

Agnieszka Bogdanowicz

**SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA
NOWYCH POCHODNYCH PIRYDYNY**

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry: dr hab. Jarosław Sławiński

Promotor pracy:
Prof. dr hab. Henryk Foks

Gdańsk 2010

Promotorowi –

Panu Profesorowi dr hab. Henrykowi Foksowi
za opiekę, nieocenioną pomoc i życzliwość
w trakcie realizacji niniejszej pracy
składam podziękowanie i wyrazy szacunku.

Dziękuję mojej mamie oraz mężowi za wiarę i wsparcie.

Pracę zrealizowano w ramach grantu promotorskiego
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Nr N N405 305736.

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	5
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	7
II.1. Aktualna sytuacja lekooporności bakterii.....	7
II.2. Kierunki i metody poszukiwań związków przeciwbakteryjnych	9
II.2.1. Analogi strukturalne linezolidu	10
II.2.2. Pochodne 3-cyjanopirydyny	13
II.2.3. Inhibitory syntetazy metionyno-tRNA	15
II.2.4. Analogi strukturalne Likochalkonu A	17
II.3. Gruźlica i jej zagrożenia w świetle narastającej lekooporności bakterii	18
II.3.1. Mechanizmy oporności prątków <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na stosowane leki przeciwgruźlicze.....	20
II.3.2. Analogi strukturalne związków o aktywności przeciwgruźliczej	23
II.3.2.1. Modyfikacje strukturalne kwasu <i>p</i> -aminosalicylowego (PAS)	23
II.3.2.2. Modyfikacje strukturalne tiacetazonu	24
II.3.2.3. Modyfikacje strukturalne izoniazydu	25
III. CEL PRACY	31
IV. BADANIA WŁASNE.....	35
IV.1. Otrzymywanie i struktura 2-[1,3-di(amino-podstawionych)allilideno]malononitryli 3a, 3b	35
IV.1.1. Synteza i reaktywność 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli 4a - c.....	36
IV.1.2. Reakcje 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli 4a - c z tiomocznikiem ^{54, 55}	40
IV.1.2.1. Synteza 2- <i>S</i> -podstawionych alkilowych, arylowych i acetylowych pochodnych nikotynonitryli 8a – y, 9a – h.....	42
IV.1.2.2. Synteza tieno[2,3- <i>b</i>]pirydyn.....	45
IV.1.2.3. Reakcje pirydyno-2(1 <i>H</i>)-tionów 7a – c z kwasem hydroksyloamino- <i>O</i> -sulfonowym	49
IV.1.3. Synteza i reaktywność pochodnych 2-amino-4-podstawionych-nikotynonitryli. 50	
IV.1.3.1. Otrzymywanie 2-amino-4-(pirolidyn-1-ylo)- i 2-amino-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitrylu (12b, c)	51
IV.1.3.2. Reakcje 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli 4b, c z aminami	52
IV.1.3.3. Reakcje kondensacji 2-amino-4-podstawionych-nikotynonitryli 12a - c z dimetyloformamidem-dimetyloacetalu	52
IV.1.4. Otrzymywanie, struktura i reaktywność pochodnych 4-podstawionych-pirydo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-5(8 <i>H</i>)-onów 15a - e.....	53
IV.1.5. Otrzymywanie 4-podstawionych i 1,4-dipodstawionych 3-amino-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]pirydyn 17a - d	63
IV.2. Synteza i reaktywność 4-podstawionych pochodnych kwasu pikolinowego	64
IV.2.1. Synteza i reaktywność (4-chloropirydyn-2-ylo)- pochodnych ¹⁰⁴	64
IV.2.1.1. Otrzymywanie i reaktywność metyloiminoestru kwasu 4-chloropikolinowego (20)	65
IV.2.1.2. Reakcje 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (23) z disiarczkiem węgla i izotiocyjanianami	66

IV.2.1.3. Reakcje 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (23) z aldehydami, ketonami i iminoestrami	69
IV.2.1.4. Reakcje <i>N'</i> -metylo-4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (24) z disiarczkiem węgla i izotiocyjanianem metylu	70
IV.2.2. Otrzymywanie i reaktywność pochodnych kwasu <i>N'</i> -[(4-podstawionego)pikolinoilo]ditiokarbazowego	71
IV.2.2.1. Synteza hydrazydów i <i>N'</i> -metylohydrazydów kwasu 4-chloro- i 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego 42 – 45	71
IV.2.2.2. Otrzymywanie <i>S</i> -estrów i <i>S,S'</i> -diestrów kwasu <i>N'</i> -(4-chloropikolinoilo)- i <i>N'</i> -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego 46a – 48d	73
IV.2.2.3. Otrzymywanie 1-(4-chloropikolinoilo)-4-podstawionych-tiosemikarbazydów 49a – d	77
IV.2.2.4. Synteza i reaktywność <i>S</i> -estrów kwasu <i>N'</i> -(4-chloropikolinoilo)- i <i>N'</i> -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]- <i>N</i> -metyloditiokarbazowego	80
IV.2.2.5. Otrzymywanie i struktura pochodnych 1,2,4-triazolotionów 52a – c	80
V. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ BIOLOGICZNYCH	83
V. 1. Aktywność przeciwmikrobiologiczna <i>in vitro</i> nowych pochodnych pirydyny względem bakterii tlenowych i beztlenowych	83
V. 2. Aktywność przeciwgruźlicza <i>in vitro</i> niektórych spośród otrzymanych w pracy nowych pochodnych pirydyny	95
VI. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	101
VII. WNIOSKI	140
VIII. PIŚMIENNICTWO	144

I. WSTĘP

Mikroorganizmy są przyczyną chorób infekcyjnych, które stanowią 25% wszystkich zgonów na świecie. Do zwalczania drobnoustrojów stosuje się leki będące pochodzenia naturalnego bądź produkty syntetyczne posiadające właściwości hamowania wzrostu lub powodujące ich śmierć.

Do dziś poznano ponad piętnaście klas związków przeciwmikrobiologicznych o różnej strukturze chemicznej i mechanizmach działania.

Od odkrycia pierwszego antybiotyku w 1928 roku do końca lat 70 – tych ubiegłego wieku można mówić o erze rozkwitu środków przeciwmikrobiologicznych. Lawinowo pojawiały się nowe antybiotyki o wąskim lub szerokim spektrum działania triumfujące w medycynie ludzkiej. Coraz częściej wykorzystywano je w leczeniu chorób bakteryjnych zwierząt i roślin.

Używanie antybiotyków, w połączeniu z poprawą warunków sanitarnych i żywieniowych, wpłynęło na znaczący spadek śmiertelności powodowanej powszechnymi chorobami infekcyjnymi i wzrost średniej długości życia.

Jednak powszechne, nadmierne i często niewłaściwe stosowanie antybiotyków spowodowało pojawienie się i rozprzestrzenienie patogennych mikroorganizmów, które stały się odporne na te leki. W wyniku tego antybiotyki przestają być skuteczne w leczeniu coraz większej liczby infekcji.

Do innych licznych czynników wpływających na rozprzestrzenianie się chorób infekcyjnych oraz wzrost oporności mikroorganizmów na stosowane dotychczas leki można zaliczyć:

- urbanizację połączoną z przeludnieniem i pogorszeniem warunków sanitarnych,
- zanieczyszczenie i degradację środowiska oraz zmianę warunków klimatycznych, co w szczególności wpływa na rozprzestrzenianie się chorób przenoszonych przez insekty,
- zmiany demograficzne, w wyniku których wzrasta ilość osób starszych wymagających hospitalizacji, a tym samym narażonych na kontakt z wysoce opornymi patogenami szpitalnymi,
- epidemię AIDS i wzrost populacji pacjentów z obniżoną odpornością,
- wzrost międzynarodowego handlu i turystyki,
- powszechne stosowanie środków przeciwmikrobiologicznych jako promotorów wzrostu w hodowlach zwierzęcych i związane z tym przenoszenie opornych bakterii na ludzi.

Potrzeba opracowania nowych klas leków przeciwbakteryjnych, które umożliwiłyby szybkie i skuteczne zwalczanie chorób infekcyjnych, a jednocześnie nie wykazywałyby toksyczności względem komórek ludzkich, spowodowana jest brakiem chemioterapeutyków aktywnych wobec patogennych szczepów.

Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie oraz Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego współpracują z wieloma ośrodkami naukowymi w Polsce, w tym również z Wydziałem Farmaceutycznym GUMed, prowadząc badania polegające na wyselekcjonowaniu najbardziej aktywnych związków, które stanowiłyby podstawę dla celowanych prac nad wdrożeniem nowych klas leków przeciwbakteryjnych.

Otrzymanie pochodnych pirydyny i pirazyny o znaczącej aktywności biologicznej jest jednym z efektów dotychczasowej współpracy powyższych ośrodków z Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej GUMed.

Wyniki badań opisane w niniejszej pracy stanowią kontynuację poszukiwań w tym kierunku.

Część wyników zawartych w tej pracy została opublikowana (pozycje piśmiennictwa 54, 55, 104).

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

II.1. Aktualna sytuacja lekooporności bakterii

Oporność na antybiotyki jest cechą części szczepów bakteryjnych, która umożliwia mikroorganizmom przeciwstawienie się wpływowi leku. Oporność można podzielić na pierwotną, wynikającą z naturalnej struktury bakterii uniemożliwiającej działanie leku, oraz nabytą. Przejście bakterii wrażliwych w odporne na dany lek może być zależne od spontanicznej mutacji lub też poprzez przeniesienie genów kodujących oporność, zlokalizowanych w chromosomie bakteryjnym lub w plazmidach, na drodze transdukcji lub bardziej powszechnej koniugacji.

W ostatnich latach poważne zagrożenie stanowią infekcje szpitalne, spowodowane wzrostem szczepów lekoopornych, szczególnie wielolekoopornych bakterii Gram (+), których możliwości leczenia są ograniczone. W wyniku pojawienia się nowych mechanizmów oporności, a także poprzez szerokie i szybkie rozprzestrzenianie się patogenów znanych już od lat, szczególnie niebezpiecznymi, z punktu widzenia nie tylko terapii, ale także epidemiologii oporności, stały się gronkowce i enterokoki.¹

Oporne na metycylinę stafylokoki oraz wankomycynę enterokoki stanowią poważny problem terapeutyczny na całym świecie.

Meticylinooporny *Staphylococcus aureus* (MRSA) został wykryty po raz pierwszy w Europie w 1961 roku, zaledwie 2 lata po wprowadzeniu do lecznictwa półsyntetycznych penicylin – meticyliny i oksacyliny. Częstość występowania MRSA jest najmniejsza w północnej Europie (1 - 2%), natomiast w Hiszpanii, Francji i Włoszech szczep ten stanowi ponad 30%.² Podstawę w leczeniu infekcji wywołanych MRSA stanowiły glikopeptydy (głównie wankomycyna), jednak pojawienie się szczepów *Staphylococcus aureus* opornych i na ten antybiotyk (VRSA) stanowi ogromne zagrożenie dla skutecznej terapii zakażeń gronkowcowych, gdyż wankomycyna uważana jest często za tzw. antybiotyk „ostatniej szansy”.

Obecnie ponad 90% gronkowców przez wytwarzanie penicylinaz jest niewrażliwych na działanie penicylin naturalnych, aminopenicylin i ureidopenicylin. Dostępnymi na rynku lekami wykazującymi aktywność względem gronkowców są penicyliny odporne na hydrolizę przez β -laktamazy, do których należą penicyliny izoksazolilowe i penicyliny z inhibitorami β -laktamaz (ampicylina/sulbaktam, amoksycylina/kwas klawulonowy) oraz cafalosporyny I i II

generacji. Szczepy odporne na metycylinę są jednocześnie odporne na wszystkie antybiotyki betalaktamowe, gdyż oporność nie jest związana z wytwarzaniem penicylinaz, lecz z syntezą zmienionego białka PBP2a wiążącego penicylinę, o niskim powinowactwie do tej grupy antybiotyków.³ Za kodowanie tego białka odpowiada gen *mecA*, stanowiący fragment chromosomalnego DNA.⁴

Wzrost powszechnego użycia wankomycyny w medycynie ludzkiej, a także stosowanie jako dodatku do pasz awoparcyny – glikopeptydu o budowie zbliżonej do wankomycyny, przyczyniły się również do rozwoju oporności enterokoków na glikopeptydy. Oporne na wankomycynę enterokoki (VRE) oznaczono po raz pierwszy w Europie w 1988 roku.⁵ Z doniesień literaturowych wynika, iż ilość enterokoków opornych na wankomycynę wzrosła w latach 1989 - 1998 z 0,4% do 22,6%, a szczepy *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus species* są patogenami wywołującymi około 12% wszystkich infekcji szpitalnych, co stanowi poważny problem, gdyż zazwyczaj są one odporne na wszystkie antybiotyki.⁶ Enterokoki charakteryzują się naturalną opornością na wiele dostępnych antybiotyków, wśród których są cefalosporyny, linkozamidy, kotrimoksazol i aminoglikozydy, a obok naturalnych mechanizmów nabyły szereg genów warunkujących oporność na glikopeptydy, penicyliny, tetracykliny, chloramfenikol, erytromycynę czy fluorochinolony.⁷

Oporność na wankomycynę jest cechą kodowaną chromosomowo lub plazmidowo przez geny *van*, których pochodzenie u enterokoków jest nadal nieznanne. Dotychczas opisano sześć klas fenotypowych wśród szczepów VRE: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, z których każdy związany jest z obecnością w genomie bakteryjnym zespołu genów kodujących białka enzymatyczne syntezy prekursorów peptydoglikanu.⁸ Oporność szczepów *Enterococcus spp.* na antybiotyki aminoglikozydowe związana jest natomiast z wytwarzaniem enzymów modyfikujących aminoglikozydy, co warunkują geny znajdujące się na plazmidach koniugacyjnych i transpozonach przenoszonych wśród odmian szpitalnych.⁷

Aktualna sytuacja epidemiologiczna w zakresie lekooporności bakterii, szczególnie ziarenkowców Gram (+), jest niezwykle niepokojąca. Trwają poszukiwania nowych leków i innych opcji terapeutycznych, takich jak immunostymulacja (szczepionki). Bardzo ważną rolę odgrywa stałe monitorowanie oporności szczepów izolowanych zarówno z zakażeń szpitalnych, jak i pozaszpitalnych, celem modyfikowania zaleceń właściwej terapii.

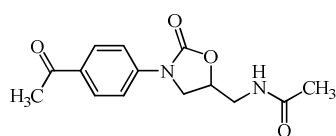
W odpowiedzi na globalną potrzebę powstrzymania rozprzestrzeniania się oporności, we wrześniu 2001 roku WHO wprowadziła pierwszą ogólnoswiatową strategię pod nazwą „WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance”, która zaleca

interwencję wśród grup przyczyniających się do rozwoju oporności, to jest lekarzy, weterynarzy, diagnostyków laboratoryjnych oraz pośrednio rządów i przemysłu farmaceutycznego. Jej celem jest wpływ na uchwalanie prawnych zasad dystrybucji i sprzedaży przeciwmikrobiologicznych leków oraz pomoc krajom w zakładaniu laboratoriów kontrolujących rozwój oporności pod nadzorem wykwalifikowanego personelu, z użyciem metod opartych na odpowiedniej jakości testach laboratoryjnych.⁹

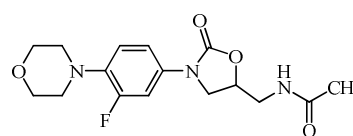
II.2. Kierunki i metody poszukiwań związków przeciwbakteryjnych

Obecnie prowadzone badania zmierzają w kierunku uzyskania nowych lub zmodyfikowanych chemioterapeutyków wykazujących działanie szczególnie wobec wielolekoopornych bakterii Gram (+), które stanowią poważne zagrożenie w rozprzestrzenianiu się infekcji szpitalnych i pozaszpitalnych. Wśród nich znajdują się zmodyfikowane oksazolidynony, chinoliny czy likochalkony często o odmiennych niż znane mechanizmach działania.

Oksazolidynony stanowią nową klasę syntetycznych środków przeciwmikrobiologicznych, zarejestrowaną w lecznictwie dopiero po 37 latach od wprowadzenia kwasu nalidyksowego. Wykazują one aktywność względem szczepów wrażliwych, ale również opornych na dotychczas stosowane leki, to jest opornego na metycylinę *Staphylococcus aureus* (MRSA), na wankomycynę *Enterococcus faecium* (VRE) oraz na penicylinę *Streptococcus pneumoniae* (PRSP). Związki te posiadają charakterystyczny dla swojej grupy mechanizm działania polegający na hamowaniu syntezy białka we wczesnej fazie translacji przez selektywne wiązanie się z cząsteczką 23S rRNA podjednostki 50S rybosomu i nie wykazują oporności krzyżowej z innymi inhibitorami syntezy białek.¹⁰ Pierwszym zatwierdzonym w lecznictwie lekiem tej grupy był linezolid, którego budowa oparta jest na modyfikacji oksazolidynonu Dup – 721, przez wprowadzenie w miejsce grupy acetylowej w pozycji 4 pierścienia aromatycznego aminy cyklicznej oraz fluoru w pozycję *meta*.¹¹



Dup - 721



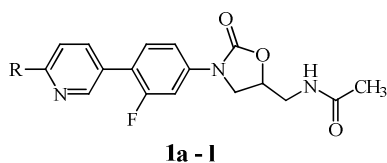
Linezolid

Struktury środków przeciwmikrobiologicznych o budowie oksazolidynonów.

W ostatnim dziesięcioleciu poza linezolidem wprowadzona została do leczenia daptomycyna, produkt fermentacji bakterii *Streptomyces roseosporus*, jako pierwszy naturalny lipopeptyd wskazany w powikłaniach zakażeń skóry i tkanek miękkich u dorosłych. Antybiotyk ten wyróżnia mechanizm działania, który polega na zmianie napięcia powierzchniowego bakteryjnej błony cytoplazmatycznej, powodując szybką śmierć komórki. Daptomycyna jest aktywna wobec szerokiego spektrum bakterii Gram (+), szczególnie wobec enterokoków oraz streptokoków i stafylokoków wielolekoopornych.⁶ Według przeprowadzonego w latach 2007 - 2008 programu kontrolującego pojawienie się oporności na daptomycynę, nie stwierdzono zmniejszenia aktywności tego antybiotyku względem przebadanych szczepów *Enterococcus spp.* i *Staphylococcus aureus*. Inhibicja wzrostu obu szczepów przy zachowanych dawkach była taka sama w stosunku do ostatniej kontroli w roku 2002, co sugeruje, że oporność na ten antybiotyk pojawia się bardzo rzadko.¹²

II.2.1. Analogi strukturalne linezolidu

Zgodnie z założeniem, iż wprowadzenie do cząsteczki linezolidu heteroaromatycznego pierścienia, którego płaska budowa i nadmiar elektronów może zwiększyć interakcję związku w miejscu wiązania z cząsteczką 23S rRNA podjednostki 50S rybosomu, zespół koreańskich naukowców¹³ przeprowadził testy mikrobiologiczne *in vitro* i *in vivo* analogów linezolidu, w których w miejsce morfoliny wprowadzono podstawiony pierścień pirydyny.



Związek	1a	1b	1c	1d	1e	1f
R						
Związek	1g	1h	1i	1j	1k	1l
R						

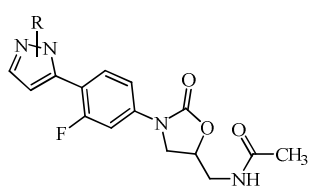
Aktywność przeciwmikrobiologiczna większości przebadanych związków względem sześciu szczepów bakterii jest wyższa niż wzorcowego linezolidu. Szczególnie wysoką aktywność *in vitro* i *in vivo* wykazały związki z podstawionym triazolem (**1b**), oksadiazolem (**1e**) oraz tetrazolem (**1f**).

Związek	MIC ₅₀ (µg/ml)						ED ₅₀ ^g (mg/kg)
	MSSA ^a	MRSA ^b	VRE ^c	PRSP ^d	<i>M. cat</i> ^e	<i>H. inf</i> ^f	
1b	0,39	0,39	0,2	0,2	1,56	6,25	3,9
1e	0,39	0,78	0,39	0,2	1,56	6,25	3,9
1f	0,39	0,78	0,2	0,2	1,56	3,13	3,4
Linezolid	3,13	3,13	1,56	1,56	6,25	12,5	8,0

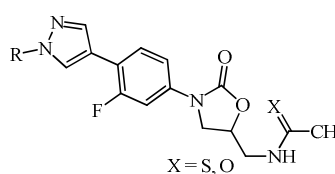
a) *S. aureus* wrażliwy na metycylinę, b) *S. aureus* oporny na metycylinę, c) enterokoki oporne na wankomycynę, d) *S. pneumoniae* oporny na penicylinę, e) *Moraxella catarrhalis*, f) *Haemophilus influenzae*, g) ilość antybiotyku (mg/kg) wymagana do wyleczenia 50% zainfekowanych myszy

Wpływ miejsca podstawienia grupą metylową pierścienia tetrazolu (związki **1f**, **1g**, **1l**) na aktywność biologiczną jest niezauważalny, natomiast zamiana metylu na proton (związek **1d**) powoduje utratę aktywności względem bakterii Gram (+). Obecność podstawnika metylowego w strukturze związku może przyczyniać się do zmniejszenia częstotliwości podawania potencjalnego leku przez wydłużenie czasu półtrwania (dla związku **1f** 12,4 h, dla linezolidu 0,9 h).

Potwierdzeniem powyższych doniesień są badania przeprowadzone na trzech seriach oksazolidynonów, w których pierścień benzenowy połączony jest wiązaniem C-3 lub C-4 z pirazolem.¹⁴



połączenie C-3



połączenie C-4

R = H, Me, CH₂CN, CH₂CH₂CN, CH₂CH₂OH, allil, Ac

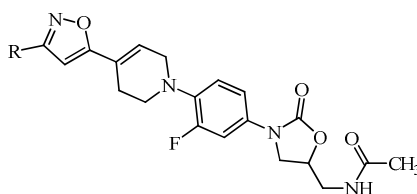
Związek z niepodstawionym pirazolem w serii C-3 (**1**) wykazuje podobny poziom aktywności do linezolidu, natomiast analog w serii C-4 (**2**) jest od 2 do 4 razy aktywniejszy od wzorca. Wymiana protonu na metyl w pozycji α serii C-3 (**3**) powoduje wielokrotny wzrost aktywności (MIC = 0,5 – 1 µg/ml) względem bakterii Gram (+) w stosunku do linezolidu. Analogi z serii C-4 z podstawionym metylem (**4**) lub tioamidem w łańcuchu bocznym (**5**) wykazują selektywną zdolność hamowania wzrostu badanych szczepów do

kilkunastu razy silniejszą od wzorca. Zamiana podstawnika metylowego na hydroksyetyl, cyjanoetyl czy allil powoduje znaczny spadek aktywności w obu seriach.

Związek	MIC ₅₀ (µg/ml)					
	MSSA ^a	MRSA ^b	<i>S. p</i> ^c	<i>E. f</i> ^d	<i>M. cat</i> ^e	<i>H. inf</i> ^f
1	4	4	<0,5	4	32	8
2	2	1	0,25	1	8	4
3	1	<0,5	<0,5	<0,5	8	2
4	1	1	0,25	1	8	4
5	0,25	0,25	<0,06	0,25	1	1
Linezolid	4	2	1	4	16	8

a) *S. aureus* wrażliwy na metycylinę, b) *S. aureus* oporny na metycylinę, c) *Streptococcus pneumoniae*, d) *Enterococcus faecalis*, e) *Moraxella catarrhalis*, f) *Haemophilus influenzae*

Kolejny zespół badawczy otrzymał nowe analogi linezolidu, wprowadzając w miejsce morfoliny tetrahydropirydynę i podstawiony pierścień izoksazolu.¹⁵



R = CH₃, CN, Cl, CF₃, CO₂Et, CONH₂, CON(CH₃)₂

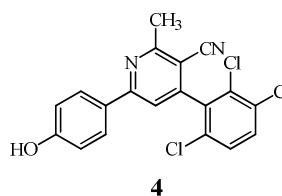
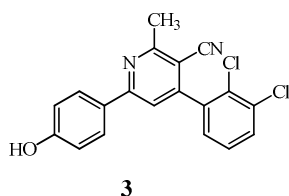
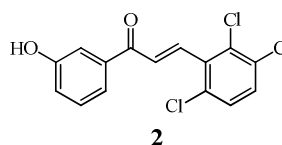
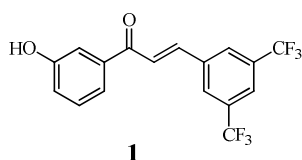
Jednym z efektów badań było wyselekcjonowanie związku (R = CONH₂), który wykazuje porównywalną bądź wielokrotnie większą aktywność niż linezolid i wankomycyna względem testowanych mikroorganizmów, włącznie ze szczepami opornymi na metycylinę i wankomycynę. Przypuszcza się, iż grupa amidowa jest znacząca dla korzystnego profilu działania, gdyż związki z pierścieniem izoksazolu podstawionym silnie elektroujemnymi grupami -CN, -Cl i -CF₃ w tej samej pozycji wykazują znacznie niższą aktywność.

Związek	MIC (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i> ^a	MRSA ^b	<i>E. faecalis</i> ^c	VRE ^d
R = CONH ₂	0,5	0,5	1	1
Linezolid	2	0,5	2	2
Wankomycyna	1	2	4	64

a) *Staphylococcus aureus*, b) *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę, c) *Enterococcus faecalis*, d) enterokoki oporne na wankomycynę

II.2.2. Pochodne 3-cyjanopirydyny

W celu szybkiej identyfikacji efektywnych związków względem *Staphylococcus aureus*, zespół M. Bowmana¹⁶ zastosował technikę makromacierzy. Polega ona na równoległej syntezie od 50 do 200 pochodnych o masie molowej nie większej niż 500 g/mol na matrycy celulozowej. Badania aktywności względem *Staphylococcus aureus* oraz innych wybranych szczepów bakterii Gram (+) przeprowadzono na związkach o strukturze chalkonu i 3-cyjanopirydyny metodą dyfuzji krążkowej. Po oznaczeniu MIC wskazano cztery związki, których aktywność względem szczepu *Staphylococcus aureus* jest porównywalna z aktualnie stosowanym linezolidem, oraz które przejawiają podobną aktywność względem szczepu *Staphylococcus aureus* opornego na metycylinę i selektywność względem niektórych szczepów bakterii Gram (+).



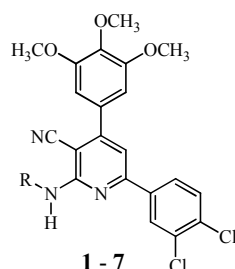
Związek	1	2	3	4	Linezolid
<i>S. aureus</i> ; MIC (μM)	3,5	10,0	10,0	7,5	10,0
<i>S. aureus</i> oporny na metycylinę; MIC (μM)	3,0	10,0	10,0	7,5	8,0

Warto podkreślić, że o ile aktywność przeciwbakteryjna chalkonów była wcześniej znana, to znaczące jest pokazanie 2-metylo-3-cyjanopirydyn jako nowej klasy potencjalnych związków przeciwmikrobiologicznych.

Wieloletnie badania zespołu badawczego A. Abel-Aziza¹⁷ dotyczące pochodnych pirydyny otwierają możliwości ich zastosowania jako potencjalnych chemioterapeutyków.

Przeprowadzono syntezę szeregu pochodnych 2-amino-3-cyjanopirydyny i zbadano ich aktywność względem bakterii Gram (+) *Staphylococcus aureus* i Gram (-) *Escherichia coli*. Dla każdego związku oznaczono MIC i porównano z ciprofloksacyną. Najbardziej

aktywne z przebadanej serii 4,6-dipodstawionych-2-amino-3-cyjanopirydyn względem obu szczepów okazały się związki **1 - 7**.

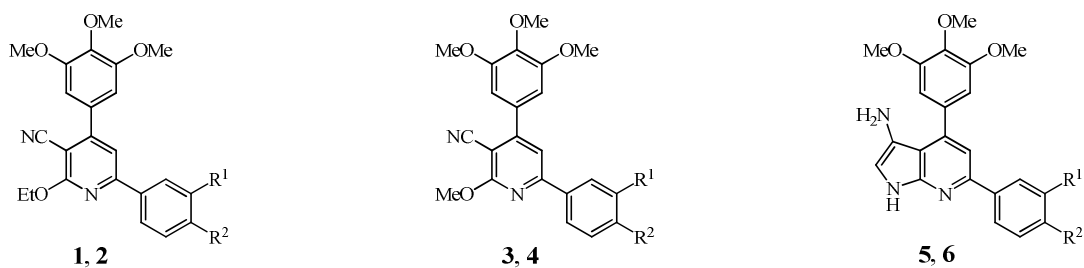


Związek	1	2	3	4	5	6	7
R	Ph	4-Cl-Ph	2-Cl-Ph	3-CF ₃ -Ph	4-Me-Ph	2,6-diMe-Ph	2,6-di(<i>izo</i> -Pr)-Ph

Związek	1	2	3	4	5	6	7	Ciprofloksacyna
<i>S. aureus</i> MIC (µg/ml)	20,0	15,0	14,0	13,0	20,0	11,0	7,0	2,3
<i>E. coli</i> MIC (µg/ml)	8,1	5,8	5,5	4,7	7,3	4,1	3,2	4,0

Zauważalne jest, iż aktywność przeciwbakteryjna jest tak zależna od podstawników przy *N*-arylowej grupie pirydyny, że niewielka zmiana strukturalna wpływa znacząco na efekt biologiczny. Pierścień aromatyczny z podstawnikiem izopropylowym (związek **7**) w położeniu 2 i 6 powoduje trzykrotny wzrost aktywności związku w stosunku do analogu z niepodstawionym pierścieniem benzenowym (związek **1**). Wprowadzenie grupy elektronodonorowej (-CH₃) w pozycję *para* pierścienia aromatycznego nie zmienia aktywności związku, natomiast elektronoakceptorowej (-NO₂) całkowicie ją znosi (MIC > 100 µg/ml) względem obu szczepów.

Ten sam zespół badawczy przeprowadził syntezy pochodnych 2-alkoksypirydyny, a następnie cyklizował powyższe związki pod wpływem hydrazyny, uzyskując pochodne 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]pirydyny.¹⁸ Aktywność otrzymanych związków zbadano względem bakterii Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* oraz Gram (+) *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. *Escherichia coli* okazała się najbardziej wrażliwa na testowane związki. Najwyższą aktywność względem niej wykazały pochodne **1 - 6**.



Związek	1, 3, 5	2, 4, 6
R ¹	Cl	H
R ²	Cl	Br

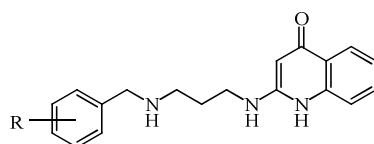
Związek	1	2	3	4	5	6	Cefotaksym	Gentamycyna	Streptomycyna
<i>E. coli</i> MIC (µg/ml)	2,0	2,3	2,6	2,8	1,6	1,8	1,5	2,4	2,6

Po analizie zależności struktura – aktywność biologiczna, wykazano, że związki z podstawnikami metoksyłowymi w położeniach 3, 4, 5 pierścienia benzenowego mają zdolność hamowania wzrostu *E. coli* porównywalną z gentamycyną czy streptomycyną. Zmiana podstawników w pierścieniu benzenowym na 4-NO₂, 4-Me, 4-OMe lub zmiana pierścienia benzenowego na tiofen lub furan inaktywują powyższe związki.

II.2.3. Inhibitory syntetazy metionilo-tRNA

Od momentu pojawienia się lekoopornych szczepów stafylokoków i enterokoków, wzmożone poszukiwania zarówno nowych leków, jak i nowych celów ich działania spowodowały, iż wskazano grupę związków pochodnych chinoliny o działaniu hamującym bakteryjny enzym syntetazę metionilo-tRNA (MRS). Enzym ten jest jednym z dwudziestu syntetaz aminoacylo-tRNA odpowiedzialnych za przenoszenie aminokwasów w trakcie syntezy białka. Hamowanie działania MRS jest przyczyną śmierci komórki bakteryjnej, a inhibitory MRS mogą okazać się skutecznymi lekami przeciwbakteryjnymi.

Badania Jarvesta i współpracowników¹⁹ w dziedzinie syntezy związków zdolnych do hamowania MRS doprowadziły do uzyskania szeregu pochodnych o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej względem *S. aureus* i *E. faecalis*, dla których najwyższa wartość IC₅₀ (nM) wynosiła 4,4.

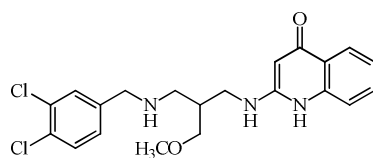


1 - 5

Związek	R	IC ₅₀ (nM)	MIC (µg/ml)	
		<i>S. aureus</i> MRS	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
1	2,3,5-triCl	<3	0,25	≤0,06
2	2-EtO, 3,5-diBr	4,4	≤0,06	≤0,06
3	2-EtO, 3-Br, 5-MeO	3,1	0,13	≤0,06
4	2-EtO, 3,5-diI	<3	≤0,06	≤0,06
5	2-EtO, 3-I, 5-MeO	3,3	0,5	0,13

Analiza zależności budowa – aktywność związków wykazała, że znaczący wpływ na wzrost aktywności biologicznej ma podstawienie pierścienia benzenowego w pozycjach 2, 3 i 5 małymi podstawnikami alkoksyłowymi bądź halogenami, natomiast grupy –CN oraz –CH₂OH redukują ich działanie.

Zespół Farhanullaha²⁰ przeprowadził syntezę analogów powyżej opisanych 2-podstawionych-4-chinolonów, wprowadzając podstawniki przy węglu C-2 1,3-propylodiaminy, a następnie wyznaczył wartości IC₅₀ MRS *S. aureus* oraz MIC względem szczepów *S. aureus*, *E. faecium* oraz *E. faecalis* dla tych związków. Stwierdzono, iż podstawniki takie jak hydroksymetyl, alkoksyl czy aryloksyl przy węglu C-2 testowanych analogów mogą być przyczyną braku pożądanego działania, jednakże podstawnik metoksymetylowy (związek A) nie znosi aktywności względem enterokoków.

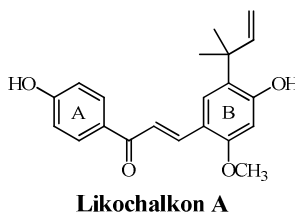


A

Szczep	MIC (µM/ml)		
	Mupiroksyna	Amoksycylina	Związek A
<i>E. faecium</i> ATCC10541	8	1	0,125
<i>E. faecalis</i> ATCC19433	64	1	0,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	64	2	0,5

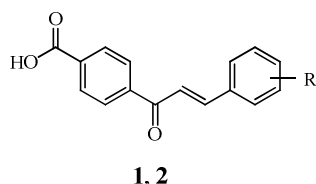
II.2.4. Analogi strukturalne Likochalkonu A

Znaczne osiągnięcia w dziedzinie syntezy potencjalnych leków przeciwbakteryjnych, a w szczególności względem Gram (+) *S. aureus*, uzyskano wśród pochodnych chalkonów. Wiele zespołów badawczych poszukuje nowego leku poprzez modyfikację cząsteczki Likochalkonu A - związku naturalnego, znajdującego się w korzeniach lukrecji chińskiej *Glycyrrhiza uralensis* (*Fabaceae*).



Modyfikacje te polegają na zmianie podstawników w pierścieniu A i B w celu zwiększenia rozpuszczalności oraz obniżenia aktywności hemolitycznej erytrocytów tych związków.

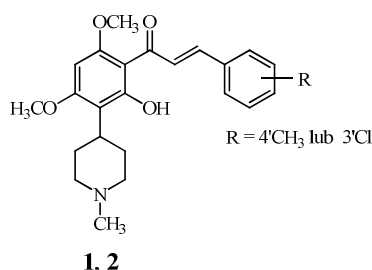
Prace Nielsena²¹ doprowadziły do uzyskania analogów Likochalkonu A, w których podstawnik hydroksylowy przy pierścieniu A został podstawiony grupą karboksylową, wpływając na znaczne zwiększenie rozpuszczalności. Wraz ze zmianą podstawnika w pierścieniu A zmienił się również profil działania z bakteriobójczego na statyczne, co może wpływać na zmniejszenie toksyczności względem komórek ludzkich. W doborze podstawników przy pierścieniu B kierowano się ich rozmiarem, lipofilowością oraz miejscem podstawienia. Związki z podstawnikami lipofilowymi -Br, -CF₃ w pozycji 3 i 5 pierścienia B wykazały brak cytotoksyczności i znaczną aktywność przeciwbakteryjną, porównywalną z ciprofloksacyną oraz linezolidem, natomiast podstawniki bardziej polarne -OH i -OCH₃ powodowały drastyczny jej spadek.



Związek	1	2	Ciprofloksacyna	Linezolid
R	3,5-diCF ₃	3,5-diBr	-	-
MIC (μM) <i>S. aureus</i>	2	2	2	2

Działanie przeciwbakteryjne wykazały również analogi Likochalkonu A, w których do pierścienia A wprowadzono dwa podstawniki metoksyłowe i metylopiperydynę, natomiast podstawnik hydroksylowy umieszczono w pozycji 2. Obecność metylopiperydyny i grupy

hydroksylowej w zmienionej pozycji okazała się znacząca dla działania biologicznego. Wyselekcjonowano dwa związki, których aktywność względem *S. aureus* (MIC = 6,3 μ M) jest taka sama jak Likochalkonu A, lecz charakteryzują się znacznie niższą aktywnością hemolityczną niż wzorzec.²²



Związek	1	2	Likochalkon A	Penicylina G
R	4-CH ₃	3-Cl	-	-
MIC (μM) <i>S. aureus</i>	6,25	6,25	6,3	0,12

II.3. Gruźlica i jej zagrożenia w świetle narastającej lekooporności bakterii

Istnienie gruźlicy szacowane jest na ponad cztery tysiące lat. Badania dowodzą obecność DNA bakterii *Mycobacterium tuberculosis* w starożytnych szkieletach i tkankach miękkich zmumifikowanych Egipcjan.²³ Zidentyfikowane przez Roberta Kocha w 1882 roku prątki *Mycobacterium tuberculosis* mogą atakować niemalże każdą część ludzkiego ciała, jednak 85% przypadków dotyczy gruźlicy płuc. Obecnie, pomimo istnienia wielu metod pozwalających na szybkie rozpoznanie choroby oraz obecności wielu leków przeciwprątkowych, nie udaje się opanować epidemii, a nawet zauważalny jest wzrost zachorowań w skali światowej.²⁴ Szacuje się, iż około 30% ogółu ludzkości jest nosicielami bakterii *Mycobacterium tuberculosis*. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dotyczącego danych z 2007 roku, odnotowano 13,7 mln chorych na gruźlicę i ponad 9 mln nowych przypadków, głównie w południowo-wschodniej Azji i Afryce, oraz około 1,7 mln zgonów spowodowanych tą chorobą.²⁵

Początki chemioterapii gruźlicy sięgają połowy dwudziestego wieku. Pierwszym tuberkulostatykiem, odkrytym w 1943 roku, była streptomycyna, co stanowiło ogromny przełom w walce z tą chorobą i zapoczątkowało okres wprowadzania nowych leków przeciwprątkowych. Jednak już w kilka lat po wprowadzeniu do użytku streptomycyny, prątki odporne na ten antybiotyk izolowano od 80% chorych na gruźlicę. Dużym postępem było wprowadzenie do terapii w roku 1946 kwasu *p*-aminosalicylowego (PAS) oraz izoniazylu (INH) w 1952 roku, co umożliwiło stosowanie terapii kombinowanej, która znacznie ogranicza możliwość występowania mutantów równocześnie opornych na dwa lub więcej

leków. Nieco później włączono do leczenia bakteriobójczy, heterocykliczny pirazynamid i w latach siedemdziesiątych rifampicynę.²⁶

Proces leczenia gruźlicy jest dla pacjentów bardzo uciążliwy nie tylko ze względu na długi okres terapii, ale także na występujące po przyjmowaniu tuberkulostatyków skutki uboczne, takie jak nudności, utrata słuchu czy hepatotoksyczność.²⁷

Standardową, kombinowaną terapię przeciwprątkową można podzielić na dwa etapy z użyciem leków pierwszego rzutu: pierwszy (dwumiesięczny) – intensywne leczenie, którego celem jest zahamowanie wzrostu bakterii i zabicie istniejących prątków, drugi (czteromiesięczny) – opiera się na leczeniu podtrzymującym, mającym na celu zlikwidowanie form przetrwalnikowych i zapobieganie nawrotom choroby. W przypadku prątków opornych lub powikłań chorobowych sięga się po kolejne leki, do których należy amikacyna, ciprofloksacyna, cykloseryna, etionamid, kanamycyna, kapreomycyna, ofloksacyna oraz tiokarlid.

Jedną z przyczyn występowania obecnie epidemii gruźlicy jest jej koincydencja z nosicielstwem wirusa HIV. Według danych WHO, 1/3 spośród ponad 40 mln osób zakażonych tym wirusem jest również zakażona prątkami gruźlicy. Nosicielstwo HIV ułatwia reaktywację zakażenia latentnego, jak również zwiększa podatność pacjentów na zakażenie prątkiem. Gruźlica została uznana za chorobę wskaźnikową AIDS.²⁸⁻³⁰

Najbardziej niepokojącym aspektem w obecnej pandemii gruźlicy jest problem wzrastającej lekooporności. Powołując się na dane WHO, blisko 5% z 9 mln nowych przypadków gruźlicy pojawiających się każdego roku dotyczy szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na dwa najczęściej stosowane leki podstawowe - izoniazyd i rifampicynę, wywołujących wielolekooporną gruźlicę MDR-TB (multidrug - resistant tuberculosis).²⁵ Leczenie tej odmiany gruźlicy wymaga terapii nawet do dwóch lat i stosowania leków drugiej linii, które wywołują więcej skutków ubocznych. Biorąc pod uwagę, że wielolekooporna gruźlica występuje najczęściej w krajach zubożałych, jej leczenie jest często niemożliwe ze względu na wysokie koszty terapii, co sprawia, iż tylko 2% przypadków zakażonych MDR-TB jest poprawnie leczonych.^{31, 32}

Zwiększenie stosowania leków uzupełniających w terapii gruźlicy spowodowało pojawienie się szczepów opornych i na te tuberkulostatyki. Obecnie najpoważniejsze zagrożenie stanowi odmiana gruźlicy zwana XDR-TB, którą wywołują prątki *Mycobacterium tuberculosis* odporne na izoniazyd, rifampicynę, fluorochinolony i przynajmniej jeden iniekcyjny lek drugiej linii (amikacynę, kapreomycynę, kanamycynę).³³

II.3.1. Mechanizmy oporności prątków *Mycobacterium tuberculosis* na stosowane leki przeciwgruźlicze

Isoniazyd jest jednym z najefektywniejszych leków, który wykazuje swoiste działanie względem *Mycobacterium tuberculosis*, będąc mało skutecznym w stosunku do bakterii gramujemnych i pozostałych bakterii gramdodatnich. INH jest prolekiem wymagającym do aktywacji enzymu bakteryjnego o aktywności katalazy i peroksydazy (KasaA). Powstały produkt hamuje aktywność enzymu zwanego KatG (syntazy β -ketoacylo-ACP), który uczestniczy w biosyntezie kwasów mikołowych, współtworzących ścianę komórkową prątków. Głównym mechanizmem oporności szczepów *M. tuberculosis* na INH jest utrata aktywności KatG w wyniku mutacji. Szczepy odporne na INH o niezmienionej aktywności KatG często wytwarzają białko KasaA ze zmienioną sekwencją aminokwasów. Mutacje w komórkach *M. tuberculosis* mogą występować również w genach uczestniczących w szlaku biosyntezy kwasów mikołowych, przede wszystkim w genie *inhA*, kodującym zależną od ATP reduktazę enoilo-ACP, oraz w *aphC*. Mutacje w genie *inhA* nadają komórkom opornym na INH oporność krzyżową na etionamid, będący pochodną kwasu izonikotynowego, który również hamuje powstawanie kwasów mikołowych.³⁴

Do chemioterapeutyków specyficznie działających na przedstawicieli z rodzaju *Mycobacterium* należy również etambutol, analog arabinozy hamujący funkcje arabinotransferaz uczestniczących w biosyntezie enzymu typu III, który bierze udział w powstawaniu arabinogalaktanu ściany komórkowej. Oporność na etambutol jest wynikiem spontanicznych mutacji w genach prątków kodujących produkty wrażliwe na działanie tego leku. Na podstawie analizy fluktuacyjnej wykazano, że częstość tych mutacji wynosi 10^{-7} w czasie jednej generacji.³⁴

Pirazynamid (PZA), podobnie jak izoniazyd i etionamid, jest syntetycznym analogiem nikotynamidu. Wyniki badań wskazują, iż tak jak INH jest prolekiem, który w wyniku deaminacji katalizowanej przez pirazynamidazę ulega w komórce prątka modyfikacji do kwasu pirazynowego. Wiedza na temat powstawania oporności prątków względem PZA jest niewielka. Wiadomo, że oporności towarzyszy utrata przez komórkę bakteryjną aktywności pirazynamidazy i nikotynamidazy, które warunkuje gen *pncA*.³⁴

Antybiotyki z grupy cyklicznych oligopeptydów działające bakteriostatycznie na prątki to kapreomycyna i wiomycyna. Mechanizm przeciwpłątkowej aktywności wiomycyny polega na hamowaniu translokacji peptydylo-tRNA z miejsca A do miejsca P na rybosomie, natomiast w większych stężeniach hamuje powstawanie kompleksu inicjacyjnego.

Wiomycyna stosowana jest rzadko, głównie ze względu na nefro- i ototoksyczność. Kapreomycyna, mimo podobnych skutków ubocznych, jest nadal stosowana, lecz mechanizm jej działania nie jest do końca poznany. Oporność na oba antybiotyki jest stosunkowo rzadka, co może być związane z ograniczonym ich stosowaniem. Wiadomo jednak, że oporność na wiomycynę wynika z braku wiązania z podjednostką 30S rybosomu, za co odpowiedzialne są zmiany w rRNA.³⁴

Antybiotyki aminoglikozydowe są wytwarzane przez promieniowce lub na drodze syntezy chemicznej. Wśród leków przeciwprątkowych do grupy tej należy streptomycyna, amikacyna oraz kanamycyna. Z punktu widzenia zastosowania w leczeniu charakteryzują je niekorzystne właściwości, takie jak pojawiające się z dużą częstotliwością mutanty odporne na te antybiotyki oraz możliwość uszkodzenia nerek i aparatu słuchowego po ich zastosowaniu. Streptomycyna swoiście wiąże się do podjednostki 30S rybosomu, która jest zbudowana z 16S rRNA oraz 21 różnych białek, do których powinowactwo wykazują inne aminoglikozydy. Była ona początkowo szeroko stosowana nie tylko jako lek przeciw prątkom gruźlicy, ale także przeciw bakteriom gramujemnym. Długotrwałe podawanie tego antybiotyku w terapii gruźlicy sprzyjało powstawaniu szczepów opornych. Oporność bakterii na aminoglikozydy związana jest z jednym z następujących mechanizmów:

- działaniem enzymów inaktywujących antybiotyk,
- enzymatyczną modyfikacją 16S rRNA,
- mutacyjną zmianą struktury rybosomu (białka, 16S rRNA),
- zmianą w przepuszczalności osłon bakteryjnych dla leku,
- enzymatyczną modyfikacją antybiotyku.

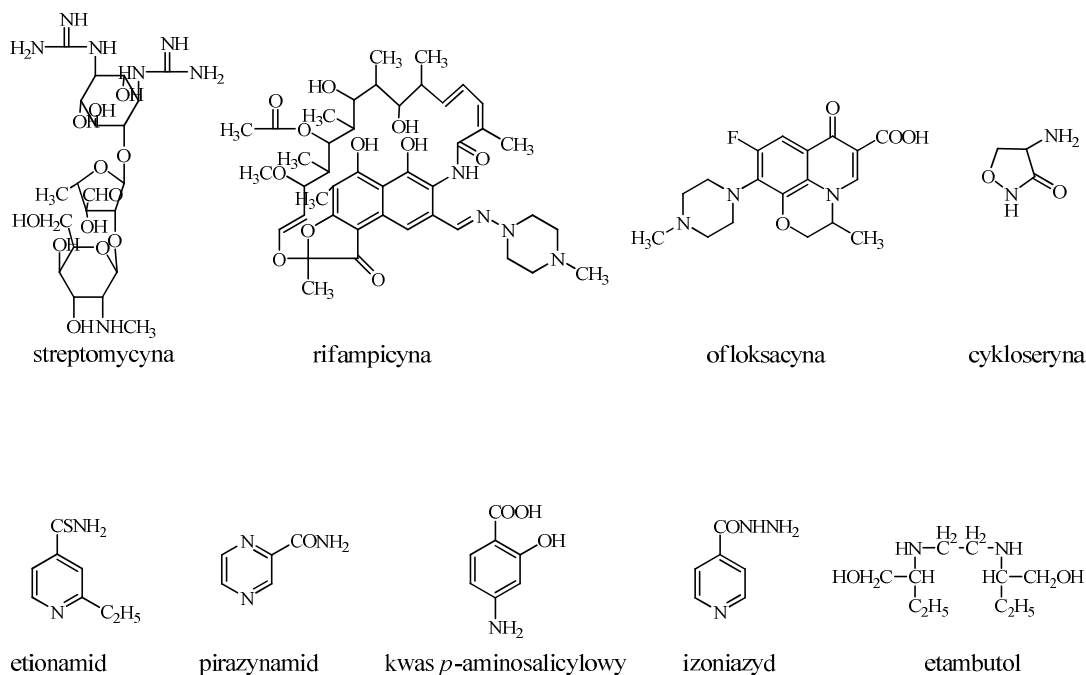
Przyczyną oporności bakterii na streptomycynę jest najczęściej inaktywacja enzymatyczna antybiotyku na drodze acetylacji z udziałem *N*-acetylotransferazy aminoglikozydowej, adenylacji z udziałem *O*-adenylotransferazy aminoglikozydowej i fosforylacji z udziałem *O*-fosfotransferazy aminoglikozydowej.³⁴

Oporność na rifampicynę, należącą do grupy antybiotyków hamujących syntezę i funkcje kwasów nukleinowych, również wzrasta i jest związana ze zmianami w pojedynczych parach zasad w centralnym obszarze genu strukturalnego podjednostki β polimerazy RNA. Scharakteryzowano około 40 typów mutacji punktowych, insercji i delecji w tym obszarze, co może powodować brak wiązania rifampicyny do polimerazy RNA.³⁴

Do leków przeciwgruźliczych dołączono również powstałe w latach osiemdziesiątych fluorochinolony o właściwościach bakteriobójczych, które podobnie jak rifampicyna hamują syntezę kwasów nukleinowych. Mimo że oporność na fluorochinolony rozwija się wolniej niż

na inne chemioterapeutyki, najpowszechniejszy typ oporności związany jest z mutacją genów kodujących topoisomerazy bakteryjne, będące punktami ich uchwytu. Oporność prątków gruźlicy na fluorochinolony związana jest również z aktywnością białek o właściwościach pomp należących do typu MFS (major facilitator superfamily), które rozpoznają chemioterapeutyki i usuwają go z cytoplazmy.³⁴

Inny mechanizm aktywności przeciwpłatkowej wykazuje D-cykloseryna, która ze względu na liczne i uciążliwe objawy uboczne stosowana jest dopiero w drugim rzucie. Antybiotyk ten działa jako kompetytywny inhibitor racemazy alaninowej i syntetazy D-alanylo-D-alaninowej, czyli enzymów niezbędnych do wytworzenia prawidłowych łańcuchów peptydowych mureiny, blokując tym samym pierwszy etap jej syntezy. Mutanty odporne na D-cykloserynę wykazują zaburzenia w funkcjonowaniu systemu transportu D-alanyloglicyny do komórki, co wskazuje na udział tego systemu również w pobieraniu D-cykloseryny.³⁴



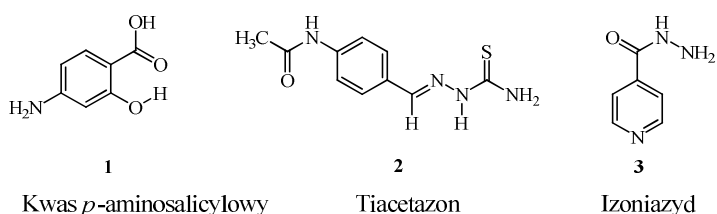
Wzory stosowanych leków przeciwgruźliczych

Jednym z głównych podejść do problemu uzyskania syntetycznych leków przeciwgruźliczych jest projektowanie związków o strukturach zbliżonych do już istniejących tuberkulostatyków. Od wielu lat trwają poszukiwania analogów klasycznych leków, które

umożliwiłyby skuteczniejsze i szybsze zwalczanie gruźlicy i jej lekooporności. W następnym podrozdziale przedstawiono ważniejsze osiągnięcia w tej dziedzinie.

II.3.2. Analogi strukturalne związków o aktywności przeciwgruźliczej

Analizując struktury związków o aktywności przeciwgruźliczej, począwszy od pierwszych leków, takich jak kwas *p*-aminosalicylowy (**1**), aromatyczne pochodne hydrazyny (**2**) oraz arylohydrazydy (**3**), można zauważyć, że wszystkie zawierają pierścień aromatyczny oraz wiązanie podwójne zdolne do sprzęgania z nim.

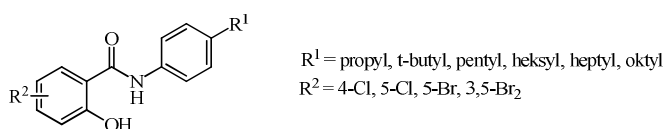


Ze względu na aktywność biologiczną wyżej wymienionych leków, wielu badaczy uznało je za prototypy służące do projektowania i syntezy nowych połączeń, które odznaczałyby się lepszą selektywnością działania, brakiem niekorzystnych działań ubocznych oraz szybszym i skuteczniejszym zwalczaniem wielolekoopornej odmiany gruźlicy.

II.3.2.1. Modyfikacje strukturalne kwasu *p*-aminosalicylowego (PAS)

Z powodu małej trwałości oraz niepożądanych efektów ubocznych kwasu *p*-aminosalicylowego stopniowo rezygnowano z jego użycia w leczeniu gruźlicy, jednak modyfikacja układu jest przedmiotem badań naukowców.

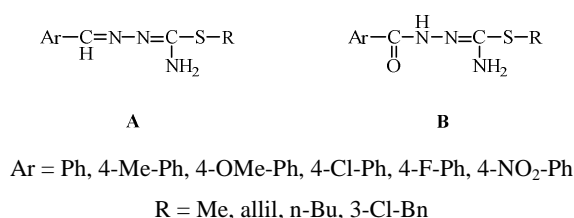
Do znanych przekształceń struktury PAS należą zmiany w obrębie grupy karboksylowej oraz eliminacja grupy aminowej.³⁵ Otrzymano amidowe pochodne kwasu salicylowego, które posiadają podstawnik alkilofenylowy przy atomie azotu oraz odpowiedni halogen w pierścieniu aromatycznym kwasu.



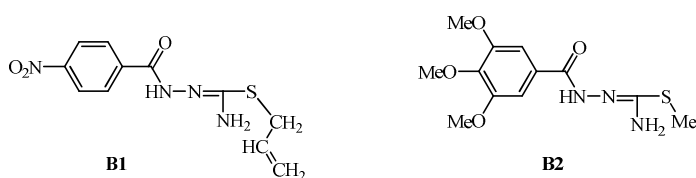
Przeprowadzone badania aktywności *in vitro* otrzymanych związków wykazały, iż wartości MIC wobec *Mycobacterium tuberculosis* zawierają się w granicach 2 - 32 mmol/l. Najmniejszą aktywność wykazały dihalogenopochodne, natomiast największą związki z halogenem w pozycji C-5 oraz propylem i oktylem *N*-fenylosalicylamidu.

II.3.2.2. Modyfikacje strukturalne tiacetazonu

Zespół włoskich badaczy³⁶ przeprowadził syntezę i zbadał aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą serii izotiosemikarbazonów [A] i izotiosemikarbazydów [B].



Szczegółowa analiza wykazała, iż znaczny wpływ na wyżej wymienione aktywności izotiosemikarbazonów ma długość łańcucha przy atomie *S* (wydłużenie alkilu zwiększa aktywność). Jednocześnie dowiedziono, że aktywność biologiczna drastycznie spada, jeżeli łańcuch posiada więcej niż cztery atomy węgla. Wzrost aktywności jest natomiast obserwowany przy zamianie łańcucha alkilowego na podstawnik benzyłowy, w szczególności podstawiony atomem chloru. Z serii przetestowanych benzoiloizotiosemikarbazydów aktywność przeciwpłatkową wykazały tylko dwa związki - **B1** i **B2**, na poziomie MIC odpowiednio 25 i 50 µg/ml, co wskazuje, że zamiana grupy benzyłidowej na benzoilową znacznie obniża aktywność przeciwmikrobiologiczną.

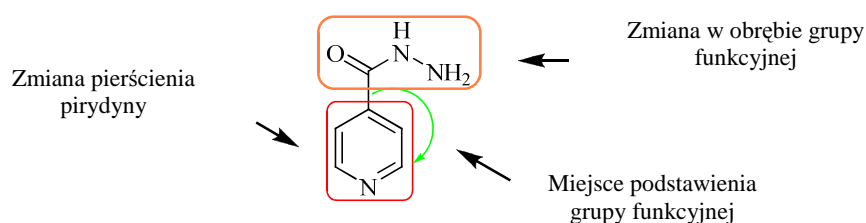


Struktury benzoiloizotiosemikarbazydów o umiarkowanej aktywności przeciwpłatkowej.

II.3.2.3. Modyfikacje strukturalne izoniazydu

Przedmiotem zainteresowań wielu zespołów badawczych jest modyfikacja izoniazydu, jednego z najskuteczniejszych leków przeciwgruźliczych. Elementy strukturalne cząsteczki izoniazydu ulegają wymianie w następujących kierunkach:

- zmiany pierścienia pirydyny na inny układ heterocykliczny lub benzen,
- zmiany w obrębie grupy funkcyjnej poprzez wprowadzenie ugrupowania amidrazonowego czy tiosemikarbazydowego,
- miejsce połączenia grupy funkcyjnej z pierścieniem aromatycznym.



Elementy strukturalne cząsteczki izoniazydu podlegające modyfikacjom.

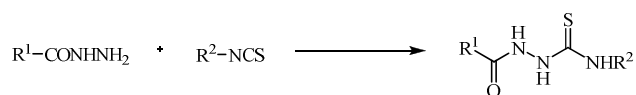
W oparciu o uzyskane wielkości minimalnego stężenia hamującego wzrost szczepów (MIC w zakresie 3,1 – 12,5 $\mu\text{g/ml}$), stwierdzono, iż znaczną aktywność tuberkulostatyczną wykazują *N*-metylohydrazydy kwasu benzooesowego z różnymi podstawnikami w pierścieniu aromatycznym oraz kwasu adamantylooctowego. Istotne działanie przeciwprątkowe w stosunku do szczepu *H*₃₇*R*_v wykazały także ich pochodne tiosemikarbazydowe (MIC w zakresie 6,2 – 12,5 $\mu\text{g/ml}$), które uzyskano w reakcji *N*-metylohydrazydów z odpowiednimi izotiocyjanianami.³⁷



$\text{R}^1 = 4\text{-Cl-Ph}, 2,4\text{-diCl-Ph}, 3,4\text{-diCl-Ph}, 4\text{-OMe-Ph}, 3,4,5\text{-triMeO-Ph}, \text{CH}_2\text{Ad}$

$\text{R}^2 = \text{Me}, \text{Ph}, \text{CH}_2\text{Ph}, \square$

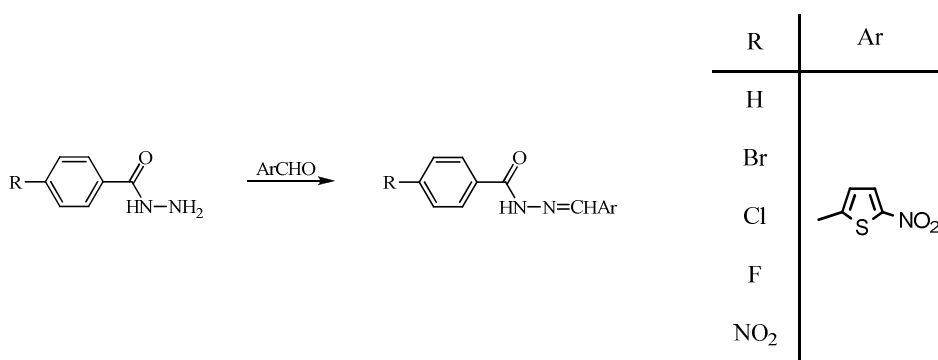
Tiosemikarbazydowe pochodne izoniazydu uzyskane w reakcji hydrazydu kwasu benzooesowego, 4-OH-benzooesowego i 3,4,5-triOMe-benzooesowego z izotiocyjanianami³⁸, mimo możliwości oddziaływań elektronów Π z łańcuchem bocznym, wykazują umiarkowaną bądź niską aktywność przeciwgruźliczą (MIC w zakresie 25 - 100 $\mu\text{g/ml}$).



$R^1 = \text{Ph}, 4\text{-OH-Ph}, 3,4,5\text{-tri-OMe-Ph}$

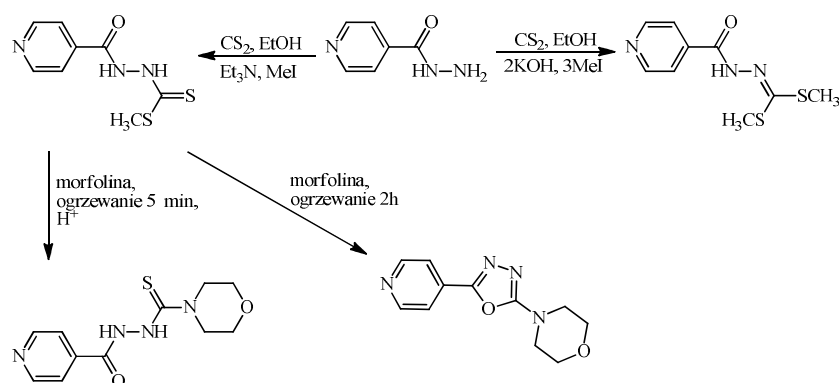
$R^2 = \text{Et}, \text{allil}, \text{Ph}, 4\text{-Br-Ph}$

Dalsze poszukiwania analogów izoniazydu doprowadziły do uzyskania serii pochodnych kwasu benzooesowego o budowie hydrazydo - hydrazonowej, w reakcji kondensacji hydrazynu 4-podstawionego kwasu benzooesowego z odpowiednimi aldehydami.³⁹



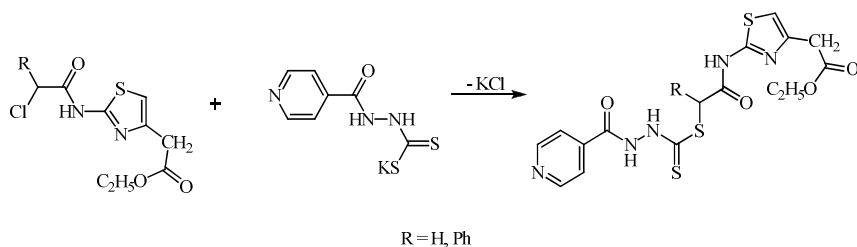
Najwyższą aktywność wykazał (5-nitrotiofen-2-ylo-metyleno)hydrazyn kwasu 4-nitrobenzooesowego, który przy wartości MIC = 0,78 µg/ml powodował zahamowanie wzrostu 98% bakterii. (5-Nitrotiofen-2-ylo-metyleno)hydrazyn kwasu 4-fluoro- i 4-chlorobenzooesowego wykazały inhibicję odpowiednio w 98 i 96% przy wartości MIC = 3,13 µg/ml. Za pomocą programu ETM (Electronic-Topological Method) dokonano analizy pomiędzy budową cząsteczki a jej aktywnością tuberkulostatyczną. W analizie istotną rolę odgrywała budowa przestrzenna związków oraz rozkład gęstości elektronów. Dane z przeprowadzonych badań wykazały, iż obecność pierścienia tiofenu z podstawnikiem elektroujemnym (NO₂, Br) w największym stopniu wpływa na aktywność mikrobiologiczną. Zastąpienie pierścienia tiofenu na benzen, pirydynę czy pirol, jak również brak grupy nitrowej w pierścieniu tiofenu, powoduje znaczne obniżenie aktywności biologicznej. Jednocześnie wykazano, że rodzaj halogenu w pozycji *para* pierścienia aromatycznego nie wpływa na zmianę aktywności.

Jedną z modyfikacji izoniazydu było przeprowadzenie tego związku w monoester i diester metylowy kwasu *N'*-izonikotynoilditiokarbazowego, a następnie monoestru pod wpływem aminy cyklicznej w pochodną tiosemikarbazydu lub 1,3,4-oksadiazolu, w zależności od warunków reakcji.⁴⁰



Oznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost prątków gruźlicy, które dla większości otrzymanych związków zawierało się w granicach 250 - 1000 $\mu\text{g/ml}$, co sugeruje, iż transformacja izoniazydu do takich układów w tym miejscu pierścienia heterocyklicznego znacznie obniża aktywność biologiczną.

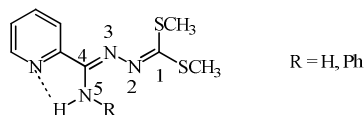
Inny zespół badaczy rozbudował monoester kwasu *N'*-izonikotynoilditiokarbazowego przez wprowadzenie do cząsteczki ugrupowania estrowego i heterocyklicznego pierścienia tiazolu. Testy *in vitro* wobec szczepu *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* nie potwierdziły jednak aktywności przeciwprątkowej otrzymanych związków.⁴¹



Geometria i konformacja związków o strukturze kwasu *N'*-[1-amino-1-(heteroarylo)-metylideno]ditiokarbazowego jest przedmiotem badań od lat 90 - tych ubiegłego wieku.

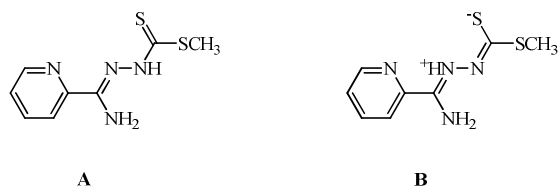
Analiza spektroskopowa ^1H NMR i ^{13}C NMR *S,S'*-diestrów metylowych kwasów *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego oraz *N'*-[1-(*N*-fenyloamino)-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego potwierdziła obecność izomerów, lecz jednoznaczne określenie ich geometrii było niemożliwe. W celu ustalenia dominującej formy tautomerycznej i konformacji, przeprowadzono analizę rentgenograficzną, która wykazała, iż oba związki występują w przedstawionej poniżej odmianie tautomerycznej oraz charakteryzują się w przybliżeniu budową płaską. Pomimo wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy aminą przy węglu C4 jako donorem protonu i azotempirydyny jako

akceptorem, zauważalne jest odchylenie od formy koplanej przez skrócenie pierścienia heterocyklicznego o kąt 11 - 14° w stosunku do płaskiego fragmentu 2,3,5-triaza-1,3-pentadienu.⁴²



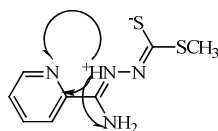
Preferowana forma tautomeryczna stabilizowana wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym.

W toku syntez uzyskano dwiema metodami monoester metylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego, poprzez przeprowadzenie karbonitrylu w iminoester, który w reakcji z metylotiosemikarbazylem daje pożądany produkt lub w reakcji metylowanego adduktu disiarczku węgla do amidrazonu.⁴³ Analiza ¹H NMR wykonana w deuterowanym acetonie w temperaturze pokojowej wykazała istnienie dwóch form tautomerycznych w stosunku 5:4. Rozpatrywano trzy typy wewnątrzcząsteczkowych przemian: tautomeryzację, konfigurację względem wiązania C=N oraz konformację. Na podstawie analizy spektroskopowej HSQC wskazano dwie możliwe formy tautomeryczne **A** i **B**.



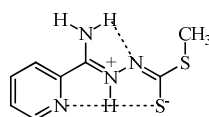
*Formy tautomeryczne kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego na podstawie analizy spektroskopowej HSQC.*

W dalszej kolejności dokonano dwóch analiz: ¹H-¹³C HMBC, która wykazała oddziaływanie pomiędzy protonem przy azocie hydrazydowym NH i węglem C(2) pierścienia pirydyny oraz ¹H-¹⁵N HMBC, wykazującą oddziaływanie protonu hydrazydowego NH z azotem grupy NH₂ i azotem pierścienia pirydyny.



Korelacja ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{15}N w widmie HMBC estru metylowego kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego.

W celu ustalenia, która z form jest obecna w postaci krystalicznej, przeprowadzono analizę rentgenograficzną wykazującą istnienie związku w dipolarnej konfiguracji *Z* z silnymi wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi, stabilizującymi obserwowaną strukturę płaską.

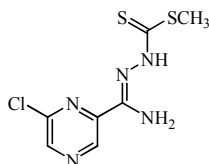


Dipolarna konfiguracja *Z* estru metylowego kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego.

Związek ten wykazał wysoką aktywność bakteriostatyczną wobec *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* (MIC = 3,13 µg/ml).

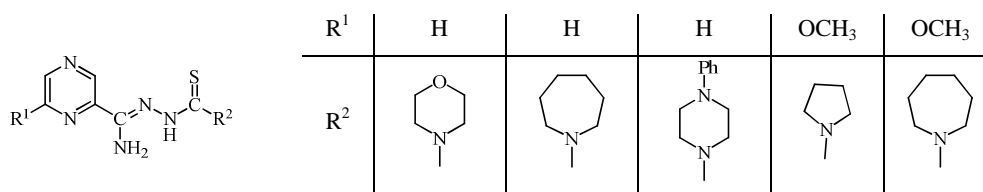
Analiza geometryczna możliwych konformerów powyższego związku wykazała, że najważniejszym współczynnikiem stabilności jest konformacja względem pojedynczego wiązania N-N, co potencjalnie formułuje wiązania wodorowe między protonem azotu N3 (forma pierwsza) lub protonem pierwszorzędowej grupy NH₂ (forma druga) a azotem pirydyny. Struktura krystaliczna uwidacznia występowanie związku w formie pierwszej.

Przypuszczano, iż zastąpienie pirydyny w estrze metylowym kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego halogenopirazyną, której budowa również umożliwia tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, nie spowoduje zniesienia aktywności tuberkulostatycznej. W testach *in vitro* wartość MIC dla oznaczonych szczepów: standardowego *H₃₇Rv*, 192 - wrażliwego i 210 – opornego na stosowane leki wynosiła 32 µg/ml, co wskazuje na umiarkowane działanie przeciwpłatkowe tego związku.⁴⁴



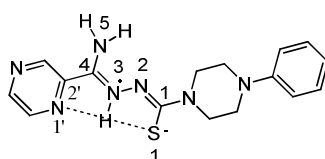
Ester metylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(6-chloropirazyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego.

Konsekwentne badania nad pochodnymi heterocyklicznych amidrazonów doprowadziły do syntezy serii *N'*-tioamido-podstawionych 2-pirazynokarboksyamidrazonów o spodziewanej aktywności przeciwpłatkowej.⁴⁵ Testy *in vitro* przeprowadzone względem 10 szczepów *Mycobacterium tuberculosis* wskazują na znaczącą aktywność ocenianych pochodnych (MIC = 8 µg/ml).



Struktury *N'*-tioamido-podstawionych pirazynokarboksyamidrazonów.

Biorąc pod uwagę podobieństwo otrzymanych związków do estru metylowego kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego, którego analiza krystalograficzna wykazała silne wiązania wodorowe utrzymujące planarność całej cząsteczki, podjęto próbę zbadania oddziaływań wodorowych w krystalicznej formie *N'*-[tiokarbonylo-(4-fenylopiperazyno)]pirazyno-2-karboksyamidrazonu.⁴⁶ Potwierdzono silne oddziaływania pomiędzy wiązaniami S1-C1 i C1-N2 jednej strony łańcucha oraz N3-C4 i C4-N5 przeciwnej strony łańcucha. Rezultatem tych oddziaływań jest dodatni ładunek na azocie N3 i dwa wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Proton przy azocie N3 odgrywa kluczową rolę jako donor do wiązania z siarką S1 oraz z azotem pirazyny, co zapobiega rotacji wokół wiązań pojedynczych C4-C2' i N2-N3. Płaską strukturę potwierdza fakt, iż wartość skręcenia kąтового jest mniejsza niż $\pm 9^\circ$.

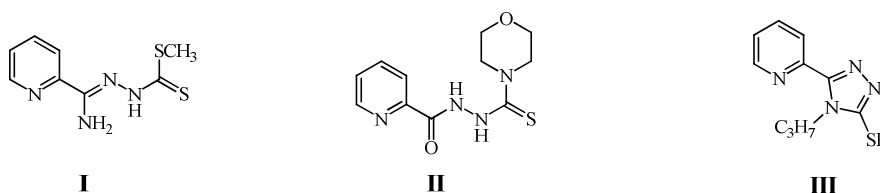


N'-[Tiokarbonylo-(4-fenylopiperazyno)]pirazyno-2-karboksyamidrazon.

III. CEL PRACY

Przedstawiony w „Części Teoretycznej” rozprawy aktualny stan wiedzy na temat lekooporności mikroorganizmów, zwłaszcza stafylokoków i enterokoków, będących patogenami wywołującymi znaczną część infekcji szpitalnych, oraz prątków gruźlicy, będących przyczyną szerzącej się epidemii gruźlicy, dowodzi, iż poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych klas związków o pożądanej, przeciwbakteryjnej aktywności budzi duże zainteresowanie badaczy zajmujących się chemią medyczną.

Badania prowadzone od szeregu lat w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, we współpracy z Katedrą Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z Zakładem Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, związane są z poszukiwaniem nowych, potencjalnych leków przeciwbakteryjnych, w szczególności tuberkulostatycznych. Obiecujące wyniki uzyskano w obrębie pochodnych pirydyny zawierających ugrupowania amidrazonowe (**I**)⁴³, pirydynolotiosemikarbazydowe (**II**) i 1,2,4-triazolo-3-tiolu (**III**)⁴⁷ w położeniu 2 pierścienia. Struktury najaktywniejszych związków przedstawiono poniżej (Rys. 1).



Rysunek 1

Głównym celem podjętych w tej pracy badań było opracowanie metod i synteza nowych związków pochodnych kwasu nikotynowego i pikolinowego o potencjalnym działaniu biologicznym, a zwłaszcza przeciwbakteryjnym.

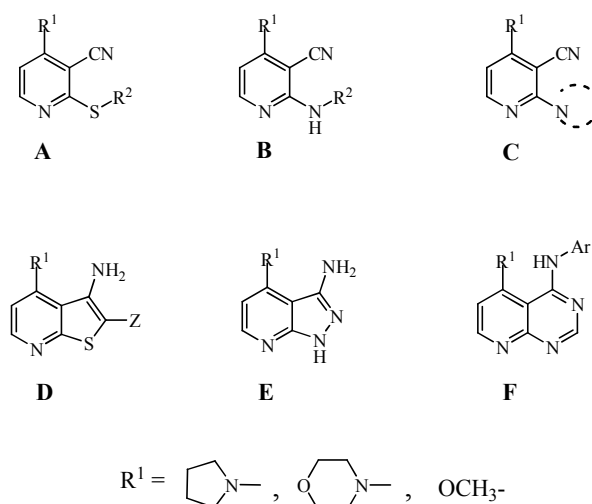
W obrębie pochodnych kwasu nikotynowego założeniem było zbadanie możliwości wykorzystania 1,1-dicyjano-4-(*N,N*-dimetyloamino)-2-metoksy-1,3-butadienu do syntezy pierścienia pirydyny ze zmiennymi podstawnikami w pozycji 2 i 4. Według doniesień literaturowych, obiecujące wyniki przeciwmikrobiologiczne uzyskano wśród pochodnych 3-cyjanopirydyny zawierających ugrupowania siarkowe⁴⁸ lub aminowe¹⁷ w położeniu 2, a także w produktach ich cyklizacji do wielocłonowych układów heterocyklicznych, takich jak tieno[2,3-*b*]pirydyny⁴⁹ czy pirydopirymidyny.^{50, 51}

W piśmiennictwie chemicznym brak jest opracowań na temat syntezy, reaktywności i aktywności biologicznej pochodnych pirydyny z aminą cykliczną oraz nieliczne doniesienia dotyczące pochodnych pirydyny z podstawnikiem metoksyowym w położeniu 4, które to związki są przedmiotem badań w tej pracy.

Szukano odpowiedzi na pytania:

- Jaki jest wpływ azotowego układu cyklicznego w pozycjach 2 i 4 oraz podstawnika metoksyowego w położeniu 4 pirydyny na aktywność biologiczną 3-cyjanopirydyn?
- Czy wprowadzenie do cząsteczki ugrupowań siarkowych i azotowych, następnie ich cyklizacja do układów płaskich wpłynie na wzrost aktywności przeciwbakteryjnej?

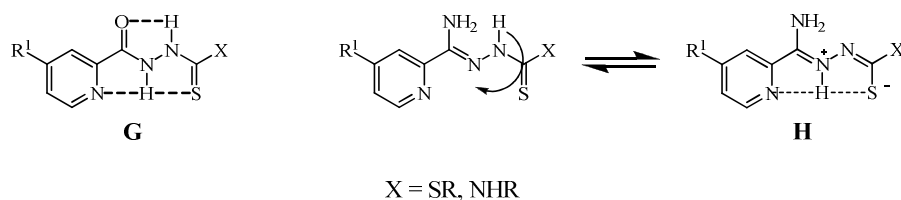
W tym celu postanowiono przeprowadzić syntezy szeregów pochodnych pirydyny oznaczonych na Rysunku 2 ogólnymi wzorami odpowiednio **A** – **F**.



Rysunek 2

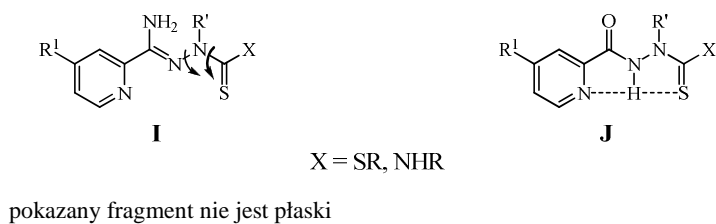
W obrębie pochodnych kwasu pikolinowego celem pracy była synteza pochodnych kwasu *N'*-pikolinoiloditiokarbazowego (**G**) i *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]ditiokarbazowego (**H**). Analiza geometrii i konformacji związków o strukturze **H** (opisanych w części teoretycznej) i analiza rentgenograficzna hydrazydowych związków o strukturze **G** (dane niepublikowane dla pochodnej pirazynowej) wykazały, że charakteryzują się one podobną cechą – są płaskie dzięki występującym w sprzężeniu wiązaniom wielokrotnym oraz możliwości istnienia w postaci odpowiedniego tautomeru i powstawaniu

wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych utrwalających planarność fragmentu cząsteczki, co mogłoby warunkować ich aktywność tuberkulostatyczną (Rys. 3).



Rysunek 3

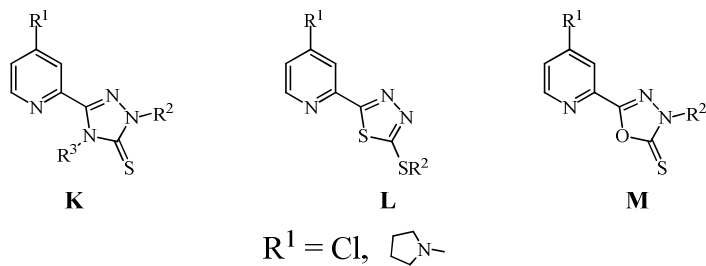
W celu sprawdzenia czy wprowadzenie do powyższych układów podstawnika (R') w miejsce protonu przy azocie N wpłynie na zmianę aktywności przeciwcukrzyczej, zaplanowano również syntezę pochodnych kwasów *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]-*N*-metyloditiokarbazowego (**I**) oraz *N'*-(pikolinoilo)-*N*-metyloditiokarbazowego (**J**) (Rys. 4).



Rysunek 4

W strukturze pochodnej amidrazonu **I** wprowadzenie podstawnika R' blokuje możliwość tautomerycznego przeniesienia protonu. W rezultacie takiego podstawienia i braku wspomnianych wiązań wodorowych „płaska” konformacja cząsteczki jest mniej prawdopodobna i związki takie powinny wykazywać mniejszą aktywność tuberkulostatyczną. W pochodnej hydrazydowej **J** duży fragment cząsteczki nie ulega zmianie, w wyniku czego wprowadzenie podstawnika R' mogłoby nie powodować zmian aktywności przeciwcukrzyczej.

Kolejnym założeniem pracy było również zbadanie reaktywności otrzymanych związków ditiokarbazowych do syntezy azotowych układów heterocyklicznych, takich jak 1,2,4-triazole (**K**), 1,3,4-tiadiazole (**L**) i 1,3,4-oksadiazole (**M**) ze zróżnicowanymi podstawnikami, których wprowadzenie na innej drodze jest utrudnione lub niekiedy niemożliwe (Rys. 5).



Rysunek 5

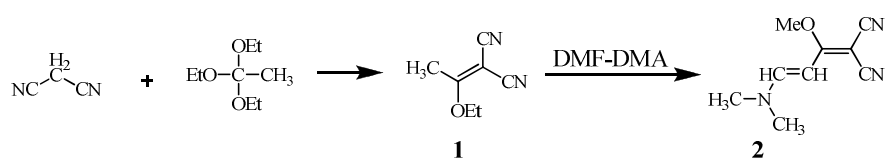
Należy dodać, że otrzymane w tej pracy struktury, poza badaną aktywnością przeciwbakteryjną, mogą wykazywać inne szerokie, potencjalne działanie biologiczne. Przedstawiono je w dalszych podrozdziałach tej pracy omawiających syntezy poszczególnych klas pochodnych pirydyny.

Wybrany kierunek badań aktywności biologicznej podyktowany był możliwościami ich przeprowadzenia.

IV. BADANIA WŁASNE

IV.1. Otrzymywanie i struktura 2-[1,3-di(amino-podstawionych)allilideno]malononitryli **3a, 3b**

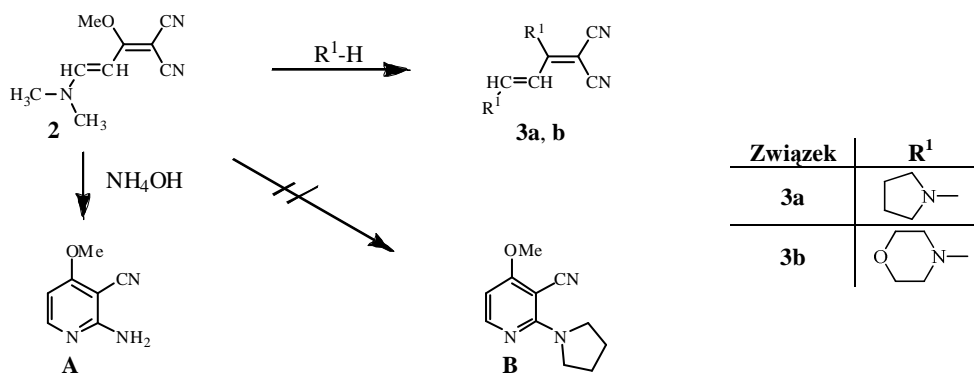
Podstawowym substratem stosowanym w pierwszej części niniejszej pracy do utworzenia pierścienia pirydyny jest 2-[3-(dimetyloamino)-1-metoksyallilideno]malononitryl (**2**), który otrzymano według metody opisanej przez Mittelbacha⁵² (Schemat 1).



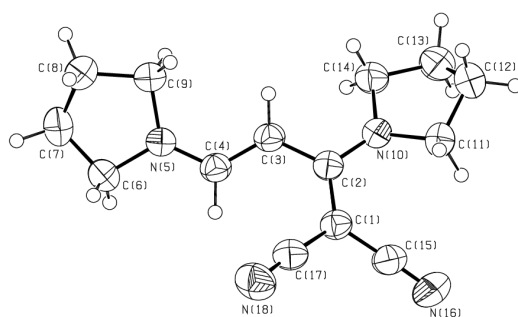
Schemat 1

W pierwszym etapie przeprowadzono syntezę 1,1-dicyjano-2-etoksy-prop-1-enu (**1**)⁵³, działając triortoocetanem etylu na malonodinitryl. Otrzymany produkt poddano kondensacji z dimetyloformamidem-dimetyloacetalu (DMF-DMA) w metanolu, uzyskując związek **2**.

Na podstawie doniesienia Mittelbacha⁵² o cyklizacji związku **2** do 2-amino-4-metoksynikotynonitrylu (**A**) w reakcji z amoniakiem, podjęto próbę przeprowadzenia analogicznej reakcji z wykorzystaniem aminy cyklicznej (pirolidyny, morfoliny). Zakładając, że reakcję rozpoczyna przyłączenie pirolidyny do spolaryzowanej grupy cyjanowej, spodziewano się, iż produktem reakcji będzie nikotynonitryl z podstawioną aminą cykliczną w pozycji 2 oraz z grupą metoksyłową w pozycji 4 (**B**). Zamiast oczekiwanej pochodnej, w reakcji związku **2** z pirolidyną i morfoliną doszło do utworzenia odpowiednio 2-[1,3-di(pirolidyn-1-ylo)allilideno]malononitrylu (**3a**) i 2-[1,3-di(morfolin-4-ylo)allilideno]malononitrylu (**3b**) (Schemat 2), których struktura została potwierdzona w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz na podstawie widm IR oraz ¹H NMR. Tożsamość związku **3a** jednoznacznie określono w oparciu o wyniki analizy rentgenograficznej (Rys. 6).



Schemat 2



<u>Długość wiązań</u>		<u>Kąty skręcenia</u>	
C1-C2	1,418(2)	C1-C2-C3-C4	-27,1(2)
C1-C15	1,414(2)	C2-C3-C4-N5	175,6(1)
C1-C17	1,414(2)		
C2-C3	1,435(2)		
C2-N10	1,339(2)		
C3-C4	1,360(2)		
C4-N5	1,327(2)		
C15-N16	1,147(2)		
C17-N18	1,144(2)		

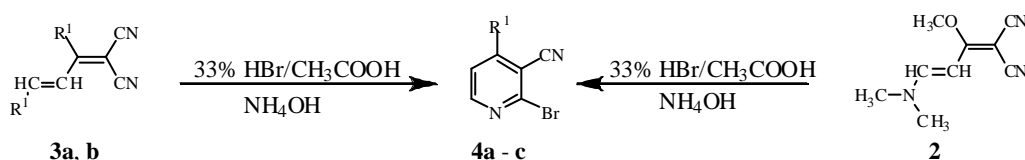
Rysunek 6. Projektcja (ORTEP) związku **3a**.

IV.1.1. Synteza i reaktywność 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4a - c**

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie możliwości wykorzystania związków **3a** i **3b** do syntezy zamierzonego układu 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4b, c**.

Zgodnie z oczekiwaniem, 2-bromo-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (**4b**) oraz 2-bromo-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (**4c**) uzyskano, działając na związki **3a** i **3b** 33%

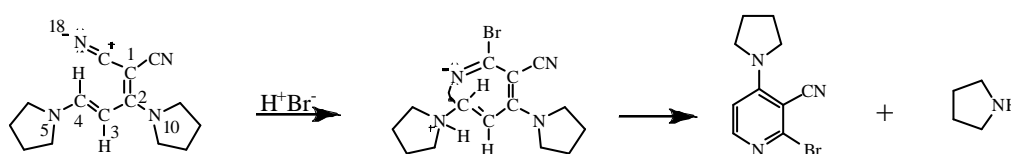
roztworem HBr w kwasie octowym w temperaturze pokojowej przez 72 h. Podobnie jak dla powyższych pochodnych, opisany wcześniej w literaturze 2-bromo-4-metoksynikotynonitryl (**4a**)⁵² otrzymano zmodyfikowaną metodą Mittelbacha, poprzez zamianę gazowego bromowodoru na 33% roztwór HBr w kwasie octowym (Schemat 3). Produkty w postaci bromowodorków alkalizowano amoniakiem, uzyskując związki **4a - c** z wydajnością od 63 do 80%.



Związek	4a	4b	4c
R ¹	OCH ₃		

Schemat 3

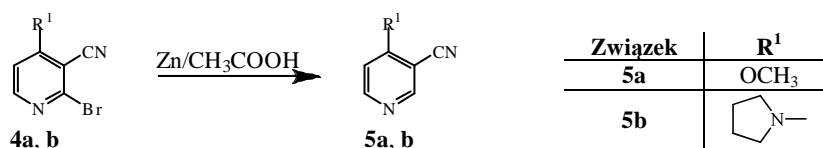
Na podstawie wyników badania rentgenograficznego zaproponowany został mechanizm reakcji cyklizacji 1→2,3. Szkielet związku składa się z naprzemiennego systemu wiązań pojedynczych i wielokrotnych. Dochodzi do sprzężeń, w których biorą udział także wolne pary elektronowe dwóch pochodzących od piperolidyny atomów azotu. Sprzężenia te sprzyjają płaskości struktury. Potwierdza to skrócenie wiązań pojedynczych zarówno C-C (C1-CN i C2-C3), jak i pomiędzy C-N (C4-N5, C2-N10) oraz wydłużenie podwójnych (C1=C2, C3=C4) i potrójnych CN. W rezultacie takiego ułożenia w przestrzeni mogłoby dochodzić do zbliżenia pomiędzy H (C4) i grupą cyjanową (N18). Naprężenie jest złagodzone przez znaczący skręt wzdłuż wiązania C2-C3, co dowodzi wartość skrzywienia kąтового C1-C2-C3-C4 o wielkości -27,1°. Skrzywienie to powoduje wychylenie grupy CN z płaszczyzny C3=C4 z łatwiejszym dostępem do nieosłoniętego przez atom wodoru węgla C4 (Rys. 7).



Rysunek 7

Pod wpływem bromowodoru dochodzi do przyłączenia anionu bromkowego do węgla spolaryzowanej grupy cyjanowej i protonowania pirolidyny. Jednocześnie następuje atak wolnej pary elektronowej azotu na węgiel C4, w wyniku czego zamknięciu ulega pierścień pirydyny i eliminacja pirolidyny.

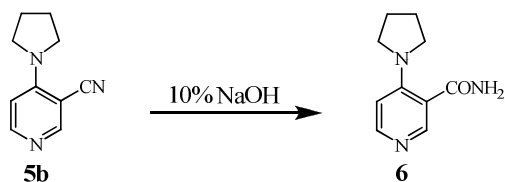
Zmierając do uzyskania pochodnych z ugrupowaniem karboksylowym w położeniu 3 pierścienia pirydyny, podjęte zostały próby przeprowadzenia hydrolizy kwasowej i zasadowej dla związków **4a** - **c**. Pomimo zwiększenia zarówno stężenia środków hydrolizujących, jak i wydłużenia czasu reakcji, stwierdzono, iż wbrew oczekiwaniom dla żadnego ze związków reakcje nie zachodzą. Brak reaktywności grupy cyjanowej może być spowodowany zarówno obecnością wolnej pary elektronowej w pirolidynie, co powoduje zmniejszenie ładunku dodatniego na węglu grupy –CN, jak i zawadą przestrzenną atomu bromu w pozycji 2. W celu sprawdzenia wpływu bromu na reaktywność grupy cyjanowej, przeprowadzono jego redukcję cynkiem w obecności kwasu octowego dla związków **4a** i **4b**, uzyskując produkty **5a** i **5b** (Schemat 4).



Schemat 4

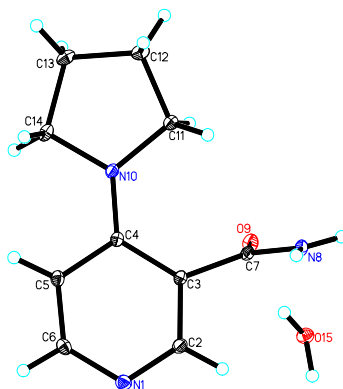
Struktury związków **5a** i **5b** potwierdzono metodami spektroskopii IR i ¹H NMR. W widmie ¹H NMR obserwujemy sygnał rezonansowy protonu H-2 przy 8,68 dla związku **5a** i 8,46 ppm dla związku **5b**. Masę cząsteczkową związku **5b** potwierdza widmo MS, w którym występuje pik podstawowy [M + 1] przy m/z = 174 o intensywności 100%.

4-(Pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (**5b**) poddano następnie hydrolizie zasadowej, ogrzewając związek w 10% wodnym roztworze NaOH przez 4 h. Spodziewano się, iż po przeprowadzeniu reakcji w powyższych warunkach izolowanym produktem będzie kwas (4-pirolidyn-1-ylo)nikotynowy. Związek **5b** okazał się bardziej reaktywny niż jego analog z bromem, jednak hydroliza zatrzymuje się na etapie amidu kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynowego (**6**) (Schemat 5). Taką strukturę potwierdza analiza widm IR, ¹H NMR oraz rentgenograficzna (Rys. 8).



Schemat 5

W widmie IR związku **6** znajdujemy pasma drgań rozciągających wiązań grupy NH_2 w zakresie $3479 - 3163 \text{ cm}^{-1}$ oraz wiązania grupy karbonylowej $\text{C}=\text{O}$ przy 1661 cm^{-1} . W obrazie widma ^1H NMR występują dwa poszerzone singlety przy 1,88 i 3,28 ppm o intensywności czterech protonów każdy odpowiadające protonom piperolidyny, dwa dublety o stałej sprzężenia 6,3 Hz przy 6,54 i 8,06 ppm odpowiadające protonom pirydyny H-5 i H-6, singlet przy 8,10 ppm charakteryzujący proton pirydyny H-2 oraz dwa poszerzone singlety przy 7,37 i 7,85 ppm od grupy NH_2 .



Rysunek 8. Widok części niezależnej komórki elementarnej związku **6** z podaną numeracją atomów (elipsoidy drgań termicznych na poziomie 50%; atomy wodoru zaznaczono jako kulki). Związek współkrystalizuje z rozpuszczalnikiem – wodą.

Potwierdzenia obniżonej reaktywności grupy cyjanowej w obecności bromu w pozycji 2 pierścienia pirydyny związków **4a - c** próbowano poszukać w oparciu o obliczenia kwantowo-chemiczne dla izolowanych molekuł. Obliczenia te prowadzono *ab initio* metodami: Hartree-Focka, DFT oraz MP2 z użyciem bazy 6,31-G**, wykorzystując do tych celów program SPARTAN 08, wersja 1.1.1 firmy Wavefunction Inc., USA. Po optymalizacji struktur obliczono energię całkowitą dla związku 2-bromo-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitrylu (**4b**) oraz jego analogu bez halogenu **5b**. Wyniki obliczeń przedstawiono w Tabeli 1.

Nr związku	Energia obliczona (E, hartrees)		
	HF/6,31G**	DFT/6,31G**	MP2/6,31G**
4b	-3119,94686	-3125,21723	-3121,88658
5b	-548,433408	-551,941028	-550,254827

Tabela 1. Energia całkowita związków **4b** i **5b** po optymalizacji geometrii metodami HF, DFT i MP2.

Po porównaniu wyznaczonego trzema metodami ładunku elektrostatycznego węgla grupy –CN obu związków wskazano, iż w każdym przypadku jest on wyższy dla pochodnej bez zawady sterycznej, jaką stanowi brom (Tabela 2).

Nr związku	Ładunek elektrostatyczny węgla C		
	HF/6,31G**	DFT/6,31G**	MP2/6,31G**
4b	0,335	0,157	0,321
5b	0,395	0,275	0,359

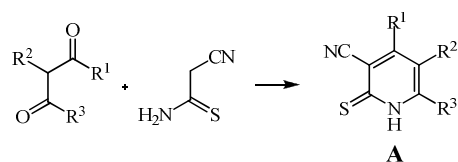
Tabela 2. Ładunek elektrostatyczny C dla związków **4b** i **5b** obliczony metodami HF, DFT i MP2.

Rezultatem przeprowadzonych badań eksperymentalnych jest potwierdzenie, iż węgiel grupy –CN 4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitrylu (**5b**) jest bardziej elektrofilowy, co może wpływać na zwiększoną reaktywność tego związku z odpowiednimi nukleofilami.

IV.1.2. Reakcje 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4a** - c z tiomocznikiem^{54, 55}

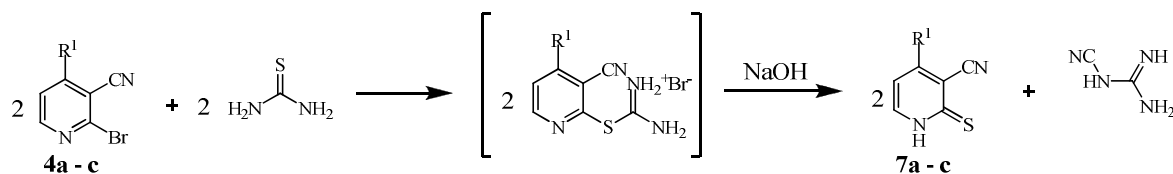
Spośród związków zawierających układ 2-merkaptopirydyny (2-MP) dużą część stanowią 3-cyjano-pochodne, będące doskonałymi substratami w syntezie podstawionych, jednopierścieniowych, jak również bardziej złożonych, wielopierścieniowych układów, takich jak tienopirydyny, izotiazolopirydyny, pirydotienopirydyny, pirydotienopirymidyny, pirydotienotriazyny i inne. Ta liczna grupa związków charakteryzuje się szerokim zakresem działań terapeutycznych. W dalszej części rozdziału opisano aktywność biologiczną znanych z literatury pochodnych 3-cyjano-pirydino-2(1*H*)-tionów oraz metody syntezy nowych połączeń z uwzględnieniem podziału na sulfidy i tieno[2,3-*b*]pirydyny.

Z doniesień literaturowych^{56, 57} wynika, iż cennym substratem w syntezie 3-cyjano-pirydino-2(1*H*)-tionów jest 2-cyjanotioacetamid, który reaguje z diketonami, a następnie cyklizuje w obecności II-rzędowej lub III-rzędowej aminy jako katalizatora do zamierzonego układu (Rys. 9).



Rysunek 9

Z myślą o otrzymaniu analogów związku **A**, podjęte zostały próby syntezy pirydyno-2(1*H*)-tionu w reakcji otrzymanych wcześniej 2-bromo-3-cyjanopirydyn **4a - c** z tiomocznikiem. Metoda ta jest preferowana ze względu na to, iż 2-halogeno-pochodne pirydyny stosunkowo łatwo ulegają podstawieniu grupą tiolową oraz z uwagi na dużą dostępność tiomocznika.⁵⁸ W pierwszym etapie reakcji prowadzonych we wrzącym metanolu dochodzi do utworzenia soli bromonowych tiomocznika, które następnie przeprowadzono w wolne 3-cyano-pirydyno-2(1*H*)tiony **7a - c** pod wpływem 10% wodnego roztworu NaOH. Podjęto również próby syntezy pirydyno-2(1*H*)-tionu z wykorzystaniem wielosiarczku amonu i uwodnionego siarczku sodu, jednak lepsze wydajności czystych produktów (69 – 96%) uzyskano przy zastosowaniu tiomocznika. Przebieg reakcji obrazuje Schemat 6.



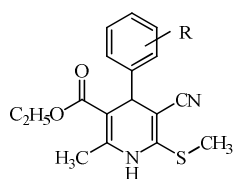
Związek	7a	7b	7c
R ¹	-OCH ₃	-N	-N

Schemat 6

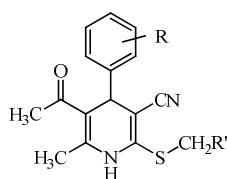
W widmach IR, obok pasm w zakresie 3216 - 3150 cm⁻¹, które odpowiadają drganiom walencyjnym wiązań N-H, znajdują się pasma w zakresie 1244 – 1249 cm⁻¹ charakterystyczne dla grupy C=S. W widmach ¹H NMR tych związków występują linie rezonansowe w zakresie 12,78 – 13,56 ppm o intensywności jednego protonu odpowiadające grupom N-H, co wskazuje, iż uzyskane produkty reakcji przyjmują formę tautomeryczną tionu.

IV.1.2.1. Synteza 2-S-podstawionych alkilowych, arylowych i acetylowych pochodnych nikotynonitryli 8a – y, 9a – h

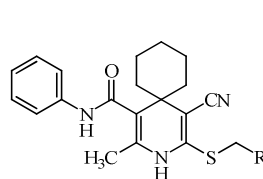
Otrzymanie 2-S-podstawionych pochodnych 3-cyjanopirydyny jest interesujące z punktu widzenia potencjalnych właściwości biologicznych. Wiadomo bowiem, że niektóre pochodne pirydyno-2(1*H*)-tionu posiadają udowodnione działanie przeciwnowotworowe, gdy występują w postaci kompleksów z metalami ciężkimi⁵⁹, kardiowaskularne⁶⁰⁻⁶⁴, przeciwutleniające⁶⁵, hepatoprotekcyjne⁶⁶ czy pożądane przeciwbakteryjne.⁴⁸



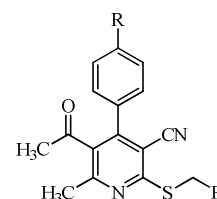
kardiowaskularne



przeciwutleniające



hepatoprotekcyjne

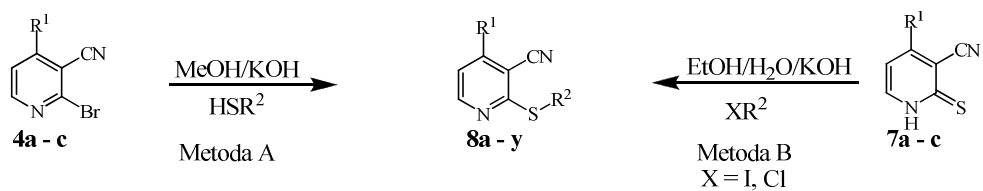


przeciwbakteryjne

W celu otrzymania analogów wyżej wymienionych układów, syntezy tioeterów przeprowadzono dwiema metodami (opisanymi w piśmiennictwie 60, 65, 67):

- A)** w reakcji 2-bromopochodnych pirydyny **4a - c** z merkaptanami i tiofenolami,
- B)** w bezpośredniej reakcji tionów **7a - c** z halogenopochodnymi.

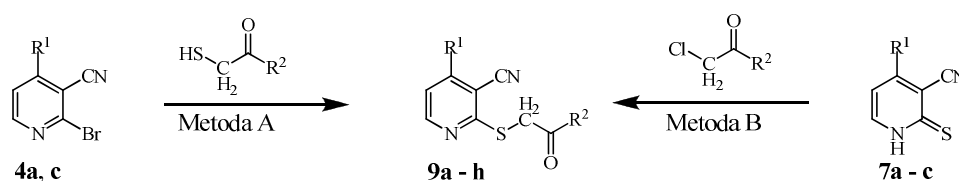
Reakcje metodą **A** prowadzono w środowisku wrzącego metanolowego roztworu KOH przez 1 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej produkty ulegały wytrąceniu. Reakcje przy zastosowaniu metody **B** prowadzono w środowisku zasadowym w mieszaninie etanol/woda, w temperaturze pokojowej przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 3 h lub we wrzeniu przez 30 minut. Produkty oczyszczono na drodze krystalizacji. Przebieg reakcji obrazuje Schemat 7.



Związek	Metoda	R ¹	R ²
8a	B	-OCH ₃	-CH ₃
8b	A	-OCH ₃	
8c	A	-OCH ₃	
8d	A	-OCH ₃	
8e	A	-OCH ₃	
8f	A	-OCH ₃	
8g	A	-OCH ₃	
8h	B		-CH ₃
8i	B		-CH ₂ CH ₃
8j	A		-CH ₂ CH ₂ NH ₂
8k	B		-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂
8l	B		
8m	A		
8n	A		
8o	A		
8p	A		
8r	A		
8s	A		
8t	B		-CH ₃
8u	B		
8w	B		
8x	A		
8y	A		

Schemat 7

Opierając się na doniesieniach o przydatności syntetycznej pirydino-2(1*H*)-tionów do bardziej rozbudowanych układów heterocyklicznych, podjęto również syntezę tioeterów z ugrupowaniem amidowym lub estrowym. Związki **7a - c** zostały użyte jako substraty w reakcji alkilowania z aktywnymi halogenometylenopochodnymi o budowie amidowej (metoda B). Reakcje z chlorowodorkiem 1-(2-chloroacetylo)-4-fenylopiperazyny, chlorowodorkiem 1-(2-chloroacetylo)-4-(pirydyn-2-yl)piperazyny oraz chlorowodorkiem 1-(2-chloroacetylo)-4-(4-fluorofenylo)piperazyny przeprowadzono w temperaturze pokojowej, w obecności 2 lub 3 (dla związku **9d i 9e**) ekwiwalentów wodnego roztworu KOH w DMF. Związki **9d i 9e**, dla których już analiza spektroskopowa IR wykazuje strukturę liniową (obecne pasma absorpcji drgań rozciągających grupy CN przy 2206 cm⁻¹), otrzymano pomimo dodania 3 równoważników molowych zasady, co miało spowodować bezpośrednią wewnątrzcząsteczkową cyklizację tych związków do układu tieno[2,3-*b*]pirydyny. Tioetery o charakterze estrów **9a, 9f** otrzymano w reakcji 2-bromo-3-cyjanopirydyn **4a, c** z tioglikolanem metylu (metoda A). Poszukiwania optymalnych warunków tych reakcji wykazały, iż największe wydajności produktów **9a - h** (do 82%) uzyskano przy zastosowaniu wodnego roztworu KOH i DMF (Schemat 8).



Związek	Metoda	R ¹	R ²
9a	A	-OCH ₃	-OCH ₃
9b	B	-OCH ₃	
9c	B	-OCH ₃	
9d	B		
9e	B		
9f	A		-OCH ₃
9g	B		
9h	B		

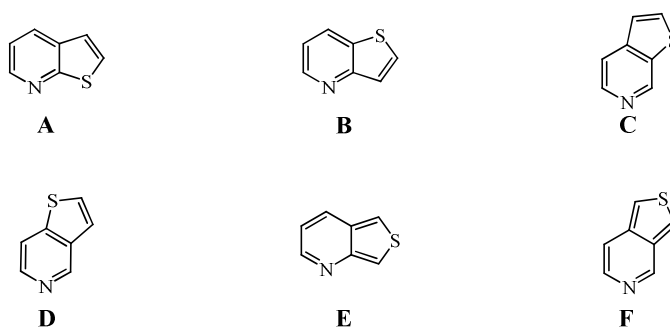
Schemat 8

Zgodnie z oczekiwaniem, w widmach IR związków **9a - h** obserwujemy charakterystyczne pasma drgań rozciągających grupy -CN w zakresie 2202 – 2225 cm⁻¹ oraz

grupy karbonylowej w zakresie 1628 – 1739 cm^{-1} . Obecność grupy CH_2 w widmie ^1H NMR potwierdza singlet o intensywności 2 protonów w zakresie 4,03 – 4,36 ppm.

IV.1.2.2. Synteza tieno[2,3-*b*]pirydyn

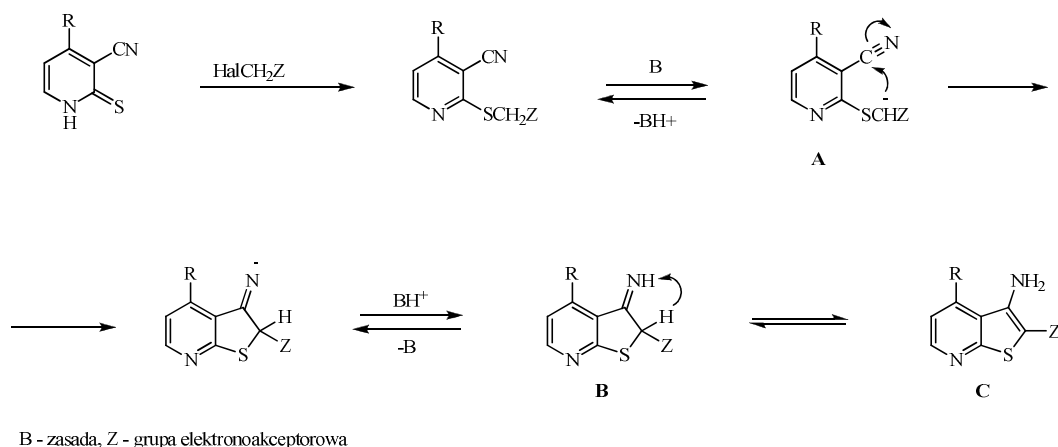
Znanych jest sześć izomerycznych struktur tienopirydyn, które charakteryzuje różny układ połączenia: tieno[2,3-*b*]pirydyny [**A**], tieno[3,2-*b*]pirydyny [**B**], tieno[2,3-*c*]pirydyny [**C**], tieno[3,2-*c*]pirydyny [**D**], tieno[3,4-*b*]pirydyny [**E**] oraz tieno[3,4-*c*]pirydyny [**F**]. Najszerzej poznane są pierwsze cztery struktury.



Chemię izomerów [2,3-*b*] poznano najlepiej, co jest związane przede wszystkim z dużym, praktycznym wykorzystaniem tej grupy związków w chemii medycznej. Spektrum biologicznej aktywności tej klasy pochodnych jest szerokie: przeciwwstrząsowe, przeciwzapalne, przeciwnadciśnieniowe⁶⁸⁻⁷⁰, przeciwbakteryjne⁷¹⁻⁷³, przeciwwirusowe⁷⁴ oraz przeciwnowotworowe.⁷⁵ Dodatkowo, niektóre pochodne tieno[2,3-*b*]pirydyn wykazują obiecującą aktywność w kierunku leczenia osteoporozy⁷⁶, są inhibitorami lipoksygenazy⁷⁷, agonistami receptora dla LH⁷⁸ oraz antagonistami GnRH⁷⁹⁻⁸² (hormonu regulującego uwalnianie gonadotropin).

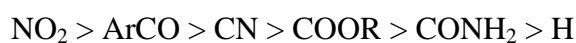
Znaczącą rolę w rozwoju chemii tieno[2,3-*b*]pirydyn odgrywają dogodne metody ich syntezy, które opierają się na zamykaniu pierścienia tiofenu z wykorzystaniem pochodnych pirydyny oraz zamykaniu pierścienia pirydyny na bazie pochodnych tiofenu.

W niniejszej pracy syntezę tieno[2,3-*b*]pirydyn oparto na cyklizacji Thorpego-Zieglera 2-alkilotiopodstawionych pochodnych 3-cyjanopirydyny z aktywną grupą metylenową w łańcuchu bocznym. Wybór tej metody spowodowany był łatwo otrzymywanymi pochodnymi 2-bromo-3-cyjanopirydyny **4a - c** oraz 3-cyjanopirydyno-2(1*H*)-tionu **7a - c**, które były substratami przedstawionych poniżej syntez. Mechanizm reakcji obrazuje Schemat 9.



Schemat 9

Do heterocyklizacji wymagane jest silniejsze środowisko zasadowe (pH ~ 9) zapewniające utworzenie karboanionu. Elektrono-akceptorowy efekt podstawnika Z, odpowiedzialnego za stabilność i stężenie karboanionu **A**, jest głównym czynnikiem determinującym szybkość cyklizacji. Empirycznie ustalono⁸³, że aktywność elektroakceptorowa podstawnika Z obniża się w następującej kolejności:



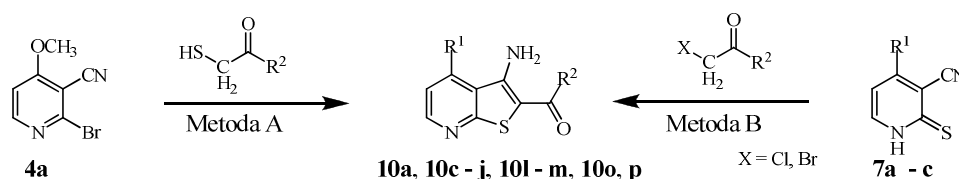
Równowaga tautomeryczna **B** - **C** przesunięta jest w kierunku formy aminowej **C**.⁸³

Warunki reakcji mogą się zmieniać w szerokim zakresie. Znane są cyklizacje zachodzące w środowisku kwasu, lecz głównie syntezy te prowadzone są w środowisku zasadowym, przeważnie w układach KOH/DMF, KOH/EtOH, K₂CO₃/EtOH, K₂CO₃/DMF, EtONa/EtOH, Na₂CO₃/EtOH, K₂CO₃/aceton, MeONa/EtOH, KOH/EtOH/H₂O, AcONa/EtOH, Et₃N/dioksan, Et₃N/EtOH czy Et₃N/DMSO. Zazwyczaj cyklizacje przeprowadza się w nadmiarze zasady, lecz w nielicznych przypadkach już równomolowa jej ilość powoduje, iż dochodzi do niej spontanicznie i izolacja tioeterów jest niemożliwa. Tienopirydyny przeważnie otrzymywane są w łagodnych warunkach (temperatura pokojowa), jednak czasami niezbędne jest ogrzewanie.⁸⁴

Syntezę tienopirydyn można prowadzić poprzez izolowanie tioeterów, a następnie cyklizację w środowisku zasadowym lub bezpośrednią reakcją 3-cyjanopirydino-2(1H)-tionów z czynnikiem alkilującym w nadmiarze zasady.

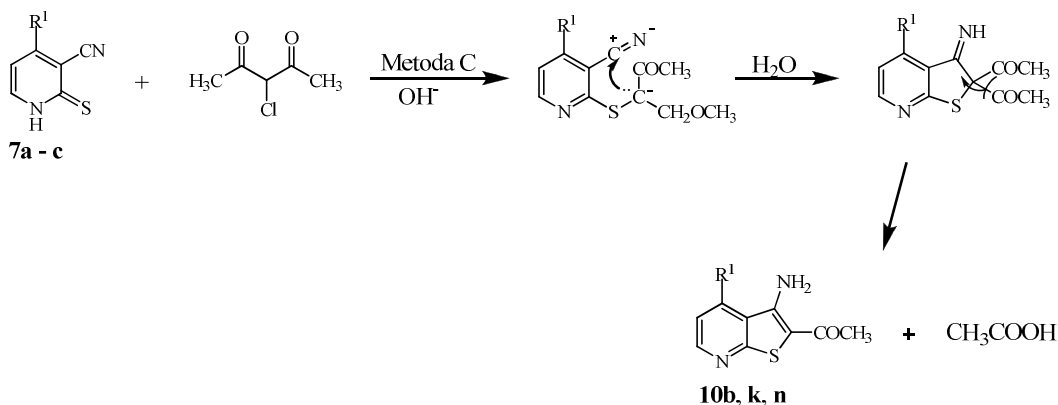
W niniejszej pracy syntezę tieno[2,3-*b*]pirydyn przeprowadzono 3 metodami (**A**, **B**, **C**) bez izolacji produktów pośrednich, co mogłoby wpłynąć na obniżenie wydajności reakcji. W

metodzie **A** jako substraty wykorzystano 2-bromo-4-metoksynikotynonitryl (**4a**) oraz pochodne kwasu tioglikolowego o charakterze estrów i amidów. W alternatywnej metodzie **B** użyto 3-cyjanopirydyno-2(1*H*)-tionów **7a - c** i środków alkilujących. Omawiana reakcja substytucji nukleofilowej i wewnątrzcząsteczkowa cyklokondensacja do wielofunkcyjnych, podstawionych tieno[2,3-*b*]pirydyn prowadzone były w temperaturze otoczenia przy udziale 2 lub 3 (dla związków **10h** i **10i**) równoważników molowych zasady, z uzyskaniem związków **10a, 10c - j, 10l - m, 10o, p** z wydajnościami od 14 do 78% (Schemat 10).


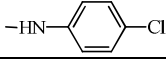
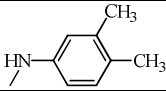
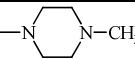
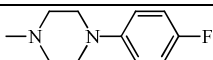












Schemat 10

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż zaproponowany mechanizm otrzymywania metyloketo pochodnych **10b, k, n** w reakcji tionów **7a - c** z 3-chloro-2,4-pentadionem (metoda **C**) przebiega z wydzieleniem cząsteczki kwasu octowego, co odróżnia tę syntezę od przedstawionych powyżej reakcji cyklizacji, w których nie obserwujemy wydzielania produktów ubocznych (Schemat 11).



Schemat 11

Związek	Metoda	R ¹	R ²
10a	B	-OCH ₃	
10b	C	-OCH ₃	-
10c	B	-OCH ₃	-NH ₂
10d	B	-OCH ₃	-OCH ₂ CH ₃
10e	A	-OCH ₃	-OCH ₃
10f	A	-OCH ₃	
10g	A	-OCH ₃	
10h	B	-OCH ₃	
10i	B	-OCH ₃	
10j	B		
10k	C		-
10l	B		-NH ₂
10ł	B		-OCH ₂ CH ₃
10m	B		
10n	C		-
10o	B		-NH ₂
10p	B		-OCH ₂ CH ₃

Tożsamość związków **10a - p** potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz spektroskopowej. W widmach IR, obok niekiedy szerokich pasm w zakresie 3450 – 3100 cm⁻¹, przyczyną których może być występowanie wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań niewiążących pomiędzy grupą karbonylową i protonami przy egzocyklicznym azocie NH₂, znajdujemy pasma o dużej intensywności w zakresie 1579 – 1678 cm⁻¹ charakterystyczne dla obecności grupy C=O, natomiast brak jest pasm drgań rozciągających grup CN rejestrowanych dla substratów.

W widmach ¹H NMR tej klasy związków obserwujemy linie rezonansowe w postaci singletów w zakresie 6,32 – 8,12 ppm protonów grupy NH₂ oraz charakterystyczne dublety przy δ 6,83 – 7,04 i 8,25 – 8,55 ppm dla protonów odpowiednio H-5 i H-6 pierścienia pirydyny.

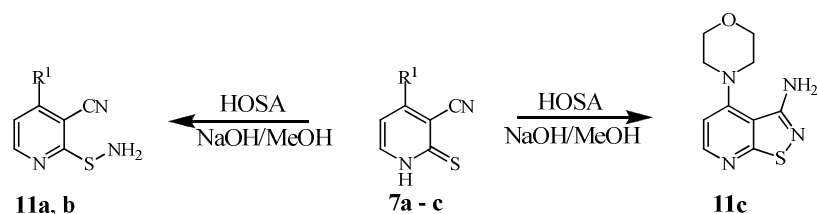
IV.1.2.3. Reakcje pirydino-2(1*H*)-tionów **7a** – **c** z kwasem hydroksyloamino-*O*-sulfonowym

W celu uzyskania informacji na temat reaktywności pirydino-2(1*H*)-tionów **7a** – **c** z odczynnikami o właściwościach elektrofilowych, podjęto próbę syntezy izotiazolo[5,4-*b*]pirydyn metodą opisaną przez Gewalda.⁸³

Pirydino-2(1*H*)-tiony **7a** - **c** w reakcji z kwasem hydroksyloamino-*O*-sulfonowym (HOSA) w nadmiarze zasady, zgodnie z powyższym doniesieniem, mogłyby ulegać elektrofilowemu aminowaniu i cyklizacji do zamierzonego układu. Wyniki analizy elementarnej i spektroskopowej produktów trzech reakcji prowadzonych w takich samych warunkach wskazują, iż tylko dla pochodnej **7c** zachodzi aminowanie i wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja, w wyniku których powstaje 3-amino-4-(morfolin-4-yl)izotiazolo[5,4-*b*]pirydyna (**11c**), a dla pochodnych **7a**, **b** proces kończy elektrofilowe aminowanie atomu siarki z utworzeniem 2-aminotio-4-podstawionych-nikotynonitryli **11a**, **b** (Schemat 12).

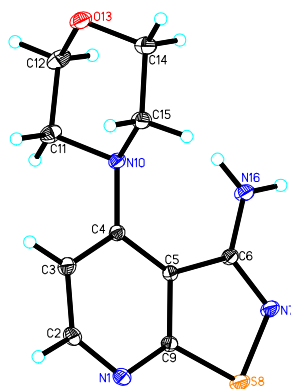
W widmach IR pochodnych **11a**, **b** obecne są pasma drgań rozciągających grup CN przy odpowiednio 2221 i 2206 cm⁻¹, czego nie obserwuje się w widmie związku **11c**. W widmach ¹H NMR związków **11a**, **b** obserwujemy sygnały w postaci singletów o intensywności 2 protonów każdy odpowiadające protonom grup SNH₂ odpowiednio przy 4,21 i 3,87 ppm, natomiast dla związku **11c** szeroki singlet o intensywności dwóch protonów grupy NH₂ przy 5,46 ppm.

Strukturę związku **11c** potwierdzono ostatecznie w oparciu o badania rentgenograficzne monokryształu (Rys. 10).



Związek	11a	11b
R ¹	-OCH ₃	-N(CH ₂) ₄

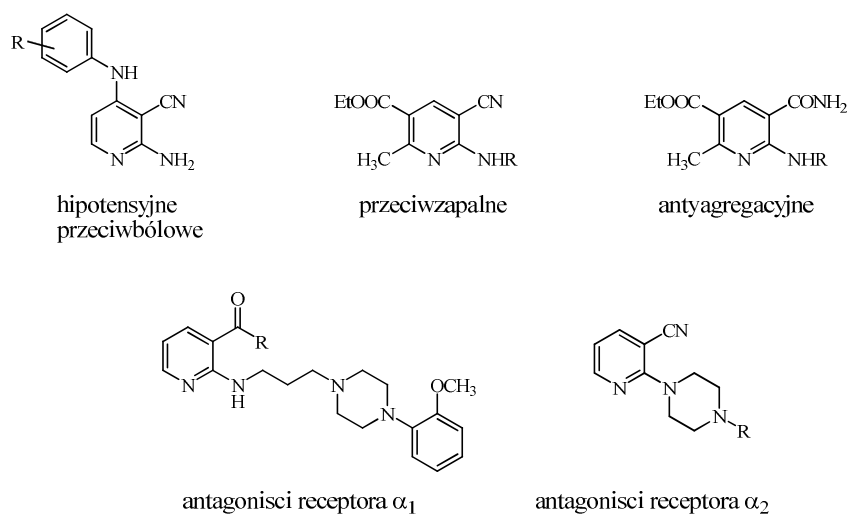
Schemat 12



Rysunek 10. Widok części niezależnej komórki elementarnej związku **11c** z podaną numeracją atomów (elipsoidy drgań termicznych na poziomie 50%; atomy wodoru zaznaczono jako kulki).

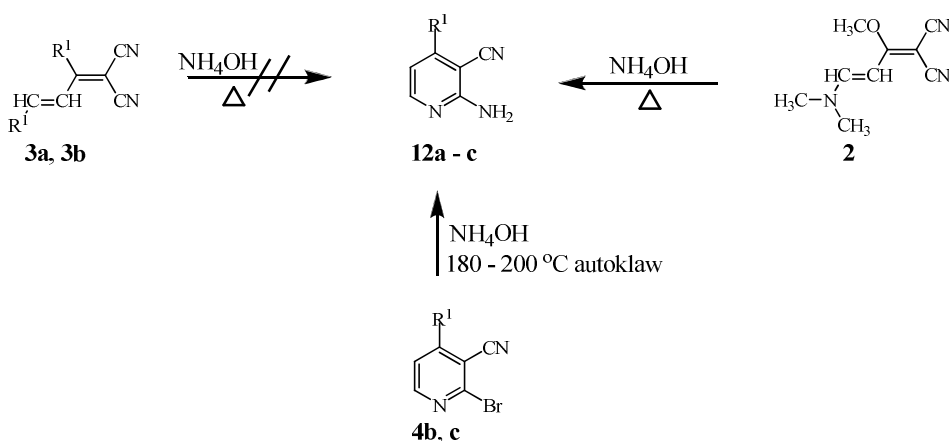
IV.1.3. Synteza i reaktywność pochodnych 2-amino-4-podstawionych-nikotynonitryli

Wiele zespołów badawczych prowadzi badania nad pochodnymi układu 2-amino-3-cyjanopirydyny. Różnokierunkowość badań farmakologicznych potwierdza między innymi aktywność hipotensyjna i przeciwbólowa⁸⁵ tej grupy związków. Duży wpływ na aktywność przeciwzapalną ma grupa cyjanowa w pozycji 3, której hydroliza do amidu zmienia kierunek działania na antyagregacyjne.⁸⁶ Udowodniono, że selektywnymi antagonistami receptora α_1 -adrenergicznego są aryloalkilo-2-aminopochodne 3-cyjanopirydyny⁸⁷, natomiast receptora α_2 te związki, które w swej strukturze posiadają bezpośrednie połączenie pirydyny i podstawionej piperazyny.⁸⁸



IV.1.3.1. Otrzymywanie 2-amino-4-(pirolidyn-1-ylo)- i 2-amino-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitrylu (12b, c)

W pracy Mittelbacha⁵² opisano syntezę 2-amino-4-metoksynikotynonitrylu (**12a**), który powstał w wyniku ogrzewania butadienowej pochodnej **2** w roztworze stężonego amoniaku. Spodziewano się, iż produkty reakcji 2-[1,3-di(pirolidyn-1-ylo)allilideno]malononitrylu (**3a**) oraz 2-[1,3-di(morfolin-4-ylo)allilideno]malononitrylu (**3b**) z amoniakiem będą posiadały strukturę analogiczną do związku **12a**, z odpowiednią aminą cykliczną w położeniu 4 pierścienia pirydyny. Brak reaktywności pochodnych **3a** i **3b** spowodował, iż syntezę pożądanego 2-amino-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitrylu (**12b**) oraz 2-amino-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitrylu (**12c**) przeprowadzono na drodze substytucji nukleofilowej 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli. Reakcje prowadzono w autoklawie, w roztworze amoniaku przez 4 h (Schemat 13).



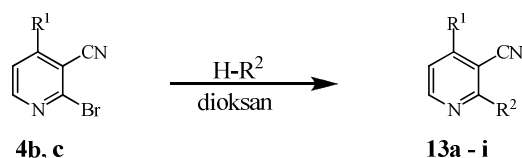
Związek	12a	12b	12c
R ¹	-OCH ₃	-N	-N

Schemat 13

Dla przykładu, w widmie IR produktu reakcji **12b** obecne są pasma absorpcji charakterystyczne dla drgań rozciągających wiązania NH₂ przy 3450 i 3303 cm⁻¹, natomiast w widmie ¹H NMR, obok linii rezonansowych grup CH₂ pierścienia pirolidyny i protonów pirydyny H-5 i H-6, obserwujemy dodatkowo singlet przy 5,20 ppm odpowiadający protonom podstawionej grupy NH₂. Masę cząsteczkową badanego związku potwierdza obecność w widmie MS (CI) piku podstawowego [M + 1] przy m/z = 189,1 o intensywności 100%.

IV.1.3.2. Reakcje 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4b, c** z aminami

W dalszej części syntez przeprowadzono podstawienie bromu w związkach **4b, c** aminami I i II rzędowymi. Ogrzewanie substratów w temperaturze wrzenia dioksanu doprowadziło do uzyskania produktów **13a - i** zgodnie ze Schematem 14.



Związek	R ¹	R ²	Związek	R ¹	R ²
13a			13f		
13b			13g		
13c			13h		
13d			13i		
13e					

Schemat 14

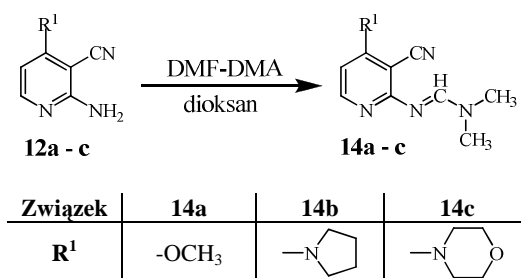
Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe pochodnych **13a - i** przedstawiono w części eksperymentalnej. Cechą wspólną tych związków jest obecność w widmach ¹H NMR linii rezonansowych w postaci dubletów w zakresach 5,84 – 6,25 i 7,69 – 8,05 odpowiadających protonom przy węglach pirydyny odpowiednio C-5 i C-6.

IV.1.3.3. Reakcje kondensacji 2-amino-4-podstawionych-nikotynonitryli **12a - c** z dimetyloformamidem-dimetyloacetalu

Z doniesień literaturowych wynika, iż związki o budowie *N,N*-dimetyloformamidyn można otrzymać w reakcji aminy pierwszorzędowej z dimetyloformamidem i tlenochlorkiem fosforu⁸⁹, z dimetyloformamidem-dimetyloacetalu w metanolu, w temperaturze pokojowej⁹⁰ oraz z DMF-DMA w dioksanie.⁹¹

W niniejszej pracy syntezę *N'*-[3-cyjano-4-(podstawionych)pirydyn-2-ylo]-*N,N*-dimetyloformamidyn **14a - c** przeprowadzono, wykorzystując ostatnią z wymienionych metod, z zastosowaniem 2-amino-4-podstawionych-nikotynonitryli **12a - c** jako substratów

(Schemat 15). Oczyszczone na drodze krystalizacji produkty otrzymano z wydajnościami od 56 do 85%.



Schemat 15

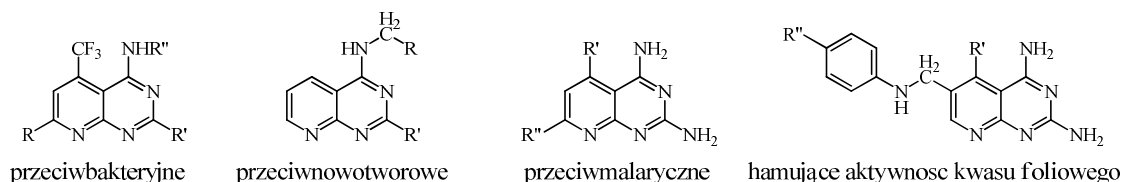
Strukturę otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o wyniki analizy widm IR oraz ¹H NMR.

W widmie IR związku **14b** znajdujemy pasmo absorpcyjne przy 2199 cm⁻¹ charakterystyczne dla grupy -CN oraz przy 1615 cm⁻¹, które można przypisać wiązaniu C=N. Widmo ¹H NMR związku **14b** potwierdza strukturę szkieletu węglowodorowego cząsteczki. W zakresie alifatycznym widma znajdujemy linie rezonansowe przy 1,90 ppm (4H) i 3,55 ppm (4H), które odpowiadają protonom grup CH₂ piperolidyny odpowiednio w pozycjach 3' i 4' (4H) oraz 2' i 5' (4H), jak i przy 3,01 ppm (3H) oraz 3,09 ppm (3H) odpowiadające sześciu protonom dwóch grup NCH₃.

W zakresie aromatycznym widma ¹H NMR związku **14b** znajdujemy dwa dublety przy 6,17 i 7,79 ppm o intensywności jednego protonu każdy odpowiadające protonom pirydyny oraz singlet przy 8,54 ppm potwierdzający obecność ugrupowania alkenylowego.

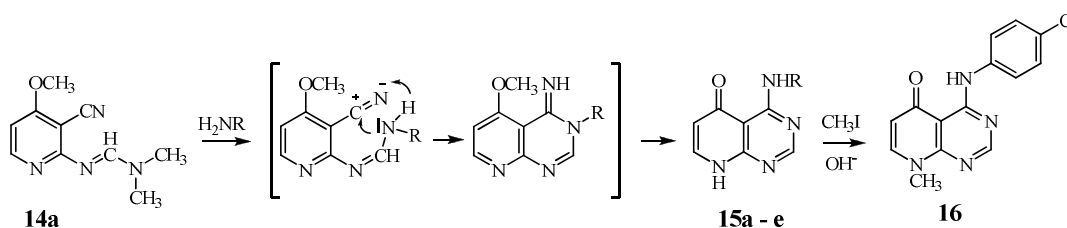
IV.1.4. Otrzymywanie, struktura i reaktywność pochodnych 4-podstawionych-pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-onów **15a - e**

Heterocykliczny układ pirydo[2,3-*d*]pirymidyny jest obecny w wielu związkach organicznych wykazujących działanie przeciwbakteryjne^{92, 93}, przeciwnowotworowe⁹⁴, przeciwpadaczkowe⁹⁵, hamujące aktywność kwasu foliowego⁹⁶, przeciwmalaryczne⁹⁷ oraz przeciwdepresyjne.⁹⁸



Synteza pirydo[2,3-*d*]pirymidyn prowadzona jest głównie na drodze przyłączenia pierścienia pirymidyny do pirydyny lub odwrotnie.⁹⁹ Szeroki zakres aktywności biologicznej tego układu heterocyklicznego, a zwłaszcza działanie przeciwbakteryjne, spowodował podjęcie prób wykorzystania opisanych w poprzednim podrozdziale *N'*-[3-cyano-(4-podstawionych)pirydyn-2-yl]-*N,N*-dimetyloformamidyn do syntezy diczłonowego układu ze zmiennymi podstawnikami.

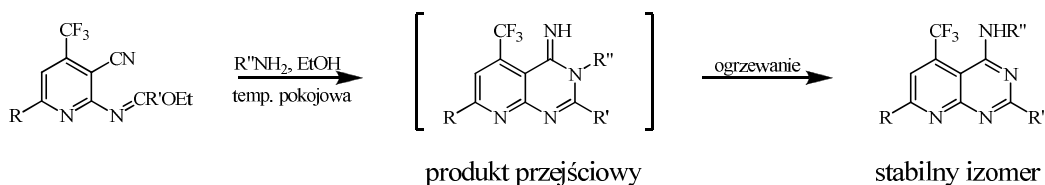
Substratami dla reakcji aminolizy, a następnie cyklizacji do podstawionego układu pirydo[2,3-*d*]pirymidyny były pochodne **14a** i **14b** oraz aromatyczne aminy pierwszorzędowe i benzyloamina. Reakcje prowadzono w kwasie octowym przez 1 h¹⁰⁰ (Schemat 16).



Związek	15a	15b	15c	15d	15e
R	<chem>c1ccc(Cl)cc1</chem>	<chem>Cc1cc(C)cc1</chem>	<chem>COC(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	<chem>Cc1cc(C)cc1</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>

Schemat 16

Założono, opierając się na doniesieniach Kanta¹⁰¹ o cyklizacji do analogicznych układów pochodnych o budowie iminoestrów (Rys. 11), iż najbardziej prawdopodobny mechanizm reakcji związku **14a** z wyżej przedstawionymi aminami jest również związany z aminolizą substratu i spontaniczną cyklizacją do mniej stabilnego związku przejściowego, który w wyniku przegrupowania Dimrotha może formułować bardziej stabilny izomer.



Rysunek 11

Produkty **15a - e** zostały oczyszczone na drodze krystalizacji i scharakteryzowane metodami spektralnymi IR, ^1H NMR. W każdym z uzyskanych produktów nastąpiła eliminacja podstawnika metoksyowego w pozycji 4 (brak charakterystycznego sygnału w widmach ^1H NMR przy 4,0 ppm).

W widmach IR związków **15a - e** znajdujemy pasma absorpcji grup NH w zakresie 3134 – 3449 cm^{-1} oraz pasma o dużej intensywności mogące odpowiadać drganiom walencyjnym grup C=O w zakresie 1613 - 1650 cm^{-1} .

Przykładowe widmo ^1H NMR związku **15b** zawiera dwa singlety grup metylowych przy 2,19 i 2,22 ppm, cztery dublety o intensywności jednego protonu każdy przy 6,23, 7,12, 7,56, 7,85 ppm odpowiadające dwóm protonom pierścienia pirydo[2,3-*d*]pirymidyny H-6 i H-7 oraz dwóm protonom pierścienia benzenowego i cztery singlety o intensywności jednego protonu każdy przy 7,49, 8,45, 12,32 i 12,67 ppm odpowiadające pozostałym protonom obu pierścieni H-2 i H-2' oraz protonom dwóch grup NH.

W oparciu o powyższe dane spektralne nie można było w sposób jednoznaczny określić struktury badanego związku. W celu ustalenia zarówno miejsca podstawienia pierścieniem aromatycznym diczłonowego układu pirydo[2,3-*d*]pirymidyny, jak i wskazania odpowiedniej formy tautomerycznej uzyskanych pochodnych, przeprowadzono dodatkowe eksperymenty w postaci analizy NOE oraz widm heterokorelacyjnych HSQC (ang.: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), HMBC (ang.: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), a także widma ROESY (ang.: *Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) (przedstawione na kolejnych stronach jako widma 1, 2, 3 i 4).

Pomiar NOE (Widmo 1), w którym naświetlony proton H7 określa bliskie sąsiedztwo protonu przy azocie N8, oraz sygnał węgla C5 przy wartości 180 ppm (Widmo 3) potwierdzają, iż związek **15b** występuje w formie tautomerycznej pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-onu.

W oparciu o analizę widma HSQC związku **15b**, poszczególne atomy wodoru przyporządkowano sąsiadującym z nimi atomom węgla, które oznaczono w Widmie 2 jako 2xCH₃, C6 – H6, C7 – H7, C2' – H2', C5' – H5' oraz C6' – H6'.

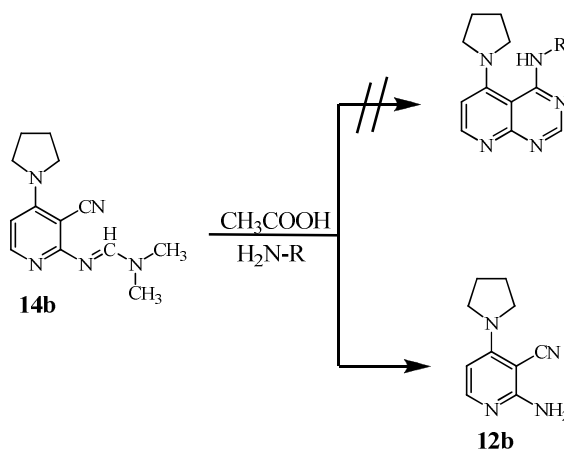
Widmo HMBC (Widmo 3) wykazuje obecność sprzężeń spinowo-spinowych protonów z atomami węgla oddalonych od siebie o trzy lub więcej wiązań, dzięki czemu możemy obserwować wzajemne oddziaływania protonów jąder atomów węgla układów pirydo[2,3-*d*]pirymidyny oraz podstawionego pierścienia benzenowego, połączonych mostkiem aminowym. Węgiel C10 układu pirydo[2,3-*d*]pirymidyny sprzęga się z protonem H4a oraz protonem H6. Atom węgla C9 koreluje z protonami H2 i H7 tego samego układu. Wyraźnie zaznaczona jest również korelacja węgli C2' i C6' z protonem H4a oraz węgla C5 z protonem H7.

Z kolei widmo ROESY (Widmo 4), w którym obrazowane są niewiążące oddziaływania proton - proton "przez przestrzeń", dostarczyło dowodów na bliskie umiejscowienie w przestrzeni protonu przy azocie 4a z protonami przy węglach C2', C6' i C5' pierścienia benzenowego i nie wskazuje ich oddziaływań z protonem H2.

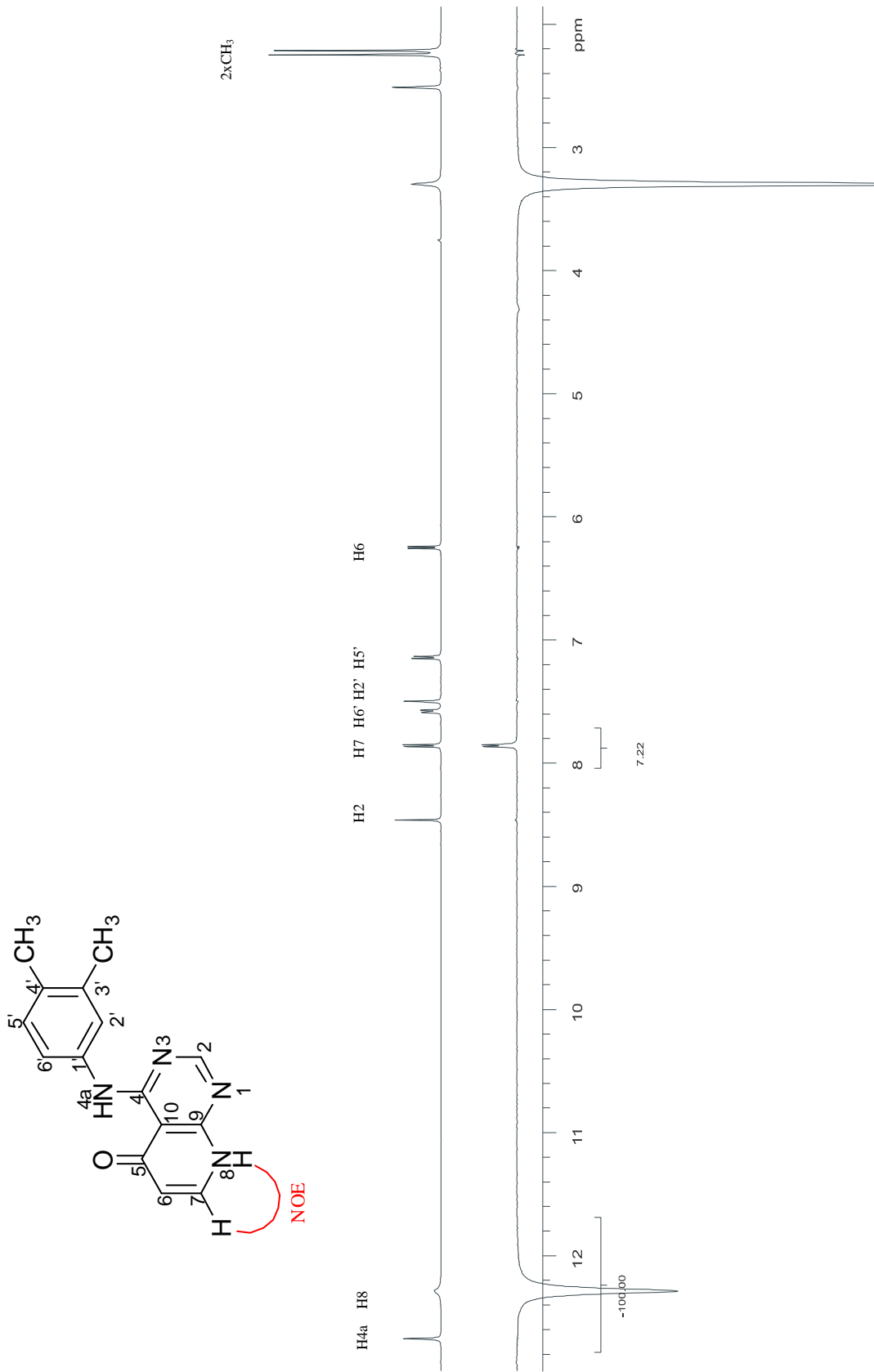
Opisana powyżej analiza widm IR, 1D i 2D NMR potwierdza strukturę otrzymanych związków **15a** – **e** z aminą w pozycji 4 układu pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-onu.

Podjęto próbę ponownego wprowadzenia metoksyłu w pozycję 5 pierścienia pirydo[2,3-*d*]pirymidyny, jednak w wyniku reakcji związku **15a** z jodkiem metylu w środowisku metanolanu potasu metylowaniu uległ azot i uzyskano 4-(4-chlorofenyloamino)-8-metylopirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (**16**), co potwierdzono analizą widma ¹H NMR (Widmo 5) oraz przeprowadzonym pomiarem NOE (Widmo 6), w którym proton H7 wskazuje bliskie sąsiedztwo grupy metylowej.

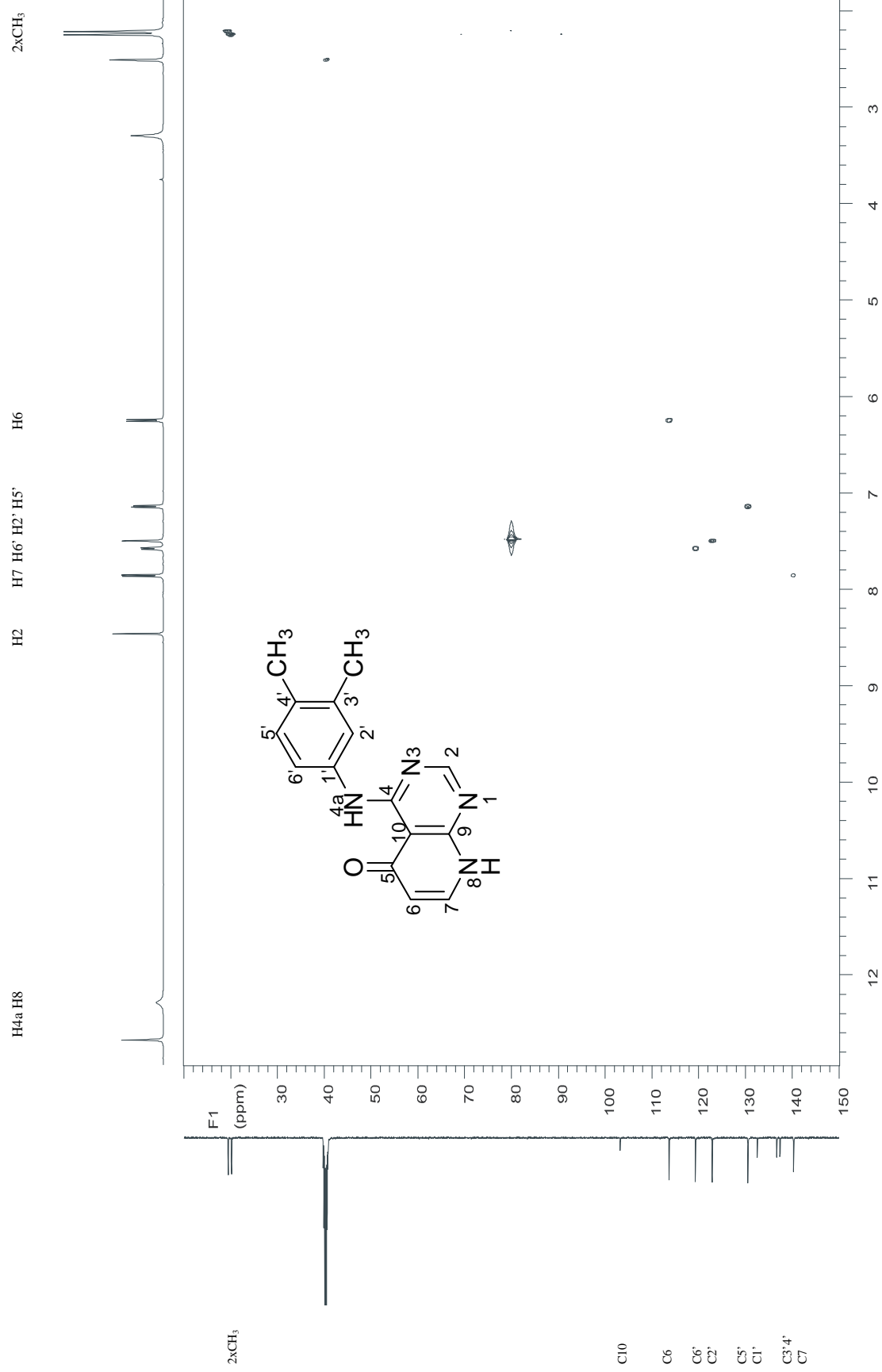
Związek **14b** w analogicznych reakcjach z wyżej wymienionymi aminami nie daje pożądaných produktów. W warunkach reakcji zachodzi rozpad związku, prowadząc do uzyskania 2-amino-4-(pirolidyn-1-yl)nikotynonitrylu (**12b**) (Schemat 17).



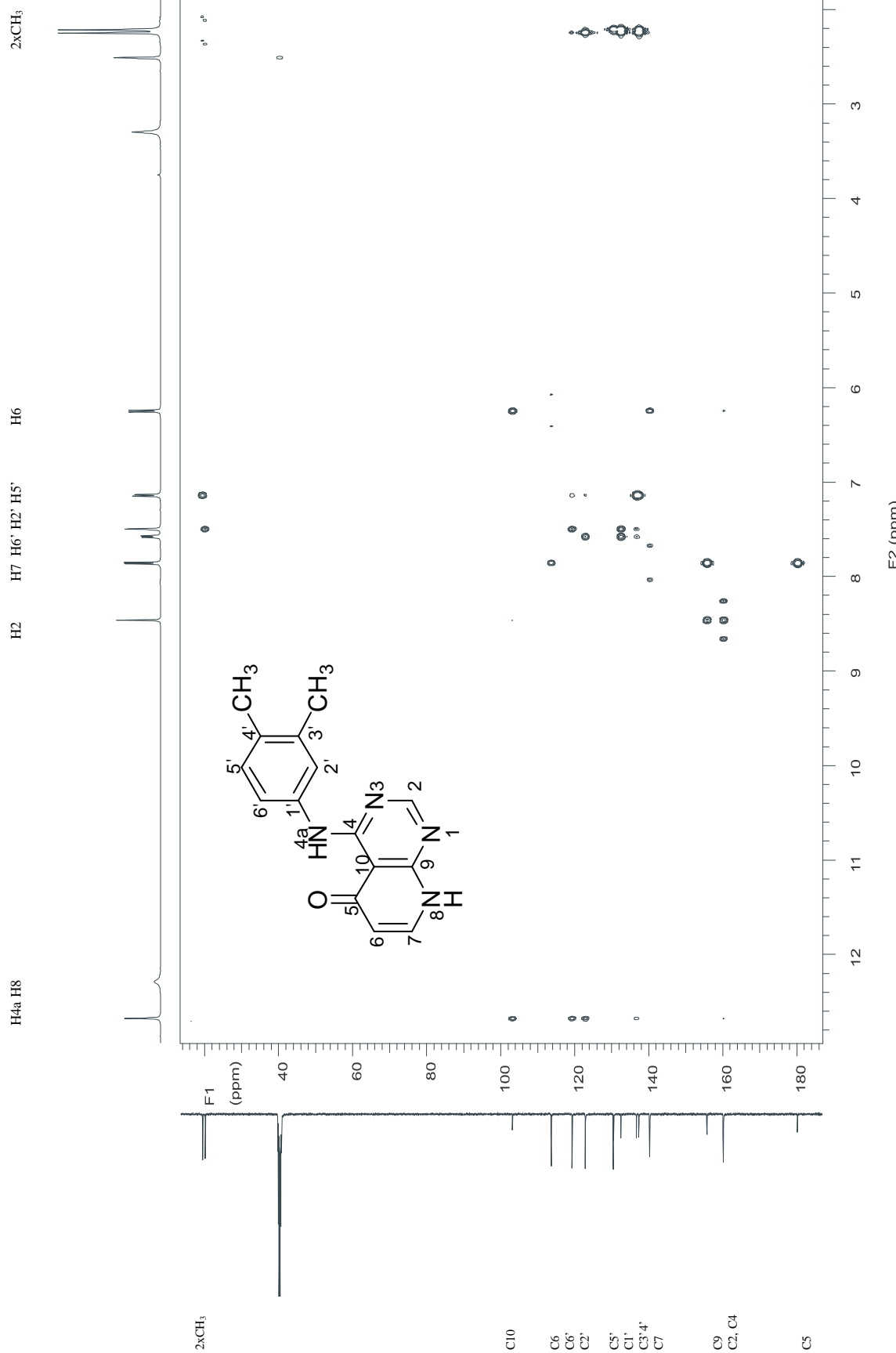
Schemat 17



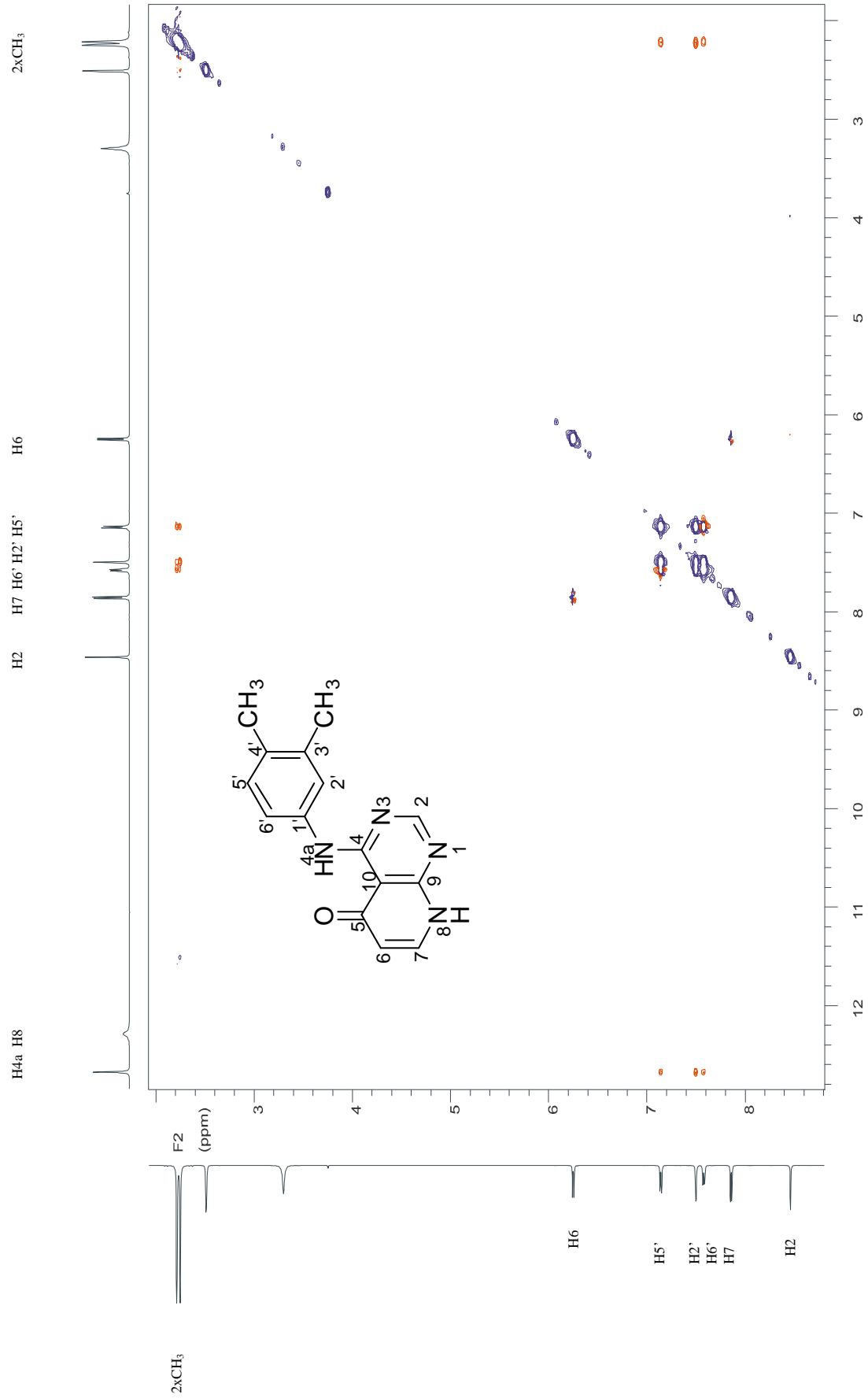
Widmo 1. Widmo NOE związku **15b** (DMSO- d_6 , 500 MHz).



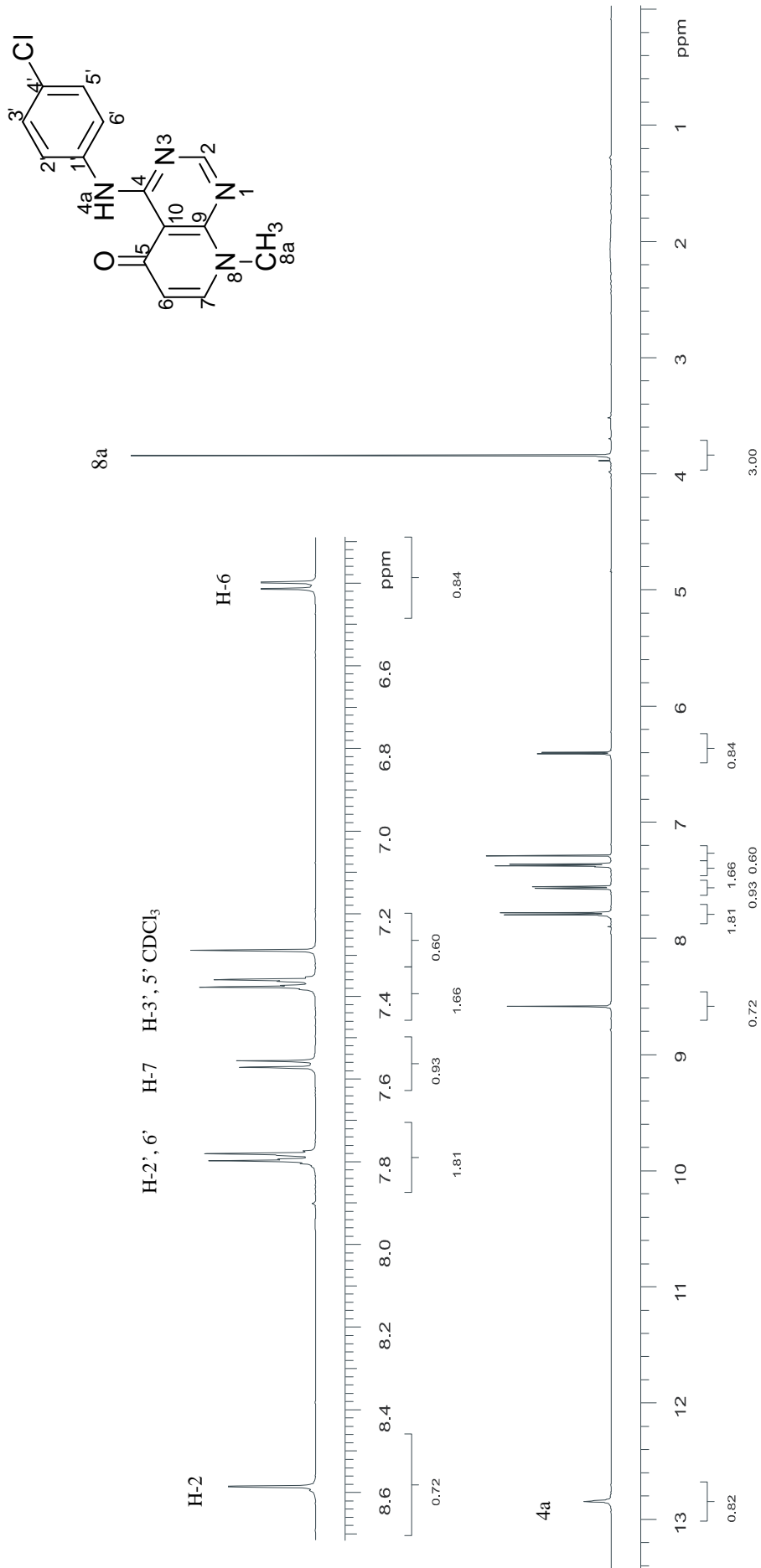
Widmo 2. Widmo HSQC związku **15b** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).



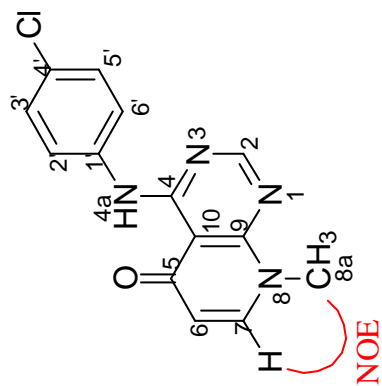
Widmo 3. Widmo HMBC związku **15b** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).



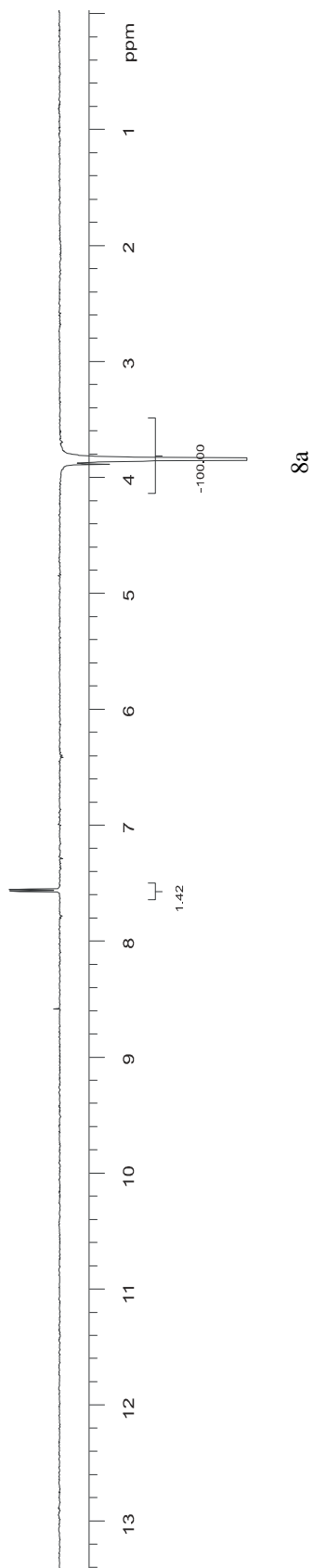
Widmo 4. Widmo ROESY związku **15b** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).



Widmo 5. Widmo ¹H NMR związku **16** (CDCl₃, 500 MHz).



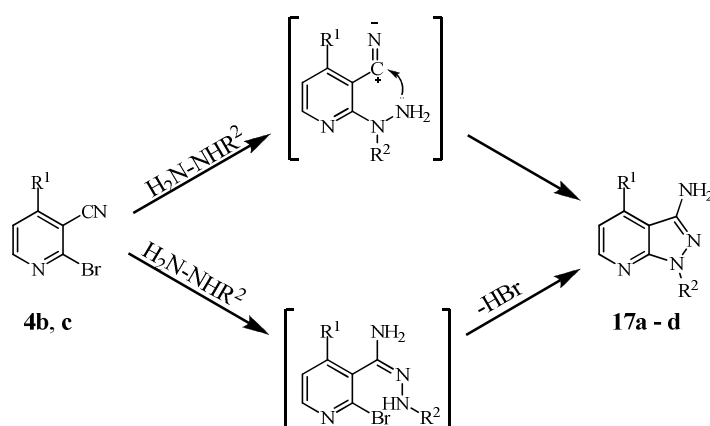
H-7



Widmo 6. Widmo NOE związku **16**.

IV.1.5. Otrzymywanie 4-podstawionych i 1,4-dipodstawionych 3-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]pirydyn 17a - d

Spośród szeregu metod syntezy chemicznej umożliwiających tworzenie pochodnych pirydyny o budowie pirazolo[3,4-*b*]pirydyny, w niniejszej pracy wykorzystano reakcje związków 2-bromo-3-cyjanopochodnych pirydyny **4b, c** z 99% wodzianem hydrazyny i metylohydrazyną.¹⁰² Reakcje przeprowadzano we wrzącym etanolu od 1,5 do 10 h, a czyste produkty **17a - d** uzyskano poprzez krystalizację (Schemat 18). Cyklokondensacja może przebiegać na dwóch różnych drogach: początkowa nukleofilowa debrominacja, następnie wewnątrzcząsteczkowy atak hydrazyny na dodatnio naładowany węgiel grupy cyjanowej lub początkowe przyłączenie nukleofilowe hydrazyny do grupy -CN z utworzeniem pochodnej amidrazonu, następnie wewnątrzcząsteczkowe wyparcie bromu.¹⁰³



Związek	17a	17b	17c	17d
R ¹				
R ²	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃

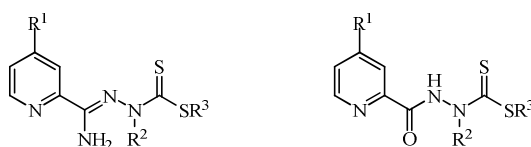
Schemat 18

Na podstawie analizy widm IR i ¹H NMR potwierdzono struktury związków **17a - d**. Dla przykładu, cechą charakterystyczną widma IR związku **17a** jest brak pasma absorpcji odpowiadającego drganiom rozciągającym wiązania CN przy 2215 cm⁻¹, natomiast występują pasma odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań NH₂ i NH w zakresie 3174 – 3406 cm⁻¹. W widmie ¹H NMR tego związku obserwujemy dwa singlety odpowiadające odpowiednio dwóm protonom egzocyklicznej grupy NH₂ przy 4,70 ppm oraz protonowi przy endocyklicznym azocie NH przy wartości 11,83 ppm. Masę cząsteczkową badanego związku

potwierdza obecność w widmie MS (CI) pikę podstawowego $[M + 1]$ przy $m/z = 204,1$ o intensywności 100%.

IV.2. Synteza i reaktywność 4-podstawionych pochodnych kwasu pikolinowego

Omówione w poprzednich rozdziałach reakcje dotyczyły otrzymywania pochodnych kwasu nikotynowego oraz ich przemian prowadzących do uzyskania produktów o zróżnicowanej – jedno lub wielocząłkowej strukturze. Reakcje zaprezentowane w tym rozdziale dotyczą pochodnych kwasu pikolinowego, a w szczególności kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego i kwasu *N'*-(pikolinoilo)ditiokarbazowego (Rys. 12), które wykazują podobieństwo strukturalne do klasycznych tuberkulostatyków i we wstępnych badaniach niektóre typy związków okazały się aktywne.



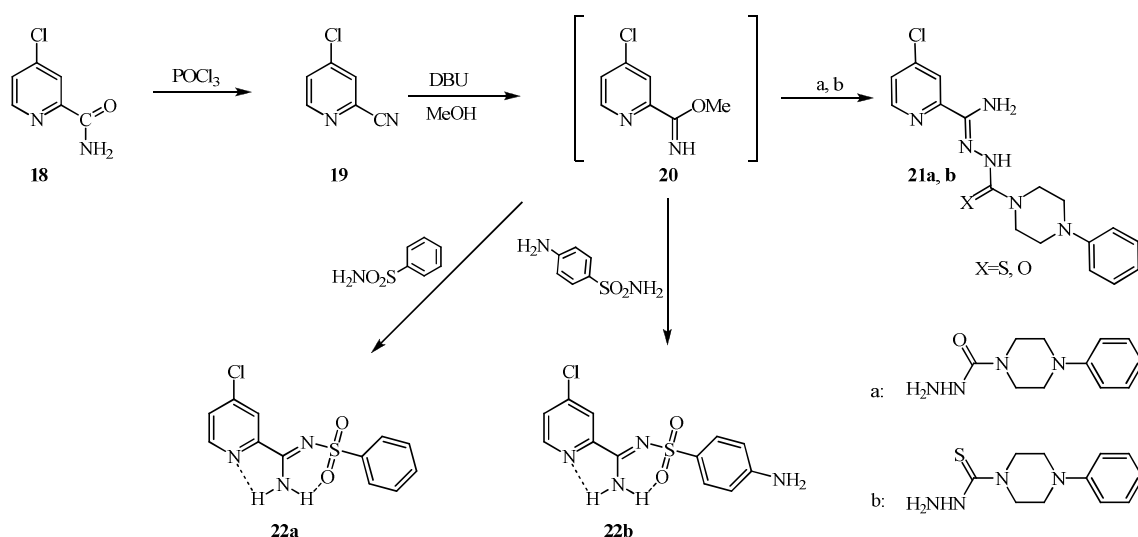
Rysunek 12

IV.2.1. Synteza i reaktywność (4-chloropirydyn-2-ylo)- pochodnych¹⁰⁴

Zgodnie z przyjętym założeniem, iż związki charakteryzujące się budową płaską, dzięki sprzężeniu układu wiązań pojedynczych i podwójnych oraz możliwości istnienia w postaci odpowiedniego tautomeru i powstawaniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, mogą wykazywać zwiększoną aktywność tuberkulostatyczną (Cel pracy), w poniższym podrozdziale przedstawiono przeprowadzone syntezy nowych pochodnych pirydyny podstawionych w pozycji drugiej pierścienia głównie fragmentami strukturalnymi o budowie amidrazonów, które mogą utrzymywać planarność fragmentu cząsteczki. Zbadano również ich zdolność do tworzenia układów cyklicznych, takich jak 1,3,4-tiadiazolo-2-tiony oraz 1,2,4-triazole.

IV.2.1.1. Otrzymywanie i reaktywność metyloiminoestru kwasu 4-chloropikolinowego (20)

W celu otrzymania grupy nowych pochodnych kwasu 4-chloropirydyno-2-karboksyłowego o budowie amidrazonów **21a, b** i amidyn **22a, b**, w pierwszej kolejności przeprowadzono syntezę 4-chloropirydyno-2-karbonitrylu (**19**)¹⁰⁵ z amidu kwasu 4-chloropikolinowego (**18**) przy użyciu POCl₃ w bezwodnym dioksanie. Stosując ogólnie przyjętą metodę syntezy metyloiminoestrów z nityrli wobec alkoholanów^{106, 107}, w 4-chloropochodnych pirydyny, obok powstania ugrupowania iminoestrowego, następuje (niepożądana) wymiana chloru na ugrupowanie alkoksyłowe. Chlor zostaje zachowany, gdy iminoestry powstają w sposób nieopisany wcześniej w literaturze, w metanolu wobec katalitycznej ilości 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enu (DBU). Utworzony *in situ* metyloiminoester kwasu 4-chloropikolinowego (**20**) w reakcji z 4-fenylpiperazyno-1-karbotiohydrazidem i 4-fenylpiperazyno-1-karbohydrazidem prowadzi do uzyskania odpowiednio *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)metyleno]-4-fenylpiperazyno-1-karbotiohydrazidu (**21a**) oraz *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)metyleno]-4-fenylpiperazyno-1-karbohydrazidu (**21b**). Utworzony w analogiczny sposób iminoester **20** w reakcji z benzenosulfonamidem i *p*-aminobenzenosulfonamidem daje odpowiednie amidyny **22a, 22b** (Schemat 19).

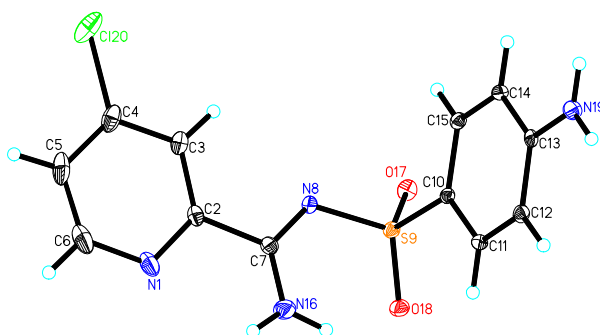


Schemat 19

Struktury otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz na podstawie analizy widm IR i ^1H NMR.

W widmach ^1H NMR związków **21a** i **21b** występują poszerzone singlety o intensywności dwóch protonów każdy odpowiednio przy 6,28 i 6,58 ppm odpowiadające protonom grupy aminowej oraz singlety o intensywności jednego protonu przy 8,29 i 8,92 ppm dla NH, co odzwierciedla wskazaną na Schemacie 19 formę tautomeryczną tych związków.

Widma ^1H NMR związków **22a** i **22b** sugerują obecność układu $\text{HN}=\text{C}(\text{Ar})\text{-NH-SO}_2\text{-Ph}$, ze względu na występowanie dwóch poszerzonych singletów o intensywności jednego protonu każdy przy 8,29 i 8,92 ppm dla związku **22a** oraz 8,12 i 8,88 ppm dla związku **22b**, jednak analiza rentgenograficzna monokryształu związku **22b** (Rys. 13) jednoznacznie potwierdza strukturę tautomeryczną przedstawioną na Schemacie 19. Obecność dwóch pasm dla grupy NH_2 może tłumaczyć występowanie różnocennych, wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych.



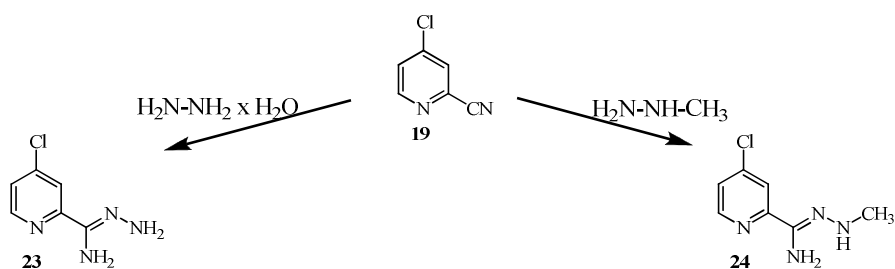
Rysunek 13. Widok części niezależnej komórki elementarnej związku **22b** z podaną numeracją atomów (elipsoidy drgań termicznych na poziomie 50%; atomy wodoru zaznaczono jako kulki).

IV.2.1.2. Reakcje 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) z disiarczkiem węgla i izotiocyjanianami

Przystępując do syntezy związków opartych na strukturze amidrazonu połączonego z pierścieniem aromatycznym, zaplanowano reakcje, których produkty mogłyby wykazać planarność fragmentu cząsteczki, jak również obecność drugiego układu heterocyklicznego, którego wprowadzenie na innej drodze jest utrudnione.

Substratami dla reakcji były 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) oraz *N'*-metylo-4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**24**), uzyskane w bezpośredniej reakcji 4-chloropirydyno-2-

karbonitrylu (**19**) odpowiednio z 99% wodzianem hydrazyny i metylohydrazyną⁴⁴ (Schemat 20).



Schemat 20

4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) poddano reakcjom z disiarczkiem węgla przy zmiennych warunkach.¹⁰⁸ Jak się spodziewano, w reakcji związku **23** z CS₂ w metanolu powstaje 5-(4-chloropirydyn-2-ylo)-1,3,4-tiadiazolo-2(3*H*)-tion (**25**), którego struktura wskazuje, iż może on występować w postaci dwóch form tautomerycznych **25a** i **25b**. Wartość przesunięcia chemicznego dla wymiennego protonu wynosząca δ 14,96 ppm sugeruje na jego połączenie z azotem. Widmo IR (KBr) wykazuje silne pasma absorpcji przy 3088 cm⁻¹ (NH) i 1235 cm⁻¹, które może odpowiadać wiązaniu C=S. Przeprowadzono również obliczenia kwantowo-chemiczne dla izolowanych molekuł, w celu porównania energii całkowitych obu tautomerów. Obliczenia te prowadzono *ab initio* metodami: Hartree-Focka, DFT oraz MP2 z użyciem bazy 6,31-G**, wykorzystując do tych celów program SPARTAN 08, wersja 1.1.1 firmy Wavefunction Inc., USA. Wyniki obliczeń uzyskanych po wcześniej dokonanej optymalizacji struktur przedstawiono w Tabeli 3.

HF/6,31G**			
Związek	E	ΔE	μ
25a	-1685,23343	0	5,43
25b	-1685,21170	13,6357	4,41
DFT/(B3LYP)/6,31G**			
Związek	E	ΔE	μ
25a	-1689,96760	0	4,19
25b	-1689,94443	14,54	4,01
MP2/6,31G**			
Związek	E	ΔE	μ
25a	-1687,00775	0	4,17
25b	-1686,99096	5,11	4,52

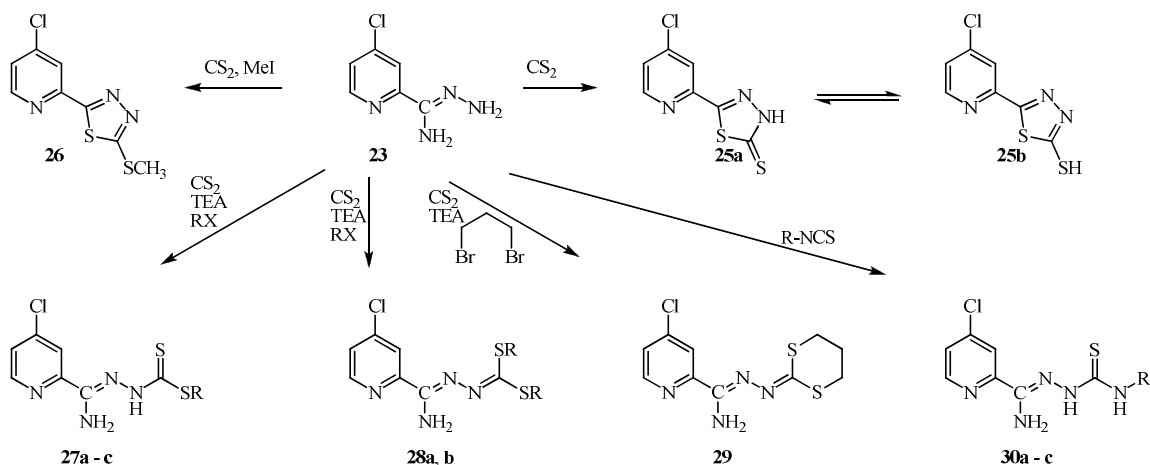
Tabela 3. Energia obliczona (E, hartrees), energia względna (ΔE , kcal/mol) i moment dipolowy (μ , Debye) dla form tautomerycznych **25a** i **25b**.

Rezultatem przeprowadzonych trzema metodami badań jest potwierdzenie, iż forma tionu **25a** jest bardziej stabilna w zakresie o 5,11 – 14,54 kcal/mol niż forma tiolu **25b**.

Związek **23** poddano następnie reakcji z CS₂ i jodkiem metylu, w wyniku czego następuje stabilizacja układu, a produktem reakcji jest 2-(4-chloropirydyn-2-ylo)-5-(metylotio)-1,3,4-tiadiazol (**26**). W analogicznej reakcji przy zmianie środowiska na alkaliczne przez dodanie 1 ekwiwalentu trietyloaminy¹⁰⁹ powstaje, w zależności od użytego środka alkilującego (odpowiednio jodku metylu, jodku butylu i chlorku benzylu), liniowy monoester kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego **27a - c** (Schemat 21). Na podstawie chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono, że surowe produkty zawierały niewielkie ilości *S,S'*-diestrów przy niewykorzystanym jeszcze substracie, które usunięto przez krystalizację z alkoholu.

Monoestry posiadają aktywny wodór związany z atomem azotu. Oczekiwano zatem, że w obecności zasady będą one reagowały z odczynnikami elektrofilowymi, a miejscem ataku będzie bardziej nukleofilowy atom siarki. W celu uzyskania diestru metylowego i benzylowego kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (odpowiednio **28a** i **28b**), przeprowadzono reakcje związku **23** z dwukrotnym nadmiarem jodku metylu i chlorku benzylu w nadmiarze trietyloaminy. Wykorzystując natomiast równomolową ilość 1,3-dibromopropanu jako środka alkilującego, uzyskano cykliczny ditioester **29** o strukturze ditianu (Schemat 21).

W kolejnym etapie pracy podjęto próbę syntezy tiosemikarbazydów, z uwagi na podobieństwo strukturalne do monoestrów i możliwość występowania bocznego fragmentu układu w postaci planarnej. W celu wprowadzenia przy azocie podstawnika o różnym charakterze chemicznym, przeprowadzono reakcje związku **23** z izotiocyjanianem metylu, allilu i *p*-Cl-fenylu, uzyskując z wydajnością 42 - 82% pochodne tiosemikarbazydów **30a - c** (Schemat 21).



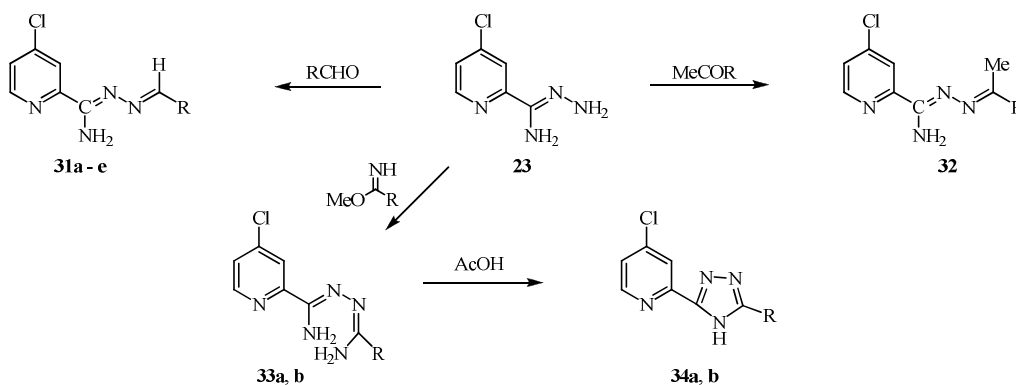
Związek	27a	27b	27c	28a	28b	30a	30b	30c
R	Me	Bu	Bn	Me	Bn	Me	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	<i>p</i> -Cl-Ph

Schemat 21

IV.2.1.3. Reakcje 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) z aldehydami, ketonami i iminoestrami

W kolejnym etapie prac eksperymentalnych przeprowadzono reakcje związku **23** z aldehydami, ketonami oraz iminoestrami, mając na uwadze modyfikację łańcucha w pozycji 2 pierścienia pirydyny. 4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) w reakcji z 4-chlorobenzaldehydem, 5-nitrofuran-2-ylo-karbaldehydem, 5-nitrotiofen-2-ylo-karbaldehydem, 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehydem, 4-(dimetyloamino)benzaldehydem i 1-(tiofen-2-ylo)etanonem daje odpowiednio produkty kondensacji **31a - e** oraz **32**. W przypadku związku **32** reakcję przeprowadzono w obecności katalitycznej ilości kwasu octowego. Amidrazon **23** w reakcjach z iminoestrami, przebiegających w temperaturze pokojowej, prowadzi do uzyskania pochodnych **33a** i **33b**, które podczas ogrzewania w kwasie octowym ulegają wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do 1,2,4-triazoli **34a** i **34b** (Schemat 22).

Struktury otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz na podstawie analizy widm IR i ^1H NMR.



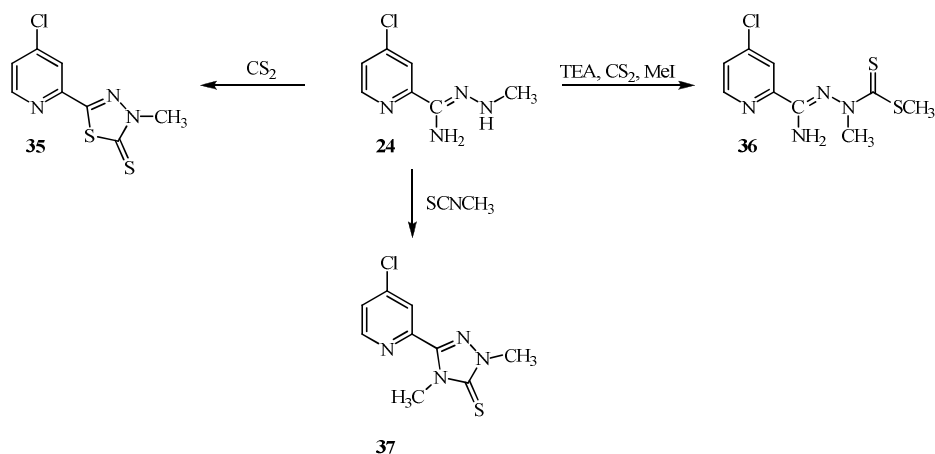
Związek	31a	31b	31c	31d	31e	32	33a, 34a	33b, 34b
R								

Schemat 22

IV.2.1.4. Reakcje *N'*-metylo-4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (24) z disiarczkiem węgla i izotiocyanianem metylu

W celu analizy wpływu protonu przy azocie *N'* amidrazonu **23** na aktywność głównie tuberkulostatyczną, przeprowadzono syntezę związków, w których proton zastąpiony został grupą metylową. Substratem do tych syntez był *N'*-metylo-4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**24**) (Schemat 20). Rezultatem przeprowadzonych analogicznie jak dla związku **23** syntez było otrzymanie 3-metylo-5-(4-chloropirydyn-2-ylo)-3*H*-1,3,4-tiadiazolo-2-tionu (**35**) w reakcji z CS₂ i estru metylowego kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]-*N*-metyloditiokarbazowego (**36**) w reakcji z CS₂ i MeI w środowisku trietyloaminy. Przeprowadzając reakcję z izotiocyanianem metylu, zauważono różnicę w reaktywności amidrazonu **23** i metyloamidrazonu **24**. Utrzymując takie same warunki przebiegu syntezy, produktem reakcji izotiocyanianu metylu z pochodną **23** był 1-[amino-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]-4-metylotiosemikarbazyd (**30a**) (Schemat 21), natomiast w przypadku *N'*-metyloamidrazonu **24** otrzymano wyłącznie produkt cykliczny 2,4-dimetylo-5-(4-chloropirydyn-2-ylo)-2,4-dihydro-1,2,4-triazolo-3-tion (**37**) (Schemat 23).

W widmie ¹H NMR związku **37** występują dwa singlety o intensywności 3 protonów każdy przy 3,91 i 4,06 ppm odpowiadające dwóm grupom CH₃, brak natomiast pasm od grup NH₂ i NH.



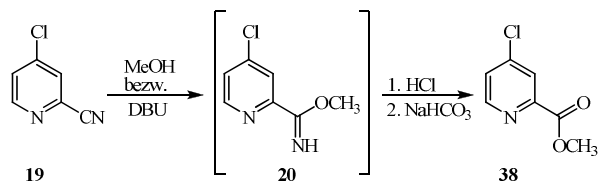
Schemat 23

IV.2.2. Otrzymywanie i reaktywność pochodnych kwasu *N'*-[(4-podstawionego)pikolinoilo]ditiokarbazowego

W poniższym podrozdziale opisano przeprowadzone syntezy nowych pochodnych pirydyny podstawionych w pozycji drugiej pierścienia głównie fragmentami strukturalnymi o budowie hydrazydów oraz ich zdolność do tworzenia układu 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu i 1,2,4-triazolotionu.

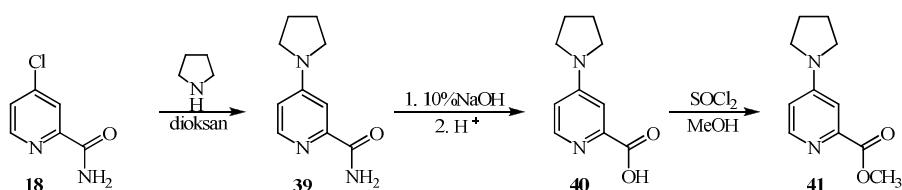
IV.2.2.1. Synteza hydrazydów i *N'*-metylohydrazydów kwasu 4-chloro- i 4-(pirolidyn-1-yl)pikolinowego 42 – 45

Utworzony *in situ* iminoester **20** po zakwaszeniu kwasem solnym, a następnie zalkalizowaniu wodorowęglanem sodu, prowadzi do otrzymania estru metylowego kwasu 4-chloropikolinowego (**38**)¹¹⁰ (Schemat 24).



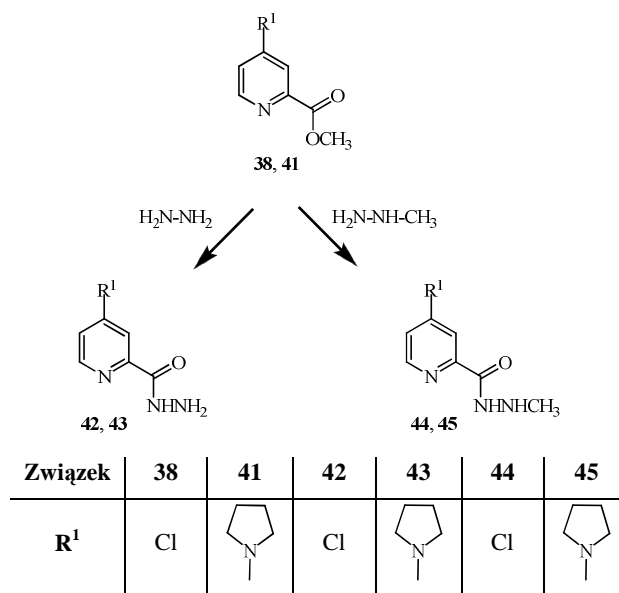
Schemat 24

Rozpoczynając od związku **18**, wykonano ciąg reakcji prowadzących do uzyskania estru metylowego kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**41**). Amid kwasu 4-chloropikolinowego (**18**) przeprowadzono w amid kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**39**), prowadząc reakcję w dioksanie, w obecności nadmiaru pirolidyny. Hydrolyza zasadowa związku **39** doprowadziła do otrzymania kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**40**)¹¹¹, którego estryfikacja (według metody opisanej w piśmiennictwie 112) dała pożądany produkt **41** (Schemat 25).



Schemat 25

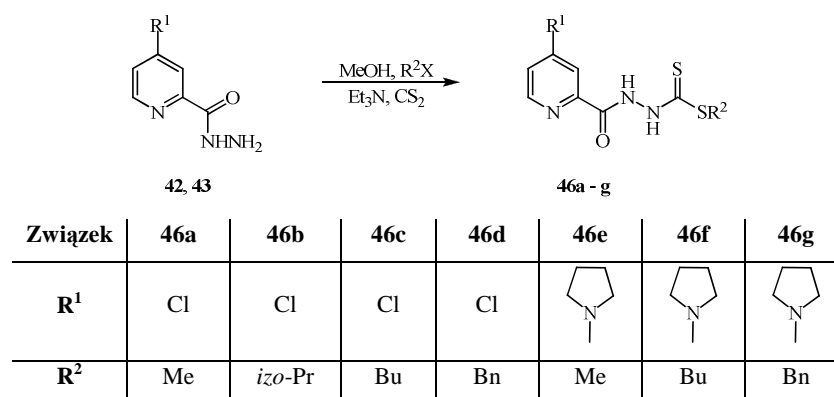
Związki **38** i **41** w reakcji z 99% wodzianem hydrazyny w metanolu utworzyły odpowiednio hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) i 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**43**), natomiast z *N*-metylohydrazyną odpowiednio *N'*-metylohydrazydy tych kwasów **44** i **45** (Schemat 26).



Schemat 26

IV.2.2.2. Otrzymywanie *S*-estrów i *S,S'*-diestrów kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)- i *N'*-[4-(pirolidyn-1-yl)opikolinoilo]ditiokarbazowego 46a – 48d

Hydrazydy **42** i **43** zostały wykorzystane do otrzymania estrów kwasu ditiokarbazowego. We wszystkich przypadkach reakcje prowadzono w metanolu, stosując disiarczki węgla i TEA. W pierwszej kolejności wykonano syntezę monoestrów z podstawnikami o krótkim łańcuchu (estry metylowe **46a**, **46e**), wykorzystując jako środek alkilujący jodek metylu. Następnie otrzymano estry z podstawnikami o średniej długości łańcucha (butylowe **46c**, **46f**), używając do alkilowania jodku butylu. Ponadto przeprowadzono syntezę estru z łańcuchem rozgałęzionym, w którym jako środek alkilujący zastosowano jodek izopropylu **46b** oraz syntezę estrów z alkilo-aromatycznym podstawnikiem benzyłowym **46d**, **46g**, gdzie środkiem alkilującym był chlorek benzyłu. Reakcje zachodziły w temperaturze pokojowej, w czasie od 5 minut do 24 godzin. Z uwagi na możliwość powstania diestrów, poza pożądanymi monoestrami, reakcje kontrolowano chromatografią cienkowarstwową TLC i prowadzono ją do momentu zanim zaczął powstawać produkt dipodstawienia. Produkty oczyszczono na drodze krystalizacji z metanolu lub mieszaniny metanolu z wodą (Schemat 27).

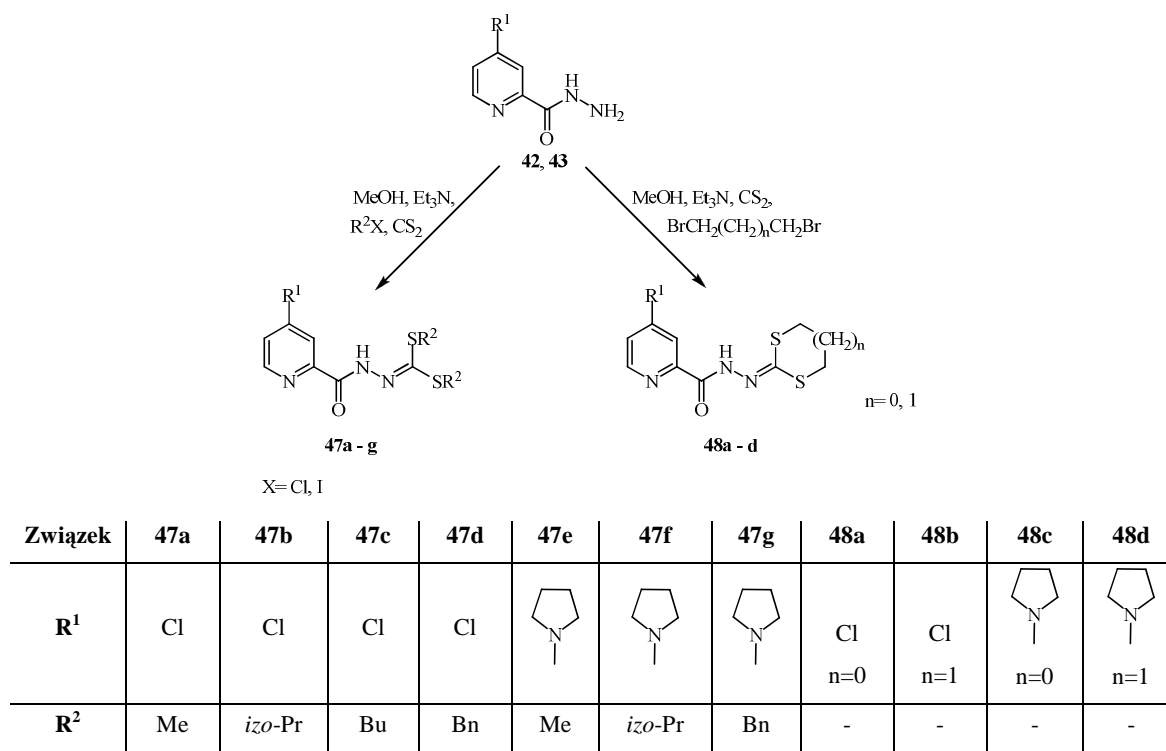


Schemat 27

W dalszej kolejności hydrazydy **42** i **43** zostały wykorzystane do syntezy symetrycznych *S,S'*-diestrów kwasów *N'*-(4-chloropikolinoilo)- i *N'*-[4-(pirolidyn-1-yl)opikolinoilo]ditiokarbazowych **47a - g** (Schemat 28). Syntezy prowadzono również w metanolu w obecności TEA i CS₂. Odpowiednie halogenopochodne zostały użyte w stosunku 2:1 do wyjściowych hydrazydów. Otrzymane surowe produkty oczyszczono na drodze

krystalizacji z alkoholu, natomiast dla związku **47b** przeprowadzono chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina aceton - toluen 1:1.

Przeprowadzono również syntezę cyklicznych *S,S'*-diestrów, otrzymując pierścienie 1,3-ditiolanów **48a**, **48c** i 1,3-ditianów **48b**, **48d** (Schemat 28). Reakcje prowadzono w etanolu w obecności TEA, disiarczku węgla i odpowiednio 1,2-dibromoetanu oraz 1,3-dibromopropanu w stosunku molowym 1:1 do substratów. Związki **48a**, **c**, **d** oczyszczono przez krystalizację z alkoholu, natomiast **48b** na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina chloroform – octan etylu w stosunku objętościowym 5:1.



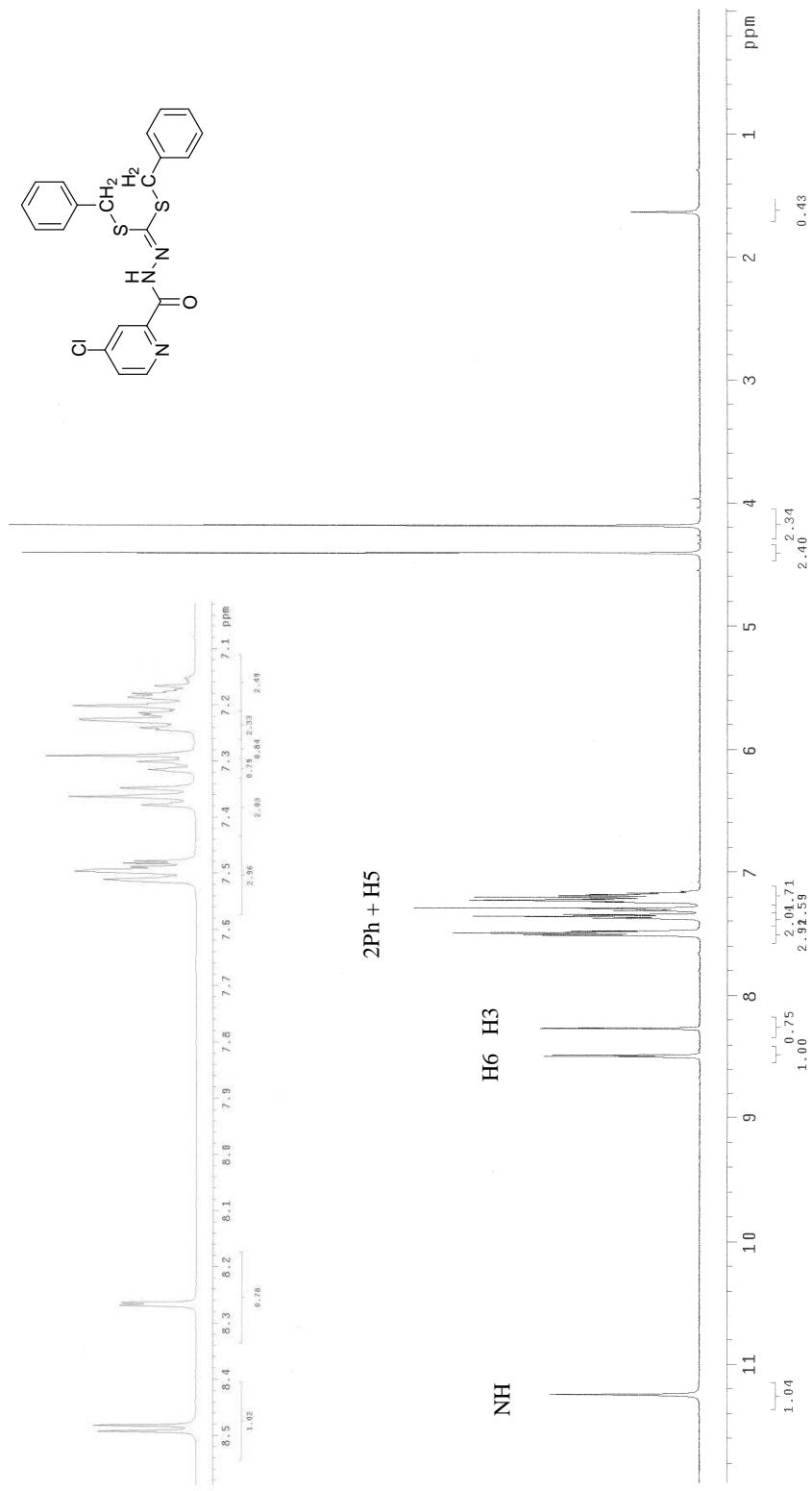
Schemat 28

Przykładowa analiza widm IR oraz ¹H NMR dla *S,S'*-diestru benzyłowego kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**47d**) potwierdza strukturę związku.

W widmie ¹H NMR związku **47d** (Widmo 7) możemy wyróżnić trzy grupy linii rezonansowych występujących w zakresach: alifatycznym (4,18 – 4,41 ppm), aromatycznym (7,15 – 8,48 ppm) oraz singlet o intensywności jednego protonu przy 11,25 ppm odpowiadający grupie N-H. W zakresie alifatycznym widma znajdujemy dwa singlety o

intensywności dwóch protonów każdy przy 4,18 oraz 4,41 ppm, które odpowiadają protonom dwóch nierównocennych magnetycznie grup CH₂, natomiast w zakresie aromatycznym wyróżniamy multiplet 11 protonów dwóch pierścieni benzenowych oraz jednego protonu H-5 pierścienia pirydynowego w zakresie 7,15 – 7,51 ppm, dublet o stałej sprzężenia $J = 2,4$ Hz przy 8,26 ppm protonu H-3 i o stałej sprzężenia $J = 5,4$ Hz przy 8,48 ppm protonu H-6 pierścienia pirydynowego. Widmo IR tego związku zawiera pasma absorpcji przy następujących wartościach: 3281 i 1506 cm⁻¹ dla drgań odpowiednio walencyjnych i deformacyjnych grupy NH oraz 1693 cm⁻¹ charakteryzujące drgania walencyjne grupy karbonylowej.

CH₂ CH₂



2Ph + H5

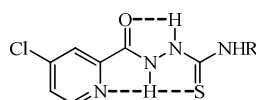
H6 H3

NH

Widmo 7. Widmo ¹H NMR związku 47d (CDCl₃, 500 MHz).

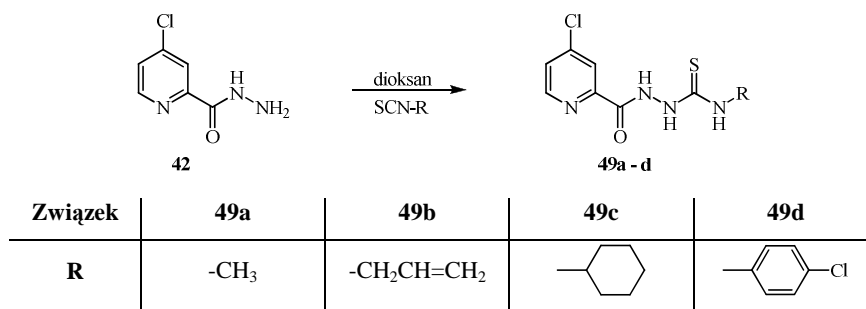
IV.2.2.3. Otrzymywanie 1-(4-chloropikolinoilo)-4-podstawionych-tiosemikarbazydów 49a – d

Kierując się przesłankami, iż płaska budowa cząsteczki wpływa na wzrost aktywności tuberkulostatycznej, zaplanowano również syntezy 1-(4-chloropikolinoilo)-4-podstawionych-tiosemikarbazydów **49a - d**, których struktura pozwala na tworzenie wiązań wodorowych utrzymujących płaskość fragmentu związku (Rys. 14).



Rysunek 14

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) poddano działaniu izotiocyanianów, stosując odpowiednio: izotiocyanian metylu, allilu, cykloheksylu i *p*-chlorofenyłu. Po ogrzaniu mieszanin reakcyjnych do temperatury wrzenia rozpuszczalnika roztwory ochłodzono i pozostawiono w temperaturze otoczenia od 16 do 24 h. Otrzymane osady tiosemikarbazydów oczyszczono przez krystalizację z metanolu. Czyste produkty **49a - d** uzyskano z wydajnościami od 57 do 73% (Schemat 29).

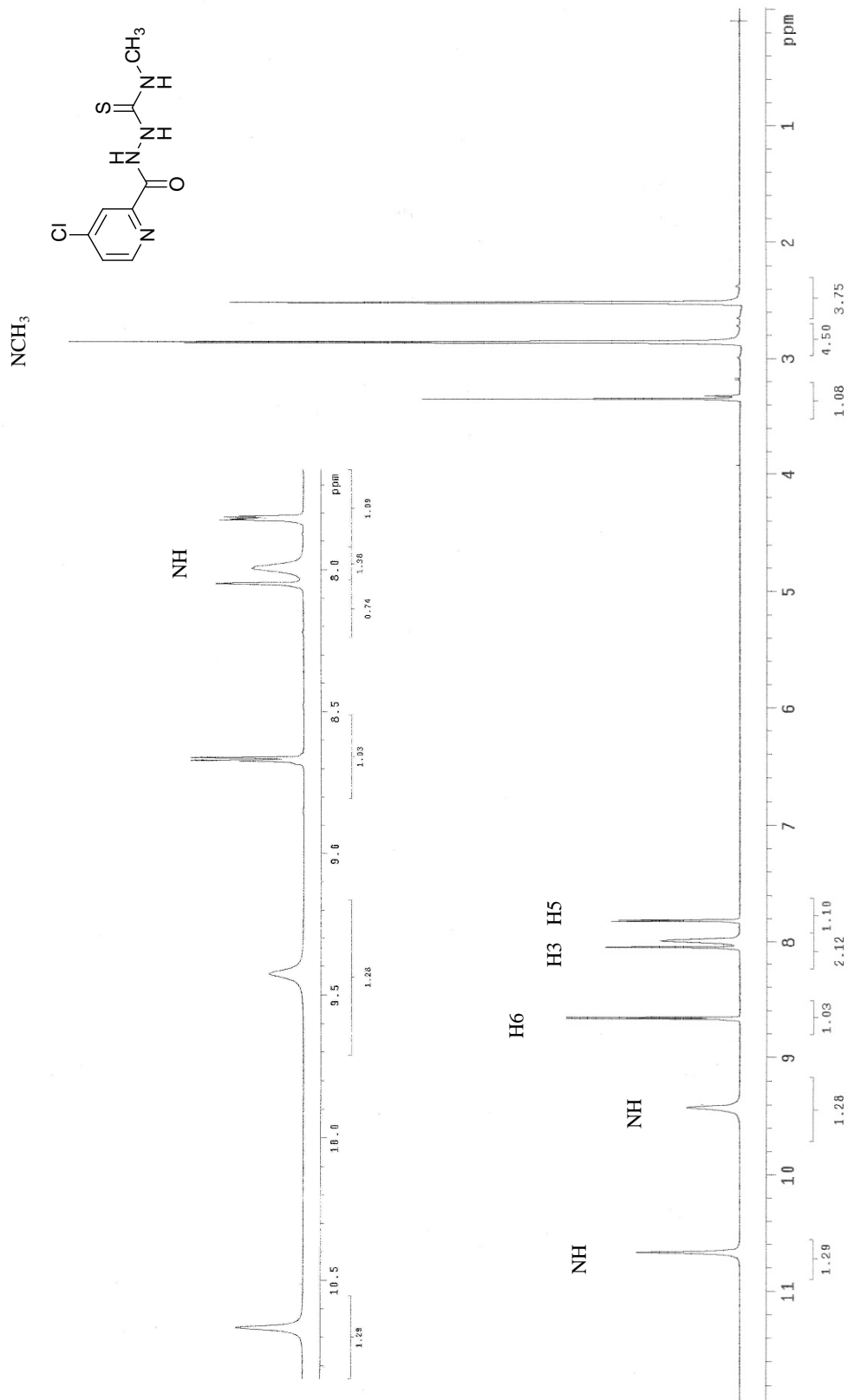


Schemat 29

Przykładowa analiza widm IR oraz ¹H NMR dla 1-(4-chloropikolinoilo)-4-metylotiosemikarbazydu (**49a**) odzwierciedla strukturę związku.

W widmie ¹H NMR związku **49a** (Widmo 8) zidentyfikowane zostały następujące sygnały: dublet o intensywności trzech protonów przy 2,86 ppm odpowiadający protonom grupy NCH₃, dublet dubletów przy 8,71 ppm o stałych sprzężenia $J_1 = 1,9$ Hz oraz $J_2 = 5,3$ Hz protonu H-5 pierścienia pirydyny, singlet protonu NH przy 7,99 ppm, dublet protonu H-3

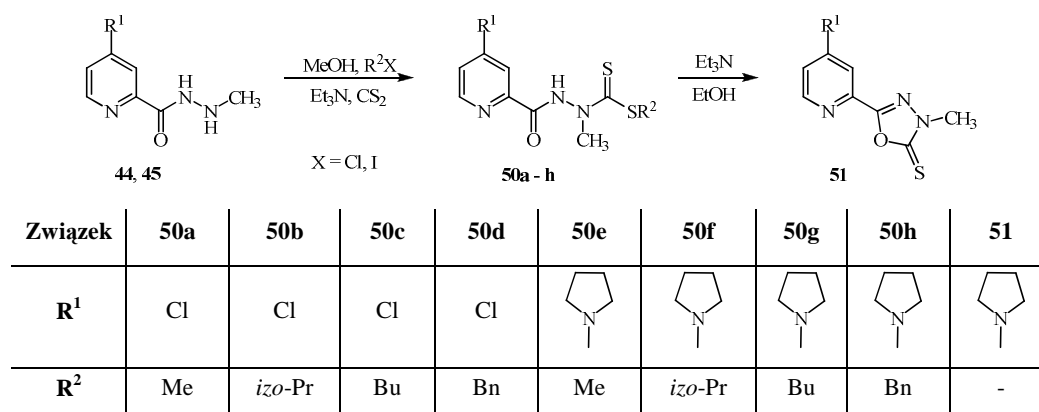
o stałej sprzężenia $J = 1,9$ Hz przy 8,05 ppm oraz dublet protonu H-6 pierścienia pirydynowego o stałej sprzężenia $J = 5,3$ Hz przy 8,67 ppm, a także dwa singlety o intensywności jednego protonu każdy przy 9,42 ppm i 10,66 ppm pochodzące od dwóch grup NH. Analiza widma IR wykazała grupy funkcyjne przy następujących wartościach liczb falowych: 3364 cm^{-1} , 3330 cm^{-1} , 3275 cm^{-1} odpowiadających drganiom walencyjnym, natomiast przy 1553 cm^{-1} i 1490 cm^{-1} deformacyjnym grupy NH i przy 1680 cm^{-1} dla drgań rozciągających wiązania C=O.



Widmo 8. Widmo ¹H NMR związku **49a** (DMSO-d₆, 500 MHz).

IV.2.2.4. Synteza i reaktywność *S*-estrów kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)- i *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]-*N*-metyloditiokarbazowego

W dalszej części pracy przeprowadzono syntezę analogów otrzymanych wcześniej monoestrów kwasów ditiokarbazowych, w których proton przy atomie azotu *N* zastąpiony został podstawnikiem metylowym. Jako substraty zastosowano *N'*-metylohydryd kwasu 4-chloropikolinowego (**44**) i *N'*-metylohydryd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**45**), które poddano działaniu TEA, disiarczku węgla oraz odpowiedniej halogenopochodnej w metanolu w stosunku molowym 1:1,5. Otrzymano monoestry metylowe, izopropylowe, butylowe i benzytowe **50a - h**. Uzyskany *S*-ester metylowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]-*N*-metyloditiokarbazowego (**50e**) poddano czterogodzinnemu ogrzewaniu w etanolu w obecności trietyloaminy, co doprowadziło do powstania związku o budowie 1,3,4-oksadiazolu **51** (Schemat 30).

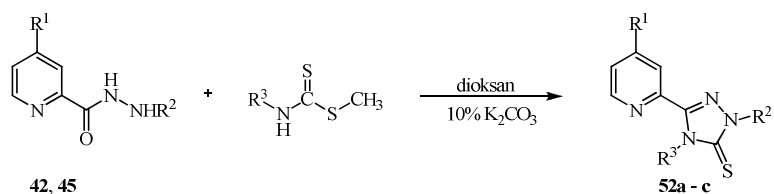


Schemat 30

IV.2.2.5. Otrzymywanie i struktura pochodnych 1,2,4-triazolotionów **52a - c**

Zmierzając do uzyskania pochodnych o budowie 1,2,4-triazolotionów z aminą cykliczną w pozycji 4, w toku syntez opracowano metodę ich otrzymywania. Do syntezy wykorzystano ponownie hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) i *N'*-metylohydryd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**45**) oraz piperidyn-1-ylo-ditiokarbaminian metylu i morfolin-4-ylo-ditiokarbaminian metylu. Stwierdzono, iż do całkowitego przebiegu reakcji wymagane jest ogrzewanie substratów we wrzącym dioksanie w obecności 10% roztworu węglanu potasu przez 10 h. 5-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-4-piperidyn-1-ylo-2,4-dihydro-1,2,4-

triazolo-3-tion (**52a**), 5-(4-chloropirydyn-2-ylo)-4-morfolin-4-ylo-2,4-dihydro-1,2,4-triazolo-3-tion (**52b**) oraz 1-metylo-4-(morfolin-4-ylo)-3-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1*H*-1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tion (**52c**) uzyskano w stanie czystym po krystalizacji z dioksanu (Schemat 31). Przegląd literaturowych baz chemicznych wskazuje, iż związki o takiej budowie nie są znane. Powyższa metoda wydaje się być dogodną do otrzymywania 1,2,4-triazoli z wbudowaną aminą cykliczną w pozycji 4.

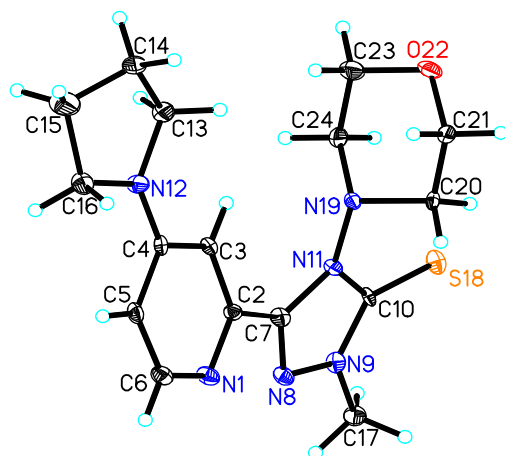


Związek	52a	52b	52c
R ¹	Cl	Cl	
R ²	H	H	CH ₃
R ³			

Schemat 31

Struktury związków **52a - c** potwierdzono metodami spektroskopii IR i ¹H NMR. W widmach IR nie obserwujemy pasm absorpcji pochodzących od wiązania w grupie karbonylowej C=O (1698 i 1658 cm⁻¹), natomiast obecne są pasma drgań N-H odpowiednio przy 3424 i 3430 cm⁻¹ dla związków **52a i b** oraz przy liczbie falowej 1235, 1237 i 1232 cm⁻¹ odpowiednio dla związków **52a - c**, które można przypisać wiązaniu C=S.

Strukturę szkieletu węglowego związku **52c** potwierdzono również w oparciu o analizę rentgenograficzną monokryształu (Rys. 15).



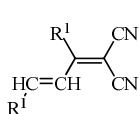
Rysunek 15. Widok części niezależnej komórki elementarnej związku **52c** z podaną numeracją atomów (elipsoidy drgań termicznych na poziomie 50%; atomy wodoru zaznaczono jako kulki).

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ BIOLOGICZNYCH

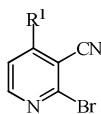
Podjmując prace nad syntezą nowych związków heterocyklicznych o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej, kierowano się możliwością przeprowadzenia badań biologicznych w Katedrze Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

V. 1. Aktywność przeciwmikrobiologiczna *in vitro* nowych pochodnych pirydyny względem bakterii tlenowych i beztlenowych

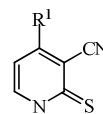
Zmierzając do poznania właściwości biologicznych otrzymanych w pracy nowych pochodnych pirydyny, do oceny aktywności przeciwbakteryjnej wytypowano początkowo 6 związków reprezentujących trzy szeregi pochodnych: 2-(1,3-dipodstawionych-allilideno)malononitryli **3a**, **3b**, 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4b**, **4c** oraz 4-podstawionych-2-tioksa-1,2-dihdropirydino-3-karbonitryli **7b**, **7c** (Schemat 32).



3a, 3b



4b, 4c



7b, 7c

Związek	3a	3b	4b	4c	7b	7c
R ¹	pirolidyn-1-yl	morfolin-4-yl	pirolidyn-1-yl	morfolin-4-yl	pirolidyn-1-yl	morfolin-4-yl

Schemat 32

W Katedrze Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przeprowadzono ocenę aktywności związków w testach *in vitro* na 26 szczepach bakterii beztlenowych oraz 26 szczepach bakterii tlenowych i względnie beztlenowych, wyizolowanych z materiałów pobranych od pacjentów z zakażeniami w obrębie jamy ustnej, dróg oddechowych i przewodu pokarmowego. Do badań włączono odpowiednie szczepy wzorcowe, traktując je jako szczepy kontrolne.

Wrażliwość bakterii beztlenowych (MIC) oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń związków w agarze Brucela z dodatkiem 5% krwi baraniej¹¹³⁻¹¹⁵, natomiast bakterii tlenowych i względnie beztlenowych w agarze Muellera - Hinton. Testowane związki rozpuszczono w 1 ml DMSO, a dalszych rozcieńczeń dokonywano przy użyciu jałowej wody

destylowanej. Oceniano wrażliwość bakterii na następujące stężenia: 200, 100, 50, 25, 12,5 i 6,2 µg/ml. Substancją kontrolną dla bakterii beztlenowych był metronidazol w stężeniach od 0,4 do 100 µg/ml, natomiast dla bakterii tlenowych amikacyna w stężeniach od 6,2 do 200 µg/ml. Hodowlę badanych posiewów i podłoży kontrolnych (bez dodatku związków) prowadzono w anaerostatach w obecności 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, katalizatora palladowego i wskaźnika beztlenowego, w temperaturze 37 °C przez 48 godzin dla bakterii beztlenowych, natomiast dla bakterii tlenowych w warunkach tlenowych, w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Za MIC uznano takie najmniejsze rozcieńczenie ocenianego związku, które całkowicie hamowało wzrost szczepów bakterii.

Zależne od struktury działanie przeciwbakteryjne wykazują wszystkie z testowanych związków. W Tabeli 4 przedstawiono odsetek wrażliwych na dany związek testowanych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml.

Numer związku	Odsetek unieczynnionych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml	
	Bakterie beztlenowe	Bakterie tlenowe
3a	84,6	11,5
3b	46,2	-
4b	42,3	11,5
4c	15,4	-
7b	23,0	15,4
7c	23,0	-

Tabela 4

W odniesieniu do wszystkich przebadanych w tej pracy związków, znaczący stopień zahamowania wzrostu głównie bakterii beztlenowych obserwuje się przy wyższych stężeniach 50 – 100 µg/ml. Wzrost tylko nielicznych szczepów jest hamowany przy stężeniu 6,2 µg/ml. Metronidazol w równoległym badaniu hamuje rozwój większości bakterii beztlenowych już przy stężeniu 0,4 µg/ml. Amikacyna jako substancja kontrolna hamująca rozwój bakterii tlenowych wykazywała MIC dla większości szczepów w stężeniach 6,2 – 12,5 µg/ml.

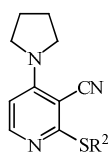
Dla zobrazowania rozkładu stężeń (MIC), dla każdej grupy przebadanych związków przedstawiono ich wartości dla związku najaktywniejszego.

Z pierwszych sześciu związków wytypowanych do badań, najaktywniejszy w odniesieniu do bakterii beztlenowych okazał się związek **3a**. W Tabeli 5 przedstawiono jego aktywność względem poszczególnych szczepów przy odpowiednich stężeniach.

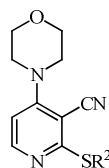
Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml												
		3a					Metronidazol							
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8
Bakterie beztlenowe														
Gram dodatnie														
<i>Fingoldia magna</i>	2	1											1	1
<i>Micromonas miros</i>	2	1	1											2
<i>Actinomyces israelii</i>	2	1			1						1	1		
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2	2							2					
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	2					2							
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2	2				2								
Gram ujemne														
<i>Prevotella bivia</i>	1	1												1
<i>Prevotella buccalis</i>	2	1												2
<i>Prevotella intermedia</i>	3	2												3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	3	3												3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2	2										1		1
<i>Bacteroides forsythus</i>	1	1										1		
<i>Bacteroides fragilis</i>	2		1											2
Ogółem	26	19	2		1	2	2			2	1	3	1	15

Tabela 5

Spośród skierowanych do oceny pochodnych 2-S-podstawionych-4-aminopodstawionych-nikotynonitryli **8h** - **8y** (Schemat 33), aktywność przeciwbakteryjną w zakresie stężeń 6,2 – 100 µg/ml wykazały związki **8h**, **8i**, **8l** - **8s**, **8x**, **8y** (Tabela 6).



8h - 8s



8t - 8y

Związek	8h, 8t	8i	8j	8k	8l, 8u	8t, 8w
R ²	metyl	etyl	2-aminoetyl	<i>N,N</i> -dietyloetyl	(pirolidyn-1-ylo)etyl	(morfolin-4-ylo)etyl
Związek	8m	8n	8o	8p, 8x	8r, 8y	8s
R ²	Ph	2-OMe-Ph	3-OMe-Ph	4-OMe-Ph	4-F-Ph	Bn

Schemat 33

Związek **8l** wyróżnia się zdolnością hamowania wzrostu 16 z 26 szczepów bakterii beztlenowych w zakresie stężeń 6,2 – 100 µg/ml (Tabela 7). Na zwrócenie uwagi wydaje się zasługiwać fakt, że modyfikacja struktury związku **8l** przez wymianę jego podstawnika pirolidyn-1-yl na morfolin-4-yl w położeniu 4 pierścienia prowadzi do związku **8u** pozbawionego aktywności w zakresie analizowanych stężeń, natomiast wymiana aminy cyklicznej w łańcuchu bocznym z pirolidyny na morfolinę (związek **8l**) w znacznym stopniu wpływa na obniżenie aktywności względem bakterii beztlenowych (Tabela 6).

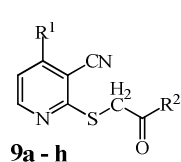
Numer związku	Odsetek unieczynnionych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml	
	Bakterie beztlenowe	Bakterie tlenowe
8h	46,1	-
8i	38,5	11,5
8l	61,5	3,8
8ł	38,5	11,5
8m	19,2	26,9
8n	11,5	7,7
8o	23,0	23,0
8p	15,4	15,4
8r	-	11,5
8s	-	7,7
8x	34,6	-
8y	15,4	-
8j, k, t, u, w	-	-

Tabela 6

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml													
		8l					Metronidazol								
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4
Bakterie beztlenowe															
<u>Gram dodatnie</u>															
<i>Finegoldia magna</i>	2		1											1	1
<i>Micromonas miros</i>	2		1												2
<i>Actinomyces israelii</i>	2		2								1	1			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2	1		1						2					
<i>Propionibacterium acnes</i>	2		2					2							
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2	1	1				2								
<u>Gram ujemne</u>															
<i>Prevotella bivia</i>	1					1									1
<i>Prevotella buccalis</i>	2														2
<i>Prevotella intermedia</i>	3	1													3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	3	2													3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2													1	1
<i>Bacteroides forsythus</i>	1												1		
<i>Bacteroides fragilis</i>	2		1	1											2
Ogółem	26	5	8	2		1	2	2			2	1	3	1	15

Tabela 7

Badania nad aktywnością przeciwbakteryjną kolejnej grupy nowych pochodnych pirydyny zapoczątkowano przeprowadzeniem syntez i przekazaniem do testów *in vitro* związków **9a - h** (Schemat 34).



Związek	R ¹	R ²
9a	metoksyl	metoksyl
9b	metoksyl	4-fenylo-piperazyn-1-yl
9c	metoksyl	4-(pirydyn-2-ylo)piperazyn-1-yl
9d	pirolidyn-1-yl	4-fenylo-piperazyn-1-yl
9e	pirolidyn-1-yl	4-fluorofenylo-piperazyn-1-yl
9f	morfolin-4-yl	metoksyl
9g	morfolin-4-yl	4-(pirydyn-2-ylo)piperazyn-1-yl
9h	morfolin-4-yl	4-fluorofenylo-piperazyn-1-yl

Schemat 34

Zdolność hamowania wzrostu komórek bakteryjnych wykazało sześć związków (Tabela 8). Wyróżniający się aktywnością związek **9d** hamuje wzrost 19 spośród 27 szczepów bakterii beztlenowych w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml (Tabela 9).

Daje się zauważyć, że aktywność i spektrum działania przeciwbakteryjnego omawianych związków **9a - 9h** zależne są przede wszystkim od trafności doboru ich podstawników R¹ i R². Przykładowa wymiana w związku **9d** podstawnika R¹ = pirolidyn-1-yl na R¹ = metoksyl prowadzi do związku **9b**, którego aktywność jest znacząco niższa względem bakterii beztlenowych w analizowanym zakresie stężeń. Inna modyfikacja struktury związku **9d** przez zmianę grupy R² = 4-fenylo-piperazyn-1-yl na R² = 4-F-fenylo-piperazyn-1-yl prowadzi do związku **9e**, który wykazuje aktywność tylko wobec 4 szczepów bakterii beztlenowych, natomiast wymiana w związku **9e** pirolidyny w pozycji czwartej pierścienia na morfolinę (pochodna **9h**) inaktywuje związek względem badanych szczepów.

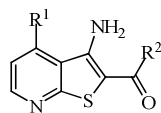
Numer związku	Odsetek unieczynnionych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml	
	Bakterie beztlenowe	Bakterie tlenowe
9a	40,7	34,6
9b	22,2	-
9c	22,2	-
9d	70,3	-
9e	14,8	-
9f	15,4	-
9g, h	-	-

Tabela 8

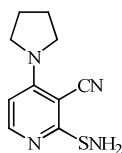
Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml													
		9d					Metronidazol								
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4
Bakterie beztlenowe															
<u>Gram dodatnie</u>															
<i>Finegoldia magna</i>	2					1								1	1
<i>Micromonas miros</i>	3	1	1											1	2
<i>Actinomyces israelii</i>	2	1								1		1			
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	1			1		2								
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2						1	1							
<u>Gram ujemne</u>															
<i>Prevotella bivia</i>	1	1													1
<i>Prevotella buccalis</i>	2	2													2
<i>Prevotella intermedia</i>	3	1													3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	2	2													2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3	3											1		2
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1	1											1		
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	1													2
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	2	2								1	1				
Ogółem	27	16	1		1	1	3	1			2	1	3	2	15

Tabela 9

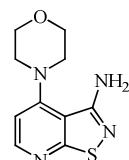
W dalszej części pracy przeprowadzono syntezę tieno[2,3-*b*]pirydyn, z których do testów biologicznych skierowano pochodne **10a – g** i **10i – p** oraz 2-aminotio-4-(pirolidyn-1-yl)nikotynonitryl (**11b**) i 3-amino-4-(morfolin-4-yl)izotiazolo[5,4-*b*]pirydynę (**11c**) (Schemat 35).



10a - g, 10i - p



11b



11c

Związek	R ¹	R ²
10a	metoksyl	Ph
10b	metoksyl	Me
10c	metoksyl	NH ₂
10d	metoksyl	EtO
10e	metoksyl	MeO
10f	metoksyl	4-Cl-PhNH-
10g	metoksyl	3,4-diMePhNH-
10i	metoksyl	4-fluorofenylo-piperazyn-1-yl
10j	pirolidyn-1-yl	Ph
10k	pirolidyn-1-yl	Me
10l	pirolidyn-1-yl	NH ₂
10ł	pirolidyn-1-yl	EtO
10m	morfolin-4-yl	Ph
10n	morfolin-4-yl	Me
10o	morfolin-4-yl	NH ₂
10p	morfolin-4-yl	EtO

Schemat 35

Aktywność przeciwbakteryjną stwierdzono dla 13 spośród 18 testowanych związków (Tabela 10) w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml. Aktywne związki hamują wzrost od 1 do 19 szczepów bakterii beztlenowych (z 27) i od 1 do 9 szczepów bakterii tlenowych (z 26). Rozpatrując wpływ podstawnika R¹ na aktywność biologiczną tieno[2,3-*b*]pirydyn, można zauważyć, iż wszystkie pochodne z podstawnikiem –OMe w pozycji czwartej pierścienia pirydyny wykazują działanie względem bakterii beztlenowych, natomiast z morfoliną są nieaktywne.

Na zwrócenie uwagi zasługuje związek **11b**, który hamuje wzrost 19 z 27 szczepów bakterii beztlenowych w analizowanym zakresie stężeń (Tabela 11).

Numer związku	Odsetek unieczynnionych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml	
	Bakterie beztlenowe	Bakterie tlenowe
10a	18,5	-
10b	3,7	7,7
10c	25,9	7,7
10d	25,9	7,7
10e	25,9	34,6
10f	11,1	19,2
10g	18,5	-
10i	14,8	-
10j	29,6	3,8
10k	18,5	7,7
10l, ł, m, n, o	-	-
10p	-	7,7
11b	70,3	-
11c	18,5	7,7

Tabela 10

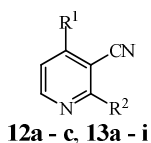
Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml													
		11b					Metronidazol								
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4
Bakterie beztlenowe															
<u>Gram dodatnie</u>															
<i>Fingoldia magna</i>	2	2												1	1
<i>Micromonas miros</i>	3	3												1	2
<i>Actinomyces israelii</i>	2	2								1		1			
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	1				1	2								
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2						1	1							
<u>Gram ujemne</u>															
<i>Prevotella bivia</i>	1	1													1
<i>Prevotella buccalis</i>	2	1													2
<i>Prevotella intermedia</i>	3	1													3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	2	1													2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3	2											1		2
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1												1		
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	2													2
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	2	2									1	1			
Ogółem	27	18				1	3	1			2	1	3	2	15

Tabela 11

2-Amino-3-cyjanopirydyny znane są z aktywności przeciwmikrobiologicznej¹⁷, co skłoniło do przeprowadzenia syntez nieopisanych wcześniej, strukturalnie zbliżonych pochodnych 2,4-diaminopodstawionych nikotynonitryli **12a – c**, **13a – i** (Schemat 36) w celu

poznania ich wpływu na hamowanie wzrostu 26 szczepów bakterii tlenowych i beztlenowych i ewentualnych zależności struktura – aktywność biologiczna.

Do testów biologicznych skierowano wszystkie otrzymane związki tej grupy. Ich aktywność przeciwbakteryjną ponownie oceniała Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Osiem związków wykazało zależną od struktury zdolność hamowania wzrostu od 3 do 18 szczepów bakterii beztlenowych, natomiast cztery związki zdolność hamowania wzrostu od 1 do 7 szczepów bakterii tlenowych. W szeregu pochodnych z grupą aminową ($R^2 = NH_2$) aktywność zależna jest tylko od podstawników w pozycji 4 pierścienia pirydyny i wyróżniającym się jest związek **12b** z podstawioną pirolidyną, ze zdolnością hamowania wzrostu 11 szczepów bakterii beztlenowych. W szeregu pochodnych **13a – i** uwagę zwraca fakt, że ich aktywność zależna jest zarówno od podstawników aminowych w pozycji 2 (R^2), jak i podstawników w pozycji 4 pierścienia pirydyny (R^1), przy czym bardziej znaczący wpływ posiada trafność doboru podstawnika R^1 . Przemawia za tym porównanie analogowych związków różniących się aktywnością (**13a** i **13f** oraz **13b** i **13g**) (Tabela 12).



Związek	R^1	R^2	Związek	R^1	R^2
12a	metoksyl	NH_2	13d	pirolidyn-1-yl	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-etyloamino
12b	pirolidyn-1-yl	NH_2	13e	pirolidyn-1-yl	2-hydroksyetyloamino
12c	morfolin-4-yl	NH_2	13f	morfolin-4-yl	morfolin-4-yl
13a	pirolidyn-1-yl	morfolin-4-yl	13g	morfolin-4-yl	pirolidyn-1-yl
13b	pirolidyn-1-yl	pirolidyn-1-yl	13h	morfolin-4-yl	2-hydroksyetyloamino
13c	pirolidyn-1-yl	piperydyn-1-yl	13i	morfolin-4-yl	4-fenyl-piperazyn-1-yl

Schemat 36

Numer związku	Odsetek unieczynnionych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 $\mu g/ml$	
	Bakterie beztlenowe	Bakterie tlenowe
12a	19,2	-
12b	42,3	3,8
12c, 13e, 13g, 13h	-	-
13a	19,2	-
13b	69,2	3,8
13c	30,7	26,9
13d	61,5	11,5
13f	7,7	-
13i	38,5	-

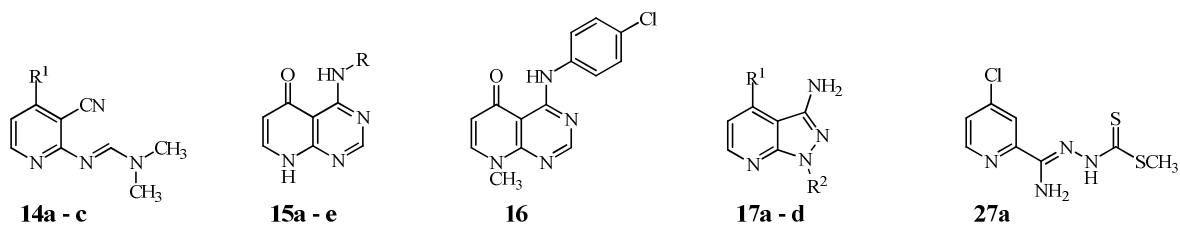
Tabela 12

Spśród powyższej grupy związków wytypowanych do badań, związek **13b** okazał się najaktywniejszy w odniesieniu do bakterii beztlenowych. W Tabeli 13 przedstawiono jego aktywność względem poszczególnych szczepów przy odpowiednich stężeniach.

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml													
		13b					Metronidazol								
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4
Bakterie beztlenowe															
<u>Gram dodatnie</u>															
<i>Finegoldia magna</i>	2	2												1	1
<i>Micromonas miros</i>	2	1			1										2
<i>Actinomyces israelii</i>	2	1		1							1	1			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2	2								2					
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	2					2								
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2					2									
<u>Gram ujemne</u>															
<i>Prevotella bivia</i>	1	1													1
<i>Prevotella buccalis</i>	2	1													2
<i>Prevotella intermedia</i>	3														3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	3	3													3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2			1	1								1		1
<i>Bacteroides forsythus</i>	1												1		
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	1	1												2
Ogółem	26	14		2	2		2	2			2	1	3	1	15

Tabela 13

Do testów *in vitro* skierowano kolejne szeregi: *N'*-[3-cyjano-4-(podstawione)pirydyn-2-ylo]-*N,N*-dimetyloformamidyny **14a – c**, pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-ony **15a – e**, metylowaną pochodną związku **15a** 4-(4-chlorofenyloamino)-8-metylopirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (**16**), 3-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]pirydyny **17a – d** i ester metylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (**27a**) (Schemat 37).



Związek	R ¹	Związek	R	Związek	R ¹	R ²
14a	metoksyl	15a	<i>p</i> -Cl-Ph	17a	pirolidyn-1-yl	-H
14b	pirolidyn-1-yl	15b	3,4-diMe-Ph	17b	pirolidyn-1-yl	-Me
14c	morfolin-4-yl	15c	3-NO ₂ -, 4-OMe-Ph	17c	morfolin-4-yl	-H
		15d	2,5-diMe-Ph	17d	morfolin-4-yl	-Me
		15e	Bn			

Schemat 37

Aktywność przeciwbakteryjną wykazały wszystkie związki z wyjątkiem **14a** (Tabela 14). Uwagę zwraca fakt, iż związek **15a** hamuje wzrost 12 z 26 szczepów bakterii beztlenowych w zakresie stężeń 25 – 50 µg/ml (Tabela 15). Związki **27a**, **17b** i **c** w analizowanym zakresie stężeń 6,2 – 100 µg/ml hamowały wzrost odpowiednio 13, 10 i 8 szczepów bakterii beztlenowych, natomiast związek **27a** wyróżnia się działaniem wobec wszystkich (25) szczepów bakterii tlenowych w powyższym zakresie stężeń (Tabela 16).

Numer związku	Odsetek unieczynnionych szczepów w zakresie stężeń 6,2 - 100 µg/ml	
	Bakterie beztlenowe	Bakterie tlenowe
14a	-	-
14b	15,4	-
14c	7,7	-
15a	46,15	-
15b	26,9	-
15c	15,4	-
15d	19,2	-
15e	15,4	-
16	19,2	-
17a	-	8,0
17b	38,4	20,0
17c	30,8	-
17d	11,5	-
27a	50,0	100,0

Tabela 14

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml												
		15a					Metronidazol							
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8
Bakterie beztlenowe														
<u>Gram dodatnie</u>														
Peptostreptococcus anaerobius	2		1									1		1
Finegoldia magna	2		1										1	1
Micromonas miros	1		1										1	
Actinomyces viscosus	1								1					
Actinomyces odontolyticus	1									1				
Propionibacterium acnes	1						1							
Propionibacterium granulosum	2		1				2							
<u>Gram ujemne</u>														
Prevotella bivia	1			1										1
Prevotella buccalis	1													1
Prevotella intermedia	3			1										3
Prevotella loescheii	1			1										1
Porphyromonas asaccharolytica	2													2
Fusobacterium nucleatum	2			1										2
Fusobacterium necrophorum	2			1								1	1	
Bacteroides fragilis	1													1
Bacteroides ureolyticus	2			2						2				
Bacteroides vulgatus	1			1										1
Ogółem	26		4	8			3			3	1	2	3	14

Tabela 15

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w µg/ml									
		27a					Amikacyna				
		100	50	25	12,5	6,2	100	50	25	12,5	6,2
Bakterie tlenowe											
<u>Gram dodatnie</u>											
Staphylococcus aureus	4		1	2		1			1	3	
Corynebacterium spp.	2			2			1	1			
<u>Gram ujemne</u>											
Klebsiella pneumoniae	3		3						1	2	
Acinetobacter baumannii	2					2		1		1	
Escherichia coli	6		5	1					2	4	
Pseudomonas aeruginosa	6	3	3					1	2	3	
Pseudomonas stutzeri	2		2						2		
Ogółem	25	3	14	5		3		2	2	8	13

Tabela 16

Po dokonaniu analizy zauważalnych zależności struktura – aktywność przeciwbakteryjna nowych pochodnych pirydyny, stwierdzono, iż zdecydowana większość otrzymanych i przebadanych w testach *in vitro* połączeń wykazuje aktywność przeciwmikrobiologiczną głównie względem bakterii beztlenowych i wybiórczo tlenowych, jednak w znacznie wyższych stężeniach niż zastosowane wzorce amikacyna i metronidazol.

V. 2. Aktywność przeciwgruźlicza *in vitro* niektórych spośród otrzymanych w pracy nowych pochodnych pirydyny

W celu poznania właściwości tuberkulostatycznych nowych pochodnych pirydyny, do oceny wytypowano 89 związków reprezentujących główne szeregi otrzymanych w pracy pochodnych.

Ocenę aktywności związków wykonał Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w testach *in vitro* na trzech szczepach Mycobacterii: prątkach standardowego szczepu *H₃₇Rv* oraz dwóch szczepach izolowanych od chorych na gruźlicę – pierwszy oporny na stosowane leki (izoniazyd, streptomycynę, etambutol, rifampicynę i etionamid) (*Myc. tbc.* 210), drugi w pełni wrażliwy na nie (*Myc. tbc.*192).

W Tabeli 17 zestawiono otrzymane wyniki dla przebadanych związków.

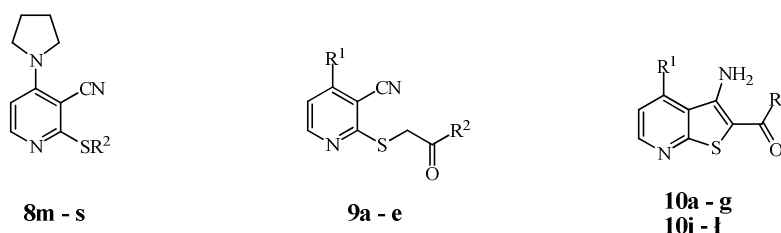
Związek	MIC (µg/ml) szczep <i>Mycobacterium</i>			Związek	MIC (µg/ml) szczep <i>Mycobacterium</i>		
	<i>H₃₇Rv</i>	wrażliwy	oporny		<i>H₃₇Rv</i>	wrażliwy	oporny
3a	50	50	25	31d	50	25	25
8m	25	50	25	31e	50	50	50
8n	25	50	25	32	50	50	50
8o	25	50	25	33a	50	100	50
8p	25	50	50	33b	25	50	50
8r	25	100	25	34a	50	50	50
8s	25	50	25	34b	50	50	50
9a	25	50	25	35	50	50	50
9b	25	50	25	36	50	50	25
9c	25	50	25	37	100	100	100
9d	25	50	25	39	50	100	50
9e	50	100	25	40	100	100	100
10a	25	25	25	41	100	100	50
10b	25	50	25	42	12,5	25	50
10c	25	50	25	44	25	25	25
10d	25	25	12,5	45	50	50	50
10e	12,5	50	25	46a	50	50	50
10f	25	50	25	46b	50	50	50
10g	25	50	25	46c	50	25	50
10i	25	25	12,5	46d	50	50	50
10j	50	50	50	46e	50	50	50
10k	50	50	25	46f	50	50	25
10l	25	25	25	46g	100	50	100
10l	25	25	25	47a	50	100	50
11b	25	50	25	47b	50	50	50
18	100	100	100	47c	50	50	50
19	100	100	50	47d	50	50	25
21a	50	50	25	47e	50	50	50
21b	100	100	50	47f	50	50	50
22a	100	100	50	47g	50	100	50
22b	100	100	50	48a	50	50	50
23	25	25	50	48b	25	25	12,5
24	50	100	50	48c	50	50	50
25	50	50	50	48d	50	50	50
26	25	25	50	49a	50	50	25
27a	50	50	50	49b	25	25	25
27b	25	25	25	49c	25	25	25
27c	50	50	25	49d	50	50	50
28a	100	50	50	50a	50	50	50
30a	50	100	50	50b	25	50	12,5
30b	50	50	25	50c	25	25	12,5
30c	100	100	50	50d	25	25	25
31a	25	25	25	50e	50	50	25
31b	25	25	25	51	50	50	25
31c	50	25	50				

Tabela 17. Aktywność przeciwgruźlicza związków przyjętych do badań przez Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w stosunku do trzech szczepów *Mycobacterium*.

Działanie tuberkulostatyczne badano klasyczną metodą probówkową seryjnych rozcieńczeń w modyfikacji Proskauera i Becka na podłożu płynnym Youmansa z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Oceniano wrażliwość bakterii na następujące stężenia: 100, 50, 25, 12,5, 6,2 i 3,1 µg/ml. Badane związki rozpuszczono w wodzie lub glikolu etylenowym. Wyniki badań odczytywano po inkubacji hodowli w temperaturze 37 °C po 21 dniach.

Oceniano minimalne stężenie hamujące wzrost szczepów (MIC) w odniesieniu do próbki kontrolnej bez substancji badanej.

W pierwszej kolejności wytypowano do oceny 23 związki reprezentujące trzy szeregi pochodnych: 2-*S*-podstawione-4-(pirolidyn-1-yl)-3-cyjanopirydyny **8m** – **s**, 2-acetylotiopodstawione-3-cyjanopirydyny **9a** – **e** oraz tieno[2,3-*b*]pirydyny **10a** – **g**, **10i** – **l** (Schemat 38).



Schemat 38

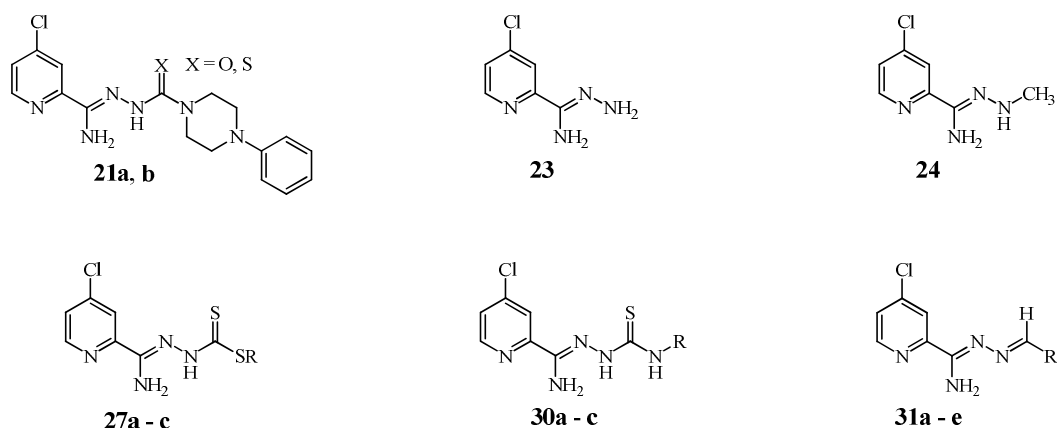
Wartość MIC dla większości związków wynosi od 25 do 100 µg/ml, co świadczy o umiarkowanej lub niskiej aktywności przeciweguźliczej. Na zwrócenie uwagi wydaje się zasługiwać względnie wysoka aktywność związków z szeregu tieno[2,3-*b*]pirydyn **10d** i **10i** w odniesieniu do szczepu opornego (*Myc. tbc.* 210) (MIC = 12,5 µg/ml) oraz związku **10e** w odniesieniu do szczepu standardowego *H₃₇R_v* (MIC = 12,5 µg/ml). Dla porównania, wartość MIC związku **9a**, niecyklicznej pochodnej estru metylowego kwasu 3-amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyłowego (**10e**), jest dwukrotnie większa względem tego samego szczepu. Rozpatrując wpływ podstawnika R¹ dla analogów **10d** i **10l**, zauważono, iż zmiana metoksyłu na pirolidyn-1-yl powoduje obniżenie aktywności względem szczepu opornego (MIC = 25 µg/ml).

Ocenę aktywności przeciweguźliczej kolejnych spośród otrzymanych i typowanych do badań biologicznych pochodnych przeprowadzono również na trzech szczepach *Mycobacterii* w tych samych zakresach stężeń. Spośród pochodnych kwasu 4-chloropirydyno-2-karboksyłowego **18** – **37** wytypowanych zostało 30 związków, głównie o budowie amidrazonu. Dwa związki, amid kwasu 4-chloropikolinowego (**18**) oraz 2,4-dimetylo-5-(4-chloropirydyn-2-yl)-2,4-dihydro-1,2,4-triazolo-3-tion (**37**), okazały się nieaktywne wobec wszystkich szczepów (MIC = 100 µg/ml). MIC dla pozostałych pochodnych zawierał się w granicach 25 - 100 µg/ml, co świadczy o umiarkowanej bądź niskiej ich aktywności (Tabela 17). Można zauważyć, iż niewielkie modyfikacje w strukturach analogów wpływają na zmianę aktywności względem wybranych szczepów. Przykładowa zmiana w związku **21b** grupy amidowej na tioamidową (pochodna **21a**) (Schemat 39) powoduje dwukrotny wzrost

aktywności względem każdego z testowanych szczepów. Wprowadzenie podstawnika metylowego w związku **23** prowadzi do uzyskania *N*'-metylo-4-chloropirydyn-2-yloamidrazonu (**24**) (Schemat 39) o dwukrotnie i czterokrotnie niższej aktywności względem odpowiednio szczepu standardowego i wrażliwego. Rozpatrując *S*-monoestry kwasu *N*'-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego **27a – c** (Schemat 39), najbardziej aktywny okazał się związek z podstawnikiem butylowym **27b** (MIC 25 µg/ml) względem wszystkich szczepów. Uwagę zwraca fakt, iż podstawienie protonu przy azocie *N* związku **27a** grupą metylową (związek **36**) nie powoduje obniżenia aktywności, lecz dwukrotny jej wzrost względem szczepu opornego.

Analizując na podstawie wartości MIC względem szczepu opornego wpływ podstawnika R w łańcuchu bocznym tiosemikarbazydów **30a – c**, stwierdzono, iż związek z podstawnikiem allilowym **30b** jest najbardziej aktywny (Schemat 39).

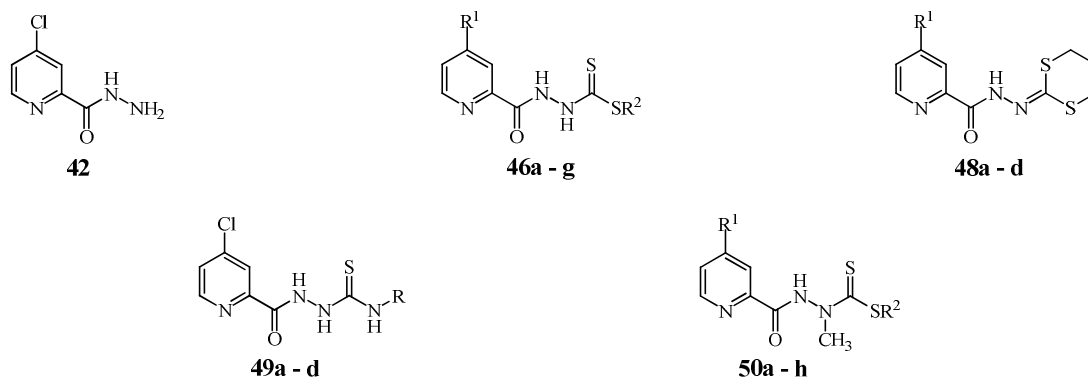
Z otrzymanych produktów kondensacji **31a – e**, pochodne z pierścieniem *p*-Cl-Ph **31a** oraz 5-NO₂-furanu **31b** charakteryzuje najniższa wartość MIC (25 µg/ml) względem wszystkich testowanych szczepów (Schemat 39).



Schemat 39

Spośród skierowanych do oceny 36 pochodnych kwasu 4-chloro- i 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego, głównie o budowie hydrazydów, nieaktywny względem testowanych szczepów okazał się kwas 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowy (**40**) (MIC = 100 µg/ml), trzydzieści jeden związków charakteryzuje się średnią bądź niską aktywnością przeciwgruźliczą (MIC od 25 do 100 µg/ml), natomiast cztery związki względnie dobrą aktywnością (MIC = 12,5 µg/ml) wobec szczepu opornego lub standardowego. Dokonując analizy struktura – aktywność biologiczna związków, brano pod uwagę wpływ podstawnika R¹ (chlor lub pirolidyna) w pozycji 4 pierścienia pirydyny, długość łańcucha bocznego estrów i diestrów oraz wpływ

grupy metylowej przy azocie *N* kwasów ditiokarbazowych. Zbyt mała różnica w aktywności pomiędzy analogami z wymiennym podstawnikiem R¹ sugeruje niewielki wpływ tej grupy na aktywność przeciwgruźliczą, z wyjątkiem analogów o budowie 1,3-ditianu **48b** (MIC = 12,5 µg/ml) i **48d** (MIC = 50 µg/ml), gdzie zauważalny jest wpływ pirolidyny na czterokrotny spadek aktywności względem szczepu opornego. Długość łańcucha bocznego w *S*-monoestrach kwasów ditiokarbazowych **46a – g** wskazuje, iż związki z podstawnikiem butylowym są najbardziej aktywne (MIC = 25 µg/ml) względem szczepu wrażliwego **46c** bądź opornego **46f**. Podstawienie grupą metylową azotu *N'* związku **42** prowadzi do uzyskania *N'*-metylohydrazidu kwasu 4-chloropikolinowego (**44**) z jednoczesnym spadkiem aktywności względem szczepu standardowego (wzrost MIC z 12,5 do 25 µg/ml) i dwukrotnym wzrostem aktywności względem szczepu opornego (MIC = 25 µg/ml). Na uwagę zasługuje fakt, iż zgodnie z oczekiwaniem, podstawnik metylowy w monoestrach kwasów *N'*-[(4-podstawionych)pikolinoilo]-*N*-metyloditiokarbazowych nie powoduje obniżenia aktywności tuberkulostatycznej. Zauważyć można, że w wielu przypadkach powoduje on nawet wzrost działania przeciwgruźliczego względem wybranych szczepów. Dla związków **50b** i **50c** odnotowano najwyższy, czterokrotny wzrost MIC (12,5 µg/ml) względem szczepu opornego w stosunku do analogów **46b** i **46c**. Analizując wpływ podstawnika R w łańcuchu bocznym tiosemikarbazydów **49a – d**, na podstawie wartości MIC = 25 µg/ml względem wszystkich szczepów stwierdzono, iż związki z podstawnikiem allilowym **49b** oraz cykloheksylowym **49c** są najbardziej aktywne (Schemat 40).



Schemat 40

Podsumowując, trzy związki **18**, **37** i **40**, spośród 89 przebadanych metodą *in vitro*, nie wykazały zdolności hamowania wzrostu (MIC = 100 µg/ml) rozpatrywanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis*. Dla 86 nowych pochodnych pirydyny wyznaczona wartość MIC zawiera się w granicach od 12,5 do 100 µg/ml, co świadczy o względnie dobrej (w

porównaniu do pirazynamidu MIC = 25 µg/ml) do niskiej [względem izoniazydu (MIC = 0,5 µg/ml), wiomycyny (MIC = 6,2 µg/ml) czy cykloseryny (MIC = 5 µg/ml)] aktywności tuberkulostatycznej.

W aspekcie wskazanego, aktualnego problemu rozwoju szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na stosowane leki, uwagę zwraca fakt, iż związki **10d**, **10i**, **48b**, **50b** oraz **50c** charakteryzuje znacząca aktywność przeciwpłatkowa względem nich (MIC = 12,5 µg/ml).

Na podstawie wartości MIC zsyntezowanych związków mogących przyjmować formę planarną oraz tych, w których jest ona niemożliwa, stwierdzono, iż dla obu typów połączeń występuje aktywność przeciwpłatkowa, jednak dla większości z nich przy wyższych stężeniach niż stosowane aktualnie chemioterapeutyki.

VI. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Identyfikacja otrzymanych związków została oparta na analizie elementarnej, której wyniki mieściły się w zakresie $\pm 0,4\%$ wartości teoretycznych oraz na analizie widm otrzymanych przy wykorzystaniu metody Protonowego Rezonansu Magnetycznego $^1\text{H NMR}$. Widma zostały wykonane przy użyciu spektrofotometru Varian Gemini przy częstotliwości 200 MHz oraz spektrofotometrem Varian Unity Plus przy częstotliwości 500 MHz. Opisano je, używając następujących skrótów: s – singlet, sz.s – szeroki singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, t – triplet, q – kwartet, m – multiplet.

Widma w podczerwieni identyfikujące grupy funkcyjne nowo powstałych związków wykonano przy użyciu aparatu Thermo Nicolet Satelite FT-IR z transformacją Fouriera, metodą transmisyjną. Dla substancji stałych wykorzystano technikę wyprasek z KBr, natomiast w przypadku olejów technikę zawiesin olejowych w oleju parafinowym.

Czystość substancji potwierdzono metodą chromatografii cienkowsarstwowej TLC przy wykorzystaniu płytek Kieselgel 60 F 254. W celu detekcji użyto spektrofotometru UV o stałej długości fali $\lambda = 254 \text{ nm}$ i $\lambda = 366 \text{ nm}$. Chromatogram rozwijano metodą wstępującą, stosując jako eluenty następujące układy: aceton – benzen (1:1) lub aceton – toluen (1:1), chloroform – metanol (1:1), chloroform – octan etylu (5:1). Do oczyszczania niektórych związków wykorzystano klasyczną, kolumnową chromatografię cieczową, w której fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy Silica gel firmy Aldrich o wielkości ziaren 70 – 230 mesh. Fazę ruchomą stanowiły następujące układy: aceton – benzen (1:1), aceton – toluen (1:1) oraz chloroform – octan etylu (5:1).

Temperatury topnienia zostały oznaczone aparatem PGH Rundfunk – Fernsehen typ 30A/G.

Analiza rentgenograficzna wybranych związków została wykonana w Katedrze Chemii Fizycznej Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego oraz w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologii Politechniki Łódzkiej.

1,1-Dicyjano-2-etoksyprop-1-en (1)

Malononitryl (24,0 g, 364 mmoli) zawieszono w estrze etylowym kwasu ortooctowego (72 ml, 390 mmoli) i ogrzewano przez 1 h, utrzymując temperaturę w granicach 90-95 °C. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej wydzielony osad odsączono, przemyto zimną wodą i oczyszczono przez krystalizację z metanolu. Wydajność: 91%; $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ (136,15); $T_{\text{topn.}}$ 91-92 °C (*lit.* 92-94 °C).⁵³

2-[3-(Dimetyloamino)-1-metoksyallilideno]malononitryl (2)

1,1-Dicyjano-2-etoksyprop-1-en (**1**) (32,0 g, 235 mmoli) zawieszono w dimetyloformamidzie-dimetyloacetalu (DMF-DMA) (54 ml) oraz w metanolu (50 ml) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 1 h. Po oziębieniu mieszaniny reakcyjnej wydzielony osad odsączono, przemyto zimnym metanolem i oczyszczono przez krystalizację z mieszaniny metanol/woda (1:1). Wydajność: 50%; C₉H₁₁N₃O (177,20); T_{topn.} 130-131 °C (*lit.* 130 °C).⁵²

2-[1,3-Di(pirolidyn-1-ylo)allilideno]malononitryl (3a)

2-[3-(Dimetyloamino)-1-metoksyallilideno]malononitryl (**2**) (17,7 g, 100 mmoli) zawieszono w pirolidynie (50 ml, 590 mmoli) oraz 5 ml wody i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 2 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z metanolu. Wydajność: 83%; C₁₄H₁₈N₄ (242,32); T_{topn.} 177-179 °C; IR (KBr) ν: 2984, 2875, 2190, 2164, 1613, 1457, 1390, 1281, 969, 775, 554 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,96 (m, 8H, pirolidyna), 3,57 (m, 8H, pirolidyna), 4,34 (d, 1H, J = 12,2 Hz, CH), 7,74 (d, 1H, J = 12,2 Hz, CH) ppm.

Analogicznie otrzymano związek **3b**:

2-[1,3-Di(morfolin-4-ylo)allilideno]malononitryl (3b)

Wydajność: 83%; C₁₄H₁₈N₄O₂ (274,32); T_{topn.} 162-164 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2967, 2861, 2192, 2169, 1610, 1498, 1277, 1114, 777 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,35 (m, 4H, morfolina), 3,59 (m, 4H, morfolina), 3,74 (m, 8H, morfolina), 4,52 (d, 1H, CH, J = 12,5 Hz), 7,34 (d, 1H, CH, J = 12,5 Hz) ppm.

Metoda ogólna syntezy 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli 4a, 4b, 4c

Związek **2**, **3a** lub **3b** (60 mmoli) rozpuszczono w 33% roztworze HBr w kwasie octowym (75 ml), następnie ochłodzono i mieszano przez 15 min, po czym pozostawiono w temperaturze otoczenia przez 72 h. Po alkalizacji mieszaniny reakcyjnej 25% roztworem amoniaku wydzielony osad odsączono, przemyto zimną wodą i oczyszczono przez krystalizację.

2-Bromo-4-metoksynikotynonitryl (4a)

Wydajność: 69%; C₇H₅BrN₂O (213,0); T_{topn.} 178-179 °C (metanol) (*lit.* 182 °C).⁵²

2-Bromo-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (4b)

Wydajność: 63%; C₁₀H₁₀BrN₃ (252,11); T_{topn.} 124-126 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2953, 2215, 1590, 1502, 1332, 1278, 1126, 1071, 992, 812 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,05 (s, 4H, pirolidyna), 3,70 (s, 4H, pirolidyna), 6,43 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-5), 7,96 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-6) ppm.

2-Bromo-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (4c)

Wydajność: 80%; C₁₀H₁₀BrN₃O (268,11); T_{topn.} 159-162 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2217, 1582, 1445, 1117, 957, 820, 770, 566 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,51 (t, 4H, J = 4,6 Hz, morfolina), 3,86 (t, 4H, J = 4,6 Hz, morfolina), 6,71 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-5), 8,14 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-6) ppm.

4-Metoksynikotynonitryl (5a)

2-Bromo-4-metoksynikotynonitryl (**4a**) (1,07 g, 5 mmoli) rozpuszczono w EtOH (20 ml) z dodatkiem kwasu octowego (1,65 ml). Następnie dodawano porcjami Zn (1,4 g) i ponownie kwas octowy (1,65 ml). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano 10 h w temp. 80 °C, następnie odsączono Zn. Do zagęszczonego przesączu dodano lodu (10 g). Wytrącony osad odsączono i oczyszczono na drodze krystalizacji z metanolu. Wydajność: 88%; C₇H₆N₂O (134,14); T_{topn.} 115-118 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3062, 2999, 2816, 2226, 1590, 1502, 1409, 1318, 1206, 1014, 844, 586 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4,02 (s, 3H, OCH₃), 6,94 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-5), 8,68 (m, 2H, H-2, H-6) ppm.

Analogicznie otrzymano związek **5b**:

4-(Pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (5b)

Wydajność: 71%; C₁₀H₁₁N₃ (173,21); T_{topn.} 94-95 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2971, 2845, 2211, 1596, 1512, 1432, 1272, 1209, 1052, 974, 804, 516 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,08 (m, 4H, pirolidyna), 3,73 (sz.s, 4H, pirolidyna), 6,51 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-5), 8,19 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-6), 8,46 (s, 1H, H-2) ppm; MS (CI) [M + 1] m/z = 174.

Amid kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynowego (6)

Związek **5b** (0,52 g, 3 mmole) rozpuszczono w 10% NaOH (30 ml) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Po ochłodzeniu wypadł osad, który odsączono i oczyszczono przez krystalizację z wody. Wydajność: 79%; C₁₀H₁₃N₃O (191,23); T_{topn.} 80-82 °C; IR (KBr) ν: 3479, 3336, 3163, 2876, 1661, 1517, 1404, 1353, 1247, 1149, 1061, 980, 821, 724 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,88 (s, 4H, pirolidyna), 3,28 (s, 4H, pirolidyna), 6,54 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-5), 7,37 (sz.s, 1H, NH), 7,85 (sz.s, 1H, NH), 8,06 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-6), 8,10 (s, 1H, H-2) ppm.

4-Metoksy-2-tio-1,2-dihydropirydino-3-karbonitryl (7a)

Związek **4a** (1,0 g, 4,6 mmola) rozpuszczono w MeOH (30 ml). Do ochłodzonego roztworu dodano tiomocznik (0,39 g, 4,6 mmola) i mieszano w temperaturze otoczenia przez 2 min, po czym ogrzewano we wrzeniu przez 2 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej wydzielony osad w postaci soli odsączono, rozpuszczono w 10% wodnym roztworze NaOH (20 ml) i ogrzewano przez 15 min. Po ponownym ochłodzeniu roztwór zakwaszono stężonym kwasem

octowym. Wytrącony osad odsączono, przemyto wodą i przekrystalizowano z MeOH. Wydajność: 69%; C₇H₆N₂OS (166,20); T_{topn.} 186-187 °C (metanol); IR (KBr) v: 3150, 2229, 1611, 1323, 1249, 1044 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,00 (s, 3H, OCH₃), 6,78 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-6), 7,92 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-5), 13,56 (s, 1H, NH) ppm.

Analogicznie otrzymano związki **7b** i **7c**.

4-(Pirolidyn-1-ylo)-2-tiokso-1,2-dihydropirydyno-3-karbonitryl (**7b**)

Wydajność: 84%; C₁₀H₁₁N₃S (205,28); T_{topn.} >360 °C (metanol); IR (KBr) v: 3127, 2960, 2208, 1633, 1526, 1456, 1244 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,95 (s, 4H, pirolidyna), 3,67 (s, 4H, pirolidyna), 6,30 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-6), 7,43 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-5), 12,60 (s, 1H, NH) ppm.

4-(Morfolin-4-ylo)-2-tiokso-1,2-dihydropirydyno-3-karbonitryl (**7c**)

Wydajność: 96%; C₁₀H₁₁N₃OS (221,28); T_{topn.} 225-229 °C (metanol); IR (KBr) v: 3216, 2206, 1620, 1246, 969 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,63 (d, 4H, *J* = 4,4 Hz, morfolina), 3,70 (d, 4H, *J* = 4,4 Hz, morfolina), 6,51 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-6), 7,52 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-5), 12,78 (s, 1H, NH) ppm.

Metody ogólne syntezy związków **8a** - **y**

Metoda A:

Do roztworu związku odpowiednio **4a** - **c** (2 mmole) w MeOH (15 ml) dodano roztwór KOH (3,2 mmola) i odpowiedniego tiofenolu, merkaptanu benzylowego lub 2-aminoetanotolu (2,7 mmola) w MeOH (10 ml). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h, następnie wytrącone osady odsączono i przekrystalizowano z MeOH.

Metoda B:

Odpowiedni związek **7a** - **c** (1,3 mmola) rozpuszczono w roztworze KOH (2,6 mmola) w 15 ml EtOH/H₂O (2:1). Po ochłodzeniu do mieszaniny reakcyjnej dodano odpowiedniego halogenku (2 mmole) i pozostawiono w temperaturze otoczenia, przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 3 h lub ogrzewano przez 30 min w temperaturze wrzenia. Wytrącone osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

4-Metoksy-2-(metylotio)nikotynonitryl (**8a**)

Reakcja z jodkiem metylu (metoda B). Wydajność: 48%; C₈H₈N₂OS (180,23); T_{topn.} 112-113 °C (metanol); IR (KBr) v: 2932, 2222, 1564, 1462, 1304, 1253, 1043, 966, 811 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,98 (s, 3H, SCH₃), 4,03 (s, 3H, OCH₃), 6,56 (d, 1H, *J* = 6,1 Hz, H-5), 8,19 (d, 1H, *J* = 6,1 Hz, H-6) ppm.

4-Metoksy-2-(fenylotio)nikotynonitryl (8b)

Reakcja z tiofenolem (metoda A). Wydajność: 34%; C₁₃H₁₀N₂OS (242,30); T_{topn.} 152-154 °C (metanol); IR (KBr) v: 2221, 1566, 1468, 1308, 755 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,98 (s, 3H, OCH₃), 6,64 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-5), 7,42 – 7,60 (m, 5H, Ph), 8,32 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-6) ppm.

4-Metoksy-2-(2-metoksyfenylotio)nikotynonitryl (8c)

Reakcja z 2-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 52%; C₁₄H₁₂N₂O₂S (272,32); T_{topn.} 160-163 °C (metanol); IR (KBr) v: 2842, 2220, 1561, 1436, 1034, 761 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,76 (s, 3H, OCH₃), 4,03 (s, 3H, OCH₃), 7,01 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-5), 7,15 - 7,57 (m, 4H, Ph), 8,38 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-6) ppm.

4-Metoksy-2-(3-metoksyfenylotio)nikotynonitryl (8d)

Reakcja z 3-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 55%; C₁₄H₁₂N₂O₂S (272,32); T_{topn.} 119-120 °C (metanol); IR (KBr) v: 2838, 2218, 1560, 1431, 1252, 1034 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,80 (s, 3H, OCH₃), 4,03 (s, 3H, OCH₃), 7,05 – 7,45 (m, 5H, Ph + H-5), 8,45 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-6) ppm.

4-Metoksy-2-(4-metoksyfenylotio)nikotynonitryl (8e)

Reakcja z 4-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 40%; C₁₄H₁₂N₂O₂S (272,32); T_{topn.} 183-185 °C (metanol); IR (KBr) v: 2845, 2215, 1564, 1468, 1249, 1034 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,84 (s, 3H, OCH₃), 4,02 (s, 3H, OCH₃), 7,05 (d, 2H, J = 6,8 Hz, Ph), 7,09 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-5), 7,51 (d, 2H, J = 6,8 Hz, Ph), 8,39 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-6) ppm.

2-(4-Fluorofenylotio)-4-metoksynikotynonitryl (8f)

Reakcja z 4-fluoro-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 50%; C₁₃H₉FN₂OS (260,29); T_{topn.} 160-162 °C (metanol); IR (KBr) v: 3082, 2223, 1561, 1494, 1240, 1036, 827 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,04 (s, 3H, OCH₃), 7,15 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-5), 7,31 – 7,70 (m, 4H, Ph), 8,43 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-6) ppm.

2-Benzylotio-4-metoksynikotynonitryl (8g)

Reakcja z merkaptanem benzylovym (metoda A). Wydajność: 48%; C₁₄H₁₂N₂OS (256,32); T_{topn.} 92-94 °C (metanol); IR (KBr) v: 2920, 2220, 1559, 1471, 1365, 1304, 1039, 695 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,02 (s, 3H, OCH₃), 4,56 (s, 2H, CH₂), 7,13 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-5), 7,28 – 7,47 (m, 5H, Ph), 8,62 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-6) ppm.

2-Metylotio-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8h)

Reakcja z jodkiem metylu (metoda B). Wydajność: 85%; C₁₁H₁₃N₃S (219,31); T_{topn.} 118-119 °C (metanol); IR (KBr) v: 2973, 2872, 2194, 1573, 1334, 1008, 787 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃)

δ : 1,96 – 2,03 (m, 4H, pirolidyna), 2,54 (s, 3H, SCH₃), 3,62 – 3,69 (m, 4H, pirolidyna), 6,18 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-5), 8,00 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6) ppm.

2-Etylotio-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8i)

Reakcja z jodkiem etylu (metoda B). Wydajność: 71%; C₁₂H₁₅H₃S (233,33); T_{topn.} 92-93 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν : 2959, 2863, 2200, 1576, 1330, 1004, 792 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,36 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH₃), 1,97 (m, 4H, pirolidyna), 3,19 (q, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH₂), 3,63 (m, 4H, pirolidyna), 6,18 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-5), 8,00 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-6) ppm.

2-(2-Aminoetylotio)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8j)

Reakcja z 2-aminoetanotiolem (metoda A). Wydajność: 82%; C₁₂H₁₆N₄S (248,35); T_{topn.} 129-130 °C (metanol); IR (KBr) ν : 2976, 2871, 2200, 1581, 1335, 1006, 805 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,41 (sz.s, 2H, NH₂), 2,02 (m, 4H, pirolidyna), 2,97 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, CH₂), 3,29 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, CH₂), 3,64 (m, 4H, pirolidyna), 6,17 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-5), 7,95 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6) ppm.

2-[2-(Dietyloamino)etylotio]-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8k)

Reakcja z 2-chloro-*N,N*-dietyloaminoetanem (metoda B – ogrzewanie 30 min.). Wydajność: 90%; C₁₆H₂₄N₄S (304,45); T_{topn.} 62-63 °C (metanol); IR (KBr) ν : 2967, 2858, 2200, 1582, 1497, 1334, 1005, 805 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,07 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz, 2CH₃), 2,01 (m, 4H, pirolidyna), 2,57 (q, 4H, $J = 7,1$ Hz, 2NCH₂), 2,75 (m, 2H, CH₂), 3,25 (m, 2H, CH₂), 3,64 (m, 4H, pirolidyna), 6,15 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-5), 7,95 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6) ppm.

4-(Pirolidyn-1-ylo)-2-[2-(pirolidyn-1-ylo)etylotio]nikotynonitryl (8l)

Reakcja z 1-(2-chloroetylo)pirolidyną (metoda B - ogrzewanie 30 min.). Wydajność: 76%; C₁₆H₂₂N₄S (302,44); T_{topn.} 93-94 °C (metanol); IR (KBr) ν : 2961, 2873, 2782, 2201, 1581, 1498, 1334, 1006, 806 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,78 (m, 4H, pirolidyna), 1,96 (m, 4H, pirolidyna), 2,57 (m, 4H, pirolidyna), 2,76 (t, 2H, $J = 5,9$ Hz, CH₂), 3,34 (t, 2H, $J = 5,9$ Hz, CH₂), 3,63 (m, 4H, pirolidyna), 6,16 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-5), 7,96 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6) ppm.

2-[2-(Morfolin-4-ylo)etylotio]-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8m)

Reakcja z 4-(2-chloroetylo)morfoliną (metoda B - ogrzewanie 30 min.). Wydajność: 46%; C₁₆H₂₂N₄OS (318,44); T_{topn.} 120-121 °C (metanol); IR (KBr) ν : 2977, 2861, 2816, 2201, 1579, 1497, 1334, 1113, 1006, 807 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,99 (m, 4H, pirolidyna), 2,54 (m, 4H, morfolina), 2,68 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂), 3,34 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂), 3,61 – 3,74 (m, 8H, pirolidyna + morfolina), 6,16 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-5), 7,95 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6) ppm.

2-Fenylotio-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8m)

Reakcja z tiofenolem (metoda A). Wydajność: 21%; C₁₆H₁₅N₃S (281,38); T_{topn.} 194-195 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2873, 2201, 1577, 1497, 1329, 1268, 1133, 1002, 806, 756, 692, 507 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,60 (m, 4H, pirolidyna), 6,40 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-5), 7,41 (m, 5H, Ph), 7,84 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-6) ppm.

2-(2-Metoksyfenylotio)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8n)

Reakcja z 2-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 15%; C₁₇H₁₇N₃OS (311,40); T_{topn.} 168-170 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2964, 2202, 1584, 1495, 1332, 1255, 1004, 816, 754 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,64 (m, 4H, pirolidyna), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 6,41 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-5), 6,94 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz, Ph), 7,12 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz, Ph), 7,45 (t, 2H, *J* = 7,4 Hz, Ph), 7,79 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-6) ppm.

2-(3-Metoksyfenylotio)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8o)

Reakcja z 3-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 96%; C₁₇H₁₇N₃OS (311,40); T_{topn.} 150-152 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2854, 2200, 1581, 1495, 1333, 1259, 1178, 1002, 832, 805, 526 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,56 (m, 4H, pirolidyna), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 6,44 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-5), 7,02 – 7,30 (m, 4H, Ph), 7,90 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-6) ppm.

2-(4-Metoksyfenylotio)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8p)

Reakcja z 4-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 40%; C₁₇H₁₇N₃OS (311,40); T_{topn.} 158-159 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2969, 2203, 1590, 1500, 1330, 1236, 1039, 1004, 815, 768, 691, 567 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,55 (m, 4H, pirolidyna), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 6,41 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-5), 6,96 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz, Ph), 7,39 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz, Ph), 7,81 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-6) ppm.

2-(4-Fluorofenylotio)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8r)

Reakcja z 4-fluoro-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 17%; C₁₆H₁₄FN₃S (299,37); T_{topn.} 177-179 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2869, 2199, 1579, 1506, 1455, 1330, 1219, 1154, 1003, 829, 515 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,59 (m, 4H, pirolidyna), 6,43 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-5), 7,21 (m, 2H, Ph), 7,51 (m, 2H, Ph), 7,83 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-6) ppm.

2-Benzylotio-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (8s)

Reakcja z merkaptanem benzylovym (metoda A). Wydajność: 40%; C₁₇H₁₇N₃S (295,40); T_{topn.} 135-136 °C (metanol); IR (KBr) ν: 2868, 2199, 1578, 1497, 1330, 1272, 1139, 1079, 1007, 790, 713, 698 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,54 (m, 4H,

pirolidyna), 4,42 (s, 2H, CH₂), 6,44 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-5), 7,20 – 7,42 (m, 5H, Ph), 8,05 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-6) ppm.

2-Metylotio-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (8t)

Reakcja z jodkiem metylu (metoda B). Wydajność: 66%; C₁₁H₁₃N₃OS (235,31); T_{topn.} 118-121 °C (metanol); IR (KBr) v: 2984, 2212, 1564, 1465, 1359, 1237, 1118, 1067, 961, 817, 666, 574 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,59 (s, 3H, SCH₃), 3,43 (t, 4H, *J* = 4,6 Hz, morfolina), 3,85 (t, 4H, *J* = 4,6 Hz, morfolina), 6,46 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-5), 8,24 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-6) ppm.

4-(Morfolin-4-ylo)-2-[2-(pirolidyn-1-ylo)etylotio]nikotynonitryl (8u)

Reakcja z 1-(2-chloroetylo)pirolidyną (metoda B - ogrzewanie 30 min.). Wydajność: 63%; C₁₆H₂₂N₄OS (318,44); T_{topn.} 117-120 °C (metanol); IR (KBr) v: 2960, 2792, 2208, 1566, 1480, 1349, 1242, 1114, 967, 819, 565 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,83 (sz.s, 4H, pirolidyna), 2,67 (m, 4H, morfolina), 2,83 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz, CH₂), 3,38 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz, CH₂), 3,43 (m, 4H, morfolina), 3,85 (m, 4H, pirolidyna), 6,45 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-5), 8,24 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-6) ppm.

4-(Morfolin-4-ylo)-2-[2-(morfolin-4-ylo)etylotio]nikotynonitryl (8w)

Reakcja z 4-(2-chloroetylo)morfoliną (metoda B - ogrzewanie 30 min.). Wydajność: 78%; C₁₆H₂₂N₄O₂S (334,44); T_{topn.} 109-111 °C (metanol/woda); IR (KBr) v: 2958, 2860, 2212, 1559, 1451, 1304, 1115, 968, 809, 576 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,57 (m, 4H, morfolina), 2,71 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH₂), 3,42 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH₂), 3,46 (m, 4H, morfolina), 3,74 (m, 4H, morfolina), 3,87 (m, 4H, morfolina), 6,45 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-5), 8,23 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-6) ppm.

2-(4-Metoksyfenylotio)-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (8x)

Reakcja z 4-metoksy-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 80%; C₁₇H₁₇N₃O₂S (327,40); T_{topn.} 159-162 °C (metanol); IR (KBr) v: 2971, 2856, 2206, 1590, 1491, 1447, 1245, 1112, 965, 824, 783, 574 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,34 (m, 4H, morfolina), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 3,89 (m, 4H, morfolina), 6,45 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-5), 7,26 – 7,47 (m, 4H, Ph), 8,12 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-6) ppm.

2-(4-Fluorofenylotio)-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (8y)

Reakcja z 4-fluoro-tiofenolem (metoda A). Wydajność: 50%; C₁₆H₁₄FN₃OS (315,37); T_{topn.} 135-138 °C (metanol); IR (KBr) v: 2854, 2203, 1567, 1487, 1340, 1217, 1119, 966, 830, 638, 519 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,51 (t, 4H, *J* = 4,6 Hz, morfolina), 3,89 (t, 4H, *J* = 4,6 Hz, morfolina), 6,51 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-5), 7,14 – 7,56 (m, 4H, Ph), 8,15 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-6) ppm.

Metody ogólne syntezy związków 9a - h

Metoda A dla związków 9a i 9f

2-Bromo-4-metoksynikotynonitryl (**4a**) lub 2-bromo-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (**4c**) (3 mmole) rozpuszczono w DMF (20 ml) i w wodnym roztworze KOH (3 mmole/3 ml). Następnie do roztworu dodano tioglikolanu metylu (3 mmole) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Osad wytrącono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej lodu (20 g), następnie odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

Ester metylowy kwasu 2-(3-cyjano-4-metoksypirydyn-2-ylo)tiooctowego (9a)

Wydajność: 54%; C₁₀H₁₀N₂O₃S (238,26); T_{topn.} 129-131 °C (metanol/woda); IR (KBr) v: 2225, 1735, 1673, 1559, 1475, 1303, 1163, 1042, 1025, 825 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,75 (s, 3H, OCH₃), 4,00 (s, 3H, OCH₃), 4,11 (s, 2H, CH₂), 6,68 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-5), 8,43 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6) ppm.

Ester metylowy kwasu 2-[3-cyjano-4-(morfolin-4-ylo)pirydyn-2-ylo]tiooctowego (9f)

Wydajność: 58%; C₁₃H₁₅N₃O₃S (293,34); T_{topn.} 112-115 °C (metanol); IR (KBr) v: 2991, 2211, 1739, 1561, 1445, 1303, 1153, 1113, 966, 821, 579 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,49 (m, 4H, morfolina), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,98 (m, 4H, morfolina), 4,03 (s, 2H, CH₂), 6,58 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-5), 8,20 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6) ppm.

Metoda B dla związków 9b - e, 9g - h

Odpowiedni związek **7a - c** (2 mmole) rozpuszczono w DMF (15 ml) i w wodnym roztworze KOH (4 mmole/4 ml) lub (6 mmoli/6 ml dla związków **9d** i **9e**). Następnie dodano chlorowodorku 1-(2-chloroacetylo)-4-fenylopiiperazyny (dla **9b** i **9d**), chlorowodorku 1-(2-chloroacetylo)-4-(pirydyn-2-ylo)piiperazyny (dla **9c** i **9g**), chlorowodorku 1-(2-chloroacetylo)-4-(4-fluorofenylo)piiperazyny (dla **9e** i **9h**) (2 mmole) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Osad wytrącono przez dodanie lodu (20 g), następnie odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

1-[(3-Cyjano-4-metoksypirydyn-2-ylo)tioacetylo]-4-fenylopiiperazyna (9b)

Wydajność: 26%; C₁₉H₂₀N₄O₂S (368,45); T_{topn.} 188-190 °C (metanol); IR (KBr) v: 2828, 2218, 1629, 1559, 1472, 1309, 1233, 1153, 1043, 812, 761, 691 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,21 (m, 4H, piiperazyna), 3,84 (m, 4H, piiperazyna), 3,97 (s, 3H, OCH₃), 4,23 (s, 2H, CH₂), 6,64 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-5), 6,94 – 7,35 (m, 5H, Ph), 8,37 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-6) ppm.

1-[(3-Cyjano-4-metoksypirydyn-2-ylo)tioacetylo]-4-(pirydyn-2-ylo)piiperazyna (9c)

Wydajność: 21%; C₁₈H₁₉N₅O₂S (369,44); T_{topn.} 203-205 °C (metanol); IR (KBr) v: 2846, 2217, 1628, 1560, 1474, 1306, 1236, 1158, 1046, 979, 810, 781, 735 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 3,45 – 3,65 (m, 8H, piiperazyna), 3,98 (s, 3H, OCH₃), 4,36 (s, 2H, CH₂), 6,67 (dd, 1H, J₁

= 5,0 Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, H-5'), 6,85 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-3'), 7,05 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-5), 7,55 (m, 1H, H-4'), 8,12 (dd, 1H, $J_1 = 1,5$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, H-6'), 8,49 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-6) ppm.

1-[[3-Cyjano-4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]tioacetylo]-4-fenylo piperazyna (9d)

Wydajność: 41%; $C_{22}H_{25}N_5OS$ (407,53); $T_{\text{topn.}}$ 178-180 °C (metanol); IR (KBr) ν : 2821, 2206, 1635, 1576, 1494, 1334, 1224, 1006, 803, 767, 699 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1,88 (m, 4H, pirolidyna), 3,12 (m, 4H, piperazyna), 3,55 (m, 4H, pirolidyna), 3,70 (m, 4H, piperazyna), 4,23 (s, 2H, CH_2), 6,42 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-5), 6,76 – 6,97 (m, 5H, Ph), 8,01 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-6) ppm.

1-[[3-Cyjano-4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]tioacetylo]-4-(4-fluorofenylo) piperazyna (9e)

Wydajność: 82%; $C_{22}H_{24}FN_5OS$ (425,52); $T_{\text{topn.}}$ 172-173 °C (etanol); IR (KBr) ν : 2917, 2206, 1635, 1576, 1496, 1443, 1220, 1006, 834, 801 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,05 (m, 4H, piperazyna), 3,54 – 3,69 (m, 8H, pirolidyna + piperazyna), 4,22 (s, 2H, CH_2), 6,41 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-5), 6,95 (m, 4H, Ph), 7,97 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-6) ppm.

1-[[3-Cyjano-4-(morfolin-4-ylo)pirydyn-2-ylo]tioacetylo]-4-(pirydyn-2-ylo) piperazyna (9g)

Wydajność: 49%; $C_{21}H_{24}N_6O_2S$ (424,52); $T_{\text{topn.}}$ 102-105 °C (metanol); IR (KBr) ν : 2914, 2202, 1639, 1566, 1479, 1352, 1116, 969, 774, 576 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3,44 – 3,87 (4m, 16H, morfolina + piperazyna), 4,20 (s, 2H, CH_2), 6,47 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-5), 6,65 (m, 2H, pirydyna), 7,54 (m, 2H, pirydyna), 8,18 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-6), ppm.

1-[[3-Cyjano-4-(morfolin-4-ylo)pirydyn-2-ylo]tioacetylo]-4-(4-fluorofenylo) piperazyna (9h)

Wydajność: 66%; $C_{22}H_{24}FN_5O_2S$ (441,52); $T_{\text{topn.}}$ 109-112 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν : 2911, 2218, 1640, 1509, 1441, 1349, 1232, 1117, 967, 833, 574 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3,07 – 3,87 (3m, 16H, morfolina + piperazyna), 4,20 (s, 2H, CH_2), 6,47 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-5), 6,87 (m, 4H, Ph), 8,18 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-6) ppm.

Metody ogólne syntezy związków 10a - p

Metoda A dla związków 10 e, f, g

2-Bromo-4-metoksynikotynonitryl (**4a**) (0,213 g, 1 mmol) rozpuszczono w DMF (15 ml) i w wodnym roztworze KOH (0,056g, 1 mmol/3 ml). Następnie dodano tioglikolanu metylu (0,106 g, 1 mmol dla związku **10e**), *N*-(4-chlorofenylo)-2-merkptoacetamidu (0,201 g, 1 mmol dla związku **10f**), *N*-(3,4-dimetylofenylo)-2-merkptoacetamidu (0,195 g, 1 mmol dla związku **10g**) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Ponownie dodano wodny roztwór KOH (0,056 g, 1 mmol/3 ml) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 45 min. Osad wytrącono przez dodanie lodu (10 g), następnie odsączono i przekryształizowano.

Ester metylowy kwasu 3-amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyowego (10e)

Wydajność: 46%; C₁₀H₁₀N₂O₃S (238,26); T_{topn.} 162-164 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3501, 3355, 2946, 1678, 1603, 1512, 1436, 1287, 1127, 1037, 842, 763, 573 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,76 (s, 3H, OCH₃), 4,01 (s, 3H, OCH₃), 6,95 (s, 2H, NH₂), 7,01 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-5), 8,48 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-*N*-(4-chlorofenylo)-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyamid (10f)

Wydajność: 58%; C₁₅H₁₂ClN₃O₂S (333,79); T_{topn.} 285-287 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3471, 3331, 3251, 1637, 1581, 1489, 1314, 1241, 1043, 841, 803 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,01 (s, 3H, OCH₃), 6,99 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-5), 7,17 (s, 2H, NH₂), 7,33 (m, 2H, Ph), 7,69 (m, 2H, Ph), 8,48 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-6), 9,47 (s, 1H, NH) ppm.

3-Amino-*N*-(3,4-dimetylofenylo)-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyamid (10g)

Wydajność: 50%; C₁₇H₁₇N₃O₂S (327,40); T_{topn.} 225-227 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3462, 3325, 3248, 1636, 1588, 1500, 1313, 1258, 1046, 802, 756 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,17 (s, 3H, CH₃), 2,20 (s, 3H, CH₃), 4,02 (s, 3H, OCH₃), 7,02 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-5), 7,06 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, Ph), 7,11 (s, 2H, NH₂), 7,36 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, CH), 7,46 (s, 1H, Ph), 8,48 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-6), 9,18 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda B dla związków 10a, 10c, d, 10h - j, 10l - m, 10o, p

Odpowiedni związek **7a - c** (2 mmole) rozpuszczono w DMF (15 ml) i w wodnym roztworze KOH (4 mmole) lub (6 mmoli dla związku **10h** i **10i**). Następnie dodano 2-bromo-1-fenyletanonu (2 mmole dla **10a, j, m**), 2-chloroacetamidu (2 mmole dla **10c, l, o**), estru etylowego kwasu 2-chlorooctowego (2 mmole dla **10d, k, p**), chlorowodoru 1-(2-chloroacetylo)-4-metylopiperazyny (2 mmol, dla **10h**), chlorowodoru 1-(2-chloroacetylo)-4-(4-fluorofenylo)piperazyny (2 mmol, dla **10i**) i mieszano w temperaturze otoczenia od 20 do 30 min. Wytrącony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

3-Amino-2-benzoilo-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyna (10a)

Wydajność: 52%; C₁₅H₁₂N₂O₂S (284,33); T_{topn.} 145-147 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3490, 3447, 3308, 1602, 1488, 1452, 1323, 1039, 809, 725, 693 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,06 (s, 3H, OCH₃), 7,04 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 7,51 – 7,59 (m, 3H, Ph), 7,75 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, Ph), 8,12 (sz.s, 2H, NH₂), 8,52 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyamid (10c)

Wydajność: 14%; C₉H₉N₃O₂S (223,25); T_{topn.} 238-240 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3488, 3325, 3144, 1667, 1583, 1503, 1289, 1045, 743, 478 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,99 (s, 3H, OCH₃), 6,94 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-5), 6,97 (s, 2H, NH₂), 7,05 (s, 2H, NH₂), 8,43 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-6) ppm.

Ester etylowy kwasu 3-amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydino-2-karboksyłowego (10d)

Wydajność: 33%; C₁₁H₁₂N₂O₃S: (252,29); T_{topn.} 123-124 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3502, 3368, 2979, 1671, 1566, 1509, 1366, 1290, 1131, 1043, 972, 764, 571 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,26 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz, CH₃), 4,02 (s, 3H, OCH₃), 4,22 (q, 2H, *J* = 7,3 Hz, CH₂), 6,94 (s, 2H, NH₂), 7,01 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 8,49 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

(3-Amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyn-2-ylo)(4-metylopiperazyn-1-ylo)metanon (10h)

Wydajność: 47%; C₁₄H₁₈N₄O₂S (306,38); T_{topn.} 174-176 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3481, 3346, 2847, 2792, 1617, 1591, 1499, 1424, 1295, 1141, 1050, 1002, 807, 752 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,18 (s, 3H, CH₃), 2,31 (s, 4H, piperazyna), 3,60 (s, 4H, piperazyna), 4,01 (s, 3H, OCH₃), 6,24 (s, 2H, NH₂), 6,93 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 8,38 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

(3-Amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyn-2-ylo)[4-(4-fluorofenylo)piperazyn-1-ylo]metanon (10i)

Wydajność: 50%; C₁₉H₁₉FN₄O₂S (386,44); T_{topn.} 152-153 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3494, 3328, 2850, 1586, 1511, 1432, 1291, 1159, 1059, 1010, 823, 523 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,11 (m, 4H, piperazyna), 3,72 (m, 4H, piperazyna), 4,00 (s, 3H, OCH₃), 6,38 (s, 2H, NH₂), 6,97 – 7,06 (m, 5H, Ph + H-5), 8,43 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-2-benzoilo-4-(pirolidyn-1-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydyna (10j)

Wydajność: 62%; C₁₈H₁₇N₃OS (323,41); T_{topn.} 249-252 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3349, 3064, 2851, 1589, 1550, 1349, 1307, 1271, 1128, 1064, 1004, 927, 790, 732, 542 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,37 (m, 4H, pirolidyna), 6,83 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-5), 7,52 – 7,71 (m, 5H, Ph), 8,09 (s, 2H, NH₂), 8,23 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-4-(pirolidyn-1-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydino-2-karboksyamid (10l)

Wydajność: 50%; C₁₂H₁₄N₄OS (262,33); T_{topn.} 264-266 °C (etanol/woda); IR (KBr) ν: 3428, 3295, 3133, 2831, 1673, 1611, 1582, 1502, 1371, 1339, 1112, 1056, 1002, 617, 485 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,29 (m, 4H, pirolidyna), 6,86 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-5), 6,95 (s, 2H, NH₂), 7,10 (s, 2H, NH₂), 8,25 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-6) ppm.

Ester etylowy kwasu 3-amino-4-(pirolidyn-1-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydino-2-karboksyłowego (10k)

Wydajność: 25%; C₁₄H₁₇N₃O₂S (291,37); T_{topn.} 137-139 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3374, 3248, 2851, 1666, 1615, 1561, 1370, 1289, 1150, 1087, 1064, 1009, 806 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,23 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, CH₃), 1,90 (m, 4H, pirolidyna), 3,30 (m, 4H, pirolidyna), 4,20 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 6,82 (s, 2H, NH₂), 6,85 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-5), 8,25 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-2-benzoilo-4-(morfolin-4-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydyna (10m)

Wydajność: 49%; C₁₈H₁₇N₃O₂S (339,41); T_{topn.} 240-243 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3407, 3292, 2953, 1596, 1550, 1433, 1240, 1118, 970, 941, 728, 693, 630, 540 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,59 (m, 4H, morfolina), 3,88 (m, 4H, morfolina), 6,92 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 7,49 (m, 3H, Ph), 7,85 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, Ph), 7,90 (s, 2H, NH₂), 8,55 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-4-(morfolin-4-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyamid (10o)

Wydajność: 61%; C₁₂H₁₄N₄O₂S (278,33); T_{topn.} 225-228 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3434, 3320, 3144, 1660, 1580, 1501, 1373, 1245, 1114, 968, 737, 479 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,10 (m, 4H, morfolina), 3,76 (m, 4H, morfolina), 5,29 (s, 2H, NH₂), 6,88 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 6,96 (s, 2H, NH₂), 8,52 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

Ester etylowy kwasu 3-amino-4-(morfolin-4-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydyno-2-karboksyłowego (10p)

Wydajność: 78%; C₁₄H₁₇N₃O₃S (307,37); T_{topn.} 143-146 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3466, 3355, 2859, 1660, 1588, 1367, 1292, 1113, 970, 767, 622, 483 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,39 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, CH₃), 3,41 (s, 4H, morfolina), 3,96 (s, 4H, morfolina), 4,36 (q, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH₂), 6,66 (s, 2H, NH₂), 6,93 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 8,49 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

Metoda C dla związków 10b, k, n

Odpowiedni związek **7a - c** (2 mmole) rozpuszczono w DMF (15 ml) i w wodnym roztworze KOH (4 mmole), a następnie dodano 3-chloro-2,4-pentadionu (0,23 ml, 2 mmole) i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 min (dla **10b**) lub ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 2 h. Roztwór zagęszczono, dodano lodu (10 g) i pozostawiono w temperaturze otoczenia przez 12 h. Uformowany osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

2-Acetylo-3-amino-4-metoksytieno[2,3-*b*]pirydyna (10b)

Wydajność: 67%; C₁₀H₁₀N₂O₂S (222,26); T_{topn.} 138-141 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3426, 3326, 1606, 1579, 1496, 1460, 1367, 1295, 1050, 803, 720, 576 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,30 (s, 3H, CH₃), 4,02 (s, 3H, OCH₃), 7,02 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-5), 7,49 - 7,81 (sz.s, 2H, NH₂), 8,53 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-6) ppm.

2-Acetylo-3-amino-4-(pirolidyn-1-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydyna (10k)

Wydajność: 35%; C₁₃H₁₅N₃OS (261,34); T_{topn.} 109-112 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3448, 3300, 2853, 1580, 1482, 1303, 1001, 962, 835, 474 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,87

(m, 4H, pirolidyna), 2,48 (s, 3H, CH₃), 3,28 (m, 4H, pirolidyna), 6,83 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-5), 7,63 (s, 2H, NH₂), 8,25 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-6) ppm.

2-Acetylo-3-amino-4-(morfolin-4-ylo)tieno[2,3-*b*]pirydyna (10n)

Wydajność: 51%; C₁₃H₁₅N₃O₂S (277,34); T_{topn.} 155-158 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3456, 3341, 2955, 1615, 1554, 1438, 1304, 1115, 967, 831, 535, 478 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 2,47 (s, 3H, CH₃), 3,52 (m, 4H, morfolina), 3,94 (m, 4H, morfolina), 6,92 (s, 1H, H-5), 7,48 (sz.s, 2H, NH₂), 8,55 (s, 1H, H-6) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 11a - c

Kwas hydroksyloamino-*O*-sulfonowy (0,226 g, 2 mmole) rozpuszczono w wodzie (5 ml) i zneutralizowano węglanem sodu (0,212 g, 2 mmole). Następnie przygotowano roztwór odpowiedniego związku **7a - c** (2 mmole) i NaOH (0,24 g, 6 mmoli) w MeOH (20 ml). Połączone oba roztwory mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Wytrącone osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

2-Aminotio-4-metoksynikotynonitryl (11a)

Wydajność: 26%; C₇H₇N₃OS (181,21); T_{topn.} 178-180 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν : 3345, 3249, 2221, 1565, 1471, 1368, 1307, 1040, 823 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 4,00 (s, 3H, OCH₃), 4,21 (s, 2H, SNH₂), 7,02 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-5), 8,63 (1H, d, $J = 6,1$ Hz, H-6) ppm.

2-Aminotio-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (11b)

Wydajność: 51%; C₁₀H₁₂N₄S (220,29); T_{topn.} 160-161 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3330, 3221, 2206, 1577, 1499, 1336, 1272, 1004, 797, 684 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,91 (m, 4H, pirolidyna), 3,62 (m, 4H, pirolidyna), 3,87 (s, 2H, SNH₂), 6,41 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H-5), 8,10 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H-6) ppm.

3-Amino-4-(morfolin-4-ylo)izotiazolo[5,4-*b*]pirydyna (11c)

Wydajność: 48%; C₁₀H₁₂N₄OS (236,29); T_{topn.} 208-211 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν : 3403, 3260, 2856, 1605, 1411, 1259, 1110, 968, 855, 703, 585 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 3,22 (m, 4H, morfolina), 3,94 (m, 4H, morfolina), 5,46 (sz.s, 2H, NH₂), 6,84 (1H, d, $J = 5,4$ Hz, H-5), 8,53 (1H, d, $J = 5,4$ Hz, H-6) ppm.

2-Amino-4-metoksynikotynonitryl (12a)

Związek **2** (3,54 g, 20 mmoli) zawieszono w 25% roztworze amoniaku (100 ml) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Po ochłodzeniu powstały osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z metanolu. Wydajność: 75%; C₇H₇N₃O (149,15); T_{topn.} 204-205 °C (*lit.* 211 °C).⁵²

Metoda ogólna syntezy związków 12b, c

Odpowiedni związek **4b, c** (5 mmoli) zawieszono w 25% roztworze amoniaku (30 ml). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w autoklawie w temperaturze 180-200 °C i podwyższonym ciśnieniu przez 4 h. Powstały osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

2-Amino-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (12b)

Wydajność: 54%; C₁₀H₁₂N₄ (188,23); T_{topn.} 225-228 °C (benzen); IR (KBr) v: 3450, 3303, 3085, 2188, 1646, 1508, 1351, 1282, 1027, 777 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,98 (m, 4H, pirolidyna), 3,64 (m, 4H, pirolidyna), 5,20 (s, 2H, NH₂), 5,84 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-5), 7,70 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-6) ppm.

2-Amino-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (12c)

Wydajność: 34%; C₁₀H₁₂N₄O (204,23); T_{topn.} 132-135 °C (metanol/woda); IR (KBr) v: 3436, 3317, 3218, 2855, 2200, 1640, 1567, 1376, 1249, 1116, 1004, 895, 794, 605, 518 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,49 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 3,85 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 5,36 (s, 2H, NH₂), 6,15 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-5), 7,93 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-6) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 13a - i

Odpowiedni związek **4b, c** (5 mmoli) rozpuszczono w dioksanie (3 - 10 ml), a następnie dodano odpowiednią aminę (10 mmoli): pirolidynę (dla związku **13b, g**), morfolinę (dla związku **13a, f**), piperydynę (dla związku **13c**), 2-hydroksyetyloaminę (dla związku **13e, h**), tryptaminę (dla związku **13d**), fenylopiperazynę (dla związku **13i**) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Roztwór zagęszczono, dodano lodu i przeprowadzono ekstrakcję chlorkiem metylenu, a następnie suszono bezwodnym siarczanem magnezu przez 24 h. Po odsączeniu środka suszającego roztwór zagęszczono i ponownie dodano lodu (20 g). Wytrącony osad po odsączeniu oczyszczono przez krystalizację.

2-(Morfolin-4-ylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (13a)

Wydajność: 88%; C₁₄H₁₈N₄O (258,32); T_{topn.} 130-131 °C (metanol); IR (KBr) v: 2957, 2849, 2192, 1578, 1404, 1238, 1115, 1022, 803 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,01 (m, 4H, pirolidyna), 3,48 – 3,62 (2m, 8H, morfolina + pirolidyna), 3,82 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 6,05 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-5), 7,85 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-6) ppm.

2,4-Di(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (13b)

Wydajność: 75%; C₁₄H₁₈N₄ (242,32); T_{topn.} 79-80 °C (metanol); IR (KBr) v: 2970, 2860, 2188, 1571, 1450, 1395, 1315, 1155, 778 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,94 (m, 8H, pirolidyna), 3,57 (t, 4H, J = 6,6 Hz, pirolidyna), 3,63 (t, 4H, J = 6,6 Hz, pirolidyna), 5,89 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-5), 7,81 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-6) ppm.

2-(Piperydyn-1-ylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (13c)

Wydajność: 81%; C₁₅H₂₀N₄ (256,35); T_{topn.} 121-122 °C (metanol); IR (KBr) v: 2930, 2821, 2199, 1583, 1502, 1399, 1245, 1014, 787 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,71 (m, 6H, piperydyna), 2,01 (m, 4H, pirolidyna), 3,47 – 3,62 (m, 8H, pirolidyna + piperydyna), 5,99 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-5), 7,85 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-6) ppm.

2-[2-(1H-Indol-3-ylo)etyloamino]-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (13d)

Wydajność: 68%; C₂₀H₂₁N₅ (331,41); T_{topn.} 205-208 °C (benzen); IR (KBr) v: 3337, 3163, 2924, 2873, 2204, 1590, 1499, 1351, 1280, 779, 734 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,98 (m, 4H, pirolidyna), 3,13 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 3,64 (m, 4H, pirolidyna), 3,92 (m, 2H, CH₂), 5,38 (s, 1H, NH), 5,84 (d, 1H, J = 6,8 Hz, H-5), 7,14 - 7,36 (3m, 4H, Ph), 7,64 (d, 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 7,79 (d, 1H, J = 6,8 Hz, H-6), 8,23 (s, 1H, NH) ppm.

2-(2-Hydroksyetyloamino)-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (13e)

Wydajność: 57%; C₁₂H₁₆N₄O (232,28); T_{topn.} 109-110 °C (benzen); IR (KBr) v: 3414, 3290, 2876, 2188, 1596, 1505, 1279, 1051, 776 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,02 (m, 4H, pirolidyna), 3,64 (m, 6H, CH₂ + pirolidyna), 3,80 (m, 2H, CH₂), 5,02 – 5,51 (sz.s, 1H, OH), 5,61 (s, 1H, NH), 5,85 (d, 1H, J = 6,4 Hz, H-5), 7,69 (d, 1H, J = 6,4 Hz, H-6) ppm.

2,4-Di(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (13f)

Wydajność: 53%; C₁₄H₁₈N₄O₂ (274,32); T_{topn.} 158-161 °C (metanol); IR (KBr) v: 2964, 2848, 2200, 1574, 1538, 1425, 1239, 1112, 997, 927, 852, 689 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,42 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 3,56 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 3,85 (m, 8H, morfolina), 6,25 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-5), 8,05 (d, 1H, J = 5,9 Hz, H-6) ppm.

4-(Morfolin-4-ylo)-2-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (13g)

Wydajność: 42%; C₁₄H₁₈N₄O (258,32); T_{topn.} 114-117 °C (metanol/woda); IR (KBr) v: 2971, 2859, 2195, 1572, 1459, 1235, 1113, 1022, 948, 813, 640 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,94 (m, 4H, pirolidyna), 3,37 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 3,73 (t, 4H, J = 6,6 Hz, pirolidyna), 3,88 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 6,07 (d, 1H, J = 5,7 Hz, H-5), 8,03 (d, 1H, J = 5,7 Hz, H-6) ppm.

2-(2-Hydroksyetyloamino)-4-(morfolin-4-ylo)nikotynonitryl (13h)

Wydajność: 60%; C₁₂H₁₆N₄O₂ (248,28); T_{topn.} 90-93 °C (benzen/eter etylowy); IR (KBr) v: 3390, 3363, 2961, 2858, 2202, 1596, 1544, 1449, 1376, 1244, 1117, 1048, 1011, 804, 659, 453 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,42 (m, 4H, morfolina), 3,59 (m, 2H, CH₂), 3,66 – 3,82 (m, 6H, CH₂ + morfolina), 4,80 (sz.s, 1H, OH), 5,64 (s, 1H, NH), 6,08 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-5), 7,89 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-6) ppm.

4-(Morfolin-4-ylo)-2-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)nikotynonitryl (13i)

Wydajność: 76%; C₂₀H₂₃N₅O (349,43); T_{topn.} 155-158 °C (metanol); IR (KBr) v: 2984, 2827, 2194, 1559, 1496, 1435, 1347, 1234, 1115, 1001, 764, 698 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,34 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 3,44 (t, 4H, J = 4,4 Hz, piperazyna), 3,78 (t, 4H, J = 4,4 Hz, piperazyna), 3,89 (t, 4H, J = 4,4 Hz, morfolina), 6,24 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-5), 6,86 – 7,23 (m, 5H, Ph), 8,05 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 14a - c

Odpowiedni związek **4a - c** (10 mmoli) zawieszono w DMF-DMA (6 ml) oraz dioksanie (5 ml) i ogrzewano na łaźni olejowej, w temperaturze wrzenia przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 2 h. Po ochłodzeniu mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą (10 ml), a wytrącony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

N'-(3-Cyjano-4-metoksypirydyn-2-ylo)-N,N-dimetyloformamidyna (14a)

Wydajność: 56%; C₁₀H₁₂N₄O (204,23); T_{topn.} 108-111 °C (cykloheksan); IR (KBr) v: 3001, 2938, 2220, 1627, 1552, 1450, 1385, 1288, 1079, 818 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,04 (s, 3H, NCH₃), 3,13 (s, 3H, NCH₃), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 6,74 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-5), 8,23 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-6), 8,64 (s, 1H, CH) ppm.

N'-[3-Cyjano-4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-N,N-dimetyloformamidyna (14b)

Wydajność: 85%; C₁₃H₁₇N₅ (243,31); T_{topn.} 137–139 °C (metanol/woda); IR (KBr) v: 2923, 2862, 2199, 1615, 1572, 1480, 1363, 1266, 1115, 1076, 1035, 787 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,90 (sz.s, 4H, pirolidyna), 3,01 (s, 3H, NCH₃), 3,09 (s, 3H, NCH₃), 3,55 (sz.s, 4H, pirolidyna), 6,17 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-5), 7,79 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6), 8,54 (s, 1H, CH) ppm.

N'-[3-Cyjano-4-(morfolin-4-ylo)pirydyn-2-ylo]-N,N-dimetyloformamidyna (14c)

Wydajność: 63%; C₁₃H₁₇N₅O (259,31); T_{topn.} 99-102 °C (woda); IR (KBr) v: 2919, 2209, 1625, 1564, 1442, 1373, 1113, 1080, 1006, 909, 804, 536 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,16 (s, 3H, NCH₃), 3,18 (s, 3H, NCH₃), 3,46 (t, 4H, J = 4,6 Hz, morfolina), 3,84 (t, 4H, J = 4,6 Hz, morfolina), 6,34 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-5), 8,03 (d, 1H, J = 6,1 Hz, H-6), 8,67 (s, 1H, CH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 15a - e

Związek **14a** (2 mmole) i odpowiednią aminę (2 mmole) zawieszono w kwasie octowym (16 ml) i ogrzewano na łaźni olejowej przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym w temperaturze wrzenia przez 1 h. Po ochłodzeniu wytrącone wodą (10 ml) osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

4-(4-Chlorofenyloamino)pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (15a)

Reakcja z *p*-Cl-fenyloaminą. Wydajność: 60%; C₁₃H₉ClN₄O (272,69); T_{topn.} >270 °C (kwas octowy); IR (KBr) ν: 3443, 3263, 2925, 2833, 1626, 1571, 1486, 1274, 1227, 834 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 6,26 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz, H-6), 7,43 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,85 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,91 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz, H-7), 8,50 (s, 1H, H-2), 12,43 (s, 1H, NH), 12,86 (s, 1H, NH) ppm.

4-(3,4-Dimetylofenyloamino)pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (15b)

Reakcja z 3,4-dimetylofenyloaminą. Wydajność: 54%; C₁₅H₁₄N₄O (266,30); T_{topn.} 290-293 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3280, 3134, 3003, 2800, 1613, 1566, 1490, 1278, 1221, 841, 586 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,22 (s, 3H, CH₃), 6,23 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H-6), 7,12 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H-5'), 7,49 (s, 1H, H-2'), 7,56 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H-6'), 7,85 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H-7), 8,45 (s, 1H, H-2), 12,32 (s, 1H, NH), 12,67 (s, 1H, NH) ppm.

4-(4-Metoksy-3-nitrofenyloamino)pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (15c)

Reakcja z 4-metoksy-3-nitrofenyloaminą. Wydajność: 34%; C₁₄H₁₁N₅O₄ (313,27); T_{topn.} >340 °C (*N,N*-dimetyloformamid); IR (KBr) ν: 3424, 3104, 2916, 2852, 1650, 1562, 1494, 1331, 1266, 1033, 831, 571 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,86 (s, 3H, OCH₃), 6,24 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H-6), 7,35 (dd, 1H, *J*₁ = 9,1 Hz, *J*₂ = 2,9 Hz, H-6'), 7,59 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, H-2'), 7,89 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H-7), 8,20 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz, H-5'), 8,39 (s, 1H, H-2), 12,36 (s, 1H, NH), 12,93 (s, 1H, NH) ppm.

4-(2,5-Dimetylofenyloamino)pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (15d)

Reakcja z 2,5-dimetylofenyloaminą. Wydajność: 32%; C₁₅H₁₄N₄O (266,30); T_{topn.} 273-275 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3429, 3137, 2922, 1624, 1573, 1277, 893, 838, 595 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,28 (s, 6H, 2CH₃); 6,24 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-6), 6,86 (dd, 1H, *J*₁ = 1,5 Hz, *J*₂ = 7,6 Hz, H-4'), 7,14 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-3'), 7,87 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-7), 8,14 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz, H-6'), 8,45 (s, 1H, H-2), 12,33 (s, 1H, NH), 12,53 (s, 1H, NH) ppm.

4-(Benzyloamino)pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (15e)

Reakcja z benzyloaminą. Wydajność: 64%; C₁₄H₁₂N₄O (252,27); T_{topn.} 310-313 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3449, 3061, 3027, 2910, 2812, 1629, 1548, 1446, 1205, 831, 741 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,73 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz, CH₂), 6,15 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-6), 7,32 (m, 5H, Ph), 7,78 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-7), 8,31 (s, 1H, H-2), 10,60 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz, NH), 12,10 (s, 1H, NH) ppm.

4-(4-Chlorofenyloamino)-8-metylopirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-on (16)

Związek **15a** (0,544 g, 2 mmole) rozpuszczono w roztworze KOH (0,145 g, 2,6 mmola) (20 ml MeOH/ H₂O 1:1) i dodano jodku metylu (0,16 ml, 2,6 mmol). Roztwór pozostawiono w

temperaturze otoczenia przy ciągłym mieszaniu elektromagnetycznym. Po 40 min wydzielony osad odsączono i przekryształizowano z MeOH. Wydajność: 69%; C₁₄H₁₁ClN₄O (286,72); T_{topn.} 213-215 °C; IR (KBr) ν: 3441, 2923, 1626, 1550, 1483, 1268, 829, 463 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,85 (s, 3H, OCH₃), 6,41 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-6), 7,37 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,56 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-7), 7,78 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ph), 8,59 (s, 1H, H-2), 12,86 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 17a - d

Odpowiedni związek **4b**, **c** (5 mmoli) rozpuszczono w EtOH (10 ml) i dodano 1 ml 99% wodzianu hydrazyny (dla związku **17a** i **c**) lub metylohydrazyny (dla związku **17b** i **d**). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano od 1,5 h do 10 h. Po ochłodzeniu osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację, natomiast dla związku **17b** po zagęszczeniu roztworu osad wytrącono przez dodanie lodu (20 g).

3-Amino-4-(pirolidyn-1-ylo)-1H-pirazolo[3,4-*b*]pirydyna (17a)

Wydajność: 44%; Czas ogrzewania: 1,5 h; C₁₀H₁₃N₅ (203,24); T_{topn.} 238-240 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3406, 3174, 1594, 1524, 1441, 1353, 1285, 1103, 925, 826, 784 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,93 (t, 4H, *J* = 6,2 Hz, pirolidyna), 3,57 (t, 4H, *J* = 6,2 Hz, pirolidyna), 4,70 (s, 2H, NH₂), 5,99 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-5), 7,84 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-6), 11,83 (s, 1H, NH) ppm; MS (CI) [M + 1] m/z = 204,1.

3-Amino-1-metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)-1H-pirazolo[3,4-*b*]pirydyna (17b)

Wydajność: 75%; Czas ogrzewania 10 h; C₁₁H₁₅N₅ (217,27); T_{topn.} 210-213 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3395, 3310, 3214, 2856, 1636, 1568, 1501, 1350, 1271, 1154, 1003, 783 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,02 (sz.s, 4H, pirolidyna), 3,61 (sz.s, 4H, pirolidyna), 3,87 (s, 3H, CH₃), 3,95 (s, 2H, NH₂), 6,03 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-5), 8,02 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-6) ppm.

3-Amino-4-(morfolin-4-ylo)-1H-pirazolo[3,4-*b*]pirydyna (17c)

Wydajność: 23%; Czas ogrzewania: 1,5 h; C₁₀H₁₃N₅O (219,24); T_{topn.} 241-243 °C (metanol); IR (KBr) ν 3426, 3334, 3137, 2965, 1588, 1525, 1424, 1374, 1292, 1242, 1115, 913, 813, 596 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,21 (t, 4H, *J* = 4,4 Hz, morfolina), 3,81 (t, 4H, *J* = 4,4 Hz, morfolina), 4,89 (s, 2H, NH₂), 6,33 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-5), 8,07 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6), 11,98 (s, 1H, NH) ppm.

3-Amino-1-metylo-4-(morfolin-4-ylo)-1H-pirazolo[3,4-*b*]pirydyna (17d)

Wydajność: 23%; Czas ogrzewania 10 h; C₁₁H₁₅N₅O (233,27); T_{topn.} 156-159 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν: 3391, 3288, 2859, 1619, 1563, 1420, 1244, 1116, 972, 809, 648 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,31 (t, 4H, *J* = 4,4 Hz, morfolina), 3,87 (t, 4H, *J* = 4,4 Hz,

morfolina), 3,92 (s, 3H, CH₃), 4,12 (s, 2H, NH₂), 6,34 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-5), 8,25 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6) ppm.

Amid kwasu 4-chloropikolinowego (18)

Kwas pikolinowy (20,0 g, 163 mmole) oraz KBr (2,0 g, 17 mmoli) zawieszono w SOCl₂ (70 ml, 965 mmoli) i ogrzewano we wrzeniu przez 24 h. Nadmiar SOCl₂ oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie trzykrotnie dodano po 50 ml benzenu i ponownie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano bezwodnego eteru etylowego (90 ml). Przesącz wkraplano do ochłodzonego 25% amoniaku (60 ml) przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym. Wydzielony osad odsączono, przemyto wodą i oczyszczono przez krystalizację z metanolu. Wydajność: 83%; C₆H₅ClN₂O (156,57); T_{topn.} 152-153 °C (*lit.* 162-163 °C).¹⁰⁵

4-Chloropirydino-2-karbonitryl (19)

Amid kwasu 4-chloropikolinowego (18) (5,0 g, 32 mmole) zawieszono w bezwodnym dioksanie (30 ml) i dodano POCl₃ (5 ml, 53,6 mmola). Roztwór ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1,5 h. Po zagęszczeniu do pozostałości dodano lodu (20 g), a wytrącony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z wody. Wydajność: 50%; C₆H₃ClN₂ (138,55); T_{topn.} 80-82 °C (*lit.* 84-85 °C).¹⁰⁵

Metoda ogólna syntezy związków 21a i 21b

4-Chloropirydino-2-karbonitryl (19) (0,511 g, 4 mmole) rozpuszczono w bezwodnym MeOH (10 ml), dodano DBU (0,2 ml) jako katalizatora i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 10 min. Po dodaniu karbotiohydrazynu 4-fenylopiperazyny (0,94 g, 4 mmole) (dla związku **21a**) lub karbohydrazynu 4-fenylopiperazyny (0,44 g, 4 mmole) (dla związku **21b**), mieszaninę reakcyjną doprowadzono do wrzenia i pozostawiono w temperaturze otoczenia od 2 do 5 h. Po zakwaszeniu kwasem octowym (0,3 ml), wytrącone osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

N'-[1-Amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]-4-fenylopiperazyno-1-karbotiohydrazyn (21a)

Wydajność: 52%; Czas reakcji: 5 h; C₁₇H₁₉ClN₆S (374,89); T_{topn.} 160-163 °C (dioksan); IR (KBr) ν : 3388, 3269, 2923, 1599, 1340, 1227, 1017, 758 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 3,28 (m, 4H, piperazyna), 4,18 (m, 4H, piperazyna), 6,86 (s, 2H, NH₂), 6,95 (m, 5H, Ph), 7,41 (dd, 1H, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 7,98 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-3), 8,54 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 8,58 (s, 1H, NH) ppm.

N'-[1-Amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]-4-fenylopiiperazyno-1-karbohydryd

(21b)

Wydajność: 50%; Czas reakcji 2 h; C₁₇H₁₉ClN₆O (358,83); T_{topn.} 296-298 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3430, 3333, 3232, 2814, 1631, 1539, 1425, 1229, 1156, 999, 761 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,17 (d, 4H, *J* = 5,1 Hz, piperazyna), 3,57 (d, 4H, *J* = 5,1 Hz, piperazyna), 6,58 (s, 2H, NH₂), 6,80 - 7,27 (m, 5H, Ph), 7,56 (dd, 1H, *J*₁ = 2,1 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,02 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz, H-3), 8,53 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6), 8,60 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 22a i 22b

4-Chloropirydyno-2-karbonitryl (**19**) (0,277 g, 2 mmole) rozpuszczono w bezwodnym MeOH (5 ml), dodano DBU (0,2 ml) jako katalizatora i ogrzewano 10 min. Po dodaniu benzenosulfonamidu (0,282 g, 1,8 mmola) (dla związku **22a**) lub 4-aminobenzenosulfonamidu (0,309 g, 1,8 mmola) (dla związku **22b**) mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia od 1,5 do 10 h. Po ochłodzeniu wydzielone osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

N-[1-Amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]benzenosulfonamid (**22a**)

Wydajność: 40%; Czas ogrzewania 10 h; C₁₂H₁₀ClN₃O₂S (295,74); T_{topn.} 119-121 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3418, 3311, 1618, 1574, 1285, 1142, 1084, 791, 590 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7,58 (m, 3H, Ph), 7,85 (dd, 1H, *J*₁ = 1,9 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,00 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, Ph), 8,10 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-3), 8,29 (s, 1H, NH), 8,68 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6), 8,92 (s, 1H, NH) ppm.

4-Amino-*N*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]benzenosulfonamid (**22b**)

Wydajność: 34%; Czas ogrzewania 1,5 h; C₁₂H₁₁ClN₄O₂S (310,76); T_{topn.} 206-209 °C (etanol); IR (KBr) ν: 3447, 3423, 3336, 1613, 1589, 1503, 1429, 1265, 1140, 1084, 791, 572 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 5,96 (s, 2H, NH₂), 6,58 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,59 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,81 (dd, 1H, *J*₁ = 1,9 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,04 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-3), 8,12 (s, 1H, NH), 8,65 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6), 8,88 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 23 i 24

4-Chloropirydyno-2-karbonitryl (**19**) (1,38 g, 10 mmoli) rozpuszczono na ciepło w MeOH (20 ml) i dodano 99% wodzianu hydrazyny (5 ml, 103 mmole) (dla związku **23**) lub metylohydrazynę (1,1 ml, 20 mmoli) (dla związku **24**). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano 30 min. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano lodu (10 g). Wytrącony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (23)

Wydajność: 67%; C₆H₇ClN₄ (170,60); T_{topn.} 107-109 °C (metanol); IR (KBr) v: 3439, 3330, 3203, 1655, 1625, 1550, 1577, 1345, 882, 724 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4,67 (sz.s, 2H, NH₂), 5,22 (s, 2H, NH₂), 7,29 (s, 1H, H-5), 8,06 (s, 1H, H-3), 8,41 (d, 1H, J = 5,4 Hz, H-6) ppm.

N'-Metylo-4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (24)

Wydajność: 47%; C₇H₉ClN₄ (184,63); T_{topn.} 102-104 °C (benzen/eter naftowy 1:10); IR (KBr) v: 3326, 3206, 1648, 1574, 1548, 1475, 1346, 1071, 829, 735 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,01 (s, 3H, NCH₃), 5,15 (s, 2H, NH₂), 7,25 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 7,30 (s, 1H, NH), 8,12 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,39 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6) ppm.

5-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-1,3,4-tiadiazolo-2(3H)-tion (25)

4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) (0,511 g, 3 mmole) rozpuszczono w MeOH (5 ml). Roztwór ochłodzono i dodano CS₂ (1 ml, 16,5 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przez 24 h, następnie wylano do lodu. Wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z MeOH. Wydajność: 35%; C₇H₄ClN₃S₂ (229,71); T_{topn.} 175-177 °C; IR (KBr) v: 3088, 2994, 2890, 1574, 1471, 1401, 1294, 1235, 1073, 782, 728 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7,66 (dd, 1H, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 5,7 Hz, H-5), 8,08 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-3), 8,62 (d, 1H, J = 5,7 Hz, H-6), 14,96 (s, 1H, NH) ppm.

2-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-5-(metylotio)-1,3,4-tiadiazol (26)

4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) (0,511 g, 3 mmole) rozpuszczono na ciepło w bezwodnym MeOH (10 ml). Po ochłodzeniu dodano CS₂ (1 ml, 16,5 mmola) oraz jodku metylu (0,24 ml, 3,9 mmola). Roztwór mieszano w temperaturze otoczenia przez 1 h, a wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z MeOH/H₂O (1:1). Wydajność: 57%; C₈H₆ClN₃S₂ (243,74); T_{topn.} 122-123 °C; IR (KBr) v: 1577, 1554, 1396, 1360, 1082, 834, 739 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,85 (s, 3H, SCH₃), 7,36 (dd, 1H, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 5,4 Hz, H-5), 8,32 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-3), 8,53 (d, 1H, J = 5,4 Hz, H-6) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 27a - c

Roztwór 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,852 g, 5 mmoli) w MeOH (15 ml) zawierający TEA (0,72 ml, 5 mmoli) ochłodzono do temperatury 0 °C i dodano CS₂ (0,30 ml, 5 mmoli). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 1 h. Następnie dodano jodku metylu (5 mmoli) (dla związku **27a**), jodku butylu (5 mmoli) (dla związku **27b**), chlorku benzylu (5 mmoli) (dla związku **27c**) i mieszano w temperaturze otoczenia przez kolejne 2 h. Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

Ester metylowy kwasu *N*'-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (27a)

Wydajność: 89%; C₈H₉ClN₄S₂ (260,77); T_{topn.} 159-160 °C (metanol); IR (KBr) v: 3384, 3280, 2911, 1665, 1577, 1365, 1317, 1002, 958, 741 cm⁻¹; ¹H NMR (aceton) δ: 2,56 (s, 3H, SCH₃), 6,99 (s, 2H, NH₂), 7,59 (dd, 1H, J₁ = 2,1 Hz, J₂ = 5,1 Hz, H-5), 8,22 (d, 1H, J = 2,1 Hz, H-3), 8,57 (d, 1H, J = 5,1 Hz, H-6), 10,93 (s, 1H, NH) ppm.

Ester butylowy kwasu *N*'-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (27b)

Wydajność: 32%; C₁₁H₁₅ClN₄S₂ (302,85); T_{topn.} 121-122 °C (etanol); IR (KBr) v: 3404, 3311, 2957, 1661, 1508, 1366, 1318, 994, 737 cm⁻¹; ¹H NMR (aceton) δ: 0,95 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,45 (m, 2H, CH₂), 1,67 (m, 2H, CH₂), 3,25 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂), 6,99 (s, 2H, NH₂), 7,58 (dd, 1H, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 5,5 Hz, H-5), 8,22 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-3), 8,57 (d, 1H, J = 5,5 Hz, H-6), 10,83 (s, 1H, NH) ppm.

Ester benzyłowy kwasu *N*'-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (27c)

Wydajność: 38%; C₁₄H₁₃ClN₄S₂ (336,86); T_{topn.} 218-221 °C (metanol); IR (KBr) v: 3434, 3323, 2923, 1660, 1574, 1469, 1361, 1312, 1241, 1068, 1000, 831, 735, 693, 473 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4,34 (s, 2H, CH₂), 7,06 - 7,98 (m, 9H, NH₂ + Ph + H-5 + H-3), 8,45 (d, 1H, J = 4,9 Hz, H-6), 9,74 (s, 1H, NH) ppm.

Diester metylowy kwasu *N*'-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (28a)

Roztwór 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,852 g, 5 mmoli) w MeOH (10 ml) zawierający TEA (1,66 ml, 11,5 mmola) ochłodzono do temperatury 0 °C i dodano CS₂ (0,3 ml, 5 mmoli). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 0,5 h. Następnie dodano jodku metylu (0,62 ml, 10 mmol) i mieszano w temperaturze otoczenia przez kolejne 2 h. Po zagęszczeniu do pozostałości dodano eter etylowy (30 ml). Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z etanolu. Wydajność: 79%; C₉H₁₁ClN₄S₂ (274,79); T_{topn.} 101-103 °C; IR (KBr) v: 3469, 3359, 1613, 1548, 1460, 1345, 1035, 944, 745 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,55 (s, 3H, SCH₃), 2,59 (s, 3H, SCH₃), 6,15 (s, 2H, NH₂), 7,34 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,35 (s, 1H, H-3), 8,46 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6) ppm.

Diester benzylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (28b)

Roztwór 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,341 g, 2 mmole) w MeOH (10 ml) zawierający TEA (0,72 ml, 5 mmoli) ochłodzono do temperatury 0 °C i dodano CS₂ (0,18 ml, 3 mmole). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 1 h. Następnie dodano chlorku benzylu (0,46 ml, 4 mmole) i mieszano w temperaturze otoczenia przez kolejne 24 h. Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z MeOH/H₂O (1:1). Wydajność: 33%; C₂₁H₁₉ClN₄S₂ (426,99); T_{topn.} 83-84 °C; IR (KBr) v: 3456, 3365, 1616, 1548, 1461, 1416, 1348, 1239, 1011, 742, 696 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4,31 (s, 2H, CH₂), 4,42 (s, 2H, CH₂), 5,95 (s, 2H, NH₂), 7,31 - 7,45 (m, 10H, 2Ph), 7,47 (dd, 1H, J₁ = 2,1, J₂ = 5,4 Hz, H-5), 8,26 (d, 1H, J = 2,1 Hz, H-3), 8,44 (d, 1H, J = 5,4 Hz, H-6) ppm.

4-Chloro-*N'*-(1,3-ditian-2-ylideno)pikolinoamidrazon (29)

4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) (0,511 g, 3 mmole) rozpuszczono na ciepło w MeOH (10 ml) i dodano TEA (1,05 ml, 7,5 mmola). Po ochłodzeniu do temperatury 0 °C dodano CS₂ (0,43 ml, 4,5 mmola) i mieszano w temperaturze otoczenia przez 1 h. Następnie dodano 1,3-dibromopropanu (0,30 ml, 3 mmole) i pozostawiono w temperaturze otoczenia przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez kolejne 3 h. Mieszaninę reakcyjną zagęszczono, dodano wodę (30 ml) i przeprowadzono ekstrakcję chlorkiem metylenu (3 x 30 ml). Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄ przez 12 h. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano produkt w postaci żółtego osadu. Wydajność: 31%; C₁₀H₁₁ClN₄S₂ (286,80); T_{topn.} 166-169 °C; IR (KBr) v: 3437, 3307, 2937, 2677, 2491, 1627, 1574, 1433, 1170, 1036, 952 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,48 (m, 2H, CH₂), 3,23 (m, 2H, CH₂), 3,74 (t, 2H, J = 5,2 Hz, CH₂), 6,31 (s, 2H, NH₂), 7,41 (dd, 1H, J₁ = 3,3 Hz, J₂ = 5,1 Hz, H-5), 8,36 (s, 1H, H-3), 8,47 (d, 1H, J = 5,1 Hz, H-6) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 30a - c

Do roztworu 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,511 g, 3 mmole) w dioksanie (5 ml) dodano izotiocyanianu metylu (3 mmole dla związku **30a**), izotiocyanianu allilu (3 mmole dla związku **30b**), izotiocyanianu *p*-chlorofenyłu (3 mmole dla związku **30c**) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 15 min. Po ochłodzeniu do mieszaniny reakcyjnej dodano eteru naftowego (30 ml). Wytrącony produkt odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

1-[Amino-(4-chloropirydyn-2-ylo)metyleno]-4-metylotiosemikarbazyd (30a)

Wydajność: 42%; C₈H₁₀ClN₅S (243,72); T_{topn.} 175-177 °C (metanol/woda); IR (KBr) v: 3440, 3405, 3351, 3279, 3175, 1656, 1550, 1430, 1259, 1070, 711 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆)

δ : 3,02 (d, 3H, $J = 4,6$ Hz, NCH₃), 6,92 (s, 2H, NH₂), 7,56 (dd, 1H, $J_1 = 2,1$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, H-5), 8,42 (d, 1H, $J = 4,6$ Hz, NH), 8,53 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-6), 8,62 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-3), 10,07 (s, 1H, NH) ppm.

1-[Amino-(4-chloropirydyn-2-ylo)metyleno]-4-allilotiosemikarbazyd (30b)

Wydajność: 82%; C₁₀H₁₂ClN₅S (269,75); T_{topn.} 158-160 °C (metanol/woda); IR (KBr) ν : 3423, 3365, 3269, 1655, 1575, 1541, 1431, 1295, 1222, 828, 714 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 4,43 (s, 2H, CH₂), 5,24 (m, 2H, CH₂), 6,00 (s, 1H, CH), 6,44 (s, 2H, NH₂), 7,35 (s, 1H, H-5), 7,59 (s, 1H, H-3), 8,06 (s, 1H, H-6), 8,45 (s, 1H, NH), 9,81 (s, 1H, NH) ppm.

1-[Amino-(4-chloropirydyn-2-ylo)metyleno]-4-(4-chlorofenylo)tiosemikarbazyd (30c)

Wydajność: 57%; C₁₃H₁₁Cl₂N₅S (340,23); T_{topn.} 164-166 °C (dioksan); IR (KBr) ν : 3401, 3281, 3229, 2968, 1665, 1577, 1533, 1467, 1334, 1200, 1090, 828, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7,14 (s, 2H, NH₂), 7,42 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ph), 7,57 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ph), 7,59 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-5), 8,54 (1H, d, $J = 5,3$ Hz, H-6), 8,77 (s, 1H, H-3), 10,03 (s, 1H, NH), 10,50 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 31a - e

Do roztworu 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,341 g, 2 mmole) w MeOH (5 ml) dodano 4-chlorobenzaldehydu (2 mmole dla związku **31a**), 5-nitrofuran-2-ylo-karbaldehydu (2 mmole dla związku **31b**), 5-nitrotiofen-2-ylo-karbaldehydu (2 mmole dla związku **31c**), 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehydu (2 mmole dla związku **31d**), 4-(dimetyloamino)benzaldehydu (2 mmole dla związku **31e**) i pozostawiono w temperaturze otoczenia przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 1 h. Wydzielony produkt odsączono i oczyszczono przez krystalizację z MeOH.

4-Chloro-*N'*-(4-chlorobenzylideno)pikolinoamidrazon (31a)

Wydajność: 52%; C₁₃H₁₀Cl₂N₄ (293,15); T_{topn.} 132-134 °C; IR (KBr) ν : 3491, 3375, 1623, 1548, 1464, 1327, 1087, 1011, 836, 732 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7,17 (s, 1H, NH), 7,32 (s, 1H, NH), 7,51 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, Ph), 7,71 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-5), 7,98 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, Ph), 8,23 (s, 1H, H-3), 8,50 (s, 1H, CH), 8,65 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-6) ppm.

4-Chloro-*N'*-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinoamidrazon (31b)

Wydajność: 68%; C₁₁H₈ClN₅O₃ (293,67); T_{topn.} 174-177 °C; IR (KBr) ν : 3474, 3348, 1624, 1551, 1467, 1347, 1252, 1179, 1008, 735 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7,43 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, Ar), 7,59 (sz.s, 2H, NH₂), 7,74 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, H-5), 7,84 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, Ar), 8,24 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,41 (s, 1H, CH), 8,67 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-6) ppm.

4-Chloro-*N'*-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinoamidrazon (31c)

Wydajność: 45%; C₁₁H₈ClN₅O₂S (309,73); T_{topn.} 218-220 °C; IR (KBr) v: 3454, 3356, 1614, 1551, 1486, 1337, 1205, 1060, 814, 733, 708 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7,03 (s, 1H, NH), 7,04 (s, 1H, NH), 7,29 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz, Ar), 7,47 (dd, 1H, *J*₁ = 1,9 Hz, *J*₂ = 5,1 Hz, H-5), 7,94 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-3), 8,08 (s, 1H, CH), 8,54 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz, Ar), 8,56 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, H-6) ppm.

4-Chloro-*N'*-(4-hydroksy-3-metoksybenzylideno)pikolinoamidrazon (31d)

Wydajność: 74%; C₁₄H₁₃ClN₄O₂ (304,73); T_{topn.} 130-131 °C; IR (KBr) v: 3476, 3362, 1621, 1521, 1465, 1285, 1117, 1032, 854, 728, 501 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3,85 (s, 3H, OCH₃), 6,79 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ph), 7,05 (s, 2H, NH₂), 7,17 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ph), 7,62 (s, 1H, Ph), 7,66 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, H-5), 8,20 (s, 1H, H-3), 8,36 (s, 1H, CH), 8,61 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, H-6), 9,49 (s, 1H, OH) ppm.

4-Chloro-*N'*-[4-(dimetyloamino)benzylideno]pikolinoamidrazon (31e)

Wydajność: 28%; C₁₅H₁₆ClN₅ (301,77); T_{topn.} 149-151 °C; IR (KBr) v: 3494, 3376, 1604, 1546, 1369, 1175, 812, 728, 587 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,97 (s, 6H, 2NCH₃), 6,71 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ph), 6,88 (s, 2H, NH₂), 7,64 (dd, 1H, *J*₁ = 2,0 Hz, *J*₂ = 5,4 Hz, H-5), 7,69 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ph), 8,20 (s, 1H, H-3), 8,36 (s, 1H, CH), 8,61 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-6) ppm.

4-Chloro-*N'*-[1-(tiofen-2-ylo)etylideno]pikolinoamidrazon (32)

Do roztworu 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,341 g, 2 mmole) w MeOH (10 ml), zawierającego kwas octowy (0,1 ml) jako katalizator, dodano 1-(tiofen-2-ylo)etanon (0,252 g, 2 mmole). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przez 1 h. Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z MeOH. Wydajność: 82%; C₁₂H₁₁ClN₄S (278,76); T_{topn.} 167-169 °C; IR (KBr) v: 3438, 3311, 1613, 1548, 1466, 1417, 1294, 1018, 832, 717 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,52 (s, 3H, CH₃), 7,04 (sz.s, 2H, NH₂), 7,15 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, Ar), 7,63 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz, Ar), 7,71 (dd, 1H, *J*₁ = 1,4 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 7,85 (d, 1H, *J* = 4,8 Hz, Ar), 8,45 (d, 1H, *J* = 1,4 Hz, H-3), 8,66 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

1,4-Diamino-1-(pirymidyn-2-ylo)-4-(4-chloropirydyn-2-ylo)-2,3-diaza-buta-1,3-dien (33a)

Roztwór pirymidyno-2-karbonitrylu (0,525 g, 5 mmoli) i TEA (0,5 ml) w MeOH (10 ml) ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 2 h. Następnie odparowano rozpuszczalnik i do pozostałości dodano roztwór 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,852 g, 5 mmoli) w MeOH (5 ml) oraz kwas octowy (0,2 ml). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 5 min.

Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z MeOH/H₂O (1:1). Wydajność: 35%; C₁₁H₁₀ClN₇ (275,70); T_{topn.} 188-190 °C; IR (KBr) v: 3296, 1611, 1547, 1443, 1349, 1038, 817, 639 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 6,39 (s, 2H, NH₂), 6,52 (s, 2H, NH₂), 7,31 (m, 2H, H-5 + pirymidyna), 8,39 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-3), 8,46 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-6), 8,84 (d, 2H, *J* = 4,8 Hz, pirymidyna) ppm.

1,4-Diamino-1-(pirazyn-2-ylo)-4-(4-chloropirydyn-2-ylo)-2,3-diaza-buta-1,3-dien (33b)

Metyloiminoester kwasu pirazyno-2-karboksyłowego (0,274 g, 2 mmole) dodano do roztworu 4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazonu (**23**) (0,341 g, 2 mmole) w MeOH (10 ml) z dodatkiem kwasu octowego (0,2 ml) i pozostawiono w temperaturze otoczenia przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 5 min. Wydzielony osad odsączono i przekrystalizowano z EtOH. Wydajność: 76%; C₁₁H₁₀ClN₇ (275,70); T_{topn.} 255-257 °C; IR (KBr) v: 3400, 3293, 1605, 1548, 1464, 1425, 1020, 714 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7,45 (s, 2H, NH₂), 8,54 – 8,70 (m, 6H, pirydyna + pirazyna), 9,65 (s, 2H, NH₂) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 34a i 34b

Roztwór związku **33a** lub **33b** (1 mmol) w kwasie octowym (3 ml) ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Mieszaninę reakcyjną wylano do lodu (10 g), a wytrącony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z MeOH/H₂O (2:1).

2-[5-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo]pirymidyna (34a)

Wydajność: 85%; C₁₁H₇ClN₆ (258,67); T_{topn.} 204-205 °C; IR (KBr) v: 3444, 1565, 1452, 1396, 1210, 1152, 789, 754 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7,62 (m, 2H, H-5 + pirymidyna), 8,20 (s, 1H, H-3), 8,71 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-6), 9,01 (d, 2H, *J* = 4,8 Hz, pirymidyna), 11,25 (s, 1H, NH) ppm.

2-[5-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo]pirazyna (34b)

Wydajność: 89%; C₁₁H₇ClN₆ (258,67); T_{topn.} 217-219 °C; IR (KBr) v: 3435, 1633, 1556, 1380, 1160, 1019, 788, 763 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 6,92 (m, 1H, H-5), 7,61 (s, 1H, H-3), 8,41 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-6), 8,74 (m, 2H, pirazyna), 9,32 (m, 1H, pirazyna), 11,15 (s, 1H, NH) ppm.

3-Metylo-5-(4-chloropirydyn-2-ylo)-3*H*-1,3,4-tiadiazolo-2-tion (35)

Roztwór związku **24** (0,554 g, 3 mmole) w MeOH (5 ml) ochłodzono do temperatury 0 °C i dodano CS₂ (1 ml, 16,5 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przez 12 h. Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z mieszaniny EtOH/H₂O (4:1). Wydajność: 59%; C₈H₆ClN₃S₂ (243,74); T_{topn.} 181-183 °C; IR (KBr) v: 3056, 1572, 1404, 1295, 1135, 1101, 757 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,97 (s, 3H,

CH₃), 7,38 (dd, 1H, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, H-5), 8,01 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-3), 8,51 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-6) ppm.

Ester metylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]-*N*-metyloditiokarbazowego (36)

Roztwór związku **24** (0,554 g, 3 mmole) i TEA (0,42 ml, 3 mmole) w MeOH (15 ml) ochłodzono do temperatury 0 °C i dodano CS₂ (0,18 ml, 3 mmole). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze otoczenia przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 1,5 h. Następnie dodano jodku metylu (0,19 ml, 3 mmole) i mieszano w temperaturze otoczenia przez kolejną 1 h. Po zagęszczeniu roztworu do pozostałości dodano eteru etylowego (20 ml). Wydzielony osad odsączono i oczyszczono przez krystalizację z mieszaniny MeOH/H₂O (3:2). Wydajność: 28%; C₉H₁₁ClN₄S₂ (274,79); T_{topn.} 175-177 °C; IR (KBr) ν : 3409, 3294, 2917, 1629, 1575, 1368, 1100, 987, 740 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 2,55 (s, 3H, SCH₃), 3,73 (s, 3H, NCH₃), 6,15 (s, 2H, NH₂), 7,47 (dd, 1H, $J_1 = 2,1$ Hz, $J_2 = 5,2$ Hz, H-5), 8,37 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-3), 8,53 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, H-6) ppm.

2,4-Dimetylo-5-(4-chloropirydyn-2-ylo)-2,4-dihydro-1,2,4-triazolo-3-tion (37)

Do roztworu związku **24** (0,553 g, 3 mmole) w dioksanie (5 ml) dodano izotiocyjanianu metylu (0,23 g, 3 mmole) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 15 min. Po ochłodzeniu do mieszaniny reakcyjnej dodano eteru naftowego (30 ml). Wytrącony produkt odsączono i oczyszczono przez krystalizację z H₂O. Wydajność: 31%; C₉H₉ClN₄S (240,71); T_{topn.} 169-170 °C; IR (KBr) ν : 3054, 1576, 1480, 1364, 1162, 1343, 767 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 3,91 (s, 3H, NCH₃), 4,06 (s, 3H, NCH₃), 7,41 (dd, 1H, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, H-5), 8,05 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-3), 8,57 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-6) ppm.

Ester metylowy kwasu 4-chloropikolinowego (38)

Związek **19** (5,0 g, 0,361 mola) rozpuszczono w bezwodnym MeOH (60 ml) i ogrzewano we wrzeniu przez 1 h w obecności katalitycznej ilości DBU (1 ml). Po odparowaniu MeOH do pozostałości dodano rozcieńczonego wodą (1:1) kwasu solnego i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Roztwór zalkalizowano wodorowęglanem sodu do pH = 8 i przeprowadzono ekstrakcję chlorkiem metylenu (3 × 30 ml). Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄ przez 12 h. Po odsączeniu środka suszącego chlorek metylenu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość wygotowano w cykloheksanie, otrzymując produkt w postaci białego osadu. Wydajność: 61%; C₇H₆ClNO₂ (171,58); T_{topn.} 52-53 °C (*lit.* 51-54 °C).¹¹⁰

Amid kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (39)

Amid kwasu 4-chloropikolinowego (**18**) (0,470 g, 3 mmole) rozpuszczono w dioksanie (10 ml) i dodano pirolidynę (2 ml, 25 mmoli). Roztwór ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 24 h. Po ochłodzeniu dodano 5 ml wody, a wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z MeOH. Wydajność: 82%; C₁₀H₁₃N₃O (191,23); T_{topn.} 203-205 °C; IR (KBr) ν: 3360, 3147, 2852, 1702, 1603, 1389, 1290, 1011, 790, 652, 567 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,95 (t, 4H, *J* = 6,3 Hz, pirolidyna), 3,29 (t, 4H, *J* = 6,3 Hz, pirolidyna), 6,56 (dd, 1H, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 7,11 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-3), 7,47 (s, 1H, NH), 7,96 (s, 1H, NH), 8,10 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

Kwas 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowy (40)

Amid kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**39**) (1,91 g, 0,01 mola) rozpuszczono w wodnym 10% NaOH (20 ml) i ogrzewano we wrzeniu przez 2 h. Po ochłodzeniu roztwór zakwaszono kwasem octowym. Wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z MeOH, uzyskując produkt w postaci białego osadu. Wydajność: 66%; C₁₀H₁₂N₂O₂ (192,21); T_{topn.} >260 °C (*lit.* 263-264 °C).¹¹¹

Ester metylowy kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (41)

Kwas 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowy (**40**) (1,53 g, 0,008 mola) rozpuszczono w MeOH (20 ml) i dodano chlorku tionylu (2 ml, 0,025 mola). Roztwór ogrzewano we wrzeniu przez 3 h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i dodano wodny roztwór NaHCO₃ do pH = 8. Roztwór ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 30 ml) i suszono bezwodnym MgSO₄ (3,0 g) przez 12 h. Po zagęszczeniu CH₂Cl₂ surowy produkt przekrystalizowano z MeOH. Wydajność: 56%; C₁₁H₁₄N₂O₂ (206,24); T_{topn.} 65-66 °C; IR (KBr) ν: 2862, 1740, 1602, 1538, 1393, 1302, 1131, 1091, 1011, 783 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,05 (s, 4H, pirolidyna), 3,38 (s, 4H, pirolidyna), 3,99 (s, 3H, OCH₃), 6,49 (dd, 1H, *J*₁ = 1,9 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 7,28 (s, 1H, H-3), 8,30 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6) ppm.

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (42)

Związek **38** (2,07 g, 0,015 mola) rozpuszczono w MeOH (20 ml) i wkroplono 99% wodzianu hydrazyny (1,1 ml, 0,022 mola). W trakcie wkraplania wypadł osad, który pozostawiono w temperaturze pokojowej przy intensywnym mieszaniu elektromagnetycznym przez 1 h. Osad odsączono i przekrystalizowano z wody. Wydajność: 79%; C₆H₆ClN₃O (171,58); T_{topn.} 167-169 °C (*lit.* 166,5-168 °C).¹¹⁰

Hydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (43)

Związek **41** (2,06 g, 0,01 mola) rozpuszczono w MeOH (20 ml) i dodano 99% wodzianu hydrazyny (0,73 ml, 0,015 mola). Roztwór ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 2,5 h.

Po ochłodzeniu wydzielony osad odsączono, przemyto benzenem i krystalizowano z mieszaniny MeOH/H₂O (1:1). Wydajność: 68%; C₁₀H₁₄N₄O (206,24); T_{topn.} 150-151 °C; IR (KBr) ν: 3313, 3271, 1660, 1604, 1506, 1392, 1249, 984, 938, 837, 705, 581 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,07 (s, 4H, pirolidyna), 3,40 (s, 4H, pirolidyna), 4,11 (sz.s, 2H, NH₂), 6,45 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 7,31 (s, 1H, H-3), 8,11 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6), 9,20 (sz.s, 1H, NH) ppm.

N'-Metylohydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (44)

Związek **38** (3,43 g, 0,02 mola) rozpuszczono w MeOH (20 ml) i wkropiono metylohydrazynę (1,6 ml, 0,03 mola). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną zagęszczono i dodano lodu (10 g). Wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z cykloheksanu. Wydajność: 78%; C₇H₈ClN₃O (185,61); T_{topn.} 101–103 °C; IR (KBr) ν: 3363, 3280, 2956, 1674, 1553, 1384, 1171, 993, 752, 690 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,78 (d, 3H, J = 1,9 Hz, NCH₃), 4,84 (sz.s, 1H, NH), 7,46 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,20 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,47 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6), 9,16 (sz.s, 1H, NH) ppm.

N'-Metylohydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (45)

Związek **41** (4,12 g, 0,02 mola) rozpuszczono w EtOH (20 ml) i dodano metylohydrazynę (1,6 ml, 0,03 mola). Roztwór ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 2 h. Po odparowaniu rozpuszczalnika, do pozostałości dodano benzenu (60 ml) i zagotowano. Po ochłodzeniu wydzielony osad odsączono i przekrystalizowano z mieszaniny MeOH/H₂O (1:1). Wydajność: 61%; C₁₁H₁₆N₄O (220,27); T_{topn.} 184-186 °C; IR (KBr) ν: 3256, 3156, 2861, 1658, 1602, 1503, 1392, 1216, 987, 706 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,02 (m, 4H, pirolidyna), 2,72 (s, 3H, NCH₃), 3,35 (m, 4H, pirolidyna), 4,95 (s, 1H, NH), 6,46 (dd, 1H, J₁ = 2,4 Hz, J₂ = 5,8 Hz, H-5), 7,34 (d, 1H, J = 2,4 Hz, H-3), 8,10 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6), 9,40 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 46a - g

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) lub hydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**43**) (3 mmole) rozpuszczono na ciepło w MeOH (20 ml). Do roztworu dodano TEA (0,42 ml, 3 mmole) oraz CS₂ (0,27 ml, 4,5 mmola) i mieszano w temperaturze pokojowej do momentu wytrącenia soli (15 min - 1 h), którą rozpuszczono przez dodanie wody (3 ml). Następnie dodano halogenopochodną (3 mmole), używając odpowiednio: jodku metylu, jodku izopropylu, jodku butylu i chlorku benzylu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym od 5 minut do 24 h,

kontrolując przebieg reakcji analizą TLC. Wytrącone osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację.

S-Ester metylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**46a**)

Wydajność: 49%; Czas reakcji: 5 min; C₈H₈ClN₃OS₂ (261,75); T_{topn.} 148-152 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3248, 3155, 3084, 2922, 1683, 1557, 1455, 1340, 925, 767 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,71 (s, 3H, SCH₃), 7,52 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,2 Hz, H-5), 8,20 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,55 (d, 1H, J = 5,2 Hz, H-6), 10,20 (sz.s, 1H, NH), 11,60 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester izopropylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**46b**)

Wydajność: 48%; Czas reakcji: 24 h; C₁₀H₁₂ClN₃OS₂ (289,80); T_{topn.} 193-195 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3278, 3148, 3038, 2923, 2854, 1667, 1473, 1330, 1153, 986, 767 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,44 (s, 3H, CH₃), 1,47 (s, 3H, CH₃), 4,10 (m, 1H, CH), 7,52 (dd, 1H, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 5,2 Hz, H-5), 8,21 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-3), 8,55 (d, 1H, J = 5,2 Hz, H-6), 10,20 (sz.s, 1H, NH), 11,68 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester butylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**46c**)

Wydajność: 51%; Czas reakcji: 5 h; C₁₁H₁₄ClN₃OS₂ (303,83); T_{topn.} 168-171 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3256, 3146, 3080, 2993, 2924, 1677, 1555, 1475, 1331, 1204, 927, 767 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,95 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃), 1,37 - 1,51 (m, 2H, CH₂), 1,55 - 1,79 (m, 2H, CH₂), 3,33 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂), 7,51 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,2 Hz, H-5), 8,20 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,55 (d, 1H, J = 5,2 Hz, H-6), 10,20 (sz.s, 1H, NH), 11,60 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester benzyłowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**46d**)

Wydajność: 48%; Czas reakcji: 3 h; C₁₄H₁₂ClN₃OS₂ (337,85); T_{topn.} 118-121 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3251, 3140, 3068, 2990, 1669, 1554, 1455, 1328, 1239, 926, 765 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4,44 (s, 2H, CH₂), 7,30 (m, 5H, Ph), 7,84 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,07 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,66 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6), 11,33 (s, 1H, NH), 11,68 (s, 1H, NH) ppm.

S-Ester metylowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego (**46e**)

Wydajność: 81%; Czas reakcji: 10 min; C₁₂H₁₆N₄OS₂ (296,41); T_{topn.} 128-130 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3286, 3187, 3044, 2920, 1643, 1558, 1415, 1223, 1154, 1025, 899, 808 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,99 (m, 4H, pirolidyna), 2,51 (s, 3H, SCH₃), 3,37 (m, 4H, pirolidyna), 6,68 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,8 Hz, H-5), 7,13 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,16 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6), 8,93 (sz.s, 1H, NH), 11,60 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester butylowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego (**46f**)

Wydajność: 42%; Czas reakcji: 2 h; C₁₂H₂₂N₄OS₂ (338,49); T_{topn.} 170-172 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3431, 3285, 2955, 2868, 1643, 1556, 1473, 1349, 1256, 1027, 900, 755 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,98 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH₃), 1,48 (m, 2H, CH₂), 1,74 (m, 2H, CH₂), 2,08 (m, 4H, pirolidyna), 3,31 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, CH₂), 3,54 (m, 4H, pirolidyna), 6,48 (dd, 1H, *J*₁ = 1,9 Hz, *J*₂ = 5,8 Hz, H-5), 7,37 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-3), 7,98 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-6), 8,17 (s, 1H, NH), 11,20 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester benzyłowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego (**46g**)

Wydajność: 59%; Czas reakcji: 3 h; C₁₈H₂₀N₄OS₂ (372,51); T_{topn.} 240-243 °C (dioksan); IR (KBr) ν: 3434, 3279, 3027, 2950, 1642, 1554, 1414, 1220, 1153, 1021, 899, 807, 705 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,09 (sz.s, 4H, pirolidyna), 3,36 (sz.s, 4H, pirolidyna), 4,59 (s, 2H, CH₂), 6,48 (dd, 1H, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 6,3 Hz, H-5), 7,29 (m, 5H, Ph), 7,44 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-3), 8,01 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-6), 8,19 (sz.s, 1H, NH), 12,03 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 47a - g

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) lub hydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**43**) (3 mmole) rozpuszczono na ciepło w MeOH (20 ml). Do roztworu dodano TEA (1,04 ml, 7,5 mmola) oraz CS₂ (0,27 ml, 4,5 mmola) i mieszano w temperaturze pokojowej do momentu wytrącenia soli (15 min - 1h), którą rozpuszczono przez dodanie wody (3 ml). Następnie dodano halogenopochodną (6 mmoli), używając odpowiednio: jodku metylu, jodku izopropylu, jodku butylu i chlorku benzyłu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym od 40 minut do 72 h, kontrolując przebieg reakcji analizą TLC. Wytrącone osady odsączono i oczyszczono przez krystalizację lub chromatografię kolumnową (dla związku **47b**) wypełnioną żelalem krzemionkowym, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina aceton – toluen 1:1. Diester **47c** uzyskano w postaci oleju.

S,S'-Diester metylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**47a**)

Wydajność: 73%; Czas reakcji: 40 min; C₉H₁₀ClN₃OS₂ (275,78); T_{topn.} 155-157 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3283, 3061, 2927, 2361, 1696, 1499, 1457, 1275, 1230, 1083, 899, 760 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,60 (s, 3H, CH₃), 2,62 (s, 3H, CH₃), 7,47 (dd, 1H, *J*₁ = 2,1 Hz, *J*₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,27 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz, H-3), 8,50 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-6), 11,15 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S,S'-Diester izopropylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (**47b**)

Wydajność: 46%; Czas reakcji: 72 h; C₁₃H₁₈ClN₃OS₂ (331,88); T_{topn.} 155-157 °C (chromatografia kolumnowa); IR (KBr) ν: 3258, 3072, 2961, 2861, 1708, 1576, 1490, 1387,

1233, 1085, 899, 761 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,39 (d, 6H, $J = 1,8$ Hz, 2CH_3), 1,44 (d, 6H, $J = 1,8$ Hz, 2CH_3), 3,71 (m, 1H, CH), 4,07 (m, 1H, CH), 7,46 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 8,28 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,52 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 11,44 (s, 1H, NH) ppm.

S,S'-Diester butylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (47c)

Wydajność: 54%; Czas reakcji: 6 h; $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{OS}_2$ (359,94); olej; IR (KBr) ν : 3281, 2957, 2930, 2870, 1680, 1501, 1278, 898, 761 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,93 (m, 6H, 2CH_3), 1,46 (m, 4H, 2CH_2), 1,69 (m, 4H, 2CH_2), 3,08 (m, 2H, CH_2), 3,22 (m, 2H, CH_2), 7,47 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-5), 8,27 (s, 1H, H-3), 8,51 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-6), 11,31 (s, 1H, NH) ppm.

S,S'-Diester benzyłowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)ditiokarbazowego (47d)

Wydajność: 62%; Czas reakcji: 3 h; $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}_2$ (427,97); $T_{\text{topn.}}$ 119-121 $^{\circ}\text{C}$ (metanol/woda); IR (KBr) ν : 3281, 3059, 2931, 1693, 1506, 1236, 908, 763, 708 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 4,18 (s, 2H, CH_2), 4,41 (s, 2H, CH_2), 7,15 - 7,51 (m, 11H, 2Ph + H-5), 8,26 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-3), 8,48 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-6), 11,25 (s, 1H, NH) ppm.

S,S'-diester metylowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego (47e)

Wydajność: 69%; Czas reakcji: 50 min; $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OS}_2$ (310,44); $T_{\text{topn.}}$ 193-194 $^{\circ}\text{C}$ (metanol); IR (KBr) ν : 3253, 2960, 2921, 2859, 1684, 1609, 1510, 1392, 1289, 998, 896, 817, 772, 565 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,07 (m, 4H, pirolidyna), 2,58 (s, 3H, CH_3), 2,60 (s, 3H, CH_3), 3,42 (m, 4H, pirolidyna), 6,47 (dd, 1H, $J_1 = 2,2$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, H-5), 7,41 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-3), 8,14 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, H-6), 11,45 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S,S'-diester izopropylowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego (47f)

Wydajność: 38%; Czas reakcji: 72 h; $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{OS}_2$ (366,54); $T_{\text{topn.}}$ 95-96 $^{\circ}\text{C}$ (metanol/woda); IR (KBr) ν : 3387, 3258, 2964, 2861, 1703, 1616, 1511, 1273, 987, 894, 777 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1,41 - 1,45 (m, 12H, 4CH_3), 2,10 (m, 4H, pirolidyna), 3,39 (m, 4H, pirolidyna), 3,71 (m, 1H, CH), 4,04 (m, 1H, CH), 6,48 (dd, 1H, $J_1 = 2,2$ Hz, $J_2 = 6,1$ Hz, H-5), 7,40 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-3), 8,14 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-6), 11,64 (s, 1H, NH) ppm.

S,S'-diester benzyłowy kwasu *N'*-[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]ditiokarbazowego (47g)

Wydajność: 75%; Czas reakcji: 3 h; $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{OS}_2$ (462,63); $T_{\text{topn.}}$ 171-172 $^{\circ}\text{C}$ (etanol); IR (KBr) ν : 3259, 3025, 2863, 1687, 1602, 1501, 1388, 1141, 986, 894, 702 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,06 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz, pirolidyna), 3,39 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz, pirolidyna), 4,18 (s, 2H, CH_2), 4,37 (s, 2H, CH_2), 6,45 (dd, 1H, $J_1 = 2,4$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, H-5), 7,18 - 7,48 (m, 11H, 2Ph + H-3), 8,14 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, H-6), 11,52 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 48a - d

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) lub hydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**43**) (0,003 mola) rozpuszczono na ciepło w EtOH (20 ml) i dodano TEA (1,04 ml, 0,0075 mola) oraz CS₂ (0,27 ml, 0,0045 mola). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej do momentu wytrącenia soli (15 minut - 1h). Po rozpuszczeniu soli przez dodanie wody (3 ml) wkroplono odpowiednio 1,2-dibromoetanu i 1,3-dibromopropanu (0,003 mola) i mieszano w temperaturze pokojowej 2 – 24 h. Po zakończeniu reakcji wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z alkoholu. W przypadku związku **48b** surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelom krzemionkowym, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina chloroform – octan etylu w stosunku objętościowym 5:1. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano czysty produkt w postaci beżowego osadu.

N'-(1,3-Ditiolan-2-ylideno)hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**48a**)

Wydajność: 64%; Czas reakcji: 18 h; C₉H₈ClN₃OS₂ (273,76); T_{topn.} 187-190 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3275, 3058, 1701, 1505, 902, 850, 760 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,52 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 3,72 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 7,48 (dd, 1H, J₁ = 1,4 Hz, J₂ = 4,8 Hz, H-5), 8,29 (d, 1H, J = 1,4 Hz, H-3), 8,48 (d, 1H, J = 4,8 Hz, H-6), 10,29 (sz.s, 1H, NH) ppm.

N'-(1,3-Ditian-2-ylideno)hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**48b**)

Wydajność: 53%; Czas reakcji: 2 h; C₁₀H₁₀ClN₃OS₂ (287,79); T_{topn.} 152-156 °C (chromatografia kolumnowa); IR (KBr) ν: 3269, 1700, 1493, 1318, 1278, 1064, 901, 759, 525 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,17 (m, 2H, CH₂), 3,17 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 3,25 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 7,84 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,11 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,68 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6), 11,01 (s, 1H, NH) ppm.

N'-(1,3-Ditiolan-2-ylideno)hydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**48c**)

Wydajność: 58%; Czas reakcji: 24 h; C₁₃H₁₆N₄OS₂ (308,42); T_{topn.} 218-221 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3218, 2962, 2846, 1692, 1607, 1507, 1392, 1281, 988, 855, 774 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,05 (m, 4H, pirolidyna), 3,38 (m, 4H, pirolidyna), 3,51 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 3,68 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂), 6,45 (dd, 1H, J₁ = 2,4 Hz, J₂ = 5,8 Hz, H-5), 7,38 (d, 1H, J = 2,4 Hz, H-3), 8,13 (d, 1H, J = 5,8 Hz, H-6), 10,58 (sz.s, 1H, NH) ppm.

N'-(1,3-Ditian-2-ylideno)hydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**48d**)

Wydajność: 33%; Czas reakcji: 3 h; C₁₄H₁₈N₄OS₂ (322,45); T_{topn.} 185-186 °C (metanol); IR (KBr) ν: 3260, 2917, 2854, 1701, 1606, 1707, 1393, 1288, 984, 775 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,02 (m, 4H, pirolidyna), 2,19 (m, 2H, CH₂), 3,13 (m, 4H, 2CH₂), 3,41 (m, 4H, pirolidyna),

6,48 (dd, 1H, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 6,1$ Hz, H-5), 7,41 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-3), 8,12 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-6), 11,34 (s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 49a - d

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) (0,514g, 0,003 mola) rozpuszczono na ciepło w dioksanie (10 ml) i dodano izotiocyanianu (0,003 mola), używając odpowiednio: izotiocyanianu metylu, allilu, cykloheksylu i *p*-Cl-fenyłu. Roztwór ogrzano do wrzenia i pozostawiono w temperaturze pokojowej do momentu wytrącenia osadu (16 h – 24 h). Po dodaniu eteru naftowego (20 ml) osad odsączono i przekrystalizowano z MeOH.

1-(4-Chloropikolinoilo)-4-metylotiosemikarbazyd (49a)

Wydajność: 72%; Czas reakcji 16 h; $C_8H_9ClN_4OS$ (224,70); $T_{topn.}$ 205-209 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3364, 3330, 3275, 3066, 2928, 1680, 1553, 1490, 1232, 1038, 764 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2,86 (d, 3H, $J = 4,4$ Hz, NCH_3), 7,81 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 7,99 (s, 1H, NH), 8,05 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,67 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 9,42 (s, 1H, NH), 10,66 (s, 1H, NH) ppm.

1-(4-Chloropikolinoilo)-4-allilotiosemikarbazyd (49b)

Wydajność: 66%; Czas reakcji 24 h; $C_{10}H_{11}ClN_4OS$ (270,74); $T_{topn.}$ 174-178 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3335, 3304, 3155, 2923, 1680, 1582, 1485, 1229, 1149, 763 cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1,27 (s, 2H, CH_2), 5,25 (m, 2H, CH_2), 5,99 (m, 1H, CH), 6,84 (s, 1H, NH), 7,55 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 4,9$ Hz, H-5), 8,14 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,56 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-6), 8,67 (sz.s, 1H, NH), 10,25 (sz.s, 1H, NH) ppm.

1-(4-Chloropikolinoilo)-4-cykloheksylotiosemikarbazyd (49c)

Wydajność: 69%; Czas reakcji 21 h; $C_{13}H_{17}ClN_4OS$ (312,82); $T_{topn.}$ 182-186 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3317, 3232, 3111, 2933, 2853, 1658, 1541, 1481, 1252, 1131, 776, 725 cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1,23 - 2,13 (5m, 11H, cykloheksyl), 6,75 (s, 1H, NH), 7,55 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 8,14 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,59 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 9,00 (sz.s, 1H, NH), 10,53 (sz.s, 1H, NH) ppm.

1-(4-Chloropikolinoilo)-4-(4-chlorofenylo)tiosemikarbazyd (49d)

Wydajność: 74%; Czas reakcji 18 h; $C_{13}H_{10}Cl_2N_4OS$ (341,22); $T_{topn.}$ 192-194 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3328, 3220, 3166, 1690, 1534, 1358, 1225, 1095, 825, 769 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 7,37 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ph), 7,48 (sz.s, 2H, Ph), 7,82 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 8,08 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,68 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 9,75 (sz.s, 1H, NH), 9,91 (sz.s, 1H, NH), 10,88 (sz.s, 1H, NH) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 50a - h

Metylohydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**44**) lub metylohydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-yl)pikolinowego (**45**) (0,003 mola) rozpuszczono w MeOH (20 ml). Do roztworu dodano TEA (0,63 ml, 0,0045 mola) oraz CS₂ (0,27 ml, 0,0045 mola) i mieszano w temperaturze pokojowej do momentu wytrącenia soli (30 min – 2 h), którą rozpuszczono przez dodanie wody (3 ml). Następnie wkroplono halogenopochodną (0,0045 mola), używając odpowiednio: jodku metylu, jodku izopropylu, jodku butylu i chlorku benzylu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przy silnym mieszaniu elektromagnetycznym od 15 minut do 24 h, kontrolując przebieg reakcji analizą TLC. Wytrącone osady odsączono i przekrystalizowano z MeOH lub oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej wypełnionej żelem krzemionkowym, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina aceton - benzen w stosunku objętościowym 1:1 (dla związków **50f** i **50g**).

S-Ester metylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)-*N*-metyloditiokarbazowego (**50a**)

Wydajność: 69%; Czas reakcji: 15 min; C₉H₁₀ClN₃OS₂ (275,78); T_{topn.} 181-186 °C (metanol); IR (KBr) v: 3277, 3064, 2921, 1688, 1487, 1234, 1110, 762 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,58 (s, 3H, SCH₃), 3,83 (s, 3H, NCH₃), 7,56 (dd, 1H, J₁ = 1,9 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,24 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-3), 8,55 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6), 10,00 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester izopropylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)-*N*-metyloditiokarbazowego (**50b**)

Wydajność: 54%; Czas reakcji: 24 h; C₁₁H₁₄ClN₃OS₂ (303,83); T_{topn.} 129-132 °C (metanol); IR (KBr) v: 3257, 2958, 2923, 1681, 1494, 1351, 1028, 765 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,39 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 3H, CH₃), 3,79 (s, 3H, NCH₃), 3,89 (m, 1H, CH), 7,56 (dd, 1H, J₁ = 1,4 Hz, J₂ = 5,3 Hz, H-5), 8,24 (d, 1H, J = 1,4 Hz, H-3), 8,55 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-6), 9,93 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester butylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)-*N*-metyloditiokarbazowego (**50c**)

Wydajność: 84%; Czas reakcji: 24 h; C₁₂H₁₆ClN₃OS₂ (317,86); T_{topn.} 135-138 °C (metanol); IR (KBr) v: 3315, 3081, 2957, 2856, 1700, 1480, 1253, 1113, 763 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,93 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃), 1,43 (m, 2H, CH₂), 1,64 (m, 2H, CH₂), 3,19 (sz.s, 2H, CH₂), 3,81 (s, 3H, NCH₃), 7,56 (dd, 1H, J₁ = 1,4 Hz, J₂ = 4,9 Hz, H-5), 8,24 (s, 1H, H-3), 8,55 (d, 1H, J = 4,9 Hz, H-6), 9,97 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester benzylowy kwasu *N'*-(4-chloropikolinoilo)-*N*-metyloditiokarbazowego (**50d**)

Wydajność: 77%; Czas reakcji: 10 h; C₁₅H₁₄ClN₃OS₂ (351,87); T_{topn.} 118-121 °C (metanol); IR (KBr) v: 3321, 3055, 2915, 1699, 1477, 1235, 1109, 763, 691 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,85 (s, 3H, NCH₃), 4,44 (s, 2H, CH₂), 7,30 (m, 5H, Ph), 7,53 (dd, 1H, J₁ = 1,4 Hz, J₂ = 4,9

Hz, H-5), 8,22 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-3), 8,50 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-6), 9,96 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester metylowy kwasu N' -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]- N -metyloditiokarbazowego (50e)

Wydajność: 76%; Czas reakcji: 2 h; $C_{13}H_{18}N_4OS_2$ (310,44); $T_{\text{topn.}}$ 185-186 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3300, 2852, 1687, 1607, 1506, 1476, 1272, 1095, 1000, 895, 782, 605 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,03 (m, 4H, pirolidyna), 2,53 (s, 3H, SCH_3), 3,37 (m, 4H, pirolidyna), 3,79 (s, 3H, NCH_3), 6,49 (dd, 1H, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 5,9$ Hz, H-5), 7,37 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-3), 8,13 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-6), 9,58 (s, 1H, NH) ppm.

S-Ester izopropylowy kwasu N' -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]- N -metyloditiokarbazowego (50f)

Wydajność: 68%; Czas reakcji: 24 h; $C_{15}H_{22}N_4OS_2$ (338,49); $T_{\text{topn.}}$ 155-157 °C (chromatografia kolumnowa); IR (KBr) ν : 3205, 2959, 2856, 1684, 1604, 1503, 1460, 1357, 1122, 1000, 784, 606 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,34 (s, 3H, CH_3), 1,37 (s, 3H, CH_3), 2,05 (m, 4H, pirolidyna), 3,39 (m, 4H, pirolidyna), 3,74 (s, 3H, NCH_3), 3,85 (m, 1H, CH), 6,48 (dd, 1H, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, H-5), 7,33 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-3), 8,13 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, H-6), 10,05 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester butylowy kwasu N' -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]- N -metyloditiokarbazowego (50g)

Wydajność: 59%; Czas reakcji: 24 h; $C_{15}H_{24}N_4OS_2$ (352,52); olej; IR (KBr) ν : 3318, 3088, 2859, 1697, 1606, 1352, 1274, 1108, 999, 782, 680 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH_3), 1,36 (m, 2H, CH_2), 1,61 (m, 2H, CH_2), 2,04 (m, 4H, pirolidyna), 3,13 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH_2), 3,35 (m, 4H, pirolidyna), 3,72 (s, 3H, NCH_3), 6,47 (dd, 1H, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, H-5), 7,31 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-3), 8,12 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, H-6), 10,06 (sz.s, 1H, NH) ppm.

S-Ester benzyłowy kwasu N' -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]- N -metyloditiokarbazowego (50h)

Wydajność: 62%; Czas reakcji: 7 h; $C_{19}H_{22}N_4OS_2$ (386,53); $T_{\text{topn.}}$ 84-86 °C (metanol); IR (KBr) ν : 3258, 3059, 2970, 2860, 1695, 1606, 1393, 1249, 1102, 1000, 781 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,08 (m, 4H, pirolidyna), 3,38 (m, 4H, pirolidyna), 3,81 (s, 3H, NCH_3), 4,43 (s, 2H, CH_2), 6,48 (dd, 1H, $J_1 = 2,4$ Hz, $J_2 = 4,9$ Hz, H-5), 7,24 - 7,36 (m, 6H, Ph + H-3), 8,11 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-6), 10,03 (sz.s, 1H, NH) ppm.

3-Metylo-5-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3H)-tion (51)

S-Ester metylowy kwasu N' -[4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinoilo]- N -metyloditiokarbazowego (50e) (0,93g, 0,003 mola) rozpuszczono w EtOH (15 ml), dodano TEA (1,5 ml, 0,011 mola) i

ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano, natomiast do pozostałości dodano lodu (10 g). Wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z MeOH. Wydajność: 69%; $C_{12}H_{14}N_4OS$ (262,33); $T_{\text{topn.}}$ 210-211 °C; IR (KBr) ν : 2846, 1601, 1483, 1391, 1183, 1056, 1001, 832, 814, 738, 556 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,87 (m, 4H, pirolidyna), 3,38 (m, 4H, pirolidyna), 3,82 (s, 3H, NCH_3), 6,49 (dd, 1H, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 6,1$ Hz, H-5), 7,01 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-3), 8,31 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-6) ppm.

Metoda ogólna syntezy związków 52a - c

Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) lub *N'*-metylohydrazyd kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**45**) (1,2 mmola) rozpuszczono na ciepło w dioksanie (3 ml). Do roztworu dodano odpowiednio piperidyn-1-ylo-ditiokarbaminianu metylu (dla związku **52a**) lub morfolin-4-ylo-ditiokarbaminianu metylu (dla związku **52b** i **c**) (1,2 mmola) oraz 10% K_2CO_3 (3 ml) i ogrzewano 10 h. Następnie mieszaninę reakcyjną zagęszczono na rotatorze, do pozostałości natomiast dodano lodu (10 g). Wytrącony osad odsączono i przekrystalizowano z dioksanu.

5-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-4-piperidyn-1-ylo-2,4-dihydro-1,2,4-triazolo-3-tion (52a)

Wydajność: 81%; $C_{12}H_{14}ClN_5S$ (295,79); $T_{\text{topn.}}$ 205-208 °C; IR (KBr) ν : 3424, 2932, 2853, 1575, 1419, 1332, 1307, 1235, 1132, 843, 785 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1,12 - 1,67 (3m, 6H, piperidyna), 2,76 (d, 2H, $J = 10,2$ Hz, piperidyna), 4,56 (t, 2H, $J = 10,2$ Hz, piperidyna), 7,46 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 7,83 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,57 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 9,29 (s, 1H, NH) ppm.

5-(4-Chloropirydyn-2-ylo)-4-morfolin-4-ylo-2,4-dihydro-1,2,4-triazolo-3-tion (52b)

Wydajność: 57%; $C_{11}H_{12}ClN_5OS$ (297,76); $T_{\text{topn.}}$ 149-151 °C; IR (KBr) ν : 3430, 3148, 2853, 1590, 1540, 1450, 1306, 1237, 1110, 972, 723 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,04 (m, 2H, morfolina), 3,69 (m, 2H, morfolina), 3,98 (m, 2H, morfolina), 4,70 (m, 2H, morfolina), 7,47 (dd, 1H, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, H-5), 7,99 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-3), 8,71 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-6), 11,60 (sz.s, 1H, NH) ppm.

1-Metylo-4-(morfolin-4-ylo)-3-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1*H*-1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tion (52c)

Wydajność: 81%; $C_{16}H_{22}N_6OS$ (346,4); $T_{\text{topn.}}$ 184-185 °C; IR (KBr) ν : 2845, 1605, 1542, 1330, 1232, 1109, 1002, 849, 709, 535 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,06 (m, 4H, pirolidyna), 2,95 (m, 2H, morfolina), 3,35 (m, 4H, pirolidyna), 3,63 (m, 2H, morfolina), 3,80 (s, 3H,

NCH₃), 3,93 (m, 2H, morfolina), 4,80 (m, 2H, morfolina), 6,45 (dd, 1H, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 5,9$ Hz, H-5), 7,20 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-3), 8,31 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-6) ppm.

VII. WNIOSKI

Celem pracy było opracowanie metod i przeprowadzenie syntez nowych związków pochodnych kwasu nikotynowego i pikolinowego o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym.

W oparciu o uzyskane rezultaty można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Stwierdzono, że w reakcji 2-[3-(dimetyloamino)-1-metoksyallilideno]malononitrylu (**2**) z aminami cyklicznymi (pirolidyna, morfolina) powstają, nieopisane dotychczas w piśmiennictwie chemicznym, 2-[1,3-di(amino-podstawione)allilideno]malononitryle **3a** i **3b**. Strukturę związku **3a** potwierdzono w oparciu o analizę rentgenograficzną i zaproponowano mechanizm cyklizacji tego układu do 2-bromo-3-cyjanopirydyn z aminą cykliczną w położeniu 4 pierścienia **4b** i **4c** pod wpływem 33% HBr w kwasie octowym. Stwierdzono, że grupa cyjanowa jest niereaktywna w wyniku zawady przestrzennej i zwiększonej gęstości elektronowej na węglu grupy –CN, co potwierdzają obliczenia kwantowo-chemiczne. 2-Bromo-4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitryl (**4b**) poddany redukcji cynkiem w kwasie octowym prowadzi do uzyskania 4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynonitrylu (**5b**), którego produktem hydrolizy zasadowej jest amid kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)nikotynowego (**6**). Dla związku **6** przeprowadzono badanie rentgenograficzne, w celu jednoznacznego potwierdzenia budowy chemicznej.
2. W reakcjach 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4a** - **c** z tiomocznikiem otrzymano 3-cyjano-pirydino-2(1*H*)-tiony **7a** - **c**. Syntezy szeregu 2-*S*-podstawionych alkilowych, arylowych i acetylowych pochodnych nikotynonitryli **8a** - **y**, **9a** - **h** oraz skondensowanego układu tieno[2,3-*b*]pirydyny **10a** - **p** o charakterze estrów, amidów i ketonów przeprowadzono następującymi metodami: w reakcji 2-bromopochodnych pirydyny **4a** - **c** z merkaptanami i tiofenolami oraz w bezpośredniej reakcji tionów **7a** - **c** z halogenopochodnymi. Pochodne o budowie tieno[2,3-*b*]pirydyn otrzymano w reakcji substytucji nukleofilowej i wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji bez izolacji związków pośrednich o budowie tioeterów.
3. Stwierdzono, iż reakcja elektrofilowego aminowania pirydino-2(1*H*)-tionów **7a** - **c** kwasem hydroksyloamino-*O*-sulfonowym w nadmiarze zasady przebiega z utworzeniem 2-aminotio-4-podstawionych-nikotynonitryli **11a**, **b** lub w wyniku aminowania i wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji prowadzi do uzyskania 3-amino-4-(morfolin-4-ylo)izotiazolo[5,4-*b*]pirydyny (**11c**), której budowę potwierdza analiza rentgenograficzna monokryształu.

4. Synteza 2,4-diamino-podstawionych-nikotynonitryli **12b**, **c**, **13a** - **i** była możliwa w oparciu o reakcje substytucji nukleofilowej 2-bromo-4-podstawionych-nikotynonitryli **4b** i **4c** szeregiem amin pierwszorzędowych, cyklicznych oraz amoniakiem. Właściwości chemiczne 2-amino-4-podstawionych-nikotynonitryli **12a** - **c** zbadano na przykładzie reakcji kondensacji z DMF-DMA, uzyskując *N'*-[3-cyjano-4-(podstawione)pirydyn-2-ylo]-*N,N*-dimetyloformamidyny **14a** - **c**, a następnie sprawdzono ich przydatność do syntezy dipierścieniowego układu pirydo[2,3-*d*]pirymidyny.
5. Stwierdzono, że w reakcji *N'*-(3-cyjano-4-metoksypirydyn-2-ylo)-*N,N*-dimetyloformamidyny (**14a**) z pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi i benzyloaminą dochodzi do utworzenia zamierzonego układu pirydo[2,3-*d*]pirymidyny **15a** – **e**, jednak z jednoczesną eliminacją podstawnika metoksyowego w pozycji 5. W oparciu o analizę spektroskopową widm 2D NMR dla związku **15a**, określono, iż pochodne **15a** - **e** występują w formie tautomerycznej pirydo[2,3-*d*]pirymidyn-5(8*H*)-onów.
6. Opracowano nową, alternatywną do klasycznej z użyciem alkoholanów, metodę syntezy metyloiminoestrów z nitryli, z wykorzystaniem DBU jako katalizatora, którego zastosowanie nie powoduje niepożądanego wymiany chloru na alkoksyl. Metyloiminoester kwasu 4-chloropikolinowego (**20**) wykorzystano do syntezy pochodnych kwasu 4-chloropirydyno-2-karboksylowego o budowie amidrazonów **21a**, **b**, w reakcji z odpowiednio 4-fenylopiperazyno-1-karbotiohydrazidem lub 4-fenylopiperazyno-1-karbohydrazidem, jak również o budowie amidyn **22a**, **b**, w reakcji z benzenosulfonamidem i *p*-amino-benzenosulfonamidem. Na podstawie analizy rentgenograficznej monokryształu związku **22b**, potwierdzono, iż w reakcji metyloiminoestru z *p*-amino-benzenosulfonamidem bierze udział grupa sulfonamidowa, natomiast produkt reakcji przyjmuje formę tautomeryczną z grupą –NH₂.
7. 4-Chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**23**) i *N'*-metylo-4-chloropirydyn-2-ylo-amidrazon (**24**) zostały wykorzystane do syntezy pochodnych kwasu ditiokarbazowego **27a** - **29**, **36** w reakcji z disiarczkiem węgla, TEA i odpowiednim środkiem alkilującym. Pochodne tiosemikarbazydowe **30a** - **c** otrzymano w reakcji związku **23** z izotiocyjanianami o zróżnicowanym chemicznie podstawniku (metylowym, allilowym i *p*-Cl-fenylowym).
8. Hydrazyd kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) i 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**43**) wykorzystano do otrzymania monoestrów kwasów ditiokarbazowych ze zróżnicowanej długości podstawnikiem alkilowym i alkilo-aromatycznym podstawnikiem benzylowym **46a** - **g**, symetrycznych diestrów **47a** - **g** oraz cyklicznych *S,S'*-diestrów tych kwasów z pierścieniem 1,3-ditiolanu **48a**, **c** i 1,3-ditianu **48b**, **d**. W reakcji związku **42** z

izotiocyjanianami (metylu, allilu, cykloheksylu i *p*-chloro-fenyłu) otrzymano 1-(4-chloropikolinoilo)-4-podstawione-tiosemikarbazyny **49a - d**, których struktura pozwala na tworzenie wiązań wodorowych utrzymujących płaskość fragmentu cząsteczki.

9. Monoestry metylowe, izopropylowe, butylowe i benzylowe kwasów ditiokarbazowych z podstawnikiem metylowym przy atomie azotu *N* **50a - h** powstały w reakcji *N'*-metylohydrazynu kwasu 4-chloropikolinowego (**44**) i *N'*-metylohydrazynu kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**45**) z disiarczkiem węgla i odpowiednią halogenopochodną w środowisku zasadowym. Związek **50e** posłużył następnie do syntezy 3-metylo-5-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu (**51**) w etanolu i nadmiarze TEA.
10. Otrzymano nieopisany wcześniej w literaturze chemicznej układ heterocykliczny 1,2,4-triazolo-3-tion **52a - c** z wbudowaną aminą cykliczną w pozycji 4, w reakcji hydrazynu kwasu 4-chloropikolinowego (**42**) i *N'*-metylohydrazynu kwasu 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinowego (**45**) z odpowiednimi ditiokarbaminianami w dioksanie, w obecności 10% roztworu węglanu potasu. Strukturę potwierdzono analizą rentgenograficzną dla związku **52c**.

W pracy otrzymano 155 nowych, nieopisanych w literaturze, pochodnych pirydyny, których budowę chemiczną potwierdzono w oparciu o analizę elementarną i spektroskopową widm IR, 1D NMR oraz w uzasadnionych przypadkach 2D NMR i MS. Ponadto struktury 5 otrzymanych związków potwierdzono badaniami rentgenograficznymi monokryształów.

W aspekcie badań biologicznych, przebadano 75 związków w testach *in vitro* względem szczepów bakterii tlenowych i beztlenowych oraz 89 związków względem trzech szczepów *Mycobacterium tuberculosis*: standardowego *H37Rv*, opornego (*Myc. tbc.* 210) i w pełni wrażliwego na stosowane leki (*Myc. tbc.* 192).

Wykazano, że otrzymane związki posiadają zależną od struktury zdolność hamowania głównie szczepów bakterii beztlenowych i wybiórczo tlenowych, jednak przy wyższych stężeniach (50 – 100 µg/ml). Wzrost tylko nielicznych szczepów jest hamowany przy stężeniu 6,2 µg/ml. Odnotowano, że znaczącą aktywność względem bakterii tlenowych wykazuje ester metylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(4-chloropirydyn-2-ylo)-metyleno]ditiokarbazowego (**27a**), którego minimalne stężenie hamujące (MIC) względem kilku szczepów jest porównywalne ze wzorcem.

Przekazane do badań związki wykazały umiarkowaną bądź niską aktywność wobec prątków *M. tuberculosis*. W odniesieniu do wskazanego, aktualnego problemu rozwoju

szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na stosowane chemioterapeutyki, uwagę zwraca fakt, iż związki **10d**, **10i**, **48b**, **50b** oraz **50c** charakteryzuje znacząca aktywność przeciwpłatkowa względem nich (MIC = 12,5 µg/ml).

VIII. PIŚMIENICTWO

1. W. Hryniewicz; *Medycyna po Dyplomie*, **7**, 29-38 (1998)
2. J. Garau; *Clin. Drug Invest.*, **15**, 1, 1 – 8 (1998)
3. W. Hryniewicz; *Mikrobiologia Medycyna*, **2**, 23 – 30 (1998)
4. I. Couto; *Mikrob. Drug Resist.*, **2**, 377 (1996)
5. G. A. Jakoby, G. L. Arche; *New Eng. J. Med.*, **324**, 601 (1991)
6. J. Alder, T. Li, D. Yu, L. Morton, J. Silverman, X. Hang, I. Critchley, G. Thorne; *American Society for Microbiology*, **47**, 3561 (2003)
7. M. Kawalec, W. Hryniewicz; *Nowa Klinika*, **6**, 520-524 (1999)
8. M. Arthur, P. Courvalin; *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 1563 (1993)
9. www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/EGlobal_strat.pdf
10. P. Kloss, L. Xiong, D. L. Shinabarger, A. S. Mankin; *J. Mol. Biol.*, **294**, 93 (1999)
11. A. M. Nilus; *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **4**, 149 (2003)
12. H. S. Sader, R. N. Jones; *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **65**, 158 (2009)
13. Y. W. Jo, W. B. Im, J. K. Rhee, M. J. Shim, W. B. Kim, E. C. Choi; *Bioorgan. Med. Chem.*, **12**, 5909 (2004)
14. C. S. Lee, D. A. Allwine, M. R. Barbachyn, K. C. Grega, L. A. Dolak, C. W. Ford, R. M. Jansen, E. P. Seest, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi, G. E. Zurenko, M. J. Genin; *Bioorgan. Med. Chem.*, **9**, 3243 (2001)
15. J. S. Lee, Y. S. Cho, M. H. Chang, H. Y. Koh, B. Y. Chung, A. N. Pae; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 4117 (2003)
16. M. D. Bowman, J. C. O'Neill, J. R. Springer, H. E. Blackwell; *Chem. Biol.*, **14**, 351 (2007)
17. A. A.-M. Abel-Aziz, H. I. El-Subbagh, T. Kunieda; *Bioorgan. Med. Chem.*, **13**, 4929 (2005)
18. F. E. Goda, A. A.-M. Abel-Aziz, O. A. Attef; *Bioorgan. Med. Chem.*, **12**, 1845 (2004)
19. R. L. Jarvest, J. M. Berge, M. J. Brown, P. Brown, J. S. Elder, A. K. Forrest, C. S. V. Houge-Frydrych, P. J. O'Hanlon, D. J. McNair, S. Rittenhouse, R. J. Sheppard; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 665 (2003)
20. Farhanullah, T. Kang, E.-J. Yoon, E.-C. Choi, S. Kim, J. Lee; *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 239 (2009)

21. S. F. Nielsen, T. Boesen, M. Larsen, K. Schønning, H. Kromann; *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 3047 (2004)
22. X. L. Liu, Y. J. Xu, M. L. Go; *Eur. J. Med. Chem.*, **43**, 1681 (2008)
23. A. R. Zink, C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, A. G. Nerlich; *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 359 (2003)
24. E. Augustynowicz – Kopeć, Z. Zwolska; *Przegl. Epidemiol.*, **62**, 113 (2008)
25. World Health Organization, Programmes and projects, Tuberculosis, WHO publications on tuberculosis, WHO Report 2009,
www.who.int/tb/publications/global_report/2009/key_points/
26. M. Korzeniewska – Koseła; *Pneumonologia i Alergologia Polska*, **75**, 1 (2007)
27. R. A. Fluck, SENCER, Ancient foe, modern scourge,
www.serc.carleton.edu/sencer/backgrounders/tuberculosis_ancient_foe_modern.html
28. A. Olczak, E. Grąbczewska, D. Koziulewicz, B. Gorzelak; *Przegl. Epidemiol.*, **62**, 63 (2008)
29. M. M. Dąbrowska, J. Pogorzelska, A. Parfieniuk, E. Siwak, A. Wiercińska – Drapało; *Pol. Merk. Lek.*, **23**, 212 (2007)
30. D. C. Perlman, C. C. Leung, W. W. Yew; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **175**, 1102 (2007)
31. C. E. Barry III, M. S. Cheung; *Scientific American*, **300**, 62 (2009)
32. R. Vijdea, M. Stegger, A. Sosnovskaja, A. B. Andersen, V. O. Thomsen, D. Bang; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **27**, 1079 (2008)
33. M. Jassal, W. R. Bishai; *Lancet Infect. Dis.*, **9**, 19 (2009)
34. Z. Markiewicz, Z. A. Kwiatkowski „Bakterie Antybiotyki Lekooporność” Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001, 121, 124, 125, 143, 188-190
35. K. Waissner, J. Matyk, H. Divisova, P. Husakova, J. Kunes, V. Klimesova, J. Kaustova, U. Mollmann, H. M. Dahse, M. Miko; *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **339**, 616 (2006)
36. A. Plumitallo, M. C. Cardia, S. Distinto, A. DeLogu, E. Maccioni; *Il Farmaco*, **59**, 945 (2004)
37. H. Foks, M. Janowiec, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć; *Ann. Acad. Med. Gedan.*, **32**, 301 (2002)
38. H. Foks. M. Janowiec, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć; *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **180**, 537 (2005)
39. K.-K. Bedia, O. Elçin, U. Seda, K. Fatma, S. Nathaly, R. Sevim, A. Dimoglo; *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 1253 (2006)

40. H. Foks, J. Mieczkowska, M. Janowiec, Z. Zwolska, Z. Andrzejczyk; *Chem. Heterocycl. Compd.*, **38**, 810 (2002)
41. Ö. Ateş, A. Gürsoy, H. Altıntaş, G. Ötük, S. Birteksöz; *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **1**, 39 (2003)
42. M. L. Głównka, D. Martynowski, A. Olczak, K. Kozłowska, Z. Ołubek, C. Orlewska, H. Foks; *Pol. J. Chem.*, **73**, 845 (1999)
43. C. Orlewska, H. Foks, P. Sowiński, D. Martynowski, A. Olczak, M. L. Głównka; *Polish J. Chem.*, **75**, 1237 (2001)
44. H. Foks, I. Trapkowska, M. Janowiec, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć; *Chem. Heterocycl. Compd.*, **40**, 1185 (2004)
45. C. Orlewska, H. Foks, M. Janowiec, Z. Zwolska-Kwiek; *Pharmazie*, **50**, 565 (1995)
46. A. Olczak, M. L. Głównka, J. Gołka, M. Szczesio, J. Bojarska, K. Kozłowska, H. Foks, C. Orlewska; *J. Mol. Struct.*, **830**, 171 (2007)
47. D. Pancechowska-Ksepko, H. Foks, M. Janowiec, Z. Zwolska-Kwiek; *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **50**, 259 (1993)
48. E. A. Bakhite, A. E. Abdel-Rahman, O. S. Mohamed, E. A. Thabet; *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 1709 (2002)
49. R. Gilmour, J. E. Foster, Q. Sheng, J. R. McClain, A. Riley, P.-M. Sun, W. -L. Ng, D. Yan, T. I. Nicas, K. Henry, M. E. Winkler; *J. Bacteriol.*, **187**, 8196 (2005)
50. B. L. Narayana, A. R. Rao, P. S. Rao; *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1342 (2008)
51. B. L. Narayana, A. R. Rao, P. S. Rao; *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 1369 (2009)
52. M. Mittelbach, G. Kastner; H. Junek; *Arch. Pharm.*, **318**, 481 (1985)
53. H.-W. Schmidt, H. Junek; *Monatsh. Chem.*, **108**, 895, (1977)
54. A. Miszke, H. Foks, A. Kędzia, E. Kwapisz, Z. Zwolska; *Heterocycles*, **75**, 2251 (2008)
55. A. Miszke, H. Foks, K. Brożewicz, A. Kędzia, E. Kwapisz, Z. Zwolska; *Heterocycles*, **75**, 2723 (2008)
56. Y. W. Ho, W. H. Yao; *Dyes Pigments*; **70**, 60 (2006)
57. S. J. Shuttleworth, M. Quimpére, N. Lee, J. DeLuca; *Mol. Divers.*, **4**, 183 (1998)
58. B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, A. R. Tatchell; Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th Ed, ©1989 Longman Group UK Ltd.
59. G. Carvantes, S. Marchal, M. J. Prieto, J. M. Pérez, V. M. González, C. Alonso, V. Moreno; *J. Inorg. Biochem.*, **77**, 197 (1999)
60. A. A. Krauze, L. Baumane, L. Sile, L. Chernova, M. Vilums, R. Vitolinya, G. Duburs, J. Stradins; *Chem. Heterocycl. Compd.*, **40**, 876 (2004)

61. A. A. Krauze, V. N. Garalene, G. Duburs; *Pharm. Chem. J.*, **27**, 49 (1993)
62. A. A. Krauze, R. O. Vitoliya, M. R. Romanova, G. Duburs; *Pharm. Chem. J.*, **22**, 627 (1988)
63. A. A. Krauze, R. O. Vitoliya, M. R. Romanova, G. Duburs; *Pharm. Chem. J.*, **22**, 366 (1988)
64. A. A. Krauze, R. O. Vitoliya, G. V. Zarin'sh, Y. È. Pelcher, A. A. Kimenis, G. Duburs; *Pharm. Chem. J.*, **19**, 313 (1985)
65. D. Tirzite, A. A. Krauze, A. Zubareva, G. Duburs; *Chem. Heterocyc. Compd.*, **38**, 795 (2002)
66. A. A. Krauze, A. G. Odynets, A. A. Verreva, S. K. Germane, A. N. Kozhukhov, G. Duburs; *Pharm. Chem. J.*, **25**, 477 (1991)
67. V. I. Shvedov, T. P. Sycheva, T. V. Sakovich; *Chem. Heterocyc. Compd.*, **15**, 1070 (1979)
68. I. Adachi, Y. Hiramatsu, JP3052890A (1991); C. A., **115**, 71573 (1991)
69. S. Takashi, M. Haruhiko, B. Atsuo; WO9614319 (1996); C. A., **125**, 114583x (1996)
70. T. Yasuma, A. Baba, H. Makino, A. Haruhiko, T. Nagata; WO0164685 (2001); C. A., **135**, 226889q (2001)
71. J. Bompert, L. Giral, G. Malicorne, M. Puygrenier; *Eur. J. Med. Chem.*, **22**, 139, (1987)
72. M. M. El-Abdelah, S. S. Sabri, H. A. Al-Ashqar; *Heterocycles*, **45**, 255, (1997)
73. M. M. El-Abadelah, M. Z. Nazer, S. F. Okasha, M. Calas, J. Bompert, P. Mion; *Eur. J. Med. Chem.*, **33**, 33, (1998)
74. M. E. Schnute, M. M. Cudahy, A. Scott; WO0053610 (2000); C. A., **133**, 222706g (2000)
75. O. Takanori, S. Mitsuharu, K. Haruhito, K. Masao; JP7053562 (1995); C. A., **123**, 256681k (1995)
76. O. Kiyoshi, N. Satoru, N. Akira, S. Takeshi, M. Satoshi, S. Atsunari; JP2005325099 (2005)
77. H. Vieweg, S. Leistner, J. Prantz, N. Bohm, G. Wagner; *Pharmazie*, **47**, 841 (1992)
78. N. C. R. van Straten, G. G. Schoonus-Gerritsma, R. G. van Someren, J. Draaijer, A. E. P. Adang, C. M. Timmers, R. G. J. M. Hanssen, C. A. A. van Boeckel; *ChemBioChem*, **10**, 1023 (2002)
79. S. Furuya, N. Takeyru, H. Matsumoto; Jpn. Pat. 09,169,766 (1997); C. A., **127**, 176416 (1997)
80. M. Shokyo, F. Koichiro, A. Masahiro, A. Junichi, F. Shuichi, I. Yoichiro; WO9909033 (1999); C. A., **130**, 196644h (1999)
81. S. Nobuhiro, M. Hirokazu, F. Shuichi; EP781774 (1997); C. A., **127**, 135807e (1997)

82. F. Shuichi, M. Hirokazu, H. Yoji, S. Nobuhiro, I. Takashi; WO9741126 (1997); C. A., **128**, 13211f (1998)
83. K. Gewald, U. Schlegel, H. Schäfer; *J. Prakt. Chem.*, **317**, 959 (1975)
84. V. P. Litvinov, V. V. Dotsenko, S. G. Krivokolysko; *Russ. Chem. Bull.*, **54**, 864 (2005)
85. I. F. Foemark, L. T. Guss, L. V. Evshov, G. Y. Shvarts, V. G. Granik; *Khim. Farm. Zh.*, **5**, 27 (1990)
86. A. B. Deyanov, R. K. Nyazov, F. Y. Nazmetolinov, B. Y. Syropatov, V. E. Kolla, M. E. Konshin; *Khim. Farm. Zh.*, **10**, 31 (1991)
87. T. R. Elworthy, A. P. D. Ford, G. W. Bantle, D. J. Morgans, R. S. Ozer, W. S. Palmer, D. B. Repke, M. Romero, L. Sandoval, E. B. Sjogren, X. Francisco, A. Vazquez, H. Wu, N. F. Arredondo, D. R. Blue, A. DeSousa, L. M. Gross, M. S. Kava, J. D. Lesnick, R. L. Vimont, T. J. Williams, Z. Quan-Ming, J. R. Pfister, D. E. Clarke; *J. Med. Chem.*, **40**, 2674 (1997)
88. W. S. Saari, W. Halczenko; *J. Med. Chem.*, **26**, 1696 (1983)
89. E. Fernández-Alvarez; *J. Heterocyclic Chem.*, **26**, 1623 (1989)
90. K. Y. Rho, J. H. Kim, S. H. Kim, Ch. M. Yoon; *Heterocycles*, **48**, 2521 (1998)
91. Zhang N., Wu B., Powell D., Wissler A., Middleton B., Kovacs E., Toral-Barza L., Kohler C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2825 (2000)
92. S. R. Kanth, G. V. Reddy, K. H. Kishore, P. S. Rao, B. Narsaiah, U. S. N. Murthy; *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 1011 (2006)
93. L. F. Kuyper, J. M. Garvey, D. P. Baccanari, J. N. Champness, D. K. Strammers, C. R. Beddell; *Bioorgan. Med. Chem.*, **4**, 593 (1996)
94. L. Cordeu., E. Cubedo., E. Bandrés; *Bioorgan. Med. Chem.*, **15**, 1659 (2007)
95. V. J. Ram, D. A. Vanden Berghe, A. J. Vlietinck; *J. Heterocyclic Chem.*, **25**, 217 (1988)
96. J. R. Piper, G. S. McCalab, J. A. Montgomery, R. L. Kisliuk, Y. Gaumont, F. M. Sirotnak; *J. Med. Chem.*, **29**, 1080 (1986)
97. R. K. Robins, G. H. J. Hitchings; *Am. Chem. Soc.*, **80**, 3449 (1958)
98. M. F. Hasan, A. M. Madkour, I. Saleem, J. M. A. Rahman, E. A. Z. Mohammed; *Heterocycles*, **38**, 57 (1994)
99. A. R. Kataritzky, Ch. W. Rees, E. F. V. Scriven; *Comprehensive Heterocyclic Chemistry – II* **7**, 591 (1996)
100. H.-R. Tsou, N. Mamuya, B. D. Johnson, M. F. Reich, B. C. Gruber, F. Ye, R. Nilakantan, R. Shen, C. Discifani, R. DeBlanc, R. Davis, F. E. Koehn, L. M. Greenberger, Y.-F. Wang, A. Wissner; *J. Med. Chem.*, **44**, 2719 (2001)

101. S. R. Kanth, G. V. Reddy, K. H. Kishore, P. S. Rao, B. Narsaiah, U. S. N. Murthy; *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 1011 (2006)
102. L. Kuczyński, A. Mroziakiewicz, W. Banaszekiewicz, K. Poręba; *Pol. J. Pharmacol. Phar.*, **31**, 217 (1979)
103. B. M. Lynch, M. A. Khan, H. C. Teo, F. Pedrotti; *Can. J. Chemistry*, **66**, 420 (1988)
104. A. Bogdanowicz, H. Foks, A. Kędzia, E. Kwapisz, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć; *Heterocycles*, **78**, 2217 (2009)
105. D. Varlet, E. Fourmaintraux, P. Depreux, D. Lesieur; *Heterocycles*, **53**, 797 (2000)
106. C. M. Tice, L. M. Bryman; *Tetrahedron*, **57**, 2689 (2001)
107. D.-K. Kim, J. Kim, H.-J. Park; *Bioorgan. Med. Chem.*, **12**, 2013 (2004)
108. H. Foks, C. Orlewska, M. Janowiec; *Polish Pharmaceutical Society*, **49**, 47 (1992)
109. H. Foks, L. Trapkowska, M. Janowiec, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć; *Khim. Geterotsykl. Soedin*, **9**, 1368 (2004)
110. L. Mosher; *J. Org. Chem.*, **20**, 283 (1955)
111. E. H. Mørkved, M. W. Cronyn; *Acta Chem. Scand.*, **32**, 231 (1978)
112. E. M. Słomińska, E. A. Carrey, H. Foks, C. Orlewska, E. Wiczerzak, P. Sowiński, M. H. Yacoub, A. M. Marinaki, H. A. Simmonds, R. T. Smoleński; *J. Biol. Chem.*, **281**, 32057 (2006)
113. A. Balows, H. J. Hauser, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, H. J. Shadomy: *Manual of Clinical Microbiology* (5th ed.). Am. Soc. Microbiol., Washington, 1991
114. B. A. Forbes, D. F. Sahn, A. S. Weissfeld: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology* (12th ed.). Mosby Elsevier, St. Louis, 2007
115. W. C. Winn, G. W. Allen, P. C. Schreckenberger, G. L. Woods: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (6th ed.). Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006