

Institut für Pharmazeutische Chemie¹ der Technischen Universität Braunschweig und Biochemisches Institut² der Universitätsklinik Gießen, Germany

[1]Benzofuro[3,2-*b*]pyridin-4-yl-amine – Synthese und Prüfung auf Wirksamkeit gegen Malaria⁴

K. GÖRLITZER¹, H. MEYER¹, H. JOMAA², J. WIESNER²

Eingegangen am 16. September 2003, angenommen am 12. Oktober 2003

Prof. Dr. K. Görlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie, Beethovenstraße 55, D-38106 Braunschweig
k.goerlitzer@tu-bs.de

Pharmazie 59: 443–445 (2004)

Der 4-Chlorbenzofuro[3,2-*b*]pyridin-3-carbonsäureethylester (**2**) reagierte mit den Hydrochloriden der Mono- und Bis-Phenol-Mannich-Basen **3** zu den Amodiaquin- und Pyronaridin-Analogen **4**. Die Umsetzung von **2** mit der Novaldiamin-Base (**5**) in einer Phenolschmelze lieferte das Chloroquin-Analoge **6**. Die aktivste Substanz **4c** hemmte das Wachstum des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* mit einer IC₅₀ von 500 nM.

[1]Benzofuro[3,2-*b*]pyridin-4-yl-amines – synthesis and investigation of activity against malaria

The ethyl 4-chlorobenzofuro[3,2-*b*]pyridine-3-carboxylate (**2**) reacted with the hydrochlorides of the mono- and bis-phenol Mannich bases **3** to yield the amodiaquine and pyronaridine analogues **4**. The chloroquine analogue **6** was formed by melting **2** with the novaldiamine base (**5**) in phenol. The most active compound **4c** inhibited the growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* with an IC₅₀ of 500 nM.

1. Einleitung

Chloroquin-, Amodiaquin- und Pyronaridin-Analoga mit dem linear anellierten Pyrido[3,2-*b*]indol-4-yl- und dem [1]Benzothieno[3,2-*b*]pyridin-4-yl-Gerüst waren in vorherigen Arbeiten synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit gegen Malaria geprüft worden. Die größten Aktivitäten zeigten die Trihydrochloride der bis-aminomethylierten Phenol-Mannich-Basen **1**. Bei der *In-vitro*-Prüfung gegen den Chloroquin-sensitiven *Plasmodium-falciparum*-Stamm 3D7 ergab das Indol-Derivat **1a** einen IC₅₀-Wert von 50 nM und das Benzothieno-Derivat **1b** einen IC₅₀-Wert von 150 nM. Mit dem Chloroquin-resistenten Dd2-Stamm wurde für **1a** ein IC₅₀-Wert von 38 nM und für **1b** ein IC₅₀-Wert von 210 nM ermittelt. Verbindung **1a** zeigt auch in einem murinen Malariamodell Aktivität. Dabei wurde in *P. vinckei*-infizierten Mäusen nach oraler Applikation ein ED₅₀-Wert von 26 mg/kg bestimmt. Da keine toxischen Ef-

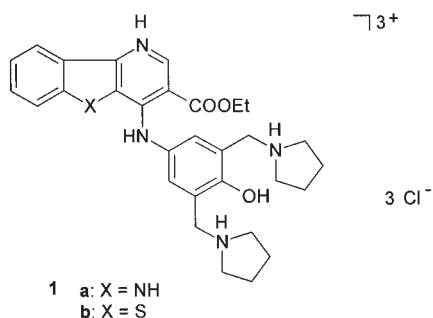
fekte beobachtet wurden, eignet sich **1a** als Leitstruktur für die Weiterentwicklung zu einem Antimalariamittel (Görlitzer et al. 2004a, 2004b).

In Fortsetzung der Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden hier Substanzen vorgestellt, bei denen der mittlere Pyrrol-Ring von **1a** oder der Thiophen-Ring von **1b** durch einen Furan-Ring ersetzt wird.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

2.1. Synthesen

Als Ausgangssubstanzen zur Darstellung der Titelverbindungen diente der 4-Chlorpyridin-3-carbonsäureethylester **2**, der durch Umsetzung des 1,4-Dihydro-4-oxo-[1]benzofuro[3,2-*b*]pyridin-3-carbonsäureethylesters mit Phosphoroxotrichlorid erhalten wurde (Görlitzer et al. 2000). Nach dem Erhitzen des 4-Chlorpyridins **2** mit den Hydrochloriden der mono- und bis-aminomethylierten Phenol-Mannich-Basen **3** (Burckhalter et al. 1948, Görlitzer et al. 2004a) in Ethylenglycolmonoethylether wurden die 4-Arylaminopyridine **4** isoliert und daraus die Hydrochloride dargestellt. Der 4-Chlorpyridin-3-carbonsäureester **2** reagierte mit der Novaldiamin-Base **5** und Natriumiodid in einer Phenolschmelze (Andersag 1948) unter nucleophiler Substitution des 4-Chlors. Beim Einleiten von Chlorwasserstoff in die Lösung der erhaltenen Base wurde das Dihydrochlorid **6** ausgefällt. Charakteristisch für die vinylogene Amidinium-Salze **4** sowie **6** ist die Absorption des 2-H bei tiefem Feld ($\delta \sim 9.00$) im ¹H-NMR-Spektrum.



Schema

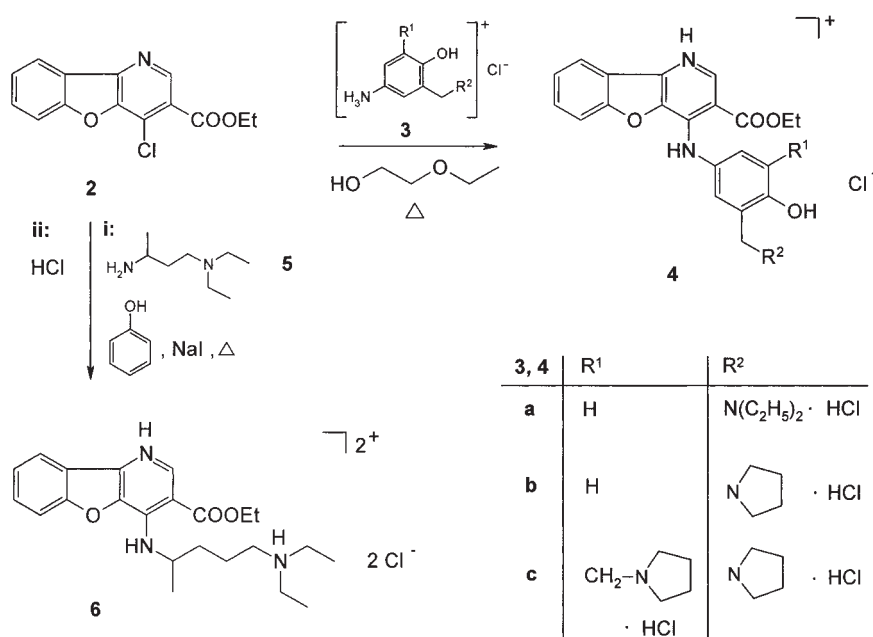


Tabelle: Wachstumshemmung des Chloroquin-resistenten *Plasmodium-falciparum* Stammes Dd2

Substanz	4a	4b	4c	6	Chloroquin
IC ₅₀ (nM)	2300	1100	500	3000	80

2.2. Prüfung auf Wirksamkeit gegen Malaria (Görlitzer et al. 2004a)

Die Verbindungen **4a–c** und **6** wurden gegen den Chloroquin-resistenten *P. falciparum*-Stamm Dd2 *in vitro* getestet. Die Chloroquin-analoge Substanz **6** zeigte nur schwache wachstumshemmende Wirkung mit einer IC₅₀ von 3000 nM. Höhere Aktivitäten wurden mit den Amodiaquin/Pyronaridin-analogen Substanzen **4a–c** beobachtet. Der IC₅₀-Wert der aktivsten Verbindung, dem Bispiperidinomethyl-Derivat **4c**, lag bei 500 nM (Tabelle). Aufgrund der vorliegenden Daten über Struktur-Wirkungs-Beziehungen an linear anellierten 6-5-6-Tricyclen (Görlitzer et al. 2004a, b) beschränkt sich die Weiterentwicklung zu einem Antimalariamittel auf das Pyrido[3,2-*b*]indol-Derivat **1a**. Bemerkenswerterweise wurden bei allen drei untersuchten Klassen von Heterocyclen die höchsten Aktivitäten mit den Pyronaridin-analogen Bispiperidinomethyl-Derivaten beobachtet. Daher sollte bei zukünftigen Untersuchungen dieses Strukturelement beibehalten und Substitutionen am Pyrido[3,2-*b*]indol-Gerüst vorgenommen werden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben

Vgl. Görlitzer et al. (2004a).

3.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 1) zur Darstellung der Amodiaquin- und Cycloquin-Analoga

0,28 g (1 mmol) **2** (Görlitzer et al. 2000) werden in 20 ml Ethylenglycolmonoethylether gelöst. Nach Zugabe von 1 mmol des Hydrochlorids der Phenol-Mannich-Base **3** (Görlitzer et al. 2000) wird unter N₂ für 2 h auf 120 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird i. Vak. abdestilliert,

der Rückstand mit H₂O aufgenommen, mehrfach mit EtOAc gewaschen, mit konz. NH₃ bis pH 9 alkalisiert und mehrfach mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird sc gereinigt (Eluent: EtOAc/HNEt₂ 99:1), in EtOH aufgenommen, mit Aktivkohle aufgekocht und filtriert. Man engt auf ein Drittel ein, überschichtet vorsichtig mit Et₂O, kühlt und saugt ab. Zur Darstellung der Hydrochloride wird der Rückstand in EtOH aufgenommen. Anschließend wird unter Eiskühlung HCl-Gas eingeleitet, vorsichtig mit Et₂O überschichtet, über Nacht gekühlt und der entstandene Niederschlag abgesaugt.

3.3. 4-(3-Diethylaminomethyl-4-hydroxy-phenylamino)-benzofuro[3,2-*b*]pyridin-3-carbonsäureethylester-dihydrochlorid (**4a**)

Darstellung gemäß AAV 1 aus **2** und **3a**. Ausbeute: 0,34 g (66%). Gelbe Kristalle, Schmp.: 216 °C (EtOH/Et₂O). IR (KBr): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3406$ (OH, NH), 3255 (NH), 1698 (C=O), 1631, 1622 (C=N, C=C). UV (H₂O): λ_{max} (lg ϵ) = 218 nm (4.30), 263 (4.40), 297 (4.30), 341 (3.89). ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ (ppm) = 1.20 (t, J = 7 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂), 1.40 (t, J = 7 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 3.08 (mc, J = 7 Hz, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 4.21 (d, J = 5 Hz, 2H, CH₂N), 4.42 (q, J = 7 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 7.07 (d, J = 9 Hz, 1H, 5'-H), 7.36 (dd, J = 9 Hz, J = 3 Hz, 1H, 6'-H), 7.48 (d, J = 8 Hz, 1H, 6-H), 7.53 (t, J = 8 Hz, 1H, 8-H), 7.53 (s, 1H, 2'-H), 7.68 (dt, J = 1 Hz, J = 8 Hz, 1H, 7-H), 8.33 (d, J = 8 Hz, 1H, 9-H), 9.05 (s, 1H, 2-H), 9.52 (br. s, 1H, OH), 10.31 (s, 1H, NH), 10.64 (s, 1H, NH⁺). MS (EI): m/z (%) = 433 (59) [M]⁺, 45 (100). HPLC (1): t_s = 5.22 min. C₂₅H₂₇N₃O₄ · 2 HCl (506.4)

3.4. 4-[4-Hydroxy-3-(pyrrolidinomethyl)phenylamino]-benzofuro[3,2-*b*]pyridin-3-carbonsäureethylester-dihydrochlorid-Dihydrat (**4b**)

Darstellung gemäß AAV 1 aus **2** und **3b**. Ausbeute: 0,30 g (55%). Beigefarbige Kristalle, Schmp.: 200–202 °C (EtOH/Et₂O). IR (KBr): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3420$ (OH, NH), 3283 (NH), 1701 (C=O), 1637, 1555 (C=N, C=C). UV (Dioxan): λ_{max} (lg ϵ) = 219 nm (4.34), 263 (4.42), 297 (4.32), 339 (3.93). ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ (ppm) = 1.41 (t, J = 7 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.83 und 1.93 (mc, mc, 2H, 2H, NCH₂CH₂CH₂, NCH₂CH₂CH₂), 3.08 und 3.37 (mc, mc, 2H, 2H, NCH₂CH₂, NCH₂CH₂), 4.43 (q, J = 7 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 7.12 (d, J = 9 Hz, 1H, 5'-H), 7.37 (dd, J = 9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, 6'-H), 7.54 (d, J = 8 Hz, 1H, 6-H), 7.56 (t, J = 7 Hz, 8-H), 7.60 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 2'-H), 7.70 (dt, J = 8 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, 7-H), 8.45 (d, J = 8 Hz, 1H, 9-H), 9.04 (s, 1H, 2-H), 10.52 (br. s, 2H, OH, NH), 10.71 (br. s, 1H, NH⁺). MS (EI): m/z (%) = 431 (82) [M]⁺, 360 (100). HPLC (2): t_s = 1.47 min. C₂₅H₂₅N₃O₄ · 2 HCl · 2 H₂O (540.4)

3.5. 4-[4-Hydroxy-3,5-bis(pyrrolidinomethyl)phenylamino]-benzofuro[3,2-*b*]pyridin-3-carbonsäureethylester-trihydrochlorid-Trihydrat (**4c**)

Darstellung gemäß AAV 1 aus **2** und **3c**. Ausbeute: 0,36 g (52%). Farblose Kristalle, Schmp.: 190 °C (EtOH/Et₂O). IR (KBr): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 3442$ (OH,

NH), 1709 (C=O), 1639, 1623, 1586 (C=N, C=C). UV (H₂O): λ_{\max} (lg ϵ) = 263 nm (4.43), 298 (4.35), 331 (3.96). ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ (ppm) = 1.42 (t, J = 7 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.82–1.88 (m, 4 H, NCH₂CH₂, NCH₂CH₂), 1.91–1.94 (m, 4 H, NCH₂CH₂, NCH₂CH₂), 3.12–3.18 (m, 4 H, NCH₂CH₂, CH₂CH₂), 3.39–3.47 (m, 4 H, NCH₂CH₂, NCH₂CH₂), 4.45 (m, 6 H, OCH₂CH₃, CH₂N), 7.54 (dt, J = 7 Hz, J = 1.4 Hz, 1 H, 8-H), 7.66 (m, J = 7 Hz, 2 H, 6-H, 7-H), 7.70 (s, 2 H, 2'-H, 6'-H), 8.38 (d, J = 8 Hz, 1 H, 9-H), 9.06 (s, 1 H, 2-H), 10.23 (br. s, 1 H, OH), 10.40 (s, 1 H, NH), 10.60 (br. s, 2 H, NH⁺). MS (EI): m/z (%) = 514 (29) [M]⁺, 374 (100). HPLC (2): t_s = 3.58 min. C₃₀H₃₄N₄O₄ · 3 HCl · 3 H₂O (678.1)

3.6. 4-(4-Diethylamino-1-methyl-butylamino)-benzofuro[3,2-b]pyridin-3-carbonsäureethylester-dihydrochlorid-Hemihydrat (6)

0.69 g (2.5 mmol) **2** werden mit 0.79 g (5 mmol) **5**, 0.24 g (2.5 mmol) Phenol und 0.02 g NaI unter N₂ 1 h auf 160 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz in 15% H₂SO₄ aufgenommen und mehrfach mit CHCl₃ gewaschen. Anschließend wird mit 12% NaOH alkalisiert und mit CHCl₃ extrahiert. Die organische Phase wird mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird in 20 ml EtOH aufgenommen. Anschließend wird unter Eiskühlung HCl-Gas eingeleitet. Der Ansatz wird vorsichtig mit Et₂O überschichtet, über Nacht gekühlt und der Niederschlag abgesaugt. Ausbeute: 0.62 g (52%). Gelbe Kristalle, Schmp.: 181 °C (EtOH). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3509, 3424 (NH), 1702 (C=O), 1634, 1619 (C=N, C=C). UV (H₂O): λ_{\max} (lg ϵ) = 223 nm (4.20), 263 (4.53), 298 (4.25), 322 (3.83), 336 (3.84). ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ (ppm) = 1.17 (dt, J = 7 Hz, J = 5 Hz, 6 H, N(CH₂CH₃)₂), 1.40 (t, J = 7 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.43 (d, J = 6 Hz, 3 H, CH(CH₃)), 1.75–1.88 (m, 4 H, CH₂CH₂), 3.07 (m, 6 H, NCH₂), 4.41 (q, J = 7 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 4.73 (mc, 1 H, CH), 7.62 (t, J = 7 Hz, 1 H, 8-H), 7.82 (t, J = 7 Hz, 1 H, 7-H), 7.99 (d, J = 8 Hz, 1 H, 6-H), 8.47 (d, J = 8 Hz, 1 H, 9-H), 8.96 (s, 1 H, 2-H), 9.12 (d, J = 9 Hz, 1 H, NH), 10.38 (br.s, 1 H, NH⁺). MS (EI): m/z (%) = 397 (7) [M]⁺, 86 (100). HPLC (1): t_s = 1.76 min. C₂₃H₃₁N₃O₃ · 2 HCl · 1/2 H₂O (479.4)

3.7. In vitro-Kultur von P. falciparum (Trager und Jensen 1976; Görlitzer et al. 2004a, b)

3.8. Bestimmung der In-vitro-Antimalaria-Aktivität (Ancelin et al. 1998; Desjardins et al. 1979; Görlitzer et al. 2004a, b)

⁴ Aus der Dissertation Holger Meyer, TU Braunschweig 2003

Literatur

- Ancelin ML, Calas M, Bompard J, Cordina G, Martin D, Ben Bari M, Jei T, Druilhe P, Vial HJ (1998) Antimalarial activity of 77 phospholipid polar head analogs: close correlation between inhibition of phospholipid metabolism and *in vitro* Plasmodium falciparum growth. Blood 91: 1426–1437.
- Andersag H (1948) Antimalariamittel aus der Gruppe halogensubstituierter Chinolinverbindungen. Chem Ber 81: 499–507.
- Burckhalter JH, Tendick FH, Jones EM, Jones PA, Holcomb WF, Rawlins AL (1948) Aminoalkylphenols as antimalarials. II (Heterocyclic-amino)- α -amino-o-cresols. The synthesis of camoquin. J Am Chem Soc 70: 1363–1373.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 16: 710–718.
- Görlitzer K, Kramer C, Boyle Ch (2000) Synthese und Transformationen des 1,4-Dihydro-4-oxo-[1]benzofuro[3,2-b]pyridin-3-carbonsäureethylesters, neue antibakterielle Wirkstoffe. Pharmazie 55: 651–658.
- Görlitzer K, Kramer C, Meyer H, Walter RD, Jomaa H, Wiesner J (2004a) Pyrido[3,2-b]indol-4-yl-amine – Synthese und Prüfung auf Wirksamkeit gegen Malaria. Pharmazie 59: 243–250.
- Görlitzer K, Meyer H, Walter RD, Jomaa H, Wiesner J (2004b) [1]Benzothieno[3,2-b]pyridin-4-yl-amine – Synthese und Prüfung auf Wirksamkeit gegen Malaria. Pharmazie im Druck.
- Trager W, Jensen JB (1976) Human Malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673–675.