure-activity relationships
TDZD	=	Thiadiazolidinones
USP	=	United States Pharmacopoeia

REFERENCES

- [1] Cacabelos, R. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 59.
- [2] Teunissen, C.E.; de Vente, J.; Steinbusch, H.W.V.; De Bruijn, C. *Neurobiol. Aging* **2002**, *23*, 485.
- [3] Smith, M.A.; Casadesu, G.; Joseph, J.A.; Perry, G. *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, *33*, 1194.
- [4] Smith, M.A.; Drew, K.L.; Nunomura, A.; Takeda, A.; Hirai, K.; Zhu, X.; Atwood, C.S.; Raina, A.K.; Rotkamp, C.A.; Sayre, L.M.; Friedland, G.P. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 527.
- [5] Cummings, J.L.; Vinters, H.V.; Cole, G.M.; Khachaturian, Z.S. *Neurology* **1998**, *51*, s2.
- [6] Cicula, S. *Neurology* **1998**, *51*, s18.
- [7] Amenta, F.; Parnetti, L.; Gallai, V.; Wallin, A. *Mech. Of Ageing and Develop.* **2001**, *122*, 2025.
- [8] Andreani, A.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Pietra, C.; Viletti, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 77.
- [9] Chazot, P.L. *Current Opinon in Central & Peripheral Nervous System Investigational Drugs* **2000**, *2*, 467.
- [10] Liu, Q.; Kawai, H.; Berg, D.K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4734.
- [11] Decker, M.W.; Brioni, J.D.; Sullivan, J.P.; Buckley, M.J.; Radek, R.J.; Raskiewicz, J.L.; Kang, C.H.; Kim, D.B.; Giardina, W.J.; Wasicak, J.T.; Garvey, D.S.; Williams, M.; Arneric, S.P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 319.
- [12] Kihara, T.; Shimohama, S.; Sawada, H.; Kimura, J.; Kume, T.; Kochiyama, H.; Maeda, T.; Akaike, A. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 159.
- [13] Lin, N.H.; Gunn, D.E.; Ryther, K.B.; Garvey, D.S.; Donnelly-Roberts, D.L.; Decker, M.W.; Brioni, J.D.; Buckley, M.J.; Rodrigues, A.D.; Marsh, K.G.; Anderson, D.J.; Buccafusco, J.J.; Prendergast, M.A.; Sullivan, J.P.; Williams, M.; Arneric, S.P.; Holladay, M.W. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 385.
- [14] Vernier, J.M.; El-Abdellaoui, H.; Holsenback, H.; Cosford, N.D.P.; Bleicher, L.; Barker, G.; Bontempi, B.; Chavez-Noriega, L.; Menzaghi, F.; Rao, I.S.; Reid, R.; Sacuan, A.L.; Suto, C.; Washburn, M.; Lloyd, G.K.; McDonald, I.A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1684.
- [15] Guandalini, L.; Dei, S.; Gualtieri, F.; Romanelli, M.N.; Scapecchi, S.; Teodori, E.; Varani, K. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 96.
- [16] Peters, D.; Olsen, G.M.; Nielsen, E.O.; Ahling, P.K.; Jorgensen, I.D. *PTC Int. Appl.* WO 02/44176 (2002).
- [17] Maelicke, A.; Schratzenholz, A.; Sanschocki, M.; Radina, M.; Albuquerque, E.X. *Behav. Brain Res.* **2000**, *113*, 199.
- [18] Balestra, M.; Gurley, D.; Rosamond, J. *PTC Int. Appl.* WO 01/32620 (2001).
- [19] Doods, H.N. *Drugs Fut.* **1995**, *20*, 157.
- [20] Billard, W.; Binch, H.; Bratzler, K.; Chen, L.Y.; Crosby, G.; Duffy, R.A.; Dugar, S.; Lachowicz, J.; McQuade, R.; Pushpavanam, P.; Ruperto, V.B.; Taylor, L.A.; Clader, J.W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2209.
- [21] Camps, P.; Munoz-Torres, D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 11.
- [22] Lachowicz, J.E.; Duffy, R.A.; Ruperto, V.; Kozlowski, J.; Zhou, G.; Clader, J.; Billard, W.; Binch, H.; Crosby, G.; Cohen-Williams, M.; Strader, C.D.; Coffin, V. *Life Sci.* **2001**, *68*, 2585.
- [23] Kozlowski, J.A.; Zhou, G.; Tagat, J.R.; Lin, S.I.; McCombie, S.W.; Ruperto, V.B.; Duffy, R.A.; McQuade, R.A.; Crosby, G.; Taylor, L.A.; Billard, W.; Binch, H.; Lachowicz, J.E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 791.
- [24] McCombie, S.W.; Lin, S.I.; Tagat, J.R.; Nazareno, D.; Vice, S.; Ford, J.; Asberom, T.; Leone, D.; Kozlowski, J.A.; Zhou, G.; Ruperto, V.B.; Duffy, R.A.; Lachowicz, J.E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 795.
- [25] Greenlee, W.; Clader, J.; Asberom, T.; McCombie, S.; Ford, J.; Guzik, H.; Kozlowski, J.; Li, S.; Liu, C.; Lowe, D.; Vice, S.; Zhao, H.; Zhou, G.; Billard, W.; Binch, H.; Crosby, R.; Duffy, R.; Lachowicz, J.; Coffin, V.; Watkins, R.; Ruperto, V.; Strader, C.; Taylor, L.; Cox, K. *Pharmaco* **2001**, *56*, 247.
- [26] Wang, Y.; Chackalamannil, S.; Hu, Z.; McKittrick, B.A.; Greenlee, W.; Ruperto, V.; Duffy, R.A.; Lachowicz, J.E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1087.
- [27] Bohne, T.M.; Keim, C.; Dannhardt, G.; Mutschler, E.; Lambrecht, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1241.
- [28] Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Romanelli, M.N.; Gualtieri, F.; Bartolini, A. *CNS Drug Reviews* **2000**, *6*, 63.
- [29] Kozikowski, A.P.; Fauq, A.H.; Miller, J.H.; McKinney, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 797.
- [30] Gao, L.J.; Wasilbroeck, M.; Hofman, S.; Van Haver, D.; Milanesio, M.; Viterbo, D.; De Clercq, P.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1909.

- [31] Inestrosa N C; Alvarez A; Perez, Cristian A; Moreno, R D; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O.; Soto, C.; Garrido, J. *Neuron*, **1996**, *16*, 881.
- [32] Liu, L.; Ikonen, S.; Heikkinen, T.; Tapiola, J.; van Groen, I.; Tanila, H. *Exp Neurol*, **2002**, *173*, 196.
- [33] Giacobini, E.; Spiegel, R.; Enz, A.; Veroff, A. E.; Cutler, N. R. *J Neural Transm*, **2002**, *109*, 1053.
- [34] Ballard, C. G. *Eur Neurol*, **2002**, *47*, 64.
- [35] Anonymous. *Drugs Future*, **1991**, *16*, 33.
- [36] Emmertling, M. R.; Gregor, V. E.; Schwarz, R. D.; Scholten, J. D.; Callahan, M. J.; Lee, C.; Moore, C. J.; Raby, C.; Lipinski, W. J.; Davis, R. E. *Advances in Behavioral Biology*, **1995**, *44*, 483.
- [37] Imbibo, B. P. *CNS Drugs*, **2001**, *15*, 375.
- [38] Sramek, J. J.; Hourani, J.; Jhee, S. S.; Cutler, N. R. *Life Sci*, **1999**, *64*, 1215.
- [39] Yu, Q. S.; Holloway, H. W.; Hippen-Anderson, J. L.; Hoffman, B.; Brossi, A.; Greig, N. H. *J Med Chem*, **2001**, *44*, 4062.
- [40] Trabace, L.; Cassano, T.; Ioverre, A.; Steardo, L.; Cuomo, V. *CNS Drug Reviews*, **2002**, *8*, 53.
- [41] Cassano, T.; Carratu, M. R.; Coluccia, A.; Di Giovanni, V.; Steardo, L.; Cuomo, V.; Trabace, L. *Drug Develop Res*, **2002**, *56*, 354.
- [42] Yu, Q. S.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Whitaker, N. F.; Brossi, A.; Greig, N. H. *J Med Chem*, **2002**, *45*, 3684.
- [43] Mustazza, C.; Borioni, A.; Del Giudice, M. R.; Gatta, F.; Ferretti, R.; Meneguzzi, A.; Volpe, M. T.; Lorenzini, P. *Eur J Med Chem*, **2002**, *37*, 91.
- [44] Rampa, A.; Piazzi, L.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Bisi, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Cavrini, V.; Cavalli, A.; Recanatini, M.; Valenti, P. *J Med Chem*, **2001**, *44*, 3810.
- [45] Bolognesi, M. L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiazi, V.; Melchiorre, C. *J Med Chem*, **2001**, *44*, 105.
- [46] Sugimoto, H.; Yamanishi, Y.; Limura, Y.; Kawakami, Y. *Curr Med Chem*, **2000**, *7*, 303.
- [47] Feldman, H.; Gauthier, S.; Hecker, J.; Vellas, B.; Subbiah, P.; Whalen, E. *Neurology*, **2001**, *57*, 613.
- [48] Barak, Y.; Bodner, E.; Zemishlani, H.; Mirecki, I.; Aizenberg, D. *Arch Gerontol Geriatr*, **2001**, *33*, 237.
- [49] Martinez, A.; Fernandez, A. C.; Santiago, C.; Rodriguez-Franco, I.; Bahos, J. E.; Badia, A. *Eur J Med Chem*, **2000**, *35*, 913.
- [50] Takeuchi, Y.; Shibata, T.; Suzuki, E.; Imura, Y.; Kosasa, T.; Yamanishi, Y.; Sugimoto, H. *PCT Int Appl WO 02/20482* (2002).
- [51] Imura, Y.; Kosasa, T. *PCT Int Appl WO 01/78728* (2001).
- [52] Carbonell, T.; Masip, I.; Sanchez-Baeza, F.; Delgado, M.; Araya, E.; Llorens, O.; Corcho, F.; Perez, J. J.; Perez-Paya, E.; Messegue, A. *Mol Divers*, **2002**, *5*, 131.
- [53] Raskind, M. A.; Paskind, E. R.; Wessel, T.; Yuan, W.; Allen, F. H. Jr.; Aronson, S. M.; Baumeister, B.; Eisner, J.; Brenner, R.; Cheren, S.; Verma, S.; Daniel, D. G.; DePriest, M.; Ferguson, J. M.; England, D.; Farmer, M. V.; Frey, J.; Filman, S. S.; Harrell, I. E.; Holub, R.; Jacobson, A.; Olivera, G. F.; Ownby, R. L.; Jenkins, L. R.; Landfloom, R.; Leibowitz, M. T.; Zolnouni, P. P.; Lyketos, C.; Mintzer, J. E.; Nakra, R.; Pahl, J. J.; Potkin, S. G.; Richardson, B. C.; Richter, R. W.; Rymel, M. M.; Saur, D. P.; Daffner, K. R.; Scinto, L.; Stoukides, J.; Targum, S. D.; Thein, S. G. Jr.; Thien, S. G.; Tomlinson, J. R. *Neurology*, **2000**, *54*, 2261.
- [54] López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *Life Sci*, **2002**, *71*, 2521.
- [55] Tang, X. C.; Han, Y. F. *CNS Drug Reviews*, **1999**, *5*, 281.
- [56] Rahman, A.-U.; Haq, Z.-U.; Asaad, K.; Anjum, S.; Khan, M. R.; Choudhary, M. I. *Helv Chim Acta*, **2002**, *85*, 678.
- [57] Heo, H. J.; Hong, S. C.; Cho, H. Y.; Hong, B.; Kim, H. K.; Kim, E. K.; Shin, D. H. *Mol Cells*, **2002**, *13*, 113.
- [58] Kang, S. Y.; Lee, K. Y.; Song, S. H.; Park, M. J.; Kim, Y. C. *J Nat Prod*, **2001**, *64*, 683.
- [59] Brühlmann, C.; Ooms, F.; Carrupt, P. A.; Testa, B.; Catto, M.; Leonetti, F.; Altomare, C.; Carotti, A. *J Med Chem*, **2001**, *44*, 3195.
- [60] Chung, Y. K.; Heo, H. J.; Kim, E. K.; Kim, H. K.; Huh, T. L.; Lim, Y.; Kim, S. K.; Shin, D. H. *Mol Cells*, **2001**, *11*, 137.
- [61] Park, C. H.; Choi, S. H.; Koo, J. W.; Seo, J. H.; Kim, H. S.; Jeong, S. J.; Suh, Y. H. *J Neurosci Res*, **2002**, *70*, 484.
- [62] Otoguro, K.; Shiomi, K.; Yamaguchi, Y.; Arai, N.; Sunazuka, T.; Masuma, R.; Iwai, Y.; Omura, S. *J Antibiot*, **2000**, *53*, 50.
- [63] Sunazuka, T.; Handa, M.; Nagai, K.; Shirahata, T.; Harigaya, Y.; Otoguro, K.; Kuwajima, I.; Omura, S. *Org Lett*, **2002**, *4*, 367.
- [64] Cole, K. P.; Hsung, R. P.; Yang, X. F. *Tetrahedron Lett*, **2002**, *43*, 3341.
- [65] Cole, K. P.; Hsung, R. P. *Tetrahedron Lett*, **2002**, *43*, 8791.
- [66] Chen, J. W.; Luo, Y. L.; Hwang, M. J.; Peng, F. C.; Ling, K. H. *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 34919.
- [67] Dong, Y.; Zheng, Z.; Zhang, Q.; Zhang, H.; Lu, X.; Shu, W.; Shan, Y.; Ma, Y.; Mo, Y.; He, B. *Zhongguo Kangsheng Zashi*, **2002**, *27*, 260.
- [68] Rao, K. S.; Divakar, S.; Karanth, N. G.; Sattur, A. P. *J Antibiot*, **2001**, *34*, 848.
- [69] Wang, H.; Carlier, P. R.; Ho, W. L.; Wu, D. C.; Lee, N. I. K.; Li, C. P. L.; Pang, Y. P.; Han, Y. F. *NeuroReport*, **1999**, *10*, 789.
- [70] Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M. H.; Hu, M. K. *J Med Chem*, **2002**, *45*, 2277.
- [71] Carlier, P. R.; Chow, E. S. H.; Han, Y.; Liu, J.; El Yazal, J.; Pang, Y. P. *J Med Chem*, **1999**, *42*, 4225.
- [72] Wong, D. M.; Greenblatt, H. M.; Dvir, I.; Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, T. L. *J Am Chem Soc*, **2003**, *125*, 363.
- [73] Mary, A.; Rneko, D. Z.; Guillo, C.; Thid, C. *Bioorg Med Chem*, **1998**, *6*, 1835.
- [74] Camps, P.; Gomez, E.; Munoz-Torero, D.; Badia, A.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J. *J Med Chem*, **2001**, *44*, 4733.
- [75] Youdim, M. B. H.; Weinstock, M. *Cell Mol Neurobiol*, **2002**, *21*, 555.
- [76] Weinstock, M.; Poltyrev, T.; Bejar, C.; Youdim, M. B. H. *Psychopharmacology*, **2002**, *160*, 318.
- [77] Fisher, A. *CNS Drugs*, **1999**, *12*, 197.
- [78] Beach, T. G.; Walker, D. G.; Potter, P. E.; Sue, L. I.; Fisher, A. *Brain Res*, **2001**, *905*, 220.
- [79] Lazareno, S.; Popham, A.; Birdsall, N. J. M. *J Mol Neurosci*, **2002**, *19*, 123.
- [80] Mharzi, M.; Willig, F.; Gieles, C.; Palou, A. M.; Oberlander, C.; Barzaghi, F. *Pharmacol Biochem Be*, **1997**, *564*, 663.
- [81] Messer, W. S. Jr. *J Mol Neurosci*, **2002**, *19*, 187.
- [82] Wienrich, M.; Ceci, A.; Ensinger, H. A.; Gaida, W.; Mondla, K. D.; Osugi, T.; Raschig, A.; Weiser, T. *Drug Develop Res*, **2002**, *56*, 321.
- [83] Fisher, A.; Brandeis, R.; Bai-Nei, R. H. N.; Kliger-Spatz, M.; Natan, N.; Sonego, H.; Marcovitch, I.; Pitel, Z. *J Mol Neurosci*, **2002**, *19*, 145.
- [84] Marol, A. M.; Ngo, J.; Castaner, J. *Drugs Future*, **1997**, *22*, 144.
- [85] Glenner, G. G.; Wong, C. W. *Biochem Biophys Res Commun*, **1984**, *120*, 885.
- [86] Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Mülthaupt, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1985**, *82*, 4245.
- [87] Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Mülthaupt, G.; Beyreuther, K.; Moeller-Hill, B. *Nature*, **1987**, *325*, 733.
- [88] Selkoe, D. J. *Annu Rev Cell Biol*, **1994**, *10*, 373.
- [89] Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T. *J Biochemistry*, **1993**, *32*, 4693.
- [90] Zheng, W. H.; Bastianetto, S.; Mennicken, F.; Ma, W.; Kar, S. *Neuroscience*, **2002**, *115*, 201.
- [91] Behl, C.; Davis, J. B.; Lesley, R.; Schubert, D. *Cell*, **1994**, *77*, 817.
- [92] Fassbender, K.; Simons, M.; Bergmann, C.; Stroick, M.; Lufjohann, D.; Keller, P.; Runz, H.; Kuhl, S.; Bertsch, T.; Von Bergmann, K.; Hennerici, M.; Beyreuther, K.; Hartmann, T. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**, *98*, 5856.
- [93] Wahle, S.; Das, P.; Nyberg, A. C.; McLendon, C.; Sboji, M.; Kawarabayashi, T.; Younkin, L. H.; Younkin, S. G.; Golde, T. E. *Neurobiol Dis*, **2002**, *9*, 11.
- [94] Weggen, S.; Erikson, J. L.; Das, P.; Sagl, S. A.; Wang, R.; Plettrik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Butler, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E. H. *Nature*, **2001**, *414*, 212.
- [95] Avramovich, Y.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 31466.
- [96] Furukawa, K.; Sopher, B. I.; Rydel, R. E.; Begley, J. G.; Pham, D. G.; Martin, G. M.; Fox, M.; Mattson, M. P. *J Neurochem*, **1996**, *67*, 1882.
- [97] Fisher, A.; Michaelson, D. M.; Brandeis, R.; Haring, R.; Chapman, S.; Pitel, Z. *Ann NY Acad Sci*, **2000**, *920*, 315.
- [98] Lahiri, D. K. *Neurobiol Aging*, **2000**, *21*, S274.

- [99] Vassar, R.; Bennett, B.D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E.A.; Denis, P.; Teplow, D.B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loebloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M.A.; Biere, A.L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J.C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. *Science*, 1999, 286, 735.
- [100] Sinha, S.; Anderson, J.P.; Barbour, R.; Basi, G.; Caccavello, R.; Davis, D.; Doan, M.; Dovey, H.F.; Frigon, N.; Hong, J.; Jacobson-Croak, K.; Jewett, N.; Keim, P.; Knops, J.; Lieberburg, I.; Power, M.; Tan, H.; Tatsuno, G.; Tung, J.; Schenk, D.; Seubert, P.; Suomensaar, S.M.; Wang, S.; Walker, D.; John, V. *Nature*, 1999, 402, 537.
- [101] Yan, R.; Bienkowska, M.J.; Shuck, M.E.; Miao, H.; Torg, M.C.; Pauley, A.M.; Brashler, J.R.; Stratman, N.C.; Mathews, W.R.; Buhl, A.E.; Carter, D.B.; Tomasselli, A.G.; Parodi, L.A.; Henrikson, R.L.; Gorney, M.E. *Nature*, 1999, 402, 533.
- [102] Hussain, I.; Powell, D.; Howlett, D.R.; Tew, D.G.; Meek, I.D.; Chapman, C.; Gloger, I.S.; Murphy, K.E.; Southan, C.D.; Ryan, D.M.; Smith, I.S.; Simmons, D.L.; Walsh, F.S.; Dingwall, C.; Christie, G. *Mol. Cell. Neurosci.*, 1999, 14, 419.
- [103] Lin, X.; Koelsch, G.; Wu, S.; Downs, D.; Dashti, A.; Tang, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 1456.
- [104] Ghosh, A.K.; Shin, D.; Downs, D.; Koelsch, G.; Lin, X.; Ermoloff, J.; Tang, J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 3522.
- [105] Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A.K.; Zhang, X.C.; Tang, J. *Science*, 2000, 290, 150.
- [106] Ghosh, A.K.; Bileer, G.; Harwood, C.; Kawahama, R.; Shin, D.; Hussain, K.A.; Hong, L.; Loy, J.A.; Nguyen, C.; Koelsch, G.; Ermoloff, J.; Tang, J. *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 2865.
- [107] Hong, L.; Turner, R.T.; III; Koelsch, G.; Shin, D.; Ghosh, A.K.; Tang, J. *Biochemistry*, 2002, 41, 10563.
- [108] Boyd, T.G.; Singleton, D.H. *Eur. Pat. Appl.*, EP 1233021 (2002).
- [109] Beck, J.P.; Gallunas, A.; Hom, R.; Jagodzinska, B.; John, V.; Maillard, M. *PCT Int. Appl.*, WO 02/02520.
- [110] Miyamoto, M.; Matsui, J.; Fukumoto, H.; Tsui, N. *PCT Int. Appl.*, WO 01/87293 (2001).
- [111] Steinhlil, M.L.; Turner, R.S.; Gaut, J.R. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 4476.
- [112] Esler, W.P.; Kimberly, W.J.; Ostaszewski, B.L.; Ye, W.; Diehl, T.S.; Selkoe, D.J.; Wolfe, M.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 2720.
- [113] Wolfe, M.S.; Angeles, J.D.L.; Miller, D.; Xia, W.; Selkoe, D.J. *Biochemistry*, 1999, 38, 11223.
- [114] Campbell, W.A.; Iskandar, M.K.; Reed, M.L.O.; Xia, W. *Biochemistry*, 2002, 41, 3372.
- [115] Leissring, M.A.; Murphy, M.P.; Mead, I.R.; Akbari, Y.; Sugarman, M.C.; Jannatipour, M.; Anliker, B.; Muller, U.; Saltig, P.; De Strooper, B.; Wolfe, M.S.; Golde, T.E.; LaFerla, F.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 4697.
- [116] Tischer, E.; Cordell, B. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 21914.
- [117] Tsai, J.Y.; Wolfe, M.S.; Xia, W. *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 1087.
- [118] Yamazaki, T.; Haass, C.; Saido, Takaomi, C.; Omura, S.; Ihara, Y. *Biochemistry*, 1997, 36, 8377.
- [119] Steinhlil, M.L.; Turner, R.S.; Gaut, J.R. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 4476.
- [120] Higaki, J.; Chakravarty, S.; Bryant, C.M.; Lisa, R.C.; Harden, P.; Scardina, J.M.; Muvunkel, B.; Lucifke, G.R.; Cordell, B. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3889.
- [121] Wolfe, M.S.; Citron, M.; Diehl, I.S.; Xia, W.; Donkor, I.O.; Selkoe, D.J. *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 6.
- [122] Seifert, D.; Bradley, J.D.; Rominger, C.M.; Rominger, D.H.; Yang, F.; Meredith, J.E.; Wang, Q.; Roach, A.H.; Thompson, L.A.; Spitz, S.M.; Higaki, J.N.; Prakash, S.R.; Combs, A.P.; Copeland, R.A.; Arneric, S.P.; Hartig, P.R.; Robertson, D.W.; Cordell, B.; Stern, A.M.; Olson, R.E.; Zaczek, R. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 34086.
- [123] Olson, R.E.; Liu, H.; Thompson, L.A., III. *US. Pat. Appl. Publ.* US 2002052360 (2002).
- [124] Shearman, M.S.; Behr, D.; Clarke, E.E.; Lewis, H.D.; Harrison, T.; Hunt, P.; Nadin, A.; Smith, A.L.; Stevenson, G.; Castro, J.L. *Biochemistry*, 2000, 39, 8698.
- [125] Behr, D.; Wrigley, J.D.; Nadin, A.; Evin, G.; Masters, C.L.; Harrison, T.; Castro, J.L.; Shearman, M.S. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 45394.
- [126] Rishton, G.M.; Retz, D.M.; Tempest, P.A.; Novotny, J.; Kahn, S.; Treanor, J.I.S.; Lile, J.D.; Citron, M. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 2297.
- [127] Petit, A.; Bihel, F.; Alves da Costa, C.; Pourquie, O.; Checler, F.; Kraus, J.L. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, 507.
- [128] Esler, W.P.; Das, C.; Campbell, W.A.; Kimberly, W.J.; Kornilova, A.Y.; Diehl, T.S.; Ye, W.; Ostaszewski, B.L.; Xia, W.; Selkoe, D.J.; Wolfe, M.S. *Nat. Cell Biol.*, 2002, 4, E110.
- [129] Tjernberg, L.O.; Naeslund, I.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlstrom, A.R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 8545.
- [130] Soto, C.; Sturgis, E.M.; Morelli, L.; Kumar, R.A.; Castano, E.M.; Frangione, B. *Nat. Med.*, 1998, 4, 822.
- [131] LeVine, H. *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 1121.
- [132] Parker, M.H.; Chen, R.; Conway, K.A.; Lee, D.H.S.; Luo, C.; Boyd, R.F.; Nortey, S.O.; Ross, T.M.; Scott, M.K.; Reitz, A.B. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 3565.
- [133] Augelli-Szafran, C.E.; Lai, Y.; Sakrab, A.T.; Walker, L.C. *PCT Int. Appl.*, WO 00796969 (2000).
- [134] Augelli-Szafran, C.E.; Barvian, M.R.; Bigge, C.F.; Glase, S.A.; Hachiya, S.; Keily, J.S.; Kimura, T.; Lai, Y.; Sakrab, A.T.; Suto, M.J.; Walker, L.C.; Yasunaga, T.; Zhuang, N. *PCT Int. Appl.*, WO 0076489 (2000).
- [135] Augelli-Szafran, C.E.; Glase, S.A.; Purchase, I.S. *PCT Int. Appl.*, WO 0076988 (2000).
- [136] Allsop, D.; Gibson, G.; Martin, I.K.; Moore, S.; Turnbull, S.; Twyman, L.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 255.
- [137] Forloni, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M. *FEBS Lett.*, 2001, 487, 404.
- [138] Beudheim, P.E.; Poegecler, B.; Neria, E.; Ziv, V.; Pappola, M.A.; Chain, D.G. *J. Mol. Neurosci.*, 2002, 19, 213.
- [139] Cherny, R.A.; Atwood, C.S.; Xilinas, M.E.; Gray, D.N.; Jones, W.D.; McLean, C.A.; Barnham, K.J.; Volitakis, I.; Fraser, F.W.; Kim, Y.S.; Huang, X.; Goldstein, L.E.; Moir, R.D.; Lim, J.T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R.E.; Masters, C.L.; Bush, A.I. *Neuron*, 2001, 30, 665.
- [140] Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. *Nature*, 1999, 400, 173.
- [141] Cheek, E. *Nature*, 2002, 415, 462.
- [142] McLaurin, J.; Cecal, R.; Kierstead, M.E.; Tian, X.; Phinney, A.L.; Manea, M.; French, J.E.; Lambermon, M.H.L.; Darabie, A.A.; Brown, M.E.; Janus, C.; Chishti, M.A.; Horne, P.; Westaway, D.; Fraser, P.E.; Mount, H.I.J.; Przybylski, M.; St. George-Hyslop, P. *Nat. Med.*, 2002, 8, 1263.
- [143] Bachmann, M.F. *Trends Immunol.*, 2002, 23, 569.
- [144] Cleveland, D.W.; Hwo, S.Y.; Kirschner, M.W. *J. Mol. Biol.*, 1977, 116, 207.
- [145] Cleveland, D.W.; Hwo, S.Y.; Kirschner, M.W. *J. Mol. Biol.*, 1977, 116, 227.
- [146] Braak, H.; Braak, E. *Acta Neuropathol.*, 1991, 82, 239.
- [147] Delacourte, A.; David, J.P.; Sergeant, N.; Buee, L.; Watiez, A.; Vermeiren, P.; Ghazal, F.; Falte-Bianco, C.; Pasquier, F.; Lebert, F.; Petit, H.; Menza, G.D. *Neurology*, 1999, 52, 1158.
- [148] Gong, C.X.; Lidsky, T.; Wegiel, J.; Zuck, L.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 5535.
- [149] Liu, F.; Zaidi, T.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Merkle, R.K.; Gong, C.X. *FEBS Letters*, 2002, 512, 101.
- [150] Abroha, A.; Ghoshal, N.; Gambin, T.C.; Cryns, V.; Berry, R.W.; Kuret, J.; Binder, L.I. *J. Cell Sci.*, 2000, 113, 3737.
- [151] Patrick, G.N.; Zukerberg, L.; Nikolic, M.; De La Monte, S.; Dikkes, P.; Tsai, L.H. *Nature*, 1999, 402, 615.
- [152] Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R.; Marko, D.; Bibb, J.A.; Snyder, G.L.; Greengard, P.; Biernat, J.; Wu, Y.Z.; Mandelkow, E.M.; Eisenbrand, G.; Meijer, I. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 251.
- [153] Maccioni, R.B.; Orth, C.; Concha, I.; Munoz, J.P. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, 1518.
- [154] de Azevedo, W.F.; Gaspar, R.T.; Canduri, F.; Camera, J.C.; da Siveira, N.J.F. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002, 297, 1154.
- [155] Leost, M.; Schultz, C.; Link, A.; Wu, Y.Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.M.; Bibb, J.A.; Snyder, G.L.; Greengard, P.; Zarewicz, D.W.; Gussio, R.; Sendenowicz, A.M.; Sausville, E.A.; Kunick, C.; Meijer, I. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 593.
- [156] Schultz, C.; Link, A.; Leost, M.; Zarewicz, D.W.; Gussio, R.; Sausville, E.A.; Meijer, I.; Kunick, C. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2909.

- [157] Planel E; Sun X; Takashima A *Drug Develop Res*, **2002**, 56, 491.
- [158] Klein, P.S.; Melton, D.A. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, 93, 8455.
- [159] Sun, X.; Sato, S.; Murayama, O.; Murayama, M.; Park, J.-M.; Yamaguchi, H.; Takashima, A. *Neurosci Lett*, **2002**, 321, 61.
- [160] Gong, L.; Grupe, A.; Peltz, G.A. *PCT Int Appl*. WO 02/10158 (2002).
- [161] Kuo, G.H.; Prouty, C.; Deangelis, A.; Zhang, H.C. *PCT Int Appl*. WO 02/46197 (2002).
- [162] Martinez, A.; Alonso, M.; Castro, A.; Perez, C.; Moreno, F.J. *J Med Chem*, **2002**, 45, 1292.
- [163] Bebbington, D.; Knechtel, R.; Birch, H.; Golec, J.M.C.; Li, P.; Charrier, J.D. *PCT Int Appl*. WO 02/22602 (2002).
- [164] Markeshory, *Free Rad Biol Med*, **1997**, 23, 134.
- [165] Butterfield, D.A.; Drake, J.; Pocernich, C.; Castegna, A. *Trends in Molecular Medicine*, **2001**, 7, 548.
- [166] Cash, A.D.; Perry, G.; Smith, M.A. *Curr Med Chem*, **2002**, 9, 1605.
- [167] Behl, C.; Moosmann, B. *Biol. Chem.*, **2002**, 383, 521.
- [168] Moosmann, B.; Skutella, T.; Bever, K.; Behl, C. *Biol Chem*, **2001**, 382, 1601.
- [169] Behl, C.; Skutella, T.; Lezoualc'h, F.; Post, A.; Widmann, M.; Newton, C.J.; Holsboer, F. *Mol Pharm*, **1997**, 51, 535.
- [170] Allison, C.; Cacabelos, R.; Lombardi, V.R.M.; Alvarez, X.A.; Vigo, C. *Prog Neuro-Psychoph*, **2001**, 25, 1341.
- [171] Yan, J.J.; Cho, J.Y.; Kim, H.S.; Kim, K.I.; Jang, J.S.; Huh, S.O.; Suh, H.W.; Kim, Y.H.; Song, D.K. *Brit J Pharmacol*, **2001**, 133, 89.
- [172] Kanski, J. *Nutr Biochemistry*, **2002**, 13, 273.
- [173] Sharma, M.; Gupta, Y.K. *Life Sci*, **2002**, 71, 2489.
- [174] Park, S.Y.; Kim, D.S.H.L. *J Nat Prod*, **2002**, 65, 1227.
- [175] Rice-Evans, C. *Curr Med Chem*, **2001**, 8, 797.
- [176] Choi, Y.T.; Jung, C.H.; Lee, S.R.; Bae, J.H.; Baek, W.K.; Suh, M.H.; Park, I.; Park, C.W.; Suh, S.I. *Life Sci*, **2001**, 70, 603.
- [177] Sano, M.; Ernesto, C.; Thomas, R.G.; Klauber, M.R.; Schafer, K.; Grundman, M.; Woodbury, P.; Growdon, J.; Cotman, C.W.; Pfeiffer, E.; Schneider, L.S.; Thal, L.J. *N Engl J Med*, **1997**, 336, 1216.
- [178] Kanski, J.; Drake, J.; Aksenova, M.; Engman, L.; Butterfield, D.A. *Brain Res*, **2001**, 911, 12.
- [179] Floyd, R.A.; Kenneth, H.; Forster, M.J.; Kelleher-Anderson, J.A.; Wood, P.L. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, **2002**, 959, 321.
- [180] Gutzmann, H.; Kuhl, K.P.; Hadler, D.; Rapp, M.A. *Pharmacopsychiatry*, **2002**, 35, 12.
- [181] Crapper McLachlan, D.R.; Dalton, A.J.; Kruck, I.P.A.; Bell, M.Y.; Smith, W.L.; Kalow, W. Andrews, D.F. *Lancet*, **1991**, 337, 1304.
- [182] Bush, A.I. *Neurobiol aging*, **2002**, 23, 1031.
- [183] Pettigrew, J.W.; McClure, R.J. *Expert Review of Neurotherapeutics*, **2002**, 2, 647.
- [184] Hager, K.; Marahrens, A.; Kenkies, M.; Riederer, P.; Münch, G. *Arch Gerontol Geriatr*, **2001**, 32, 275.
- [185] Butterfield, D.A.; Pocernich, C.V.; Drake, J. *Drug Develop Res*, **2002**, 56, 428.
- [186] Turini, M.E.; DuBois, R.N. *Annu. Rev. Med.*, **2002**, 53, 35.
- [187] Supuran, C.T.; Scozzafava, A. *Expert Opin Ther Patents*, **2002**, 12, 217.
- [188] Sun, M.K.; Alkon, D.L. *Trends in Pharmacol Sci.*, **2002**, 23, 83.
- [189] Sun, M.K.; Alkon, D.L. *J Pharm. Exp Ther*, **2001**, 297, 961.
- [190] Supuran, C.T.; Scozzafava, A. In *The Carbonic Anhydrases – New horizons*. Chagwidden W.R., Carter N., Edwards Y., Birkhauser Verlag, Basel, **2000**, pp. 197-219.
- [191] Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Eur J Pharm Sci*, **2000**, 10, 29.
- [192] Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 31.
- [193] Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *J Med Chem*, **2002**, 45, 284.
- [194] Ilies, M.; Banciu, M.D.; Ilies, M.A.; Scozzafava, A.; Capriou, M.T.; Supuran, C.T. *J Med Chem*, **2002**, 45, 504.
- [195] Bleakman, B.; Lodge, D. *Neuropharmacology*, **1998**, 37, 1187.
- [196] Graindorge, E.; Francotte, P.; Boverie, S.; Lestage, P.; de Tullio, P.; Pirote, B. *Curr Med Chem CNS*, **2004** in preparation.
- [197] Pirote, B.; Podona, T.; Diouf, O.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Dupont, L.; Sommeis, F.; Delarge, J.; Morain, P.; Lestage, P.; Lepagnol, J.; Spedding, M. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2946.
- [198] Pirote, B.; de Tullio, P.; Boverie, S.; Kempen, I.; Lestage, P. *PCT Int Appl*, WO 01/40210 (2001).
- [199] Phillips, D.; Sonnenberg, J.; Arai, A.; Vaswani, R.; Kützik, P.O.; Keisli, T.; Kessler, M.; Granger, R.; Lynch, G.; Chamberlin, A.R.; *Bioorg Med. Chem*, **2002**, 10, 1229.
- [200] Arai, A.C.; Xia, Y.F.; Kessler, M.; Phillips, D.; Chamberlin, R.; Granger, R.; Lynch, G. *Mol. Pharmacol*, **2002**, 62, 566.
- [201] Lestage, P.; Danoh, L.; Lockhart, B.; Roger, A.; Lebrun, C.; Robin, J.L.; Desos, P.; Cordi, A. *Research and Practice in Alzheimer's Disease*, **2002**, 6, 253.
- [202] Ornstein, P.L.; Zimmerman, D.M.; Arnold, M.B.; Bleish, J.; Cantrell, B.; Baker, S.R.; Gates, M.R.; Tizzano, J.P.; Bleakman, D. *J. Med Chem*, **2000**, 43, 4354.
- [203] Kimball, J.R.; Johnson, J.A.; Griffey, K.L.; Ornstein, P.L.; Zimmerman, D.M.; Zarinnayeh, H.; Schoepp, D.D.; Tizzano, J.P. *Society for Neuroscience Abstracts*, **2000**, 26, 528.
- [204] Shepherd, T.A.; Atkins, J.A.; Bleakman, D.; Cantrell, B.E.; Rearick, J.P.; Simon, R.L.; Smith, E.C.R.; Stephenson, G.A.; Zimmerman, D.M. *J Med Chem*, **2002**, 45, 2101.
- [205] Sekiguchi, M.; Fleck, M.W.; Mayer, M.L.; Takeo, J.; Chiba, Y.; Yamashita, S.; Wada, K. *J Neurosci*, **1997**, 17, 5760.
- [206] Kemp, J.A.; McKernan, R.M. *Nat. Neurosci*, **2002**, 5, 1039.
- [207] Laake, K.; Oeksengaard, A.R. *Cochrane Database Syst Rev*, **2002**, 2, CD003153.
- [208] Wolozin, B.; Kellman, W.; Rousseau, P.; Clesia, G.G.; Siegel, G. *Arch Neurol*, **2000**, 57, 1439.

Annexe 9

New Trends in the Development of Positive Allosteric Modulators of AMPA Receptors

E. Graindorge¹, P. Francotte¹, S. Boverie¹, P. de Tullio¹ and B. Pirotte^{1,*}

¹Natural and Synthetic Drugs Research Center, Dept. of Medicinal Chemistry, University of Liège, Av. de l'hôpital, 4000 Liège, Belgium

Abstract: The 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propanoic acid (AMPA) receptors, a subtype of glutamate receptors, are involved in important neuronal functions such as long-term memory. A decrease of the number and activity of these receptors seems to play a role in schizophrenia and in the impairment of cognitive function associated to Alzheimer's disease. Therefore, research has been focused on the development of drugs acting on those receptors, in particular of AMPA receptors positive allosteric modulators. Although agonists have an intrinsic activity, allosteric modulators need the release of glutamate to be active. Therefore, these drugs are expected to exhibit a decreasing risk of toxicity compared to pure agonists.

In this article, we review the recent advances in the design of positive allosteric modulators of AMPA receptors.

1) INTRODUCTION

Glutamate receptors play a major role in the central nervous system (CNS); these receptors are coupled to GTP binding proteins (metabotropic receptors) or to an ion channel (ionotropic receptors). The ionotropic receptors can be subdivided into three classes: *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionate (AMPA) and kainate (KA) receptors.

Like other ligand-gated ion channels, the RNA editing, the alternative splicing, and the presence of allosteric modulator sites can affect functions of glutamate receptors [1, 2, 3]. Native AMPA receptors are likely constituted as heterooligomers, composed of one or more of the receptors subunits GluR1, GluR2, GluR3 and GluR4, whereas kainate receptors are constructed from GluR5-7 in combination with KA1 and KA2 subunits [1]. Each subunit exists in flip and flop isoforms generated by alternative splicing [4]. Projection neurons preferentially express flip variants, while interneurons and hippocampal CA1 pyramidal cells express predominantly flop variants [5]. The configuration of the receptors determines their functional properties [6] and diversifies the kinetics and time course of AMPA receptor-mediated synaptic responses [7]. Recombinant expression studies demonstrate that on heteromeric receptors the low Ca^{2+} permeability property could be linked to the GluR2 subunit. On the other hand, homomeric and heteromeric receptors assembled from the GluR1, R3, and R4 are significantly permeable to Ca^{2+} [1, 8].

AMPA and KA receptors mediate rapid excitatory transmission in the CNS while NMDA receptors have a slow rise time [4].

High densities of AMPA receptors are present in the hippocampus, septum, cerebral cortical areas and striatum [9].

In addition to the classical competitive site of AMPA receptor for glutamate, there are non-competitive sites where positive and negative allosteric modulators can attach [10, 11]. It seems that the action of positive allosteric modulators is to reduce receptor desensitisation. This process appears during continued or repeated application of the agonist and led to a decrease of the receptor's functionality for a certain time period [12]. Positive allosteric modulators of the AMPA receptors, by reducing the desensitisation, increase the current induced by the agonist (glutamate) (Fig. 5). Allosteric modulators have no effects without agonist.

Whereas an over-activation of glutamate receptors by the excitatory amino acid leads to neurodegeneration associated with a variety of acute and chronic disorders (like stroke, epilepsy, Parkinson's disease), a reduction of AMPA receptors functions seems to play a role in the learning and memory deficits observed in Alzheimer's disease [13].

The glutamate hypothesis of schizophrenia suggests that the use of positive allosteric modulators of AMPA receptors should be interesting for thwarting the reduced glutamate receptor activation, which represents one of the components contributing to psychotic symptoms [14].

Moreover glutamate receptors are also implicated in pain and anxiety [15,16].

Before the presentation of the last developments in the field of positive allosteric modulators of AMPA receptors, a brief description of the other classes of AMPA modulators is reported.

AMPA receptor agonists should be beneficial in diseases where the functions of AMPA receptors are low. Studies have established the following rank order for the affinity of various AMPA receptor ligands: quisqualate (1) > AMPA

*Address correspondence to this author at the Natural and Synthetic Drugs Research Center, Dept. of Medicinal Chemistry, University of Liège, Av. de l'hôpital, 4000 Liège, Belgium; Tel: +32-436-643-65; Fax: +32-436-643-62; Email: B.Pirotte@ulg.ac.be

(2) > glutamate (3) > kainate (4). One of the most important families of synthetic agonists is belonging to the willardiine series, which comprises peptidomimetic compounds

The nature of the halogen atom in the 5-position of willardiine will determine the selectivity of the molecule (S)-5-iodowillardiine appears to be highly selective for kainate receptor although (S)-5-fluorowillardiine (5) is highly AMPA receptor selective [17].

Unfortunately, the control of the current induced by the AMPA receptor agonists seems to be very difficult and the use of this therapeutic class was generally linked to excitotoxicity or negative side effects. Thus, drugs acting as AMPA receptor agonists seem to be dedicated only to biological studies of native AMPA receptors [18, 19].

AMPA receptors rapidly mediate desensitising responses to agonists; the rate of desensitising may change in function of the different subunits. Studies have determined that GluR3 desensitises threefold faster than GluR1 [20]. Consequently, there is a great interest in the development of novel compounds interacting selectively with a specific AMPA receptor subunit. In this way, (S)-CPW399 (6) was synthesised and tested *in vitro* exhibiting good subtype selectivity for GluR2 and GluR3 [21]. This compound should be a useful tool for investigating the molecular mechanisms of desensitisation and neurotoxicity of AMPA receptors subunits, leading to a new class of agonists.

AMPA receptor antagonists are potentially useful for the prevention and the treatment of a broad range of acute and chronic neurological disorders [22]. They may be used to reduce neurodegeneration due to excitation of glutamate receptors by the endogenous agonist [23]. Other biological effects of these compounds have been reported such as a neuroprotective action against ischaemia [24, 25], an anti-Parkinson activity [26, 27] and an anticonvulsant activity in various experimental models of epilepsy.

NBQX (7) and its analogues were presented as the first generation of AMPA receptor antagonists. Unfortunately this class of compounds showed a low selectivity for AMPA

versus kainate receptors. More selective compounds have been found with tetrazole-substituted decahydroisoquinolines such as LY293558 (8). The latter was notably tested as an analgesic, with encouraging results [15].

NBQX and its derivatives were tested *in vivo* and *in vitro* as antiepileptics [28, 29, 30]. Lastly, AMP 397 (9) was studied as the first competitive AMPA receptor antagonist with high receptor affinity, good *in vivo* potency and oral bioavailability [31].

Baeckstroem *et al* have suggested that AMPA receptors are involved in mediation of cocaine-seeking behaviour. This study was conducted with the AMPA receptor antagonist CNQX, another analogue of NBQX [32].

AMPA receptors antagonists could also be used as neuroprotectants for cerebral ischaemia. Recently, compound SPD 502 (10) was shown to reduce axonal damage by 45% [33]. Another recent molecule presented as an AMPA antagonist was RPR 117824 (11), which appeared to be active as anticonvulsant and neuroprotectant [34].

The 2,3-benzodiazepines are the main family of negative allosteric modulators of AMPA receptors. The most studied molecule is GYKI 52466 (12). This compound has generally the same use as competitive antagonists and they are often simply referred as antagonists. For example, compounds like GYKI 52466, CFM-1 (13) and CFM-2 (14) could be used for epilepsy [35, 36].

Talampanel (15) (LY300164) was also presented as a negative allosteric modulator and was studied as an antiepileptic drug in human. This study examined the single- and multiple-dose pharmacokinetics, safety and tolerability of Talampanel in patients with intractable epilepsy and assessed the potential for pharmacokinetic interaction [37].

II) POSITIVE ALLOSTERIC MODULATORS

We've seen in the last chapter that activation of AMPA receptors through an agonist ligand could imply neurotoxicity. Positive allosteric modulators have no intrinsic effects. Consequently, they allow a better control of

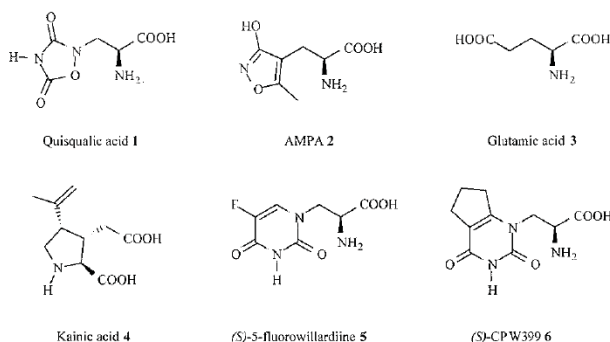


Fig. (1). AMPA receptor agonists

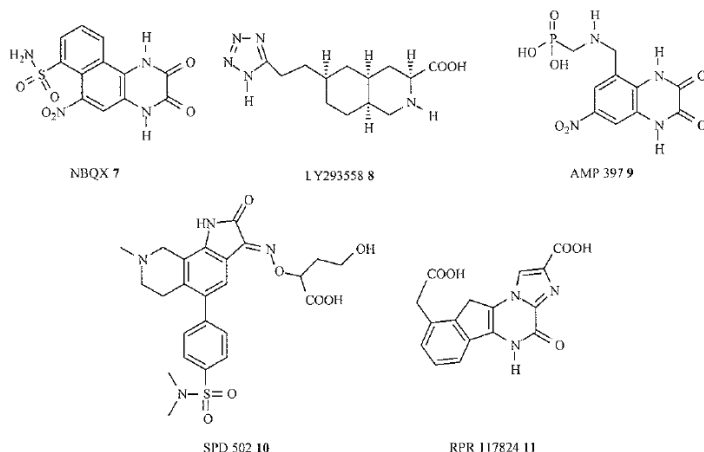


Fig (2). AMPA receptors antagonists

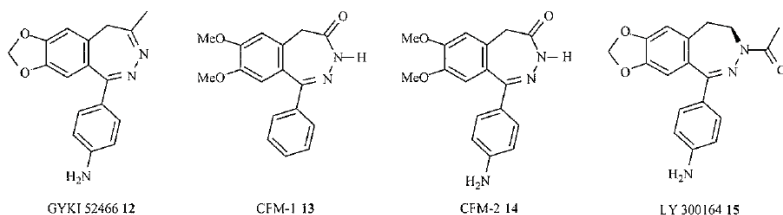


Fig (3). Negative allosteric modulators of AMPA receptors

the AMPA current release and therefore decrease the risk of neurodegeneration

AMPA receptors are mainly involved in long-term memory, and a decrease of the function of these receptors seems to play a role in impairment of cognitive function associated to the age or to Alzheimer's disease. Positive allosteric modulation shows beneficial effect on this type of disorder. Several series of drugs are presented to act as positive allosteric modulators. Among those, the 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide family with cyclothiazide (16), diazoxide (17) and IDRA-21 (18) appears to be one of the most important

The action of diazoxide on AMPA receptors was discovered while its known action of activating ATP-sensitive potassium channels was being studied. Other benzothiadiazine dioxides were evaluated such as cyclothiazide initially used as a diuretic [38]

IDRA-21 has been reported to enhance synaptic transmission and to be effective in behavioural tests, but typically requires threshold concentrations of at least 100 μ M to be active *in vitro*.

Aniracetam (19) and derivatives were also identified as positive allosteric modulators of AMPA receptors. However, kinetic studies have demonstrated that this family of compounds acts through different mechanisms than that of benzothiadiazine dioxides: aniracetam modulates desensitization of the receptor as a consequence of slowing channel closing, whereas, cyclothiazide has two effects, firstly, it modulates desensitization by stabilising the non-desensitized agonist-bound closed state and secondly, it increases the glutamate affinity of the receptor [39] (fig 5)

These mechanistic differences between the two classes of compounds suggest that they act at different allosteric modulatory sites on AMPA receptors. Moreover, other

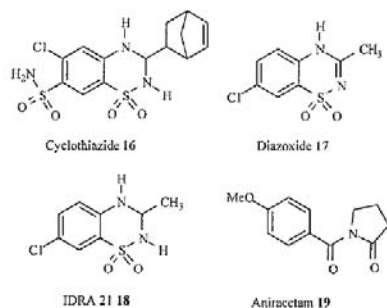


Fig. (4). Positive allosteric modulators of AMPA receptors

studies have shown that cyclothiazide antagonised the effect of GYKI 52466 [40-42]

Table 1 reports the EC_{2x} [concentration of drugs which increases twofold the AMPA (30 μM) current] and EC_{5x} [concentration of drugs which increases fivefold the AMPA (30 μM) current] for the most important AMPA allosteric modulators tested on AMPA receptors expressed in *Xenopus* oocytes [43]

Table 1. EC_{2x} and EC_{5x} of the Most Important AMPA Allosteric Modulators. Pirrotte *et al.* [43]

	EC _{2x} (μM)	EC _{5x} (μM)
Cyclothiazide	1.6 ± 0.3	9.8 ± 1.9
Diazoxide	448 ± 76	>1000
Aniracetam	1440 ± 180	>3000

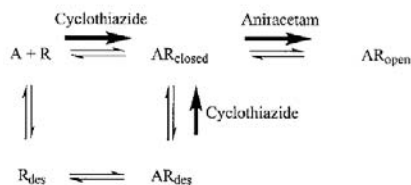


Fig. (5). Simplified kinetic scheme indicating the mechanism of action of cyclothiazide and aniracetam. R = receptor; A = agonist, des = desensitised (Modified from Yamada [38])

a) Benzothiadiazine and Analogues

Pirrotte *et al.* have studied pyridothiadiazine dioxides (20) structurally related to benzothiadiazine dioxides such as IDRA 21 [43, 44]. The authors examined the effect of the

position of the nitrogen atom in the pyridine ring as well as the influence of the nature and the size of different alkyl or aryl side chains in the 2-, 3-, and 4-positions of the heterocycle. The most potent compound, tested on AMPA receptors expressed in *Xenopus* oocytes (male Wistar rats cerebral cortex mRNA-injected *Xenopus* oocytes) was 4-ethyl-2,3-dihydro-4H-pyrido[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide (21) which exhibited an EC_{2x} of 8.8 μM [43].

Further studies were conducted with new series of pyrido- and benzothiadiazine dioxides among which compounds 22 and 23 were identified as strong potentiators of AMPA receptors [44]. Those compounds confirmed that the structural requirements leading to optimal activity were the following: a) an hydrogen atom or a methyl group in the 2-position; b) an hydrogen atom or a methyl group in the 3-position; c) a short alkyl chain in the 4-position i.e. an ethyl group; d) saturation of positions 2,3 [43].

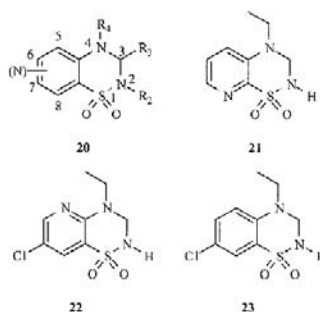


Fig. (6). Skeleton of pyridothiadiazine dioxides and examples of pyrido- and benzothiadiazine dioxides

Phillips *et al.* [45] have conducted another study on benzothiadiazine dioxide structure using an indexed combinatorial library approach to obtain 64 compounds for whose the activity was compared with that of IDRA 21 to find a target compound

Out of this study, compound 24 was selected as a promising drug. It enhanced [³H]AMPA binding with an EC₅₀ of 17 μM (Binding of 50 nM [³H]AMPA to rat brain membranes)

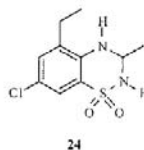


Fig. (7). Structure of 24

Arai *et al.* [46] have examined analogues of **24** and concluded that; a) an alkyl group at the 5-position greatly potentiated drug-receptor interaction; b) **24** and cyclothiazide differed radically in their effect on AMPA receptor kinetics despite of many commonalities in structure, potency and subunits preferences; c) the length of the 5-substituent not only controlled potency but also the manner in which the compounds affected the waveform of synaptic responses.

Substitution in the 3-position of the thiadiazine ring was also investigated by Braghieri *et al.* [47]. The authors synthesised and evaluated the new molecules by measuring the variation of kainate-evoked currents on primary cultures of cerebral granule neurons. The variation of the substituent in this position appeared to change the pharmacological activity of the molecule, which in some cases became a negative modulator of KA-activated currents. For example, compound **25** with a short substituent acted as a positive allosteric modulator although compound **26** with a para hydroxyphenyl group acted as a negative allosteric modulator.

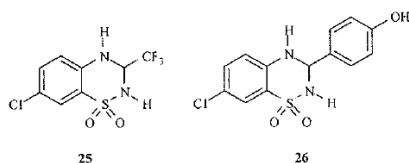


Fig. (8). Structure of compounds 25-26

Studies have demonstrated that the AMPA receptors display stereoselectivity in their interaction with the ligand. For IDRA 21, only the (+) isomer was found to be active [48]. For cyclothiazide, the most active isomer is five times more potent than the racemic cyclothiazide in potentiating AMPA transmission in rat cortex mRNA injected *Xenopus* oocytes [49].

IDRA 21 tested *in vivo* seemed to improve cognition, as revealed by its ability to enhance performance in water maze and passive avoidance tests in rats. Such effects were expected to be the result of an action of IDRA 21 on a stereoselective site of AMPA receptors [48].

Taking into account these informations, S18986 (**27**) was synthesised [50]. The (*S*) compound was found to be a potent and selective AMPA positive allosteric modulator ($EC_{2x} = 35 \mu\text{M}$; tested in mRNA injected *Xenopus* oocytes) whereas the (*R*) compound was less active ($EC_{2x} = 300 \mu\text{M}$)

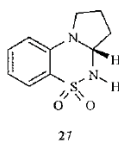


Fig. (9) Structure of S18986

This molecule, investigated *in vitro* as a positive modulator of AMPA receptors, was found to enhance (S)-AMPA-mediated [^3H]noradrenaline release from rat hippocampal and frontal cortex slices [51].

b) Biarylpropylsulfonamides

Ornstein *et al.* have worked on a series of biarylpropylsulfonamides [52] and identified a novel AMPA receptor potentiator (**28**). A SAR study was conducted in order to increase the AMPA potentiator effect of this compound. Fig. 10 illustrates the best molecules obtained in this series.

These new derivatives (**28-31**) were evaluated for their ability to potentiate responses mediated by $100 \mu\text{M}$ L-glutamate in HEK-293 cells expressing iGluR4 flip. The activities of the tested drugs at various concentrations were expressed as a percentage of responses evoked by $100 \mu\text{M}$ cyclothiazide, and EC_{50} values were calculated (Table 2) [53].

Table 2. EC_{50} of **28-31**

Compounds	$EC_{50} \pm \text{SEM}(\mu\text{M})$
Cyclothiazide	$3,8 \pm 0,4$
28	$4,4 \pm 0,6$
29	$0,66 \pm 0,16$
30	$1,2 \pm 0,4$
31	$0,13 \pm 0,017$

Other structural modifications led to the development of a new molecule exhibiting a very interesting pharmacological profile (**32**) and that could be used as radioligand ([^3H]**32**) [54]. Compound **32** was found to be more active than cyclothiazide in potentiation of AMPA receptor-mediated inward currents in acutely isolated cerebellar Purkinje neurons. It was hypothesized that the maximal responses produced by compound **32** can represent activation of a specific receptor subpopulation insensitive to cyclothiazide in addition to possible differences in intrinsic efficacy between these compounds [53].

To further define the structural requirements responsible for activity in this series, ring-constrained arylalkyl-sulfonamide compounds characterised by the presence of two stereogenic centres were prepared [54]. It was found that the potentiating activity of the drugs was highly dependent of the stereochemistry at the 2-position of the disubstituted cyclopentane ring and was independent of the relative stereochemistry at the 1-position. The *R,R*-derivative **33** represents a potent, novel potentiator of iGluR4 flip receptors with an $EC_{50} = 22,6 \text{ nM}$ in the HEK-293 cells expressing iGluR4 flip model (see above) [54].

Baumbarger *et al.* have investigated the ability of LY392098 (**28**) to potentiate AMPA receptor-mediated currents of neurons in the prefrontal cortex [55]. The drug exhibited an EC_{50} value (concentration equal to 50% of the

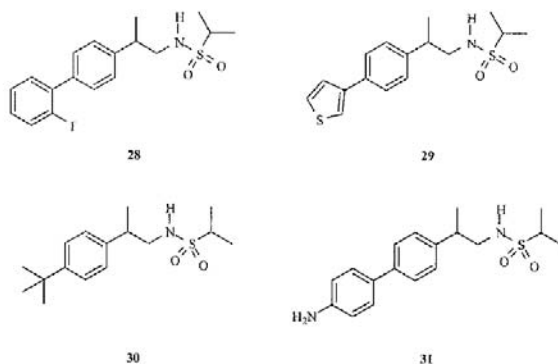


Fig. (10). Structure of compounds 28-31

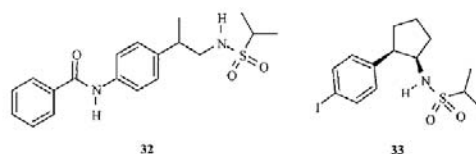


Fig. (11). Structure of compounds 32 and 33

maximally effective concentration) of $1.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ and a maximal potentiation of a 31.0 ± 4.1 -fold increase relative to current evoked by AMPA alone. *In vivo* studies have demonstrated that LY392098 (28) is an orally active novel AMPA receptor potentiator that enhances spatial and memory performance in rats [56] and also reverses both pharmacologically and age-associated learning and memory deficits in rats [57].

c) Aniracetam and Derivatives

Aniracetam is known to be a weak AMPA receptor modulator, requiring high concentrations ($\pm 1 \text{ mM}$) to significantly increase AMPA currents *in vitro*. Structurally related compounds have been synthesised. This class of compounds includes benzoylpiperidine and benzoylpyrrolidine structures and are often referred as Ampakines.

Another interest of several drugs belonging to the benzoylpiperidine series (e.g., CX516 (34) or 1-BCP (35)) is that they are not metabolised into an inactive form like aniracetam and are able to enter the CNS as the active form [58]. These compounds were widely tested *in vivo* in animal models and were found to improve performance on a variety of memory tasks.

Nagarajan *et al.* [59] have studied the mechanism of actions and the impact of the allosteric AMPA receptor modulation by CX546 (36) on gating kinetics of recombinant, native AMPA receptors and on synaptic currents. In presence of CX516 and CX546, desensitisation of GluR2/flip receptors was inhibited more than desensitisation of GluR1/flip ones, whereas they had no effect upon response shape or conductance. CX546 increased agonist affinity threefold on nondesensitising AMPA receptors by slowing agonist unbinding. Analysis of the modulatory action suggested that, in contrast to cyclothiazide

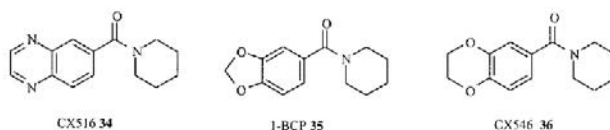


Fig. (12). Structure of CX516, 1-BCP and CX546

or IDRA 21, CX546 bound more specifically to the agonist bound nondesensitised receptor, most likely acting by destabilising the desensitised receptor conformation.

Black *et al.* [60] demonstrated that, in addition to regional variations in the brain (by comparing the effects of different modulators in the hippocampus and the cortex), differences were found in the modulator response dependent upon whether a response is generated endogenously (electrically stimulated response) or exogenously (external application of AMPA). This fact may be explained by a difference in AMPA receptor populations in the different brain regions.

Electrically stimulated EPSPs (excitatory postsynaptic potential) in the hippocampus were augmented by CX516, aniracetam and 1-BCP and not by cyclothiazide [60].

On the other hand, when added simultaneously with AMPA, aniracetam, 1-BCP and CX516 increased the response in the frontal cortex. While in the hippocampus, only aniracetam and cyclothiazide increased the response when simultaneously added with AMPA [60].

In vivo studies have demonstrated that CX516 had positive effects on the memory in aged humans [61]. Furthermore, the drug had no evident influence on heart rate or self-assessment of several psychological variables.

Ingvar *et al.* [62] have also demonstrated the effect of the Ampakine CX516 over the memory in humans. Four tests were used: 1) visual associations, 2) recognition of odours, 3) acquisition of a visuospatial maze and 4) location and identity of playing cards. The drug has shown positive effects on these different memory models.

All these studies suggested that there was not over toxicity such as seizures, tremor, or hyperactivity after i.p. administration of AMPA receptor modulators 1-BCP and CX516 to rodents [57] or after oral administration of CX516 to humans [61,62].

d) Arylsulfonamides

Sekiguchi *et al.* [63] reported a novel sulfonamido compound, 4-[2-(phenylsulfonamino)ethylthio]-2,6-difluorophenoxyacetamide (PEPA) (37), which is structurally distinct from the previously characterised pyrrolidinone or benzothiadiazine compounds typified by aniracetam and cyclothiazide. The action of this molecule was discovered *via* electrophysiological screening of compounds containing a sulfonamido group, using the *Xenopus* oocyte expression system of AMPA receptors and poly (A⁺) mRNA prepared from rat brain [63].

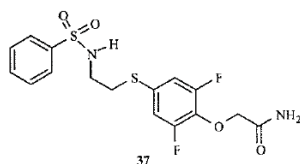


Fig. (13). Structure of PEPA

PEPA preferentially modulated AMPA receptor flop isoforms. At 200 μ M, PEPA potentiated glutamate responses by 50-fold in oocytes expressing GluRClflop (EC_{50} = 50 μ M) versus only threefold for GluRClflip [63].

e) Patents

Several recent patents claim novel compounds as positive allosteric modulators.

New benzothiadiazine dioxides and related isosteres (38) have been claimed by Gouliacov *et al.* [64]. One of the most promising molecules of this series was 3-cyclohexyl-6-methyl-7-morpholinosulfonyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (39), which should be considered as an analogue of cyclothiazide.

Konkoy *et al.* [65] have studied substituted 5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-benzopyrans (40) from which compound (41) increased the maximum potentiation of the AMPA response in *Xenopus* oocytes 11-fold at 100 μ M. Half-maximum potentiation occurred at 16.6 μ M, and a twofold potentiation was elicited at 4 μ M.

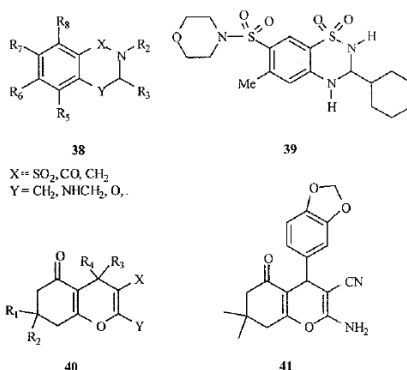


Fig. (14). Related structures in patents

Winter *et al.* [66] have worked on the azaacenaphthylene dioxide series (42). The compounds may be regarded as structural analogues of benzothiadiazine dioxides.

New benzothiadiazine dioxides have been synthesised by Piroette *et al.* [67] (43). Among those, 7-bromo-2,3-dihydro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (44) gave a 5-fold potentiation of AMPA-induced excitatory currents in *Xenopus* oocytes at 78 μ M. Several compounds gave marked improvement in memory of Wistar rats at low doses (object recognition test), e.g., at 0.3 to 3 mg/kg i.p., or 3 to 30 mg/kg orally.

CONCLUSION

Positive allosteric modulators of the AMPA receptors appear to be very promising drugs for the future treatment of

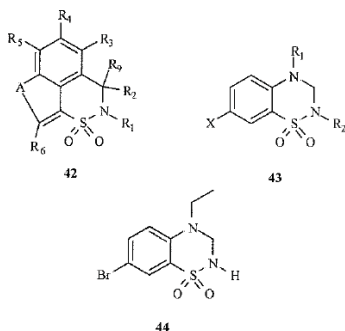


Fig. (15) Structure of compounds 42-44

several CNS diseases. Alzheimer's disease and the ageing of the population show that the trouble of cognition will be a very important problem in this new century. As a result, drugs that can improve memory performance in humans would become an important therapeutic approach of such disorders.

Moreover, *in vivo* studies in animals and in humans suggest that several drugs of this class have beneficial effects at doses lower than those for which toxicity is observed. The therapeutic index of such compounds seems to be acceptable and candidates for clinical trials are now expected in the near future.

REFERENCES

- [1] Benier, B.; Malle, C. *Neuropharmacology*, **1995**, 34(2), 123-139.
- [2] Lees, J. G. *Drugs*, **2000**, 59(1), 33-78.
- [3] Bleakman, B.; Lodge, D. *Neuropharmacology*, **1998**, 37, 1187-1204.
- [4] Sommer, B.; Keinänen, K.; Verdoorn, I.; Wisden, W.; Burnashev, N.; Herb, A.; Köhler, M.; Takagi, T.; Sakmann, B.; Seeburg, P. *Science*, **1990**, 249, 1580-1585.
- [5] Geiger, J. R.; Melcher, T.; Koh, D. S.; Sakmann, B.; Seeburg, P. H.; Jonas, P.; Møyer, H.; *Neuron*, **1995**, 15(1), 193-204.
- [6] Keinänen, K.; Wisden, W.; Sommer, B.; Werner, P.; Herb, A.; Verdoorn, I. A.; Sakmann, B.; Seeburg, P. H. *Science*, **1990**, 249, 556-560.
- [7] Fleck, M. W.; Bähring, R.; Patneau, D. K.; Mayer, M. I. *J Neurophysiol*, **1996**, 75(6), 2322-33.
- [8] Pellegrini-Giampietro, D. E. *Trends in Neurosciences*, **2003**, 26(1), 9-11.
- [9] Stensbol, I. B.; Slok, F. A.; Trometer, J.; Hurt, S.; Ebert, B.; Kjoller, C.; Egebjerg, J.; Madsen, U.; Diemer, N. H.; Krogsgaard-Larsen, P. *Eur J Pharmacol*, **1999**, 373, 251-262.
- [10] Desai, M. A.; Burnett, J. P.; Ornstein, P. I.; Schoep, D. D. *J Pharmacol Exp Ther*, **1995**, 272, 38-43.
- [11] Kessler, M.; Arai, A.; Quan, A.; Lynch, G. *Mol Pharmacol*, **1996**, 49(1), 123-131.
- [12] Robert, A.; Howe, J. R. *J Neurosci*, **2003**, 23(3), 847-858.
- [13] Francotte, P.; Grandoige, E.; Boverie, S.; Lestage, P.; de Tullio, P.; Pirrotte, B. *Curr Med Chem*, **2004**, in press.
- [14] Olney, J. W.; Newcomer, J. W.; Farber, N. B. *J Psychiatr Res*, **1999**, 33, 523-533.
- [15] Sang, C. N.; Hostetter, M. P.; Gracely, R. H.; Chappell, A. S.; Schoep, D. D.; Lee, G.; Whitcup, S.; Caruso, R.; Max, M. B. *Anesthesiology*, **1998**, 89, 1060-1067.
- [16] Kotlinska, J.; Liljequist, S. *Pharmacol Biochem Behav*, **1998**, 60(1), 119-124.
- [17] Wong, L. A.; Mayer, M. I.; Jane, D. E.; Watkins, J. C. *J Neurosci*, **1994**, 14(6), 3881-3897.
- [18] Fletcher, F. J.; Lodge, D. *Pharmacol Ther*, **1996**, 70(1), 65-89.
- [19] Swanson, G. T.; Green, T.; Heinemann, S. F. *Mol Pharmacol*, **1998**, 53, 942-949.
- [20] Bunke, T. G.; Greenwood, J. R.; Christensen, J. K.; Liljefors, T.; Traynelis, S. F.; Schousboe, A.; Pickering, D. S. *J Neurosci*, **2001**, 21, 3052-3062.
- [21] Camplani, G.; Morelli, E.; Nacci, V.; Fattorusso, C.; Ramunno, A.; Novellino, E.; Greenwood, J. R.; Liljefors, T.; Griffiths, R.; Sinclair, C.; Reavy, H.; Kristensen, S. A.; Pickering, D. S.; Schousboe, A.; Cagnotto, A.; Fumagalli, E.; Mennini, T. *J Med Chem*, **2001**, 44, 4501-4504.
- [22] Chimiri, A.; Gitto, R.; Zappala, M. *Exp Opin Ther Patents*, **1999**, 9(5), 557-570.
- [23] Westergren, L.; Johansson, B. B. *Brain Res*, **1992**, 573(2), 324-326.
- [24] Sheardown, M. J.; Nielsen, E. O.; Hansen, A. J.; Jacobsen, P.; Honoré, I. *Science*, **1990**, 247, 571-574.
- [25] Frank, I.; Bruhn, I.; Diemer, N. H. *Neurosci Lett*, **1992**, 140(1), 106-112.
- [26] Klockgether, T.; Turski, L.; Honore, J.; Zhang, Z. M.; Gash, D. M.; Kullen, R.; Greenamyre, J. T. *Ann Neurol*, **1991**, 30(5), 717-723.
- [27] Wachtel, H.; Kunow, M.; Loschmann, P. A. *Neurosci Lett*, **1992**, 142(2), 179-82.
- [28] Chapman, A. G.; Smith, S. E.; Meldrum, B. S. *Epilepsy Res*, **1991**, 9(2), 92-96.
- [29] Gean, P. W. *Brain Res*, **1990**, 530(2), 251-256.
- [30] De Sarro, G.; Rizzo, M.; Sinopoli, V. A.; Gitto, R.; De Sarro, A.; Zappala, M.; Chimiri, A. *Pharmacol Biochem Behav*, **1998**, 61(3), 215-220.
- [31] Suter, W.; Hartmann, A.; Poetter, F.; Sagelsdorff, P.; Hoffmann, P.; Martus, H. *J Mutation research*, **2002**, 518, 181-194.
- [32] Bueckstroem, P.; Hyttia, P. *Psychopharmacology*, **2003**, 166(1), 69-76.
- [33] McCracken, E.; Fowler, J. H.; Dewar, D.; Morrison, S.; McCulloch, J. *J Cereb. Blood Flow Metab*, **2002**, 22(9), 1090-1097.
- [34] Mignani, S.; Bohme, G. A.; Biraux, G.; Boireau, A.; Jimonet, P.; Damour, D.; Genevois-Borella, A.; Debono, M. W.; Pratt, J.; Vuilhorgne, M.; Wahl, F.; Stutzmann, J. M. *Bioorg Med Chem*, **2002**, 10, 1627-1637.
- [35] Chimiri, A.; De Sarro, G.; De Sarro, A.; Gitto, R.; Grasso, S.; Quararone, S.; Zappala, M.; Giusti, P.; Libri, V.; Constanti, A.; Chapman, A. *J Med Chem*, **1997**, 40(8), 1258-1269.
- [36] De Sarro, G.; Di Paola, E. D.; Gareri, P.; Galich, I.; Scotto, G.; De Sarro, A. *Eur J Pharmacol*, **1999**, 368, 149-159.
- [37] Langan, Y. M.; Lucas, R.; Jewell, H.; Toubiane, N.; Schaefer, H.; Sander, J. W. A. S.; *Epilepsia*, **2003**, 44(1), 46-53.
- [38] Yamada, K. A. *Neurobiol. Dis.*, **1998**, 5, 67-80.
- [39] Partin, K. M.; Fleck, M. W.; Mayer, M. I. *J Neurosci*, **1996**, 16(21), 6634-6647.
- [40] Zorumski, C. F.; Yamada, K. A.; Price, M. T.; Olney, J. W. *Neuron*, **1993**, 10, 61-7.
- [41] Yamada, K. A.; Turetsky, D. M.; Br. *J Pharmacol*, **1996**, 117(8), 1663-1672.
- [42] Rammes, G.; Swandulla, D.; Spielmanns, P.; Parsons, C. G. *Neuropharmacology*, **1998**, 37, 1299-1320.
- [43] Pirrotte, B.; Podona, T.; Diouf, O.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Dupont, I.; Somers, F.; Delarge, J.; Morain, P.; Lestage, P.; Lepagnol, J.; Spedding, M. *J Med Chem*, **1998**, 41, 2946-2956.
- [44] Pirrotte, B. Aggregation thesis **2000**, Université de Liège.
- [45] Phillips, D.; Sonnenberg, J.; Arai, A. C.; Vaswani, R.; Krutzik, P. O.; Kleisli, T.; Kessler, M.; Granger, R.; Lynch, G.; Chamberlin, A. R. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 1229-1248.
- [46] Arai, A. C.; Xia, Y. F.; Kessler, M.; Phillips, D.; Chamberlin, A. R.; Granger, R.; Lynch, G. *Mol Pharmacol*, **2002**, 62, 566-577.
- [47] Braghivelli, D.; Faria, G.; Cannova, G.; Tait, A.; Parenti, C.; Losi, G.; Baraldi, M. *J Med Chem*, **2002**, 45, 2355-2357.
- [48] Zivcovic, I.; Thompson, D. M.; Bertolino, M.; Uzunov, D.; Dibella, M.; Costa, E.; Guidotti, A. *J Pharmacol Exp Ther*, **1995**, 272, 300-309.
- [49] Cordi, A. A.; Serkiz, B.; Hennig, P.; Mahieu, J.-P.; Bodichon, C.; de Nanteuil, G.; Lepagnol, J. *Bioorg & Med Chem Lett*, **1994**, 4(16), 1957-1960.

- [50] Dasos, P.; Serkiz, B.; Moulin, P.; Leygnol, J.; Cordi, A. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*(24), 3003-3008.
- [51] Lockhart, B.; Iop, F.; Closier, M.; Lestage, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *407*, 145-153.
- [52] Ornstein, P. I.; Zimmerman, D. M.; Arnold, M. B.; Bleish, J.; Cantrell, B.; Baker, S. R.; Gates, M. R.; Tizzano, J. P.; Bleakman, D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4354-4358.
- [53] Zarrinmayeh, H.; Bleakman, D.; Gates, M. R.; Yu, H.; Zimmerman, D. M.; Ornstein, P. I.; McKeon, T.; Arnold, M. B.; Wheeler, W. J.; Skolnick, P. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 302-304.
- [54] Shepherd, T. A.; Atkins, J. A.; Bleakman, D.; Cantrell, B. E.; Reareck, J. P.; Simon, R. L.; Smith, E. C. R.; Stephenson, G. A.; Zimmerman, D. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2101-2111.
- [55] Baumbarger, P.; Muthaner, M.; Yang, C. R.; Nisenbaum, E. S. *Neuropharmacology*, **2001**, *40*, 992-1002.
- [56] Kimball, J. R.; Johnson, J. A.; Griffey, K. I.; Ornstein, P. I.; Zimmerman, D. M.; Zarrinmayeh, H.; Schoep, D. D.; Tizzano, J. P. *Society for neuroscience abstracts*, **2000**, *26*, 528, 19.
- [57] Tizzano, J. P.; Kimball, J. R.; Johnson, J. A.; Griffey, K. I. *Society for neuroscience abstracts*, **2000**, *26*, 528, 20.
- [58] Staubli, U.; Rogers, G.; Lynch, G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 777-781.
- [59] Nagarajan, N.; Quast, C.; Boxall, A.; Shahid, M.; Rosenmund, C. *Neuropharmacology*, **2001**, *41*, 650-663.
- [60] Black, M. D.; Wolonia, J.; Schip, D. E.; Honak, S. E.; Sorensen, S. M.; Wettstein, J. G. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *394*, 85-90.
- [61] Lynch, G.; Granger, R.; Ambros-Ingerson, J.; Davis, M. C.; Kessler, M.; Schehr, R. *Exp. Neurol.* **1997**, *143*, 89-92.
- [62] Ingvar, M.; Ambros-Ingerson, J.; Davis, M.; Granger, R.; Kessler, M.; Rogers, G. A.; Schehr, R.; Lynch, G. *Exp. Neurol.* **1997**, *146*, 533-559.
- [63] Sekiguchi, M.; Fleck, M. W.; Mayer, M. I.; Takeo, J.; Chiba, Y.; Yamashita, S.; Wada, K. *J. Neurosci.* **1997**, *17*(13), 5760-5771.
- [64] Gualiev, A. H.; Larsen, M.; Varming, T.; Mathiesen, C.; Johansen, T. H.; Scheel-Kruger, J.; Olsen, G. M.; Nielsen, E. O. *World patent application*, WO 99/42456.
- [65] Konkoy, C. S.; Fick, D. B.; Cai, S. X.; Jan, N. C.; Keane, J. I. W. *World patent application*, WO 00/75123.
- [66] Winter, K.; Weiser, T.; Blech, S. M.; Ceci, A. *World patent application*, WO 01/57045.
- [67] Pirrette, B.; De Tullio, P.; Boveris, S.; Kempen, J.; Lestage, P. *World patent application*, WO 01/40210.

Annexe 10

Expert Opinion

1. Introduction
2. Latest developments in the different chemical classes of K_{ATP} channel openers
3. Expert opinion

Monthly Focus: Cardiovascular, Renal, Endocrine & Metabolic

New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers

Bernard Pirotte*, Pascal de Tullio, Marie-Hélène Antoine, Sophie Sebille, Xavier Florence & Philippe Tebun

**Natural and Synthetic Drugs Research Center, Laboratoire de Chimie Pharmaceutique Université de Liège, 1, Avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

ATP-sensitive potassium channel openers are expected to be valuable drugs for the treatment of a wide variety of pathologies. However, their clinical interest depends mainly on their tissue selectivity, which is linked to their affinity for a specific ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel subtype. Hypertension was the first indication for K_{ATP} channel openers currently on the market. Recent progress in the synthesis of tissue-selective compounds led to the discovery of potential candidates for the management (prevention and/or treatment) of several pathological states such as Type 1 or Type 2 diabetes, obesity, urinary incontinence and congestive heart failure. The present report focuses on patent applications introduced between 2001 – 2004, describing original K_{ATP} channel openers.

Keywords: K_{ATP} channel, potassium channel opener (KCO)

Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15(5) 497–504

1. Introduction

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) are regulated by the intracellular levels of nucleotides; ATP induces channel inhibition and MgADP promotes channel opening. Consequently, these channels link the membrane potential to the metabolic state of the cell. They have been described in a wide range of cells, including *inter alia* pancreatic β -cells, smooth muscle cells, skeletal muscle cells, cardiomyocytes and various types of neurons [1–6]. In pancreatic β -cells (insulin-secreting cells), such K^+ channels have been shown to be involved in the insulin secretory process [7–8], whilst in the vascular tissue, K_{ATP} channels play an important role in controlling muscle tone and contractility [9]. In the CNS, the K_{ATP} channels have been reported to affect neurotransmitter release [10]. Furthermore, these membrane K^+ channels could also modulate the duration of cardiac action potential [11–12]. More recently, K_{ATP} channels from the inner mitochondrial membrane have been suggested to play a critical role in cardioprotection (ischaemic preconditioning) [13]. Thus, given their many physiological functions, K_{ATP} channels represent promising drug targets.

Recent progress in molecular biology has indicated that K_{ATP} channels are octameric complexes of two distinct subunits: a pore forming subunit (Kir6) and a regulatory subunit, the sulfonylurea receptor (SUR) [14–15]. According to their tissue localisation, different isoforms of K_{ATP} channels, resulting from the assembly of the SUR and Kir subunits in multiple combinations, are found. The assembly of SUR1 with the Kir6.2 subunits (SUR1/Kir6.2) forms the pancreatic β -cell type K_{ATP} channels, whereas the SUR2A/Kir6.2 and the SUR2B/Kir6.2 or Kir6.1 combinations generate the cardiac type and the smooth muscle type K_{ATP} channels, respectively [15]. In skeletal muscle cells, as in cardiac cells, the K_{ATP} channels are expected to be composed of the SUR2A/Kir6.2 subunits [16], whilst in central neurons, two different combinations have been reported: SUR1/Kir6.2 and SUR2B/Kir6.2 [17–18].

Ashley Publications
www.ashley-pub.com



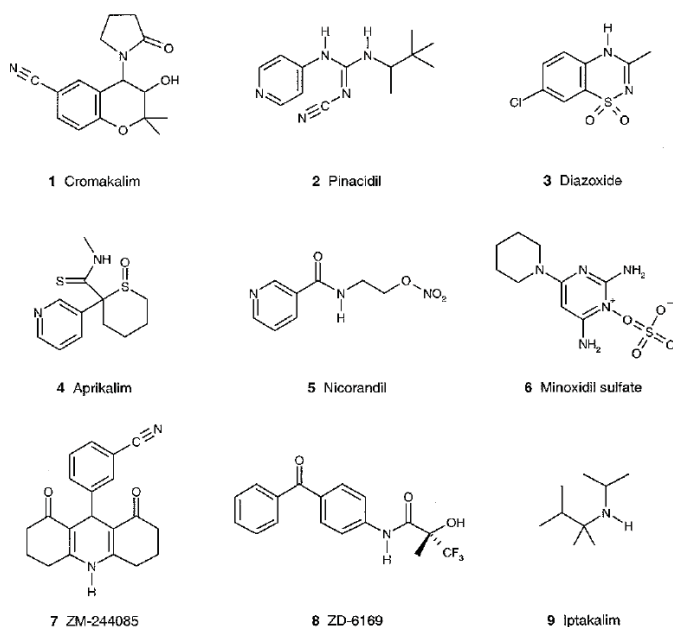


Figure 1. Chemical structures of reference K_{ATP} channel openers.

A large variety of compounds has been reported to activate K_{ATP} channels. Those drugs, named potassium channel openers/activators (KCOs, PCOs or KCAs), are potentially of great clinical value as new therapeutic agents [19,20]. However, due to the ubiquitous distribution of K_{ATP} channels, and in order to reduce the putative side effects of KCOs, the development of novel drugs should be linked to the synthesis of original compounds exhibiting a high selectivity for a single channel subtype [19]. Although recent works have shown that the binding sites for the K_{ATP} channel modulators (blockers or openers) are mostly located on the SUR subunit, the expression of different isoforms (SUR1, SUR2A, SUR2B, ...) in various tissues enables the identification of specific modulators for one SUR subtype. Such modulators could, therefore, express the desired tissue selectivity, allowing their use for specific therapeutic applications.

Thus, pancreatic β (insulin-secreting)-cells K_{ATP} channel activators ('SUR1-specific' compounds) have been proposed to be beneficial in the prevention and/or treatment of several disease states involving altered endocrine pancreatic function

such as Type 1 and 2 diabetes and obesity [21,22]. Because the SUR1 subunit is also expressed in the CNS, an exclusive peripheral effect should probably be obtained with compounds unable to cross the blood-brain barrier.

On the other hand, cardiac cell K_{ATP} channel openers ('SUR2A-specific' compounds) or, more likely, mitochondrial K_{ATP} channel openers (the composition and architecture of the cardiac mito- K_{ATP} still remain unsolved and their existence controversial) have been suggested to be of value as cardioprotectants [20,23].

Additional therapeutic applications have been reported for KCOs acting as myorelaxants ('SUR2B-specific' drugs) on a variety of smooth muscle tissues, including the treatment of arterial hypertension, the prevention of premature labour, the treatment of urinary incontinence and the control of bronchoconstriction in asthmatic patients [20,24].

In clinical practice, a series of KCOs has been introduced onto the market for the treatment of arterial hypertension, that is, pinacidil (2), diazoxide (3) and minoxidil sulfate (6) (Figure 1). Unfortunately, these first generation compounds

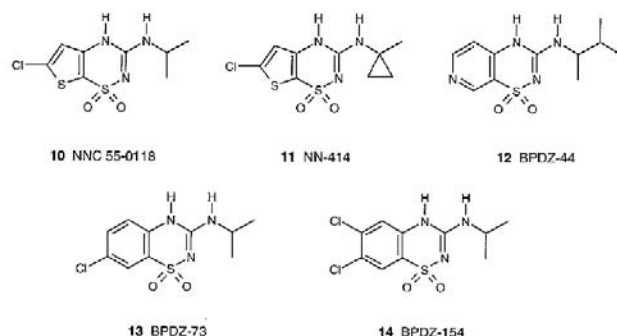


Figure 2. Benzothiadiazine dioxides and related compounds.

did not achieve a marked tissue selectivity. As a typical example, diazoxide (3) is a modulator of the SUR1- and SUR2B-comprising K_{ATP} channels [25], as well as of the mito- K_{ATP} channels [26], being able to inhibit insulin release and to provoke myorelaxant effect [28,29].

KCOs exhibit a wide structural diversity and comprise a number of different chemical classes such as benzopyranes (cromakalim; 1), cyanoguanidines (pinacidil; 2), benzothiadiazine dioxides (diazoxide; 3), thioamides (aprikalim; 4), pyridine-derived nitric esters (nicorandil; 5), pyrimidine *N*-oxide sulfates (minoxidil sulfate; 6) and, more recently, dihydropyridines (ZM-244085; 7) and tertiary carbinols (ZD-6169; 8) (Figure 1). More surprising, is the recent identification of a simple secondary amine with short branched alkyl chains (iptakalim; 9) as a potent K_{ATP} channel opener [29,30] (Figure 1).

The present review focuses on novel K_{ATP} channel openers and on the latest developments patented from 2001 to 2004. The compounds described are classified according to their chemical families.

2. Latest developments in the different chemical classes of K_{ATP} channel openers

2.1 Benzothiadiazine dioxides and related compounds

In 2001–2004, several patents were claimed by Novo Nordisk describing original thienothiadiazine dioxides as potassium channel openers [101–109]. Patents reporting this class of compounds have been seen since 1997 [109] and medicinal chemistry research on a series of thienothiadiazine dioxides was recently published [31].

Among the different compounds reported in these patents, the thienothiadiazine dioxides 10 (NNC-550118) and 11 (NN-414; Figure 2) are of particular interest due to their high

selectivity for the pancreatic K_{ATP} channels ('SUR1-specific' compounds). These drugs may be considered as isosteres of pyrido- and benzothiadiazine dioxides [32–34], known to be structural analogues of diazoxide or hybrid compounds between pinacidil and diazoxide, expressing a marked selectivity for the pancreatic tissue. BPDZ-44 (12), a pyrido-thiadiazine dioxide, was the first example of potent pancreatic β cell selective K_{ATP} channel opener reported in the literature [32,35] (Figure 2). Two other benzothiadiazine dioxides, BPDZ-73 (13) and BPDZ-154 (14), were later reported to be strong activators of the pancreatic β cell K_{ATP} channels [21,36] (Figure 2). Benzo-, pyrido- and thienothiadiazine dioxides behave as selective ligands for the SUR1 subunit when a short branched alkylamino side chain is introduced at the 3-position of the thiadiazine ring, and when a halogen atom (preferably fluorine or chlorine) is located on the fused aromatic cycle (in the 6-position of thienothiadiazines and in the 7-position of benzothiadiazines).

Compounds described in patent WO0102410 [101] are stated to be selective potassium channel openers inhibiting insulin release and inducing β cell rest. Thus, they were expected to be useful for the treatment and/or prevention of Type 1 and 2 diabetes, obesity, dyslipidaemia, and for the treatment of eating disorders such as anorexia and bulimia. In patent WO0200222 [102], fused thiadiazines (i.e., thienothiadiazines) potassium channel agonists are claimed for treating cancer, more specifically breast and endometrial cancer. Thienothiadiazines have also been suggested for the treatment of arterial hypertension, coronary heart disease, stroke and gallbladder disease (WO0200223) [103]. In patent WO0200665 [104], the same drugs are claimed to protect pancreatic β cells against toxic damage and to prevent their autoimmune destruction. A related patent (WO0250085) [105] describes a new synthetic process for preparing fused 1,2,4-thiadiazine derivatives, such as compound 11 (Figure 2).

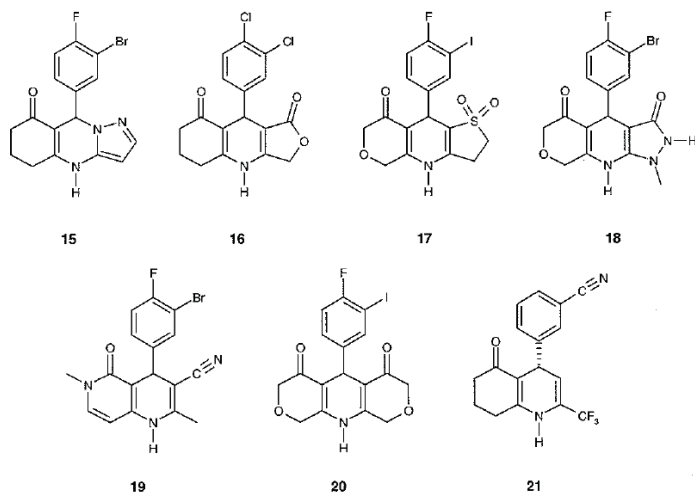


Figure 3. Dihydropyridines and related compounds.

In patent WO03045954 [106], SUR1/Kir6.2 selective potassium channel openers, such as compound 11, are further claimed for the treatment of hyperinsulinaemia and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. Lastly, patent WO2004005299 [108] from Novo Nordisk described several polymorphic forms of NN-414 (11).

NN-414 (11) reached Phase II clinical studies in 2003. At the end of 2003, Novo Nordisk decided to suspend clinical trials because of the existence of a liver toxicity [201]. It is not known if the latter unwanted effect is specific to this compound or is related to this new pharmacological class of tissue-selective KCOs.

2.2 Dihydropyridines and related compounds

Since the discovery of the K⁺ channel opening properties of 1,4-dihydropyridines, such as ZM-244085 (7, Figure 1), a broad exploration of the therapeutic interest of new dihydropyridine-related compounds has been launched by Abbott Labs. In 2001, the company introduced 4 patents (WO0136422, WO0183480, WO0183484 and WO0166544) [110-113] claiming different heterocyclic families of drugs expected to be KCOs structurally related to the dihydropyridine ZM-244085 (7). Typical examples of compounds are the tetrahydropyrazoloquinazolinone (15) [110], the tetrahydrofuroquinolinone (16) [111], the tetrahydropyranothienopyridinone dioxide (17) [112] and the tetrahydropyranopyrazolopyridinedione (18) [113] (Figure 3). These compounds were

stated to be effective at hyperpolarising cell membranes, opening K_{ATP} channels, relaxing smooth muscle cells and inhibiting bladder contractions. They were, in general, claimed to be effective for the treatment of urinary incontinence.

In 2002, in the patent application WO0210164 [114], Abbott Labs described novel dihydronaphthyridinones such as compound 19 (Figure 3). These compounds, structurally related to the previously described dihydropyridine KCOs and related structures (15 – 18, Figure 3), were also claimed to be potassium channel openers with myorelaxant properties.

Original synthetic processes for producing dihydropyridine KCOs, like compound 20 (Figure 3), have been described in two other patents claimed by Abbott Labs in 2003 (WO03068765 and WO03070678) [115, 116].

AstraZeneca also introduced two patents in 2002 (WO0210103 and WO0210134) [117, 118] and one patent in 2003 (WO03062203) [119] describing new chemical processes for the synthesis of dihydropyridine-related compounds. The tetrahydroquinolinone 21 (AZD-0947; Figure 3), already described in the patent application US-05455253, was claimed to be a potassium channel opener useful for the treatment of urinary incontinence [117-119].

2.3 Cyanoguanidines and related compounds

A patent from Abbott Labs (WO0109096) [120] in 2001 claimed a series of *N*-pyridyl-*N'*-benzamidoalkyl-*N''*-cyanoguanidines structurally related to the prototype KCO pinacidil (2). The

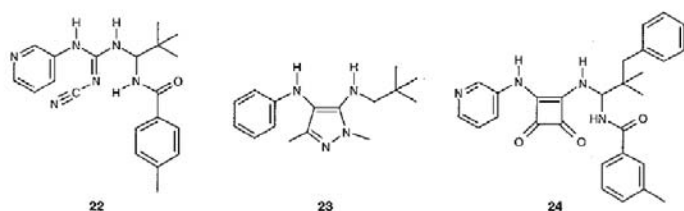


Figure 4. Cyanoguanidines and related compounds.

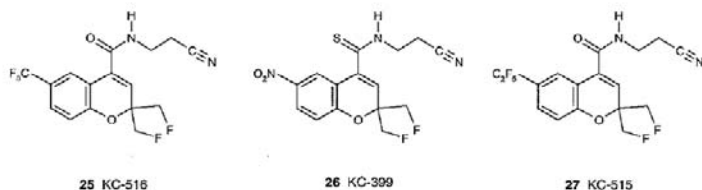


Figure 5. Benzopyrans and related compounds.

claimed compounds, including compound 22 (Figure 4), exhibited chemical structures (aminal derivatives) unusual in medicinal chemistry. The potential ability of these compounds to improve urinary incontinence, bladder overactivity and bladder instability was investigated by measuring their inhibitory effects on bladder contractions. These original cyanoguanidine derivatives were found to be KCOs of biological and therapeutic interest.

In 2001, another company, American Home Products Corp., introduced in 2001 a patent (US6319941) [121] covering a series of other pinacidil-related structures. Compounds, such as compound 23 (Figure 4), were disclosed to relax smooth muscle and to activate K_{ATP} channels. They were suggested for the treatment of disorders associated with spastic or excessive smooth muscle contraction of the urinary tract, particularly urge urinary incontinence. From a chemical point of view, these compounds may be compared to pinacidil, for which the cyanoguanidine moiety has been replaced by a diaminopyrazole core structure (isosteric replacement). Moreover, it can be expected that the two NH groups are similarly orientated as in the preferential conformation adopted by pinacidil (as shown in Figures 1 and 4).

In 2002, two additional patents from Abbott Labs (WO02062761 and WO02062762) [122, 123] claimed aminal cyclobutenediones (such as 24) and aminal *N*-pyridyl-*N'*-benzamidoalkyl-*N'*-cyanoguanidines (such as 22). These compounds

were tested in a membrane hyperpolarisation assay for potassium channel opening activity using primary cultured guinea-pig urinary bladder cells [122, 123].

2.4 Benzopyrans and related compounds

Over the last four years, little appeared about cromakalim analogues in the patent literature, although many scientific works were devoted to representatives of this important series of KCOs (for a recent review on cromakalim analogues, see [37]). In 2003, a patent from Central Glass (EP-01283207) [124] described a new synthetic process giving access to the benzopyran KC-516 (25; Figure 5). By comparison with previously reported structural analogues, such as KC-399 (26) and KC-515 (27; Figure 5), KC-516 was prepared in order to develop a highly potent, long-lasting antihypertensive agent expressing reduced reflex tachycardia, and retaining the beneficial effects of related KCOs on lipid metabolism [38, 39].

2.5 Mitochondrial K_{ATP} channel openers

Orion Corp. initially described levosimendan (OR-1259; 28, Figure 6) and related structures in the patent applications EP-00565546 and WO9321921. Levosimendan, known for a long time as a positive inotropic compound [40], was suggested for the treatment of heart failure. A recent publication reported that compound 28, usually characterised as a calcium

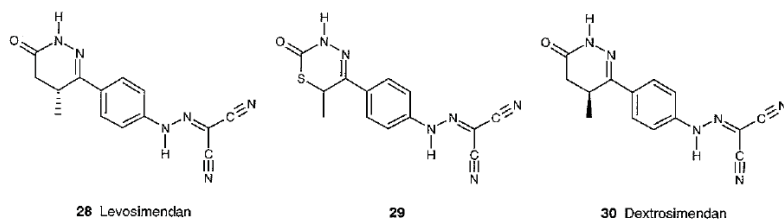


Figure 6. Levosimendan and related compounds.

sensitiser, was also a mitochondrial K_{ATP} channel opener (dual mechanism) [41]. In 2001, Orion Corp. further claimed the use of levosimendan for the treatment of septic shock (WO02002220) [125]. Intravenous administration of 0.2 mg/kg levosimendan to pigs followed by a continuous intravenous infusion at 0.2 mg/kg/h prevented endotoxin-induced decreases in cardiac index and portal blood flow and substantially inhibited the increase in pulmonary vascular resistance and portal venous blood lactate.

In patent WO0100211 [126], the same company claimed the use of levosimendan (i.v. administration) for the treatment of coronary graft spasm following coronary bypass surgery. In 2002, the use of levosimendan for the treatment of erectile dysfunction was also claimed in patent application WO0247603 [127].

A structurally related analogue of levosimendan, the thiadiazine derivative 29 (Figure 6), was claimed in patent WO0240025 [128] for being another mitochondrial ATP-dependent potassium channel opener useful for the treatment and prevention of inflammatory processes.

In 2002, a patent describing dextrosimendan (30, Figure 6), the corresponding dextrogyre enantiomer of levosimendan, was taken out by Orion Corp. (WO0240026) [129]. The latter compound was expected to be useful for inducing cardioprotective preconditioning via opening of mitochondrial K_{ATP} channels and to be effective for the treatment of congestive heart failure [129].

3. Expert opinion

During the last decade, many investigations on KCOs have been conducted with the aim of discovering new drugs for

therapeutic indications such as diabetes, obesity, arterial hypertension, asthma, urinary incontinence and congestive heart failure. Due to the ubiquitous distribution of K_{ATP} channels, KCOs may only be used in clinical practice provided that they express a marked tissue selectivity. The recent patents covering the new series of K_{ATP} channel openers confirm that, today, only tissue selective KCOs are attractive to the pharmaceutical industry. However, it should be emphasised that no new KCOs have recently been introduced onto the market.

A significant therapeutic benefit was awaited from the use of pancreatic β -cell selective K_{ATP} channel openers for the prevention and/or treatment of diabetes. The unique compound introduced in Phase I and Phase II clinical studies was, however, recently removed due to its hepatotoxicity. To the authors' knowledge, no back-up compounds devoid of such a side effect have been examined as possible substitutes for this therapeutic application.

The authors' feel that additional investigations could possibly lead to the rapid identification of original drugs for the treatment of asthma or chronic obstructive pulmonary disease. In such a field, limitation of unwanted systemic side effects can be expected from KCOs administered by topic application.

Many patents granted during the last four years were focused on KCOs suggested as possible treatments of urinary incontinence. Several patents were also dedicated to KCOs acting on mitochondrial K_{ATP} channels and expected to be developed as cardioprotectants. The near future will indicate the outcome of these new therapeutic promises.

Bibliography

1. NOMA A: ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* (1983) 305:147-148.
2. COOK DL, HALES CN: Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B cells. *Nature* (1984) 311:271-273.
3. ALLARD B, LAZDUNSKI M: Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscles cells. *Eur J Pharmacol* (1993) 236:419-426.
4. STANDEN NB, QUAYLE JM, DAVIES NW, BRAYDEN JE, HUANG Y, NELSON MI: Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* (1989) 245:177-180.

- 5 QUAYLE JM, NELSON MT, STANDEN NB: ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* (1997) 77:1165-1232
- 6 BERNARDI HA, FOSSET M, LAZDUNSKI M: Purification and affinity labeling of a brain $[^{3H}]$ -glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85:9816-9820
- 7 ASHCROFT FM: Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* (1988) 11:97-118
- 8 PETERSEN OH, DUNNE MJ: Regulation of K^+ channels plays a crucial role in the control of insulin secretion. *Pflügers Arch* (1989) 414:S115-S120
- 9 KOLB HA: Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (1990) 15:51-79
- 10 AMOROSO S, SCHMID-ANTOMARCHI H, FOSSET M, LAZDUNSKI M: Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K^+ channels. *Science* (1990) 247:852-854
- 11 NICHOLS CG, FEDERER WJ: The regulation of ATP-sensitive K^+ channel activity in intact and permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol* (1990) 423:91-110
- 12 GASSER RN, VAUGHAN JONES RD: Mechanism of potassium efflux and action potential shortening during ischemia in isolated mammalian cardiac tissue. *J Physiol* (1990) 431:713-741
- 13 LIU Y, SATO T, O'ROURKE B, MARBAN E: Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* (1998) 97:2463-2469
- 14 INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP *et al*: Reconstitution of IK_{ATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* (1995) 270:1166-1170
- 15 BABENKO AB, AGUILAR-BRYAN I, BRYAN J: A view of SUR/Kir6 X K_{ATP} channels. *Annu Rev Physiol* (1998) 60:667-687
- 16 ISOMOTO S, KONDO C, YAMADA M *et al*: A novel sulfonylurea receptor form with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. *J Biol Chem* (1996) 271:24321-24324
- 17 INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP *et al*: A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron* (1996) 16:1011-1017
- 18 LISS B, BRUNS R, ROETER J: Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K_{ATP} channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J* (1999) 18:833-846
- 19 PIROTTIE B, FONTAINE J, LEBRUN P: Recent advances in the chemistry of potassium channel openers. *Curr Med Chem* (1995) 2:573-582
- 20 MANNHOLD R: K_{ATP} channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev* (2004) 24:213-266
- 21 LEBRUN P, ARKHAMMAR R, ANTOINE M-H, NGUYEN Q-A, RONDO HANSEN J, PIROTTIE B: A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K^+ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* (2000) 43:723-732
- 22 HANSEN JB, ARKHAMMAR PO, BODVARSDOTTIR TB, WAHL P: Inhibition of insulin secretion as a new drug target in the treatment of metabolic disorders. *Curr Med Chem* (2004) 11:1595-1615
- 23 MIURA T, MIKI T: ATP-sensitive K^+ channel openers: old drugs with new clinical benefits for the heart. *Curr Vasc Pharmacol* (2003) 1:251-258
- 24 COGHLIN MJ, CARROLL WA, GOPAL AKRISHNAN M: Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: update from a decade of progress. *J Med Chem* (2001) 44:1627-1653
- 25 ASHCROFT FM, GRIBBLE FM: New windows on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *Trends Pharmacol Sci* (2000) 21:439-445
- 26 GARIJD KD, PAUCEK P, YAROV-YAROVY V *et al*: Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels: Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* (1997) 81:1072-1082
- 27 LEBRUN P, DEVRUX V, HERMANN M, HERCHUELZ A: Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *J Pharmacol Exp Ther* (1989) 250:1011-1018
- 28 ANTOINE M-H, BERKENBOOM G, FANG Z-Y, FONTAINE J, HERCHUELZ A, LEBRUN P: Mechanical and ionic response of rat aorta to diazoxide. *Eur J Pharmacol* (1992) 216:299-306
- 29 WANG H, ZHANG YL, TANG XC, FENG HS, GANG H: Targeting ischemic stroke with a novel opener of ATP-sensitive potassium channels in the brain. *Mol Pharmacol* (2004) 66:1160-1168
- 30 WANG H, LONG CL, ZHANG YL: A new ATP-sensitive potassium channel opener reduces blood pressure and reverses cardiovascular remodeling in experimental hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 312:1326-1333
- 31 NIELSEN FE, BODVARSDOTTIR TB, WORSAAE A *et al*: 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-c]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives: potentially and selectively activate ATP-sensitive potassium channels of pancreatic β -cells. *J Med Chem* (2002) 45:4171-4187
- 32 PIROTTIE B, DE TULLIO P, LEBRUN P *et al*: 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-c]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic β cells: a new class of potassium channel openers? *J Med Chem* (1993) 36:3211-3213
- 33 DE TULLIO P, PIROTTIE B, LEBRUN P *et al*: 3- and 4-substituted 4H-pyrido[4,3-c]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation and structure-activity relationships. *J Med Chem* (1996) 39:937-948
- 34 DE TULLIO P, BECKER B, BOVERIE S *et al*: Toward tissue-selective pancreatic β cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J Med Chem* (2003) 46:3342-3353
- 35 PIROTTIE B, ANTOINE M-H, DE TULLIO P *et al*: A pyridothiadiazine (BPDZ-44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K^+ channels. *Biochem Pharmacol* (1994) 47:1581-1586
- 36 COSGROVE KE, ANTOINE M-H, LEE AT *et al*: BPDZ-154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels: *in vitro* studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87:4860-4868

New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers

- 37 SFRITTO S, DE TULLIO P, BOVERIE S, ANTOINE M-H, LEBRUN P. PEROLE B: Recent developments in the chemistry of potassium channel activators: the cromakalim analogs. *Curr. Med. Chem.* (2004) 11:1213-1222.
- 38 KOGA H, OHYA M, SAIO H, ISHIZAWA T, NABATA H: Design of potent K⁺ channel openers by pharmacophore model. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1993) 3:625-631.
- 39 TAKA N, KOGA H, SATO H, ISHIZAWA T, IAKAHASHI T, IMAGAWA J: 6-Substituted 2,2-bis(fluoromethyl)-benzopyran-4-carboxamide K⁺ channel openers. *Bioorg. Med. Chem.* (2000) 8:1393-1405.
- 40 RAASMAJA A, TALO A, HAIKALA H, NISSINEN E, LINDEN IB, POHTO P: Biochemical properties of OR-1259, a positive inotropic and vasodilatory compound with an antiarrhythmic effect. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1992) 311:423.
- 41 KOPUSTINSKIENE DM, POLISELLO P, SARIS NE: Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 428:311-314.

Patents

- 101 NOVO NORDISK AS: WO0102410 (2001).
- 102 NOVO NORDISK AS: WO0200222 (2002).

- 103 NOVO NORDISK AS: WO0200223 (2002).
- 104 NOVO NORDISK AS: WO0200665 (2002).
- 105 NOVO NORDISK AS: WO0250085 (2002).
- 106 NOVO NORDISK AS: WO03045954 (2003).
- 107 NOVO NORDISK AS: WO03045955 (2003).
- 108 NOVO NORDISK AS: WO2004005299 (2004).
- 109 NOVO NORDISK AS: WO9726265 (1997).
- 110 ABBOTT LABS: WO0136422 (2001).
- 111 ABBOTT LABS: WO0183480 (2001).
- 112 ABBOTT LABS: WO0183484 (2001).
- 113 ABBOTT LABS: WO0166544 (2001).
- 114 ABBOTT LABS: WO0210164 (2002).
- 115 ABBOTT LABS: WO03068765 (2003).
- 116 ABBOTT LABS: WO03070678 (2003).
- 117 ASTRAZENECA AB: WO0210103 (2002).
- 118 ASTRAZENECA AB: WO0210134 (2002).
- 119 ASTRAZENECA AB: WO03062203 (2003).
- 120 ABBOTT LABS: WO0109096 (2001).
- 121 AMERICAN HOME PRODUCTS CORP: US6319941 (2001).
- 122 ABBOTT LABS: WO02062761 (2002).

- 123 ABBOTT LABS: WO02062762 (2002).
- 124 CENTRAL GLASS CO. LTD: EP-01283207 (2003).
- 125 ORION CORP: WO0200220 (2001).
- 126 ORION CORP: WO0100211 (2001).
- 127 ORION CORP: WO0247603 (2002).
- 128 ORION CORP: WO0240025 (2002).
- 129 ORION CORP: WO0240026 (2002).

Website

- 201 http://www.fda.gov/cder/dpa/1_205/news/18771-1.html
Drug Pipeline Alert (5/11/2003).

Affiliation

Bernard Pinette¹, Pascal de Tullio¹, Marie-Hélène Antoine², Sophie Sebillot¹, Xavier Florence¹ & Philippe Lebrun²
¹Author for correspondence
²Natural and Synthetic Drugs Research Center, Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Université de Liège, 1, Avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium
³Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808, route de Lennik, B-1070, Bruxelles, Belgium
Tel: +32 4 366 43 65; Fax: +32 4 366 43 62; E-mail: B.Pinette@ulg.ac.be

Annexe 11

3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as ATP-Sensitive Potassium Channel Openers: Effect of 6,7-Disubstitution on Potency and Tissue Selectivity

Pascal de Tullio,^{*,†} Stéphane Boverie,[‡] Bénédicte Becker,[‡] Marie-Hélène Antoine,[‡] Quynh-Anh Nguyen,[‡] Pierre Francotte,[†] Stéphane Counerotte,[†] Sophie Sebille,[†] Bernard Pirotte,[†] and Philippe Lebrun[‡]

Centre de Recherche en Pharmacochimie des Substances Naturelles et Synthétiques, Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Université de Liège, 1 Avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium, and Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgium

Received January 26, 2005

A series of 6,7-disubstituted 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides bearing a short alkylamino side chain in the 3-position were synthesized. These compounds were tested on rat pancreatic islets and on rat aorta rings. In vitro data indicated that in most cases substitution in the 6 and the 7 positions increased their activity as inhibitors of insulin secretion, while the myorelaxant potency of the drugs was maintained or enhanced according to the nature of the substituent in the 7-position. The presence of either chlorine or bromine atoms in the 6 and 7 positions did not improve the apparent selectivity of the drugs for the pancreatic tissue. By contrast, the introduction of one or two fluorine atoms, as well as the presence of a methoxy group in the 7-position, generated potent and selective inhibitors of insulin release. Radioisotopic and fluorimetric experiments performed with the most potent compound inhibiting insulin release (34, BPDZ 259, 6-chloro-7-fluoro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) confirmed that the drug activated K_{ATP} channels. 34 was found to be one of the most potent and selective pancreatic potassium channel openers yet described.

Introduction

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels), which regulate the flow of potassium ions through the cell membrane, have been identified in a wide range of cell types and have been found to link the metabolic state to the electric state of the cell.^{1–8} K_{ATP} channels are composed of two different protein subunits in a 4 + 4 stoichiometry.⁹ The K_{ATP} channel pore belongs to the inwardly rectifying potassium channel family and is named Kir6.x.¹⁰ The second subunit, the SUR (for sulfonylurea receptor) subunit, contains the regulatory sites for most drugs.¹⁰ Four variants of SUR have been reported (SUR1, SUR2A, SUR2B, and SUR2C).¹¹ According to their tissue localization, K_{ATP} channels are composed of different subunits. For example, SUR1 combined with Kir6.2 forms the pancreatic K_{ATP} channel.¹² The combination of SUR2A and Kir6.2 subunits is found in cardiac and skeletal muscle, while the smooth muscle K_{ATP} channel is composed of SUR2B and Kir6.1 or Kir6.2 subunits.¹³ Although pancreatic K_{ATP} channels are well-known to be involved in the insulin-releasing process^{14,15} and smooth muscle K_{ATP} channels in the control of muscle tone,^{16,17} the physiological roles of the different channel subtypes have not yet been thoroughly assessed.^{18,19}

Several drugs, named PCOs (potassium channel openers), have been found to activate K_{ATP} channels,^{20,21} leading to plasma membrane hyperpolarization and reduction in cell excitability. This may, in turn,

provoke the relaxation of smooth muscles and/or the inhibition of endocrine releases.^{22,23} Because of their broad therapeutic potential, a large variety of K_{ATP} channel agonists has been developed.^{24,25} These drugs include chromane derivatives such as cromakalim,²⁶ cyanoguanidine compounds such as pinacidil,²⁷ and 1,2,4-benzothiadiazine derivatives such as diazoxide²⁸ (Figure 1). Selective activation of pancreatic K_{ATP} channels has been demonstrated to be of clinical value in the treatment of several metabolic disorders, including type I and type II diabetes, obesity, and hyperinsulinemia.^{29–32} Until recently, diazoxide was the only compound reported to activate pancreatic K_{ATP} channels. Unfortunately, as a consequence of its lack of tissue selectivity, diazoxide induces many side effects such as hypertrichosis, edema, headache, and hypotension.³³

In the search for new pancreatic selective PCOs, several years ago we developed a series of 3-alkylamino-4*H*-pyrido- and -1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides.^{34–40} Among the drugs of this original series, BPDZ 44³⁷ (1, Figure 1), BPDZ 73⁴¹ (7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (2, Figure 1), BPDZ 138 (7-fluoro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide)⁴⁰ (3, Figure 1), and BPDZ 216 (3-isopropylamino-7-methoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide)⁴² (4, Figure 1) were identified as the first potent and selective pancreatic K_{ATP} channel openers. Usually, the benzenic derivatives appeared to exhibit a higher potency on vascular and/or pancreatic tissue in comparison with their pyridinic counterparts. More recently, 3-alkylamino-6-chloro-4*H*-thieno[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides, such as NN414 (5, Figure 1), have also

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 32-4-366-43-69. Fax: 32-4-366-43-62. E-mail: P.deTullio@ulg.ac.be.

† Université de Liège.

‡ Université Libre de Bruxelles.

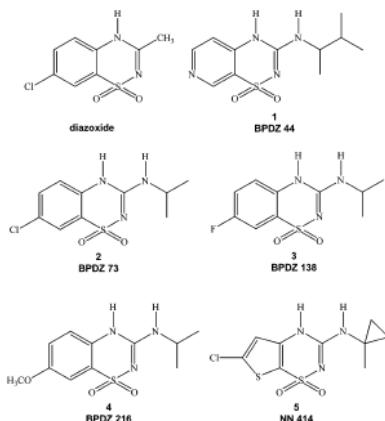


Figure 1. Chemical structure of diazoxide and several analogues described as potassium channels openers.

been proposed for the treatment of metabolic disorders linked to insulin secretion.⁴³

Thirty years ago, Topliss and Yudis⁴⁴ demonstrated that the introduction of a small group in the 6-position of diazoxide improved its vasorelaxant activity, while Wales et al.⁴⁵ showed that the 6,7-dichloro analogue of diazoxide maintained the hyperglycemic properties of the parent compound. On this basis, it might be expected that the disubstitution of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides in the 6 and 7 positions would enhance the K_{ATP} channel agonistic activity of diazoxide analogues. In line with this proposition and according to the structure–activity relationships (SAR) deduced from our previous work,^{34,36,40} we synthesized in the present study a series of 6- and 7-substituted 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides bearing short and branched alkylamino side chains in the 3-position. These newly synthesized compounds were tested as putative K_{ATP} channel openers on a vascular and a pancreatic pharmacological model in order to evaluate the impact of the 6- and 7-disubstitution on both their potency and tissue selectivity. Moreover, further biological investigations were conducted with a selected drug to confirm the mechanism of action of these original compounds.

Chemistry

The different synthetic pathways used to prepare the 6,7-disubstituted 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides described in this manuscript are illustrated in Schemes 1–3. In the 6,7-dichloro, 7-bromo-6-chloro, 6-chloro-7-fluoro, and 6,7-difluoro series (Scheme 1), a chlorosulfonation step was used to give access to the *o*-aminobenzenesulfonamides key intermediates (14–17). Starting from the appropriate aniline (6–9), the treatment with chlorosulfonic acid led to the corresponding sulfonyl chloride (10–13), which reacted without further purification with diluted ammonia. Ring closure of *o*-aminobenzenesulfonamides, using 1,1'-

thiocarbonyldiimidazole as previously described,⁴⁶ led to compounds 18–21. The 3-imidazolyl group of the reactive intermediates was displaced by selected branched alkylamines to give the expected 3-alkylamino-substituted derivatives (22–35). Such a nucleophilic substitution occurred without any difficulties in the cases of 6,7-dichloro (14), 7-bromo-6-chloro (15), and 6-chloro-7-fluoro (16) intermediates. However, the fluorine atom in the 6-position of 6,7-difluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (17) was substituted by the alkylamine, together with the imidazole group. Thus, application of this synthetic pathway to the 6,7-difluoro intermediate (17) led to compounds bearing two alkylamino side chains: the first one, as expected, in the 3-position and the second one, more surprisingly, in the 6-position (compounds 36–38). So to obtain the 6,7-difluoro-substituted compounds (42–44), we decided to follow the route described by Flemming et al. for obtaining 3-alkylamino-substituted thienothiadiazine dioxides.⁴⁸ The action of different alkyl isothiocyanates on 2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonamide (17) generated the corresponding sulfonylthioureas (39–41). Ring closure was then achieved at low temperature using phosgene and led to the expected drugs (Scheme 2, 42–44).

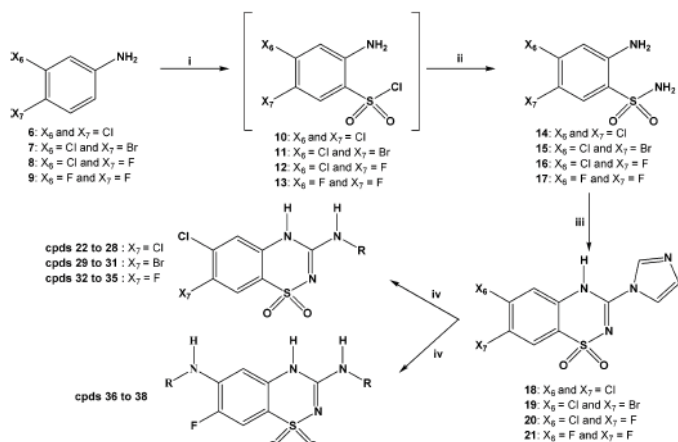
The 6-chloro-7-methoxy derivatives (49–51) were prepared according to Scheme 3, starting from 3-chloro-4-methoxyaniline (45). Reaction with chlorosulfonyl isocyanate led to the 3-oxo intermediate (46). Subsequent conversion of the 3-oxo function into a 3-thioxo one, (47) followed by *S*-methylation, gave access to the expected reactive 3-methylsulfonyl-substituted intermediate (48). The nucleophilic substitution of the methylsulfonyl group was conducted with the appropriate alkylamine under reflux at normal pressure or in a sealed vessel (compounds 49–51).

Results and Discussion

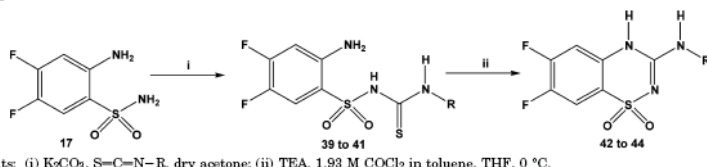
Twenty-four new 6,7-disubstituted 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides bearing, in most cases, a short alkylamino side chain in the 3-position were prepared. To determine their putative activity on K_{ATP} channels and also to compare their relative tissue selectivity, a pancreatic and a vascular *in vitro* model were used as pharmacological screening tools.

The ability of such compounds to inhibit glucose-induced insulin secretion was evaluated on isolated rat pancreatic islets and compared to that of diazoxide and the corresponding 7-monosubstituted analogues (Tables 1 and 2). Except for compounds exhibiting a large alkylamino side chain in the 3-position (*n*-hexyl substituent, 28) and compounds substituted by an alkylamino chain in the 6-position (36–38) that were found to be inactive at 50 μ M, all drugs markedly inhibited insulin release at 10 μ M. At a lower concentration (1 μ M), and whatever the nature of the 6 and 7 substituent, the 3-ethylamino and the 3-isopropylamino side chains appeared to be the more accurate choice to elicit a marked inhibitory activity on the insulin secreting rate (see compounds 22, 24, 29, 30, 32, 34, 42, 43, and 50).

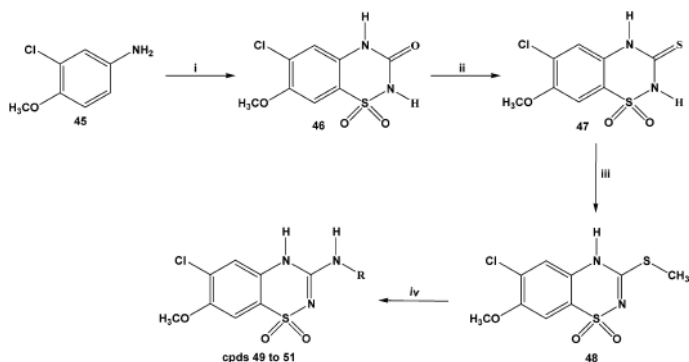
Another interesting hydrocarbon chain on the nitrogen atom in the 3-position appeared to be cyclobutyl (27, 31, 35, 51). These results are in accordance with the SAR related to the nature of the alkylamino chain in

Scheme 1^a

^a Reagents: (i) ClSO_3H ; (ii) NH_4OH ; (iii) 1,1-thiocarbonyldiimidazole; (iv) RNH_2 .

Scheme 2^a

^a Reagents: (i) K_2CO_3 , $\text{S}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$, dry acetone; (ii) TEA, 1.93 M COCl_2 in toluene, THF, 0 °C.

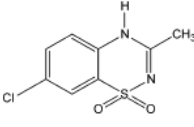
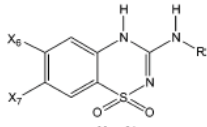
Scheme 3^a

^a Reagents: (i) MeNO_2 , ClSO_2NCO , AlCl_3 ; (ii) P_2S_5 , pyridine; (iii) K_2CO_3 , CH_3I ; (iv) RNH_2 .

the 3-position and the SAR deduced from previous studies on 7-substituted 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides.^{40,47} Moreover, on looking at the calculated IC_{50} values (Tables 1 and 2), it is noted that these disubstituted compounds appear to be more

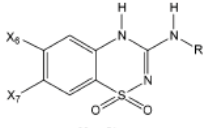
potent than their respective 7-monosubstituted analogues (24 vs 2, 34, 43 vs 3, and 50 vs 4) and up to 150 times more potent than diazoxide. So in general the introduction of a halogen atom in the 6-position appeared to favor activity on the pancreatic tissue. The

Table 1. Effects of 6,7-Dichloro-Substituted or 6-Chloro-7-bromo-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on 16.7 mM Glucose-Induced Insulin Release from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

				Diazoxide			22 to 31		
									
compd				% of residual insulin release (mean ± SEM (n))			IC ₅₀ (pancreas), ^b μM	EC ₅₀ (aorta), ^c μM	EC ₅₀ /IC ₅₀ ^d
				10 μM	1 μM	0.1 μM			
22	Cl	Cl	CH ₂ CH ₃	9.1 ± 1.7 (18)	8.5 ± 0.6 (29)	83.4 ± 3.8 (24)	0.25	1.0 ± 0.1 (8)	4
23	Cl	Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₃	9.9 ± 0.9 (14)	60.2 ± 4.1 (15)		1.37	4.7 ± 0.5 (4)	3.4
24	Cl	Cl	CH(CH ₃) ₂	6.3 ± 0.7 (12) ^e	13.2 ± 1.0 (26) ^e	84.9 ± 4.5 (21) ^e	0.28 ^e	2.3 ± 0.2 (8)	8.2
25	Cl	Cl	CH ₂ CH=CH ₂	13.5 ± 0.8 (11)	68.5 ± 4.1 (16)		1.89	1.2 ± 0.2 (4)	0.63
26	Cl	Cl	CH(CH ₂) ₂ ^f	17.6 ± 2.0 (18)	92.5 ± 3.3 (14)		3.34	>30 (4)	>9
27	Cl	Cl	CH(CH ₂) ₂ ^f	8.4 ± 1.7 (18)	58.1 ± 5.4 (16)		1.25	12.6 ± 2.0 (5)	10.1
28	Cl	Cl	(CH ₂) ₆ CH ₃	95.2 ± 4.7 (16)	ND ^e		ND ^e	>300 (4)	ND ^e
29	Cl	Br	CH ₂ CH ₃	7.9 ± 0.7 (13)	19.7 ± 1.9 (13)	79.5 ± 3.8 (36)	0.27	3.3 ± 0.6 (6)	12.2
30	Cl	Br	CH(CH ₃) ₂	7.5 ± 0.7 (14)	25.7 ± 2.0 (15)	73.3 ± 4.2 (23)	0.26	5.6 ± 0.7 (6)	21.5
31	Cl	Br	CH(CH ₂) ₂ ^f	9.5 ± 0.6 (14)	57.2 ± 5.6 (16)		1.21	6.6 ± 0.5 (6)	5.5
diazoxide	H	Cl	-	73.9 ± 4.4 (16) ^e	87.5 ± 5.0 (15) ^e		22.6 ^e	22.4 ± 2.1 (11) ^e	1.0 ^e
2	H	Cl	CH(CH ₃) ₂	4.9 ± 0.4 (32) ^e	36.2 ± 2.4 (31) ^e	90.4 ± 3.5 (23) ^e	0.73	36.3 ± 2.2 (6) ^e	49.7
52	H	Br	CH(CH ₃) ₂	8.1 ± 0.8 (12) ^e	34.9 ± 2.8 (12) ^e	91.0 ± 5.3 (13) ^e	0.47	4.8 ± 0.7 (5) ^e	10.2

^a Published results (refs 32 and 40). ^b Drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^c Drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl induced contraction of rat aorta rings (mean ± SEM (n)). ^d Estimated selectivity ratio. ^e Cyclopropyl. ^f Cyclobutyl. ^g ND: not determined.

Table 2. Effects of 6-Chloro-7-fluoro-Substituted, 6-Alkylamino-7-fluoro-Substituted, 6,7-Difluoro-Substituted, and 6-Chloro-7-methoxy-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on 16.7 mM Glucose-Induced Insulin Release from Rat Pancreatic Islets and on Contractile Activity of K⁺-Depolarized Rat Aorta Rings

				32 to 51					
									
compd				% of residual insulin release (mean ± SEM (n))			IC ₅₀ (pancreas), ^b μM	EC ₅₀ (aorta), ^c μM	EC ₅₀ /IC ₅₀ ^d
				10 μM	1 μM	0.1 μM			
32	Cl	F	CH ₂ CH ₃	12.7 ± 0.9 (14)	7.3 ± 0.6 (14)	73.1 ± 3.0 (24)	0.20	42.4 ± 2.8 (6)	212
33	Cl	F	CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.5 ± 0.6 (12)	37.6 ± 2.3 (13)	92.0 ± 4.7 (23)	0.52	45.3 ± 2.5 (5)	87.1
34	Cl	F	CH(CH ₃) ₂	7.0 ± 0.6 (14)	5.7 ± 0.4 (13)	64.4 ± 3.3 (31)	0.16	41.5 ± 1.4 (6)	259.4
35	Cl	F	CH(CH ₂) ₂ ^f	12.8 ± 0.8 (13)	15.3 ± 1.4 (15)	74.5 ± 4.2 (23)	0.23	39.9 ± 1.3 (6)	173.5
36	NH-CH(CH ₃) ₂	F	CH(CH ₃) ₂		[70.1 ± 4.1 (20) at 50 μM]			>200 (4)	ND ^e
37	NH-CH ₂ CH ₂ CH ₃	F	CH ₂ CH ₂ CH ₃		[104.1 ± 4.1 (16) at 50 μM]			ND ^e	ND ^e
38	NH-CH(CH ₂) ₂ ^f	F	CH(CH ₂) ₂ ^f		[88.6 ± 3.8 (14) at 50 μM]			ND ^e	ND ^e
42	F	F	CH ₂ CH ₃	10.5 ± 1.2 (15)	22.0 ± 0.9 (15)	94.5 ± 5.1 (16)	0.37	66.7 ± 8.5 (4)	180.3
43	F	F	CH(CH ₃) ₂	6.1 ± 0.5 (11)	22.9 ± 2.3 (12)	81.6 ± 3.4 (16)	0.30	102.4 ± 15.2 (4)	341.3
44	F	F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	42.3 ± 2.5 (15)	86.9 ± 3.2 (16)		5.68	>30 (4)	>5.3
49	Cl	OCH ₃	CH ₂ CH ₃	7.2 ± 0.6 (15)	38.0 ± 4.1 (14)	85.3 ± 4.7 (21)	0.48	8.1 ± 0.9 (5)	16.9
50	Cl	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	7.7 ± 0.7 (15)	20.6 ± 1.9 (13)	73.8 ± 4.1 (19)	0.24	37.0 ± 2.7 (6)	154.2
51	Cl	OCH ₃	CH(CH ₂) ₂ ^f	9.2 ± 0.8 (14)	38.1 ± 3.0 (14)	90.0 ± 4.6 (16)	0.51	23.4 ± 1.4 (5)	45.9
3	H	F	CH(CH ₃) ₂	3.7 ± 0.6 (13) ^e	47.3 ± 3.7 (23) ^e	96.9 ± 4.9 (16) ^e	0.76	43.1 ± 10.7 (5) ^e	56.7
4	H	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	8.5 ± 0.9 (24)	67.6 ± 4.3 (20)		1.75	274.0 ± 19.0 (5)	156.6

^a Published results (ref 40). ^b Drug concentration giving 50% inhibition of insulin release (estimated value). ^c Drug concentration giving 50% relaxation of the 30 mM KCl induced contraction of rat aorta rings (mean ± SEM (n)). ^d Estimated selectivity ratio. ^e Cyclobutyl. ^f ND: not determined.

replacement of the chlorine atom in the 7-position by a fluorine, a bromine atom, or a methoxy group had little impact on the effect of the drugs. Among these newly described drugs, compounds belonging to the 6-chloro-7-fluoro-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide series (32–35), and more specifically the 3-ethyl (32), the 3-isopropyl (34), and the cyclobutyl (35) derivatives, can be considered as among the most potent inhibitors of insulin release reported to date.

The myorelaxant effect of these compounds was evaluated on the contractile activity of KCl-depolarized rat aorta rings. Results are presented in Tables 1 and 2 as the EC₅₀ values, together with the EC₅₀/IC₅₀ ratio, which reflects the apparent tissue selectivity (vascular versus pancreatic) of the drugs. As previously noted with 3-alkyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides,⁴⁴ the introduction of two chlorine atoms in the 6 and 7 positions (compounds 22–27) led to a sizable increase in myore-

laxant activity, in comparison with their previously reported 7-chloro-substituted analogues,⁴⁰ except for the hindered 3-hexylamino-substituted compound (28). A marked enhancement in vasorelaxant activity was also noticed in the 6-chloro-7-methoxy series (49–51) (compare 50 to its 7-methoxy counterpart 4). By contrast, in the 6-chloro-7-fluoro and in the 6-chloro-7-bromo series, the introduction of a chlorine atom in the 6-position failed to exert any obvious impact (30 vs its 7-bromo counterpart 52 and 34 vs 3). As reported previously with the 3-alkylamino-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides,⁴⁰ the presence of two fluorine atoms on the benzene ring (compounds 42–44) was deleterious for the myorelaxant activity of the drugs. The presence of a hindered group in the 3-position, such as *n*-hexyl (compound 28), was also clearly unfavorable to myorelaxant activity.

Comparison of these *in vitro* results by means of the EC_{50}/IC_{50} ratio allows us to assess the apparent tissue selectivity (vascular versus pancreatic) of the compounds. Drugs of the 6,7-dichloro series (22–27), and more specifically the 3-ethylamino and the 3-isopropylamino derivatives (22 and 24), highly potent on pancreatic B-cells, were characterized by a decrease in tissue selectivity in comparison with compound 2. The 7-bromo derivatives (29–31) expressed a moderate selectivity for the pancreatic tissue. As previously noted with monosubstituted 7-fluoro- and 7-methoxy-3-alkylaminobenzothiadiazine 1,1-dioxides,^{40,42} the presence of at least one fluorine atom or one methoxy group in the 7-position of the benzothiadiazine ring led to drugs more selective for the pancreatic tissue. 6-Chloro-7-fluoro-3-ethylamino (32), 6-chloro-7-fluoro-3-isopropylamino (34), 6-chloro-7-fluoro-3-cyclobutylamino (35), and 6,7-difluoro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (43) were identified as the most promising compounds in terms of insulin inhibitory activity ($IC_{50} \leq 0.3 \mu M$) and pancreatic selectivity (EC_{50}/IC_{50} ratio up to 340).

Taken as a whole, such *in vitro* results indicate that a halo substitution in the 6-position of the 7-substituted 3-alkylamino-1,2,4-benzothiadiazine ring yielded an increase in inhibitory activity on the insulin-releasing process, while the myorelaxant potency of the drugs was maintained or enhanced according to the nature of the substituent group in the 7-position.

Compound 34 (6-chloro-7-fluoro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide), namely, BPDZ 259, was found to be the most potent compound acting on pancreatic B-cells. Therefore, further radioisotopic and fluorimetric experiments were performed in order to characterize its mechanism of action. The drug (10 μM) provoked a rapid, sustained, and marked increase in ^{86}Rb outflow (^{42}K substitute) from prelabeled and perfused rat pancreatic islets (Figure 2). The stimulatory effect of 34 on ^{86}Rb FOR (fractional outflow rate) was reversible and totally abolished by the presence of glibenclamide (10 μM), a hypoglycemic sulfonylurea known to block K_{ATP} channels^{48,49} (Figure 2). Such data indicate that BPDZ 259 induces an increase in membrane K^+ permeability through the activation of ATP-sensitive K^+ channels.^{22,41,50}

Activation of K_{ATP} channels might be expected to hyperpolarize the plasma membrane and to restrict

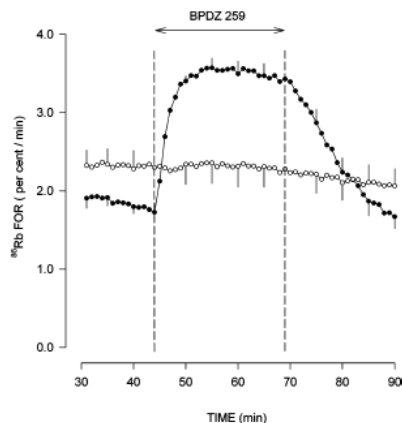


Figure 2. Effect of 10 μM BPDZ 259 (34) on ^{86}Rb outflow from rat pancreatic islets perfused throughout in the absence (●) or presence (○) of 10 μM glibenclamide. Basal media contained 5.6 mM glucose and extracellular Ca^{2+} . Mean values ($\pm SEM$) are from six individual experiments.

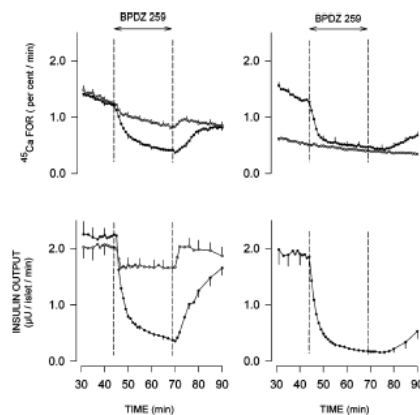


Figure 3. (Left panels) Effect of 100 nM (○) and 1 μM (●) BPDZ 259 (34) on ^{45}Ca outflow (upper) and insulin release (lower) from pancreatic islets perfused throughout in the presence of 16.7 mM glucose. Basal media contained extracellular Ca^{2+} . (Right panels) Effect of 10 μM BPDZ 259 (34) on ^{45}Ca outflow (upper) and insulin release (lower) from pancreatic islets perfused throughout in the presence of 16.7 mM glucose. Basal media contained extracellular Ca^{2+} (●) or were deprived of Ca^{2+} and enriched with EGTA (○). Mean values are from four to six individual experiments.

Ca^{2+} inflow through voltage-dependent Ca^{2+} channels. In agreement with this, Figure 3 (upper panels) clearly documents an inhibitory effect of 34 on ^{45}Ca outflow from rat pancreatic islets exposed to 16.7 mM glucose and extracellular Ca^{2+} . Under such experimental conditions, a decrease in ^{45}Ca FOR is known to result from a

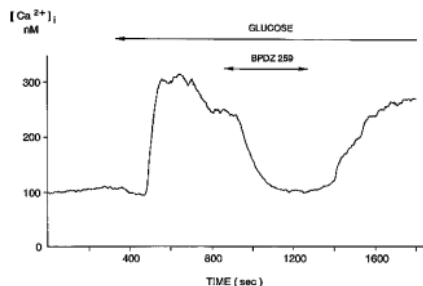


Figure 4. Effect of 1 μ M BPDZ 259 (**34**) on glucose (20 mM) induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. Basal media contained 2.8 mM glucose and extracellular Ca^{2+} . Each graph is a representative experiment conducted on a single cell.

reduction in ^{45}Ca entry through voltage-sensitive Ca^{2+} channels.⁵⁰ This proposal is further confirmed by the lack of effect of **34** on ^{45}Ca outflow from pancreatic islets perfused in the absence of extracellular Ca^{2+} (Figure 3, right upper panel).

The inhibitory effect of **34** on ^{45}Ca FOR was sustained, reversible, and concentration-dependent. The paired difference in ^{45}Ca FOR before (40–44 min) and during (60–68 min) exposure to 100 nM, 1 μ M, and 10 μ M **34** averaged 0.40 ± 0.02 , 0.78 ± 0.04 , and 0.80 ± 0.03 %/min, respectively.

Moreover, the effect of **34** on ^{45}Ca outflow was accompanied by a concentration-dependent reduction in insulin output. The effect of **34** on the insulin-releasing process can be viewed as the result of the decrease in $^{45}Ca^{2+}$ entry because the dynamic measurement of the insulin secretory rate displayed a time course parallel to that of the ^{45}Ca FOR response.

Incidentally, the cationic and secretory responses to **34** were clearly reversible, indicating that the drug did not damage the pancreatic B-cells.

A decrease in Ca^{2+} entry as mediated by **34** should provoke a reduction in the cytosolic Ca^{2+} concentration. Such an effect of **34** is attested by calcium fluorimetry experiments, indicating that the drug was able to counteract the rise in cytosolic Ca^{2+} provoked by an insulinotropic glucose concentration (Figure 4).

Altogether, these radioisotopic and fluorimetric data suggest that in insulin-secreting cells compound **34** activates K_{ATP} channels. This in turn reduces Ca^{2+} entry, decreases the cytosolic Ca^{2+} concentration, and ultimately inhibits insulin output. Such a view is further supported by the failure of **34** to affect the increase in ^{45}Ca outflow from pancreatic islets exposed to 50 mM extracellular K^+ (Figure 5). Indeed, the ^{45}Ca response to high K^+ is known to be sensitive to Ca^{2+} channel blockers but resistant to potassium channel openers.^{22,41,51}

Conclusions

Having previously explored the 7-monosubstituted 3-alkylamino-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as putative K_{ATP} channel openers, we synthesized and examined several 3-alkylamino derivatives substituted in

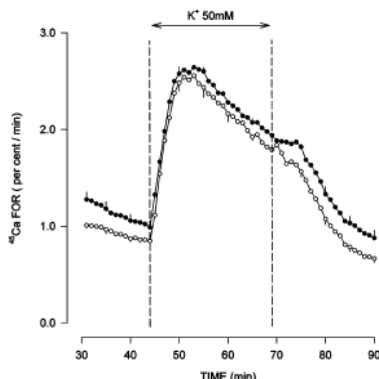


Figure 5. Effect of a rise in the extracellular K^+ concentration from 5 to 50 mM on ^{45}Ca outflow from rat pancreatic islets perfused throughout in the absence (○) or presence (●) of 10 μ M BPDZ 259 (**34**). Basal media contained 2.8 mM glucose and extracellular Ca^{2+} . Mean values ($\pm$ SEM) are from four individual experiments.

the 6 and 7 positions by different halogen atoms or by a methoxy group. The effects of these compounds were characterized in two different models: rat insulin-secreting cells and rat aorta rings. The *in vitro* data indicate that halo-substitution in the 6-position of the 7-substituted 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine ring enhanced the inhibitory effect on insulin release, while the myorelaxant properties of the drugs were unaffected or increased according to the nature of the substituent in the 7-position. A fluorine atom and a methoxy group were found to be substituents leading to marked tissue selectivity (pancreatic vs aortic).

Radioisotopic and fluorimetric experiments performed with the most potent drug inhibiting the insulin secretory rate, compound **34** (6-chloro-7-fluoro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide), also named BPDZ 259, confirmed that the drug activated the K_{ATP} channels. Thus, BPDZ 259, a potent and selective pancreatic K_{ATP} channel opener, might be considered as a valuable substitute for diazoxide in the treatment of glucose homeostasis disorders.

Materials and Methods

Chemistry. Melting points were determined on a Büchi-Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FT spectrophotometer (Perkin-Elmer). The ^1H NMR spectra were taken on a Bruker AW-80 instrument, on a Bruker AM-400, and on a Bruker AM-500 (Bruker Belgium, Brussels, Belgium) in DMSO- d_6 with HMDS (hexamethyldisiloxane) or TMS (tetramethylsilane) as internal standard. Chemical shifts are reported in δ units (ppm) relative to internal HMDS. In the data presentation, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, b = broad are used. Elemental analyses (C, H, N, S) were realized on a Carlo-Erba EA 1108 elemental analyzer and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. All reactions were routinely checked by TLC on Merck 60F 254 silica gel (Merck, Darmstadt, Germany).

2-Amino-4,5-dichlorobenzenesulfonamide (**14**).⁵² 3,4-Dichloroaniline (6, 20 g, 0.0123 mol) was added portionwise

to chlorosulfonic acid (70 mL) cooled in an ice/water bath. The suspension was then refluxed and supplemented after 1 h with thionyl chloride (20 mL). The reflux was maintained for another 30 min. After cooling, the mixture was poured on ice and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The crude residue of 2-amino-4,5-dichlorobenzenesulfonyl chloride (10) was dissolved in dioxane (50 mL) and added dropwise to a 10% w/v aqueous solution of ammonia (100 mL). After 10 min of being stirred, the solution was concentrated under reduced pressure to a small volume. The yellow-brown precipitate obtained was collected by filtration and washed with water. The crude product was suspended in water, and this suspension was adjusted to pH 12 with 2.5 M NaOH. The resulting solution was treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl. The precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in MeOH/water (44%). Mp 175–178 °C (lit., 175–178 °C²²).

2-Amino-5-bromo-4-chlorobenzenesulfonamide (15).²³ 4-Bromo-3-chloroaniline (7, 2 g, 0.0097 mol) was added portionwise to chlorosulfonic acid (8 mL) cooled in an ice/water bath. The suspension was then heated at 150 °C for 1 h. After cooling, the mixture was poured onto ice and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The crude residue of 2-amino-5-bromo-4-chlorobenzenesulfonyl chloride (11) was dissolved in dioxane (10 mL) and added dropwise to a 10% w/v aqueous solution of ammonia (50 mL). After 30 min of being stirred, the solution was treated with charcoal, filtered, and concentrated under reduced pressure to a small volume. The yellow-brown precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and dried (42%). Mp 177–180 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₆H₅BrClN₂O₂S) C, H, N, S.

2-Amino-4-chloro-5-fluorobenzenesulfonamide (16). 3-Chloro-4-fluoroaniline (8, 2 g, 0.0137 mol) was added portionwise to chlorosulfonic acid (6 mL) cooled on an ice/water bath. The suspension was heated at 150 °C and supplemented after 1 h with thionyl chloride (1 mL). The reflux was maintained for another 30 min. After cooling, the mixture was poured onto ice and the precipitate was filtered off. The crude residue of 2-amino-4-chloro-5-fluorobenzenesulfonyl chloride (12) was dissolved in dioxane (10 mL) and added dropwise to a 10% w/v aqueous solution of ammoniac (50 mL). After the mixture was stirred for 30 min, concentration under reduced pressure to a small volume gave rise to a precipitate of the title compound (45%). Mp 178–180 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₆H₅ClF₂O₂S) C, H, N, S.

2-Amino-4,5-difluorobenzenesulfonamide (17). 3,4-Difluoroaniline (9, 8.7 g, 0.067 mol) was added portionwise to chlorosulfonic acid (26 mL) cooled on an ice/water bath. The mixture was refluxed for 90 min. After cooling, the mixture was supplemented with thionyl chloride (10 mL) and refluxed for another 90 min. The mixture was poured onto ice and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The crude residue of 2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonyl chloride (13) was dissolved in dioxane (30 mL) and added dropwise to a 10% w/v aqueous solution of ammonia (100 mL). After the mixture was stirred for 30 min, concentration under reduced pressure to a small volume gave rise to a precipitate of the title compound (57%). Mp 129–130 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₆H₅F₂N₂O₂S) C, H, N, S.

6,7-Dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (18). The title compound was obtained as described in the literature,⁴⁶ starting from 2-amino-4,5-dichlorobenzenesulfonamide (14).

7-Bromo-6-chloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (19). 2-Amino-5-bromo-4-chlorobenzenesulfonamide (15, 0.2 g, 0.7 mmol) and 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (0.45 g, 0.0025 mol) were dissolved in dioxane (3 mL). The mixture was heated under reflux for 2 h. The

solvent was removed under reduced pressure, and the residue was triturated with water. The resulting solution was adjusted to pH 12 with 2.5 M NaOH, treated with charcoal, and filtered. The filtrate was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl. The precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and crystallized in acetone/*n*-hexane (59%). Mp 261–264 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₆BrClN₄O₂S) C, H, N, S.

6-Chloro-7-fluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (20). 2-Amino-4-chloro-5-fluorobenzenesulfonamide (16, 4 g, 0.0178 mol) and 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (8.84 g, 0.05 mol) were dissolved in dioxane (60 mL). The mixture was heated under reflux for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was triturated with water. The resulting solution was adjusted to pH 12 with 2.5 M NaOH, treated with charcoal, and filtered. The filtrate was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl. The precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and dried (48%). Mp 271–275 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₆ClF₂N₄O₂S·H₂O) C, H, N, S.

6,7-Difluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (21). 2-Amino-4,5-difluorobenzenesulfonamide (17, 5.5 g, 0.026 mol) and 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (15 g, 0.084 mol) were dissolved in dioxane (50 mL). The mixture was heated under reflux for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was triturated with water. The resulting solution was adjusted to pH 3–4 with 12 M HCl, and the precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in acetone/diethyl ether (35%). Mp 264–266 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₆F₂N₄O₂S) C, H, N, S.

6,7-Dichloro-3-(ethylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (22). A mixture of 6,7-dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.00157 mol) and a 70% w/v aqueous solution of ethylamine (5 mL) was heated in a sealed vessel for 5 h at 150 °C. After the mixture was cooled, the excess amine was eliminated by distillation under reduced pressure. The residue was suspended in water and stirred for 1 h. The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in MeOH/water (60%). Mp 308–310 °C (lit., 302–304 °C²⁰); IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₈H₈Cl₂N₃O₂S) C, H, N, S.

6,7-Dichloro-3-(propylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (23). The title compound was obtained as described for 22, starting from 6,7-dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.00157 mol) and propylamine (5 mL). The final product was crystallized in MeOH/water (65%). Mp > 300 °C (lit., 314–315 °C²⁰); IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₁₁Cl₂N₃O₂S·H₂O) C, H, N, S.

6,7-Dichloro-3-(isopropylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (24). The title compound was obtained as described for 22 starting from 6,7-dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.00157 mol) and isopropylamine (5 mL). The final product was crystallized from hot MeOH (58%). Mp 296–298 °C (lit., 289–291 °C²⁰); IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₀H₁₁Cl₂N₃O₂S·H₂O) C, H, N, S.

3-Allylamino-6,7-dichloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (25). A mixture of 6,7-dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.00157 mol) and allylamine (5 mL) was heated in a sealed vessel for 3 h at 140 °C. The excess amine was eliminated by distillation under reduced pressure. The residue was suspended in water, and the pH was adjusted to 3–4 with concentrated HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in MeOH/water (29%). Mp 298–301 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₈Cl₂N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclopropylamino-6,7-dichloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (26). A mixture of 6,7-dichloro-3-(1*H*-

imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.001 57 mol) and cyclopropylamine (5 mL) was heated in a sealed vessel for 5 h at 150 °C. The excess amine was eliminated by distillation under reduced pressure. The residue was suspended in water, and the pH was adjusted to 12 with 2.5 M NaOH. The solution was treated with charcoal and filtered, and the pH of the filtrate was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl. The precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in hot MeOH (62%). Mp 295–297 °C (lit., 282–285 °C²⁰); IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₉Cl₂N₃O₂S) C, H, N, S.

3-Cyclobutylamino-6,7-dichloro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (27). 6,7-Dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.001 57 mol) was dissolved in dioxane (4 mL) and supplemented with cyclobutylamine (1 mL). The mixture was heated in a sealed vessel for 8 h at 140 °C. The excess amine was eliminated by distillation under reduced pressure. The residue was suspended in water (20 mL), and the pH was adjusted to 12 with 2.5 M NaOH. The solution was treated with charcoal and filtered, and the pH was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in hot MeOH (60%). Mp 320–326 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₄H₁₁Cl₂N₃O₂S) C, H, N, S.

6,7-Dichloro-3-(hexylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (28). A mixture of 6,7-dichloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (18, 0.5 g, 0.001 57 mol) and *n*-hexylamine (5 mL) was refluxed for 4 h. The excess amine was eliminated by distillation under reduced pressure. The residue was suspended in water and stirred for 1 h. The precipitate was collected by filtration, washed with water, dried, and crystallized in hot MeOH (64%). Mp 282–286 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₃H₁₇Cl₂N₃O₂S) C, H, N, S.

7-Bromo-6-chloro-3-(ethylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (29). The title compound was obtained as described for 22, starting from 7-bromo-6-chloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (19, 0.5 g, 0.001 38 mol) and an aqueous solution of ethylamine (70%, 5 mL). The final product was crystallized from hot MeOH (60%). Mp >290 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₉H₈BrClN₃O₂S) C, H, N, S.

7-Bromo-6-chloro-3-(isopropylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (30). The title compound was obtained as described for 22, starting from 7-bromo-6-chloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (19, 0.5 g, 0.001 38 mol) and isopropylamine (5 mL) (62%). IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Mp >290 °C. Anal. (C₁₀H₁₁BrClN₃O₂S) C, H, N, S.

7-Bromo-6-chloro-3-(cyclobutylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (31). The title compound was obtained as described for 27, starting from 7-bromo-6-chloro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (19, 0.5 g, 0.001 38 mol) and cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL) (58%). Mp >290 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₁H₁₁BrClN₃O₂S) C, H, N, S.

6-Chloro-3-(ethylamino)-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (32). The title compound was obtained as described for 22, starting from 6-chloro-7-fluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (20, 0.5 g, 0.001 67 mol) and a 70% w/v aqueous solution of ethylamine (5 mL) (65%). Mp >290 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₉H₈ClFN₃O₂S) C, H, N, S.

6-Chloro-7-fluoro-3-(propylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (33). The title compound was obtained as described for 22, starting from 6-chloro-7-fluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (20, 0.5 g, 0.001 67 mol) and propylamine (5 mL) (59%). Mp 287–289 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₁₁ClFN₃O₂S) C, H, N, S.

6-Chloro-7-fluoro-3-(isopropylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (34). The title compound was ob-

tained as described for 22, starting from 6-chloro-7-fluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (20, 0.5 g, 0.001 67 mol) and isopropylamine (5 mL) (59%). Mp 228–232 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₀H₁₁ClFN₃O₂S) C, H, N, S.

6-Chloro-3-(cyclobutylamino)-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (35). The title compound was obtained as described for 27, starting from 6-chloro-7-fluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (20, 0.5 g, 0.001 67 mol) and cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL) (55%). Mp >290 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₁H₁₁ClFN₃O₂S) C, H, N, S.

7-Fluoro-3,6-di(isopropylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (36). The title compound was obtained as described for 22, starting from 6,7-difluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (21, 0.5 g, 0.001 76 mol) and isopropylamine (5 mL) (65%). Mp 234–237 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₃H₁₉FN₄O₂S) C, H, N, S.

7-Fluoro-3,6-di(propylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (37). The title compound was obtained as described for 22, starting from 6,7-difluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (21, 0.5 g, 0.001 76 mol) and *n*-propylamine (5 mL) (62%). Mp 236 °C, then 256 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₂H₁₉FN₄O₂S) C, H, N, S.

3,6-Di(cyclobutylamino)-7-fluoro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (38). The title compound was obtained as described for 27, starting from 6,7-difluoro-3-(1*H*-imidazol-1-yl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (21, 0.5 g, 0.001 76 mol) and cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL) (45%); IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Mp 258 °C, then 297 °C. Anal. (C₁₅H₁₉FN₄O₂S) C, H, N, S.

***N*-Ethyl-*N'*-(2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonyl)thiourea (39).** 2-Amino-4,5-difluorobenzenesulfonamide (17, 0.4 g, 0.0019 mol) was dissolved in dry acetone (3 mL) and supplemented with K₂CO₃ (0.32 g) and ethyl isothiocyanate (0.3 mL). The mixture was heated at 60 °C for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was suspended in water (25 mL). The solution was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl and stirred at room temperature for a few hours. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The crude product was used without further purification (52%).

***N*-Isopropyl-*N'*-(2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonyl)thiourea (40).** The title compound was obtained as described for 39, starting from 2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonamide (17) and isopropyl isothiocyanate. The crude product was used without further purification (48%).

***N*-Isobutyl-*N'*-(2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonyl)thiourea (41).** The title compound was obtained as described for 39, starting from 2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonamide (17) and isobutyl isothiocyanate. The crude product was used without further purification (37%).

6,7-Difluoro-3-(ethylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (42). *N*-Ethyl-*N'*-(2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonyl)thiourea (39, 0.2 g, 0.68 mmol) and triethylamine (0.2 mL) were dissolved in dry THF (5 mL). The mixture was cooled in an ice/water bath and slowly supplemented with a 20% phosgene solution in toluene (0.5 mL). After 2 h at 0 °C, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was triturated with water, adjusted to pH 12 with 2.5 M NaOH, treated with charcoal, and filtered. The filtrate was adjusted to pH 3–4 with concentrated HCl, and the precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and dried (75%). Mp 246–252 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₉H₈F₂N₃O₂S) C, H, N, S.

6,7-Difluoro-3-(isopropylamino)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (43). The title compound was obtained as described for 42, starting from 2*N*-isopropyl-*N'*-(2-amino-4,5-difluorobenzenesulfonyl)thiourea (40) (68%). Mp 242–244 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₁₁F₂N₃O₂S) C, H, N, S.

6,7-Difluoro-3-isobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (44). The title compound was obtained as described for 42, starting from 2*N*-isobutyl-*N'*-(2-amino-4,5-difluorobenzene)sulfonylthiourea (41) (65%). Mp >270 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₁H₁₃F₂N₃O₂S) C, H, N, S.

6-Chloro-7-methoxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (46). Chlorosulfonyl isocyanate (5 mL, 0.057 mol) and nitroethane (50 mL) were mixed together in a closed, dried vessel. The mixture was cooled at -40 °C (acetone and carbogene) and protected from moisture during the slow addition, under vigorous stirring, of 3-chloro-4-methoxyaniline (45, 4.8 g, 0.03 mol) dissolved in nitroethane (10 mL). At the end of the addition, anhydrous AlCl₃ (5 g, 0.0375 mol) was added to the resulting suspension and the mixture was heated at 110 °C for 20 min. The hot solution was poured onto ice (200 g), and after the mixture was stirred and after complete melting of the ice, the resulting precipitate was collected by filtration and dissolved in an aqueous solution of sodium hydrogenocarbonate (5 g/150 mL). The solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 by means of 12 N HCl. The white precipitate that appeared was collected by filtration, washed with water, and dried (28%). Mp 277–279 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₈H₇ClN₂O₄S) C, H, N, S.

6-Chloro-7-methoxy-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (47). A mixture of 6-chloro-7-methoxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (46, 2.62 g, 0.01 mol) and phosphorus pentasulfide (4.5 g) in anhydrous pyridine (25 mL) was refluxed for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in an aqueous solution of NaOH (5 g/100 mL). The solution was treated with charcoal and filtered, and the filtrate was adjusted to pH 1 by means of 12 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and suspended in an aqueous solution of sodium hydrogenocarbonate (3 g/100 mL). The suspension was heated until most of the insoluble material dissolved and was then treated with charcoal and filtered. The filtrate was adjusted to pH 1 with 12 N HCl, and the precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. Mp 233–235 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₈H₇ClN₂O₃S₂) C, H, N, S.

6-Chloro-7-methoxy-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Monohydrate (48). 6-Chloro-7-methoxy-3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (47, 0.47 g, 0.0017 mol) was dissolved in a hydromethanolic 1:1 solution of sodium hydrogenocarbonate (1 g/10 mL), and an excess of methyl iodide (1.8 mL) was added. After 30 min of being stirred, the resulting suspension was adjusted to pH 5–6 by means of 6 N HCl. The suspension was concentrated under reduced pressure to half of the volume, and the white precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. Mp 271–275 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₉H₉ClN₂O₃S₂·H₂O) C, H, N, S.

6-Chloro-3-(ethylamino)-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (49). A mixture of 6-chloro-7-methoxy-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (48, 0.5 g, 0.0017 mol) and a 70% w/v aqueous solution of ethylamine (5 mL) was heated in a sealed vessel for 4 h at 120 °C. The excess amine was eliminated by distillation under reduced pressure, and the residue was dissolved in an aqueous 2% w/v solution of NaOH (20 mL). The alkaline solution was treated with charcoal and was filtered, and the filtrate was adjusted to pH 4–5 with concentrated HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The compound was recrystallized in methanol/water (75%). Mp >300 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₀H₁₂ClN₂O₃S) C, H, N, S.

6-Chloro-3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (50). The title compound was obtained as described for 49, starting from 6-chloro-7-methoxy-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (48) and isopropylamine (70%). Mp 281–283 °C; IR

(KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 80 MHz). Anal. (C₁₁H₁₄ClN₂O₃S) C, H, N, S.

6-Chloro-3-cyclobutylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (51). The title compound was obtained as described for 49, starting from 6-chloro-7-methoxy-3-methylsulfonyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate (48) and cyclobutylamine (1 mL) in dioxane (5 mL) (62%). Mp >284 °C; IR (KBr); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz). Anal. (C₁₂H₁₄ClN₂O₃S) C, H, N, S.

Biological Assays. Measurement of Insulin Release from Incubated Rat Pancreatic Islets. Pancreatic islets were isolated by the collagenase method from fed Wistar rats (180–220 g). Groups of 10 islets, each derived from the same batch of islets, were preincubated for 30 min at 37 °C in 1 mL of a physiological salt medium (in mM: NaCl 115, KCl 5, CaCl₂ 2.56, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24), supplemented with 2.8 mM glucose and 0.5% (w/v) dialyzed albumin (fraction V, Sigma), and equilibrated against a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%).

The islets were then incubated at 37 °C for 90 min in 1 mL of the same medium containing 16.7 mM glucose and the reference compound or the benzothiadiazine derivative. The release of insulin was measured radioimmunologically using rat insulin as a standard.⁴¹

Residual insulin release was expressed as a percentage of the value recorded in control experiments (100%), i.e., in the absence of drug and presence of 16.7 mM glucose.

Measurement of the Contractile Activity in Rat Aorta. All experiments were performed with aortae removed from fed Wistar rats (180–220 g). A section of the aorta was cleared of adhering fat and connective tissue and was cut into transverse rings (3–4 mm long). The endothelium was removed by rubbing the intimal surface with forceps. The segments were suspended under 1.5 g of tension by means of steel hooks in an organ bath containing 20 mL of a Krebs bicarbonate buffered solution of the following composition (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucose 5. The physiological solutions were maintained at 37 °C and bubbled continuously with a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%). The isometric contractions of the aortic rings were measured with a force-displacement transducer. After 60 min of equilibration, the rings were exposed to 30 mM KCl. When the tension had stabilized, the drugs were added to the bath at increasing concentrations until maximal relaxation (or until 0.3 mM). The relaxation response was expressed as the percentage of the contractile response to KCl. The ED₅₀ values (drug concentration evoking 50% inhibition of the plateau phase induced by KCl) were assessed from dose-response curves using Datanalyst software (EMKA Technologies, France).⁵⁹

Measurement of ⁸⁶Rb and ⁴⁵Ca Outflow and Insulin Release from Perfused Rat Pancreatic Islets. Experiments were performed with pancreatic islets isolated from fed Wistar rats (180–220 g). The media used for incubating, washing, and perfusing the islets consisted of a physiological salt medium (in mM: NaCl 115, KCl 5, CaCl₂ 2.56, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24) supplemented with 0.5% (w/v) dialyzed albumin (fraction V, Sigma) and gassed with O₂ (95%)/CO₂ (5%).

The methods used to measure ⁸⁶Rb (⁴²K substitute) outflow, ⁴⁵Ca outflow, and insulin release from perfused pancreatic islets have been described previously.^{22,61} Briefly, groups of 100 islets were incubated for 60 min in the physiological medium containing 16.7 mM glucose and either ⁸⁶Rb (0.15–0.25 mM, 50 μCi/mL) or ⁴⁵Ca (0.02–0.04 mM, 100 μCi/mL). After incubation, the islets were washed four times with a non-radioactive medium and then placed in a perfusion chamber. The perfusate was delivered at a constant rate (1.0 mL/min). From 31 to 90 min, the effluent was continuously collected over successive periods of 1 min each. An aliquot of the effluent (0.5 mL) was used for scintillation counting, while the remainder was stored at -20 °C for insulin radioimmunoassay. At the end of the perfusion, the radioactive content of the islets was also determined. The outflow of ⁸⁶Rb or ⁴⁵Ca (cpm/min) was expressed as a fractional outflow rate (% of instantaneous

islet content/min, FOR). Some media contained no CaCl_2 and were enriched with 0.5 mM EGTA (Sigma).

When high concentrations (50 mM) of extracellular K^+ were used, the concentration of extracellular NaCl was lowered to keep the osmolality constant.

BPDZ 259 was dissolved in dimethyl sulfoxide, which was added to both control and test media at final concentrations not exceeding 0.1% (v/v).

Results are expressed as the mean ($\pm$ SEM) together with the number of individual experiments (n). The inhibitory effect of BPDZ 259 on ^{45}Ca outflow and insulin release from islets perfused in the presence of 16.7 mM glucose was taken as the difference between the mean value for ^{45}Ca outflow or insulin output recorded in each individual experiment between the 40–44 and 60–68 min of perfusion.

The magnitude of the increase in ^{45}Ca outflow was estimated in each individual experiment from the integrated outflow of ^{45}Ca observed during stimulation (45–68 min) after correction for the basal value (40–44 min).

Measurement of Cytosolic Ca^{2+} Concentration from Single Rat Pancreatic Islet Cells. Pancreatic islets were disrupted in a Ca^{2+} -depleted medium and then centrifuged through an albumin solution to remove debris and dead cells. Cells were seeded onto glass coverslips and maintained in tissue culture for 72 h before use. The cells were then incubated with fura-2 AM ($2\ \mu\text{mol/L}$) (Molecular Probes) for 1 h. The medium used to perfuse the cells contained the following (in mM): NaCl 115, KCl 5, CaCl_2 2.56, MgCl_2 1, NaHCO_3 24, glucose 2.8. The medium was gassed with O_2 (95%)/ CO_2 (5%). Fura-2 fluorescence of single-loaded cells was measured by use of dual-excitation microfluorimetry with a Spex photometric system (Optilas, Alphen aan den Rijn, Holland). The excitation and emission wavelengths were set at 340/380 and 510 nm, respectively.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ was calculated as previously described.⁸⁵ The experiment was repeated with different cell populations.

Acknowledgment. This study was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium) from which P. de Tullio is Research Associate and P. Lebrun is Research Director. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of D. Dewalque, M. P. Fraikin, J. Sergiooris, and A. Van Praet.

Supporting Information Available: Elemental analysis results and IR and ^1H NMR spectra of the newly synthesized compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Noma, A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983, 305, 147–148.
- Cook, D. L.; Hales, C. N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984, 311, 271–273.
- Bernardi, H.; Fosset, A. M.; Lazdunski, M. Purification and affinity labelling of brain [^3H]glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85, 9816–9820.
- Standen, N. B.; Quayle, J. M.; Davies, N. W.; Brayden, J. E.; Huang, Y.; Nelson, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989, 245, 177–180.
- Allard, B.; Lazdunski, M. Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 236, 419–426.
- Quayle, J. M.; Nelson, M. T.; Standen, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1997, 77, 1185–1222.
- Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L. The ABCs of ATP-sensitive potassium channels: more pieces of the puzzle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9, 553–559.
- Seino, S.; Miki, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003, 81, 133–176.
- Babenko, A. P.; Aguilar-Bryan, J. A. A view of SUR/Kir6.X K_{ATP} channels. *Annu. Rev. Physiol.* 1998, 60, 667–687.
- Dhahan, N.; Jacquet, H.; Moreau, C.; Catty, P.; Viraudou, M. A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K^+ channels by K^+ channel openers. *Mol. Pharmacol.* 1990, 56, 308–315.
- Seino, S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 1999, 61, 337–362.
- Inagald, N.; Gonio, T.; Clement, J. P. Reconstitution of IK_{ATP} : an inward rectifier subunit plus a sulfonylurea receptor. *Science* 1995, 270, 1168–1170.
- Handrock, A.; Löffler-Walz, C.; Delabar, U.; Horio, Y.; Kurachi, Y.; Quast, U. ATP-sensitive K^+ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol. Pharmacol.* 1999, 55, 832–840.
- Petersen, O. H.; Dunne, M. J. Regulation of K^+ channels plays a crucial role in the control of insulin secretion. *Diabetes* 1989, 38, S115–S120.
- Lebrun, P. Flux cationiques dans les cellules B des îlots pancréatiques et investigations pharmacologiques (Cationic flux in B-cells from pancreatic islets and pharmacological investigations). *Rev. Fr. Endocrinol. Clin., Nutr. Metab.* 1993, 34, 241–254.
- Kolb, H. A. Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1990, 15, 51–79.
- Brayden, J. E. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscles. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002, 29, 312–316.
- Seino, S.; Miki, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003, 81, 133–176.
- Cotzée, W. A. ATP-sensitive potassium channels and myocardial ischemia: why do they open? *Cardiovasc.* 1992, 6, 201–208.
- Mannhold, R. K_{ATP} channel openers: structure–activity relationships and therapeutic potential. *Mol. Rev.* 2004, 24, 213–268.
- Coghlan, M. J.; Carroll, W. A.; Gopalakrishnan, M. Recent development in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: update from a decade progress. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 1627–1653.
- Lebrun, P.; Devreux, V.; Hermann, M.; Herchuelz, A. Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 250, 1011–1018.
- Quast, U. Do the K^+ channel openers relax smooth muscle by opening K^+ channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, 14, 332–337.
- Atwal, K. S. Advances in the structure–activity relationships, mechanism of action, and therapeutic utilities of ATP-sensitive potassium channel openers. *Drug Dev. Res.* 1994, 33, 250–262.
- Gribble, F. M.; Reimann, F. Pharmacological modulation of $\text{K}(\text{ATP})$ channels. *Biochem. Soc. Trans.* 2002, 30, 333–339.
- Sebillé, S.; de Tullio, P.; Boverie, S.; Antoine, M.-H.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Recent development in the chemistry of potassium channel activators: the cromakalim analogues. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11, 1213–1222.
- Manley, P. W.; Quast, U. Structure–activity studies of potassium channel opening in pinacidil-type cyanoguanidines, nitroethenediamines, thioureas, and ureas. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2327–2340.
- Pirotte, B.; Fontaine, J.; Lebrun, P. Recent advances in the chemistry of potassium channel openers. *Curr. Med. Chem.* 1995, 2, 537–582.
- Björk, E.; Berne, C.; Kämppe, O.; Wibell, P.; Oskarsson, P.; Karlsson, F. A. Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* 1996, 45, 1427–1430.
- Alemzadeh, R.; Langley, G.; Upchurch, L.; Smith, P.; Slonim, A. E. Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998, 83, 1911–1915.
- Rasmussen, S. B.; Sørensen, T. S.; Hansen, J. B.; Mandrup-Poulsen, T.; Hornum, L.; Markholst, H. Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual beta-cells function and mass in acutely diabetic BB rats. *Horm. Metab. Res.* 2000, 32, 294–300.
- Cosgrove, K.; Antoine, M.-H.; Lee, A.; Barnes, P.; de Tullio, P.; Clayton, P.; McCloy, R.; De Lonlay, P.; Nihoul-Fekété, C.; Robert, J.; Saudubray, J.-M.; Rahier, J.; Lindley, K.; Hussain, K.; Aynsley-Green, A.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Dunne, M. BPDZ 154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels: in vitro studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, 87, 4860–4868.
- Kumar, G. K.; Dastoor, F. C.; Robayo, J. R.; Razzague, M. A. Side effects of diazoxide. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 1976, 235, 275–276.

- (34) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Fontaine, J.; Dupont, L.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Khelili, S.; Maggetto, C.; Masereel, B.; Diouf, O.; Podona, T.; Delarge, J. 3- and 4-substituted 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 937–948.
- (35) de Tullio, P.; Ouedraogo, R.; Dupont, L.; Somers, F.; Boverie, S.; Dogné, J.-M.; Delarge, J.; Pirotte, B. Synthesis and structural studies of 3-alkylamino-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides, a new class of heterocyclic compounds with therapeutic promises. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5419–5432.
- (36) Pirotte, B.; Ouedraogo, R.; de Tullio, P.; Khelili, S.; Somers, F.; Boverie, S.; Dupont, L.; Fontaine, J.; Damas, J.; Lebrun, P. 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: design, synthesis, and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1456–1466.
- (37) Pirotte, B.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Hermann, M.; Herchuelz, A.; Delarge, J.; Lebrun, P. A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1381–1386.
- (38) Boverie, S.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Somers, F.; Becker, B.; Sebille, S.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium-channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73): introduction of heteroatoms in the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 973–980.
- (39) Ouedraogo, R.; Becker, B.; Boverie, S.; Somers, F.; Antoine, M.-H.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; de Tullio, P. 2-Alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- and pyridothiadiazine 1,1-dioxides: from K⁺_{ATP} channel openers to Ca²⁺ channel blockers? *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 1759–1768.
- (40) de Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Bondo Hansen, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Toward tissue-selective pancreatic B-cells K⁺_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3342–3353.
- (41) Lebrun, P.; Arkhammar, P.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Bondo Hansen, J.; Pirotte, B. A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* **2000**, *43*, 723–732.
- (42) Dabrowski, M.; Ashcroft, F. M.; Ashfield, R.; Lebrun, P.; Pirotte, B.; Egebjerg, J.; Hansen, J. B.; Wahl, P. The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes* **2002**, *51*, 1896–1906.
- (43) Flemming, E. N.; Bodvarsdottir, T. B.; Worsaae, A.; MacKay, P.; Ståden, C. E.; Boonen, H. C.; Fridal, L.; Arkhammar, P. O. G.; Wahl, P.; Ynddal, L.; Junager, F.; Dragsted, N.; Tagmose, T. M.; Mogensen, J. F.; Koch, A.; Treppendahl, S. P.; Hansen, J. B. 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic B-cells. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4171–4187.
- (44) Topliss, J. G.; Yudis, M. D. Correlation of antihypertensive activity with structure in a series of 2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides using the substituent constant approach. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 394–403.
- (45) Wales, J. K.; Kress, S. V.; Grant, A. M.; Viktoria, J. K.; Wolff, F. W. Structure-activity relationships of benzothiadiazine compounds as hyperglycemic agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1968**, *164*, 421–432.
- (46) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Somers, F.; Boverie, S.; Lacan, F.; Delarge, J. Study of the ring closure reaction of o-aminosulfonamides with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4935–4942.
- (47) Peat, A. J.; Townsend, C.; Worley, J. F.; Allen, S. H.; Garrido, D.; Mertz, R. J.; Pföhl, J. L.; Terry, C. M.; Truax, J. F.; Vessey, R. L.; Thomson, S. A. Synthesis and evaluation of 7-substituted-3-cyclobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide derivatives as K⁺_{ATP} channel agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2977–2980.
- (48) Ashcroft, F. M.; Rosman, P. Electrophysiology of the pancreatic B-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1989**, *54*, 87–143.
- (49) Malaisse, W. J.; Lebrun, P. Mechanisms of sulfonylurea-induced insulin release. *Diabetes Care* **1990**, *13*, 9–17.
- (50) Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Herchuelz, A. Minireview: K⁺ channel openers and insulin release. *Life Sci.* **1992**, *51*, 795–806.
- (51) Lebrun, P.; Malaisse, W. J.; Herchuelz, A. Evidence for two distinct modalities of Ca²⁺ influx into pancreatic B cell. *Am. J. Physiol.* **1982**, *242*, E59–E68.
- (52) Novello, F. C.; Bell, S. C.; Abrams, E. L.; Ziegler, C.; Spargue, J. Diuretics: Aminobenzenedisulfonamides. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 965–981.
- (53) Raffa, L.; Monzani, A.; Albasini, A. Halogen derivatives of 2-aminobenzenedisulfonamide. *Farmaco* **1964**, *19*, 35–46.
- (54) Raffa, L.; Di Bella, M.; Ferrari, P.; Rinaldi, M.; Ferrari, W. Cardiovascular effect of derivatives of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *Farmacol.* **1974**, *39*, 411–423.
- (55) Becker, B.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Rigo, B.; Cosgrove, K. E.; Barnes, P. D.; Dunne, M. J.; Pirotte, B.; Lebrun, P. Synthesis and characterization of a quinolinic compound activating ATP-sensitive K⁺ channels in endocrine and smooth muscle tissues. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 375–385.
- (56) Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Kane, C.; Dunne, M.; Hermann, M.; Herchuelz, A.; Masereel, B.; Delarge, J.; de Tullio, P.; Pirotte, B. Activation of ATP-dependent K⁺ channels and inhibition of insulin release: effect of BPDZ 62. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 156–162.

JM0580050

Annexe 12

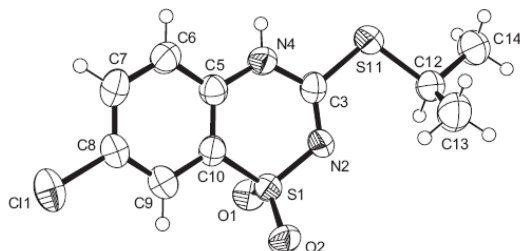
Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₁ClN₂O₂S₂

L. Dupont^{*1}, S. Boverie^{II}, P. de Tullio^{II} and B. Pirotte^{II}

^I Université de Liège, Institut de Physique - bât. B5, Unité de Cristallographie, Allée du 6 Août, 17, 4000 Liège, Belgium

^{II} Université de Liège, Département de Pharmacie - bât. B36, Service de Chimie Pharmaceutique, Avenue de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium

Received July 12, 2005, accepted and available on-line August ??, 2005; CCDC no. 1267/1595



Abstract

C₁₀H₁₁ClN₂O₂S₂, orthorhombic, *Pcab* (no. 61), *a* = 8.5908(5) Å, *b* = 12.0056(8) Å, *c* = 24.213(1) Å, *V* = 2497.3 Å³, *Z* = 8, *R*_{int}(*F*) = 0.058, *wR*_{ref}(*F*²) = 0.169, *T* = 293 K.

Source of material

The compound was synthesized by alkylation of 7-chloro-3-thioxo-3,4-dihydro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, a well known synthetic intermediate [1] with isopropyl iodide. Crystals were obtained by slow evaporation of a methanol solution.

Discussion

7-Chloro-3-isopropylsulfanyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ209), is an old compound developed initially as antimicrobial drug [2]. As it is structurally related to BPDZ73 (7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide), a reference pancreatic ATP sensitive potassium channel opener KATPACO [1,3], it was recently evaluated as putative KATPACO. The isosteric change of the 3-isopropyl chain of BPDZ73 by a 3-isopropylsulfanyl side chain led to an important change in the pharmacological profile of the drug.

The X-ray analysis of BPDZ209 demonstrated that the N4—C3 distance [1.360(5) Å] corresponds to a single bond type whereas the double bond character of N2—C3 [1.310(5) Å] is well defined. The 4*H*- rather than the 2*H*-tautomeric form is so exhibited in the crystalline state of BPDZ209 like in BPDZ73 and also in many benzothiadiazine 1,1-dioxides previously studied. The presence of an N4—H⋯O hydrogen bond and the absence of a meaningful peak near N2 in the Fourier difference map confirm this scheme. The geometry of the hydrogen bond N4—H⋯O1ⁱ [symmetry code (i) ½+*x*, ½−*y*, *z*], is characterized by the N4⋯O2ⁱ

distance of 2.826(4) Å and the N4—H4—O2ⁱ angle of 174(4)°. The C3—S11—C12—C13 torsion angle is equal to −72.3(4)°. The corresponding value in BPDZ73 is −70.7(5)°. The values of the torsion angles S1—N2—C3—N4 (8.5(6)°) and C10—S1—N2—C3 (−24.1(4)°) show that the conformation of the heterocycle ring is less planar in BPDZ209 than in BPDZ73 where the relevant angles values are 4.8(5)° and −12.3(3)°, respectively.

Table 1. Data collection and handling.

Crystal:	colorless prism, size 0.11 × 0.46 × 0.51 mm
Wavelength:	Cu K _α radiation (1.54180 Å)
μ:	57.79 cm ^{−1}
Diffractionmeter, scan mode:	Stoe-Siemens AED, ω
2θ _{max} :	136.1°
<i>N</i> (<i>hkl</i>) _{measured} , <i>N</i> (<i>hkl</i>) _{unique} :	2242, 2242
Criterion for <i>I</i> _{obs} , <i>N</i> (<i>hkl</i>) _{gt} :	<i>I</i> _{obs} > 2 σ(<i>I</i> _{obs}), 1463
<i>N</i> (<i>param</i>) _{refined} :	157
Programs:	SHELXS-97 [4], SHELXL-97 [5], ORTEP-III [6]

Table 2. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

Atom	Site	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U</i> _{iso}
H(4)	8c	0.4165	0.2924	0.4052	0.064
H(6)	8c	0.4850	0.2892	0.4993	0.067
H(7)	8c	0.4789	0.1962	0.5836	0.071
H(9)	8c	0.2331	−0.0512	0.5154	0.061
H(12)	8c	0.2404	0.1347	0.2453	0.070
H(13A)	8c	0.4289	0.0158	0.2086	0.125
H(13B)	8c	0.4372	0.0159	0.2733	0.125
H(13C)	8c	0.5594	0.0837	0.2389	0.125
H(14A)	8c	0.4728	0.2585	0.1885	0.114
H(14B)	8c	0.2975	0.2937	0.1926	0.114
H(14C)	8c	0.3447	0.1882	0.1584	0.114

* Correspondence author (e-mail: leon.dupont@ulg.ac.be)

Table 3. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

Atom	Site	x	y	z	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
S(1)	8c	0.1789(1)	0.02418(7)	0.40516(4)	0.0490(5)	0.0423(5)	0.0426(5)	-0.0005(4)	0.0000(4)	0.0019(4)
O(1)	8c	0.0215(3)	0.0626(2)	0.4110(1)	0.048(1)	0.058(2)	0.063(2)	0.003(1)	-0.002(1)	0.002(1)
O(2)	8c	0.1991(4)	-0.0932(2)	0.4006(1)	0.082(2)	0.036(1)	0.057(2)	0.002(1)	-0.001(2)	-0.002(1)
N(2)	8c	0.2550(4)	0.0843(3)	0.3525(1)	0.064(2)	0.055(2)	0.036(1)	-0.014(2)	0.003(2)	0.004(1)
C(3)	8c	0.3292(5)	0.1792(3)	0.3569(2)	0.054(2)	0.052(2)	0.039(2)	0.005(2)	-0.001(2)	-0.000(2)
N(4)	8c	0.3669(4)	0.2299(3)	0.4053(1)	0.072(2)	0.042(2)	0.046(2)	-0.006(2)	-0.002(2)	0.002(1)
C(5)	8c	0.3591(4)	0.1760(3)	0.4567(2)	0.050(2)	0.047(2)	0.044(2)	0.005(2)	0.001(2)	0.002(2)
C(6)	8c	0.4335(6)	0.2214(3)	0.5024(2)	0.069(2)	0.048(2)	0.050(2)	-0.001(2)	-0.002(2)	-0.004(2)
C(7)	8c	0.4310(5)	0.1652(4)	0.5528(2)	0.069(2)	0.064(3)	0.044(2)	0.008(2)	-0.008(2)	-0.008(2)
C(8)	8c	0.3569(5)	0.0633(4)	0.5566(2)	0.050(2)	0.056(2)	0.041(2)	0.005(2)	0.003(2)	0.006(2)
C(9)	8c	0.2831(5)	0.0172(3)	0.5123(2)	0.048(2)	0.057(3)	0.047(2)	0.003(2)	0.004(2)	0.006(2)
C(10)	8c	0.2837(4)	0.0749(3)	0.4615(1)	0.051(2)	0.046(2)	0.040(2)	0.005(2)	-0.000(2)	-0.002(2)
S(11)	8c	0.3948(2)	0.2517(1)	0.29941(4)	0.0840(8)	0.0556(6)	0.0468(5)	-0.0171(6)	0.0042(5)	0.0046(4)
C(12)	8c	0.3489(5)	0.1591(4)	0.2423(2)	0.072(3)	0.058(3)	0.043(2)	-0.008(2)	-0.002(2)	0.001(2)
C(13)	8c	0.4528(8)	0.0598(4)	0.2406(2)	0.117(4)	0.071(3)	0.061(3)	0.001(3)	0.007(3)	-0.001(2)
C(14)	8c	0.3678(7)	0.2317(4)	0.1906(2)	0.105(4)	0.074(3)	0.049(2)	-0.010(3)	-0.003(3)	0.010(2)
Cl(1)	8c	0.3590(2)	-0.0069(1)	0.61909(4)	0.0688(7)	0.0874(9)	0.0445(5)	0.0099(6)	-0.0005(5)	0.0128(5)

References

- De Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Bondo Hansen, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B.: Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **46** (2003) 3342-3353.
- Di Bella, M.; Rinaldi, M.; Fabio, U.; Manicardi, G.: Antimicrobial activity of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives. *Il Farmaco*. **27** (1972) 990-998.
- Dupont, L.; Pirotte, B.; de Tullio, P.: Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₂ClN₂O₂S. *Z. Kristallogr. NCS* **220** (2005) ???-???
- Sheldrick, G. M.: Phase Annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures. *Acta Crystallogr. A* **46** (1990) 467-473.
- Sheldrick, G. M.: SHELXL-97. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany 1997.
- Burnett, M. N.; Johnson, C. K.: ORTEP-III. Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations. Report ORNL-6895, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA 1996.

Annexe 13

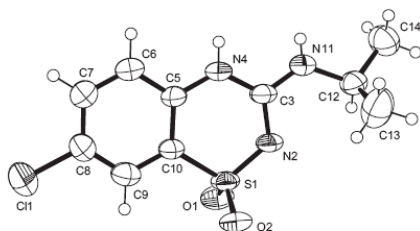
Crystalline structure of 7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₂ClN₃O₂S

L. Dupont^{*1}, B. Pirotte^{II} and P. de Tullio^{II}

^I Université de Liège, Institut de Physique - bât. B5, Unité de Cristallographie, Allée du 6 août, 17, 4000 Liège, Belgium

^{II} Université de Liège, Département de Pharmacie - bât. B36, Service de Chimie Pharmaceutique, Avenue de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium

Received April 22, 2005, accepted and available on-line July 7, 2005; CCDC no. 1267/1536



Abstract

C₁₀H₁₂ClN₃O₂S, monoclinic, *P*12₁/*n*1 (no. 14), *a* = 5.898(1) Å, *b* = 17.148(3) Å, *c* = 12.506(2) Å, β = 94.41(1)°, *V* = 1261.2 Å³, *Z* = 4, *R*_{int}(*F*) = 0.043, *wR*_{ref}(*F*²) = 0.110, *T* = 293 K.

Source of material

The compound was synthesized by a well described four steps chemical pathway starting from 4-chloroaniline [1]. Crystals were obtained by slow evaporation of a methanol solution.

Experimental details

H atoms were restrained (included as riding atoms) except H(N4) and H(N11) which were refined, with isotropic temperature parameters fixed at 1.2 *U*_{eq} of the parent atom (1.5 for methyl atoms).

Discussion

7-Chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiazine 1,1-dioxide, namely BPDZ73, was revealed to be one of the most potent and tissue-selective pancreatic B-cells ATP sensitive potassium channel opener [1,2]. Some crystallographic structures of related compounds have been determined such as 7-iodo-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiazine 1,1-dioxide (BPDZ69) [3] which is less powerful and less sensitive at the level of the pancreatic tissue.

X-ray analysis of chloro- and iodo-substituted compounds demonstrated that the N4—C3 distances [1.352(4) Å and 1.367(8) Å] correspond to a single bond type. The 4*H*- rather than the 2*H*-tautomer form is so exhibited in the crystalline state of the two compounds like in many benzothiazine 1,1-dioxides previously studied. The presence of N4—H⋯O hydrogen bond in both structures confirms this scheme. It must be emphasized that all H(N) hydrogen positions were located by Fourier difference synthesis,

and included in the refinements. Moreover, there are no significant peaks near N2 in the difference maps. In the crystal structure of BPDZ73, the N2—C3 [1.330(4) Å] and C3—N11 [1.314(4) Å] bond lengths indicate a charge delocalization along the N2—C3—N11—H⋯O1 bonds network as observed in the structure of BPDZ69 [3]. Although the symmetry in both structures is described by the same space group *P*12₁/*n*1, the packing modes are quite different. Indeed the hydrogen-bonding scheme in BPDZ73 involves the N4—H4⋯O2ⁱ and N11—H11⋯O1ⁱ bonds [symmetry code (i) $\frac{1}{2}+x, \frac{1}{2}-y, \frac{1}{2}+z$], with distances N4⋯O2ⁱ 2.811(3) Å, N11⋯O1ⁱ 2.976(3) Å, and angles N4—H4—O2ⁱ 169(3)°, N11—H11—O1ⁱ 177(4)°. The other shortest intermolecular contact is C11⋯O1ⁱ 3.593(4) Å [(ii) $-1+x, y, z$]. Whereas the stacking of the molecules in the BPDZ69 structure is characterized by three H-bonds N4—H4⋯O1ⁱⁱⁱ, N4—H4⋯O1^{iv}, N11—H11⋯O1^{iv} and by the other close intermolecular contacts N4⋯N4ⁱⁱⁱ [3.281(8) Å], O1⋯O1^v [3.172(8) Å] and I1⋯O2^{vi} [3.258(7) Å] [(iii) $1-x, 2-y, -z$; (iv) $1+x, y, z$; (v) $-x, 2-y, -z$; (vi) $-x, 2-y, 1-z$]. The values of the torsion angles inside the heterocycle shows that the BPDZ73 molecule conformation is more plane than that of BPDZ69.

Table 1. Data collection and handling.

Crystal:	colorless prism, size 0.15 × 0.23 × 0.53 mm
Wavelength:	Cu K α radiation (1.54180 Å)
μ :	42.01 cm ⁻¹
Diffractionmeter, scan mode:	Stoe-Siemens AED 4, ω
2 θ _{max} :	135.98°
<i>N</i> (<i>hkl</i>) _{measured} , <i>N</i> (<i>hkl</i>) _{unique} :	2361, 2258
Criterion for <i>I</i> _{obs} , <i>N</i> (<i>hkl</i>) _g :	<i>I</i> _{obs} > 2 σ (<i>I</i> _{obs}), 1062
<i>N</i> (<i>param</i>) _{refined} :	163
Programs:	SHELXS-97 [4], SHELXL-97 [5], ORTEP-III [6]

Table 2. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

Atom	Site	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U</i> _{iso}
H(4)	4e	0.340(6)	0.266(2)	1.003(3)	0.067
H(6)	4e	0.0554	0.3489	1.0683	0.076
H(7)	4e	-0.2646	0.4230	1.0270	0.077
H(9)	4e	-0.2766	0.3556	0.7212	0.065
H(11)	4e	0.584(6)	0.174(2)	0.970(3)	0.065
H(12)	4e	0.7043	0.1367	0.7859	0.066
H(13A)	4e	0.3785	0.0610	0.7828	0.144
H(13B)	4e	0.4647	0.0210	0.8911	0.144
H(13C)	4e	0.5909	0.0058	0.7872	0.144
H(14A)	4e	0.8455	0.0640	0.9815	0.115
H(14B)	4e	0.9707	0.1353	0.9341	0.115
H(14C)	4e	0.9659	0.0547	0.8748	0.115

* Correspondence author (e-mail: leon.dupont@ulg.ac.be)

Table 3. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

Atom	Site	x	y	z	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
S(1)	4e	0.1199(2)	0.26178(5)	0.71335(6)	0.0578(5)	0.0659(6)	0.0268(3)	0.0005(5)	-0.0039(3)	0.0006(4)
O(1)	4e	0.2184(4)	0.3180(1)	0.6441(2)	0.080(2)	0.082(2)	0.035(1)	-0.011(2)	0.007(1)	0.009(1)
O(2)	4e	-0.0480(4)	0.2115(1)	0.6578(2)	0.064(2)	0.074(2)	0.037(1)	-0.007(1)	-0.014(1)	-0.008(1)
N(2)	4e	0.3107(4)	0.2093(2)	0.7718(2)	0.059(2)	0.080(2)	0.026(1)	0.017(2)	-0.006(1)	-0.007(1)
C(3)	4e	0.3801(6)	0.2164(2)	0.8751(2)	0.053(2)	0.059(2)	0.030(2)	0.002(2)	-0.005(2)	0.000(2)
N(4)	4e	0.2851(5)	0.2655(2)	0.9435(2)	0.070(2)	0.065(2)	0.029(1)	0.015(2)	-0.011(1)	-0.003(1)
C(5)	4e	0.0898(6)	0.3091(2)	0.9184(2)	0.059(2)	0.050(2)	0.030(2)	0.006(2)	-0.002(2)	0.000(1)
C(6)	4e	-0.0088(6)	0.3508(2)	0.9980(3)	0.075(3)	0.077(3)	0.036(2)	0.015(2)	-0.004(2)	-0.005(2)
C(7)	4e	-0.2001(6)	0.3946(2)	0.9737(3)	0.070(3)	0.075(3)	0.049(2)	0.016(2)	0.007(2)	-0.004(2)
C(8)	4e	-0.2976(6)	0.3965(2)	0.8685(3)	0.059(2)	0.058(2)	0.056(2)	0.012(2)	0.001(2)	0.004(2)
C(9)	4e	-0.2074(6)	0.3550(2)	0.7905(3)	0.061(2)	0.058(2)	0.043(2)	-0.002(2)	-0.005(2)	0.007(2)
C(10)	4e	-0.0119(5)	0.3116(2)	0.8138(2)	0.050(2)	0.055(2)	0.030(2)	0.004(2)	-0.002(1)	0.001(1)
N(11)	4e	0.5474(5)	0.1718(2)	0.9144(2)	0.059(2)	0.065(2)	0.036(1)	0.011(2)	-0.007(1)	-0.004(2)
C(12)	4e	0.6645(6)	0.1129(2)	0.8531(3)	0.054(2)	0.070(2)	0.041(2)	0.008(2)	0.004(2)	-0.003(2)
C(13)	4e	0.5106(7)	0.0439(2)	0.8261(4)	0.081(3)	0.084(3)	0.124(4)	-0.002(3)	0.009(3)	-0.033(3)
C(14)	4e	0.8813(6)	0.0896(2)	0.9167(3)	0.062(3)	0.091(3)	0.076(3)	0.013(2)	0.002(2)	0.004(2)
Cl(1)	4e	-0.5363(2)	0.45397(7)	0.83870(9)	0.0738(7)	0.0924(7)	0.0846(7)	0.0297(6)	-0.0007(6)	0.0053(6)

References

1. de Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Sebillle, S.; Ouedraogo, R.; Bondo Hansen, J.; Lebrun, P.; Pirotte, P.: Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **46** (2003) 3342-3353.
2. Lebrun, P.; Arkhammar, P.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Bondo Hansen, J.; Pirotte, B.: A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* **43** (2000) 723-732.
3. Dupont, L.; Pirotte, B.; de Tullio, P.: 7-Iodo-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *Acta Crystallogr. C55* (1999) 1152-1154.
4. Sheldrick, G. M.: Phase Annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures. *Acta Crystallogr. A46* (1990) 467-473.
5. Sheldrick, G. M.: SHELXL-97. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany 1997.
6. Burnett, M. N.; Johnson, C. K.: ORTEP-III. Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations. Report ORNL-6895. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA 1996.

Annexe 14

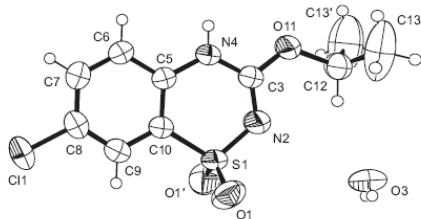
Crystal structure of 7-chloro-3-isopropoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide monohydrate, C₁₀H₁₃ClN₂O₄S · H₂O

L. Dupont^{*1}, S. Boverie^{II}, B. Pirotte^{II} and P. de Tullio^{II}

^I Université de Liège, Institut de Physique - bât. B5, Unité de Cristallographie, Allée du 6 août, 17, 4000 Liège, Belgium

^{II} Université de Liège, Département de Pharmacie - bât. B36, Service de Chimie Pharmaceutique, Avenue de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium

Received September 6, 2005; accepted and available on-line December ??, 2005; CCDC no. 1267/1643



Abstract

C₁₀H₁₃ClN₂O₄S, monoclinic, C₁₂/m1 (no. 12), $a = 16.6352(6)$ Å, $b = 6.8145(7)$ Å, $c = 12.2805(6)$ Å, $\beta = 107.921(3)^\circ$, $V = 1324.6$ Å³, $Z = 4$, $R_{\text{int}}(F) = 0.043$, $wR_{\text{ref}}(F^2) = 0.126$, $T = 293$ K.

Source of material

The compound was synthesized by alkylation of 7-chloro-3-oxo-3,4-dihydro-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, a well known synthetic intermediate [1] with isopropyl iodide. Crystals were obtained by slow evaporation of a methanol solution.

Experimental details

The space group *C*2/*m*, the highest symmetry compatible with the statistics of the reflections, seemed to be the most appropriate to describe the structure according to the criteria formulated in [2]. The refinements of the title crystal structure in the space groups *Cm* and *C*2 were nevertheless investigated (private unpublished data). In both of them large correlation matrix elements are observed mainly between parameters of atoms which are out of the molecular mean plane in *C*2 or out of the mirror plane in *Cm*, like the oxygen atoms of SO₂ and the terminal carbon atoms of the side chain. Unusually large e.s.d.s. are also obtained for some parameters of these atoms. The refinement in the group *Cm* exhibits no significantly better results than in *C*2/*m*. Quite the opposite some anisotropic displacement parameters of C12 and C13 have less satisfactory values. Moreover, a disorder of the positions of the hydrogen atoms around the water molecule cannot be resolved. The final *R* indices are slightly better in *Cm* (for instance $wR = 0.114$ for all data to be compared to 0.126 in *C*2/*m*) but the ratio number of data/number of parameters (1360/217) is smaller than that in *C*2/*m* (1298/111). The refinement in the space group *C*2 brings to a final wR index (for all data) equal to 0.113. The ratio data/parameters is 1299/175. The values of the anisotropic displacement parameters of C12 and C13 are not better than in the

*C*2/*m* refinement. The deviations of the bond lengths and angles in the non-centrosymmetric refinement from their corresponding values in the *C*2/*m* refinement are not significant (less than 1 σ) except when the highly correlated parameters are included.

Discussion

7-Chloro-3-isopropoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ229), is a putative ATP sensitive potassium channel opener (K_{ATP}PCO) [3], structurally related to BPDZ73 (7-chloro-3-isopropylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide), a reference pancreatic K_{ATP} opener [2,4]. The isosteric change of the 3-isopropylamino chain of BPDZ73 by a 3-isopropoxyl side chain led to an important change in the pharmacological profile of the drug. The crystal structure may also be compared to that of the 3-isopropylsulfanyl derivative BPDZ209 [5].

All the atoms are in the mirror plane of the *C*2/*m* space group, except O1 (linked to the atom S), C13 of the isopropoxyl group and H3 of the water molecule. The N2=C3 double bond character and the N4—C3 single bond character are well defined with distances 1.289(4) Å and 1.339(4) Å, respectively. The 4*H*- rather than the 2*H*-tautomer form is so exhibited in the crystalline state of BPDZ229 like in BPDZ209 and BPDZ73 previously studied [?]. The presence of an N4—H...O hydrogen bond and the absence of a significant peak near N2 in the Fourier difference map of the crystal structure of BPDZ229 monohydrate confirm this scheme. There are two hydrogen bonds in the structure. They both include the water molecule. The main characteristics are: N4—H4...O3, $d(\text{N4}\cdots\text{O3}) = 2.780(3)$ Å, $\angle \text{N4—H4}\cdots\text{O3} = 167(4)^\circ$; O3—H3...O1¹ (symmetry code (i) $-\frac{1}{2}+x, -\frac{1}{2}+y, z$), $d(\text{O3}\cdots\text{O1}^1) = 2.844(2)$ Å and $\angle \text{O3—H3}\cdots\text{O1}^1 = 175(4)^\circ$. Concerning the torsion angles, the largest deviation observed from the two space groups refinements (see Experimental details) is 1.7(2)° inside the phenyl ring, and 4.6(2)° (N4—C5—C10—S1) inside the thiadiazine ring. The values of N2—C3—O11—C12 and C3—O11—C12—C13 torsion angles are respectively 4.4(2)° and -111.3(2)° in *C*2, 0° and -120.7(3)° in *C*2/*m*. The corresponding values are -0.9(5)° and -70.7(4)° in BPDZ73 [?], and -4.5(4)° and -72.3(4)° in BPDZ209 [?].

Table 1. Data collection and handling.

Crystal:	colorless prism, size 0.30 × 0.46 × 0.46 mm
Wavelength:	Cu K α radiation (1.54180 Å)
μ :	41.31 cm ⁻¹
Diffractometer, scan mode:	Stoe-Siemens AED4, ω
$2\theta_{\text{max}}$:	136°
$N(\text{hkl})_{\text{measured}}$, $N(\text{hkl})_{\text{unique}}$:	1361, 1298
Criterion for I_{obs} , $N(\text{hkl})_{\text{gs}}$:	$I_{\text{obs}} > 2 \sigma(I_{\text{obs}})$, 1043
$N(\text{param})_{\text{refined}}$:	111
Programs:	SHELXS-97 [6], SHELXL-97 [7], ORTEP [8]

* Correspondence author (e-mail: leon.dupont@ulg.ac.be)

Table 2. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

Atom	Site	x	y	z	U _{iso}
H(4)	4i	0.126(3)	0	0.814(3)	0.06(1)
H(6)	4i	0.1438	0	1.0155	0.057
H(7)	4i	0.2358	0	1.1978	0.065
H(9)	4i	0.4337	0	1.0757	0.062
H(12)	4i	0.2150	0	0.5322	0.110

Table 2. Continued.

Atom	Site	x	y	z	U _{iso}
H(13A)	8j	0.0552	0.1846	0.4581	0.238
H(13B)	8j	0.1166	0.1797	0.3836	0.238
H(13C)	8j	0.1420	0.2947	0.4998	0.238
H(3)	8j	-0.014(2)	-0.087(4)	0.832(3)	0.092

Table 3. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

Atom	Site	x	y	z	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
S(1)	4i	0.35917(4)	0	0.83659(6)	0.0353(4)	0.0604(5)	0.0538(5)	0	0.0161(3)	0
O(1)	8j	0.4058(1)	0.1766(3)	0.8396(2)	0.081(1)	0.087(1)	0.084(1)	-0.034(1)	0.041(1)	-0.005(1)
N(2)	4i	0.2785(2)	0	0.7259(2)	0.045(1)	0.116(3)	0.050(2)	0	0.017(1)	0
C(3)	4i	0.2016(2)	0	0.7284(2)	0.040(1)	0.064(2)	0.046(2)	0	0.012(1)	0
N(4)	4i	0.1767(2)	0	0.8223(2)	0.035(1)	0.053(1)	0.047(1)	0	0.011(1)	0
C(5)	4i	0.2326(2)	0	0.9329(2)	0.041(1)	0.038(1)	0.048(2)	0	0.016(1)	0
C(6)	4i	0.2018(2)	0	1.0271(3)	0.047(2)	0.046(2)	0.052(2)	0	0.020(1)	0
C(7)	4i	0.2565(2)	0	1.1356(3)	0.066(2)	0.049(2)	0.051(2)	0	0.023(2)	0
C(8)	4i	0.3437(2)	0	1.1536(3)	0.060(2)	0.048(2)	0.047(2)	0	0.007(1)	0
C(9)	4i	0.3756(2)	0	1.0634(3)	0.045(2)	0.051(2)	0.055(2)	0	0.010(1)	0
C(10)	4i	0.3196(2)	0	0.9533(2)	0.040(1)	0.041(1)	0.049(2)	0	0.013(1)	0
O(11)	4i	0.1377(1)	0	0.6333(2)	0.045(1)	0.114(2)	0.043(1)	0	0.0121(9)	0
C(12)	4i	0.1541(2)	0	0.5217(3)	0.058(2)	0.179(5)	0.040(2)	0	0.016(1)	0
C(13)	8j	0.1133(4)	0.1809(7)	0.4603(3)	0.285(7)	0.122(4)	0.081(2)	-0.009(4)	0.075(4)	0.021(2)
Cl(1)	4i	0.41254(7)	0	1.29202(8)	0.0816(7)	0.1043(8)	0.0481(5)	0	-0.0017(4)	0
O(3)	4i	0.0124(2)	0	0.8335(3)	0.045(1)	0.069(2)	0.120(2)	0	0.032(2)	0

References

- De Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Bondo Hansen, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B.: Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **46** (2003) 3342-3353.
- Baur, W. H.; Tillmanns, E.: How to Avoid Unnecessarily Low Symmetry in Crystal Structure Determinations. *Acta Crystallogr. B* **42** (1986) 95-111.
- Raffa, L.; Pecorari, P.: XXXII. N²-Alkyl derivatives of 7-chloro-3-oxodihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide and 3-alkoxy derivatives of 7-chloro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. *II Farmaco* **21** (1966) 16-29.
- Dupont, L.; Pirotte, B.; de Tullio, P.: Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₂ClN₂O₂S. *Z. Kristallogr. NCS* **220** (2005) 353-354.
- Dupont, L.; Pirotte, B.; Boverie, S.; de Tullio, P.: Crystal structure of 7-chloro-3-isopropylsulfany-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, C₁₀H₁₁ClN₂O₂S₂. *Z. Kristallogr. NCS* **220** (2005) 467-468.
- Sheldrick, G. M.: Phase Annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures. *Acta Crystallogr. A* **46** (1990) 467-473.
- Sheldrick, G. M.: SHELXL-97. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany 1997.
- Burnett, M. N.; Johnson, C. K.: ORTEP-III. Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations. Report ORNL-6895. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA 1996.

Annexe 15

Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationships of ATP-Sensitive Potassium (K_{ATP}) Channel Openers Belonging to the 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-benzo- and 3-Alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-Dioxide Families

Pascal de Tullio,*^{†,‡} Léon Dupont,^{§,‡} Pierre Francotte,[†] Stéphane Counerotte,[†] Philippe Lebrun,[‡] and Bernard Pirotte[†]

Centre de recherche en Pharmacochimie des Substances Naturelles et Synthétiques, Laboratoire de Chimie Pharmacéutique, Université de Liège, 1 avenue de l'hôpital, B-4000 Liège, Belgium, Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808 route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgium, and Unité de Cristallographie, Université de Liège, 17 Allée du 6 août, B-4000 Liège, Belgium

Received May 9, 2006

Recent studies have demonstrated that selective activation of pancreatic ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels could be of clinical value in the treatment of type I and type II diabetes, obesity, and hyperinsulinemia. Taking into account these promising therapeutic opportunities, we have explored the 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyrido- and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide families. Among these series, numerous drugs were identified as highly potent and selective openers of either the pancreatic or the aortic K_{ATP} channels. Thanks to comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA), quantitative structure–activity relationship approaches using more than 100 compounds, pharmacophoric models explaining the activity and selectivity of the drugs have been elaborated. These models highlighted the importance of several chemical regions for K_{ATP} channel activation and could be very helpful for future improvement of drug potency, selectivity, or both. Moreover, an original CoMSIA analysis, using a selectivity index (SI) as a dependent variable, was also performed with the aim of identifying the structural parameters influencing tissue selectivity.

Introduction

Potassium channels regulated by changes in intracellular levels of adenosine triphosphate (K_{ATP} channels) have been identified in a wide range of cell types.^{1–8} These channels are composed of two different protein subunits in a 4 + 4 stoichiometry⁹ and link the metabolic state to the electrical activity of the cell. The K_{ATP} channel pore belongs to the inwardly rectifying potassium channel family¹⁰ (Kir6.x.), while the second subunit (SURx for sulfonylurea receptor) contains the regulatory sites for most drugs.¹⁰ Several subfamilies of variants of Kir6.x (Kir6.1 and Kir6.2) and several variants of SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) have been reported.¹¹ The combination of these different subunits can vary and lead to specific K_{ATP} channel subtypes. For example, SUR1 combines with Kir6.2 to form the insulin-secreting-cell K_{ATP} channel.¹² SUR2A and Kir6.2 subunits are found in cardiac and skeletal muscle, while the smooth muscle K_{ATP} channel is composed of SUR2B and Kir6.1 or Kir6.2 subunits.¹³ Although pancreatic K_{ATP} channels are reported to be involved in the insulin-secreting process^{14,15} and smooth muscle K_{ATP} channels in the control of muscle tone,^{16,17} the physiological roles of the different channel subtypes have not yet been thoroughly assessed.¹⁸

Activation of K_{ATP} channels led to plasma membrane hyperpolarization. As a result, agents able to activate such channels (potassium channel openers or PCOs) have been shown to reduce the activity of different excitable cells.¹⁹ Therefore,

PCOs can interfere with several important physiological processes such as insulin release from pancreatic B-cells and contractile activity from smooth muscle cells.^{21,22}

Selective activation of pancreatic K_{ATP} channels has been demonstrated to be of clinical value in the treatment of metabolic disorders such as type I and type II diabetes, obesity, and hyperinsulinemia.^{23–26} A few years ago, diazoxide, an antihypertensive agent, was the only compound reported to activate pancreatic K_{ATP} channels. Unfortunately, as a consequence of its lack of tissue selectivity, diazoxide induced side effects, such as hypertrichosis, edema, headache, and arterial hypotension.²⁷ Thus, and in order to develop a new class of therapeutic agents, the pancreatic selectivity of the PCOs appears to be a key challenge. Taking into account the promising therapeutic value of pancreatic B-cell-selective PCOs, we have been interested, during the past decade, in the development of new compounds belonging to 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyrido- and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. Such drugs can be considered as hybrid structures between 1 (diazoxide) and 2 (pinacidil) (Figure 1).^{28–35} Several modulation poles were explored (Figure 1), including the nature of the substituent on the exocyclic nitrogen atom in the pyridothiadiazine heterocycle, the number, the nature, and the position of the substituent(s) on the benzene ring of benzothiadiazine dioxides, and the presence of alkyl groups in the 2- and 4-positions. More than 200 drugs were synthesized and evaluated in vitro as potential PCOs. Among these drugs, 3 (BPDZ 44),³⁶ 4 (BPDZ 73),³⁷ 5 (BPDZ 154),³⁸ 6 (BPDZ 216),³⁹ and 7 (BPDZ 256)³⁵ (Figure 2) were identified as potent and selective pancreatic PCOs and might be considered as valuable substitutes for diazoxide in the treatment of glucose homeostasis disorders. More recently, the thienothiadiazine isomers 8 (NNC 55-0118) and 9 (NN-414)

* Corresponding author. Tel.: 32-(0)4-366-43-69. Fax: 32-(0)4-366-43-62. E-mail: P.deTullio@ulg.ac.be.

[†] Laboratoire de Chimie Pharmacéutique, Université de Liège.

[‡] Contributed equally to the work.

[§] Unité de Cristallographie, Université de Liège.

[‡] Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles.

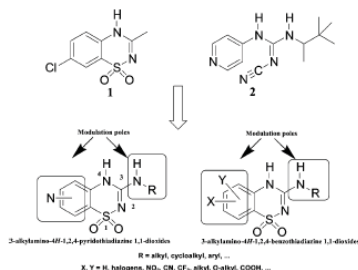


Figure 1. 3-Alkylamino-4H-1,2,4-pyrido- and 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides.

(Figure 2) have also been described and suggested for the treatment of metabolic disorders linked to insulin secretion.⁴⁰ Unfortunately, the development of NN-414 was stopped in phase II clinical trials because of an unwanted increase in blood liver enzymes, suggesting a liver toxicity.⁴¹

According to the potency and selectivity of several 3-alkylamino-4H-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides on the SUR1/Kir6.2 K_{ATP} channel subtype, the determination of a pharmacophoric model appears to be crucial for the future chemical development of new SUR1/Kir6.2-selective compounds. Partial and fractional structure–activity relationships (SAR) previously deduced through a classical approach, from *in vitro* results, led to the first pharmacophoric model for activity on the pancreatic tissue (Figure 3).²⁸

To confirm and to improve this initial model, but also to develop a pharmacophoric model for the activity on the vascular smooth muscle tissue, we decided to apply the comparative molecular field analysis (CoMFA)⁴² and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA)⁴³ approaches to a series of 150 drugs belonging to the 3-alkylamino-4H-1,2,4-pyrido- and 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide series. A particular and original CoMSIA analysis, using a selectivity index (SI) as dependent variable, was also performed with the aim of identifying the structural parameters that influence tissue selectivity.

Computational Details

Data and Biological Activity. The training and the test sets for the 3D-QSAR studies were taken from a data set consisting of 136 compounds designed and synthesized at the Department of Medicinal Chemistry of the University of Liège according to procedures described in the literature.^{28–35} The drugs were tested on two different pharmacological models: a pancreatic model onto which the ability of the compounds to inhibit glucose-induced insulin secretion was evaluated on isolated rat pancreatic islets (a model that could reflect the activation of the SUR1/Kir6.2 K_{ATP} channel subtype) and a vascular model onto which the ability of the compounds to reduce the contractile activity of KCl-depolarized rat aorta rings was measured (a model expected to reflect the activity of the drugs on the SUR2B/Kir6.1 channel subtype). The biological data obtained as IC₅₀ (drug concentration, in micromolar, inhibiting 50% of the 16.7 mM glucose-induced insulin release) and EC₅₀ (drug concentration, in micromolar, giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction) were converted into pIC₅₀ (–log IC₅₀, Table 1) and pEC₅₀ (–log EC₅₀, Table 1) values and used as

dependent variables in the 3D-QSAR analyses. A selectivity index (SI), which represents the ratio between the EC₅₀ and IC₅₀ values was also calculated, converted into pSI (log SI, Table 1), and used as a dependent variable in a particular CoMSIA analysis. The structure of the compounds and the biological data are listed in Table 1.

Molecular Modeling and Alignment. Molecular modeling studies of the compounds were performed using the SYBYL 7.0⁴² software package, Tripos Associates (St. Louis, MO), on a Silicon Graphics O2 workstation. Molecular structures were built using the built/edit commands of SYBYL starting from 27 crystal structures previously determined. All values were filled with valence, and MOPAC⁴³ (method AM1) charges were calculated for each compound. Geometry optimization was carried out using MAXIMIN2 molecular mechanics and Tripos force field supplied within SYBYL, with convergence criterion set at 0.05 kcal/(Å mol). Systematic conformational search was also carried out to recognize a reasonably low-energy conformation for each compound. For drugs exhibiting a stereogenic center on the 3-alkylamino side chain, only the racemates were introduced in the study and built as the *R*-enantiomeric structure. This necessary arbitrary choice was driven by classical SAR deduced from the comparison of biological data obtained with (*R*)- and (*S*)-BPDZ 42 and -BPDZ 44 enantiomers.⁴⁴ The orientation of the 3-alkylamino side chain deduced from these molecules after molecular modeling fixed the orientation of the chains for all the other compounds.

A superimposition of molecules was first realized by trying to minimize root-mean-square (rms) differences in the fitting of selected atoms (the 10 atoms of the fused rings) with those of a template molecule (5). The field fit procedure was then used as the second alignment criteria to increase field similarity within the entire molecular data set. In the field fit operation, the rms difference in the sum of steric and electrostatic interaction energies averaged across all lattice points between molecules in the training set and the template molecule was minimized to find the best fit. The steric and electrostatic fields were evaluated from the QSAR CoMFA FIELD process.

CoMFA and CoMSIA 3D QSAR Analysis. CoMFA and CoMSIA models were generated using SYBYL 7.0. The CoMFA steric and electrostatic fields and the CoMSIA molecular descriptor fields, expressed as steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donors, and hydrogen bond acceptors, were calculated using the default settings in SYBYL and correlated with the variations of the target properties [pIC₅₀ (–log IC₅₀), pEC₅₀ (–log EC₅₀), or pSI (log EC₅₀/IC₅₀)] using the statistical method of partial least squares (PLS).⁴³ The "leave-one-out" (LOO) cross-validated method was applied to determine the optimum number of PLS components, corresponding to the highest *r*² (*q*²) value and to the lowest standard error of prediction, *s*. The optimum of six components was used in the validation of the CoMFA model, and seven components were used in the validation of the CoMSIA analysis. The un-cross-validated models were assessed by the explained variance *r*², standard error of estimated *S*, and *F* ratio. The CoMFA analysis was only undertaken on the pIC₅₀ values to test the homogeneity of the whole data set and to evaluate the fields used in the field fit procedure. Statistical results obtained from field fit alignment criteria gave better cross-validated *q*² values than superimposition (data not shown) in the earliest studied models. Therefore, only field fit alignment was used for further CoMFA and CoMSIA studies. In the final CoMFA analysis, 126 compounds were used, omitting the most outlying compounds 135 (BPDZ 61), 122 (BPDZ 80), 123 (BPDZ 81), 44 (BPDZ 274), and 45 (BPDZ 275). The pIC₅₀ CoMSIA analysis included 130 compounds (the most outlying 135 was omitted), and the pEC₅₀ CoMSIA analysis was based on 107 compounds (omitting 67 (BPDZ 70), 70 (BPDZ 158), 93 (BPDZ 190), 24 (BPDZ 214), and 84 (BPDZ 243)). The pSI CoMSIA comprised 106 derivatives, the most outlying 12 (BPDZ 137) being excluded in addition to those omitted in the previous pIC₅₀ and pEC₅₀ CoMSIA analysis. Except for 44 (BPDZ 274) and 45 (BPDZ 275), which have the singular 7-cyano substituent included in the

^a Abbreviations: QSAR, quantitative structure–activity relationship; CoMFA, comparative molecular field analysis; CoMSIA, comparative molecular similarity indices analysis; PLS, partial least squares; pIC₅₀, –log IC₅₀; pEC₅₀, –log EC₅₀; pSI, log EC₅₀/IC₅₀.

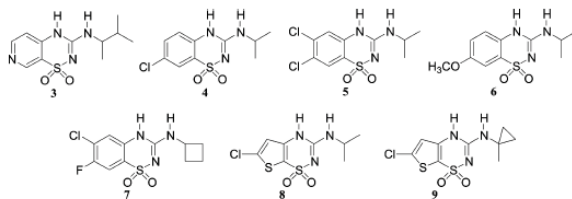


Figure 2. Chemical structures of the most interesting drugs.

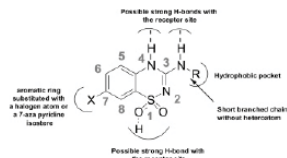


Figure 3. Initial pharmacophoric model for the activity on the pancreatic endocrine tissue.

analysis, we were unable to find any structural explanation for the removal of the other compounds.

QSAR Coefficient Contour Maps. The visualization of the results of the best CoMSIA models have been performed using "Coeff $\times$ SD" mapping option contoured by actual values. The maps were generated by interpolation of the pairwise products between the PLS coefficients (Coeff) and the standard deviations (SD) of the corresponding CoMSIA descriptor values. The contours of the CoMSIA steric map are shown in green (more bulk favorable) and yellow (less bulk favorable). The electrostatic fields contours are colored blue (positive charge favorable) and red (negative charge favorable). The contours of the hydrophobic fields are colored yellow (hydrophobic groups enhance activity) and white (hydrophilic groups enhance activity). The hydrogen bond acceptor field contours show regions where hydrogen bond acceptors (magenta) on the drugs are favorable for activity or regions where hydrogen bond donors on the receptor site enhance the activity. The regions where hydrogen bond acceptors on the receptor site enhance the activity are colored red. As the positive log EC_{50}/IC_{50} target values were used in the EC/IC CoMSIA analysis, the maps need to be interpreted as a function of the pSI quotient. Therefore, a green region in a steric map is more discriminating for the IC_{50} , whereas a yellow region is more discriminating for the EC_{50} . In each CoMSIA analysis, the contribution of the hydrogen bond donor field description is very low, and no contour map of this property is shown.

Results and Discussion

The Pancreatic Model. Results of the CoMFA Analysis. The statistical data obtained from the standard CoMFA model constructed with steric and electrostatic fields are shown in Table 2. The main objective of CoMFA analysis was to optimize the different parameters in order to find the best predictive model. Superimposition and field fit were the two alignment criteria used in our CoMFA study. Statistical results obtained from field fit alignment criteria gave better cross-validated r^2 (q^2) values than superimposition (data not shown) for the IC_{50} analysis. Therefore, only field fit alignment was used for further QSAR 3D (CoMSIA) studies. The default setting column filtering 2.0 kcal/mol was used to evaluate the optimal number of components (6) using the leave-one-out (LOO) cross-validated analysis. A q^2 value of 0.682 was obtained, indicating a good predictive capacity of the model ($q^2 > 0.5$). A satisfactory correlation

coefficient (r^2) of 0.842 for the un-cross-validated indicates self-consistency of the model. The steric and electrostatic fields contributed to the QSAR equation by 72.0% and 28.0%, respectively.

Results of the CoMSIA Analysis. The statistical data obtained from the standard CoMSIA model constructed with steric, electrostatic, hydrophobic, and H-bond donor and acceptor fields are also reported in Table 2. The default setting column filtering 2.0 kcal/mol was used to evaluate the optimal number of components (7) using the leave-one-out (LOO) cross-validated analysis. As noted for the CoMFA analysis, the q^2 (0.693) and the r^2 values (0.842) are consistent with a good predictive capacity and self-consistency of the model. The hydrophobic field markedly contributed to the QSAR equation (by 42.7%), while contribution of the H-bond acceptor field was about 23.0%, and the steric and electrostatic fields contributed 14.9% and 17.1%, respectively (the percentage of the H-bond donor field is insignificant). Surprisingly, the important steric contribution observed in the CoMFA analysis was not found in the CoMSIA corresponding model. The predicted versus actual pIC_{50} and the residual (pIC_{50} act. - pIC_{50} pred.) values of the training set are presented in the Supporting Information. It should be noticed that the residual values almost increased uniformly from 0.0002 to 0.917, independently of the nature of the substituent R, X, or Y on the molecule.

Besides internal validation with the training set, an external test set of five compounds (141–145, Figure 1) was used to validate the predictivity of the model. The corresponding predicted, actual, and residual values are given in the Supporting Information. Prior to prediction, the test set compounds were processed identically to the training set compounds as described in the Computational Details section. The predicted affinities for the test set are all in a reasonable agreement with the experimental values. No outlier values were observed among the five test set molecules.

CoMSIA Contour Map Analysis. In Figure 4, the electrostatic, steric, hydrophobic, and hydrogen bond acceptor fields are shown as contour maps for the pancreatic model.

Concerning the electrostatic field properties (Figure 4A), the large red contour region centered on the substituent group at the 7-position indicates that the presence of negative charges (due to electronegative atoms such as chlorine, fluorine, or oxygen) could be favorable for activity. A significant blue region appearing on the alkyl part of the 3-alkylamino side chain suggests that positive charges could increase activity (or negative charges decrease activity). This feature could be due to the deleterious impact of an electroattracting group (i.e., CF_3). The presence of a blue region located near the 8-position is less easily explainable, even if the presence of a nitrogen atom at this position (pyridine series) leads to a drastic decrease of activity.

Examination of the steric field map clearly demonstrates the influence of the steric environment on activity (Figure 4B). A

Table 1. Structure and Pharmacological Data of the Training and of the Test Sets Used in the 3D-QSAR Analysis

Benzenic Series Training Set

no.	X	Y	R	pIC ₅₀ ^a	pEC ₅₀ ^b	pSI ^c	no.	X	Y	R	pIC ₅₀ ^a	pEC ₅₀ ^b	pSI ^c
10	H	Br	CH(CH ₃) ₂	0.268	-0.681	0.949	66	H	I	CH(CH ₃) ₂	-0.143	-1.114	0.971
11	H	Br	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.772	-0.748	-0.023	67	H	I	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-1.290	-1.580	0.290
12	H	Br	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-1.520	-0.415	-1.105	68	H	I	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-1.712	0.046	-1.758
13	H	Br	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.616	-1.951	1.335	69	H	I	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-1.360	-0.875	-0.485
14	H	Br	CH ₃	-0.193	-1.490	1.298	70	H	I	CH(CH ₃) ₂	-1.160	-1.898	0.738
15	H	Br	C ₂ H ₅	0.208	-0.792	1.000	71	H	I	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.640	-1.346	0.707
16	H	Br	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.065	-1.336	1.272	72	H	NO ₂	CH(CH ₃) ₂	-1.125	-1.364	0.239
17	H	Br	CH ₂ CF ₃	-1.480			73	H	NO ₂	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-1.950	-0.785	-1.165
18	H	Br	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-0.778	-0.771	-0.007	74	H	NO ₂	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-2.355	-0.447	-1.908
19	H	Br	CH ₂ CH=CH ₂	-0.530	-0.477	-0.052	75	H	NO ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^d	-2.430		
20	H	CF ₃	CH(CH ₃) ₂	-0.279	-1.117	0.839	76	H	NO ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-2.330	-1.196	-1.134
21	H	CF ₃	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-1.440	-0.949	-0.491	77	H	NO ₂	CH(CH ₃) ₂ ^b	-1.900	-1.140	-0.760
22	H	CF ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-1.790	-0.462	-1.328	78	H	OC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	-1.390	-2.211	0.821
23	H	CF ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^d	-2.170	-1.004	-1.166	79	H	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	-1.237	-2.368	1.131
24	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	-0.298	-2.301	2.004	80	H	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂ ^b	-1.560	-2.602	1.042
25	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.745	-1.766	1.021	81	H	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	-0.255	-2.438	2.182
26	H	Cl	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-0.750	-0.303	-0.447	82	H	OC ₂ H ₅	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-0.990	-2.602	1.612
27	H	Cl	CH(CH ₃) ₂	0.113	-1.502	1.616	83	H	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.655	-1.243	0.588
28	H	Cl	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.570	-1.582	1.013	84	H	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.380	-0.079	-0.301
29	H	Cl	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-0.960	-1.109	0.149	85	H	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ OH	-0.830		
30	H	Cl	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.645	-2.279	1.634	86	F	F	C ₂ H ₅	0.000	-1.824	1.824
31	H	Cl	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.043	-1.543	1.501	87	F	H	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.124	-2.602	2.478
32	H	Cl	CH ₂ CF ₃	-1.240			88	F	H	CH(CH ₃) ₂	-0.053	-2.290	2.237
33	H	Cl	CH ₃	-0.072	-2.151	2.079	89	Cl	Br	CH(CH ₃) ₂	0.579	-0.748	1.333
34	H	Cl	CH ₂ CH ₃	0.284	-1.600	1.884	90	Cl	Br	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.110	-0.822	0.712
35	H	Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-0.431	-1.744	1.313	91	Cl	Br	C ₂ H ₅	0.553	-0.515	1.067
36	H	Cl	CH ₂ CH=CH ₂	-0.558	-1.461	0.903	92	Cl	Cl	CH(CH ₃) ₂	0.553	-0.358	0.911
37	H	Cl	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^d	-1.219	-1.615	0.396	93	Cl	Cl	(CH ₃) ₂ CH ₂	-1.640	-2.367	0.727
38	H	Cl	CH(CH ₃)CH ₂ OC ₂ H ₅	-1.750			94	Cl	Cl	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.650		
39	H	Cl	CH(C ₂ H ₅) ₂	-0.799	-1.971	1.172	95	Cl	Cl	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.083	-0.555	0.472
40	H	Cl	CH ₂ CH(CH ₃)OH	-1.890	-2.602	0.712	96	Cl	Cl	C ₂ H ₅	0.664	-0.081	0.557
41	H	Cl	CH(CH ₃)CH ₂ OH	-0.588	-1.732	1.145	97	Cl	Cl	CH ₂ CH=CH ₂	-0.287	-0.079	-0.206
42	H	Cl	(CH ₂) ₂ CH ₃	-1.520	-0.708	-0.811	98	Cl	Cl	CH(CH ₃)CH ₂ OH	-0.134	-1.246	1.112
43	H	Cl	CH(CH ₃)CH ₂ OCOC ₂ H ₅	-0.580			99	Cl	Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-0.079	-0.676	0.597
44	H	CN	CH(CH ₃) ₂	-1.370	-1.630	0.260	100	Cl	F	C ₂ H ₅	0.824	-1.627	2.451
45	H	CN	CH(CH ₃) ₂ ^b	-1.820	-1.763	-0.058	101	Cl	F	CH(CH ₃) ₂ ^b	0.682	-1.601	2.279
46	H	F	CH(CH ₃) ₂	0.042	-1.635	1.681	102	Cl	F	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	0.319	-1.326	1.645
47	H	F	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.139	-1.593	1.453	103	Cl	F	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.215	-1.656	1.871
48	H	F	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-0.445	-1.422	0.976	104	Cl	F	CH(CH ₃) ₂	0.932	-1.618	2.539
49	H	F	C ₂ H ₅	0.167	-2.602	2.770	105	Cl	H	C ₂ H ₅	0.299	-1.739	2.040
50	H	F	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-0.280	-2.220	1.941	106	Cl	H	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.590	-2.193	1.603
51	H	F	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.820	-2.602	1.783	107	Cl	H	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.190	-2.602	2.412
52	H	F	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.077	-2.053	1.978	108	Cl	H	CH ₂ CF ₃	-0.766		
53	H	F	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.126	-1.763	1.639	109	Cl	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-0.322	-1.864	1.542
54	H	F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.946	-2.164	1.218	110	Cl	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.960		
55	H	F	CH ₂ CH=CH ₂	-0.470	-2.602	2.132	111	Cl	H	CH ₂ CH=CH ₂	-0.330	-2.167	1.837
56	H	F	CH(CH ₃)CH ₂ OC ₂ H ₅	-1.520			112	Cl	H	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.440	-2.602	2.163
57	H	F	CH ₃	-0.342	-2.602	2.260	113	Cl	H	CH(CH ₃) ₂ ^d	-1.187		
58	H	F	CH ₂ CF ₃	-1.490			114	Cl	H	CH(CH ₃)CH ₂ OH	-0.188	-2.302	2.115
59	H	F	CH(CH ₃)CH ₂ OH	-0.582	-2.602	2.020	115	Cl	OC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	0.208	-0.908	1.116
60	H	H	CH(CH ₃) ₂	-0.610	-2.602	1.992	116	Cl	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	0.602	-1.568	2.170
61	H	H	C ₂ H ₅	-1.056	-2.602	1.546	117	Cl	OC ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂ ^b	0.208	-1.369	1.577
62	H	H	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.850			118	Br	H	C ₂ H ₅	0.475	-1.723	2.205
63	H	H	CH(CH ₃) ₂ ^b	-0.630			119	Br	H	CH(CH ₃) ₂	0.658	-1.746	2.403
64	H	H	CH(CH ₃) ₂ ^d	-0.754			120	Br	H	CH(CH ₃) ₂ ^b	0.187	-2.602	2.789
65	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-1.040			121	Br	H	CH(CH ₃)CH ₂ OH	-0.295		

wide and unique favorable region (green) is found on a side of the alkyl chain at the 3-position, while a smaller unfavorable steric field (yellow) appears farther on this chain. Such data underline the importance of the substitution at the 3-position by a short but also branched alkyl chain. A broad unfavorable region (yellow) is also present near the 7-position and indicates that bulky groups (such as Br, I, OC₂H₅) have a negative impact on activity. No negative or positive information could be

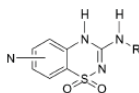
deduced concerning the 6-position, suggesting that the nature of the substituent at this position is less critical for activity.

The contribution map of hydrophobic fields is described in Figure 4C. The presence of a hydrophobic propitious region (yellow) at the 7-position confirms the positive impact of a halogen atom on activity, while the small hydrophilic favorable regions (white) are probably due to OCH₃ substitution but also

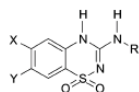
Table 1. Continued

Pyridinic Series Training Set

no.	N position	R	pIC ₅₀ ^a	pEC ₅₀ ^f	pSI ^g	no.	N position	R	pIC ₅₀ ^a	pEC ₅₀ ^f	pSI ^g
122	5-aza-7-chloro	CH(CH ₃) ₂	-2.120	-1.164	-0.956	132	7-aza	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-0.646	-2.097	1.451
123	5-aza-7-chloro	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-1.940	-1.300	-0.640	133	7-aza	CH(CH ₃) ₄ ^d	-1.440	-2.778	1.338
124	5-aza-7-chloro	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-1.896	-1.083	-0.813	134	7-aza	CH(CH ₃) ₅ ^d	-1.716	-2.699	0.983
125	5-aza-7-chloro	CH(CH ₃)C(CH ₃) ₃	-1.630	-0.017	-1.613	135	7-aza	C ₂ H ₅	-1.895	-2.778	0.883
126	5-aza-7-chloro	(CH ₂) ₂ CH ₃	-1.640			136	7-aza	CH(CH ₃)C(CH ₃) ₃	-0.580	-1.165	0.585
127	7-aza	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-1.750	-2.778	1.028	137	7-aza	CH(C ₂ H ₅) ₂	-0.852	-1.609	0.757
128	7-aza	CH(CH ₃) ₂	-1.008	-2.602	1.594	138	7-aza	(CH ₂) ₂ CH ₃	-1.870	-2.025	0.155
129	7-aza	(CH ₂) ₃ CH ₃	-1.620	-2.778	1.158	139	8-aza	CH(CH ₃) ₂	-1.480		
130	7-aza	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.623	-2.312	1.689	140	8-aza	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-1.250		
131	7-aza	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-1.315	-2.313	0.999						



Pyridinic Series Training Set



Test Set

no.	X	Y	R	pIC ₅₀ ^a	pEC ₅₀ ^f	pSI ^g	no.	X	Y	R	pIC ₅₀ ^a	pEC ₅₀ ^f	pSI ^g
141	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	-0.301	-2.301	2.000	144	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃	-0.398	-2.323	1.925
142	F	F	CH(CH ₃) ₂	0.523	-2.009	2.531	145	H	CH ₃	CH(CH ₃)CHCH ₂ CH ₃	-1.049	-1.190	0.141
143	F	F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-0.754	-2.301	1.547							

^a Cyclopropyl. ^b Cyclobutyl. ^c Cyclopentyl. ^d Cyclohexyl. ^e -log IC₅₀. ^f -log EC₅₀. ^g log(EC₅₀/IC₅₀).

Table 2. Summary of CoMFA and CoMSIA Results for Various Models^a

	CoMFA		CoMSIA		
	pancreatic model		pancreatic model	aortic model	selectivity model
Leave-One-Out (LOO) Cross-Validated					
q^2	0.682		0.693	0.673	0.763
s	0.440		0.442	0.448	0.542
F	42.871		39.753	29.043	43.097
n	126		130	107	106
n_1	6		7	7	7
n_2	120		123	99	97
vars	1170		1170	1170	1170
Un-Cross-Validated					
r^2	0.842		0.842	0.795	0.861
S	0.310		0.318	0.354	0.415
F	106.772		93.404	55.015	85.845
n	127		131	107	105
n_1	6		7	7	7
n_2	120		123	99	97
vars	1170		1170	1170	1170
Contributions					
steric	0.724		0.149	0.096	0.146
electrostatic	0.276		0.171	0.086	0.092
hydrophobic			0.427	0.603	0.539
H-bond donor			0.023	0.006	0.008
H-bond acceptor			0.230	0.209	0.216

^a q^2 , the leave-one-out (LOO) cross-validated coefficient, $q^2 = 1.0 - [\text{PRESS}(\sum(Y_i/\text{Y}_{\text{pred}} - \text{Y}_{\text{actual}})^2)]$; PRESS (predictive error sum of squares) = $\sum(Y_i/\text{Y}_{\text{pred}} - \text{Y}_{\text{actual}})^2$; Y_{pred} is a predicted value; Y_{actual} is an actual or experimental value; Y_{mean} is the best estimate of the mean of all values that might be predicted; $s = \sqrt{(\text{PRESS}/n_2)}$, the standard error of prediction in the LOO cross-validated analysis; S , the standard error of estimate in the un-cross-validated analysis; r^2 , the squared conventional correlation coefficient; F , F -statistic = $r^2/(1.0 - r^2)$; n , number of compounds; n_1 , the number of components giving the lowest PRESS value (optimal number of components); $n_2 = n - n_1 - 1$; vars, number of explanatory variables by property.

to the negative influence of too bulky substituents. The white region on the alkyl side chain at the 3-position probably results from the presence of a hydroxy group.

The hydrogen bond acceptor map clearly delineates, near the 6-position and near the 3-alkylamino side chain, several regions where hydrogen bond acceptors (magenta) enhance the activity

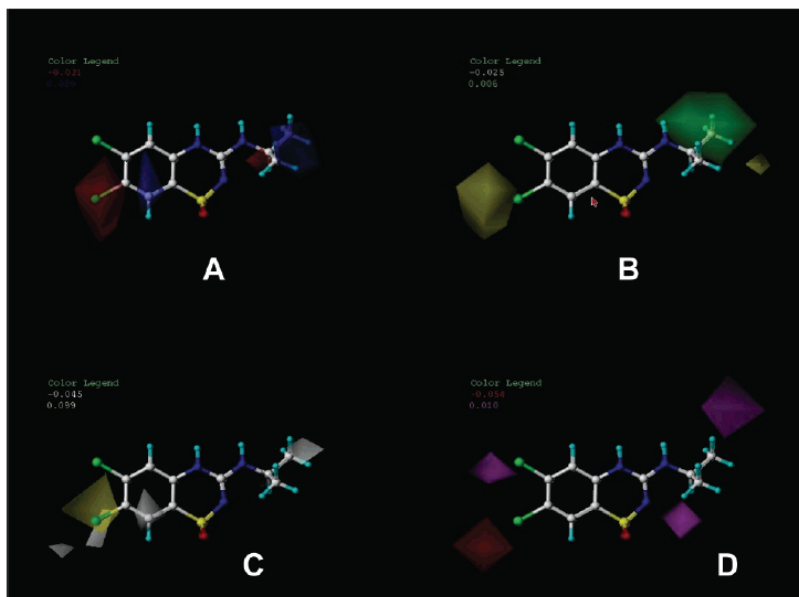


Figure 4. CoMSIA contour maps for the pancreatic model: (A) electrostatic properties, the blue isocontours denote regions where positively charged groups could increase activity (contour level 0.020) and red areas indicate enhanced activity with negatively charged groups (contour level -0.031); (B) steric properties, sterically favorable areas are shown in green (contour level 0.006), while the yellow isocontours depict sterically deleterious areas (contour level -0.025); (C) hydrophobic properties, yellow polyhedra (contour level 0.099) indicate regions where hydrophobic groups could enhance activity and white areas (contour level -0.045) depict regions where hydrophilic groups could favor activity; (D) H-bond acceptor properties, magenta isocontours (contour level 0.010) depict areas where H-bond acceptors on the molecule (or H-bond donors on the receptor site) could favor activity; the corresponding unfavorable areas are shown in red (contour level -0.054).

(Figure 4D). These data are in accordance with a classical SAR analysis. In contrast, near the 7-position, a negative effect of acceptors (red) is predicted and probably reflects the drastic decrease of activity noticed with the 7-NO₂, 7-CN, and 7-CF₃ derivatives.

The Aortic Model. Results of the CoMSIA Analysis. The statistical data obtained from the CoMSIA analysis for the aortic model are shown in Table 2. The process and the results are similar to those of the pancreatic model. The q^2 (0.673) and the r^2 (0.795) values are, nevertheless, slightly lower. Thus, the aortic model can be considered of lower quality. The importance of the hydrophobic properties seems to be higher with a contribution of the hydrophobic field of about 60.3%. On the other hand, the contribution of the steric and electrostatic fields are lower (9.6% and 8.6% respectively). The predicted versus actual pEC_{50} and the residual (pEC_{50} act. $- pEC_{50}$ pred.) values of the training set are reported in the Supporting Information. As in the pancreatic model, the residual values almost increased uniformly from 0.003 to 1.030, independently of the substituents R, X, or Y on the molecule.

An external test set of five compounds (141–145, Figure 1) was also used to validate the predictivity of the model. The corresponding predicted, actual, and residual values are given in the Supporting Information. As in the pancreatic model, the predicted affinities for the same test set are all in a reasonable agreement with the experimental values.

CoMSIA Contour Map Analysis. The contour maps for the electrostatic, steric, hydrophobic, and hydrogen bond acceptor fields are presented in Figure 5.

Figure 5A illustrates the electrostatic properties. Two favorable negative red contour regions are found around the substituent group at the 7-position (not centered on this group). These regions probably indicate that bulky electronegative groups could have a positive impact on the myorelaxant activity of the drugs (i.e., bromine and iodine atoms, NO₂ and CF₃ groups). As noticed for the pancreatic model, an important positive blue region also appears on the alkyl part of the 3-alkylamino side chain and could be due to the deleterious impact of an electron-attracting group (i.e., CF₃). The presence of a blue region around the aryl nucleus proves that an aromatic ring with a low electronic density can be favorable for the vasorelaxant activity.

Examination of the steric field map (Figure 5B) led to the conclusion that the presence of a bulky substituent at the 7-position (green) is not deleterious for activity (except for very long substituents such as a pentyl group). Two favorable regions (green) are also found on a side of the alkyl chain at the 3-position, while a marked unfavorable steric field (yellow) appears farther on this chain. These data underline the importance of the substitution at the 3-position by a branched alkyl chain and the deleterious effect of a small ring (cyclopropyl, cyclobutyl) on the myorelaxant activity of the compounds. No

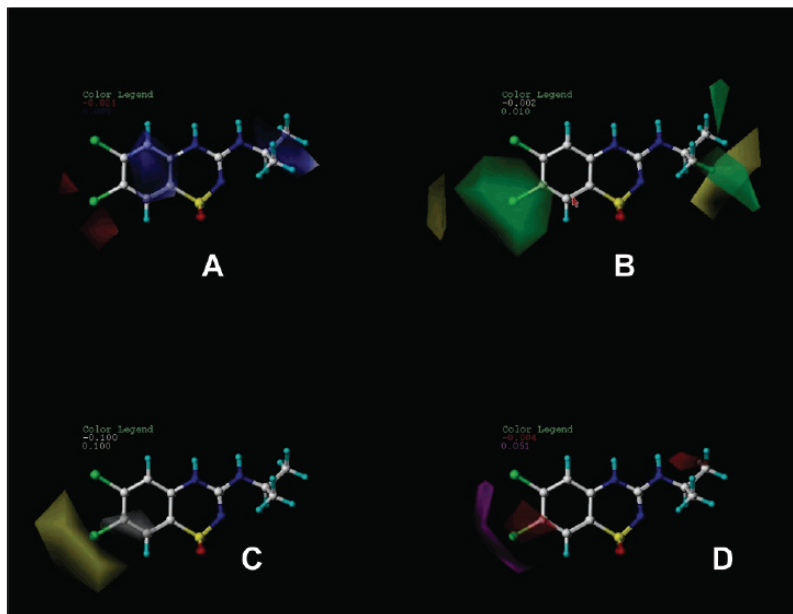


Figure 5. CoMSIA contour maps for the aortic model: (A) electrostatic properties, the blue isocontours denote regions where positively charged groups could increase activity (contour level 0.009) and red areas indicate enhanced activity with negatively charged groups (contour level -0.021); (B) steric properties, sterically favorable areas are shown in green (contour level 0.010), while the yellow isocontours depict sterically deleterious areas (contour level -0.002); (C) hydrophobic properties, yellow polyhedra (contour level 0.100) indicate regions where hydrophobic groups could enhance activity and white areas (contour level -0.100) depict regions where hydrophilic groups could favor activity; (D) H-bond acceptor properties, magenta isocontours (contour level 0.051) depict areas where H-bond acceptors on the molecule (or H-bond donors on the receptors site) could favor activity; the corresponding unfavorable areas are shown in red (contour level -0.004).

negative or positive impacts are detected for the 6-position, reinforcing the view that the substitution at this position does not appear to be critical for activity.

In this pharmacological model, hydrophobic fields are the most important contributors for the CoMSIA analysis. The presence of a wide hydrophobic region (yellow) near the 7-position confirms the positive impact of a bulky group on activity (Figure 5C). No information was available for the side chain at the 3-position.

The role of the hydrogen bond acceptor properties seems to be trivial although the map indicates that hydrogen bond acceptors (magenta) only enhance the activity when located near the 7-position (Figure 5D). The presence of red regions centered on the 7-position or near the 3-alkylamino side chain is less easily explainable.

All these data, taken together with the classical SAR analyses, lead us to propose the first pharmacophoric model for vasorelaxant activity in the 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzo- and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxide series.

The Selectivity Model. Results of the CoMSIA Analysis. Table 2 also illustrates the statistical results of the CoMSIA analysis for the selectivity model where $\log(EC_{50}/IC_{50})$ was chosen as the dependent value. The q^2 (0.763) and r^2 (0.861) values are higher than in each individual model. However, the results of this analysis are not more accurate than those obtained

with the previous pancreatic and aortic CoMSIA models. The contributions of the hydrophobic (53.9%) and H-acceptor fields (21.6%) are actually intermediate. The steric contribution (14.6%) is close to that found in the pancreatic model, and the electrostatic contribution (9.2%) is similar to that exhibited by the aortic model. The predicted versus actual pSI and the residual (pSI act. $-$ pSI pred.) values are presented in the Supporting Information. As was predictable from the results on the pancreatic and on the previously reported aortic models, the residual values almost increased uniformly from 0.009 to 0.811, independently of the substituents R, X, or Y on the molecule.

CoMSIA Contour Map Analysis. The analysis of the contour maps is more delicate and should be used cautiously to predict which structural zones are important for the improvement of tissue selectivity (pancreatic versus aortic tissue). This original approach, coupled with the more classical CoMSIA analysis using the pharmacological data as dependent variables, could also be helpful for the rational design of more potent and tissue selective K_{ATP} channel openers.

Figure 6 depicts the electrostatic, steric, hydrophobic, and hydrogen bond acceptor contour maps. The analysis of these maps can be conducted in terms of favorable zones for activity on the pancreatic tissue or favorable zones for activity on the aortic tissue.

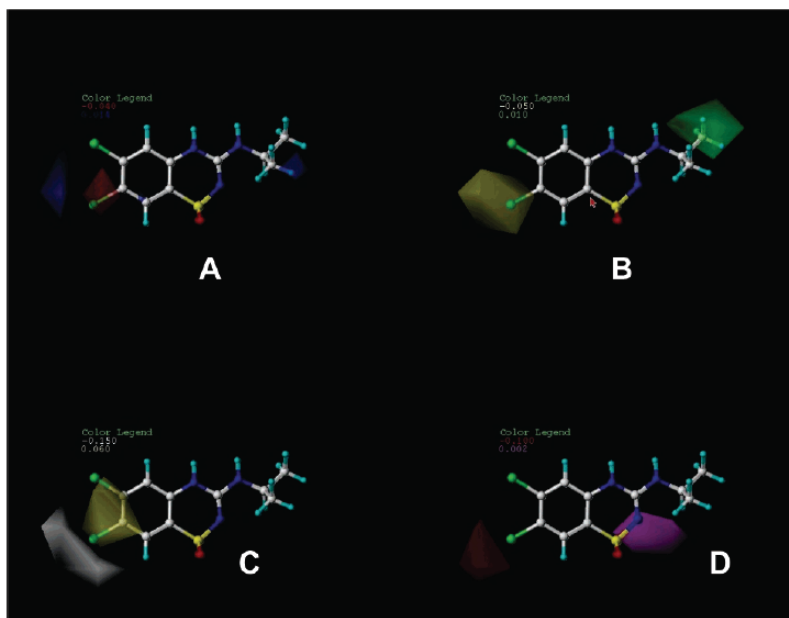


Figure 6. CoMSIA contour maps for the selectivity model: (A) electrostatic properties, the blue isosurfaces denote regions where negatively charged groups decrease the selectivity for the pancreatic tissue (contour level 0.014) and red areas indicate a deleterious effect of negatively charged groups for the inhibition of insulin release (contour level -0.040); (B) steric properties, sterically favorable areas to selectivity for the pancreatic tissue are shown in green (contour level 0.010), while the yellow isosurfaces depict sterically deleterious areas for the pancreatic tissue or favorable to the aortic tissue selectivity (contour level -0.050); (C) hydrophobic properties, yellow polyhedra (contour level 0.060) indicate regions where hydrophobic groups could enhance the selectivity for the pancreatic tissue and white areas (contour level -0.150) depict regions where hydrophilic groups could favor the selectivity for the aortic tissue; (D) H-bond acceptor properties, magenta isosurfaces (contour level 0.002) depict areas where H-bond acceptors on the molecule (or H-bond donors on the receptor site) could enhance the selectivity for the pancreatic tissue; the corresponding unfavorable areas are shown in red (contour level -0.100).

Concerning the electrostatic field properties (Figure 6A), it should be noticed that a small electronegative group (red) centered on the substituent in the 7-position could increase the activity but also the selectivity for the pancreatic tissue. A blue field near the 7-position seems to indicate a deleterious negatively charged zone for the inhibition of insulin release but a favorable zone for the vasorelaxant effect. Interpretation of the map at the 3-position appears too complex.

At the steric level, we can observe the presence of a unique zone (green) favorable to selectivity for the pancreatic tissue and located on one side of the chain in the 3-position (Figure 6B). This feature could confirm that only small and branched alkylamino side chains in the 3-position led to pancreatic selective drugs. By contrast, a large yellow zone near the substituent at the 7-position indicates that a bulky substituent in this position could decrease the selectivity for the pancreatic tissue and increase the selectivity for the aortic tissue. No critical information appears for the 6-position.

The analysis of the hydrophobic map (Figure 6C) seems to demonstrate the importance, for tissue selectivity, of the substituent at the 7-position. Indeed, while a hydrophobic zone (yellow) centered on the substituent in the 7-position appears to be favorable for the inhibition of insulin release, the bulkiest

hydrophobic groups were found to enter in a hydrophilic zone (white) and to enhance the selectivity for aortic tissue.

The map showing the influence of the hydrogen bond acceptors is less easily explainable (Figure 6D). The magenta zone near the 2-position, indicating that the presence of a hydrogen acceptor could lead to an increase of selectivity for the pancreatic tissue, does not appear to be directly linked to a particular group. A deleterious zone (red) for hydrogen acceptors was present near the 7-position. This feature is in accordance with the CoMSIA analysis executed on the two pharmacological models and could indicate that the presence of bulky hydrogen bond acceptor groups at the 7-position is concomitant with a decrease in selectivity.

New Pharmacophoric Models. The Pancreatic Pharmacophoric Model. Figure 7 illustrates the improved pharmacophoric model for activity on the pancreatic tissue taking also into account the results obtained from the CoMSIA analysis of the selectivity model.

Several relevant pieces of information about the structure–activity relationships (SARs) for activity on the pancreatic tissue have been deduced from the graphical 3D views obtained with the CoMSIA analysis. These data not only confirm the first pharmacophoric model (Figure 3) but also clearly improve the

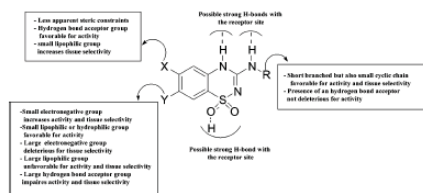


Figure 7. New improved pharmacophoric model for activity and selectivity on the pancreatic tissue.

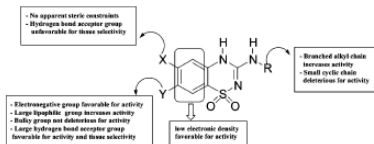


Figure 8. Pharmacophoric model for activity on the vascular smooth muscle tissue.

quality and the number of the SAR information concerning the arylthiadiazine 1,1-dioxide series. Indeed, the favorable and unfavorable lipophilic, steric, and electrostatic properties of the substituents at the 3- and at the 7-positions are now better defined. Moreover, several pieces of information about substitution at the 6-position were added. Finally, thanks to the data collected from the CoMSIA analysis of the selectivity model, some relevant structural requirements for selectivity have been added to the initial pharmacophoric model.

As previously noted, the 3- and the 7-positions appear to be the key positions for activity but also for selectivity. In the 3-position, only short branched but also small cyclic chains such as cyclobutyl are shown to maintain or enhance activity and selectivity. Moreover, the presence of a hydrogen bond acceptor does not impair activity. Concerning the 7-position, the steric constraint is apparently the critical point, specifically for the pancreatic selectivity, while both small hydrophilic and hydrophobic groups enhance activity. No or less apparent steric constraints are demonstrated for the 6-position.

The Aortic Pharmacophoric Model. In the 3-alkylamino-benzo- and 3-alkylamino-pyridothiazine 1,1-dioxide series, no real SAR studies for the vascular smooth muscle tissue have been achieved up to now. Thus, the pharmacophoric model for activity on the vascular tissue presented in Figure 8 is the first one described for these series.

From the global analysis of this original model, it appears that activity on aortic K_{ATP} channels is less dependent on steric constraints than activity on pancreatic K_{ATP} channels. Moreover, lipophilicity at the 3-, 6-, and 7-positions is more critical in the aortic model, and a low electronic density on the aromatic ring is also favorable for potency.

This CoMSIA analysis also gives us an interesting predictive tool for the design of compounds activating the K_{ATP} channels of vascular smooth muscle.

Conclusions

Application of QSAR CoMFA or CoMSIA analysis to a huge series of potent PCOs belonging to the 3-alkylamino-4H-1,2,4-pyrido- and 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiazine 1,1-dioxide series led to very coherent predictive models for activity on pancreatic and vascular tissues, as well as for tissue selectivity

(pancreatic versus aortic). Moreover, examination of the different contour maps obtained by the CoMSIA analysis allowed the development of the first 3D pharmacophoric models for activity and selectivity on pancreatic and vascular tissues. The present work also highlighted the importance of the nature of the substituents at the 3- and 7-positions for both activity and tissue selectivity. Indeed, the steric bulk at these two positions appears to be critical for activity on the pancreatic tissue, while the presence of large electronegative or lipophilic groups at the 7-position enhance the activity on the vascular tissue. In contrast, the 6-position was not shown to be critical for activity or tissue selectivity. All this information, gathered in the new pharmacophoric models, can be viewed as very helpful for the rational design of potent and selective PCOs belonging to the arylthiadiazine series, and more specifically for the identification of a new pancreatic PCO of therapeutic value for the treatment or prevention of hyperinsulinemia, diabetes, and obesity.

Acknowledgment. This study was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium) from which P. de Tullio is Research Associate and P. Lebrun Research Director. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of P. Fraikin, F. Leleux, A.-M. Vanbellingen, and A. Van Praet.

Supporting Information Available: CoMSIA actual and predicted activities for the training and test set molecules. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Noma, A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983, 305, 147–148.
- (2) Cook, D. L.; Hales, C. N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 1984, 311, 271–273.
- (3) Bernardi, H.; Fosset, M.; Lazdunski, M. Purification and affinity labeling of brain $[^3H]$ glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85, 9816–9820.
- (4) Standen, N. B.; Quayle, J. M.; Davies, N. W.; Brayden, J. E.; Huang, Y.; Nelson, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989, 245, 177–180.
- (5) Allard, B.; Lazdunski, M. Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 236, 419–426.
- (6) Quayle, J. M.; Nelson, M. T.; Standen, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1997, 77, 1165–1232.
- (7) Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L. The ABCs of ATP-sensitive potassium channels: More pieces of the puzzle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9, 553–559.
- (8) Seino, S.; Miki, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003, 81, 133–176.
- (9) Babenko, A. P.; Aguilar-Bryan, J. A. A view of SUR/Kir6.X K_{ATP} channels. *Annu. Rev. Physiol.* 1998, 60, 667–687.
- (10) D'haan, N.; Jacquet, H.; Moreau, C.; Catty, P.; Vivaudou, M. A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K^+ channels by K^+ channel openers. *Mol. Pharmacol.* 1999, 56, 308–315.
- (11) Seino, S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 1999, 61, 337–362.
- (12) Inagaki, N.; Gonio, T.; Clement, J. P. Reconstitution of I_{KATP} : An inward rectifier subunit plus a sulfonylurea receptor. *Science* 1995, 270, 1166–1170.
- (13) Hambröck, A.; Löffler-Walz, C.; Kloor, D.; Delabar, U.; Horio, Y.; Kurachi, Y.; Quast, U. ATP-sensitive K^+ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: Opposite effects of MgADP. *Mol. Pharmacol.* 1999, 55, 832–840.
- (14) Petersen, O. H.; Duane, M. J. Regulation of K^+ channels plays a crucial role in the control of insulin secretion. *Diabetes* 1989, 38, S115–S120.

- (15) Lebrun, P. Flux cationiques dans les cellules B des îlots pancréatiques et investigations pharmacologiques. *Rev. Fr. Endocrinol. Clin.* **1993**, *24*, 241–254.
- (16) Kolb, H. A. Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1990**, *15*, 51–79.
- (17) Brayden, J. E. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscles. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 312–316.
- (18) Seino, S.; Miki, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2003**, *81*, 133–176.
- (19) Coghlan, M. J.; Carroll, W. A.; Gopalakrishnan, M. Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: Update from a decade of progress. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1627–1653.
- (20) Lebrun, P.; Devreux, V.; Hermann, M.; Herchuelz, A. Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *250*, 1011–1018.
- (21) Quast, U. Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 332–337.
- (22) Marshfold, R. K_{ATP} channel openers: Structure–activity relationships and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 213–266.
- (23) Björk, E.; Beme, C.; Kampe, O.; Wibell, P.; Oskarsson, P.; Karlsson, F. A. Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* **1996**, *45*, 1427–1430.
- (24) Alenzadeh, R.; Langley, G.; Upchurch, L.; Smith, P.; Slonim, A. E. Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 1911–1915.
- (25) Rasmussen, S. B.; Sørensen, T. S.; Hansen, J. B.; Mandrup-Poulsen, T.; Hormun, L.; Markholst, H. Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual beta-cells function and mass in acutely diabetic BB rats. *Horm. Metab. Res.* **2000**, *32*, 294–300.
- (26) Ritzel, R. A.; Hansen, J. B.; Veldhuis, J. D.; Butler, P. C. Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K(ATP)-channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 795–805.
- (27) Kumar, G. K.; Dastoor, F. C.; Robayo, J. R.; Razaque, M. A. Side effects of diazoxide. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **1976**, *235*, 275–276.
- (28) de Tullio, P.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Fontaine, J.; Dupont, L.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Khelili, S.; Maggetto, C.; Maserel, B.; Diouf, O.; Podona, T.; Delarge, J. 3- and 4-Substituted 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: Synthesis, pharmacological evaluation and structure–activity relationships. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 937–948.
- (29) de Tullio, P.; Ouedraogo, R.; Dupont, L.; Somers, F.; Boverie, S.; Dogné, J.-M.; Delarge, J.; Pirotte, B. Synthesis and structural studies of 3-alkylamino-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides, a new class of heterocyclic compounds with therapeutic promises. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5419–5432.
- (30) Pirotte, B.; Ouedraogo, R.; de Tullio, P.; Khelili, S.; Somers, F.; Boverie, S.; Dupont, L.; Fontaine, J.; Damas, J.; Lebrun, P. 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: Design, synthesis, and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1456–1466.
- (31) Boverie, S.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Somers, F.; Becker, B.; Sebille, S.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium-channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73): Introduction of heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 973–980.
- (32) Ouedraogo, R.; Becker, B.; Boverie, S.; Somers, F.; Antoine, M.-H.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; de Tullio, P. 2-Alkyl-3-alkylamino-2H-benzo- and pyridothiadiazine 1,1-dioxides: From K⁺ATP channel openers to Ca²⁺ channel blockers? *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 1759–1768.
- (33) de Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Bondo Hansen, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Toward tissue-selective pancreatic B-cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3342–3353.
- (34) Boverie, S.; Antoine, M.-H.; Somers, F.; Becker, B.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Counerotte, S.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; de Tullio, P. Effect on K_{ATP} channel activation properties and tissue selectivity of the nature of the substituent in the 7- and the 3-position of 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3492–3503.
- (35) de Tullio, P.; Boverie, S.; Becker, B.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Francotte, P.; Counerotte, S.; Sebille, S.; Pirotte, B.; Lebrun, P. 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as ATP-sensitive potassium channel openers: Effect of 6,7-disubstitution on potency and tissue selectivity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4990–5000.
- (36) Pirotte, B.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Hermann, M.; Herchuelz, A.; Delarge, J.; Lebrun, P. A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1381–1386.
- (37) Lebrun, P.; Arkhammar, P.; Antoine, M.-H.; Nguyen, Q.-A.; Bondo Hansen, J.; Pirotte, B. A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* **2000**, *43*, 723–732.
- (38) Cosgrove, K.; Antoine, M.-H.; Lee, A.; Barnes, P.; de Tullio, P.; Clayton, P.; McCloy, R.; De Lonlay, P.; Nihoul-Fekété, C.; Robert, J.; Saudubray, J.-M.; Rahier, J.; Lindley, K.; Hussain, K.; Aynsley-Green, A.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Dunne, M. BPDZ 154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels: In vitro studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 4860–4868.
- (39) Dabrowski, M.; Ashcroft, F. M.; Ashfield, R.; Lebrun, P.; Pirotte, B.; Egebjerg, J.; Hansen, J. B.; Wahl, P. The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes* **2002**, *51*, 1896–1906.
- (40) Nielsen, F. E.; Bodvarsdottir, T. B.; Worsaae, A.; MacKay, P.; Stidsen, C. E.; Boonen, H. C.; Pridal, L.; Arkhammar, P. O. G.; Whal, P.; Ynddal, L.; Junager, F.; Dragsted, N.; Tagmose, T. M.; Mogensen, J. P.; Koch, A.; Treppendahl, S. P.; Hansen, J. B. 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic beta-cells. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4171–4187.
- (41) Pirotte, B.; de Tullio, P.; Antoine, M.-H.; Sebille, S.; Florence, X.; Lebrun, P. New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers. *Expert Opin. Ther. Patents* **2005**, *15*, 497–504.
- (42) Sybyl 7.0; Tripos Associates, Inc.: St. Louis, MO, 2004.
- (43) Stewart, J. J. MOPAC, a Semiempirical Molecular Orbital Program. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1990**, *4*, 1–105.
- (44) Khelili, S.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Fillet, M.; Antoine, M.-H.; Ouedraogo, R.; Dupont, L.; Fontaine, J.; Felekidis, A.; Leclerc, G.; Delarge, J.; Pirotte, B. Preparation and pharmacological evaluation of the R- and S-enantiomers of 3-(2'-butylamino)-4H- and 3-(3'-methyl-2-butylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1513–1520.
- (45) Cranner, R. D., III; Bunce, J. D.; Patterson, D. E. Crossvalidation, bootstrapping, and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies. *Quant. Struct.–Act. Relat.* **1988**, *7*, 18–25.

JM060534W

Annexe 16



Combined use of LC-SPE-NMR and LC-MS for the metabolites characterization of ATP-sensitive potassium channel openers belonging to 3-alkylamino-4H-1,2,4-arylthiadiazine 1,1-dioxides.

A.T.C. SA/NV

ATC

P. de Tullio*, P. Chiap[§], P. Francotte*, F. Gillotin[§], J.-Cl. Van Heugen[§], M. Frédérich[‡], P. Kremers[§], P. Lebrun[§] and B. Pirotte*.

* Department of Medicinal Chemistry, University of Liège, 1 avenue de l'Hôpital, 4000 Sart Tilman, Belgium

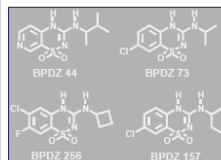
‡ A.T.C. (Advanced Technology Corporation), University Hospital Centre of Liège, 4000 Sart Tilman, Belgium

§ Department of Pharmacognosy, University of Liège, 1 avenue de l'Hôpital, 4000 Sart Tilman, Belgium

§ Department of Pharmacology, Free University of Brussels, 808 route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgium

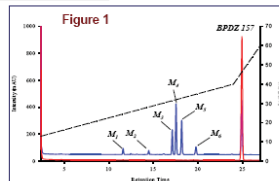
Introduction

Pancreatic ATP-sensitive potassium channel openers (pancreatic PCOs) have been demonstrated to be of clinical value in the treatment of several metabolic disorders, including type I and type II diabetes, obesity and hyperinsulinemia. Taking into account these promising therapeutic interests, we developed series of 3-alkylamino-4H-1,2,4-pyrido- and 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. Among those series, several compounds, such as BPDZ 44, 73 and 256 were demonstrated to be very potent and selective pancreatic PCOs and appeared to be good potential drug candidates. However, knowledge of their *in vivo* metabolic fate is a fundamental requirement in the view of the future *in vivo* development and the lead optimisation process of these series. For this purpose, the incubation of different drugs with rat liver microsomes could be very helpful. Indeed, these microsomes are considered as the most active and supposed to produce the highest amounts of phase I metabolites. Several drugs were chosen for these *in vitro* metabolic studies and the results of BPDZ 157, another interesting PCO, are presented in this communication. The major metabolites issued from this incubation were then analysed, not only by liquid chromatography (LC) coupled to a Time of flight mass spectrometer (Q-TOF MS/MS), but also by LC-SPE-NMR. LC-SPE-NMR is consisting of using a Solid Phase Extraction (SPE) system as an interface between LC and an high field NMR spectrometer (nuclear magnetic resonance). This system allows the elimination of non-deuterated solvents and the concentration of the metabolites through a "multiple collection step".



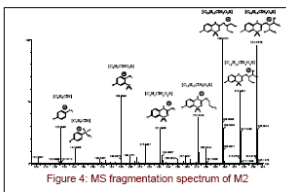
Metabolisation

The metabolic experiments were performed at 37 °C for 60 min, using phenobarbital (PB) induced rat liver microsomes known to dramatically increase levels of some P-450 cytochromes. The metabolised samples were first analysed by HPLC using the following conditions: an Alltech Hypersil BDS C18 3µm (150 x 4.6 mm) column equilibrated with ammonium formate 10 mM / acetonitrile (80/20), pH 3, flow rate: 0.8 ml·min⁻¹, gradient: see figure 1. Figure 1 illustrates typical chromatograms of BPDZ 157 without (red) and with (blue) metabolisation step and in dash, the acetonitrile gradient. Six major metabolites were identified and analysed by LC-MS/MS and LC-SPE-NMR using a multi collection step during the LC-SPE separation. For LC-MS/MS analysis, the LC conditions were slightly modified.



LC-MS/MS analysis

MS analysis was performed on a Waters Micromass Q-ToF-2 Quadrupole/Time-of-flight mass spectrometer equipped with electrospray ion source "z spray" interfaced to a Waters Alliance 2690 HPLC system under positive ionization mode. Analyses were determined using mass scan range of 90-650 Da. The molecular ions of analyses were fragmented by collision-induced dissociation (achieved with argon collision gas and collision energy of 20 eV) for structure determination. The source and desolvation temperatures were held at 125 °C and 400 °C, respectively. Figure 2 presents the chromatogram of BPDZ 157 metabolites with their mass and their putative structure.



MS analysis: Identification and structure elucidation of BPDZ 157 metabolites were based on full-scan mass spectra and fragmentation experiments. The full-scan MS analysis showed the existence of six main products of metabolisation (Figure 2). The molecular ion of M1 is characterised by a mass of 232 Da corresponding to a N-dealkylated metabolite. M2 shows a MH⁺ at m/z 334 and is due to the introduction of two hydroxyl groups on BPDZ 157 structure. M3, M4 and M5 are characterized by a MH⁺ at m/z 318, this is 16 Da higher than the parent compound and consistent with the introduction of an oxygen atom. Although the fragmentation experiments (Figure 4) allow a correct determination of the chemical structure of M1, the collected informations do not allow more precisely the localisation of the oxygen atom(s) on the lateral alkyl chain of M2, M3, M4 and M5. Complementary information, like NMR spectra, are needed to elucidate the exact structures.

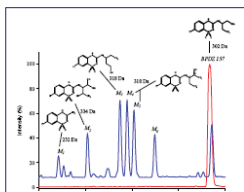


Figure 2: chromatogram with mass and putative structure of BPDZ 157 metabolites

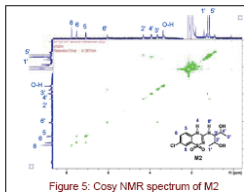
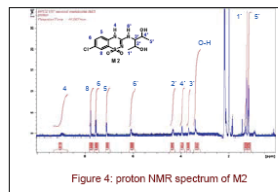


Figure 5: COSY NMR spectrum of M2

LC-SPE-NMR analysis

Our configuration consisted of an Agilent 1100 HPLC chain and of a Bruker/Spark Prospekt II SPE unit. The NMR spectrometer was a Bruker Avance 500 MHz equipped with 50 µl dual inverse ¹H/¹³C 2-gradient flow probe. After LC separation, the peaks of interest (M1 to M6 and BPDZ 157) were trapped on Hysphere Resin GP cartridges by adding water to the mobile phase at 2 mL/min. In order to enhance the metabolites concentration, three consecutive injections were trapped on the same cartridges. The trapped metabolites were transferred into the NMR probe by elution with 200 µl of acetonitrile-d₃ and 1D proton and 2D cosy (proton-proton coupling) experiments were performed.



Annexe 17

Selective pancreatic ATP-sensitive potassium channel openers for the treatment of glucose homeostasis disorders

Pascal de Tullio^{1*}, Philippe Lebrun², Xavier Florence¹, Marie-Hélène Antoine, Pierre Francotte¹, Bernard Pirotte¹

¹Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Université de Liège, 1 Avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium; ²Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgium
 *Correspondence: e-mail: P.deTullio@ulg.ac.be

CONTENTS

Abstract	991
Glucose homeostasis disorders and related pathologies	991
Glucose homeostasis disorders and K_{ATP} channels	992
The structure of pancreatic K_{ATP} channels	992
Discovery of selective pancreatic K_{ATP} channel (Kir6.2/SUR1) openers	993
Conclusions	998
Acknowledgements	998
References	998

Abstract

Disorders of glucose homeostasis may be associated with severe pathologies such as type 1 and type 2 diabetes, insulinoma, persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (PHHI), polycystic ovary syndrome (PCOS) and/or obesity. Specific activation of the Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channel subtype has been shown to be beneficial for the treatment of these pathologies. Starting from diazoxide, a nonselective Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channel activator, many research groups have conducted searches in an attempt to discover more potent and selective drugs. Several 3-alkylaminoarylthiadiazine 1,1-dioxides (BPDZ-44, BPDZ-73, BPDZ-415, NNC-55-0118, NN-414) have been described as potent Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channel openers and are reported to inhibit insulin release without a pronounced effect on smooth muscle mechanical activity. NN-414 was the most extensively studied drug and had entered clinical trials, although its development was discontinued due to liver toxicity. Other chemical series have also been developed, but none has led to compounds as potent and/or as selective as the lead arylthiadiazine drugs. Based on the therapeutic interest of Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channel activators, the discovery of new series with improved pharmacodynamic and/or pharmacokinetic properties remains a priority.

Glucose homeostasis disorders and related pathologies

The regulation of glucose homeostasis is a key process for maintaining a good metabolic state. Disorders of glucose homeostasis may lead to hypo- or hyperglycemic periods, which are generally associated with severe pathologies, such as type 1 and type 2 diabetes, insulinoma, persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (PHHI), polycystic ovary syndrome (PCOS) and/or obesity. Such diseases are related to a disturbance in the pattern of insulin secretion (1).

The lifestyle of Western society (lack of exercise, increased food consumption, food imbalance and obesity) is the main determining factor for diabetes, which is expected to emerge as a global health problem, with an increasing number of patients affected by this disease (2-5).

Type 1 diabetes is an autoimmune pathology characterized by a rapid depletion of insulin production due to a destruction of pancreatic β -cells (6-9). This β -cell loss is attributable, at least in part, to the action of autoantibodies targeted against specific antigens expressed on the β -cell surface.

Type 2 diabetes is more common than type 1 diabetes and is expected to become a major health problem in the next few years (10, 11). It is characterized by dysfunctional insulin secretion coupled with a decrease in insulin receptor sensitivity leading to glucose intolerance and high circulating glucose concentrations (12-14). These chronic hyperglycemic periods negatively affect β -cell functions and induce a progressive degeneration of insulin-secreting cells (15-17). Type 2 diabetes increases the risk for many serious complications, including cardiovascular diseases, retinopathy, neuropathy and nephropathy.

Obesity is generally associated with several metabolic disorders and constitutes an important risk factor for the development of type 2 diabetes. Indeed, obesity is frequently associated with abnormal insulin secretion and/or hyperinsulinemia (18-20).

Hyperinsulinism of infancy is the most frequent cause of PHHI (21, 22). The most severe forms arise from genetic defects in pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel subunits (23, 24). This leads to uncontrolled insulin release, which in turn induces chronic hypoglycemia, which is potentially lethal because of neurological complications associated with low circulating glucose levels (25).

PCOS is a severe hormonal disorder affecting females of reproductive age (26, 27). Symptoms of this pathology include hypersecretion of insulin, insulin resistance and obesity (28, 29). Similarly, insulinomas are also associated with a high level of insulin release, with a deleterious effect on the regulation of glucose homeostasis (30-32).

Glucose homeostasis disorders and K_{ATP} channels

The secretion of insulin from pancreatic β -cells is known to be controlled mainly by the activity of K_{ATP} channels (33-36). After a meal, glucose enters the insulin-secreting cells via the GLUT2 transporter and is phosphorylated to glucose-6-phosphate by glucokinase, an enzyme considered to be the "glucose sensor" (37). The result is an increase in the ratio of ATP to ADP, which in turn induces closure of β -cell K_{ATP} channels, depolarization of the cell membrane and subsequent activation of voltage-gated Ca^{2+} channels. The resulting Ca^{2+} entry and increase in $[Ca^{2+}]_i$ initiate the release of insulin from docked secretory vesicles. This insulin-secretory pulse will reduce glycemia, with a subsequent decrease in the ATP/ADP ratio leading to re-opening of β -cell K_{ATP} channels, hyperpolarization of the cell membrane below the threshold for activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels, and ultimately a reduction in insulin secretion (38).

In PHHI, insulinoma and PCOS, several studies have demonstrated that a direct action on insulin secretion by activation of pancreatic K_{ATP} channels could reduce symptoms linked to these pathologies. Diazoxide, the first active pancreatic K_{ATP} channel opener described, is, along with somatostatin, currently the only therapeutic approach to treat PHHI and insulinoma syndrome (39-42). Reduction of insulin secretion with diazoxide also appears to be effective at reducing PCOS symptomatology (43, 44).

The case of diabetes is more complex because the disease is generally correlated with a deficit in insulin levels and/or in insulin receptor sensitivity. Therefore, the first approach to treat this pathology, and more specifically type 2 diabetes, consisted in enhancing insulin secretion by blocking pancreatic K_{ATP} channels. Hypoglycemic sulfonylureas such as tolbutamide, glibenclamide and glipizide, which are specific pancreatic K_{ATP} channel blockers, currently represent the most widely used drugs in the treatment of type 2 diabetes (45, 46). However, long-term treatment leads to a progressive decrease in the efficacy of sulfonylureas and may be associated with side effects such as weight gain or cardiovascular complications in patients at high risk (47).

More recently, several clinical studies have demonstrated that a reduction in endogenous insulin secretion using pancreatic K_{ATP} channel openers could be beneficial for preserving β -cell function. Indeed, when β -cell rest was induced by diazoxide, a delay in the progression of β -cell loss was seen in subjects with newly diagnosed type 1 diabetes (48, 49). *In vitro* and *in vivo* studies also provided evidence for the preservation of β -cell function upon treatment with diazoxide (50, 51). This beneficial effect of potassium channel openers could be related to modifications in autoantigen expression (48-52). Pancreatic potassium channel openers have further been shown to protect β -cells and preserve the function of human and rat islets, even in the presence of high concentrations of glucose, and to prevent or delay the progression of type 2 diabetes in animal models (53-60).

Obesity is often associated with type 2 diabetes and it has been postulated that a decrease in insulin release from pancreatic β -cells could restore the sensitivity, as well as the number, of insulin receptors, leading to recovery of glucose tolerance. In animal models, activation of pancreatic K_{ATP} channels has been shown to improve the glycemic profile and to induce weight loss (54, 61, 62).

In addition to pancreatic β -cell K_{ATP} channels which regulate insulin secretion and influence circulating blood glucose levels, hypothalamic K_{ATP} channels could also play an important role in the control of glucose homeostasis. Indeed, the medial hypothalamus is a major regulator of nutritional and hormonal signals and plays a crucial role in the modulation of liver glucose output. It has recently been suggested that activation of hypothalamic K_{ATP} channels could decrease glycemia through inhibition of hepatic gluconeogenesis (63-65). Thus, hypothalamic K_{ATP} channels could also be viewed as a target site for controlling glucose homeostasis.

The structure of pancreatic K_{ATP} channels

As previously noted, K_{ATP} channels are potassium-selective channels controlled by the intracellular ATP/ADP ratio. These channels play a crucial role in the control of membrane potential in a wide variety of excitable cells and are postulated to couple metabolism to the electrical activity of the cells (66, 67). K_{ATP} channels are octameric complexes of two different subunits: the ~160-kDa regulatory protein (termed SUR for sulfonylurea receptor) and a smaller ~40-kDa protein belonging to the inwardly rectifying potassium channel family (named Kir6.x) (68-70). Four Kir6.x subunits assemble themselves to form a K^+ -selective pore, which is constitutively associated with four SUR subunits to form the active channel (Fig. 1) (71, 72). Kir6.x subunits have two transmembrane segments, M1 and M2, connected by a linker region that determines the potassium selectivity, and are endowed with an inhibitory site for ATP (Fig. 2). Two different isoforms have been identified: Kir6.1 and Kir6.2. The regulatory sulfonylurea receptor subunit (SUR) belongs to the ABC protein gene family and is composed of 17 transmembrane segments arranged in 3

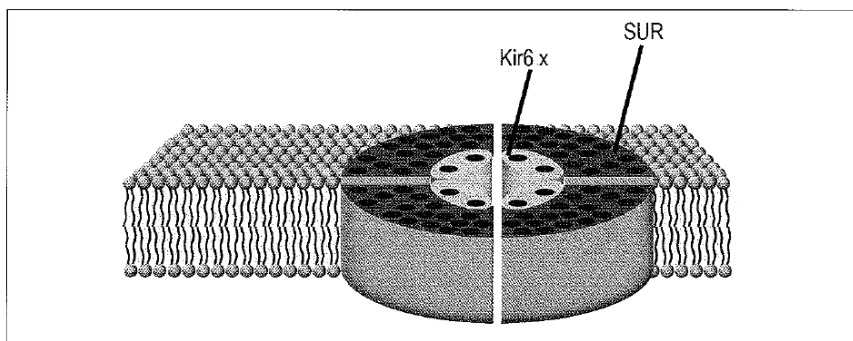


Fig 1 SURx and Kir6.x subunit assembly into a K_{ATP} channel.

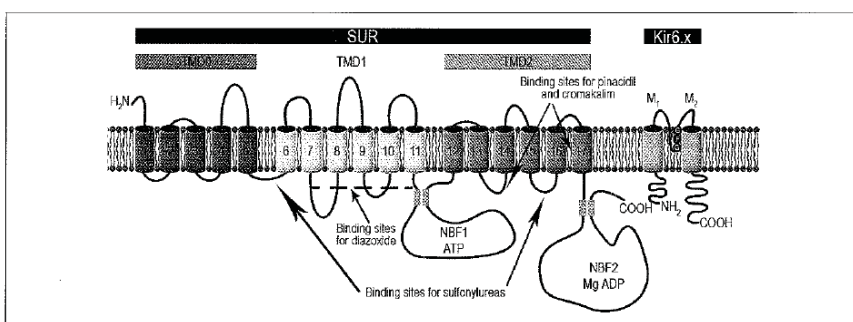


Fig 2 Topology of Kir6.x and SURx subunits

transmembrane domains (TMDs): TMD0 includes 5 segments and TMD1 and 2 each include 6 segments (Fig. 2). Two large intracellular loops contain the nucleotide binding domains (NBF1 and NBF2). Three isoforms of the SUR subunit have been identified: SUR1, SUR2A and SUR2B. SUR2A and SUR2B have 99% homology and differ only in the last 42 amino acids of the C-terminal part of NBF2, while SUR1 has 79% homology with the SUR2 isoforms (73, 74). Depending on their tissue localization, K_{ATP} channels are composed of different subunits. For example, SUR1 combined with Kir6.2 forms the pancreatic K_{ATP} channel. The combination of SUR2A and Kir6.2 subunits is found in cardiac and skeletal muscle, while the smooth muscle K_{ATP} channel is composed of SUR2B and Kir6.1 or Kir6.2 subunits. Although the binding sites for potassium channel openers have mainly been identified on the SUR subunits, several experimental studies have also demonstrated that these binding sites can be localized on different transmembrane segments (73). Thus pinacidil and cromakalim, two reference potassium chan-

nel openers, have been shown to interact with TMD segments 12-17, whereas diazoxide preferentially binds to TMD segments 7-11 and NBF1 (Fig. 2).

Discovery of selective pancreatic K_{ATP} channel (Kir6.2/SUR1) openers

The search for selective Kir6.2/SUR1 potassium channel openers began in the sixties with the observation that certain sulfonamide diuretics such as chlorothiazide (Fig. 3), elevated blood glucose in some susceptible individuals (75). Other research into the benzothiadiazine field led to the discovery of diazoxide (Fig. 3) (76). Initially developed for its antihypertensive properties, the drug was also found to increase blood glucose levels through inhibition of insulin release, and was proposed for the treatment of hyperinsulinemic states such as PHHI (77). In the following years, only one medicinal chemistry article reported derivatives of diazoxide with hyperglycemic activity (78).

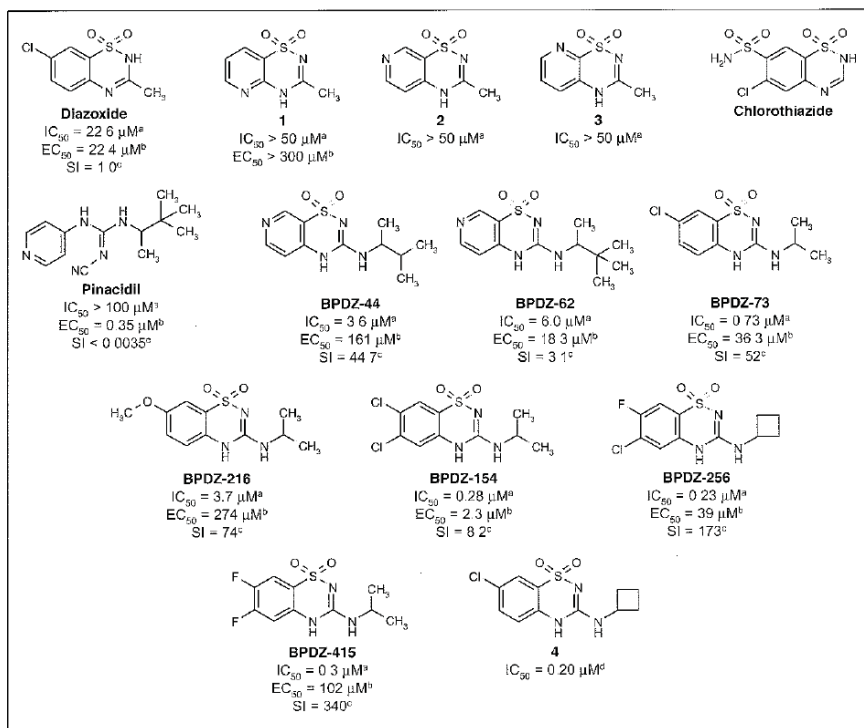


Fig 3. Benzo- and pyridothiadiazine 1,1-dioxides. ^aDrug concentration giving 50% inhibition of glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets. ^bDrug concentration giving 50% relaxation of KCl-induced contractions of rat aorta rings. ^cSelectivity index (SI) EC_{50}/IC_{50} . ^dDrug concentration eliciting 50% activation of K_{ATP} current in excised patches from *Xenopus* oocytes expressing human Kir6.2/SUR1 channels.

In the late 1980s, the target of diazoxide was identified as the K_{ATP} channels (79). Unfortunately, the drug appeared to be equipotent on both pancreatic and vascular tissues (Fig 3). As a consequence of its lack of tissue selectivity, the clinical use of diazoxide was associated with many side effects, such as hypertrichosis, edema, headache and/or arterial hypotension (77, 80). However in spite of these unwanted effects, diazoxide continues to be the compound of choice for the treatment of pathologies linked to insulin hypersecretion.

For a long time, most chemical developments linked to K_{ATP} channel openers have been focused on the enhancement of the antihypertensive properties of this pharmaceutical class. Until the nineties, few investigations were undertaken to discover new potent and selective pancreatic β -cell potassium channel openers. The first rational drug design approach was performed by our

team and initially consisted of the synthesis of pyridine analogues of diazoxide (**1**, **2**, **3**; Fig 3) (81). In contrast to diazoxide, none of the newly synthesized drugs markedly inhibited insulin release from rat pancreatic islets. This lack of inhibitory effect was probably due to the fact that, at physiological pH, the new pyridine derivatives were partially ionized.

Wollweber *et al* demonstrated in 1981 that several 3-cycloalkylamino analogues of diazoxide exhibited a slight hyperglycemic effect (82). Based on these data, original 3-alkylamino-4H-pyridothiadiazine 1,1-dioxides were synthesized and evaluated on rat pancreatic islets and rat aorta rings (81, 83, 84). Such compounds should be regarded as hybrid structures between diazoxide and pinacidil (Fig 3), a well-known K_{ATP} channel opener belonging to the cyanoguanidine family (83). From this series, compounds bearing a short and branched alkyl

side-chain at the 3-position, such as BPDZ-44 and BPDZ-62 (Fig. 3), were found to be more potent and more selective for pancreatic *versus* aortic tissue than diazoxide (81, 83-84). BPDZ-44, shown to be 7 times more active than diazoxide *in vitro* at inhibiting insulin release and 40 times more selective for pancreatic *versus* aortic tissue, was the first potent and preferential/selective pancreatic K_{ATP} channel opener described. Additional studies indicated that BPDZ-44 acted through activation of pancreatic K_{ATP} channels (85, 86). As later reported for the related compound BPDZ-62, an increase in the size of the 3-alkylamino side-chain led to less selective derivatives. Moreover, modification of the position of the pyridine nitrogen atom caused changes in the pharmacological profile of the series, with a reduction in activity on insulin release and an enhancement of activity on aortic tissue (81, 87, 88).

Transposition of the structure-activity relationship (SAR) information on the pyridine series to the benzene series led, in several cases, to more potent and/or more selective compounds (89-91). BPDZ-73 (Fig. 3) was the first lead compound of this SUR1-selective class. Its IC_{50} value in an *in vitro* assay of insulin release was found to be $< 1 \mu M$ while the EC_{50} value in the 30 mM KCl-depolarized aorta was $> 35 \mu M$ (89). BPDZ-73 was studied in different *in vitro* and *in vivo* models and its biological target was clearly identified as the K_{ATP} channel (92).

This lead compound was subjected to several modifications, starting with modulation of the 3-alkylamino chain and replacement of the chlorine atom at the 7-position by other halogen atoms or by electron-donating groups such as CH_3 , OCH_3 and NH_2 , and by electron-withdrawing groups such as CF_3 , NO_2 and CN (89, 90). 6,7-Disubstituted derivatives were also prepared (91). All the compounds were tested as putative K_{ATP} channel openers on pancreatic endocrine and vascular tissue. The biological data were then analyzed using a CoMSIA QSAR approach, leading to the proposal of a pharmacophore model for activity and selectivity on pancreatic tissue (Fig. 4) (93). This model underlined the critical importance of the 3- and 7-positions for both activity and tissue selectivity. The best insulin-secreting cell activity and selectivity were obtained with compounds substituted at the 3-position by a small alkylamino or cycloalkylamino chain, and at the 6- and/or 7-position by a small halogen atom (F or Cl) or a small electron-donating group (CH_3 or OCH_3). Substitution at the 2- and 4-position appears to be unfavorable for inhibitory activity on insulin release.

Figure 3 shows the main lead compounds in the benzene series along with their activity and selectivity index. Among these, BPDZ-154 was shown to activate K_{ATP} channels of rodent β -cells and islets isolated from young patients with hyperinsulinism (94), whereas BPDZ-216 proved to be a potent inhibitor of insulin release without marked vasorelaxant effects and to act mainly on the Kir6.2/SUR1 channel subtype (95). Other drugs such as BPDZ-256 and BPDZ-415 were also reported to be very potent and selective for the pancreatic endocrine tissue (91).

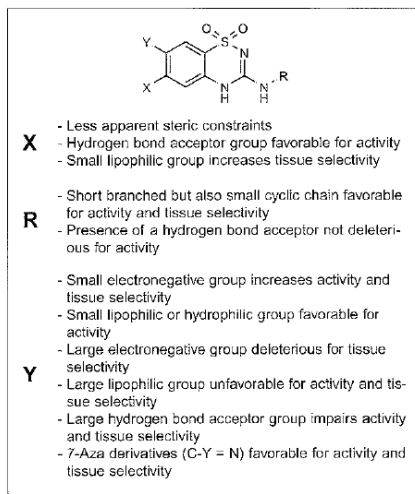


Fig. 4 Pharmacophore model for activity and selectivity for pancreatic tissue of the benzo- and pyridothiadiazine series

The recent discovery of the beneficial effect of pancreatic (Kir6.2/SUR1) K_{ATP} channel activation in the treatment of diabetes and obesity has broadened the interest for developing new pancreatic selective K_{ATP} channel openers. In 2002, Peat *et al.* prepared a small series of 3-cyclobutylamino derivatives (96). These compounds (*ie.*, 4; Fig. 3) substituted at the 7-position by different groups, were also found to be potent activators of Kir6.2/SUR1 channels. However, no data on the effect of these derivatives on insulin release and smooth muscle mechanical activity were reported.

In parallel to the development of the benzene series, Novo Nordisk explored 3-alkylamino-4*H*-thieno[3,2-*e*]1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide analogues (Fig. 5). Among the different drugs synthesized, several compounds, such as NNC-55-0118, the thiophene isostere of BPDZ-73, NNC-55-0462 and NN-414, were found to be potent K_{ATP} channel openers (97, 98). These compounds were tested in different pharmacological models and shown, like their benzene counterparts, to be potent and selective inhibitors of insulin release (97). Additional evaluation indicated that the key target for these drugs was the Kir6.2/SUR1 channel subtype (98). The most active compounds of this series have short alkylamino chains or small cycloalkylamino chains at the 3-position (Fig. 5). Increasing the size from cyclopropyl (NN-414) to cyclobutyl (NNC-55-0462) enhanced activity while further ring expansions resulted in reduced potency (99). Introduction of a 1-methyl-1-phenethylamino group at the 3-position led to another potent and insulin-secreting cell-selective compound (5; Fig. 5). The chlorine atom at

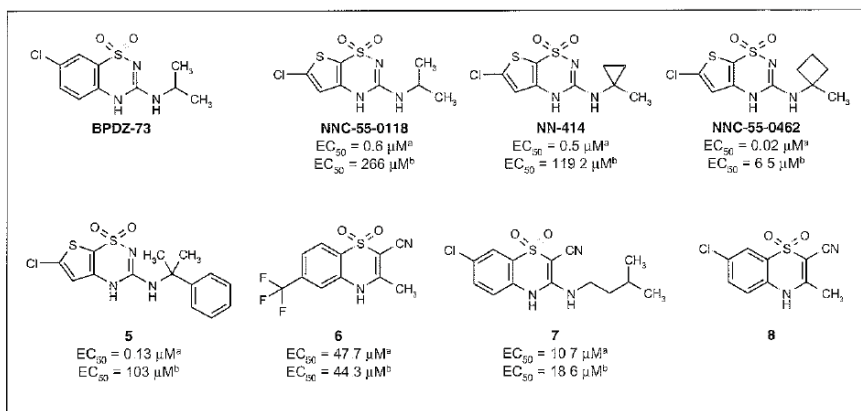


Fig. 5. Thienothiadiazine 1,1-dioxides and benzothiazine-2-carbonitriles. ^aDrug concentration giving 50% hyperpolarizing effect in TC3 β -cells. ^bDrug concentration giving 50% relaxation of phenylephrine- or KCl-induced contractions of rat aorta rings.

the 6-position can be replaced by a bromine atom without loss of activity, while modification of the position of this halogen resulted in a drastic decrease in activity (99).

High concentrations of NNC-55-0118 have been found to protect rat pancreatic islets from the toxic effects of streptozotocin, alloxan, sodium nitroprusside and IL-1 β (100, 101). Moreover, *in vivo* data indicated that treatment with NN-414 improved pancreatic β -cell function and reduced insulinitis in a type 1 diabetic rat model (102). Based on its pharmacological profile, NN-414 entered clinical trials and was shown to lower insulin levels in healthy male subjects (103). Unfortunately, the development of NN-414 was stopped in phase II clinical trials because of an unwanted increase in blood liver enzymes suggesting liver toxicity (104).

In the search for bioisosteres of the arylthiadiazine series, Novo Nordisk also explored a series of 1,4-benzothiazine-2-carbonitrile, 1,1-dioxides (**6**, **7**, **8**; Fig. 5) (105). However, although the 2-cyanomethyl analogue of diazoxide (**8**) was found to activate Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channels, none of the prepared compounds reached the potency of BPDZ-73, NNC-55-0118 or NN-414.

In terms of the tissue selectivity of pancreatic K_{ATP} channel openers, the arylthiadiazine dioxides are the most widely studied compounds. Other chemical series, however, have recently been developed. The first series was based on the structure of pinacidil (Fig. 6), which is a potent SUR2 K_{ATP} channels opener activating the SUR1 subtype only at high concentrations (106). Exploratory research indicated that replacement of the pyridyl group in pinacidil by a disubstituted phenyl group resulted in drugs activating pancreatic SUR1 K_{ATP} channels and exhibiting only a slight effect on smooth muscle SUR2 K_{ATP} channels (**9**; Fig. 6) (107).

Further modulation led to the discovery of compound **10** (Fig. 6), which was found to activate Kir6.2/SUR1 and inhibit Kir6.2/SUR2 K_{ATP} channel subtypes (108). Some 3,3-diaminosulfonylacetonitriles (**11**; Fig. 6), which could be regarded as isostere structures of cyanoguanidines, were also reported to inhibit insulin secretion from β -cell lines and rat pancreatic islets, with minimal myorelaxant effects on vascular smooth muscle (109).

Levcromakalim (Fig. 7) is the lead compound in the benzopyran K_{ATP} channel opener family. Most drugs belonging to this family are known to activate the Kir6.2/SUR2 channel and to be poorly active as inhibitors of insulin release (110, 111). Nevertheless, several compounds, such as Y-26763 (Fig. 7), have been shown to exhibit modest activity on pancreatic-type Kir6.2/SUR1 channels, while maintaining effects on muscle-type Kir6.2/SUR2 channels (112). Several structural modifications introduced on the levcromakalim structure, such as replacement of the cyano group in the 8-position, elimination of the hydroxyl group in the 3-position and introduction of a phenylaminocarbonylamino group in the 4-position, led to the characterization of the first potent and selective pancreatic K_{ATP} channel openers belonging to the benzopyran chemical class (113, 114). SAR studies indicated that the most pronounced inhibitory activity on insulin release was obtained by introducing a *meta*- or a *para*-electron-withdrawing group (*i.e.*, a chlorine atom) at the C-4 position of the phenyl moiety and a halogen atom at the 6-position (*i.e.*, F, Cl, Br). The most promising compounds (**12**, **13**; Fig. 7) were more potent than diazoxide at 10 μM in a model of glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets and failed to affect smooth muscle mechanical activity at up to 300 μM in a rat aorta ring model. Additional radioisotopic and electrophysiological experiments performed with compound **12** allowed us to

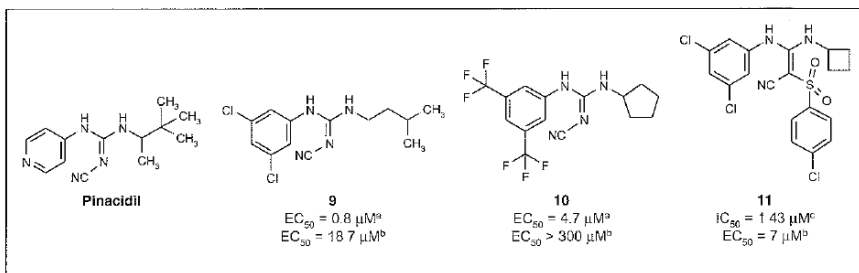


Fig. 6 Cyanoguanidines and sulfonylacrylonitriles ^aDrug concentration giving 50% hyperpolarizing effect in TC3 β -cells ^bDrug concentration giving 50% relaxation of phenylephrine- or KCl-induced contractions of rat aorta rings ^cDrug concentration giving 50% inhibition of glucose-stimulated insulin release from TC6 β -cells

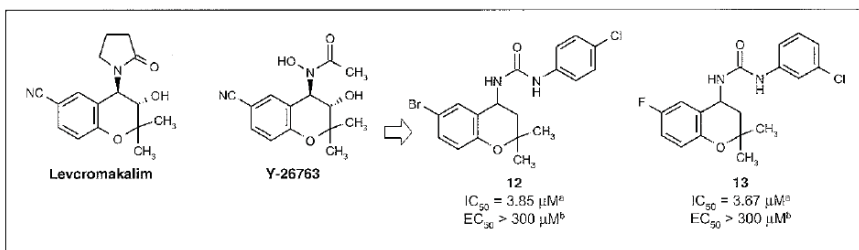


Fig. 7. Benzopyrans ^aDrug concentration giving 50% inhibition of glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets ^bDrug concentration giving 50% relaxation of KCl-induced contractions of rat aorta rings

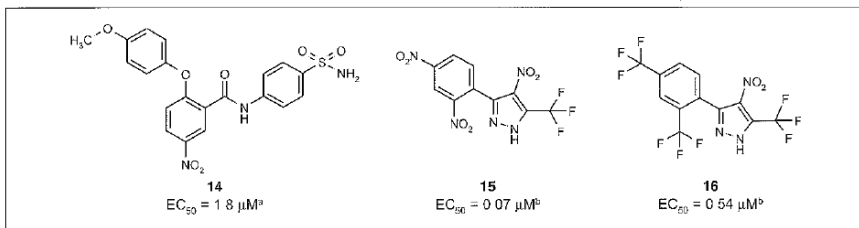


Fig. 8. Benzamides and pyrazoles ^aDrug concentration giving 50% hyperpolarizing effect in TC3 β -cells ^bDrug concentration giving 50% activation of K_{ATP} current in excised patches from *Xenopus* oocytes expressing human Kir6.2/SUR1 channels

define the pancreatic K_{ATP} channel as the main target for these drugs (114)

Recently, a series of 2-(4-methoxyphenoxy)-5-nitro-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamides (**14**; Fig. 8) emerging from a compound library screening were found to activate Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channels. However, no information about tissue selectivity was available for this series (115)

Using a high-throughput screening assay and measurement of K_{ATP} current in inside-out patches, Peat *et al.* discovered the 3-trifluoromethyl-4-nitro-5-arylpyrazoles as another new scaffold for activation of Kir6.2/SUR1 channels (116). Several compounds of this series, such as **15** and **16** (Fig. 8), were shown to activate Kir6.2/SUR1 channels with only a minimal effect on Kir6.2/SUR2 channels

Conclusions

Disorders of glucose homeostasis are generally associated with severe pathologies such as type 1 and type 2 diabetes, PHHI, PCOS, insulinoma and/or obesity. Such pathologies are related directly or indirectly to a defect in insulin secretion, a process tightly controlled by pancreatic K_{ATP} channels. Specific activation of these ionic channels has proved to be beneficial for most of these pathologies and to constitute a new therapeutic approach. Starting from diazoxide, a potent but poorly selective pancreatic K_{ATP} channel activator, numerous drugs belonging to the arylthiadiazine family have been designed. These pharmacochanical developments led to the discovery of potent and selective pancreatic K_{ATP} channel openers, such as BPDZ-44, BPDZ-73, BPDZ-415, NNC-55-0118 or NN-414. The latter compounds have proven therapeutic interest in the treatment of type 1 and type 2 diabetes and PHHI. Unfortunately, due to their poor pharmacokinetic properties or *in vivo* toxicity, none of these derivatives has passed initial clinical trials. Other chemical series have also been developed, but none of them has led to compounds as potent and/or as selective as the lead arylthiadiazine drugs. Thus, due to the great therapeutic interest in developing Kir6.2/SUR1-selective drugs, additional investigation needs to be conducted in order to optimize the existing leads or to find new lead compounds.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (FNRS; Belgium) at which P. de Tullio is Research Associate and P. Lebrun Research Director.

References

- Hansen, J.B., Arkhammar, P.O., Bodvarsdottir, T.B. et al. Inhibition of insulin secretion as a new drug target in the treatment of metabolic disorders. *Curr Med Chem* 2004, 11: 1595-615.
- Zimmel, P., Alberli, K.G., Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001, 414: 782-7.
- Turner, R.C. The UK Prospective diabetes study: A review. *Diabetes Care* 1998, 21(Suppl. 3): C35-8.
- Viviane, E.M. Type 2 diabetes in children and adolescents. The next epidemic? *Curr Med Res Opin* 2006, 22: 297-306.
- Bandyopadhyay, P. Advances in the understanding of diabetes mellitus. *Drug News Perspect* 2004, 17: 477-87.
- Gianani, R., Eisenbarth, G. The stages of type 1A diabetes. *Immunol Rev* 2005, 204: 232-49.
- Daneman, D. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006, 367: 847-58.
- Seissler, J., Scherbaum, W.A. Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2006, 44: 133-7.
- Faideau, B., Langer, E., Lepault, F. et al. Role of β -cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes* 2005, 54(Suppl. 2): S87-96.
- Jeffery, A. The seeds are sown in childhood-insulin resistance and the global epidemic of type 2 diabetes. In: Focus on Diabetes Mellitus Research. Ford, A.M. (Ed.) Nova Publishers 2006, 143-69.
- Hanefeld, M. Outcome studies in type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin* 2005, 21(Suppl. 1): S41-8.
- Chiasson, J.L., Rabasa-Lhoret, R. Prevention of type 2 diabetes. Insulin resistance and β -cell function. *Diabetes* 2004, 53(Suppl. 3): S34-8.
- Sjoholm, A., Nystrom, T. Inflammation and etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006, 22: 4-10.
- Leahy, J. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2005, 36: 197-209.
- Maedler, K., Spinas, G., Lehmann, R. et al. Glucose induces β -cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001, 50: 1683-90.
- Bjorklund, A., Lansner, A., Grill, V. Glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ abnormalities in human pancreatic islets. Important role of overstimulation. *Diabetes* 2000, 49: 1840-8.
- Poitout, V., Robertson, R. Minireview: Secondary β -cell failure in type 2 diabetes: A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002, 143: 339-42.
- Chan, C. Beta-cell stimulus-secretion coupling defects in rodent models of obesity. *Can J Physiol Pharmacol* 1995, 73: 1414-24.
- Koulouridis, E. Insulin and human obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004, 1(Suppl. 3): 438-42.
- Beloff-Chain, A. Hyperinsulinemia and obesity. In: Recent Advances in Obesity Research. 1997, 240-5.
- Sempoux, C., Guio, Y., Lefevre, A. et al. Neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia. Heterogeneity of the syndrome and keys for differential diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 1455-61.
- Dunne, M., Cosgrove, K., Shepherd, R. et al. Hyperinsulinism in infancy: From basic science to clinical disease. *Physiol Rev* 2004, 84: 239-75.
- Verkharre, V., Fournet, J., de Lonlay, P. et al. Paternal mutation of the sulfonylurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest* 1998, 102: 1286-91.
- Dunne, M., Kane, C., Shepherd, R. et al. Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *New Engl J Med* 1997, 336: 703-6.
- Aynsley-Green, A., Hussain, K., Hall, J. et al. The practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch Dis Child* 2000, 82: F98-107.
- Ruutilainen, K., Seppala, M. Polycystic ovary syndrome. Evolution of a concept. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1991, 3: 326-35.
- Goodarzi, M., Azziz, R. Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006, 20: 193-205.
- Legro, R. Diabetes prevalence and risk factors in polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2002, 9: 451-8.

- 29 Baillargeon J.P., Nestler J. *Polycystic ovary syndrome: A syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin?* J Clin Endocrinol Metab 2006 91: 22-4
- 30 Frerichs, H., Creutzfeldt, W. *Hypoglycemia. I. Insulin secreting tumors*. Clin Endocrinol Metab 1976, 5: 747-67
- 31 Flatt, R. *Defective regulation of insulin secretion in diabetes and insulinoma*. Biochem Soc Trans 1990 18: 124-7
- 32 Vassilopoulou-Sellin R., Ajani J. *Islet cell tumors of the pancreas*. Endocrinol Metab Clin N Am 1994, 23: 53-65
- 33 Efrat, S. *Regulation of insulin secretion: Insights from engineered β -cell lines*. Ann NY Acad Sci 2004 1014: 88-96
- 34 Petersen, O., Dunne, M. *Regulation of K^+ channels plays a crucial role in the control of insulin secretion*. Pflügers Arch 1989 414: S115-20
- 35 Lebrun P., Antoine M.H., Herchuelz, A. *Minireview: K^+ channel openers and insulin release*. Life Sci 1992 51: 795-806
- 36 Aguilar-Bryan, L., Bryan J., Nakazaki, M. *Of mice and men: K_{ATP} channels and insulin secretion*. Rec Prog Horm Res 2001, 56: 47-68
- 37 Thorens B. *GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection*. Mol Membrane Biol 2001 18: 265-73
- 38 Nichols C., Shyng S., Nestorowicz A. et al. *Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion*. Science 1996 272: 1785-7
- 39 Cosgrove K., Shepherd, R., Fernandez, E. et al. *Causes and therapy of hyperinsulinism in infancy*. Curr Opin Endocrinol Diabetes 2004 11: 31-8
- 40 Kane C., Lindley K., Johnson P. et al. *Therapy for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy: Understanding the responsiveness of β cells to diazoxide and somatostatin*. J Clin Invest 1997 100(7): 1888-93
- 41 Goode P., Farndon J., Anderson, J. et al. *Diazoxide in the management of patients with insulinoma*. World J Surg 1986, 10: 586-92
- 42 Gill G., Rauf O., MacFarlane I. *Diazoxide treatment for insulinoma: A national UK survey*. Postgrad Med J 1997 73: 640-1
- 43 Krassas G., Kaltsas T., Pontikides N. et al. *Leptin levels in women with polycystic ovary syndrome before and after treatment with diazoxide*. Eur J Endocrinol 1998 139: 184-9
- 44 Weil C., Taylor A., Martin K. et al. *Serum inhibin B in polycystic ovary syndrome: Regulation by insulin and luteinizing hormone*. J Clin Endocrinol Metab 2002 87: 5559-65
- 45 Best, J., Judzewitsch, R., Pfeifer, M. et al. *The effect of chronic sulfonylurea therapy on hepatic glucose production in non-insulin-dependent diabetes*. Diabetes 1982 31: 333-8
- 46 Groop L. *Sulfonylureas in NIDDM*. Diabetes Care 1992 15: 737-54
- 47 Rendell M. *The role of sulfonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus*. Drugs 2004 64: 1339-58.
- 48 Björk E., Berne C., Kämppe O. et al. *Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes*. Diabetes 1996 45: 1427-30
- 49 Björk E., Berne C., Karlsson F. *Induction of β -cell rest in type 1 diabetes: Studies on the effects of octreotide and diazoxide*. Diabetes Care 1998 21: 427-30
- 50 Rasmussen S., Sørensen T., Hansen J.B. et al. *Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual β -cells function and mass in acutely diabetic BB rats*. Horm Metab Res 2000 32: 294-300
- 51 Ritzel, R., Hansen, J.B., Veldhuis J. et al. *Induction of β -cell rest by a $K_{ir6.2}/SUR1$ -selective $K(ATP)$ -channel opener preserves β -cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose*. J Clin Endocrinol Metab 2004 89: 795-805
- 52 Björk E., Kampe, O., Andersson A. et al. *Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets*. J Clin Endocrinol Metab 1992 75: 1574-6
- 53 Leahy, J., Bumbalo L., Chen C. *Diazoxide causes recovery of β -cell glucose responsiveness in 90 % pancreatectomized diabetic rats*. Diabetes 1994 43: 173-9
- 54 Alemzadeh, R., Slonim, A., Zdanowicz, M. et al. *Modification of insulin resistance by diazoxide in obese Zucker rats*. Endocrinology 1993 133: 705-12
- 55 Aizawa, T., Taguchi, N., Nahoko S. et al. *Prophylaxis of genetically determined diabetes by diazoxide: A study in a rat model of naturally occurring obese diabetes*. J Pharmacol Exp Ther 1995 275: 194-9
- 56 Alemzadeh R., Tushaus K. *Modulation of adiponutrient axis in prediabetic Zucker diabetic fatty rats by diazoxide*. Endocrinology 2004 145: 5476-84
- 57 Surwit R., Dixon T., Petro, A. et al. *Diazoxide restores β 3-adrenergic receptor function in diet-induced obesity and diabetes*. Endocrinology 2000 141: 3630-7
- 58 Björklund A., Bøndø Hansen J., Falkmer S. et al. *Openers of ATP-dependent K^+ -channels protect against a signal-transduction linked and not freely reversible defect of insulin secretion in a rat islet transplantation model of type 2 diabetes*. Diabetologia 2004 47: 885-91
- 59 Carr, R., Brand C., Bodvardsdottir, T. et al. *NN414, a $SUR1/Kir6.2$ -selective potassium channel opener, reduces blood glucose and improves glucose tolerance in the VDF Zucker rat*. Diabetes 2003 52: 2513-8
- 60 Alemzadeh, R., Fledelius C., Bodvardsdottir T. et al. *Attenuation of hyperinsulinemia by NN414, a $SUR1/Kir6.2$ selective K^+ -adenosine triphosphate channel opener, improves glucose tolerance and lipid profile in obese Zucker rats*. Metabolism 2004 53: 441-7
- 61 Alemzadeh R., Jacobs W., Pitukcheewanont P. *Antibesity effect of diazoxide in obese Zucker rats*. Metabolism 1996 45: 334-41
- 62 Alemzadeh R., Langley, G., Upchurch L. et al. *Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults*. J Endocrinol Metab 1998 83: 1911-5
- 63 Pocai, A., Lam T., Tony K. et al. *Hypothalamic K_{ATP} channels control hepatic glucose production*. Nature 2005 434: 1026-31
- 64 Pocai A., Obici, S., Schwartz, G. et al. *A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis*. Cell Metab 2005 1: 53-61.

65. Evans M, McCrimmon R, Flanagan D et al. *Hypothalamic ATP-sensitive K^+ channels play a key role in sensing hypoglycemia and triggering counterregulatory epinephrine and glucagon responses*. Diabetes 2004; 53: 2542-51
66. Seino S, Miki T. *Physiological and physiopathological roles of ATP-sensitive K^+ channels*. Prog Biophys Mol Biol 2003; 81: 133-76
67. Kolb H.A. *Potassium channels in excitable and non-excitable cells*. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1990; 15: 51-79
68. Seino S. *ATP-sensitive potassium channels: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies*. Annu Rev Physiol 1999; 61: 337-62
69. Aguilar-Bryan L, Nichols C, Wechsler S et al. *Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion*. Science 1995; 268: 423-6
70. Inagaki N, Gonio T, Clement J.P. *Reconstitution of I_{KATP} : An inward rectifier subunit plus a sulfonylurea receptor*. Science 1996; 270: 1166-70
71. Clement J.P., Kunjilwar, K, Gonzalez G et al. *Association and stoichiometry of KATP channel subunits*. Neuron 1997; 18: 827-38
72. Shyng S, Nichols C. *Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex*. J Gen Physiol 1197; 110: 655-64
73. Moreau, C, Prost A.L., Dérard R et al. *SUR ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers*. J Mol Cell Cardiol 2005; 38: 951-63
74. Bryan, J., Crane, A, Vila-Carriés, W.H et al. *Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K_{ATP} channels*. Curr Pharm Des 2005; 11: 2699-716
75. Tabachnick, I., Gulbenkian A, Yannell A. *The hyperglycemic activity of benzothiadiazine and other diuretics*. Life Sci 1965; 4: 1931-6
76. Rubin, A., Roth, F., Winbury, M. et al. *New class of antihypertensive agents*. Science 1961; 133: 2067.
77. Black J. *Diazoxide and the treatment of hypoglycemia: An historical review*. Ann NY Acad Sci 1968; 150: 194-203
78. Wales J, Krees S, Grant, A et al. *Structure-activity relationships of benzothiadiazine compounds as hyperglycemic agents*. J Pharmacol Exp Ther 1966; 164: 421-32
79. Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku, T. *Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic β -cells*. Pflügers Arch 1986; 407: 493-9
80. Kumar, G, Dastoor, F., Robayo, J. et al. *Side effects of diazoxide*. JAMA – J Am Med Assoc 1976; 235: 275-6
81. de Tullio P, Pirotte B., Lebrun P et al. *3- And 4-substituted 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: Synthesis, pharmacological evaluation and structure-activity relationships*. J Med Chem 1996; 39: 937-48
82. Wollweber, H., Horstmann, H., Stoepel K et al. *3-(Amino)-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide mit antihypertensiver und potentieller diabetogen wirkung*. Arzneim-Forsch 1981; 31: 279-88
83. Pirotte B., de Tullio, P., Lebrun P et al. *3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic β -cells. A new class of potassium channel openers?* J Med Chem 1993; 36: 3211-3
84. Lebrun, P., Antoine, M.H., Ouedraogo, R. et al. *Pyridothiadiazines as potent inhibitors of glucose-induced insulin release*. Adv Exp Med Biol 1997; 426: 145-8
85. Pirotte B., Antoine, M.H., de Tullio P et al. *A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K^+ channels*. Biochem Pharmacol 1994; 47: 1361-6
86. Antoine, M.H., Pirotte B., Hermann, M. et al. *Cationic and secretory effects of BPDZ 44 and diazoxide in rat pancreatic islets*. Experientia 1994; 50: 830-2
87. Lebrun P, Antoine M.H., Ouedraogo, R. et al. *Activation of ATP-dependent K^+ channels and inhibition of insulin release: Effect of BPDZ 62*. J Pharmacol Exp Ther 1996; 277: 155-62
88. Pirotte, B., Ouedraogo, R., de Tullio, P. et al. *3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: Design, synthesis, and pharmacological evaluation*. J Med Chem 2000; 43: 1456-66
89. de Tullio P, Becker, B., Boverie S et al. *Toward tissue-selective pancreatic β -cells K_{ATP} channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides*. J Med Chem 2003; 46: 3342-53
90. Boverie, S., Antoine, M-H, Somers F. et al. *Effect on K_{ATP} channel activation properties and tissue selectivity of the nature of the substituent in the 7- and the 3-position of 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides*. J Med Chem 2005; 48: 3492-503
91. de Tullio, P., Boverie, S., Becker, B. et al. *3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as ATP-sensitive potassium channel openers. Effect of 6,7-disubstitution on potency and tissue selectivity*. J Med Chem 2005; 48: 4990-5000
92. Lebrun, P., Arkhammar, P., Antoine, M-H et al. *A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K^+ channels and inhibiting insulin release*. Diabetologia 2000; 43: 723-32
93. de Tullio P., Dupont, L., Francotte, P. et al. *3D-Quantitative structure-activity relationships of K_{ATP} channel openers belonging to the 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzo and 3-alkylamino-4H-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-dioxide families*. J Med Chem 2006. In press
94. Cosgrove K., Antoine, M-H, Lee A. et al. *BPDZ 154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels: In vitro studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism*. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 4860-8.
95. Dabrowski, M., Ashcroft, F.M., Ashfield, R. et al. *The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener*. Diabetes 2002; 51: 1896-906
96. Peat A, Townsend C., Worley, J.F. et al. *Synthesis and evaluation of 7-substituted-3-cyclobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide derivatives as K_{ATP} channel agonists*. Bioorg Med Chem Lett 2002; 12: 2977-80
97. Nielsen F., Bodvarsdottir, T., Worsaae A. et al. *6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP-sensitive potassium channels of pancreatic β -cells*. J Med Chem 2002; 45: 4171-87
98. Dabrowski, M., Larsen, T., Ashcroft, F. et al. *Potent and selective activation of the pancreatic β -cell type K_{ATP} channel by two novel diazoxide analogues*. Diabetologia 2003; 46: 1375-82

99. Nielsen, F. Ebdrup S. Jensen A. et al. *New 3-alkylamino-4H-thieno-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides derivatives activate ATP-sensitive potassium channels of pancreatic β cells* J Med Chem 2006 49: 4127-39
100. Kullin, M., Li, Z. Hansen J.B. et al. *K(ATP) channel openers protect rat islets against the toxic effect of streptozotocin* Diabetes 2000, 49: 1131-6
101. Kullin, M., Li, Z. Hansen, J.B. et al. *Protection of rat pancreatic islets by potassium channel openers against alloxan, sodium nitroprusside and interleukin-1 β mediated suppression. Possible involvement of the mitochondrial membrane potential* Diabetologia 2003 46: 80-8
102. Skak K. Gotfredsen C. Lundsgaard D. et al. *Improved β -cell survival and reduced insulinitis in a type 1 diabetic rat model after treatment with a β -cell-selective K_{ATP} channel opener* Diabetes 2004 53: 1089-95
103. Zdravkovic, M. Kruse M. Rost K. et al. *The effects of NN414, a SUR1/Kir6.2 selective potassium channel opener, in healthy male subjects* J Clin Pharmacol 2005 45: 763-72.
104. Pirotte B. de Tullio, P., Antoine M.-H. et al. *New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers* Expert Opin Ther Patents 2005 15: 497-504
105. Schou S. Hansen H. Tagmose T. et al. *Synthesis and pharmacological evaluation of 4H-1,4-benzothiazine-2-carbonitrile 1,1-dioxide and N-(2-cyanomethylsulfonylphenyl) acylamide derivatives as potential activators of ATP-sensitive potassium channels* Bioorg Med Chem 2005 13: 141-55.
106. Lebrun P., Devreux V. Hermann M. et al. *Pinacidil inhibits insulin release by increasing K $^{+}$ outflow from pancreatic β -cells* Eur J Pharmacol 1988 156: 283-6.
107. Tagmose T. Mogensen J. Agerholm P. et al. *Phenylcyanoguanidines as inhibitors of glucose-induced insulin secretion from β cells* Bioorg Med Chem Lett 2001 11: 1749-52.
108. Tagmose, T. Schou, S. Mogensen J. et al. *Arylcyanoguanidines as activators of Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channels and inhibitors of insulin release* J Med Chem 2004 47: 3202-11
109. Tagmose T. Zaragoza F. Boonen, H. et al. *Synthesis and biological activity of 3,3-diamino-sulfonylacrylonitriles as novel inhibitors of glucose-induced insulin secretion from β cells* Bioorg Med Chem 2003 11: 931-40
110. Sebillé S. de Tullio P. Boverie S. et al. *Recent developments in the chemistry of potassium channel activators. The cromakalim analogs* Curr Med Chem 2004 11: 1213-22
111. Mannhold, R. *Structure-activity relationships of K_{ATP} channel openers* Curr Top Med Chem 2005 5: 1031-47
112. Cosgrove K. Straub S. Barnes P. et al. *Y-26763, ATP-sensitive K $^{+}$ channel activation and the inhibition of insulin release from human pancreatic β -cells* Eur J Pharmacol 2004, 486: 153-9.
113. Sebillé, S. de Tullio P. Becker, B. et al. *4,6-Disubstituted 2,2-dimethylchromans structurally related to the K_{ATP} channel opener cromakalim. Design, synthesis and effect on insulin release and vascular tone* J Med Chem 2005 48: 614-21
114. Sebillé, S. Gail, D. de Tullio, P. et al. *Design, synthesis and pharmacological evaluation of R/S-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-6-halo-4-(phenylaminocarbonylamino)-2H-1-benzopyrans: Toward tissue-selective pancreatic β -cell K_{ATP} channel openers structurally related to ($\pm$) cromakalim* J Med Chem 2006 49: 1690-7
115. Nielsen F. Jacobsen P. Worsaae A. et al. *2-(4-Methoxyphenoxy)-5-nitro-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamide activates Kir6.2/SUR1 K_{ATP} channels* Bioorg Med Chem Lett 2004 14: 5727-30
116. Peat A. Townsend C. McKay C. et al. *9-Trifluoromethyl-4-nitro-5-arylpyrazoles are novel K_{ATP} channel agonists* Bioorg Med Chem Lett 2004 14: 813-6

Annexe 18

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07D 285/24, 417/04, 417/12, 453/02, 453/06, A61K 31/54		AI	(11) International Publication Number: WO 97/49692 (43) International Publication Date: 31 December 1997 (31.12.97)
(21) International Application Number: PCT/DK97/00266 (22) International Filing Date: 19 June 1997 (19.06.97) (30) Priority Data: 0693/96 21 June 1996 (21.06.96) DK 1451/96 19 December 1996 (19.12.96) DK (71) Applicant: NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK). (72) Inventors: PIROTTE, Bernard; 5, rue Toilet, B-4680 Oupeye (BE). LEBRUN, Philippe; 102, rue des Chats, B-1082 Bruxelles (BE). De TULLIO, Pascal; 31, rue sur les Moulins, B-4020 Liège (BE). SOMERS, Fabian; 109, rue Lairese, B-4020 Liège (BE). DELARGE, Jacques; 7, rue Haie des Chênes, B-4140 Dolembreux (BE). HANSEN, John, Bondo; Langdsen 3, DK-4450 Jyderup (DK). NIELSEN, Flemming, Elmelund; Furesø Parkvej 46, DK-2830 Virum (DK). HANSEN, Holger, Claus; Annexgårdsparcken 43, DK-3500 Værløse (DK). MOGENSEN, John, Patrick; Dybdalsvej 69, DK-2720 Vanløse (DK). TAGMOSE, Tina, Møller, Farum Hovedgade 52, 204, DK-3520 Farum (DK).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>	
(54) Title: 1,2,4-BENZOTHIADIAZINE DERIVATIVES, THEIR PREPARATION AND USE			
(I)			
(57) Abstract 1,2,4-Benzothiadiazine derivatives represented by formula (I) wherein D, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ are defined in the description, compositions thereof and methods for preparing the compounds are described. The compounds are useful in the treatment of diseases of the central nervous system, the cardiovascular system, the pulmonary system, the gastrointestinal system and the endocrinological system.			

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

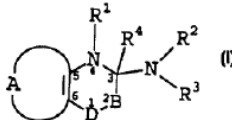
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07D 513/04, 487/04, A61K 31/54		A1	(11) International Publication Number: WO 97/26264
			(43) International Publication Date: 24 July 1997 (24.07.97)
(21) International Application Number: PCT/DK97/00018		(74) Agent: NOVO NORDISK A/S; Corporate Patents, Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK).	
(22) International Filing Date: 16 January 1997 (16.01.97)			
(30) Priority Data: 0042/96 17 January 1996 (17.01.96) DK 0246/96 5 March 1996 (05.03.96) DK 0247/96 5 March 1996 (05.03.96) DK 0248/96 5 March 1996 (05.03.96) DK 0249/96 5 March 1996 (05.03.96) DK		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN. ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Applicant: NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK- 2880 Bagsvaerd (DK).		Published With international search report.	
(72) Inventors: PIROTTÉ, Bernard; 5, rue Tillet, B-4680 Oupeye (BE). LEBRUN, Philippe; 102, rue des Chats, B-1082 Bruxelles (BE). De TULLIO, Pascal; 31, rue sur les Moulins, B-4020 Liege (BE). SOMERS, Fabian; 109, rue Lairesse, B-4020 Liege (BE). DELARGE, Jacques, Elie; 7, rue Hale des Chênes, B-4140 Doielembrux (BE). HANSEN, Holger, Claus; Annexgårdsparke 43, DK-3500 Værløse (DK). NIELSEN, Flemming, Elmelund; Furesø Parkvej 46, DK-2830 Virum (DK). HANSEN, John, Bondo; Langåsen 3, DK-4450 Jyderup (DK).			

(54) Title: PYRIDO-1,2,4-THIAZINE AND PYRIDO-1,4-THIAZINE DERIVATIVES, THEIR PREPARATION AND USE

(57) Abstract

Pyrido-1,2,4-thiazine and -1,4-thiazine derivatives represented by formula (I) wherein A, B, D, R¹, R², R³ and R⁴ are defined in the description, compositions thereof and methods for preparing the compounds are described. The compounds are useful in the treatment of diseases of the central nervous system, the cardiovascular system, pulmonary system, the gastrointestinal system and the endocrinological system.



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

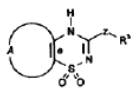
(51) International Patent Classification 6 : C07C 275/28, 335/16, 233/07, 271/26, C07D 295/16, 203/04, 205/02, A61K 31/17, 31/16, 31/33		A1	(11) International Publication Number: WO 99/07672 (43) International Publication Date: 18 February 1999 (18.02.99)
(21) International Application Number: PCT/DK98/00337 (22) International Filing Date: 24 July 1998 (24.07.98) (30) Priority Data: 0906/97 5 August 1997 (05.08.97) DK 60/055,193 11 August 1997 (11.08.97) US (71) Applicant: NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK). (72) Inventors: DORWALD, Florencio, Zaragoza; Højagerparken 30, 1, DK-2750 Ballerup (DK). HANSEN, John, Bondor Larsen 3, DK-4450 Jyderup (DK). MOGENSEN, John, Patrick; Dybdalsvej 69, DK-2720 Vanløse (DK). TAG- MOSE, Tina, Møller; Farum Hovedgade 52, 204, DK-3520 Farum (DK). PIROTTE, Bernard; 5, rue Tollet, B-4680 Oupeye (BE). LEBRUN, Philippe; 102, rue des Chats, B-1080 Bruxelles (BE). De TULLIO, Pascal; 31, rue sur les Moulins, B-4020 Liège (BE). BOVERIE, Stéphane; 18, avenue de la Gare, B-4460 Grâce-Hollogne (BE). DE- LARGE, Jacques; 7, haie des Chênes, B-4140 Dolembreux (BE).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW. ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>	
(54) Title: DERIVATIVES OF 2,5- AND 3,5-DISUBSTITUTED ANILINES, THEIR PREPARATION AND USE			
(57) Abstract Substituted anilines of general formula (I) wherein R¹, R², R³, R⁴ and X are defined in the description, compositions thereof and methods for preparing the compounds are described. The compounds are useful for the treatment of diseases of the central nervous system, the cardiovascular system, the pulmonary system, the urogenital system, the gastrointestinal system and the endocrinological system.			
(I)			

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07D 513/04, A61K 31/54 // (C07D 513/04, 285:00, 221:00)	A1	(11) International Publication Number: WO 99/32495 (43) International Publication Date: 1 July 1999 (01.07.99)
(21) International Application Number: PCT/DK98/00559 (22) International Filing Date: 17 December 1998 (17.12.98) (30) Priority Data: 1487/97 19 December 1997 (19.12.97) DK (71) Applicant (for all designated States except US): NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): DE TULLIO, Pascal [BE/BE]; 31, rue sur les Moulins, B-4020 Liège (BE); BOVERIE, Stéphane [BE/BE]; 18, avenue de la Gare, B-4460 Grâce-Hollogne (BE); SOMERS, Fabian [BE/BE]; 109, rue Lairesse, B-4020 Liège (BE); LEBRUN, Philippe [BE/BE]; 102, rue des Chats, B-1080 Bruxelles (BE); PIROTTE, Bernard [BE/BE]; 5, rue Tollet, B-4680 Oupeye (BE); NIELSEN, Flemming, Elmelund [DK/DK]; Furesø Parkvej 46, DK-2830 Virum (DK); HANSEN, John, Bondo [DK/DK]; Langaasen 3, DK-4450 Jyderup (DK). (74) Common Representative: NOVO NORDISK A/S; Corporate Patents, Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK).	(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published With international search report.	
(54) Title: PYRIDO 1,2,4-THIAZINE DERIVATIVES, THEIR PREPARATION AND USE  (I) (57) Abstract Pyrido 1,2,4-thiazine derivatives of general formula (I) wherein Z, A and R³ are defined in the description, compositions thereof and methods for preparing the compounds are described. The compounds are useful in the treatment of diseases of the central nervous system, the cardiovascular system, the pulmonary system, the gastrointestinal system and the endocrinological system.		

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07D 285/24, 417/12, 453/02, 453/06, A61K 31/54	A1	(11) International Publication Number: WO 99/32467 (43) International Publication Date: 1 July 1999 (01.07.99)
(21) International Application Number: PCT/DK98/00546 (22) International Filing Date: 11 December 1998 (11.12.98) (30) Priority Data: 1489/97 19 December 1997 (19.12.97) DK (71) Applicant: NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK). (72) Inventors: DE TULLIO, Pascal; 31, rue sur les Moulins, B-4020 Liège (BE). NIELSEN, Flemming, Elmelund; Fure-soe Parkvej 46, DK-2830 Virum (DK). HANSEN, John, Bondo; Langaaen 3, DK-4430 Jyderup (DK). HANSEN, Holger, Claus; Annexgaardsparken 43, DK-3500 Værløse (DK). PIROTTE, Bernard; 5, rue Tolleit, B-4680 Oupeye (BE). BOVERIE, Stéphane; 18, avenue de la Gare, B-4460 Grâce-Hollogne (BE). SOMERS, Fabian; 109, rue Laitresse, B-4020 Liège (BE). LEBRUN, Philippe; 102, rue des Chats, B-1082 Bruxelles (BE). MOGENSEN, John, Patrick; Dybdalsvej 69, DK-2720 Vanløse (DK).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published With international search report.
(54) Title: 1,2,4-BENZOTHIADIAZINE DERIVATIVES, THEIR PREPARATION AND USE (I) (57) Abstract 1,2,4-benzothiadiazine derivatives of general formula (I) wherein R³, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ and Z are defined in the description, compositions thereof and methods for preparing the compounds are described. The compounds are useful in the treatment of diseases of the central nervous system, the cardiovascular system, the pulmonary system, the gastrointestinal system and the endocrinological system.		

Annexe 19



Numéro de publication : **0 618 209 A1**

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt : 94400627.9

51 Int. Cl.⁵ : **C07D 513/04**, A61K 31/54,
// (C07D513/04, 285:00,
221:00)

22 Date de dépôt : 24.03.94

30 Priorité : 26.03.93 FR 9303458

43 Date de publication de la demande :
05.10.94 Bulletin 94/40

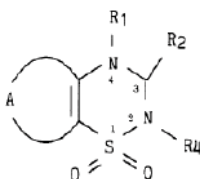
84 Etats contractants désignés :
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LJ LU NL
PT SE

71 Demandeur : ADIR ET COMPAGNIE
1 rue Carle Hébert
F-92415 Courbevoie Cédex (FR)

72 Inventeur : Piroto, Bernard
5 rue Tollet
B-4680 Cupeye (BE)
Inventeur : De Tullio, Pascal
255 rue de Bois de Breux
B-4020 Jupille (BE)
Inventeur : Masereel, Bernard
70 rue des Vieux Fours
B-6890 Libin (BE)
Inventeur : Delarge, Jacques
7 rue Haie des Chênes
B-4140 Dolembreux (BE)
Inventeur : Lepagnol, Jean
4 rue L'église
F-28210 Chaudon (FR)
Inventeur : Renard, Pierre
50 avenue de Villeneuve l'Etang
F-78000 Versailles (FR)

54 Nouvelles pyridothiadiazines, leurs procédés de préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent.

57 L'invention concerne les composés de formule (I) :



(I)

EP 0 618 209 A1

dans laquelle A, R₁, R₂, et R₄ sont tels que définis dans la description.
Médicaments.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 juin 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/40210 A1

(51) Classification internationale des brevets:
C07D 285/24, A61K 31/549, A61P 25/18

B-4860 Pepinster (BE). **LESTAGE, Pierre** [FR/FR]; 9,
allée de la Grande Terre, F-78170 La Celle Saint Cloud
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03313

(74) Représentant commun: **ADIR ET COMPAGNIE**; 1, rue
Carle Hébert, F-92415 Courbevoie Cedex (FR).

(22) Date de dépôt international:
28 novembre 2000 (28.11.2000)

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/15034 30 novembre 1999 (30.11.1999) FR

(84) États désignés (régional): brevet eurasien (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, TR).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): **ADIR
ET COMPAGNIE** [FR/FR]; 1, rue Carle Hébert, F-92415
Courbevoie Cedex (FR).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

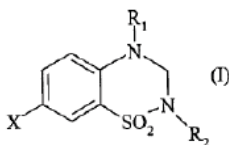
(72) Inventeurs: et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **PIROTTE,
Bernard** [BE/BE]; 5, rue Tollet, B-4680 Oupeye (BE).
DE TULLIO, Pascal [BE/BE]; 31, rue sur les Moulins,
B-4020 Jupille sur Liège (BE). **BOVERIE, Stéphane**
[BE/BE]; 18, avenue de la Gare, B-4460 Bieret (BE).
KEMPEN, Isabelle [BE/BE]; 41b, rue de la Libération,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL BENZOTHIADIAZINE DERIVATIVES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPO-
SITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre: NOUVEAUX DÉRIVÉS DE BENZOTHIADIAZINES, LEUR PROCÉDE DE PRÉPARATION ET LES COMPO-
SITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT



(57) Abstract: The invention concerns a compound of formula (I) wherein: X represents a fluorine, bromine or iodine atom or a methyl group; R₁ and R₂, identical or different, represent each a hydrogen atom or an alkyl group; their isomers when they exist, as well as their additive salts to a pharmaceutically acceptable acid.

(57) Abrégé: Composé de formule (I) dans laquelle X représente un atome de fluor, de brome ou d'iode ou un groupement méthyle, R₁ et R₂, identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, leurs isomères lorsqu'ils existent, ainsi que leurs sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable.

WO 01/40210 A1

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 854 634

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 03 05448

(51) Int Cl⁷ : C 07 D 513/04, A 61 K 31/549, A 61 P 25/18 //
(C 07 D 513/04, 285:00, 333:00)

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 05.05.03.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.11.04 Bulletin 04/46.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : LES LABORATOIRES SERVIER
Société anonyme — FR.

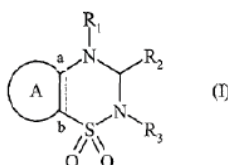
(72) Inventeur(s) : GRAINDORGE EMMANUEL, FRAN-
COTTE PIERRE, BOVERIE STEPHANE, DE TULLIO
PASCAL, PIROTTE BERNARD, LESTAGE PIERRE,
DANOBER LAURENCE, RENARD PIERRE et CAI-
GNARD DANIEL HENRI.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) :

(54) NOUVEAUX DERIVES DE THIADIAZINE, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT.

(57) Composés de formule (I) :



dans laquelle :

- A représente un groupement thiénylie, furylie, pyrroly-
lie, oxathiole, thiazole, isothiazole, oxazole ou imidazole.

- ——— représente une liaison simple ou une liaison double,
- R₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupe-
ment alkyle (C₁-C₆) linéaire ou ramifié, éventuellement
substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène,
- R₂ représente un atome d'hydrogène ou un groupe-

ment alkyle (C₁-C₆) linéaire ou ramifié, éventuellement
substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène,

- R₃ représente un atome d'hydrogène ou un groupe-
ment choisi parmi alkyle (C₁-C₆) linéaire ou ramifié, CON-
HR' ou SO₂NHR' dans lesquels R' représente un
groupement alkyle (C₁-C₆) linéaire ou ramifié,
leurs énantiomères, diastéréoisomères ainsi que leurs
sels d'addition à un sel ou à une base pharmaceutique-
ment acceptable.

Médicaments.

FR 2 854 634 - A1



(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 557 412 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
27.07.2005 Bulletin 2005/30

(51) Int Cl.7: C07D 285/24, A61K 31/549,
A61P 25/28

(21) Numéro de dépôt: 05290160.0

(22) Date de dépôt: 25.01.2005

(84) Etats contractants désignés:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR
Etats d'extension désignés:
AL BA HR LV MK YU

- Franklin Pierre
4820 Dison (BE)
- Tullio Pascal
4020 Jupille (BE)
- Pirotte Bernard
4680 Oupeye (BE)
- Lestage Pierre
78170 La Celle Saint Cloud (FR)
- Danober Laurence
78360 Montesson (FR)
- Caignard Daniel-Henri
78360 Le Pecq (FR)
- Renard Pierre
78150 Le Chesnay (FR)

(30) Priorité: 26.01.2004 FR 0400689

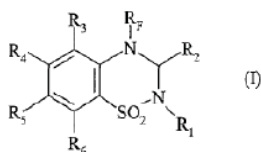
(71) Demandeur: Les Laboratoires Servier
92415 Courbevoie Cedex (FR)

(72) Inventeurs:

- Francotte Pierre
4000 Liège (BE)

(54) **Dérivés de benzothiadiazines fluorées et leur utilisation comme modulateurs des récepteurs AMPA**

(57) Composé de formule (I) :



dans laquelle :

- > R_F représente un groupement mono- ou poly- fluoroalkyle, ou monofluoro- ou polyfluoro- cycloalkylalkyle,
- > R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupement choisi parmi alkylaminocarbonyl et alkyle éventuellement substitué,
- > R_2 représente un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un groupement choisi parmi cycloalkyle et alkyle éventuellement substitué,
- > R_3 à R_6 , identiques ou différents, représentent chacun un atome ou un groupement choisi parmi les atomes d'hydrogène, d'halogène et les groupements nitro, cyano, alkylsulfonyle, hydroxy, alkoxy, alkyle éventuellement substitué, et amino éventuellement substitué,

ainsi que leurs sels d'addition avec un acide ou une base pharmaceutiquement acceptable, et leurs isomères optiques lorsqu'ils existent.

EP 1 557 412 A1

UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTÉ DES SCIENCES

**THESE ANNEXE 1 :
DESIGN, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION
BIOLOGIQUE DE BENZOPYRANES EN TANT
QU'ACTIVATEURS DES CANAUX POTASSIQUES
SENSIBLES À L'ATP**

Pascal de Tullio
Docteur en Sciences
Chercheur qualifié du FNRS

Laboratoire de Chimie Pharmaceutique
Professeur Bernard Pirotte

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur
2007

Publications en relation avec la thèse annexe 1

- Sebille S., de Tullio P., Boverie S., Antoine M.-H., Lebrun P., Pirotte B. 2004, Recent development in the chemistry of potassium channel activators: the cromakalim analogues. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1213-1222.
- Sebille S., de Tullio P., Becker B., Antoine M.-H., Boverie S. Pirotte B. 2005, 4,6-Disubstitued 2,2-Dimethylchromans Structurally Related to the K_{ATP} Channel Opener Cromakalim: Design, Synthesis, and effect on Insulin Release and Vascular Tone. *J. Med. Chem.* **48**, 614-621.
- Sebille S., Gall D., de Tullio P., Florence X., Lebrun P., Pirotte B. 2006, Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of R/S-3,4-Dihydro-2,2-dimethyl-6-halo-4-(phenylaminocarbonylamino)-2H-1-benzopyrans: Toward Tissue-Selective Pancreatic β -Cell K_{ATP} Channel Openers Structurally Related to ($\pm$)-Cromakalim. *J. Med. Chem.* **49**, 4690-4697.
- Khelili S., Lebrun P., de Tullio P., Pirotte B. 2006, Synthesis and pharmacological evaluation of some N-aryl-N-methyl-N'-(2,2-dimethyl-2H-1-benzopyrane-4-yl)ureas structurally related to cromakalim. **14**, 3530-3534.

Design, synthèse et évaluation biologique de benzopyranes en tant qu'activateurs des canaux
potassiques sensibles à l'ATP

UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTÉ DES SCIENCES

THESE ANNEXE 2:
APPLICATION DE LA RMN ET DE LA
SPECTROMETRIE DE MASSE A LA
METABOLOMIQUE DANS LES DOMAINES
BIOMEDICAL ET BIOPHARMACEUTIQUE.

Pascal de Tullio
Docteur en Sciences
Chercheur qualifié du FNRS

Laboratoire de Chimie Pharmaceutique
Professeur Bernard Pirotte

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur
2007

Résumé des travaux

Le métabolome peut être vu comme l'ensemble des produits finaux provenant de l'expression des gènes, à savoir les métabolites produits par les cellules dans des conditions spécifiques. Il définit le phénotype biochimique d'une cellule ou d'un tissu. L'évaluation qualitative et quantitative du métabolome fournit donc une vue générale du statut biochimique de l'organisme, qui peut être utilisée pour évaluer la fonction des gènes. Il est ainsi possible de définir la métabolomique comme l'étude de l'ensemble des composés de faible masse moléculaire (= métabolites, à l'exclusion des protéines) présents dans une cellule, un organe, un organisme (et biosynthétisés par celui-ci). Actuellement, aucune technique analytique à elle seule ne permet de profiler réellement l'ensemble du métabolome et cela représente une limitation majeure. Les méthodes les plus couramment utilisées pour définir le profil métabolique sont la chromatographie (liquide ou gazeuse), la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). En tenant compte d'exigences telles que la vitesse, la sélectivité, la reproductibilité et la sensibilité, les techniques basées sur la RMN sont généralement acceptées comme une approche analytique de choix en métabolomique. La spectroscopie RMN du proton, utilisée comme outil en métabolomique, possède plusieurs avantages. Bien qu'elle ne soit pas très sensible (comparée p. ex. à la SM), elle est très reproductible (déplacement chimique et intensité), elle permet de couvrir la plus grande part des métabolites et elle permet éventuellement la détermination de la structure des métabolites inconnus ou inattendus. De plus, les signaux des spectres RMN sont basés sur la concentration molaire des métabolites et peuvent directement être comparés. Les avantages de la spectroscopie RMN, couplés à sa rapidité et à la robustesse des signaux obtenus, en font une technique de premier choix pour une approche métabolomique "macroscopique" permettant d'obtenir un large profil du métabolome. Cependant, malgré tous les avantages de la RMN, il apparaît nécessaire de confronter les résultats obtenus à ceux générés par d'autres techniques analytiques. La chromatographie liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse (SM) constitue une alternative de choix à l'étude du métabolome. En effet, dans de nombreuses études, la CL-SM s'est révélée être

très complémentaire à la RMN, dans la mesure où ces deux techniques ont permis d'établir des conclusions identiques en termes de toxicité et de classification des échantillons, bien qu'elles aient mis en évidence des marqueurs différents [Wilson et al., 2005, Williams et al., 2005]. De plus, la SM est une technique très sensible et devrait donc permettre la détection de métabolites présents dans les fluides biologiques à l'état de traces. L'utilisation d'une source de type électrospray, utilisée en modes positif et négatif, devrait permettre l'obtention de profils extrêmement riches. Le couplage d'un spectromètre de masse à haute résolution (de type Q-TOF, en collaboration avec ATC, une société de services bioanalytiques dépendant du CHU de Liège) et d'une μ -CL constitue un outil de choix, dont nous disposons, afin d'obtenir des profils métabolomiques de qualité. La fragmentation des marqueurs d'intérêt pourrait nous donner des informations précieuses en vue de leur identification.

L'approche métabolomique est actuellement en plein développement dans de très nombreux domaines biomédicaux et biopharmaceutiques [Choi et al., 2004, Bollard et al., 2005, Odunsi et al., 2005, Wang et al., 2004]. Disposant d'un appareil RMN à haut champ et de spectromètres de masse performants situés au sein du Département de Pharmacie et proches du CHU de l'Université de Liège et soucieux d'utiliser au mieux ces outils, il nous est apparu extrêmement intéressant de développer l'approche moderne et prometteuse qu'est la métabolomique autour de différents projets associant approches fondamentales et applications cliniques. Cette stratégie, couplée aux approches plus classiques, devrait nous permettre de parfaire notre connaissance du métabolome et d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la recherche et l'identification de biomarqueurs de pathologies et/ou de toxicité. Les projets développés au cours de cette étude sont à classer en trois volets principaux mais pourront être étendus à d'autres domaines en fonction des résultats obtenus.

Volet 1 - en collaboration avec le Service d'Ophtalmologie du CHU (Prof. J.-M. Rakic)

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de perte visuelle chez les personnes de plus de 70 ans dans le monde occidental. Cette cécité résulte de la perte de fonction de la macula (au centre de la rétine)

qui est responsable de la vision centrale. Cette dégénérescence représente un handicap social indéniable et une perte de liberté pour ces personnes. La pathogénie de cette affection est complexe et peu comprise. La forme la plus grave de cette maladie est associée à une poussée vasculaire (angiogenèse) vers l'espace sous-rétinien qui entraîne une fibrose avec perte des photorécepteurs. La plupart des lésions ne sont pas curables par photocoagulation laser et les stratégies thérapeutiques actuelles sont insuffisantes. De grandes lacunes existent quant aux perturbations métaboliques à l'origine de la DMLA. L'étude métabolomique d'échantillons sanguins provenant de patients atteints des formes exsudative et sèche de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, et leur comparaison par rapport à des échantillons provenant de donneurs sains et jeunes, devrait nous permettre d'évaluer l'impact de cette pathologie sur le métabolisme et d'identifier d'éventuels biomarqueurs indiquant le type de pathologie associée. Cette approche, plus pratique, devrait apporter des informations importantes quant à la connaissance des causes de la DMLA.

Volet 2 - en collaboration avec les services de Chimie Médicale et de Cardiologie du CHU (Prof. V. Legrand, Dr. O. Gach, Prof. J.P. Chapelle).

L'athérosclérose est un processus complexe, comportant une importante composante inflammatoire, caractérisée par une évolution progressive des lésions coronariennes, depuis la lésion primaire jusqu'à l'apparition d'une plaque instable. La complication la plus grave de l'athérosclérose est l'infarctus du myocarde aigu. Plusieurs biomarqueurs peuvent actuellement être dosés par des méthodes enzymoimmunologiques mais ils manquent, en général, de sensibilité et de spécificité et en outre peu efficaces dans les premiers stades de la maladie. Il est donc de la plus grande importance de rechercher de nouveaux biomarqueurs permettant une définition plus précoce du risque encouru par le patient, ainsi que l'identification précise des sujets à haut risque de complications.

Nous comptons utiliser des échantillons de sérum ou de plasma prélevés chez des patients qui viennent en consultation au service de Cardiologie interventionnelle du CHU pour mise au point invasive d'un syndrome coronaire instable ou d'une maladie coronarienne stable. Des bilans pré et post-intervention

seront systématiquement prévus. Un échantillon d'urine sera éventuellement demandé.

L'étude métabolomique d'échantillons sanguins provenant de patients atteints d'athérosclérose coronarienne stable ou instable et leur comparaison à des échantillons provenant de donneurs sains devrait permettre de repérer d'éventuels nouveaux biomarqueurs d'athérosclérose, d'identifier ceux associés à une déstabilisation de cette maladie et à terme de les utiliser dans le développement d'une méthode de diagnostic précoce.

Volet 3 - en collaboration avec le laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement de l'ULg (Prof. A. Noël).

La formation de métastases et la diffusion métastatique sont des phénomènes importants et primordiaux dans la progression tumorale. Elles sont les principales responsables de la haute mortalité qu'engendrent certains cancers et restent difficiles à prévoir et à contrôler. Certains des phénomènes à la base de l'invasion métastatique, dont l'angiogenèse, l'intravasation et l'extravasation pourraient être guidés par l'intervention de certaines métalloprotéases. C'est afin de mieux cerner l'action de ces métalloprotéases que différents modèles de développement de cancer chez la souris ont été mis au point au sein du Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement de l'Université de Liège. L'étude de l'effet de ces différents types de tumeurs sur le métabolisme global des souris par l'utilisation de la RMN et de la spectrométrie de masse pourrait se révéler extrêmement intéressante que ce soit pour l'identification de profils métaboliques représentatifs d'un état cancéreux, la distinction sur la base de ce profil des différents types de tumeurs, la recherche de biomarqueurs spécifiques liés à ces pathologies ou encore la modification potentielle du profil métabolique en fonction du stade d'avancement des tumeurs (angiogenèse ou métastase).

L'analyse statistique des données spectrales générées est actuellement réalisée par le Service du Professeur Govaerts de l'UCL.

En conclusion, le développement de la métabolomique par l'utilisation de la RMN et de la SM, seule ou en couplage avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire, et les perspectives qu'elle ouvre, représentent un important enjeu non seulement pour la découverte et l'amélioration d'outils diagnostiques modernes mais également pour une meilleure compréhension des pathologies.

Ce projet est relativement récent et est en pleine phase de développement. Il est le fruit d'une collaboration entre les services de Pharmacognosie (Dr. Michel Frédéric) d'analyse des médicaments (Dr. Marianne Fillet) et le service de Chimie Pharmaceutique. Par ailleurs, Pauline Sainvitu effectue un DEA sur le sujet. Actuellement, nous avons effectué la mise au point des séquences nécessaires à l'analyse RMN et la prise des spectres des volets 1 et 3 sont en cours. Des investigations sont également entreprises afin de définir les meilleures conditions expérimentales pour l'analyse des échantillons par LC-MS. Les premiers résultats devraient être disponibles dans le courant de cette année académique.

Références :

- Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. 2005. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* 18,143-62.
- Choi HK, Choi YH, Verberne M, Lefeber AW, Erkelens C, Verpoorte R. 2004. Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by ¹H NMR and multivariate analysis technique. *Phytochemistry.* 65,857-64.
- Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, Geisler JP, Miller G, Sellers T, Cliby W, Qian F, Keitz B, Intengan M, Lele S, Alderf, 2005. Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabonomics. *Int J Cancer.* 113,782-8.
- Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, Singer BH, Utzinger J. 2004. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101,12676-81.
- Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM, 2005. HPLC-MS-Based methods for the study of metabonomics. *J. Chromatogr. B,* 5, 67-76
- Williams R.E., Lenz E.M., Evans J.A., Wilson I.D., Granger J.H., Plumb R.S., Stumpf C.L., A combined (¹H NMR and HPLC-MS-based metabonomic study of urine from obese (fa/fa) Zucker and normal Wistar-derived rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 465-471, 2005.

Application de la RMN et de la spectrométrie de masse à la métabolomique dans les domaines biomédical et biopharmaceutique.

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTÉ DES SCIENCES

THESE ANNEXE 3 :

LES DERIVES COUMARINIQUES EN TANT
QU'INHIBITEURS DE L' α -CHYMOTRYPSINE OU EN
TANT QU'AGENTS ANTI-CANCEREUX ET ANTI-
ANGIOGENIQUES

Pascal de Tullio

Docteur en Sciences

Chercheur qualifié du FNRS

Laboratoire de Chimie Pharmaceutique

Professeur Bernard Pirotte

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur

2007

Publications en relation avec la thèse annexe 3

Pochet L., Doucet C., Schynts M., Thierry N., Bogetto N., Pirotte B., Jiang K., Masereel B., de Tullio P., Delarge J., Reboux-Ravaux M. 1996, Esters and amides of 6-(chloromethyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as inhibitors of α -chymotrypsin : significance of the « aromatic » nature of the novel ester-type coumarin for strong inhibitory activity. *J. Med. Chem.* **39**, 2579-2585.

Hemmer M., Plançon S., Bernard Y., Bueb J.-L., Tschirhart E., de Tullio P., Pirotte B. 2006, Conception, synthèse et évaluation biologique de composés coumariniques en tant qu'agents anti-cancéreux et anti-angiogéniques potentiels. Communication par affiche lors des Journées franco-belges de Pharmacochimie, Lille 2006.

Les dérivés coumariniques en tant qu'inhibiteurs de l' α -chymotrypsine ou en tant qu'agents anti-cancéreux et anti-angiogéniques