

Dérivés de triazolo[4,3-*a*]quinoléines et de tétrazolo[1,5-*a*]quinoléines Synthèse, évaluation pharmacologique en tant qu'agents antiagrégants plaquettaires agissant par inhibition de phosphodiésterases

P Desos¹, G Schlewer^{1*}, C Lugnier², A Beretz³, JP Maffrand⁴, A Bernat⁴, CG Wermuth¹

¹Département de Pharmacochimie Moléculaire, Centre de Neurochimie du CNRS et U44 de l'INSERM,
6, rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg;

²Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS URA 600, Faculté de Pharmacie,
74, route du Rhin, 67401 Illkirch Graffenstaden;

³INSERM U 311, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 10 rue Spielmann, 67085 Strasbourg;

⁴Sanofi Recherches, Ligne Hémostase, 195 route d'Espagne, 31036 Toulouse, France

(Reçu le 9 janvier 1990; accepté le 31 juillet 1990)

Résumé - L'isostérie lactame-triazole ou lactame tétrazole, appliquée aux lactames des quinoléinones du composé Y-590 ou du cilostazole conduit à des molécules de potentialités analogues sur l'inhibition spécifique de phosphodiésterases plaquettaires, sur l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et les effets antithrombotiques. Par contre la même isostérie appliquée au carbonyle du "lactame" de la pyridazinone du composé Y-590 conduit à une perte notable de l'activité, signe de l'importance de la pyridazinone pour les effets observés. Cependant ce carbonyle lactamique peut être remplacé par une amidine ou un thioamide avec un maintien des activités.

Summary - Triazolo[4,3-*a*]quinoline and tetrazolo[1,5-*a*]quinoline derivatives. Synthesis and pharmacological evaluation as platelets antiaggregating agents acting through phosphodiesterases inhibition. The lactame-triazole or lactame-tetrazole isostery applied to the quinolinone lactames of compound Y-590 or cilostazole lead to compounds which show similar potencies on platelet specific phosphodiesterase inhibition, platelet aggregation inhibition and antithrombotic effects. On the other hand a supplementary isostery of the same type applied to the pyridazinone carbonyl group of compound Y-590 resulted in a dramatic loss of activity illustrating the importance of the pyridazinone moiety for the observed effects. However, this lactame carbonyl group can be replaced by an amidine or a thioamide group with retention of the activities.

Triazolo[4,3-*a*] quinolines / tétrazolo[1,5-*a*] quinolines / platelet antiaggregating agents / phosphodiesterase inhibitor

Les plaquettes sanguines participent de manière active à l'hémostase primaire, en permettant l'arrêt rapide du saignement après une brèche vasculaire [1]. Cette propriété des plaquettes met en jeu diverses réactions fonctionnelles: adhésion, agrégation, sécrétion. Toutefois, les mêmes propriétés physiologiques des plaquettes peuvent intervenir dans le déclenchement ou la propagation de certaines thromboses pathologiques. Les plaquettes ne sont pas le seul acteur mis en jeu dans la pathologie thrombotique; d'autres cellules (leucocytes, cellule endothéliale), et les systèmes de coagulation et de la fibrinolyse y participent également. Il existe toutefois certains types de thromboses où les plaquettes semblent jouer un rôle

majeur, en particulier la thrombose artérielle et la thrombose induite par les biomatériaux [2, 3]. C'est en vue de la prévention ou du traitement de ce type de thrombose que se justifie le développement de médicaments inhibiteurs des fonctions plaquettaires.

Un des mécanismes essentiels permettant d'inhiber l'activation des plaquettes est d'augmenter le taux intracellulaire d'AMP_c [4]. Le rôle principalement reconnu à une augmentation du taux d'AMP_c plaquettaire est d'inhiber les réponses liées à une augmentation de la concentration de calcium libre cytoplasmique par divers mécanismes: 1) inhibition des mécanismes conduisant à une augmentation du taux de calcium après stimulation des plaquettes; 2) activation du recaptage du calcium libre par le système tubulaire dense [4, 5]. On a également décrit que l'augmentation du GMP_c entraînerait une forte inhibition des

*Correspondance et tirés à part

fonctions plaquettaires [4, 6, 7]. Les plaquettes vont se trouver exposées *in vivo* simultanément à un grand nombre d'agents activateurs agissant en synergie par des mécanismes différents [8]. L'approche pharmacologique visant à développer des médicaments antiplaquettaires agissant sur le taux de nucléotides cycliques est particulièrement justifié par le fait que cette augmentation conduit à l'inhibition des fonctions plaquettaires quel que soit le mécanisme de leur activation [2, 4, 5]. Une augmentation du taux intraplaquettaire des nucléotides cycliques peut être obtenue en inhibant leur dégradation par les phosphodiesterases. La forme principale de phosphodiesterase des plaquettes hydrolysant l'AMP_c est l'isoenzyme à faible K_m inhibée par le GMP_c [9]. Elle se distingue par des propriétés différentes de l'enzyme présente dans le muscle lisse vasculaire qui est caractérisée par son insensibilité au GMP_c et son inhibition spécifique par le Rolipram [6]. Cette différence permet d'envisager la synthèse d'inhibiteurs agissant spécifiquement sur l'isoenzyme plaquettaire et ainsi moins susceptibles de déclencher des effets secondaires [10].

Les inhibiteurs de phosphodiesterases (IPDE) doués de propriétés antiagrégantes plaquettaires et antithrombotiques appartiennent à des familles chimiques très variées [11-39] dont les aryl-6 dihydro-4,5 pyridazinones-3 [23, 24] et les quinoléinones-2 [25-31]. Les deux représentants majeurs dans ces classes chimiques sont le composé Y-590 **1** de la firme Yoshitomi [25, 26, 32] et le cilostazole **2** de la firme Otsuka [27, 28]. Le composé Y-590 présente chez l'animal une très bonne activité antithrombotique ($DE_{50} = 0,1$ mg/kg *po*). Celle-ci est cependant accompagnée d'effets hypotenseurs importants. Le cilostazole **2**, d'activité plus faible ($DE_{50} = 15$ mg/kg *po*) ne présente que des effets hypotenseurs modérés, ce qui lui confère une potentialité thérapeutique intéressante.

Dans le travail que nous présentons ici nous avons cherché à explorer les possibilités de variations bioisostériques au niveau des fonctions carbonylées du composé Y-590 **1** et du cilostazole **2**. Plusieurs exemples de la littérature ont montré que le remplacement d'un dipôle de carbonyle par un dipôle iminé inclus dans un système hétérocyclique conduisait à des dérivés très actifs comme l'illustre le passage du diazepam **3** au triazolam **4** [33] ou du cilostamide **5** au cilostazole **2** (fig 1). En s'inspirant de ces exemples, nous avons envisagé le remplacement de l'un ou des deux carbonyles du composé Y-590 par des cycles triazoliques ou tétrazoliques (fig 2). Ce même type d'isostérie a été envisagé également au niveau du carbonyle de la quinoléinone du cilostazole. Enfin nous avons effectué des variations isostériques sur la pyridazinone du composé Y-590 où nous avons remplacé le carbonyle par une fonction imine ou thione (fig 2). Par le biais de ces isostéries nous espérons obtenir des IPDE agissant spécifiquement sur

l'agrégation plaquettaire et sans effet vasodilatateur important en ciblant spécifiquement l'AMP_c-PDE plaquettaire.

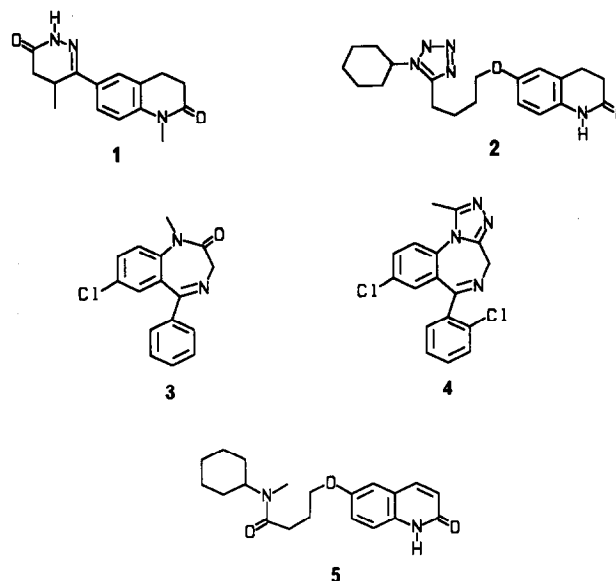


Fig 1. Structure des composés de référence.

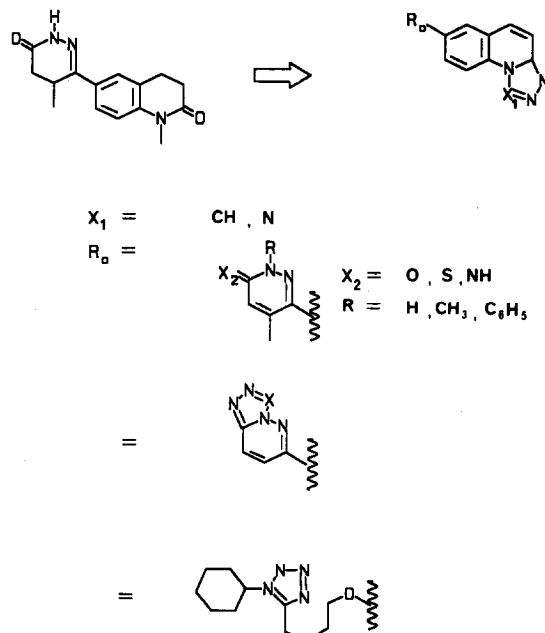


Fig 2. Isostéries envisagées.

Synthèse

Les analogues triazolo **6-8** et tétrazolo **9-11** de **1** ont été obtenus par hétérocyclisation des gamma-céto-esters correspondants **12, 13** au moyen d'hydrazines

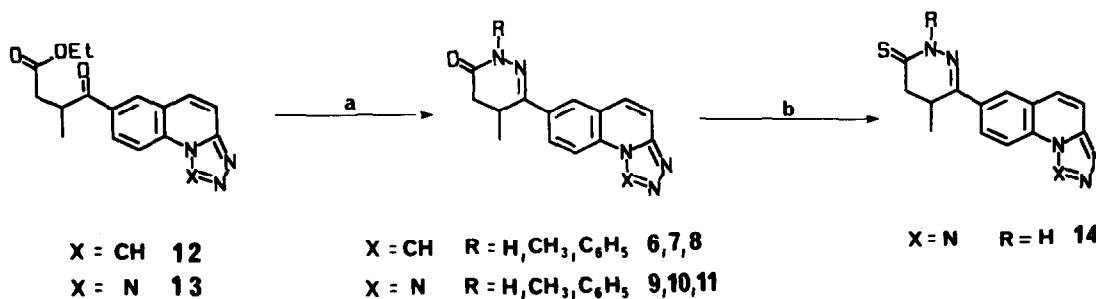


Schéma 1. Schéma de synthèse de triazolo [4,3-*a*]- et de tétrazolo [1,5-*a*]quinoléines dérivés du Y-590; a: $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$; H_2O /éthanol; b: P_2S_5 /pyridine.

convenablement substituées [34] (schéma 1). Le dérivé thioamide **14** a été obtenu par traitement de la pyridazinone **9** par le pentasulfure de phosphore dans la pyridine (schéma 1). L'imino-pyridazine **15** est, quant à elle, obtenue par hétérocyclisation du gamma-cétonitrile **16** au moyen de l'hydrate d'hydrazine (schéma 2). Enfin les dérivés ditriazoliques **17** et ditétrazoliques **18** ont été préparés à partir de la dihydrazine **20** qui a été cyclisée en ditriazole par traitement à l'orthoformate d'éthyle et en ditétrazole par action de nitrite de sodium dans l'acide acétique [34]

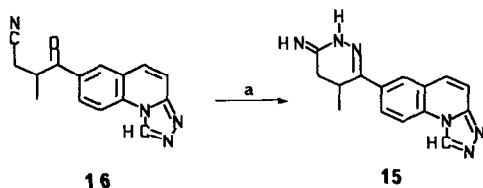


Schéma 2. Schéma de synthèse de l'isostère imine du composé **6**; a: $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$; H_2O .

(schéma 3). Cette même procédure a été utilisée pour former les dérivés triazoliques **21**, **22** et tétrazolique **23** de **2** à partir de la quinoléinone **24** (schéma 4).

Relations structure-activité

L'évaluation pharmacologique des molécules en tant qu'agents antiagrégants plaquettaires agissant par inhibition de phosphodiesterases a été réalisée par différents essais. *In vitro*, les activités inhibitrices ont été évaluées d'une part sur une préparation enzymatique brute de phosphodiesterase (PDE) de plaquettes humaines en présence de GMP_c ou d' AMP_c [35] et d'autre part sur l'agrégation de plaquettes sanguines intactes [36], induite par 3 agents agrégants, l'ADP, le collagène et la thrombine, rendant compte des 3 voies majeures d'activation plaquettaires [37-39]. *In vivo*, l'activité antithrombotique a été évaluée chez le rat par la mesure de la diminution pondérale

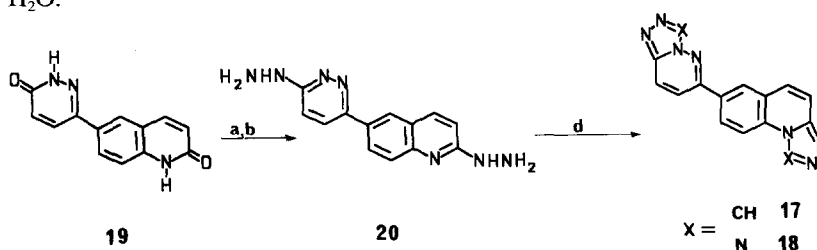


Schéma 3. Schéma de synthèse des dérivés ditriazolo- et ditétrazolo du Y-590; a: POCl_3 ; b: $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$; H_2O ; d: voir [30].

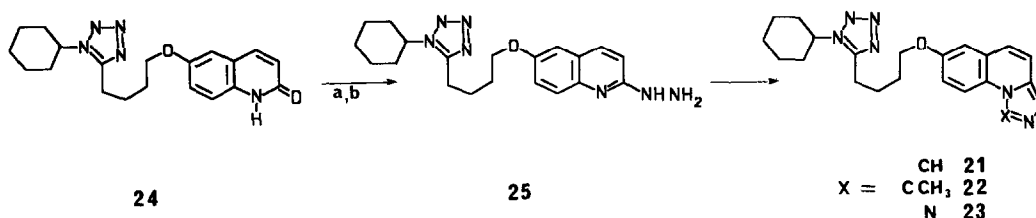


Schéma 4. Schéma de synthèse des dérivés ditriazolo- et ditétrazolo du Y-590; a: POCl_3 ; b: $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$; H_2O .

du thrombus formé sur une spirale métallique insérée dans la veine cave inférieure [40]. Les agents IPDE antiagrégants plaquettaires possédant souvent des effets secondaires, nous avons cherché à estimer la spécificité tissulaire des molécules (plaquettes *vs* muscle lisse) en évaluant leur activité inhibitrice *in vitro* sur les 3 formes de PDE isolées de média d'aorte de boeuf [41] et *in vivo* en mesurant la pression carotidienne chez le cobaye.

Les activités ont été comparées à celles de **1** et de **2** (tableau I). Pour ces 2 molécules de référence, les activités inhibitrices sur les PDE plaquettaires sont nettement supérieures à celles observées sur les PDE vasculaires. A cette spécificité tissulaire s'ajoute une spécificité de substrat (GMP_c *vs* AMP_c) qui est inversée selon le tissu considéré. Ainsi pour l'aorte, **1** est 10 fois plus actif sur la PDE-GMP_c que sur la PDE-AMP_c, alors que pour les plaquettes il devient sélectif de la PDE hydrolysant spécifiquement l'AMP_c (CI₅₀ GMP_c/AMP_c = 13,7). Nous noterons cependant, dans ce dernier cas, que l'activité observée est nettement plus faible que celle indiquée dans la littérature pour les PDE de plaquettes sanguines de lapin [26]. De même, **2** est sélectif de la PDE-AMP_c plaquettaire. Sur nos tests *in vivo*, il ne présente aucun effet antithrombotique même à 100 mg/kg *po* alors que **1** inhibe de 73% la thrombose à 0,3 mg/kg. Kimura *et al* [41] ont trouvé sur une autre espèce (souris) et un autre modèle sûrement plus plaquetto-dépendant (mortalité par injection d'ADP ou de collagène), une meilleure protection puisque les DE₅₀ sont comprises entre 3 et 30 mg/kg *po*. Les modèles sont cependant très différents et il est difficile de les comparer.

La transformation de la fonction lactame de **1** en triazole ou tétrazole sur la quinoléinone (**6-8** et **9-11**) a conduit à des dérivés d'activités supérieures ou comparables à celles de **1** lui-même (tableau II). Ces dérivés possèdent une très bonne sélectivité vis-à-vis de la PDE-AMP_c plaquettaire sur laquelle ils sont 8 à 200 fois plus actifs que sur celle provenant de la média d'aorte. Les meilleurs dérivés sont ceux où l'azote N(2) de la pyridazinone n'est pas substitué (**6**, **9**). Par ailleurs, une isostérie supplémentaire du type amide-thioamide ou amide-amidine au niveau de la pyridazinone a conduit à 2 dérivés **14** et **15** aussi puissants que **1**. Nos meilleurs inhibiteurs de la PDE-AMP_c plaquettaire (**6**, **9**, **14**) sont aussi les antiagrégants les plus puissants et cela quel que soit l'agent d'activation impliqué (ADP, collagène, thrombine). Ceci suggère que ces composés inhibent bien un phénomène commun à l'activation plaquettaire par ces 3 agents; leur action anti-agrégante pourrait donc bien être causée par l'augmentation du taux d'AMP_c intraplaquettaire et cela par l'inhibition de PDE. Parmi ces premières molécules, l'antiagrégant plaquettaire le plus puissant et le dérivé triazolique **6**. Par rapport à **1**, son activité est de 4 ou 25 fois plus élevée selon que l'agrégation a été induite respectivement par l'ADP ou le collagène. De même, le dérivé tétrazolique **9** possède une activité comparable à **1**. *In vivo*, **6**, **9** sont de puissants agents antithrombotiques, efficaces de 0,3 à 1 mg/kg *po* chez le rat. Cependant, à ces doses apparaissent déjà des effets hypotenseurs notables.

Appliquée simultanément aux 2 fonctions lactames de **1**, l'isostérie décrite ci-dessus a conduit à 2 dérivés

Tableau I. Activités IPDE, antiagrégante, antithrombotique et hypotensive des produits de référence; ns: non significatif; les valeurs relevées dans la littérature sont suivies de la référence correspondante.

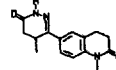
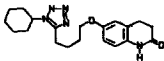
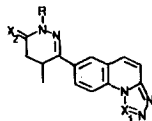
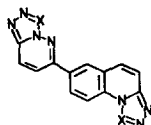
Molécule	Inhibition des PDE. CI ₅₀ µM					Activité antiagrégante CI50 µM			Activité antithrombotique DE mg/kg po (% d'inhibition)	Activité hypotensive DE mg/kg po (% d'activité)
	PDE d'aorte			PDE plaquettes		ADP 5 µM	Coll 5 mg/kg	Thromb 0,1 U/ml		
	PDE-CaM	PDE-GMP _c	PDE-AMP _c	PDE-GMP _c	PDE-AMP _c					
1 	26% à 100 µM	46	436	33 95 [26]	2,4 0,09 [26]	0,08 0,052 [25]	1,5 0,077 [25]	10	0,3 (73%) 0,1 (66%)	0,3 (38%)
2 	26% à 100 µM	25% à 100 µM	125	29 7,8 [27]	3 0,19 [27]	1 1,3 [27]	0,9 3,9 [27]	67	100 (11%)	ns

Tableau II. Activités IPDE, antiagrégante, antithrombotique et hypotensive de triazolo[4,3-*a*]- et de tétrazolo[1,5-*a*]quino-
léines dérivés du Y-590. ns: non significatif; nt: non testé.



Inhibition des PDE. CI_{50} μM									Activité antiagrégante CI_{50} μM			Activité antithrombotique	Activité hypotensive
				PDE d'aorte			PDE plaquettes					DE mg/kg po	DE mg/kg po
N°	X1	R	X2	PDE-CaM	PDE-GMPc	PDE-AMPc	PDE-GMPc	PDE-AMPc	ADP 5 μM	Coll 5 mg/l	Thromb 0,1 U/ml	(% d'inhibition)	(% d'activité)
6	CH	H	O	41	12	116	12	3	0,022	0,048	27	0,3 (35%) 1 (52%)	0,3 (27%) 1 (20%)
7	CH	CH ₃	O	60	76	63	12,9	7,1	8,9	9,6	14,8	10 (53%)	10 (33%)
8	CH	Ph	O	47	48	61	19	7,5	3,5	8,6	20	1 (19%)	1 (31%)
9	N	H	O	90	13	> 1000	7,3	1,8	0,11	0,16	> 200	1 (49%)	1 (25%)
10	N	CH ₃	O	181	116	165	14,7	10,5	13	25	> 50	10 (59%)	10 (24%)
11	N	Ph	O	31	7	60	2,5	3,2	8	23	> 100	10 (11%)	10 (24%)
14	N	H	S	ns	17	77	1,9	1,5	0,27	1,2	6,7	10 (29%)	nt
15	CH	H	NH	nt	nt	nt	21,4	4,2	8	8	> 100	nt	nt

Tableau III. Activités IPDE, antiagrégante et antithrombotique des dérivés ditriazolo-et ditétrazolo du Y-50; ns: non significatif; nt: non testé.

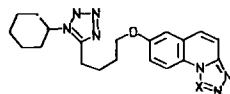


Inhibition des PDE. CI_{50} μM							Activité antiagrégante CI_{50} μM		Activité antithrombotique DE mg/kg po (% d'inhibition)	
N°	X	PDE d'aorte			PDE plaquettes		ADP 5 μM	Coll 5 mg/l	Thromb 0,1 U/ml	
		PDE-CaM	PDE-GMPc	PDE-AMPc	PDE-GMPc	PDE-AMPc				
17	CH	19% à 100 μM	29% à 100 μM	8% à 100 μM	118	15,7	3	8	> 20	nt
18	N	8% à 50 μM	21% à 50 μM	> 100	233	65,3	11% à 50 μM	> 50	> 50	ns

d'activité modérée (tableau III). Seules des propriétés antiagrégantes sont conservées pour le ditriazole **17**. Par comparaison aux dérivés précédents **6-8** et **9-11**, ces résultats montrent l'importance de la fonction lactame de la pyridazinone pour l'activité de la molé-

cule. La pyridazinone ne semble tolérer que de petites isostéries.

Les activités des analogues de **2** (tableau IV) montrent des variations intéressantes selon la provenance tissulaire des PDE étudiées. Ainsi, l'isostérie au

Tableau IV. Activités IPDE, antiagrégante et antithrombotique des dérivés triazolo-et tétrazolo du cilostazole; ns: non significatif; nt: non testé.

N°	X	Inhibition des PDE. CI_{50} μM					Activité antiagrégante CI_{50} μM		Activité antithrombotique DE mg/kg po (% d'inhibition)	
		PDE d'aorte		PDE plaquettes						
		PDE-CaM	PDE-GMPc	PDE-AMPc	PDE-GMPc	PDE-AMPc	ADP 5 μM	Coll 5 mg/l	Thromb 0,1 U/ml	
21	HC	75	60	40	nt	7,4	16	56	> 200	ns
22	H ₃ CC	ns	142	35	nt	18,4	51	45% à 100 μM	> 100	10 (27%)
23	N	67	> 1000	3,5	nt	18,3	30% à 50 μM	25% à 50 mM	> 50	ns

niveau du lactame du cilostazole se traduit par un gain d'activité sur la PDE-AMP_c vasculaire, notamment pour **23**. Ce dérivé est 35 fois plus actif que **2**. Sur les PDE plaquettaires, par contre, cette isostérie entraîne une perte très nette de l'activité; **23** est 6 fois moins actif que **2**. Cette modulation du profil d'activité rend bien compte des différences biochimiques existantes pour la PDE-AMP_c, selon sa provenance. Cependant, cette modulation d'effet ne va pas, ici, vers une inhibition sélectivement plaquettaire. A l'image de cette dernière, les propriétés antiagrégantes *in vitro* restent plus faibles que celles de **2**. *In vivo*, le dérivé méthyl-triazolo **22** présente, sur le modèle de thrombose, une activité significative contrairement au cilostazole lui-même, ce qui pourrait être dû à une meilleure biodisponibilité du dérivé du cilostazole **22**.

Partie expérimentale

Généralités

Les points de fusion ne sont pas corrigés. Les spectres RMN du proton ont été obtenus sur un appareil Bruker à 60 MHz; les déplacements chimiques sont donnés en δ ppm par rapport au TMS. Les microanalyses ont été effectuées par le Service Central d'Analyses du CNRS de Strasbourg.

Le composé Y 590 **1** a été généreusement offert par la firme Yoshitomi (Osaka, Japon), le cilostamide et le cilostazole **2** ont été resynthétisés dans nos laboratoires pour les besoins de cette étude; leurs analyses sont conformes à celles de la littérature.

(Méthyl-5 tétrahydro-2,3,4,5 thion-3 pyridazinyl-6)-7 tétrazolo [1,5-a] quinoléine **14**

Agiter pendant 2 h à 90°C, 1,15 g (4,1 mmol) de (méthyl-5 tétrahydro-2,3,4,5 pyridazinon-3-yl-6)-7 tétrazolo [1,5-a]

quinoléine **9** [30] et 0,45 g (2 mmol) de pentasulfure de phosphore dans 5 ml de pyridine. Evaporer à sec et reprendre le résidu dans de l'eau. Filtrer le précipité, rincer à l'eau, essorer et sécher. Purifier par chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol, 8/2. On obtient 0,85 g (70%) de **14**. F = 244,5°C. Analyses calculées pour C₁₄H₁₂N₆S: C = 56,73; H = 4,08; N = 28,36. Trouvées: C = 56,96; H = 4,12; N = 27,70. ¹H-RMN (CDCl₃): 1,12 (d, J = 7,5, 3H, CH₃); 2,7-3,1 (m, 2H, CH₂CHCH₃), 3,8-4,1 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 8,0-8,7 (m, 5H, ArH), 13,10 (s large, échangeable par D₂O, 1H, NH).

(Méthyl-5 tétrahydro-2,3,4,5 imino-3 pyridazinyl-6)-7 triazolo [4,3-a] quinoléine **15**

A 2,7 g (7,6 mmol) de (cyano-3 méthyl-2 propionyl)-7 triazolo [4,3-a] quinoléine **16** [30] dissous dans 20 ml d'éthanol et 1 ml d'acide acétique, ajouter 0,37 g (7,6 mmol) d'hydrate d'hydrazine. Agiter sous reflux pendant 1 nuit et filtrer le précipité jaune. Rincer à l'eau, essorer et recristalliser dans le DMF et l'eau. On obtient 1,7 g (80%) d'imine **15**. F > 300°C. Analyses calculées pour C₁₅H₁₄N₆; 1/2H₂O: C = 62,70; H = 5,26; N = 29,25. Trouvées: C = 62,29; H = 5,27; N = 28,92. ¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,19 (d, J = 7, 2, 3H, CH₃), 2,6- 3,2 (m, 3H, CH₂CHCH₃), 7,87 (d, J = 9,6, 1H, H₁₀), 8,14 (d, J = 7,2, 1H, H₉), 8,34 (d, J = 9,6, 1H, H₈), 8,4-8,7 (m, 2H, H₅ et H₇), 10,23 (s, 1H, N-CH=N), 12,30 (s large, échangeable par D₂O, NH₂).

[(Cyclohexyl-1 tétrazolyl-5)-4 butoxy]-7 triazolo [4,3-a] quinoléine **21**

Dissoudre 7,5 g (25 mmol) d'hydrazinoquinoléine **25** dans 100 ml de *n*-butanol. Ajouter 4,5 g (30 mmol) d'orthoformiate d'éthyle et agiter à 100°C pendant 1 nuit. Evaporer le solvant et reprendre le résidu dans le dichlorométhane. Laver la phase organique à l'eau puis avec une solution saturée de NaCl. Sécher sur MgSO₄, filtrer et évaporer les solvants. Chromatographier le brut réactionnel sur gel de silice élué au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol: 5/4/1; Recristal-

liser dans l'isopropanol et obtenir 7,1 g (73%) de triazoloquinoléine **21**. $F = 150^{\circ}\text{C}$. Analyses calculées pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}$: C = 64,43; H = 6,40; N = 25,05. Trouvées: C = 64,33; H = 6,40; N = 24,79. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1,0-2,8 (m, 14H, cyclohexyl et $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3,07 (t, $J = 5,5$, CH_2 -tétrazole), 3,9-4,4 (m, 3H, OCH_2 et $\text{HC}\leq$), 7,0-7,3 (m, 2H, H_8 et H_{10}), 7,55 (centre AB, $\Delta\delta = 0,17$, $J = 9,0$, 2H, H_5 et H_6), 7,85 (d, $J = 9,7$, 1H, H_9), 9,17 (s, 1H, H_3).

[(Cyclohexyl-1 tétrazolyl-5)-4 butoxy]-7 méthyl-3 triazolo [4,3-a] quinoléine 22

Même mode opératoire que pour **21** en utilisant l'orthoacétate d'éthyle à la place de l'orthoformiate d'éthyle. Rendement = 84%. $F = 166,7^{\circ}\text{C}$. Analyses calculées pour $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}$: C = 65,16; H = 6,71; N = 24,18. Trouvées: C = 64,99; H = 7,00; N = 24,17. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1,1-2,8 (m, 14H, cyclohexyl et $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3,05 (t, $J = 5,5$, 2H, CH_2 -tétrazole), 3,13 (s, 3H, CH_3), 3,9-4,4 (m, 3H, OCH_2 et $\text{HC}\leq$), 7,1-7,3 (m, 2H, H_8 et H_{10}), 7,61 (Centre AB, $\Delta\delta = 0,19$, $J = 9,0$, 2H, H_5 et H_6), 8,22 (d, $J = 10,5$, 1H, H_9).

[(Cyclohexyl-1 tétrazolyl-5)-4 butoxy]-7 tétrazolo [1,5-a] quinoléine 23

A une solution de 2,0 g (5,2 mmol) d'hydrazinoquinoléine **25** dans 20 ml d'acide acétique 2 N, ajouter une solution de 0,4 g (5,7 mmol) de nitrite de sodium dans 4 ml d'eau. Agiter 1 h à température ambiante. Filtrer le précipité, sécher et chromatographier sur gel de silice en éluant au mélange dichlorométhane/méthanol, 8/2. Recristalliser dans l'acétone pour obtenir 1,7 g (87%) de tétrazoloquinoléine **23**. $F = 145,2^{\circ}\text{C}$. Analyses calculées pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}$: C = 61,20; H = 6,16; N = 28,56. Trouvées: C = 60,82; H = 6,20; N = 28,85. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1,0-2,4 (m, 14H, cyclohexyl et $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3,01 (t, $J = 5,8$, 2H, CH_2 -tétrazole), 3,9-4,4 (m, 3H, OCH_2 et $\text{HC}\leq$), 7,2-7,6 (m, 2H, H_8 et H_{10}), 7,90 (Centre AB, $\Delta\delta = 0,21$, $J = 8$, H_5 et H_6), 8,65 (d, $J = 8,4$, 1H, H_9).

[(Cyclohexyl-1 tétrazolyl-5)-4 butoxy]-6 hydrazino-2 quinoléine 25

Agiter 8,5 g (23 mmol) de [(cyclohexyl-1 tétrazolyl-5)-4 butoxy]-6 quinoléinone-2(1H) **24** [24] dans 50 ml d'oxychlorure de phosphore à 70°C pendant 10 h. Evaporer à sec et hydrolyser le réactif résiduel par addition de glace pilée. Extraire au dichlorométhane. Laver la phase organique à l'eau, sécher sur MgSO_4 et évaporer les solvants après filtration. On obtient 7,7 g (87%) de [(cyclohexyl-1 tétrazolyl-5)-4 butoxy]-6 chloro-2 quinoléine. $F = 118,8^{\circ}\text{C}$. Analyses calculées pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NOCl}$: C = 62,22; H = 6,27; N = 18,15. Trouvées: C = 62,18; H = 6,30; N = 18,24. $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$): 1,1-2,0 (m, 14H cyclohexyl et $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3,01 (t, $J = 7,0$, 2H, CH_2 -tétrazole), 4,1-4,2 (m, 2H, CH_2O), 4,3-4,5 (m, 1H, H_3), 7,45 (d, $J = 10,0$, 1H, H_7), 7,47 (s, 1H, H_5), 7,53 (d, $J = 8,6$, 1H, H_3), 7,87 (d, $J = 10,1$, 1H, H_8), 8,31 (d, $J = 8,6$, 1H, H_4).

Porter à 110°C pendant 15 h une suspension de 6,0 g (20 mmol) de cette chloroquinoléine dans 60 ml d'hydrate d'hydrazine. Laisser refroidir et verser le milieu réactionnel dans 150 ml d'eau. Agiter la suspension et filtrer. Rincer le culot à l'eau et sécher au dessiccateur. Récupérer 5,4 g (90%) d'hydrazinoquinoléine **25**. Le produit peut être purifié par chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange de dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol, 5/4/1. $F = 115^{\circ}\text{C}$. Analyses calculées pour $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}$: C = 62,97; H = 7,14; N = 25,71. Trouvées: C = 62,92; H = 7,01; N = 25,42. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1,1-2,0 (m, 14H, cyclohexyl et $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 2,98 (t, $J = 7,0$, 2H, CH_2 -tétrazole), 4,1-4,2 (m, 2H, CH_2O), 4,24 (s échangeable par D_2O , 2H, NH_2), 4,3-4,5 (m, 1H, $\text{HC}\leq$), 6,84

(d, $J = 8,8$, 1H, H_3), 7,1-7,2 (m, 2H, H_5 et H_7), 7,47 (d, $J = 9,8$, 1H, H_8), 7,81 (d, $J = 8,8$, 1H, H_4).

Partie expérimentale biochimique et pharmacologique

Inhibition des PDE de média d'aorte de boeuf [41]

Après homogénéisation des fragments de média d'aorte de boeuf et centrifugation à 105 000 g, les PDE ont été fractionnées en 3 pics sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE Trisacryl IBF) éluée au moyen d'un gradient de NaCl. Le premier pic correspond à la PDE-CaM (forme activable par le couple calmoduline-calcium et hydrolysant préférentiellement le GMP_c), le deuxième pic correspond à la PDE- GMP_c (forme non activable par la calmoduline et hydrolysant spécifiquement le GMP_c), le 3^e pic correspond à la PDE- AMP_c (forme non activable par la calmoduline et hydrolysant spécifiquement l' AMP_c).

Les composés à tester ont été dissous dans le DMSO et ajoutés au tampon d'essai en prenant soin de ne pas dépasser une concentration finale de DMSO de 1%.

L'activité des composés a été évaluée sur la PDE-CaM, en présence d'une concentration de 1 μM de GMP_c , 10 μM de calcium et d'un excès de calmoduline (18 nM) et évaluée sur la PDE- GMP_c , en présence de 1 μM de GMP_c et de 1 mM d'EGTA, le rôle de ce dernier étant de complexer le calcium endogène afin d'éviter l'activation de la PDE-CaM contaminante, sur la PDE- AMP_c , en présence d'une concentration de 1 μM d' AMP_c et de 1 mM d'EGTA.

Dans ces conditions moins de 15% de substrat est hydrolysé, ceci afin d'obtenir une cinétique d'hydrolyse linéaire. Les CI_{50} ont été calculées par extrapolation de 6 valeurs comprises entre 25 et 75% d'inhibition contre le logarithme de la concentration de l'inhibiteur.

L'activité phosphodiésterasique est déterminée par une méthode radioenzymatique comprenant 2 étapes: hydrolyse du $[\text{H}^3]\text{AMP}_c$ ou de $[\text{H}^3]\text{GMP}_c$ en adénosine monophosphate tritié ou en guanosine monophosphate tritié par la phosphodiésterase étudiée et hydrolyse du nucléotide formé en $[\text{H}^3]\text{nucléoside}$ par un excès de 5'-nucléotidase. Le nucléoside tritié formé est séparé du nucléotide cyclique tritié de départ par chromatographie échangeuse d'anion (QAE-Sephadex).

Préparation des plaquettes sanguines humaines

Les plaquettes humaines ont été isolées et lavées par centrifugation [36]. Elles ont été resuspendues dans un tampon de Tyrode contenant 2 mM de Mg^{2+} , 5 mM d'Hepes, 1 mg/ml de glucose, 0,35% d'albumine humaine et de l'apyrase [36]. Les plaquettes ainsi préparées sont intactes, discoïdes, non activées et fonctionnelles pendant 6 à 8 h.

Inhibition de l'agrégation plaquettaire in vitro [36,43]

L'agrégation des plaquettes humaines a été suivie à 37°C , avec agitation à 1100 tours/min par une mesure turbidimétrique à l'aide d'un agrégomètre Payton (Scarborough, Ontario, Canada). 1 μl de substance à tester, dissoute dans le DMSO, a été ajouté à 0,5 ml de suspension plaquettaire ajustée à 300 000 plaquettes par μl et agité 30 s avant d'ajouter l'agent agrégant (ADP 5 μl , collagène 2,5 $\mu\text{g/ml}$, thrombine 0,1 U/ml). Les résultats ont été exprimés en CI_{50} (concentration produisant 50% d'inhibition de l'agrégation témoin observée en présence de 1 μl de DMSO) [43].

Inhibition des PDE des plaquettes sanguines humaines [35]

Les plaquettes sanguines ont été préparées comme indiqué ci-dessus et un homogénat brut est ensuite obtenu par sonication

et ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1 h [35]. L'activité des phosphodiesterases a été déterminée selon Wells *et al* [35, 44]. Les composés à tester ont été dissous dans le DMSO puis dans le tampon de la réaction enzymatique. L'activité a été mesurée avec l'AMP_c ou le GMP_c à une concentration de 1 µM en présence d'une concentration de 10 µM de calcium. La quantité de substrat hydrolysée a été maintenue en dessous de 20% Les CI₅₀ ont été calculées comme pour les PDE d'aorte de boeuf.

Activité antithrombotique [40]

Les composés à tester ont été dissous dans de la gomme arabique à 5% et administrés aux rats par voie orale à raison de 10 ml/kg, 2 h avant l'expérience. Une spirale métallique (bourse-pâte de dentiste recoupée) a été insérée dans la veine cave inférieure; 5 h après son insertion, elle a été prélevée avec le thrombus qu'elle retient, puis séchée par tamponnements répétés sur papier filtre et pesée. La spirale a ensuite été débarrassée de son thrombus, séchée et repesée. Par différence nous notons le poids du thrombus formé.

Activité hypotensive

Les composés à tester ont été solubilisés et administrés comme précédemment mais chez le cobaye. La pression carotidienne a été enregistrée par l'intermédiaire d'un capteur de pression relié à un polygraphe, l'animal étant anesthésié au pentobarbital.

Remerciements

Nous remercions A Van de Voorde pour son aide technique pendant son stage au laboratoire, ainsi que S Belmostefaoui, D Cassel et A Sutter-Bay.

Références

- Stormoken H (1986) In: *Platelet Responses and Metabolism*. Vol 1: Responses (Holmsen H, ed) CRC Press, Boca Raton 3-32
- Cazenave JP, Wiesel ML, Hemmendinger S (1984) *Agents Actions* 15, 24
- Stein B, Fuster V, Israel DH, Cohen M, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (1989) *J Am Coll Cardiol* 14, 813
- Kroll MH, Schafer AI (1989) *Blood* 74, 1181
- Siess W (1989) *Physiol Rev* 69, 58
- Gerzer R, Karrenbrock B, Siess W, Heim JM (1988) *Thromb Res* 52, 11
- Ignarro LJ (1989) *FASEB J* 3, 31
- Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF (1986) In: *Platelet Responses and Metabolism*. Vol 1: Responses (Holmsen H, ed) CRC Press, Boca Raton 193-207
- Beavo JA (1988) In: *Advances in Second Messenger and Protein Phosphorylation Research* (Greengard P, Robison GA, eds) Raven Press, NY 22, 1-38
- Lugnier C, Stierlé A, Beretz A, Schoeffter P, Lebec A, Wermuth CG, Cazenave JP, Stoclet JC (1983) *Biochem Biophys Res Commun* 113, 954
- Didisheim P (1968) *Thromb Diath Haemorrh* 20, 257
- Machleidt C, Rose P, Mittmann U (1985) *Thromb Res* 37, 595
- Ruppert D, Weithmann KU (1982) *Life Sci* 31, 2037
- Hillier K (1980) *Drugs Future* 4, 117
- Fleming JS, Buyniski JP (1979) *Thromb Res* 15, 373
- Muggli R, Tschopp TB, Mittelholzer E, Baumgartner R (1985) *J Pharmacol Exp Ther* 235, 212
- Ishikawa F, Kosasayama A, Yamaguchi H, Watanabe Y, Saegusa J, Shibamura S, Sakuma K, Ashida SI, Abiko Y (1981) *J Med Chem* 24, 376
- Ishikawa F, Saegusa J, Inamura K, Sakuma K, Ashida SI (1985) *J Med Chem* 28, 1387
- Jones GH, Venuti MC, Alvarez R, Bruno JJ, Berks AH, Prince A (1987) *J Med Chem* 30, 295
- Venuti MC, Jones GH, Alvarez R, Bruno JJ (1987) *J Med Chem* 30, 303
- Hidaka H, Endo T (1984) *Adv Cyclic Nucleotide Res* 16, 245
- Hillier K (1978) *Drugs Future* 3, 55
- Thyes M, Lehmann HD, Gries J, König H, Kretzschmar R, Kunze J, Lebkuher R, Lenke D (1983) *J Med Chem* 26, 800
- Sim AK, Mc Graw AP, Borbe HO, Wetzig H (1985) Motapizone (Nat-05-239), a novel antihypertensive drug with antithrombotic activity. Proceedings of the 3rd Congress on Thrombosis and Hemostasis. San Diego, Abstr 1239
- Mikashima H, Nakao T, Goto K (1983) *Thromb Res* 31, 599
- Mikashima H, Nakao T, Goto K, Ochi H, Yasuda H, Tsumagari T (1984) *Thromb Res* 35, 589
- Hill K (1982) *Drugs Future* 4, 264
- Nishi T, Tabusa F, Tanaka T, Shimizu T, Kanbe T, Kimura Y, Nakagawa K (1983) *Chem Pharm Bull* 31, 1151
- Hidaka H, Asano T (1976) *Biochem Biophys Acta* 429, 485
- Nishi T, Tabusa F, Tanaka T, Ueda H, Shimizu T, Kanbe T, Kimura Y, Nakagawa K (1983) *Chem Pharm Bull* 31, 852
- Nishi T, Yamamoto K, Shimizu T, Kanbe T, Kimura Y, Nakagawa K (1983) *Chem Pharm Bull* 31, 798
- Nakao T, Satoguchi S, Yaokama O (1978) Yoshitomi Pharmaceutical Int Ltd, Brevet Français 7829496, 17 Oct 1978
- Haefely W, Kyburg E, Gerecke M, Möhler H (1985) *Adv Drug Res* 14, 165
- Desos P, Schlewer G, Wermuth CG (1989) *Heterocycles* 28, 1085
- Beretz A, Briançon-Scheid F, Stierlé A, Corre G, Anton R, Cazenave JP (1986) *Biochem Pharmacol* 35, 257
- Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, Sutter-Bay A, Launay J (1983) *Ann Biol Clin* 41, 167
- Marguerie GA, Edgington TS, Plow EP (1980) *J Biol Chem* 255, 154
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 2994
- Steer ML, Salzman EW (1980) *Adv Cyclic Nucleotide Res* 12, 71
- Kumada Y, Ishihara M, Ogawa H, Abiko Y (1980) *Thromb Res* 18, 189
- Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC, (1986) *Biochem Pharmacol* 35, 1743
- Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K (1985) *Arzneim Forsch* 35, 1144
- Beretz A, Cazenave JP, Anton R (1982) *Agents Actions* 12, 382
- Wells JN, Baird CE, Wu UJ, Hardmann JG (1975) *Biochim Biophys Acta* 384, 430