

**Malwina Krause**

**Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu  
o aktywności przeciwgruźliczej**

**Praca doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Jarosław Sławiński  
Promotor pracy: Dr hab. Katarzyna Gobis**

**Gdańsk 2020**

*Składam serdeczne podziękowania mojej  
Promotor dr hab. Katarzynie Gobis  
za poświęcony czas, opiekę merytoryczną  
oraz życzliwą atmosferę.*

## Spis treści

1. WPROWADZENIE .....	5
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	8
2.1. Isoniazyd i jego pochodne.....	8
2.2. Poszukiwanie nowych leków przeciwgruźliczych .....	10
2.3. Aktualny przegląd związków o aktywności przeciwgruźliczej.....	17
2.3.1. Pochodne pirydyny o aktywności przeciwgruźliczej .....	17
2.3.2. Pochodne tiosemikarbazydowe o aktywności przeciwgruźliczej.....	25
2.3.3. Pochodne zawierające fragment tiosemikarbazydowy oraz pierścień pirydyny .....	32
3. CEL PRACY .....	37
4. BADANIA WŁASNE .....	41
4.1. Synteza .....	41
4.1.1. Otrzymywanie 4-podstawionych pochodnych pikolinonitrylu <b>1-4</b> .....	41
4.1.2. Otrzymywanie 4-podstawionych metyloiminoestrów kwasu pikolinowego <b>5-8</b> .....	42
4.1.3. Otrzymywanie pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych <b>9-24</b> .....	43
4.1.4. Otrzymywanie pochodnych amidrazonowych <b>25-32</b> .....	48
4.1.5. Otrzymywanie pochodnych tiosemikarbazydowych <b>33-64</b> .....	50
4.1.6. Otrzymywanie pochodnych iminowych <b>65-80</b> .....	55
4.1.7. Synteza pochodnych 1,2,4-triazolu .....	57
4.1.8. Synteza hydrazydowych analogów wybranych związków.....	62
4.1.8.1. Otrzymywanie 4-podstawionych pikolinianów metylu <b>113-116</b> .....	63
4.1.8.2. Otrzymywanie 4-podstawionych pikolinohydrazydów <b>117-120</b> .....	64
4.1.8.3. Otrzymywanie hydrazydowych analogów pochodnych iminowych <b>121-136</b> .....	64
4.1.8.4. Otrzymywanie hydrazydowych analogów pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych.....	68
4.2. Aktywność biologiczna .....	74
4.2.1. Aktywność przeciwgruźlicza pochodnych 4-chloropikolinonitrylu.....	74
4.2.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych 4-chloropikolinonitrylu wobec wybranych szczepów bakterii i drożdży.....	82
4.2.3. Aktywność cytotoksyczna pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych.....	89

5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	93
5.1. Synteza .....	93
5.1.1. Metoda ogólna syntezy 4-podstawionych pochodnych pikolinonitrylu <b>1-4</b> .....	94
5.1.2. Metoda syntezy pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych <b>9-24</b> .....	95
5.1.3. Metoda ogólna syntezy amidrazonów <b>25-28</b> .....	102
5.1.4. Metoda ogólna syntezy metyloamidrazonów <b>29-32</b> .....	103
5.1.5. Metoda ogólna otrzymywania pochodnych tiosemikarbazydowych <b>33-64</b> .....	105
5.1.6. Metoda ogólna otrzymywania pochodnych iminowych <b>65-80</b> .....	117
5.1.7. Ogólna metoda syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu <b>81-84</b> .....	122
5.1.8. Ogólna metoda syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu <b>85-88</b> .....	123
5.1.9. Ogólna metoda syntezy amido-azyn <b>89-92</b> .....	125
5.1.10. Ogólna metoda syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu <b>93-96</b> .....	126
5.1.11. Ogólna metoda syntezy pochodnych iminowych <b>97-112</b> .....	127
5.1.12. Ogólna metoda syntezy 4-podstawionych pikolinianów metylu <b>113-116</b> .....	133
5.1.13. Ogólna metoda syntezy 4-podstawionych pikolinohydrazydów <b>117-120</b> .....	134
5.1.14. Ogólna metoda otrzymywania hydrazydowych pochodnych iminowych <b>121-135</b> ..	136
5.1.15. Ogólna metoda otrzymywania 1,3,4-oksadiazolo-2(3 <i>H</i> )tionów <b>137-140</b> .....	141
5.1.16. Ogólna metoda otrzymywania hydrazydowych pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych <b>141-156</b> .....	143
5.2. Aktywność biologiczna .....	149
5.2.1. Aktywność przeciwgruźlicza.....	149
5.2.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa .....	150
5.2.3. Aktywność cytotoksyczna.....	150
6. WNIOSKI.....	152
7. STRESZCZENIE .....	156
8. WYKAZ SKRÓTÓW .....	162
9. PIŚMIENNICTWO .....	164

# 1. WPROWADZENIE

Gruźlica jest chorobą infekcyjną, która dotyka ludzkość już od starożytności. Pierwsze opisy chorych posiadających objawy wskazujące na gruźlicę znajdują się w dziełach Hipokratesa oraz Galena. Badania paleontologiczne ujawniły szczątki kręgow pochodzące sprzed 8000 lat p.n.e. posiadające zmiany właściwe dla gruźlicy. Pomimo znajomości tej choroby od tysięcy lat, pozostaje ona wiodącą przyczyną śmierci wśród chorób infekcyjnych powodując więcej zgonów niż wirus HIV [1,2].

Gruźlica jest chorobą związaną z ubóstwem. Niedożywienie, złe warunki mieszkalne oraz duża gęstość zaludnienia sprzyjają rozprzestrzenianiu oraz rozwojowi tej choroby. W największym stopniu dotyka najbiedniejsze, najbardziej wrażliwe i marginalizowane grupy ludności. Najwyższą liczbę przypadków gruźlicy, stanowiącą 87% wszystkich przypadków w 2016 roku, odnotowano w trzech regionach Światowej Organizacji Zdrowia (WHO): południowo-wschodniej Azji, Afryce oraz zachodnim Pacyfiku. Skrajne ubóstwo występujące w tych rejonach uniemożliwia odpowiednią profilaktykę, diagnostykę oraz leczenie [3,4].

W celu wzmocnienia kontroli nad częstością zachorowań na gruźlicę oraz liczbą zgonów w wyniku tej choroby, WHO od 1995 roku wydaje coroczny raport na temat globalnej sytuacji epidemiologicznej. Analizując dane statystyczne pochodzące z raportów WHO w latach 2012-2016 można zauważyć powolny wzrost szacunkowej liczby nowych zachorowań na gruźlicę. W 2012 roku odnotowano 8,6 mln nowych przypadków tuberkulozy, natomiast w 2016 roku liczba ta wzrosła do 10,4 mln. Niepokojący jest także fakt rosnącej liczby przypadków gruźlicy lekoopornej [5–9]. Dopiero w 2017 roku odnotowano delikatny spadek zachorowań, szacując, iż na gruźlicę zachorowało około 10 mln osób [10].

Sytuacja epidemiologiczna gruźlicy w Polsce od lat 60 XX wieku zmienia się bardzo dynamicznie. W 1957 roku utworzono Krajowy Rejestr Zachorowań na Gruźlicę, odnotowując 82 201 przypadków zachorowań. Ponadto Polska charakteryzowała się w tamtym czasie wysokim współczynnikiem zapadalności na poziomie 290,4. Współczynnik zapadalności stanowi miarę prawdopodobieństwa zachorowania będącą ilorazem zachorowań na daną chorobę, w stosunku do liczebności tej populacji w określonej jednostce czasu. W powyższym przypadku jednostką czasu był jeden rok. Coroczna analiza sytuacji epidemiologicznej w Polsce pokazuje regularny spadek zachorowalności. W roku 2000 odnotowano około 8-krotny spadek zachorowań

w porównaniu z rokiem 1957 z całkowitą liczbą chorych na gruźlicę wynoszącą 11 477. Według raportu sporządzonego przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w 2017 roku odnotowano jedynie 5787 przypadków nowych zachorowań oraz współczynnik zapadalności 15,1. Współczynnik ten nadal pozostaje wyższy niż średnia w krajach Unii Europejskiej (10,7). Najwyższą zachorowalność zaobserwowano w województwie mazowieckim oraz śląskim. Ponadto gruźlica częściej dotyka osoby zamieszkałe w miastach, co możemy wiązać z większym zagęszczeniem ludności. Dane statystyczne pokazują, iż mężczyźni zapadają na gruźlicę około 2 razy częściej niż kobiety. Pomimo spadku zachorowalności na gruźlicę w Polsce w 2016 roku tuberkuloza była wiodącą przyczyną zgonów wśród chorób infekcyjnych [11–13].

Istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia gruźlicy jest koinfekcja ludzkim wirusem niedoboru odporności HIV. Sytuacja ta sprzyja aktywacji formy latentnej i rozwinięciu pełnoobjawowej choroby. Problem ten jest szczególnie zauważalny w krajach Afryki Subsaharyjskiej, gdzie odsetek ludności zarażonej wirusem HIV jest wysoki. Badania dowodzą, iż współwystępowanie HIV-Mtb (ludzkiego wirusa niedoboru odporności oraz bakterii *mycobacterium*) przyspiesza rozwój obu chorób [14,15]. Współzakazane makrofagi posiadają większą liczbę kopii wirusowych w związku ze wzrostem replikacji HIV. Natomiast obniżenie odporności wywołane wirusem HIV powoduje wzrost zachorowalności, a także śmiertelności w wyniku gruźlicy [16]. Terapia antywirusowa u pacjentów ze współistniejącą gruźlicą często kończy się niepowodzeniem wskutek interakcji lekowych, nakładającej się toksyczności leków i zaostrzenia skutków ubocznych. Przyjmowanie leków retrowirusowych może prowadzić do zapalnego zespołu rekonstrukcji immunologicznej (IRIS), w którego efekcie dochodzi do progresji zmian gruźliczych w zainfekowanych narządach [17].

W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost migracji ludności zwłaszcza w obszarze kontynentu europejskiego [18]. Według danych Europejskiego Urzędu Statystycznego w 2013 roku do krajów Unii Europejskiej przybyło 3,4 mln imigrantów [19]. Pomimo faktu, iż odsetek przypadków gruźlicy w krajach bardzo wysoko rozwiniętych jest niski, może się on zwiększyć wraz z migracją ludności z krajów o wysokim występowaniu gruźlicy. Szczepy *Mycobacterium tuberculosis* pochodzące z krajów migrantów mogą się charakteryzować innym stopniem wirulencji oraz posiadać inne wzorce oporności niż w krajach przyjmujących [20,21]. Zaobserwowano, iż częstość występowania gruźlicy wielolekoopornej MDR-TB (ang. *multidrug-resistant tuberculosis*) w krajach o niskiej zapadalności jest wyższa wśród migrantów niż rdzennych

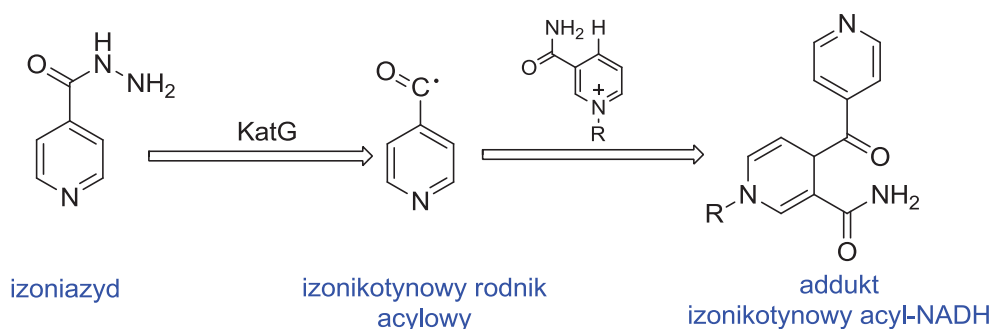
mieszkańców. Raportowane dane wskazują, że 73,4% przypadków gruźlicy lekoopornej występuje wśród migrantów. Problem ten jest wyraźnie zauważalny w krajach Europy Zachodniej oraz Północnej, takich jak Francja, Niemcy, Wielka Brytania, a także Norwegia. Gruźlicę można nabyć przed, podczas migracji, a także po niej. Przyczyną zwiększonego ryzyka zachorowania podczas oraz po zakończeniu migracji mogą być złe warunki socjalne w tranzycie lub w krajach przyjmujących oraz ograniczony dostęp do opieki medycznej [20]. Znaczna część tych przypadków wynika z aktywacji formy latentnej nabytej przed procesem migracji. Do aktywacji utajonej formy gruźlicy dochodzi najczęściej w pierwszych 2-5 latach po migracji. Jedną z przyczyn wysokiego występowania MDR-TB wśród imigrantów może być fakt, iż gromadzą się oni we własnych wąskich grupach etnicznych, co sprzyja rozprzestrzenianiu się choroby w obrębie tej społeczności. Badania wykazują, iż transmisja gruźlicy od imigrantów do populacji rodzimej jest stosunkowo niska. Niemniej jednak przepływ zakażeń gruźlicą jest dwukierunkowy i zależy od stopnia interakcji imigrantów ze społeczeństwem rodzimym. Zwiększone ryzyko występowania gruźlicy występuje także wśród migrantów uciekających z krajów dotkniętych konfliktami zbrojnymi lub kryzysem ekonomicznym, co wynika ze złych warunków społecznych oraz niesprawnego systemu opieki zdrowotnej [22]. W celu zmniejszenia ryzyka rozprzestrzenienia gruźlicy przez imigrantów niektóre kraje UE wprowadziły badania przesiewowe przed wjazdem na terytorium kraju mające na celu zidentyfikowanie osób zakażonych prątkiem gruźlicy w formie aktywnej, a także będących nosicielami formy latentnej. Aktualnie nie istnieją testy umożliwiające odróżnienie lekoopornej formy latentnej od formy wrażliwej na leczenie [23].

## 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

### 2.1. Isoniazyd i jego pochodne

Isoniazyd należy do grupy leków pierwszego rzutu stosowanych w leczeniu gruźlicy. Leki pierwszego rzutu ze względu na wysoką efektywność i niższą toksyczność, w porównaniu z innymi lekami stosowanymi w danej chorobie, są podawane pacjentowi jako pierwsze [24]. Ponadto izoniazyd jest również podawany profilaktycznie u osób z latentną infekcją *M. tuberculosis* w celu zapobiegnięcia reaktywacji. Do tak szerokiego zastosowania izoniazidu w leczeniu gruźlicy przyczyniła się jego wysoka aktywność bakteriobójcza, niski koszt, wysoka biodostępność, doskonała penetracja wewnątrzkomórkowa, a także wąskie spektrum działania.

Isoniazyd jako prolek, aby wykazywał istotną aktywność tuberkulostatyczną, wymaga aktywacji metabolicznej. Aktywacja izoniazidu zachodzi w wyniku reakcji z enzymem występującym u *M. tuberculosis* zwanym KatG będącym katalazoperoksydazą. KatG katalizuje powstawanie izonikotynowego rodnika acylowego, który następnie tworzy addukt z NADH (Rys. 1). Powstały addukt wiąże się i hamuje InhA. InhA zwany reduktazą enoilo-ACP to zależne od NADH białko nośnikowe trans-enoilo-acylo-ACP, które jest częścią układu biosyntezy kwasów tłuszczowych: syntazy kwasu tłuszczowego II (FAS II) odgrywającego rolę w syntezie kwasu mikołowego [25]. A zatem zablokowanie InhA prowadzi do zaburzeń syntezy kwasów mikołowych stanowiących istotny element budulcowy ściany komórkowej, a w efekcie śmierć komórki bakteryjnej [26].



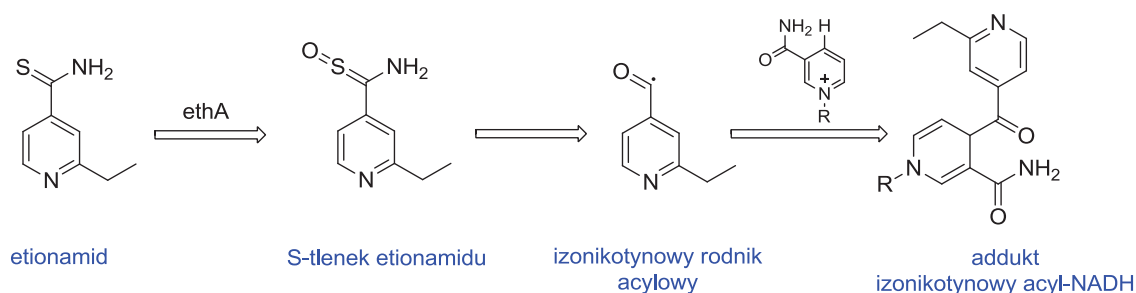
Rys. 1 Aktywacja izoniazidu

W związku ze znaczną rolą enzymu KatG w etapie aktywacji izoniazidu, stanowi on istotny element procesu nabywania oporności. Potwierdza to fakt, iż u ponad 90% szczepów opornych zaobserwowano mutacje właśnie w genie kodującym enzym KatG.



Mutacje w rejonie genu *katG* z reguły powodują oporność na wysokim poziomie. Natomiast mutacje w obrębie genu kodującego enzym InhA lub jego regionie promotorowym powodują niski poziom oporności. Co więcej, mutacja w obrębie genu *inhA* skutkuje powstaniem oporności krzyżowej z innymi lekami o zbliżonej strukturze. Badania donoszą, iż mutacje w genach *kasA*, *ahpC* czy *ndh* również są powiązane z powstawaniem oporności wobec izoniazydu, jednakże ich dokładna rola nie została jeszcze poznana [27–29].

Etionamid jest pochodną tiomocznika, która wykazuje aktywność bakteriostatyczną lub bakteriobójczą. Związek ten znalazł zastosowanie w leczeniu gruźlicy jako lek drugiego rzutu. Mechanizm działania aktywowanej postaci etionamidu polega na hamowaniu reduktazy enoilo-ACP (InhA), a zatem jest taki, jak w przypadku izoniazydu. Jednakże aktywacja etionamidu nie zachodzi za pomocą enzymu KatG, lecz monooksygenazy kodowanej przez gen *ethA* (Rys. 2). W wyniku procesu aktywacji powstaje S-oksymetabolit, który ma znacznie większą aktywność niż lek macierzysty. W wyniku licznych przemian powstaje izonikotynowy rodnik acylowy, który następnie tworzy addukt z NADH [30]. W związku z takim samym celem molekularnym, mutacja w genie kodującym InhA powoduje powstanie krzyżowej oporności wobec izoniazydu oraz etionamidu [31]. Inne mechanizmy powstawania oporności wobec etionamidu opierają się na mutacjach w obrębie genu kodującego aktywator *ethA* oraz regulator *ethR* [32,33].



**Rys. 2** Aktywacja etionamidu

Protionamid, podobnie jak etionamid, jest pochodną tiomocznika, jednakże różni się od niego długością łańcucha alkilowego posiadając w pozycji C-2 pierścienia pirydyny łańcuch propylowy. Wykazuje aktywność bakteriobójczą wobec prątków gruźliczych, a także *M. avium* oraz *M. leprae* [34]. Jednakże w związku z wysoką toksycznością tego leku jest on stosowany w leczeniu gruźlicy jako lek drugiego rzutu. Mechanizm aktywacji oraz działania bakteriobójczego jest analogiczny jak w przypadku etionamidu. Ze względu

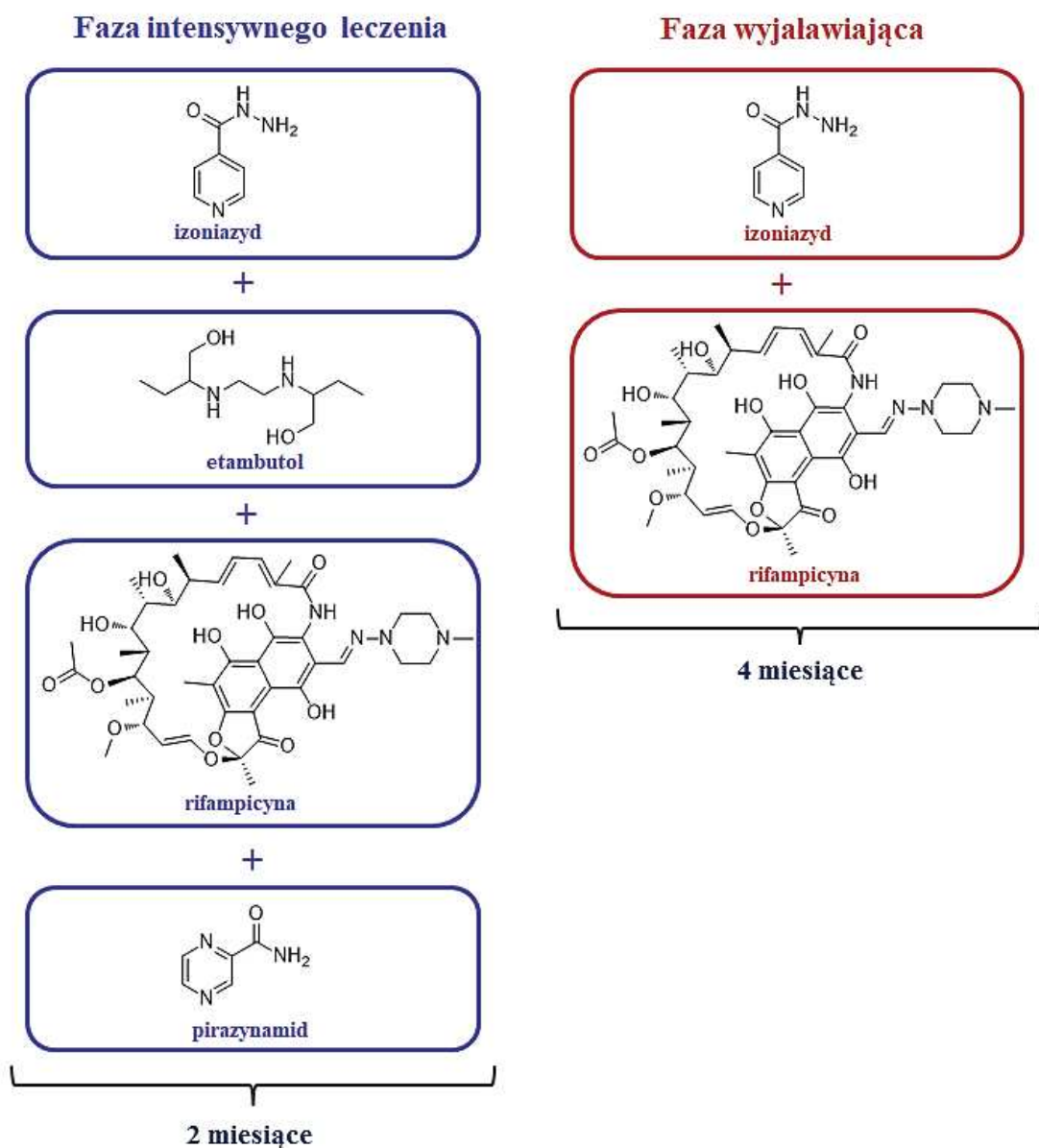
na podobieństwo strukturalne oraz mechanizm działania protionamidu i etionamidu obserwuje się występowanie oporności krzyżowej pomiędzy tymi lekami [35,36].

## 2.2. Poszukiwanie nowych leków przeciwgruźliczych

W celu zapewnienia pełnej eradykacji zakażenia *M. tuberculosis* oraz uniknięcia powstania oporności, leczenie gruźlicy wymaga długotrwałego podawania kilku leków bakteriobójczych oraz sterylizujących. Schemat leczenia gruźlicy wrażliwej polega na podawaniu czterech leków izoniazydu, rifampicyny, etambutolu oraz pirazynamidu przez okres sześciu miesięcy (Rys. 3).

Pierwsze dwa miesiące są fazą intensywnego leczenia, podczas której podawane są wszystkie cztery leki. W trakcie pozostałych czterech miesięcy stanowiących fazę wyjąławiającą podawane są tylko dwa leki: izoniazyd oraz rifampicyna [37]. Rekomendowaną przez WHO strategią leczenia gruźlicy jest DOTS (ang. *directly observed treatment short-course*), która polega na bezpośrednim nadzorowaniu leczenia [38]. Strategia ta zapewnia wysokie wskaźniki skuteczności leczenia oraz zapobieganie nawrotom. Długotrwały czas terapii skutkuje częstym występowaniem działań niepożądanych, a także nieprzestrzeganiem zaleceń lekarskich przez pacjentów.

Niestosowanie się pacjentów do zaleceń sprzyja powstawaniu gruźlicy wielolekoopornej MDR-TB oraz gruźlicy z wielolekoopornością rozszerzoną XDR-TB (ang. *extensively drug-resistant tuberculosis*). Gruźlicę MDR definiuje się jako zakażenie odporne wobec dwóch najaktywniejszych leków pierwszego rzutu, izoniazydu i rifampicyny. XDR-TB jest to oporność wobec izoniazydu i rifampicyny rozszerzona o leki drugiego rzutu, takie jak fluorochinolony oraz leki podawane parenteralnie: amikacynę, kanamycynę bądź kapreomycynę. Badania potwierdzają, iż indywidualna farmakokinetyka, zmienne przenikanie leków do zmian gruźliczych, a także stosowanie standardowych schematów leczenia w przypadku niezdiagnozowanej oporności także w znacznym stopniu przyczyniają się do powstawania szczepów opornych [39].



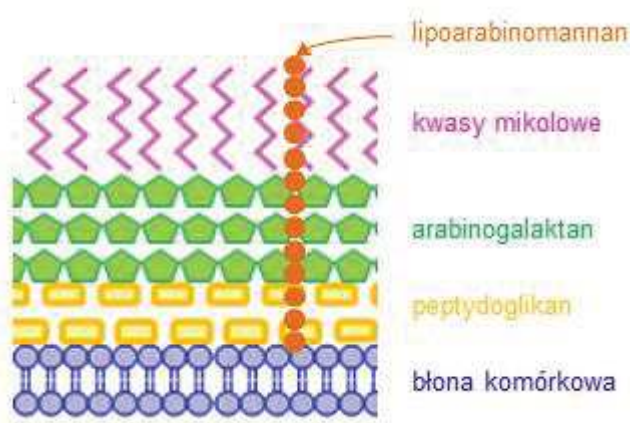
*Rys. 3 Schemat leczenia gruźlicy wrażliwej*

Leczenie gruźlicy odpornej wymaga zastosowania leków drugiego rzutu, które charakteryzują się wysoką toksycznością oraz wydłużenia czasu terapii do co najmniej 18 miesięcy [40]. Pomimo wydłużonej antybiotykoterapii zakażenie MDR-TB charakteryzuje się niskim współczynnikiem wyleczeń w zakresie 50-70%. Natomiast w związku z ograniczonym asortymentów leków skutecznych w leczeniu zakażenia XDR-TB, cechuje się ono wysokim współczynnikiem śmiertelności. Wprowadzenie nowych środków terapeutycznych oraz opracowanie nowego podejścia administracji leków mogłoby

znacząco skrócić czas leczenia, a także zmniejszyć ryzyko powstawania szczepów opornych [41,42].

Nowy lek przeciwgruźliczy powinien charakteryzować się silną aktywnością bakteriobójczą zarówno wobec aktywnej, jak i latentnej postaci gruźlicy. Aby zwiększyć skuteczność działania wobec szczepów opornych, powinien on wykazywać powinowactwo do kilku celów molekularnych. Co więcej, powinien skrócić czas trwania leczenia oraz uprościć leczenie poprzez zmniejszenie częstotliwości dawkowania. Ważną kwestią jest także wysoka biodostępność po podaniu drogą doustną oraz wysoki indeks terapeutyczny. Ponadto pożądaną cechą dla nowych tuberkulostatyków jest brak interakcji z innymi lekami oraz niska cena [43].

Poszukiwanie leków przeciwgruźliczych jest znacząco utrudnione w związku z powolnym replikowaniem prątków. Wymusza to dłuższy czas rozwoju kultur oraz rozwijania choroby w modelach zwierzęcych, aby ocenić skuteczność testowanego związku. Ponadto *M. tuberculosis* według stopnia bezpieczeństwa biologicznego BSL należy do grupy 3 patogenów, a zatem mogących wywołać ciężkie choroby ludzi i zwierząt oraz stanowiących zagrożenie dla pracowników. W związku z tym laboratoria, w których są prowadzone badania na patogenach grupy 3, muszą spełniać rygorystyczne wymogi bezpieczeństwa biologicznego. Konieczność spełnienia norm bezpieczeństwa skutkuje niedoborem ośrodków naukowych posiadających uprawnienia do prowadzenia badań na *M. tuberculosis*.



**Rys. 4** Schemat budowa ściany komórkowej *Mycobacterium tuberculosis*

Podczas zakażenia prątkami gruźlicy dochodzi do utworzenia specyficznego środowiska wewnątrz gospodarza. Odwzorowanie tych warunków w modelach zwierzęcych jest niezmiernie trudne [43,44]. Nie do końca poznana biologia prątków

gruźlicy zwłaszcza w formie latentnej stanowi problem podczas opracowywania nowych leków. Specyficzna budowa ściany komórkowej prątków, składającej się w znacznej części z lipidów, jakimi są kwasy mikolowe czy lipoarabinomannan, utrudnia przenikanie związków do wnętrza komórki, co uniemożliwia dotarcie do celu molekularnego i wywołanie efektu przeciwpątkowego (Rys. 4) [45].

Lipofilowe cząsteczki o dużej masie są bardziej podatne na gromadzenie się w błonie komórkowej i w słabym stopniu przenikają do wnętrza komórki. Ponadto silnie lipofilowe leki mogą wykazywać wyższą hepatotoksyczność oraz zaburzać funkcje mitochondriów [46]. Hughes wraz z zespołem przeprowadził analizę 245 związków znajdujących się w fazie badań przedklinicznych, na podstawie której zaobserwował zwiększone ryzyko wystąpienia działania toksycznego wraz ze wzrostem lipofilowości. Właściwości te obniżają rozpuszczalność związków, co może stanowić problem podczas optymalizacji formułacji farmaceutycznej. Hydrofobowość ściany komórkowej sprawia, że związki silnie hydrofilowe są również nieskuteczne. Potwierdza to fakt, iż większość antybiotyków aktywnych przeciwko innym drobnoustrojom nie przenika przez ściany komórkowe prątka i nie wykazuje aktywności tuberkulostatycznej. W związku z tym cechy te należy wziąć pod uwagę przy projektowaniu potencjalnego leku. Co ważniejsze, lepiej jest nadać priorytet związkom o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych niż związkom o wyższej sile działania, ale niskiej zdolności do penetracji [47].

Wiele z badanych związków jest pochodnymi obecnie stosowanych leków, bądź modulują te same procesy komórkowe. W związku z tym istnieje potrzeba identyfikacji nowych celów molekularnych. Prowadzone są liczne badania mające na celu poszukiwanie nowych szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za syntezę białek, węglowodanów, lipidów oraz kofaktorów, które jednocześnie nie występują u gospodarza. Coraz większym zainteresowaniem w świecie nauki cieszą się metody inżynierii genetycznej. CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) jako tania, prosta w wykonaniu oraz wydajna metoda wyciszania genów stała się najpopularniejszym narzędziem do edycji genomu w celu leczenia chorób oraz wad ludzkich. Singh opisał oparty na CRISPR sposób hamowania ekspresji istotnych genów występujących u *M. tuberculosis* osiągając zahamowanie ekspresji na poziomie około 80% [48].

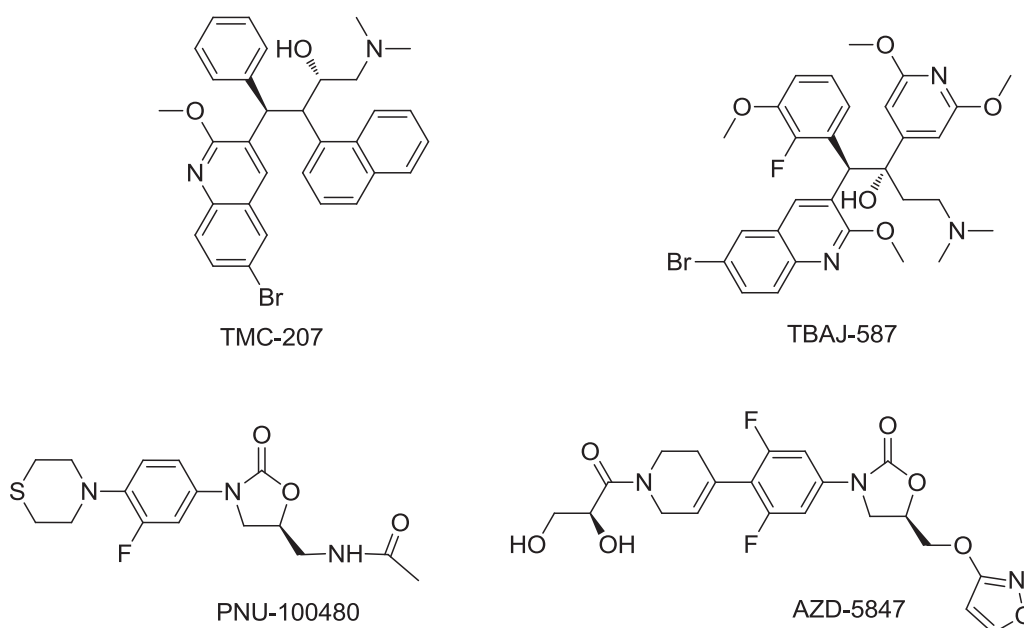
Badania dotyczące opracowania nowych leków wykazały, iż podejście oparte na genomie oraz celach molekularnych ma niewielką efektywność terapeutyczną w obszarze środków przeciwbakteryjnych. Zmiana podejścia na skrining fenotypowy polegający na badaniach przesiewowych prowadzonych wobec całych komórek bakteryjnych przynosi

lepsze efekty w sektorze leków przeciwgruźliczych [49]. Zaleca się, aby początkowo prowadzić badania przesiewowe na całych komórkach, aby wyeliminować problem słabej penetracji oraz wypływu komórkowego, a następnie przeprowadzić badanie mające na celu identyfikację celu molekularnego badanego kandydata na lek. Pomimo dużej efektywności tego podejścia wobec komórek replikujących jest ono mało efektywne wobec komórek niereplikujących, co wynika z braku korelacji pomiędzy minimalnym stężeniem hamującym wzrost (MIC) a aktywnością sterylizującą. Obecnie opracowywane są warunki hodowli umożliwiające wykonywanie badań przesiewowych wobec bakterii replikujących, a także niereplikujących [50].

Przydatnym narzędziem pomocniczym w procesie poszukiwania nowych leków zarówno na bazie celów molekularnych, jak i poprzez badania przesiewowe jest komputerowo wspomagane projektowanie leków (CADD-ang. *computer aided drug design*), które znacząco przyspiesza czas oraz obniża koszty prowadzonych badań. CADD obejmuje szeroki zakres podejść teoretycznych oraz obliczeniowych, które pomagają znaleźć nowe leki poprzez optymalizację wielu parametrów farmaceutycznych [51].

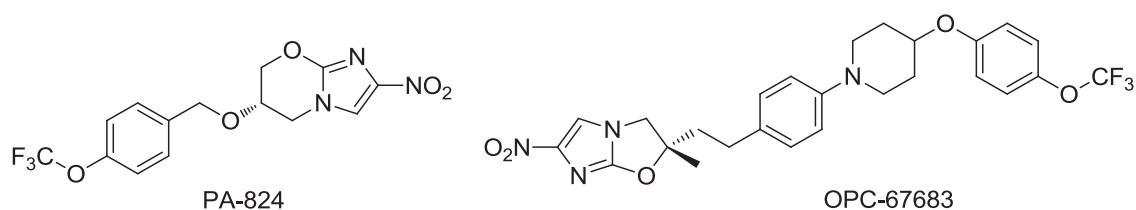
Za pomocą skринingu fenotypowego został opracowany m.in. środek przeciwprątkowy, taki jak TMC-207 (Rys. 5). Związek ten został wprowadzony do leczenia wielolekoopornej gruźlicy płuc w 2012 roku pod nazwą bedakilina. Bedakilina jest pochodną diarylocholiny, której mechanizm działania przeciwprątkowego opiera się na hamowaniu mykobakteryjnej syntazy ATP. Związek ten wykazuje aktywność wobec niereplikujących prątków gruźlicy, a także ma potencjał do zminimalizowania czasu trwania terapii. Opierając się na budowie strukturalnej bedakiliny zsyntezowano jej pochodną TBAJ-587, znajdującą się aktualnie w I fazie badań klinicznych, która wykazuje taki sam mechanizm działania [52,53].

Na podstawie struktury linezolidu, należącego do grupy oksazolidynonów wykorzystywanego w leczeniu gruźlicy wielolekoopornej, stworzono związki o zbliżonej strukturze, jednakże wykazujące lepszą aktywność przeciwprątkową *in vivo* oraz mniejszą toksyczność, takie jak PNU-100480 oraz AZD-5847 (Rys. 5) [54].



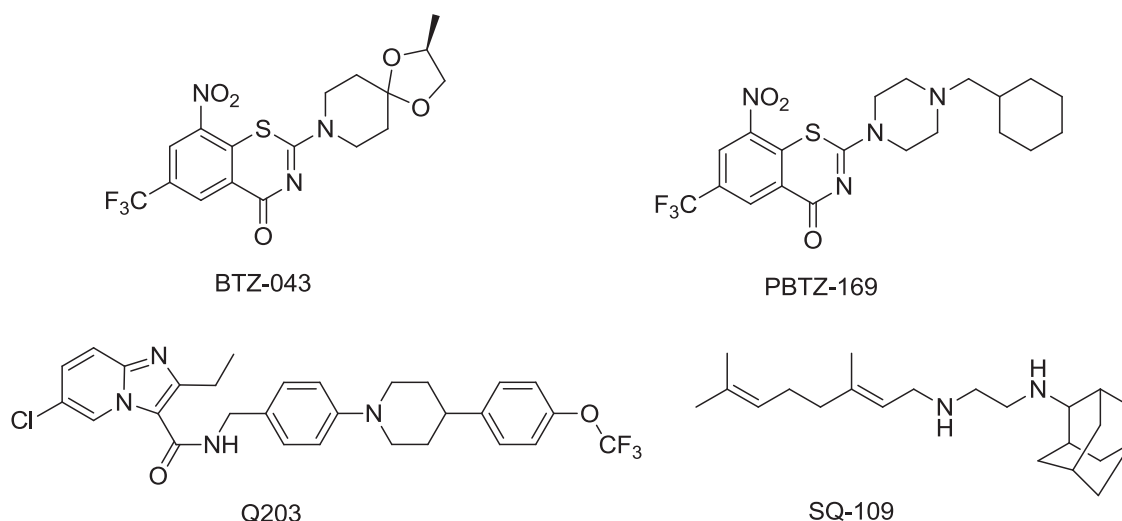
**Rys. 5** Pochodne diarylocholiny oraz oksazolidynonów

Pretomanid (PA-824) jest prolekiem będącym pochodną metronidazolu wykazującego silną aktywność wobec bakterii beztlenowych oraz pierwotniaków (Rys. 6). Nowa pochodna metronidazolu wykazuje aktywność przeciwprątkową wobec szczepów wrażliwych oraz lekoopornych z wartością MIC<sub>90</sub> równą 0,125 µg/ml. MIC<sub>90</sub> jest definiowane jako najniższe stężenie hamujące wzrost 90% badanych drobnoustrojów. Mechanizm bakteriobójczy pretomanidu wobec bakterii replikujących polega na hamowaniu syntezy białek i lipidów wchodzących w skład ściany komórkowej. Natomiast komórki niereplikujące są zabijane, poprzez uwalnianie tlenu azotu co skutkuje zaburzeniami w procesie oddychania komórkowego. Lek ten znajduje się obecnie w III fazie badań klinicznych [55]. W 2014 roku do leczenia gruźlicy wprowadzono lek delamanid (OPC-67683) będący pochodną nitroimidazolu (Rys. 6). Lek ten posiada dwukierunkowy mechanizm działania, taki sam jak pretomanid. Delamanid ze względu na dobry profil bezpieczeństwa oraz wykazywanie nielicznych interakcji lekowych może być przydatnym lekiem towarzyszącym w leczeniu pacjentów z koinfekcją wirusem HIV [44].



**Rys. 6** Struktura pretomanidu oraz delamanidu

Farmaceutyki ukierunkowane na hamowanie dekaprenylofosforylo- $\beta$ -D-rybozo-20-epimerazy (DprE1), enzymu niezbędnego do syntezy D-arabinofuranozy, są intensywnie rozwijane w I fazie badań klinicznych. Do grupy tych związków należą pochodne benzotiazynonu BTZ-043 oraz PBTZ-169 (Rys. 7). Jednakże idiosynkratyczna toksyczność wynikająca z tworzenia się chemicznie reaktywnych metabolitów może ograniczyć rozwój pochodnych benzotiazynonu [47].



**Rys. 7** Związki o aktywności przeciwgruźliczej zakwalifikowane do badań klinicznych

Związek Q203 należący do pochodnych imidazopyridyny (Rys. 7) jest obecnie testowany w I fazie badań klinicznych jako inhibitor podjednostki cytochromu bc1 (QcrB). Jednakże wysoka wartość cLogP stanowi znaczne utrudnienie w procesie formulacji leku.

Badania prowadzone nad cząsteczką SQ-109 (Rys. 7) wykazały, iż jest ona inhibitorem MmpL3. MmpL3 jest to mykobakteryjne białko błonowe odpowiedzialne za transport monomikolanów trehalozy z cytoplazmy przez błonę komórkową w celu biosyntezy ściany komórkowej. Zahamowanie białka MmpL3 prowadzi do zaburzenia w procesie tworzenia ściany komórkowej oraz akumulacji monomikolanów w cytoplazmie. Ponadto badania potwierdziły synergizm działania SQ-109 z rifampicyną oraz izoniazydem w mysim modelu przewlekłej gruźlicy. Synergia ta nie została zaobserwowana u ludzi. Po przeprowadzeniu badań klinicznych II fazy stwierdzono, iż związek ten jest skuteczny zarówno wobec MDR-TB, jak i XDR-TB [56,57].

Stworzenie nowych schematów leczenia o wyższej efektywności, niższej toksyczności oraz krótszym czasie leczenia jest istotnym elementem walki z gruźlicą oporną. Badanie STAND (ang. *Shortening Treatments by Advancing Novel Drugs*) było



pierwszym testowanym klinicznie schematem zawierającym nowatorski lek. W skład tego schematu wchodziły moksyflokscyna, pretomanid oraz pirazynamid. Skuteczność działania pretomanidu, linezolidu oraz bedakiliny w leczeniu gruźlicy lekoopornej jest tematem badania klinicznego ZeNix-TB. Wstępne badania pokazały, iż wśród 20 pacjentów przyjmujących leki przez okres 6-9 miesięcy tylko u jednej osoby nastąpił nawrót. Zatwierdzone uprzednio w leczeniu gruźlicy fluorochinolony, lewofloksacyna oraz moksyflokscyna, są ponownie tematem badań klinicznych mających na celu skrócenie czasu leczenia. Trzy badania zawierające połączenie lewofloksacyny z innymi lekami: MDR-END, OptiQ oraz NEXT, będą oceniały skuteczność leczenia po okresie 9-24 miesięcy. Obecnie istnieje kilkanaście badań będących w II i III fazie, które obejmują całe spektrum kliniczne gruźlicy. Prowadzone badania dotyczą między innymi koinfekcji z wirusem HIV, gruźlicy u dzieci, a także formy latentnej [54,56].

Naukowcy podejmują próby stworzenia nowych systemów podawania leków przy użyciu biodegradowalnych polimerów, które pozwolą na wydłużone podawanie leków za pośrednictwem dyfuzji kontrolowanej matrycą bądź membraną. Do badanych systemów kontrolowanych należą między innymi mikrosfery, nanocząstki polimerowe, liposomy czy polimeryczne micelle. Podawanie dotychczas stosowanych leków za pomocą nowoczesnych systemów wpłynie korzystnie na ich parametry farmakokinetyczne, takie jak stała szybkości wchłaniania ( $K_a$ ), dostępność biologiczna czy czas opóźnienia wchłaniania ( $t_{lag}$ ) [41,58].

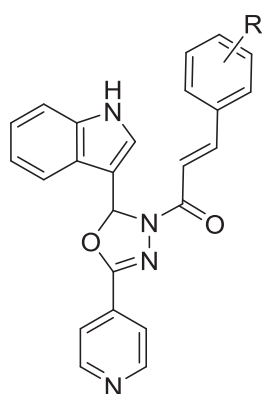
## **2.3. Aktualny przegląd związków o aktywności przeciwgruźliczej**

### **2.3.1. Pochodne pirydyny o aktywności przeciwgruźliczej**

Pirydyna jest heterocyklicznym związkiem aromatycznym posiadającym atom azotu w swojej strukturze. Wspomniany atom azotu wiąże się z dwoma sąsiadującymi atomami węgla za pomocą orbitali  $sp^2$ . Trzeci orbital atomu azotu zawiera wolną parę elektronową, dzięki której pirydyna wykazuje słabe właściwości zasadowe. W reakcji z kwasami tworzy krystaliczne sole pirydyniowe. W reakcjach organicznych zachowuje się jak trzeciorzędowa amina, ulegając protonowaniu, alkilowaniu i *N*-utlenianiu. Ponadto ze względu na zmniejszoną gęstość elektronową w pierścieniu łatwo ulega reakcjom substytucji nukleofilowej. Pierścień pirydyny jest jednym z najczęściej występujących w strukturze nowych środków leczniczych ugrupowaniem *N*-heteroaromatycznym. Ponadto w środowisku naturalnym występuje wiele związków o różnorodnych

właściwościach biologicznych zawierających ugrupowanie pirydynowe. Pochodne pirydyny wykazują m.in. działanie przeciwnowotworowe, przeciwdrgawkowe, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, w tym także przeciwgruźlicze [59–63].

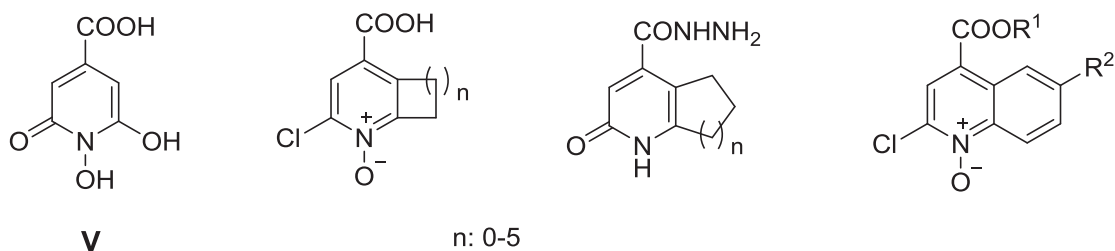
W 2016 roku indyjscy naukowcy otrzymali serię pochodnych 1,3,4-oksadiazolu z ugrupowaniem pirydynowym oraz indolowym w swojej strukturze. Dla otrzymanych związków wykonano badanie aktywności przeciwprątkowej wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv oraz *M. bovis* BCG. Testowane pochodne wykazały niską aktywność przeciwprątkową wobec szczepu *M. tuberculosis* w formie latentnej, jak i aktywnej. Badania wobec szczepu *M. bovis* pozwoliły wyłonić związki **I-IV** (Rys. 8) silnie hamujące wzrost drobnoustrojów z wartością MIC w zakresie 0,94-5,17 µg/ml. Selektywność otrzymanych związków sprawdzono poprzez poszerzone badania mikrobiologiczne wobec bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus subtilis*. Wyniki badań pokazały, iż związki te nieznacznie hamują wzrost wybranych szczepów bakterii, co świadczy o ich selektywności wobec *M. bovis*. Za pomocą dokowania molekularnego metodą *in silico* ustalono, iż pochodne te mogą oddziaływać i wiązać się z mykobakteryjną reduktazą enoilową (InhA). Fragment pirydynowy również bierze udział w oddziaływaniu z aminokwasami kieszeni wiążącej [64].



Nr	R
I	2-OH
II	2-NO <sub>2</sub>
III	4-NO <sub>2</sub>
IV	2,4-(Cl) <sub>2</sub>

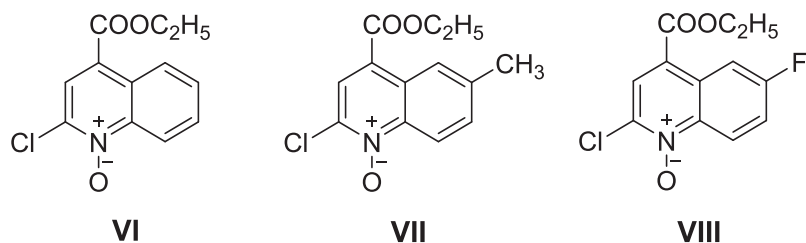
**Rys. 8** Struktura pochodnych 1,3,4-oksadiazolu z pierścieniem pirydyny

Opierając się na strukturze nowego analogu DHS (**V**), którego rdzeń stanowi pierścień pirydyny zaprojektowano wieloetapową syntezę pochodnych kwasu izonikotynowego (Rys. 9).



**Rys. 9** Pochodne kwasu izonikotynowego

Związek **V** hamuje enzym dehydrogenazę szikimianową będącą elementem szlaku szikimowego, odpowiedzialnego za syntezę związków aromatycznych u roślin i mikroorganizmów. Brak szlaku szikimowego u ludzi, a także jego duże znaczenie dla bakterii czyni go potencjalnym celem molekularnym dla rozwoju nowego leku przeciwgruźliczego. Wśród otrzymanych związków znalazły się skondensowane oraz funkcjonalizowane pochodne pirydyny o aktywności przeciwgruźliczej. Uważano, iż wprowadzenie skondensowanego pierścienia benzenowego zwiększy hydrofobowość cząsteczki, a to natomiast poprawi jej właściwości farmakologiczne.

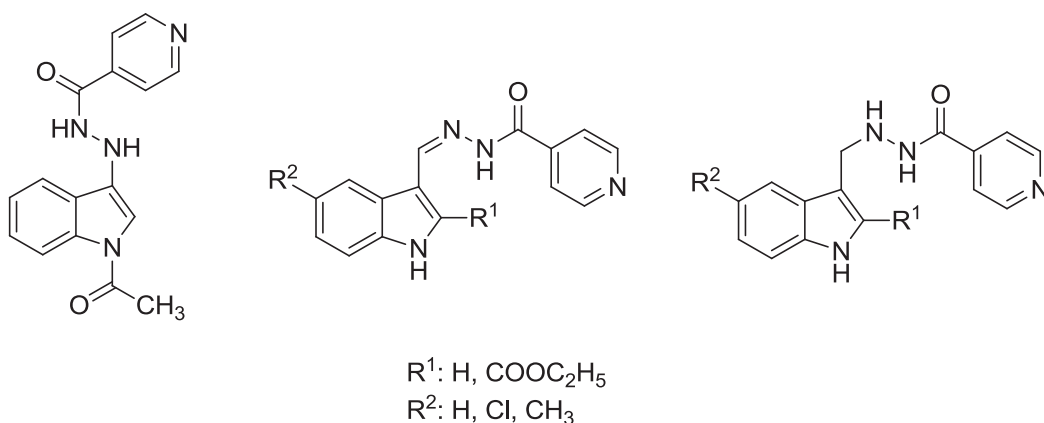


**Rys 10** Pochodne chinoliny o najwyższej aktywności przeciwgruźliczej

Aktywność tuberkulostatyczną wszystkich zsyntezowanych związków przebadano wstępnie wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv z wykorzystaniem testu MABA (ang. *microplate alamar blue assay*). Dla związków o dobrych parametrach wykonano również badania wobec niereplikujących bakterii *M. tuberculosis* za pomocą testu LORA (ang. *low oxygen recovery assay*). Otrzymana w obu testach wartość MIC była definiowana jako najniższe stężenie hamujące odzyskiwanie sygnału lucyferazy, większe lub równe 90% w stosunku do kontroli. Zmniejszenie sygnału lucyferazy koreluje ze zmniejszeniem liczby żywych komórek bakteryjnych. Jedynie związki **VI-VIII** (Rys. 10) wykazały dobrą aktywność tuberkulostatyczną z wartością MIC poniżej 13,1  $\mu\text{g/ml}$ . Pozostałe związki posiadały aktywność na poziomie wyższym niż 50  $\mu\text{g/ml}$ . Najwyższą aktywność

przeciwprątkową wykazał związek **VII** z wartością MIC w teście MABA 4,33  $\mu\text{g/ml}$  oraz w teście LORA 3,65  $\mu\text{g/ml}$ . Związek ten w teście MABA był nieco mniej aktywny niż leki referencyjne, natomiast wartość MIC w teście LORA była porównywalna lub lepsza niż dla związków odniesienia. W prowadzonym badaniu zastosowano izoniazyd, rifampicynę oraz moksyflokacynę jako leki referencyjne [65].

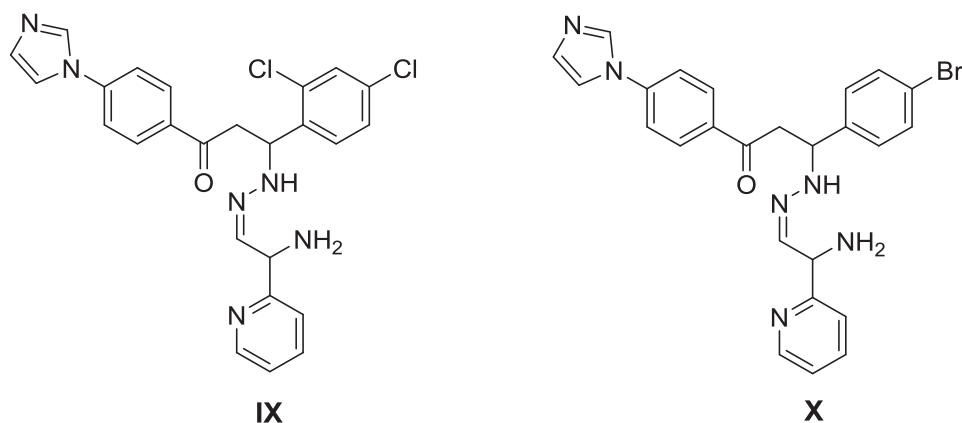
Aktualnym trendem projektowania nowych leków w chorobach bakteryjnych jest tworzenie związków hybrydowych posiadających farmakofory oddziałujące z różnymi celami molekularnymi. Zgodnie z tą koncepcją Velezheva wraz ze swoim zespołem zaprojektowała struktury hybrydowe posiadające dwa heterocykliczne pierścienie o aktywności redoks: pirydynę oraz indol, połączone fragmentem hydrazydowym. Spośród 30 nowo otrzymanych związków hybrydowych 7 posiadało bardzo dobrą aktywność hamującą wzrost szczepu *M. tuberculosis* H37Rv z wartością MIC w zakresie 0,05-0,2  $\mu\text{g/ml}$  (Rys. 11). Pochodne hydrazydowe posiadające pierścień pirydyny wykazywały wyższą aktywność niż ich analogi o budowie N-tlenków pirydyny. Redukcja pierścienia pirydynowego również powodowała spadek aktywności. Wśród otrzymanych związków znalazły się także pochodne tiosemikarbazydowe pozbawione pierścienia pirydyny, jednakże posiadały one znacząco niższą aktywność z wartością MIC  $<10 \mu\text{g/ml}$ . Dla najaktywniejszych związków przeprowadzono także badania wobec szczepu CN-40 opornego na izoniazyd. Aktywność testowanych związków wobec szczepu opornego była od 20 do 100 razy niższa niż wobec szczepu standardowego [66].



**Rys. 11** Struktury hybrydowe zawierające pierścień pirydyny oraz indolu

Zampieri zaprojektował serię związków o potencjalnie dwukierunkowej aktywności biologicznej przeciwgrzybiczej oraz przeciwgruźliczej. W celu uzyskania aktywności przeciwgrzybiczej wprowadzono do struktury pierścień imidazolu, który jest obecny w wielu lekach azolowych. Natomiast, aby otrzymane związki wykazywały

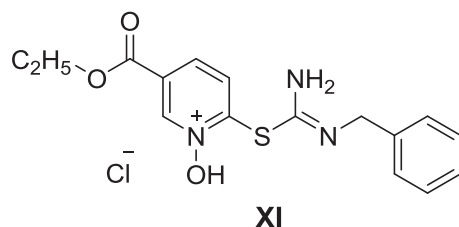
aktywność tuberkulostatyczną, wprowadzono ugrupowanie pirydyno-2-karboksyamidrazonowe (Rys. 12). Podczas projektowania wykorzystano lipofilowe oraz elektronoakceptorowe podstawniki, które poprzez zwiększenie lipofilowości związku mogą umożliwić interakcje z silnie hydrofobową ścianą komórkową *M. tuberculosis*. Wszystkie związki w niskim stopniu hamowały wzrost szczepu *Candida albicans*. Strefa zahamowania wzrostu była niższa niż leku referencyjnego, amfoterycyny B, i wynosiła od 4 do 13 mm przy dawce 20 µg/ml. Badanie aktywności przeciwprątkowej wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv ujawniło, iż związki te słabo hamują wzrost prątków. Prowadzone badania poszerzono o szczepy prątków niegruźliczych (MOTT). Pochodna 2,4-dichloro (IX) wykazała najwyższą aktywność przeciwprątkową wobec 3 spośród testowanych szczepów niegruźliczych: *M. intracellulare*, *M. avium* (33,3 µM) oraz *M. kansasii* (4,2 µM). Bromopochodna (X) wykazała najwyższą aktywność wobec szczepu *M. gordonae* (2,0 µM), *M. bovis* oraz *M. marinum* (8,2 µM). Aktywność wobec szczepów MOTT była znacząco wyższa niż dla leku referencyjnego, jakim był izoniazyd (7,3-467 µM). Analiza zależności struktura aktywność ujawniła, iż położenie podstawnika przy pierścieniu benzenowym ma wpływ na badaną aktywność. Najniższą aktywność posiadały związki z podstawnikiem w pozycji *meta*, podczas gdy podstawienie pierścienia benzenowego w pozycji *para* pogłębiało aktywność przeciwprątkową [67].



**Rys. 12** Pochodne pirydyno-2-karboksyamidrazonowe

Rosyjscy naukowcy przeprowadzili syntezę serii pochodnych 1-hydroksy-2-tiopirydyny wykazujących wysoką aktywność przeciwko prątkom aktywnym, jak również przeciwko prątkom w formie uśpionej. Na podstawie otrzymanych wyników zbadano wpływ różnych podstawników przy ugrupowaniu izotiomocznikowym, a także w pozycji C-5 pierścienia pirydyny. Zaobserwowano brak aktywności przeciwgruźliczej w obecności

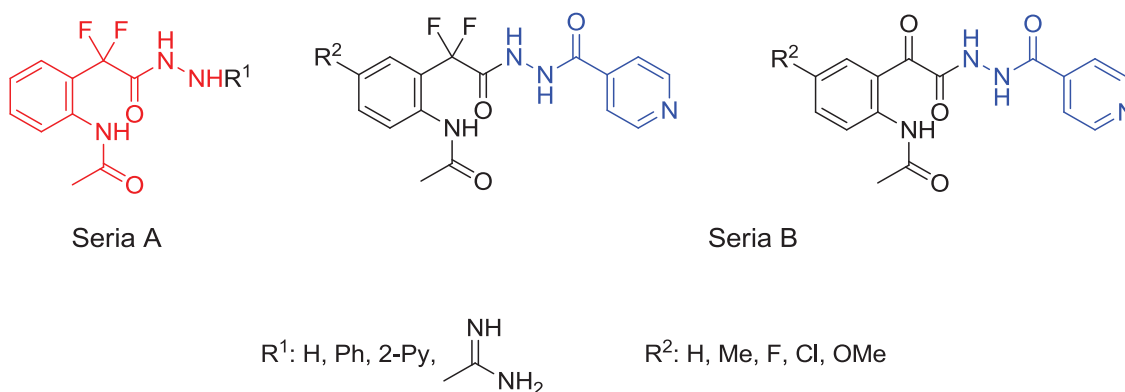
atomu wodoru, chloru oraz grupy metylowej przy pierścieniu pirydynowym. Niemniej jednak pochodne posiadające w pozycji C-5 pierścienia pirydyny podstawniki elektronoakceptorowe, takie jak alkoksykarbonyl czy trifluorometyl, wykazały wysoki potencjał przeciwgruźliczy. Najaktywniejsze związki charakteryzowały się aktywnością wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv w zakresie 0,031-0,063 µg/ml (Rys. 13). Co więcej, te same związki wykazały również aktywność wobec szczepu klinicznego CN-40 z wartością MIC równą 0,063 µg/ml. Badane pochodne 1-hydroksy-2-tiopirydyny spowodowały także wysoki spadek żywotności bakterii w formie uśpionej uzyskanych przez niedobór potasu. Dla najaktywniejszego związku (**XI**) wobec bakterii w formie uśpionej wykonano również dwa inne modele uśpienia *in vitro*: hipoksji Wayne'a oraz głodu odżywczego Betts. W obu przypadkach zaobserwowano znaczny spadek żywotności, co świadczy o wysokiej aktywności tych związków wobec bakterii w formie uśpionej. Aby ocenić stabilność *in vivo*, związek **XI** został podany myszy w dawce 25 mg/kg. Pobrana po 5 minutach od wstrzyknięcia surowica była aktywna. Aktywność ta zanikła po 30 minutach. Po podaniu doustnym nie zaobserwowano żadnej aktywności w surowicy, prawdopodobnie przez szybki metabolizm związku w wątrobie, albowiem ugrupowanie N-hydroksylowe łatwo ulega metabolizmowi w wyniku działania reduktaz [68].



**Rys. 13** Pochodna 1-hydroksy-2-tiopirydyny

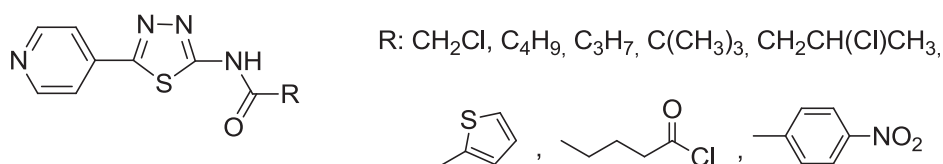
Na podstawie budowy strukturalnej dwóch leków przeciwgruźliczych izoniazydu oraz tioacetazonu zaprojektowano 2 serie pochodnych hydrazydowych (Rys. 14). Rusztowanie serii A stanowił fragment 2,2-difluoro-2-fenylacetamidu, który był podstawiany różnymi hydrazydami. Natomiast w serii B rusztowanie stanowił fragment izoniazydu podstawiony 2,2-difluoro-2-fenylacetamidem lub 2-okso-2-fenylacetamidem. Związki z serii A nieposiadające fragmentu izoniazydu w swojej strukturze nie wykazywały aktywności przeciwgruźliczej wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv. Wprowadzenie fragmentu izoniazydu w serii B spowodowało wzrost aktywności przeciwgruźliczej. Pochodne difluorowe posiadały bardzo dobrą lub umiarkowaną

aktywność przeciwpłatkową (MIC 3,59-33,07  $\mu\text{M}$ ). Podstawienie pierścienia fenylowego w pozycji C-4 miało negatywny wpływ na aktywność tuberkulostatyczną. Wpływ ten nie wykazał powiązania z charakterem elektronowym podstawnika, gdyż zarówno związki z podstawnikami elektronodonorowymi, jak i elektronoakceptorowymi wykazywały niższą aktywność niż pochodna niepodstawiona. Zastąpienie ugrupowania difluorometylowego grupą karbonylową było korzystne dla badanej aktywności. Karbonylowe analogi (MIC 0,43-0,47  $\mu\text{M}$ ) wykazywały około 2 razy wyższą aktywność niż izoniazyd czy rifampicyna oraz 30 razy wyższą niż etambutol. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy lipofilowością charakteryzowaną przez LogP a aktywnością otrzymanych związków. Sugerowałoby to, iż aktywność badanej grupy pochodnych wynikała raczej z ich budowy przestrzennej niż właściwości fizykochemicznych [69].



**Rys. 14** Hydrazydowe pochodne o aktywności przeciwgruźliczej

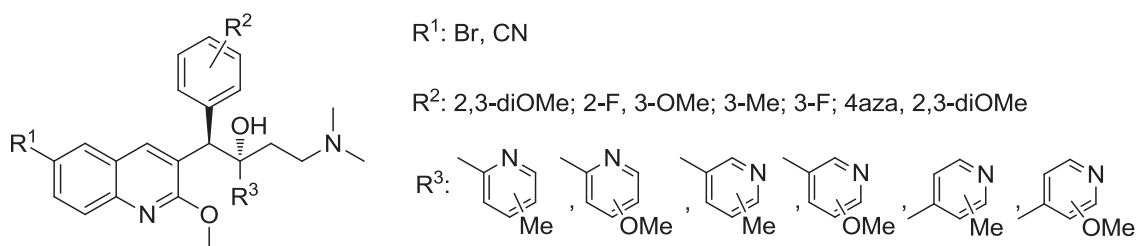
Patel wraz z zespołem otrzymał związki posiadające w swojej strukturze pierścien pirydyny oraz 1,3,4-tiadiazolu (Rys. 15). Pierścien tiadiazolu i jego pochodne są znane z szerokiej aktywności przeciwbakteryjnej w związku z obecnością ugrupowania toksoforowego N-C-S. Otrzymane związki wykazywały umiarkowaną lub niską aktywność przeciwgruźliczą wobec standardowego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv z wartością MIC w zakresie od 9,93 do 238  $\mu\text{M}$ .



**Rys. 15** Pochodne 1,3,4-tiadiazolu

Zaobserwowano, iż obecność podstawników wyciągających elektrony przy łańcuchu alifatycznym w pozycji C-2 pierścienia 1,3,4-tiadiazolu zmniejszała zdolność do hamowania wzrostu prątków [70].

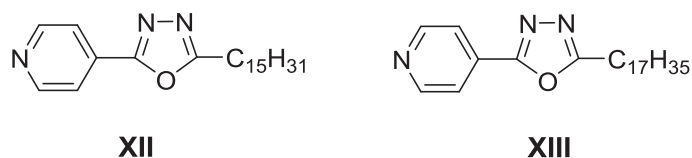
Bedakilina (Rys. 5) jest skutecznym lekiem w leczeniu gruźlicy lekoopornej, jednakże jej wysoka lipofilowość (cLogP 7,25) skutkuje długim okresem półtrwania, a to zwiększa toksyczność leku. W związku z tym Blaser wraz z zespołem zaprojektował analogi bedakiliny, w których pierścień naftalenu został zastąpiony pierścieniem pirydyny z różnymi podstawnikami, w celu otrzymania związków o mniejszej lipofilowości (Rys. 16). Otrzymane wyniki wykazały, iż związki o wyższej lipofilowości charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwgruźliczą. Siła działania tej grupy pochodnych znacznie spada, gdy cLogP wynosi poniżej 4,0. Pomimo to, większość otrzymanych substancji wykazała bardzo dobrą aktywność przeciwgruźliczą z wartością MIC90 od 0,01 do 4,1 µg/ml w teście MABA oraz od 0,02 do 3,8 µg/mL w teście LORA. Podczas gdy aktywność bedakiliny w testach MABA i LORA wynosiła odpowiednio 0,08 i 0,12 µg/ml. Stwierdzono, że zmiany w obrębie pierścienia benzenowego nie mają istotnego wpływu na aktywność [71].



**Rys. 16** Pirydynowe analogi bedakiliny

Meksykański zespół badawczy podjął próbę otrzymania połączeń pierścienia pirydyny z pierścieniem 1,3,4-oksadiazolu. Związki **XII** (MIC 0,35 µM) i **XIII** (MIC 0,65 µM) wykazały aktywność przeciwgruźliczą wobec szczepu standardowego na zbliżonym poziomie co lek referencyjny - izoniazyd (MIC 0,44 µM) (Rys. 17). Hydrazydowe pochodne nieposiadające ugrupowania 1,3,4-oksadiazolowego, nie wykazały aktywności tuberkulostatycznej. Z kolei badania wobec szczepów klinicznych CIBIN 687 oraz CIBIN 650 pokazały, iż wyżej wspomniane związki posiadają aktywność przeciwprątkową na poziomie nanomolowym, a zatem znacząco wyższą niż izoniazyd.



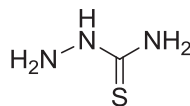


**Rys. 17** Pochodne z ugrupowaniem 1,3,4-oksadiazolu

Oba związki posiadają silnie lipofilowe łańcuchy węglowodorowe i charakteryzują się najwyższą lipofilowością spośród badanych związków z wartością cLogP odpowiednio 8,14 oraz 9,20 [72]. Wysoka lipofilowość poprawia przenikanie przez ścianę komórkową prątków, jednakże jednocześnie znacznie zmniejsza rozpuszczalność związku, a w efekcie utrudnia podawanie leków drogą doustną. Aby przezwyciężyć ten problem, wykorzystano liposomy jako nośnik dla związku **XII**. Badanie było prowadzone na modelu mysim zarażonym szczepem *M. tuberculosis* H37Rv, a także szczepami opornymi. Testowany związek był podawany drogą dotchawiczą. Po miesiącu leczenia myszy zainfekowanych szczepem standardowym zaobserwowano spadek liczebności prątków o 80%, podczas gdy dla szczepów opornych po 2 miesiącach terapii odnotowano redukcję obciążenia prątkami o 90% w porównaniu z próbą kontrolną [73].

### 2.3.2. Pochodne tiosemikarbazydowe o aktywności przeciwgruźliczej

Hydrazynokarbotioamid (tiosemikarbazyd) (Rys. 18) o wysokim procencie masowym atomów siarki i azotu, to pochodna funkcyjna kwasu tiokarbaminowego podstawiona fragmentem hydrazynowym. W związku z obecnością atomów siarki i azotu pochodne zawierające ugrupowanie hydrazynokarbotioamidowe, mogą łatwo tworzyć wiązania wodorowe z białkami, co zwiększa siłę ich oddziaływania z receptorem [74].

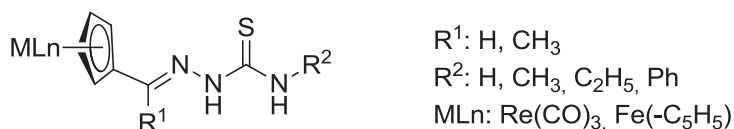


**Rys. 18** Wzór strukturalny tiosemikarbazydu

Ponadto ugrupowanie hydrazynokarbotioamidowe jest szeroko wykorzystywane w syntezie heterocyklicznych układów pierścieniowych takich jak pirazole, tiazole, 1,2,4-triazolotiony czy tiadiazepiny [75]. Dzięki szerokim właściwościom koordynacyjnym i donorowym atomu siarki są wykorzystywane do syntezy kompleksów metali

przejściowych [76]. Związki o tej budowie są znane z szerokiej aktywności biologicznej: przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej, cytotoksycznej, przeciwdrgawkowej, przeciwbólowej [74,76–78]. Właściwości przeciwgruźlicze hydrazynokarbatioamidów są przedmiotem zainteresowania naukowców od 1946 roku, kiedy to po raz pierwszy Domagk wraz z zespołem opublikował prace wskazujące na potencjał tuberkulostatyczny pochodnych tiosemikarbazydowych [79]. Dzięki ich aktywności przeciwko *Plasmodium falciparum* oraz *Trypanosoma cruzi* są istotną grupą związków w leczeniu malarii oraz choroby Changsa [80,81]. Ich kompleksy z metalami dwuwartościowymi są skutecznymi środkami fungistatycznymi. Kompleksowanie z metalami przejściowymi, a zwłaszcza żelazem i miedzią zwiększa ich siłę działania w porównaniu ze związkami niekompleksowanymi [82]. Ponadto pochodne hydrazynokarbatioamidowe wykazują specyficzną aktywność przeciwgruźliczą. Tioacetazon, należący do pochodnych tiosemikarbazydowych, jest jednym z najstarszych leków przeciwgruźliczych drugiego rzutu wykazujących hamowanie biosyntezy kwasu mikolowego [83,84].

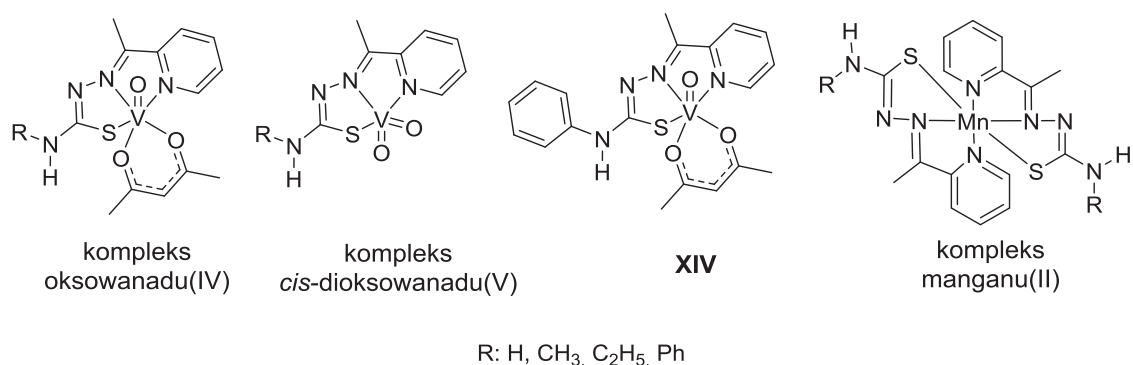
Arancibia wraz z zespołem poszukuje nowych leków w grupie tiosemikarbazydowych metalokompleksów. W wyniku prowadzonych prac przebadał pod kątem aktywności tuberkulostatycznej ferrocenyłowe oraz cyretrenyłowe pochodne tiosemikarbazydowe (Rys. 19). Należą one do tzw. metalocenów, czyli związków zawierających metal przejściowy oraz ligandy cyklopentadienylowe tworzące strukturę typu „sandwich”. Zarówno pochodne ferrocenyłowe, jak i cyretrenyłowe wykazały zbliżoną aktywność przeciwgruźliczą (MIC 20-50 µg/ml). A zatem ich przeciwnie efekty elektronowe nie wydają się mieć istotnego wpływu na aktywność przeciwgruźliczą. Umiarkowana aktywność otrzymanych związków może wynikać z wysokiej lipofilowości ugrupowania metaloorganicznego [85].



**Rys. 19** Pochodne metaloorganiczne

Podjęto także próbę otrzymania kompleksów oksowanadu(IV) oraz *cis*-dioksowanadu(V) z tiosemikarbazydami (Rys. 20). Zsyntezowane kompleksy wykazywały zróżnicowaną aktywność z wartością MIC w zakresie 1,58-62,5 µg/ml.

Podstawienie atomu wodoru przy azocie N-4 ugrupowania tiosemikarbazydowego skutkowało poprawą aktywności. Związek **XIV** charakteryzował się aktywnością 10-krotnie wyższą (MIC 1,58 µg/ml) niż jego niepodstawiony analog. Stopień utlenienia wanadu nie wydaje się mieć istotnego znaczenia, gdyż nie zaobserwowano żadnej tendencji dla aktywności przeciwgruźliczej wywołanej zamianą wanadu(IV) na wanad(V) [86].

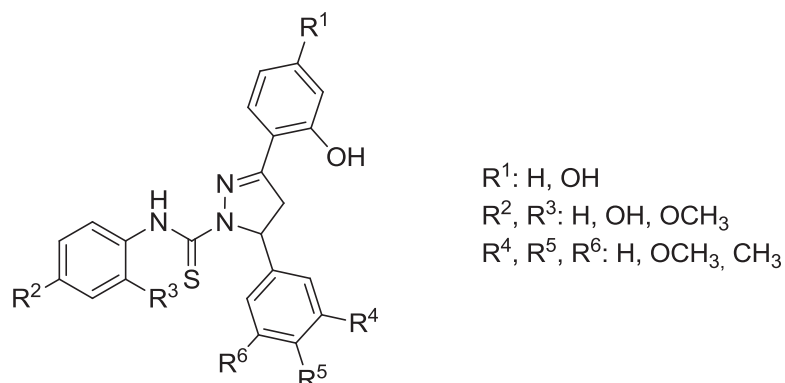


**Rys. 20** Kompleksy tiosemikarbazydów z wanadem (IV) i (V) oraz manganem (II)

Ten sam zespół badawczy syntezował i przebadał pod kątem aktywności przeciwgruźliczej kompleksy manganu(II) z tiosemikarbazydami (Rys. 20). Spośród otrzymanych kompleksów trzy związki wykazały bardzo dobrą aktywność tuberkulostatyczną z wartościami MIC w zakresie od 0,78 do 3,3 µg/ml. Niemniej jednak aktywność otrzymanych kompleksów nie różniła się znacząco w stosunku do nieskoordynowanych tiosemikarbazydów [87].

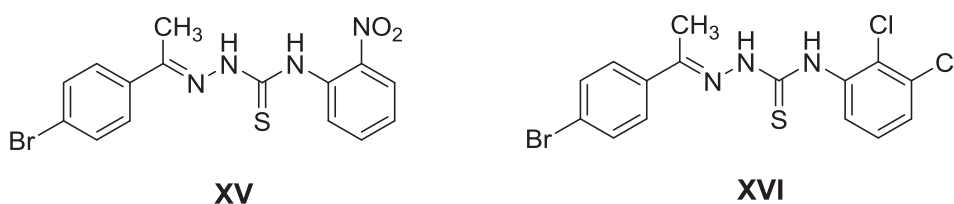
Wiele mikroorganizmów w przypadku niedoboru żelaza wydziela siderofory, czyli substancje chelatujące jony żelaza. Wynika to z faktu, iż bakterie adaptują się, aby dostosować swoją fizjologię do ograniczonej ilości niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania pierwiastka jakim jest żelazo. *Mycobacterium* wydziela dwa rodzaje sideroforów: mykobaktyny oraz karboksymykobaktyny, różniące się tylko resztą lipidową. W związku z wysokim znaczeniem mykobaktyn dla wzrostu i zjadliwości prątków stały się one atrakcyjnym celem molekularnym. Zespół naukowców ze Stanów Zjednoczonych zsyntezował związki o strukturalnym podobieństwie do sideroforów (Rys. 21). Otrzymane związki były testowane wobec *Mycobacterium* w środowisku o ograniczonej ilości żelaza oraz w środowisku bogatym w żelazo. Wartości MIC dla nowo otrzymanych pochodnych wynosiły od 12 do powyżej 500 µg/ml. Spośród 15 badanych związków 6 wykazywało trzykrotnie wyższą aktywność wobec *Mtb* hodowanych w niedoborze żelaza. Otrzymane

wyniki potwierdzają istotne znaczenie systemu sideroforów w warunkach niedoboru żelaza oraz fakt, iż jego upośledzenie skutkuje zahamowaniem wzrostu bakterii [88].



**Rys. 21** Związki o podobieństwie strukturalnym do sideroforów

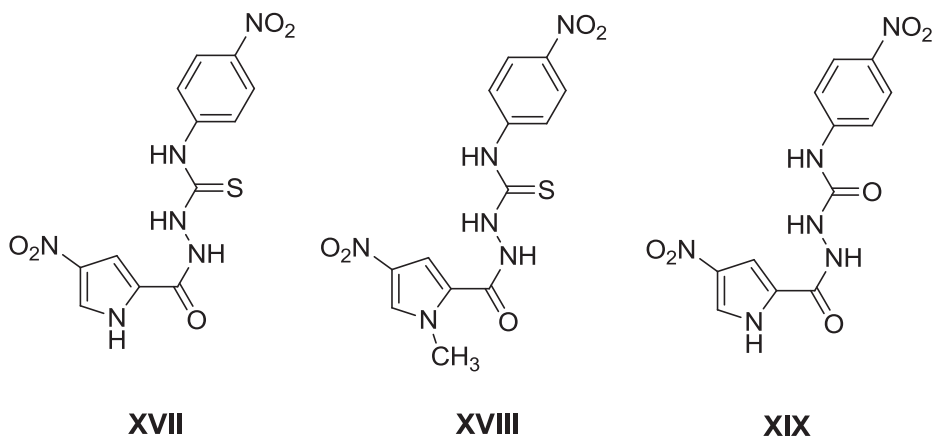
Singh otrzymał pochodne tiosemikarbazydowe **XV** i **XVI** (Rys. 22) o bardzo dobrej aktywności przeciwgruźliczej (MIC 0,4 µg/ml). Obie wymienione pochodne posiadały w pozycji 4 pierścienia benzenowego atom bromu. Pochodne posiadające w tej samej pozycji grupę nitrową wykazywały od kilku do kilkunastu razy niższą aktywność przeciwgruźliczą. Podstawienie drugiego pierścienia benzenowego bromopochodnych grupami elektronoakceptorowymi w pozycji *ortho* skutkowało pozytywnym wpływem na aktywność [89].



**Rys. 22** Pochodne tiosemikarbazydowe otrzymane przez zespół Singh

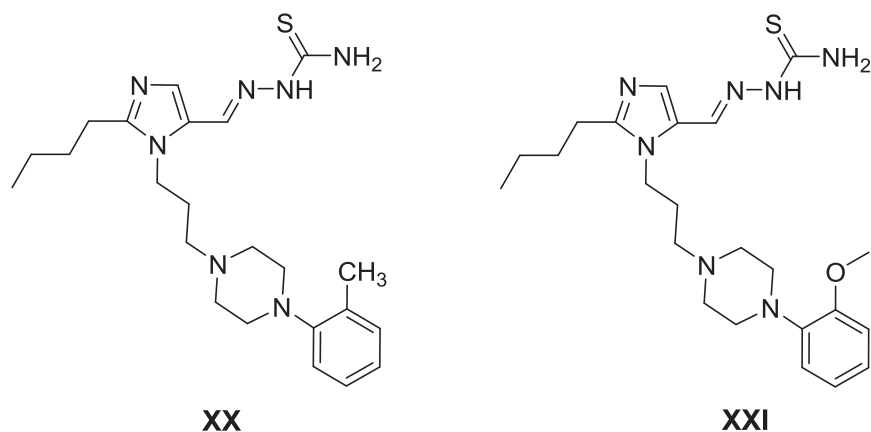
Badania zespołu Rane doprowadziły do otrzymania koniugatów ugrupowania tiosemikarbazydowego z 4-nitropirolelem (Rys. 23). Otrzymane związki posiadały dobrą bądź umiarkowaną aktywność tuberkulostatyczną (MIC 0,5-59,2 µg/ml). Związek **XVII** wykazał najwyższą aktywność (MIC 0,5 µg/ml) zbliżoną do aktywności leku referencyjnego izoniazydu (MIC 0,4 µg/ml). Ponadto uzyskane wyniki wykazały, że podstawienie pierścienia benzenowego w pozycji *para* grupą nitrową jest korzystne dla

aktywności przeciwgruźliczej, a metylacja atomu azotu pierścienia pirolowego nie sprzyja występowaniu aktywności. Związek **XVIII** będący metylowym analogiem związku **XVII** wykazał ponad 100-krotnie niższą siłę działania. Przeprowadzono również syntezę analogów semikarbazydowych, w których atom siarki został zastąpiony atomem tlenu (**XIX**), jednakże ich aktywność była znacząco niższa, co sugeruje, iż obecność atomu siarki jest preferowana w potencjalnych lekach przeciwgruźliczych [90].



*Rys. 23 4-nitropirolowe pochodne o aktywności tuberkulostatycznej*

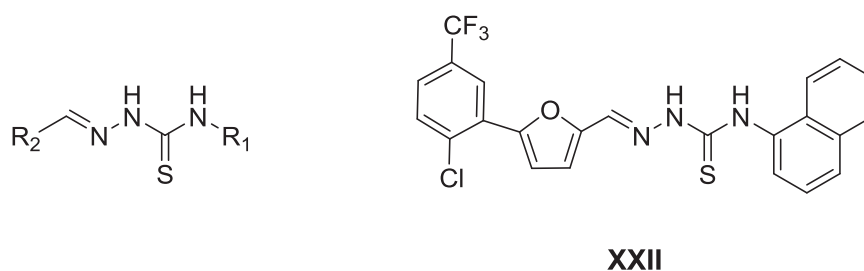
W związku z sukcesem otrzymanych dotychczas przez Jallapally pochodnych 2-butylo-4-chloroimidazo-izoksazolidyny zaproponował on hybrydę posiadającą trzy bioaktywne elementy strukturalne: imidazol, piperazynę oraz tiosemikarbazon (Rys. 24). Fragment 2-butylo-4-chloroimidazolu stanowił rdzeń zaprojektowanych związków, natomiast fragment piperazyny i tiosemikarbazynu miał na celu wzmocnienie charakteru farmakoforowego. Co więcej, do cząsteczki piperazyny dodano pierścień aromatyczny w celu zwiększenia lipofilowości. Aktywność otrzymanych związków była zróżnicowana w zakresie MIC 3,13-50 µg/ml. Związki **XX** oraz **XXI** (MIC 3,13 µg/ml) wykazały siłę działania porównywalną z lekiem referencyjnym etambutolem (MIC 3,13 µg/ml). Obecność podstawników elektronodonorowych w pozycji *orto* przy pierścieniu benzenowym zwiększała aktywność badanych związków. W przypadku podstawników elektroakceptorowych zaobserwowano odwrotny efekt. Bezpośrednie przyłączenie podstawnika fenyloвого do piperazyny wpływało lepiej na aktywność niż przyłączenie ugrupowania benzylowego. Związki posiadające grupę difenylometylową przyłączoną do piperazyny nie wykazywały istotnej aktywności przeciwgruźliczej [91].



*Rys. 24 Pochodne 2-butylo-4-chloroimidazolu*

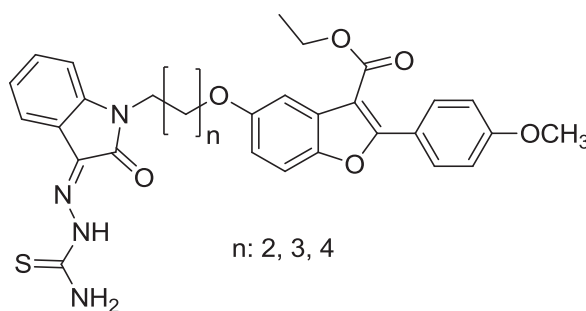
Sens wraz ze współpracownikami po raz pierwszy otrzymali i przebadali tiosemikarbazydy jako niekompetycyjne inhibitory PtpA u *M. tuberculosis* (Rys 25). Białka Ptp, będące fosfatazami tyrozynowymi, są wydzielane przez prątki do komórek gospodarza gdzie defosforylują białka cytoplazmatyczne tłumiąc odpowiedź immunologiczną. Inhibicja PtpA oraz PtpB zaangażowanych w przetrwanie bakterii powoduje zmniejszenie wzrostu prątków gruźlicy, a także zmniejszenie infekcji w modelach zwierzęcych. Badanie zostało przeprowadzone wobec rekombinowanego enzymu PtpA pochodzącego od *M. tuberculosis*. Około połowa spośród 50 otrzymanych związków wykazywała hamowanie PtpA powyżej 25%. Podstawienie w pozycji R<sup>1</sup> 1-naftyłem wpływa korzystnie na aktywność badanej grupy pochodnych tiosemikarbazydowych. Najaktywniejsza pochodna (**XXII**) wykazywała inhibicję na poziomie IC<sub>50</sub> 1,37±0,80 µg/ml (Rys. 20). Parametr IC<sub>50</sub> określa ilość substancji niezbędnej do zahamowania określonych procesów biologicznych bądź biochemicznych o 50%. Obecność hydrofobowego ugrupowania w pozycji R<sup>1</sup> oraz polarnego w pozycji R<sup>2</sup> jest preferowana w celu zwiększenia siły hamowania aktywności fosfatazy. W związku z faktem, iż Ptp występuje także u ludzi, a jego struktura jest zbliżona do Ptp prątków, istotnym elementem jest selektywność nowych związków. Podawanie niespecyficznych leków może wywoływać poważne skutki uboczne. W celu sprawdzenia selektywności związek **XXI** przebadano także wobec PtpB pochodzącego od *M. tuberculosis*, dwóch ludzkich białkowych fosfataz tyrozynowych PTP1B oraz PTP-PEST, a także fosfatazy tyrozynowej limfocytów T LYP. Badana pochodna wykazała silniejsze hamowanie PtpA niż pozostałych testowanych enzymów. Także wyznaczony współczynnik selektywności

(IC<sub>50</sub> PTP/IC<sub>50</sub> PtpA) przekroczył 2,1, co sugeruje, iż hamuje on preferencyjnie enzym PtpA [92].



*Rys. 25 Inhibitory PtpA o ugrupowaniu tiosemikarbazydowym*

Wieloletnie badania nad hybrydami benzofuranu oraz izatyny wykazały, iż elementami kluczowymi dla aktywności przeciwgruźliczej tej grupy związków jest obecność linkera pomiędzy oboma farmakoforami, a także wprowadzenie do struktury cząsteczki donorów wiązań wodorowych, takich jak hydroksyloamina czy tiosemikarbazyd. Hybrydy z fragmentem tiosemikarbazydowym (Rys. 26) wykazywały znacznie wyższą aktywność niż odpowiednie analogi hydroksyloaminowe.



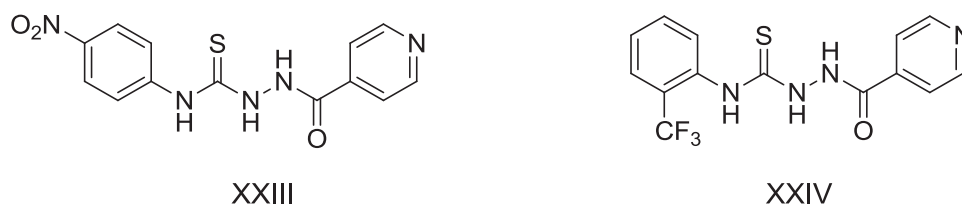
*Rys. 26 Hybrydy izatyny oraz benzofuranu*

Pochodne z fragmentem tiosemikarbazydowym wykazały doskonałą aktywność przeciwprątkową z wartością MIC poniżej 0,016 µg/ml. Ponadto ich aktywność była wyższa niż leków referencyjnych izoniazydu i rifampicyny (MIC 0,078 µg/ml). Badanie wobec dwóch szczepów izolowanych opornych wobec izoniazydu i rifampicyny również wykazało, iż otrzymane pochodne tiosemikarbazydowe (MIC 0,22-1,83 µg/ml) silniej hamują wzrost prątków niż leki referencyjne (MIC >40 µg/ml) [93].

### 2.3.3. Pochodne zawierające fragment tiosemikarbazydowy oraz pierścień pirydyny

W związku z wysoką aktywnością przeciwgruźliczą pochodnych zawierających pierścień pirydyny bądź łańcuch tiosemikarbazydowy, liczne zespoły badawcze podjęły próby łączenia obu fragmentów strukturalnych, oczekując, że nowe cząsteczki będą wykazywały wyższą aktywność biologiczną.

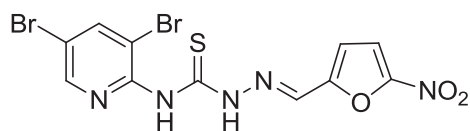
Zespół Srirama w wyniku reakcji soli potasowej podstawionego tiokarbaminianu fenylu z hydrazidem kwasu izonikotynowego otrzymał szereg pochodnych hydrazynokarbotioamidowych (Rys. 27). Otrzymane związki cechowały się bardzo dobrą aktywnością tuberkulostatyczną z wartością MIC w zakresie 0,2-3,1 µg/ml. Najwyższą aktywność wykazały pochodne posiadające podstawniki elektronoakceptorowe, takie jak grupa nitrowa (XXIII) czy trifluorometylowa (XXIV) przy pierścieniu benzenowym. Podczas gdy obecność podstawników dostarczających elektrony, takich jak metyl oraz metoksy, skutkowałą spadkiem aktywności [94].



*Rys. 27 Pochodne hydrazynokarbotioamidowe otrzymane przez Srirama*

Ten sam zespół badawczy otrzymał pochodne zawierające ugrupowanie 5-nitrofurylowe (Rys. 28). Wśród otrzymanych związków znajdowały się zarówno pochodne pirydylotiosemikarbazydowe, jak i fenylotiosemikarbazydowe. Na podstawie analizy zależności struktura aktywność ustalono, iż pochodne pirydynowe są aktywniejsze niż pochodne fenylowe. Wpływ podstawników elektronoakceptorowych oraz elektronodonorowych był analogiczny jak w wyżej opisanym badaniu. Najaktywniejsza pochodna XXV wykazała silniejszą lub taką samą zdolność do hamowania wzrostu (0,09 µg/ml) jak stosowane leki referencyjne izoniazyd (0,09 µg/ml), rifampicyna (0,19 µg/ml) oraz ciprofloksacyna (1,56 µg/ml) [95].

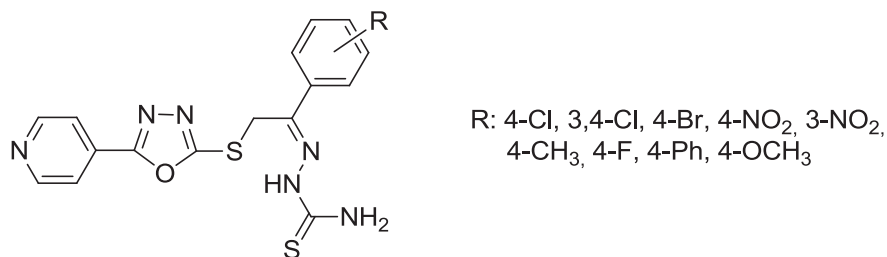




XXV

**Rys. 28** Pochodna 5-nitrofuran-2-ylu

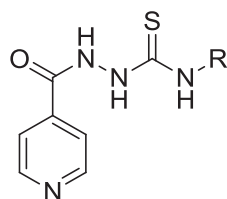
Wysoka aktywność przeciwgruźlicza pochodnych 1,3,4-oksadiazolu skłoniła zespół badawczy Ambhore'a do otrzymania serii pochodnych posiadających wyżej wymieniony pierścień heterocykliczny połączony z dwoma innymi farmakoforami: pirydyną oraz hydrazynokarbonylamidem (Rys. 29). Podstawniki takie jak atom bromu, grupa nitrowa oraz metylowa przy pierścieniu benzenowym sprzyjały występowaniu aktywności przeciwgruźliczej. Związki posiadające takie podstawniki charakteryzowały się dobrą aktywnością przeciwgruźliczą z wartością MIC 3,9  $\mu\text{g/ml}$ , jednocześnie wykazując niską toksyczność. Obecność dwóch lub więcej farmakoforów skutkowałą synergistycznym efektem działania przeciwgruźliczego. Model farmakoforowy wyznaczony w oparciu o strukturę znanych ligandów sugeruje, iż otrzymane pochodne mogą stanowić grupę inhibitorów enzymu CYP51 występującego u prątków. Enzym CYP51 uczestniczy w biosyntezie steroli drobnoustrojów patogennych. Jego zahamowanie prowadzi do akumulacji metylowanych prekursorów sterolu i w efekcie upośledza integralność błony komórkowej, powodując zahamowanie wzrostu lub śmierć komórki [96].



**Rys. 29** Pochodne 4-(1,3,4-oksadiazolo)pirydyny

Cardia wraz ze współpracownikami otrzymał oraz przebadał wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv tiosemikarbazydowe pochodne izoniazydu. Podstawienie atomu azotu grupą alkilową było najkorzystniejsze dla aktywności przeciwgruźliczej (Rys. 30). Związki wykazywały aktywność w zakresie od 6,2 do 9,98  $\mu\text{g/ml}$ . Żaden z otrzymanych

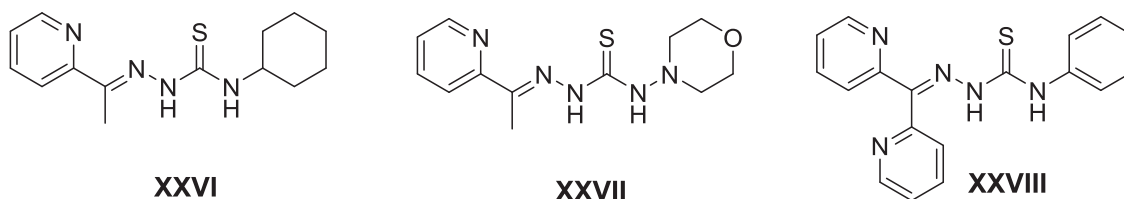
związków nie wykazywał silniejszej inhibicji wzrostu niż leki referencyjne izoniazyd (0,19 µg/ml) oraz rifampicyna (0,19 µg/ml) [97].



R: CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, c-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>

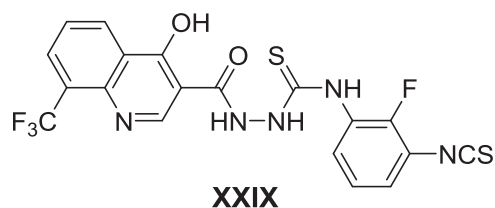
**Rys. 30** Tiosemikarbazydowe pochodne izonikotynohydrazidu

Zespół badawczy Pavana poszukuje nowych leków przeciwgruźliczych między innymi w grupie związków o budowie tiosemikarbazydowej oraz semikarbazydowej (Rys. 31). Na podstawie otrzymanych wyników ustalono, iż wymiana atomu wodoru związanego z atomem azotu N-4 na różne podstawniki powoduje poprawę aktywności. Najniższą aktywnością charakteryzowały się pochodne posiadające podstawnik fenylowy oraz alkilowy, natomiast najwyższą aktywność wykazały pochodne zawierające pierścienie nasycone, takie jak cykloheksyl czy morfolina. Zamiana atomu siarki o wysokiej gęstości elektronowej na atom tlenu skutkuje znacznym zmniejszeniem aktywności bądź jej zanikiem. Wynika to z silniejszego wiązania się atomu siarki z receptorami białkowymi. Co więcej, związki o wyższej lipofilowości wykazywały lepszą aktywność tuberkulostatyczną. Trzy spośród otrzymanych pochodnych tiosemikarbazydowych charakteryzowały się wartością MIC na poziomie 0,78 µg/ml (**XXVI-XXVIII**). Wartość ta jest lepsza lub porównywalna z lekami stosowanymi w leczeniu gruźlicy, takimi jak streptomycyna, ciprofloksacyna, etionamid czy etambutol [98].



**Rys. 31** 2-Acetylopirydyntiosemikarbazony o aktywności przeciwgruźliczej

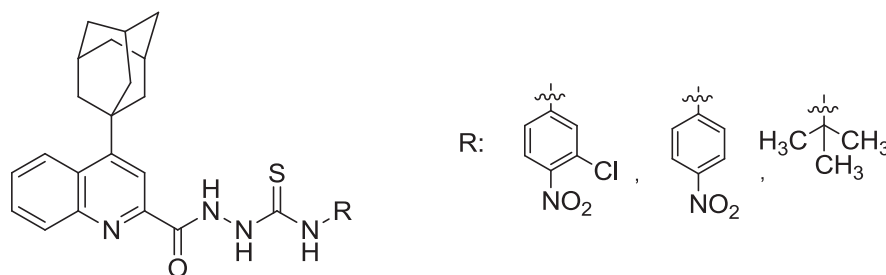
Thomas ze współpracownikami zaprojektował i zsyntezował tiosemikarbazydowe pochodne 4-hydroksy-8-trifluorometylochinoliny (Rys. 32).



**Rys. 32** Pochodna 4-hydroksy-8-trifluorometylochinoliny

Chinolina jest związkiem heterocyklicznym posiadającym dwa skondensowane pierścienie: benzenowy oraz pirydynowy. Liczne prace naukowe donoszą o dobrej aktywności przeciwgruźliczej pochodnych chinoliny [99–102]. Co więcej, fluorowane pochodne związków heterocyklicznych, w tym chinoliny, mają duże znaczenie w dziedzinie chemii medycznej. Zastąpienie atomu wodoru fluorem może znacznie modyfikować aktywność biologiczną [103]. W związku z tym zaprojektowane pochodne posiadały podstawnik trifluorometylowy w pozycji C-8 pierścienia chinoliny w celu poprawienia właściwości lipofilowych cząsteczki. Natomiast obecność grupy hydroksylowej w pozycji C-4 pierścienia chinoliny miała zwiększyć rozpuszczalność oraz poprawić wiązanie z receptorem. Najaktywniejsza pochodna **XXIX** wykazała aktywność hamującą wzrost prątków przy stężeniu (MIC) 0,625 µg/ml. Stężenie hamujące wzrost dla pozostałych związków wynosiło od 2,5 do powyżej 100 µg/ml [104].

Pochodne chinolinowe znalazły się także w centrum zainteresowania Patela i jego zespołu badawczego (Rys. 33). Podstawnik adamantylowy w pozycji C-4 pierścienia chinoliny, według wcześniejszych badań zespołu Patela, sprzyjał występowaniu aktywności tuberkulostatycznej [105].



**Rys. 33** Pochodne chinoliny otrzymane przez Patela

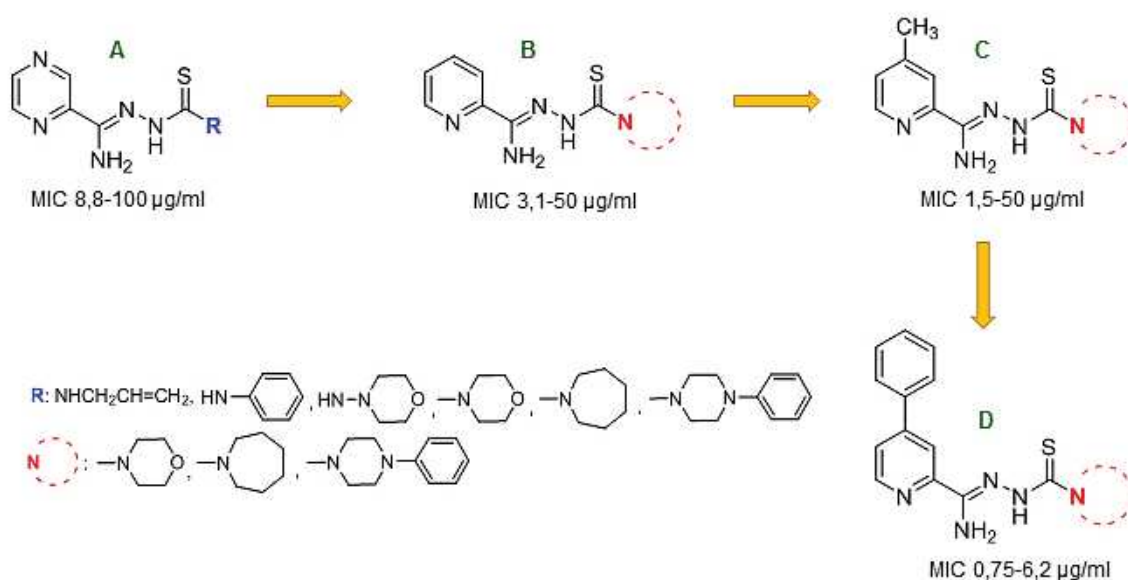
Aktywność przeciwgruźlicza była określana poprzez wyznaczenie procentu zahamowania wzrostu szczepu *M. tuberculosis* H37Rv przy stężeniu testowym, jakim było 6,25 µg/ml. Najwyższą inhibicję na poziomie 96% wykazywała pochodna posiadająca podstawnik 2-chloro-4-nitrofenylowy przy łańcuchu tiosemikarbazydowym. Pochodne

z podstawnikiem 4-nitrofenylowym oraz *tert*-butylowym również wykazały znaczną aktywność tuberkulostatyczną z wartością inhibicji odpowiednio 94% i 90% [106].

Przeprowadzone przez liczne zespoły naukowe badania potwierdzają potencjał przeciwgruźliczy związków posiadających w swojej strukturze pierścień pirydyny oraz ugrupowanie tiosemikarbazydowe. Pochodne o takiej strukturze: ich synteza oraz aktywność przeciwgruźlicza, stały się również przedmiotem niniejszego opracowania.

### 3. CEL PRACY

Rosnąca oporność szczepów *M. tuberculosis* na dotychczas stosowane leki oraz znikoma ilość nowych leków wprowadzonych do obrotu w zakresie leczenia gruźlicy jest przyczyną nieustannych poszukiwań nowych związków zdolnych hamować wzrost prątków gruźlicy. Przedstawiona w „Części teoretycznej” analiza danych literaturowych wskazuje, iż poszukiwania nowych związków posiadających pierścień pirydyny jak i ugrupowanie tiosemikarbazydowe w swojej strukturze są obiecującym kierunkiem badań. Potwierdzają to również wieloletnie prace prowadzone w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego związane z nowymi związkami o potencjalnej aktywności tuberkulostatycznej.



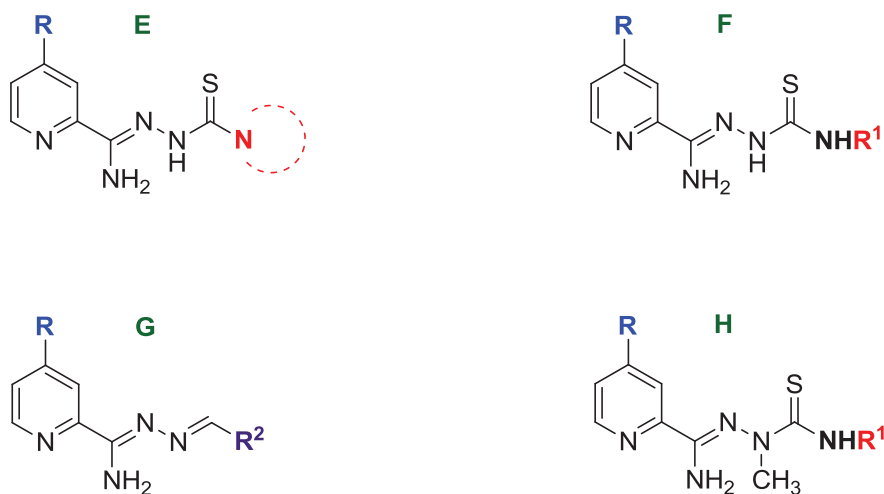
Rys. 34 Pochodne tiosemikarbazydowe otrzymane w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej GUMed

Interesujące wyniki (Rys. 34) otrzymano dla serii pochodnych tiosemikarbazydowych posiadających w swojej strukturze pierścień pirazyny (A). Najaktywniejsze (MIC 8,8-31 µg/ml) okazały się pochodne posiadające na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego aminy cykliczne takie jak morfolina, azepan czy fenylopiiperazyna [107,108]. Znacząca aktywność otrzymanych pochodnych zainspirowała do sprawdzenia wpływu zamiany pierścienia pirazyny na pierścień pirydyny (B), który jak już wspomniano w „Części teoretycznej” jest elementem strukturalnym izoniazydu. Modyfikacja ta spowodowała wzrost aktywności tuberkulostatycznej (3,1-50 µg/ml). Podstawienie

pierścienia pirydyny w pozycji C-4 grupą metylową (**C**) lub fenyłową (**D**) doprowadziło do pogłębienia działania przeciwpłatkowego (MIC 0,75-50 µg/ml). Otrzymane wyniki zachęciły do dalszych badań nad tą grupą związków.

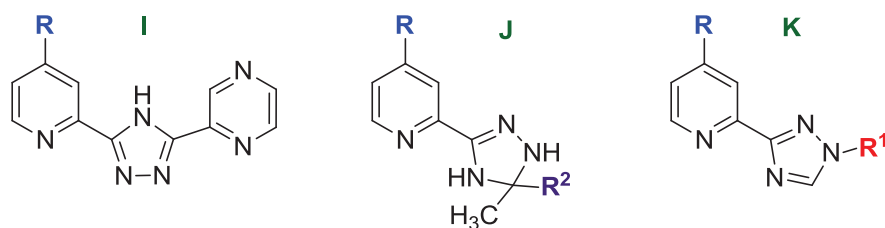
Kluczowym celem niniejszej pracy było opracowanie metod syntezy nowych pochodnych pikolinonitrylu oraz potwierdzenie struktury nowo otrzymanych związków.

Zaprojektowano serie pochodnych o budowie tiosemikarbazydowej (Rys. 35) różniących się podstawnikiem w pozycji C-4 pierścienia pirydyny oraz podstawnikiem na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego. Wśród podstawników obecnych na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego znalazły się cykloalkiloaminy (**E**) jak również związki z atomem azotu nie wchodzącym do układu cyklicznego (**F**, **H**). W celu sprawdzenia czy podstawienie protonu obecnego przy atomie azotu *N'* grupą metylową wpłynie na aktywność biologiczną otrzymano serie N-metylowych pochodnych tiosemikarbazydowych (**H**). Aby sprawdzić istotność ugrupowania tioamidowego dla występowania aktywności tuberkulostatycznej zaprojektowano szereg pochodnych iminowych, pozbawionych wyżej wspomnianego ugrupowania (**G**).



*Rys. 35* Zaprojektowane pochodne o budowie tiosemikarbazydowej oraz iminowej

Następnie aby zbadać wpływ cyklizacji na działanie biologiczne, zaplanowano serie pochodnych 1,2,4-triazolowych (Rys. 36). Pochodne triazolowe różniły się podstawnikiem zarówno przy atomie węgla C-3 (**I**) i C-5 (**J**) jak i przy atomie azotu N-1 (**K**).



**Rys. 36** Zaprojektowane pochodne 1,2,4-triazolu

Ponadto modyfikacje strukturalne zostały również zaplanowane w obrębie ugrupowania amidrazonowego. Synteza hydrazydowych analogów (Rys. 37) pochodnych cykloalkiloaminiotiosemikarbazydowych (**L**) oraz iminowych (**M**) miała na celu ocenę wpływu na badaną aktywność biologiczną zamiany grupy iminowej na grupę karbonylową. Podstawniki we wszystkich zaprojektowanych związkach zostały dobrane w taki sposób, aby różniły się lipofilowością, rozmiarem, stopniem nasycenia bądź właściwościami kwasowo-zasadowymi.



**Rys. 37** Hydrazydowe analogi pochodnych tiosemikarbazydowych oraz pochodnych iminowych

Następnym celem pracy było zbadanie aktywności tuberkulostatycznej otrzymanych związków oraz jakościowa analiza zależności struktura aktywność (SAR). Przeprowadzenie analizy SAR pozwala na określenie czynników strukturalnych wpływających na aktywność przeciwgruźliczą. Badania te były prowadzone we współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Przeprowadzenie poszerzonych badań przeciwdrobnoustrojowych dla najaktywniejszych związków umożliwiło zrealizowanie kolejnego celu pracy jakim była ocena selektywności działania przeciwpłatkowego wybranych związków. Badania mikrobiologiczne zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Ostatnim celem było przeprowadzenie badań aktywności cytotoksycznej. Badania te zostały wykonane dla wybranych związków charakteryzujących się najwyższą aktywnością przeciwgruźliczą. Aktywność cytotoksyczna została przebadana przez firmę Sunny BioDiscovery w Stanach Zjednoczonych.

Zrealizowanie wyżej wspomnianych celów umożliwiło wytypowanie związku będącego strukturą wiodącą do dalszych badań nad rozwojem leków przeciwgruźliczych.

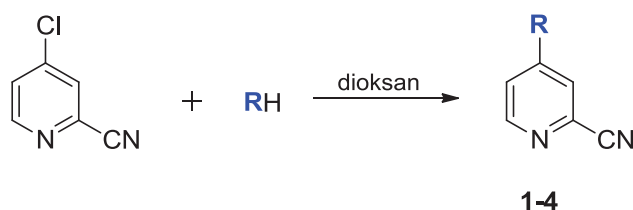



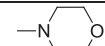
## 4. BADANIA WŁASNE

### 4.1. Synteza

#### 4.1.1 Otrzymywanie 4-podstawionych pochodnych pikolinonitrylu 1-4

Substratem do wszystkich zaprojektowanych syntez był dostępny komercyjnie 4-chloropikolinonitryl. Podstawione atomem fluorowca cyjanopirydyny dają szerokie możliwości syntetyczne, co czyni je dobrymi substancjami wyjściowymi. Modyfikacje strukturalne można wprowadzać zarówno w obrębie atomu fluorowca, jak i grupy nitylowej. Grupa nitylowa może ulegać reakcji hydrolizy, redukcji, konwersji do iminoestrów, amidów oraz ketonów [109–113]. Natomiast atom fluorowca ulega reakcji substytucji nukleofilowej [114]. Podstawienie zachodzi szczególnie łatwo, gdy atom fluorowca znajduje się w położeniu 2, 4 lub 6 [115].



Nr	1	2	3	4
R	PhO	PhS		

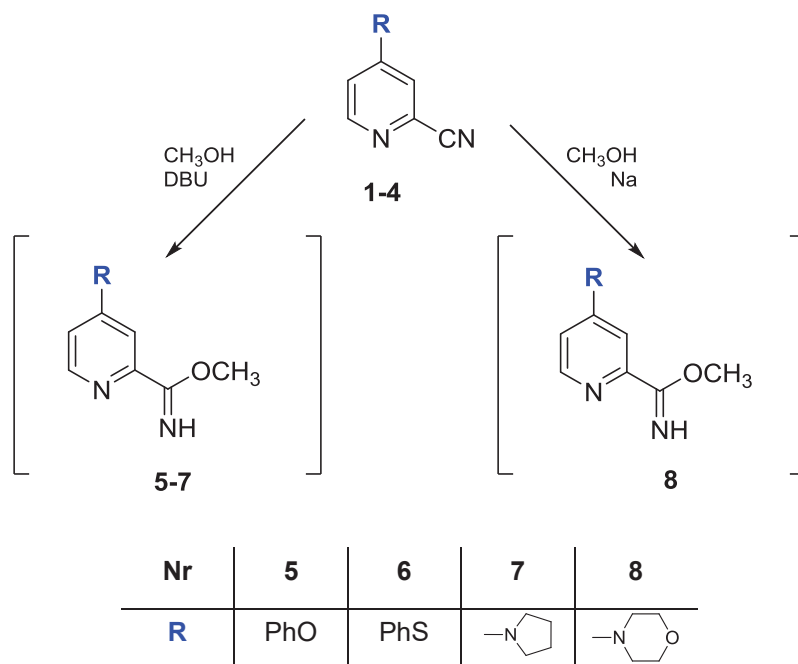
Schemat 1

Zaprojektowana reakcja zachodzi według mechanizmu addycji-eliminacji. W pierwszym etapie reakcji nukleofil przyłącza się do atomu węgla, przy którym występuje atom fluorowca tworząc karboanion, a następnie dochodzi do odłączenia grupy odchodzącej [116]. W związku z powyższym w pierwszym etapie atom chloru w pozycji C-4 poddano reakcji podstawienia czynnikami nukleofilowymi takimi jak fenol, tiofenol, piperolidyna oraz morfolina w celu otrzymania związków **1-4** (Schemat 1). W celu oceny wpływu podstawników w pozycji C-4 na aktywność nowo otrzymanych struktur wybrano je w taki sposób, aby różniły się rozmiarem, lipofilowością oraz właściwościami kwasowo-zasadowymi. Reakcje prowadzono w środowisku dioksanu z dodatkiem 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enu (DBU). Otrzymane 4-podstawione pochodne

pikolinonitrylu oczyszczano poprzez krystalizację. Wydajność przeprowadzonych reakcji wynosiła 88-99%.

#### 4.1.2 Otrzymywanie 4-podstawionych metyloiminoestrów kwasu pikolinowego 5-8

Klasycznie do otrzymywania iminoestrów wykorzystuje się metodę z użyciem metanolanu sodu. Zapewnia on zasadowe środowisko reakcji i jest znakomitym donorem grupy alkoksylowej. Niestety, często w takich warunkach następuje również wymiana podstawnika w położeniu C-4, zwłaszcza jeśli jest nim grupa relatywnie łatwo odchodząca, jak np. atom chloru. Do otrzymania metyloiminoestrów wykorzystano metodę opracowaną w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej GUMeD polegającą na prowadzeniu reakcji w środowisku metanolu oraz katalitycznej ilości DBU. Dodatek katalitycznej ilości DBU ma zabezpieczać podstawnik występujący w pozycji C-4 pierścienia pirydyny przed niepożądaną wymianą na grupę metoksyłową. Reakcje dla związków **5-8** prowadzono przez 4 h w temperaturze wrzenia (Schemat 2).



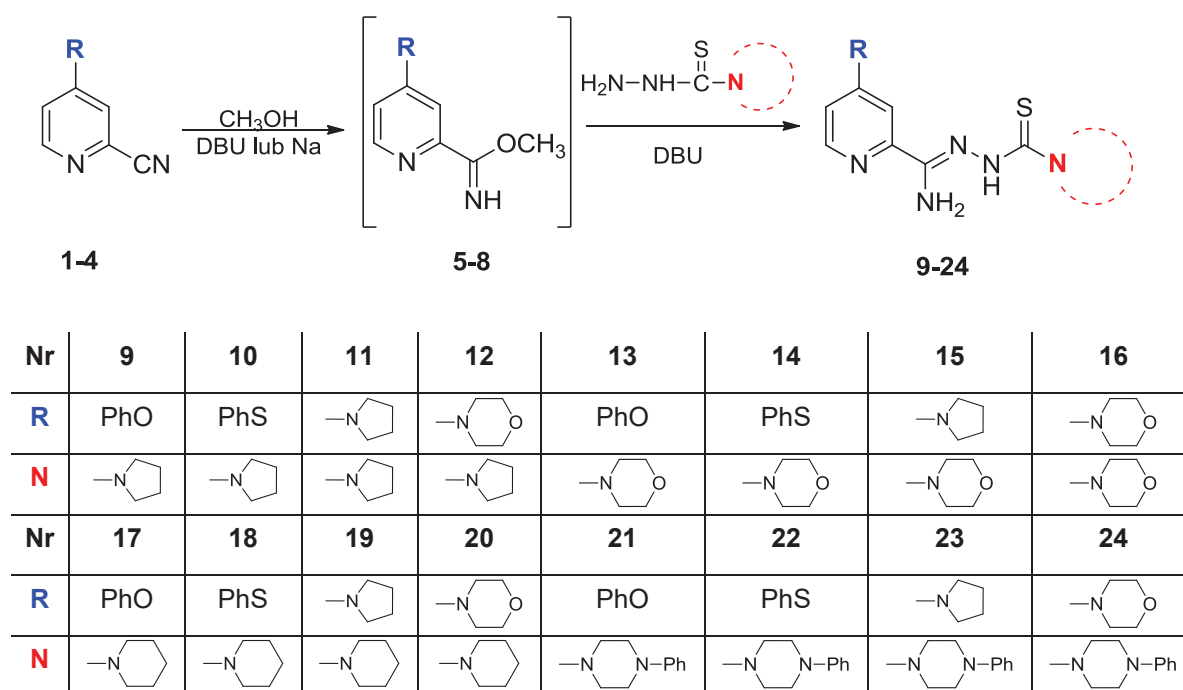
Schemat 2

Po upływie tego czasu reakcje kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC. Stwierdzono, że w przypadku związków **5-7** wyznaczony czas reakcji okazał się wystarczający. Natomiast prowadzenie reakcji dla związku **8** przez 12 h nie pozwoliło na jego otrzymanie. W związku z tym, aby otrzymać metyloiminoester kwasu 4-morfolinopikolinowego (**8**) zastosowano klasyczną metodę syntezy wobec alkoholanu sodu [111,117]. Ogrzewanie 4-morfolinopikolinonitrylu z metanolanem sodu

przez 12 h doprowadziło do całkowitego przereagowania substratu. Otrzymane metyloiminoestry nie były poddawane izolacji, lecz *in situ* wykorzystywane do dalszych reakcji.

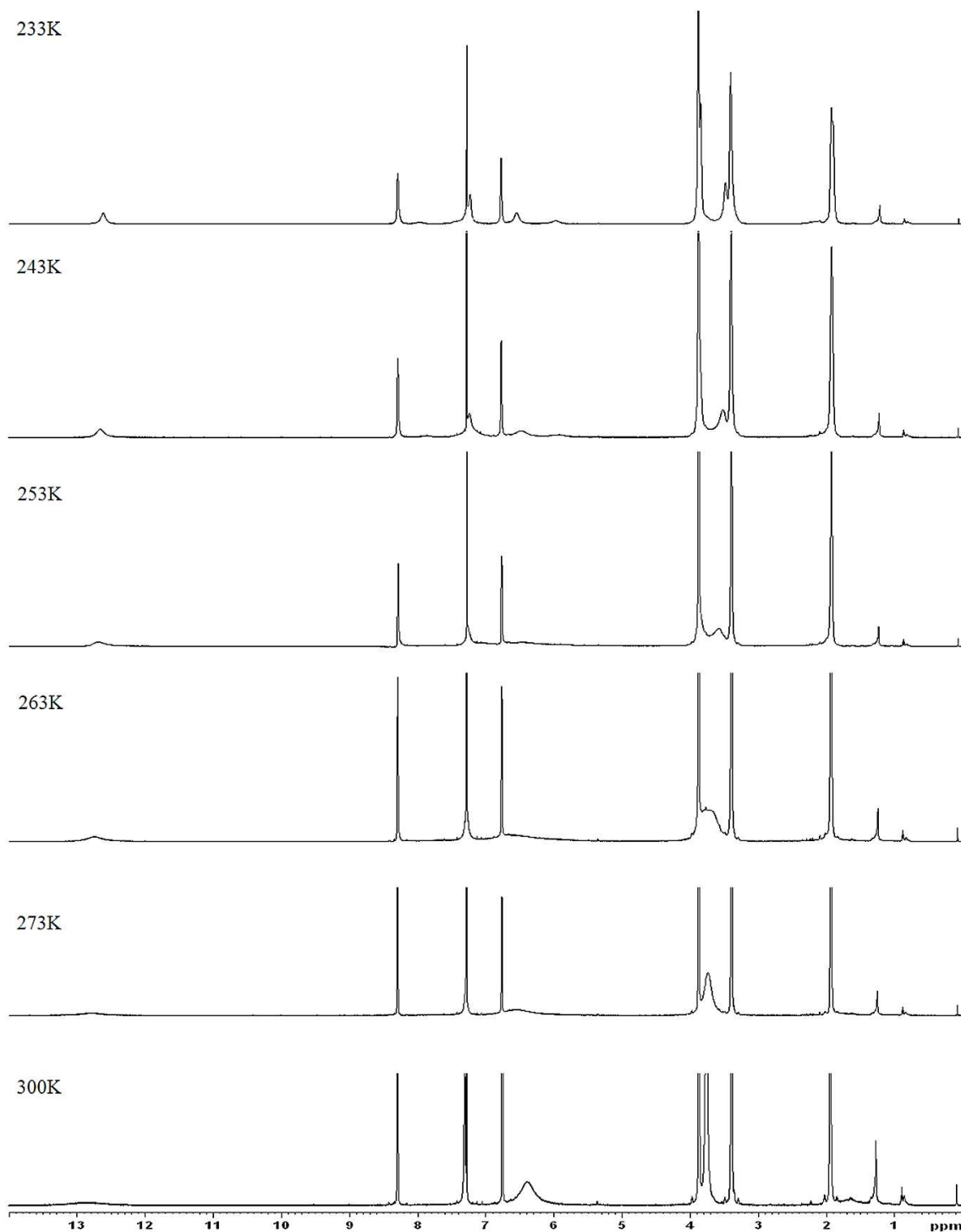
#### 4.1.3 Otrzymywanie pochodnych cykloalkilamino tiosemikarbazydowych 9-24

W związku ze wspomnianą już w części teoretycznej wysoką aktywnością przeciwgruźliczą pochodnych posiadających ugrupowanie tiosemikarbazydowe oraz pierścieni pirydyny zaprojektowano syntezę pochodnych cykloalkilamino tiosemikarbazydowych **9-24**. Związki te charakteryzują się zaangażowaniem amidowego atomu azotu ugrupowania tiosemikarbazydowego w układ cykliczny. Utworzone *in situ* metyloiminoestry poddano kondensacji z cykloalkilamino-1-karbotiohydrazydami w środowisku zasadowym wywołanym obecnością DBU (Schemat 3). Wydajność przeprowadzonych reakcji była w zakresie 36-96%. Karbotiohydrazydy otrzymano w reakcji między aminami cyklicznymi a hydrazynokarbonditionianem metylu w alkoholu lub wodzie. Metoda syntezy cykloalkilamino-1-karbotiohydrazydów została wcześniej opisana przez Klaymana i wsp. [118].



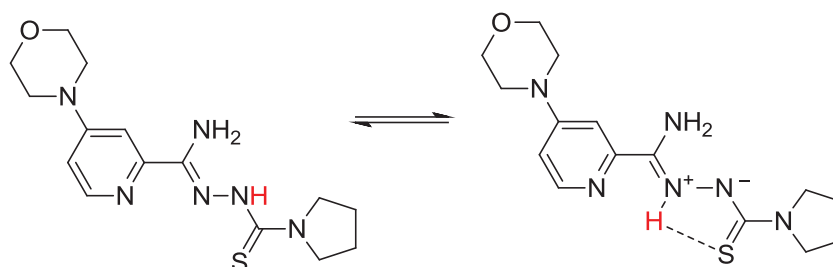
Schemat 3

Struktury otrzymanych związków potwierdzono na podstawie wyników analizy elementarnej oraz analizy widm IR i  $^1\text{H}$  NMR. Ponadto dla wybranych związków wykonano widma temperaturowe  $^1\text{H}$  NMR oraz analizę rentgenograficzną.



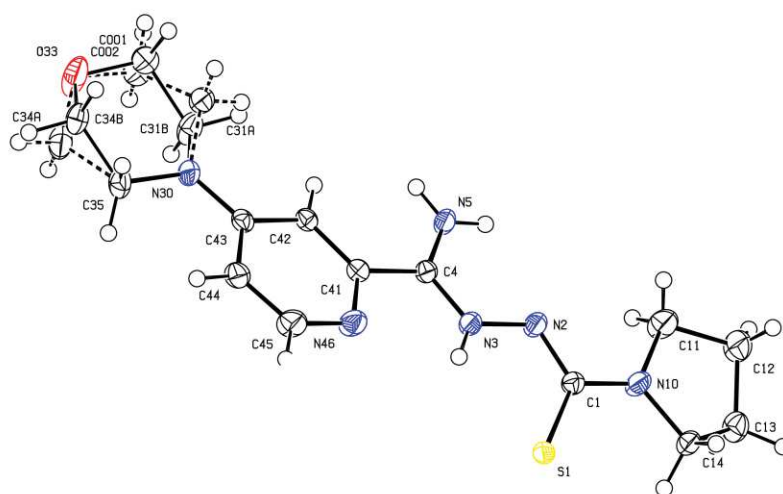
*Rys. 38* Widmo temperaturowe  $^1\text{H}$  NMR dla związku 12 wykonane w  $\text{CDCl}_3$  przy częstotliwości 700 MHz

Na widmie temperaturowym (Rys. 38) wykonanym dla związku **12** można zauważyć, że labilny proton tautomeryczny o przesunięciu 12,90 ppm w temperaturze 300 K jest bardzo poszerzony, wskutek czego prawie ginie w szumach (Rys. 39). W miarę obniżania temperatury uzyskujemy jeden ostry sygnał, przesuwany się w obszar o większym natężeniu pola magnetycznego (mniejsza wartość ppm). Zmiana położenia labilnego protonu przy atomach azotu oraz możliwość tworzenia wiązania wodorowego tego protonu z atomem azotu w pierścieniu aromatycznym wpływa na zmianę otoczenia chemicznego protonów grupy NH<sub>2</sub>. Konsekwencją tego jest nierównocенność magnetyczna protonów w grupie aminowej i wystąpienie osobnych sygnałów na widmie w temperaturze 243 K, podczas gdy w temperaturze 300 K występuje jeden uśredniony sygnał (6,40 ppm).



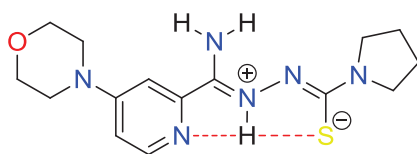
*Rys. 39* Formy tautomeryczne związku **12**

Dodatkowo możemy zaobserwować zahamowanie rotacji wokół wiązania C-N przy pierścieniu pirolidyny (zakres między 3,5 a 4,0 ppm). W temperaturze 300 K w wyniku swobodnej rotacji obserwujemy jeden uśredniony sygnał o przesunięciu 3,76 ppm pochodzący od dwóch równocennych grup CH<sub>2</sub> sąsiadujących z atomem azotu w pierścieniu. Natomiast poniżej temperatury koalescencji (263 K) możemy rozróżnić już dwa osobne sygnały od obu grup CH<sub>2</sub>, które stały się nierównocenne w wyniku zahamowania rotacji wokół wiązania C-N. Zahamowanie rotacji wynika z faktu, iż wiązanie C-N staje się wiązaniem o częściowym charakterze wiązania podwójnego.



**Rys. 40** Model ORTEP związku **12**

Związek **12** został także poddany badaniom rentgenografii strukturalnej. Struktura krystaliczna związku została zilustrowana za pomocą programu ORTEP (*ang.* Oak Ridge Thermal Elipsoid Plot) (Rys. 40). Wszystkie atomy niewodorowe w modelu ORTEP są prezentowane za pomocą elipsoid drgań termicznych, natomiast rodzaje atomów zostały oznaczone zgodnie z kolorystyczną konwencją CPK (tlen-czerwony, węgiel-czarny, azot-niebieski, siarka-żółty oraz wodór-biały). Nazwa konwencji kolorystycznej pochodzi od pierwszych liter nazwisk twórców modeli molekularnych Roberta Corey, Linusa Paulinga oraz Waltera Koltuna [119]. Przeprowadzona analiza rentgenograficzna dla badanego kryształu związku **12** wykazała, iż labilny atom wodoru w kryształach znajduje się przy atomie azotu N-3. Długość wiązania C-4-N-5 wynosi 1,32 Å, wiązania C-4-N-3 1,30 Å, natomiast wiązania C-1-N-2 1,33 Å. Według danych z bazy CSD zakres długości wiązania pojedynczego C-N wynosi 1,45-1,48 Å, podczas gdy w przypadku wiązania podwójnego C=N wynosi 1,26-1,30 Å. Analiza długości wiązań wykazała, że dla wiązań C-1-N-2 oraz C-4-N-5 nastąpiło skrócenie długości wiązania w porównaniu z czystym wiązaniem pojedynczym. Co więcej długość wiązania C-1-S-1 wynosi 1,73 Å, a zatem jest dłuższe niż typowe wiązanie podwójne C=S, którego zakres długości wynosi 1,64-1,69 Å. Powyższe wyniki wskazują, że badana cząsteczka przyjmuje formę zwitterionową (Rys. 41).



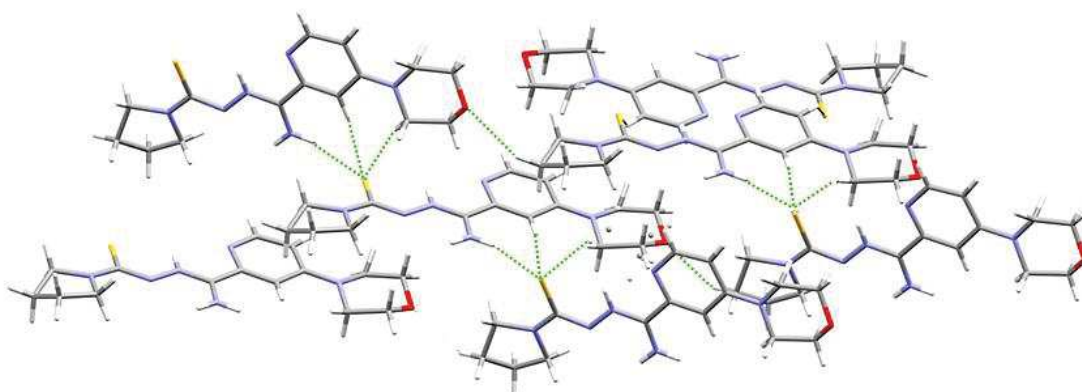
**Rys. 41** Budowa zwitterionowa związku **12**

Przeprowadzona za pomocą oprogramowania Mercury analiza geometryczna wykazała, iż związek **12** w kryształach przyjmuje formę rozciągniętą oraz planarną (Rys. 42). Forma planarna cząsteczki jest zachowana dzięki obecności silnych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy protonem występującym przy atomie azotu N-3, a atomem siarki S-1 oraz atomem azotu pierścienia pirydyny N-46 (Rys. 41).



**Rys. 42** Konformacja planarna związku **12**

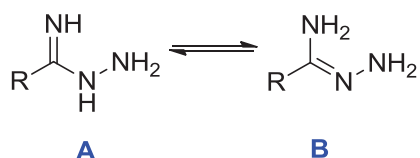
W stanie krystalicznym zaobserwowano nieuporządkowanie pierścienia morfolinowego, który przyjmuje formę krzeselkową. Między atomem siarki S-1 a atomem azotu N-5 powstają wiązania wodorowe. Ponadto struktura jest stabilizowana przez słabe kontakty międzycząsteczkowe typu C-H...S lub C-H...O (Rys. 43).



**Rys. 43** Upakowanie w komórce elementarnej oraz oddziaływania międzycząsteczkowe związku **12**

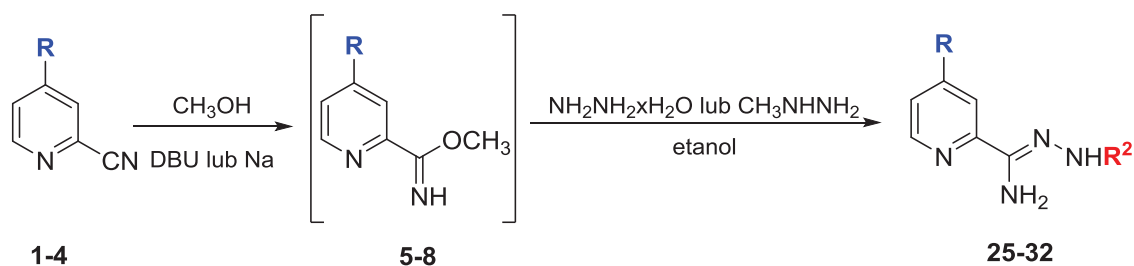
#### 4.1.4 Otrzymywanie pochodnych amidrazonowych 25-32

Amidrazony są to słabe zasady monokwasowe, które tworzą sole z kwasami nieorganicznymi. Ponadto niektóre amidrazony mogą istnieć w dwóch formach tautomerycznych jako imidy hydrazydowe (**A**) bądź hydrazony amidowe (**B**) (Rys. 44).



Rys. 44 Formy tautomeryczne amidrazonów

Pochodne amidrazonowe są badane pod kątem wielu aktywności biologicznych, m.in. działania antybakteryjnego, uspokajającego, przeciwnowotworowego czy przeciwgruźliczego [120–122]. Pirydyno-4-karboksyamidrazon wykazuje aktywność tuberkulostatyczną tylko o połowę niższą niż izoniazyd. Jednakże amidrazony są szczególnie cenione jako prekursorzy do syntezy innych związków organicznych [120]. Liczne dane literaturowe opisują otrzymywanie amidrazonów w wyniku reakcji pomiędzy iminoestrami, a hydrazyną w środowisku alkoholowym. W celu otrzymania produktu o wysokiej wydajności należy użyć co najmniej dwukrotnego nadmiaru hydrazyny w stosunku do iminoestru [121,123].



Nr	25	26	27	28	29	30	31	32
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R<sup>2</sup></b>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Schemat 4

Aby otrzymać amidrazonowe oraz metyloamidrazonowe pochodne 4-podstawionego pikolinonitrylu **25-32** do otrzymanych *in situ* roztworów



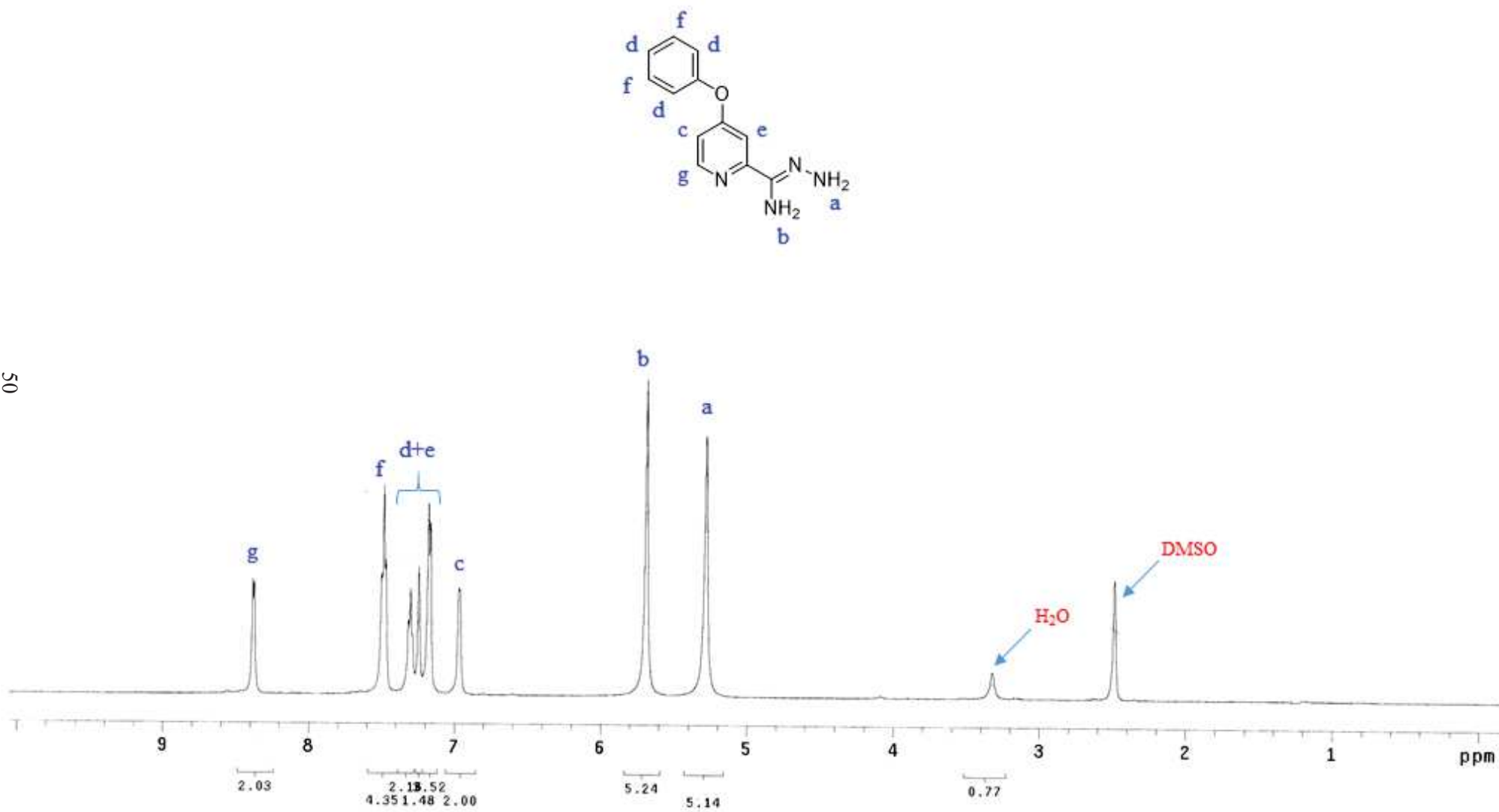
metyloiminoestrów dodano 80% roztwór wodzianu hydrazyny bądź metylohydrazynę *in substantia* (Schemat 4).

W przykładowym widmie  $^1\text{H}$  NMR wykonanym dla związku **25** w deuterowanym dimetylosulfotlenku przy częstotliwości 500 MHz można zaobserwować dwa singlety o intensywności dwóch protonów przy wartościach 5,28 (a) oraz 5,69 (b) ppm pochodzące od grup aminowych (Rys. 45). W zakresie aromatycznym występują dwa dublety przy przesunięciu 6,96 (c) oraz 8,37 (g) ppm o stałych sprzężenia  $J=3$  Hz i  $J=5$  Hz odpowiadające dwóm protonom pierścienia pirydyny. Multiplet w zakresie 7,16-7,31 (d, e) ppm posiada integrację odpowiadającą czterem protonom. Trzy z nich pochodzą od pierścienia benzenowego, natomiast jeden proton od pierścienia pirydynowego. Pozostałe dwa protony pierścienia benzenowego wywołały sygnał w postaci tripletu ze stałą sprzężenia  $J=7$  Hz przy wartości 7,48 (f) ppm.

Analiza widma sugeruje, iż otrzymany związek w roztworze dimetylosulfotlenku (DMSO) przyjmuje formę tautomeryczną **A** (Rys. 44). Dodatkowo za pomocą oprogramowania Gaussian 03 przeprowadzono obliczenia kwantowo-chemiczne mające na celu wyznaczenie energii całkowitej obu form tautomerycznych (Tabela 1). Obliczenia *ab initio* zostały wykonane metodą Hartree Focka, DFT oraz MP2 z wykorzystaniem bazy 6,31G\*\*. Przeprowadzone obliczenia pokazują, iż energia całkowita tautomeru **A** niezależnie od zastosowanej metody obliczeniowej jest niższa niż tautomeru **B**. Świadczy to o większej stabilności tautomeru **A**.

**Tabela 1.** Obliczona energia całkowita tautomerów **A** oraz **B** związku **25**

Metody obliczeniowe	Energia całkowita [Hartree]	
	Tautomer <b>A</b>	Tautomer <b>B</b>
HF 6,31G**	-754,04	-753,71
DFT	-758,46	-758,41
MP2 6,31G**	-755,37	-755,35



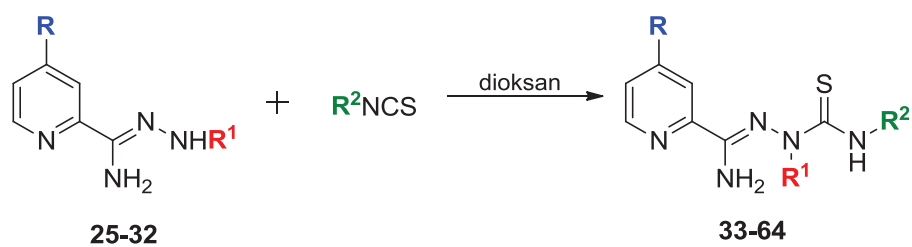
Rys. 45 Widmo  $^1\text{H}$  NMR dla związku 25, wykonane w DMSO-*d*<sub>6</sub> przy częstotliwości 500 MHz

#### 4.1.5 Otrzymywanie pochodnych tiosemikarbazydowych 33-64

Następnie, aby ocenić wpływ zamiany cyklicznej aminy drugorzędowej obecnej przy łańcuchu tiosemikarbazydowym na pierwszorzędową alkiloaminę, przeprowadzono syntezę pochodnych tiosemikarbazydowych **33-64**. Otrzymane uprzednio amidrazony oraz metyloamidrazony **25-32** poddano reakcji z izotiocyanianami etylu, cykloheksylu, fenylu oraz 2,4-dichlorofenylu (Schemat 5). Podstawniki zostały dobrane w taki sposób, aby różniły się rozmiarem oraz stopniem nasycenia. Dzięki obecności centralnego atomu węgla o elektrofilowym charakterze izotiocyaniany łatwo ulegają reakcjom addycji z nukleofilową grupą aminową dając pochodne tiomocznika [124]. Wydajność przeprowadzonych reakcji była w zakresie 22-96%.

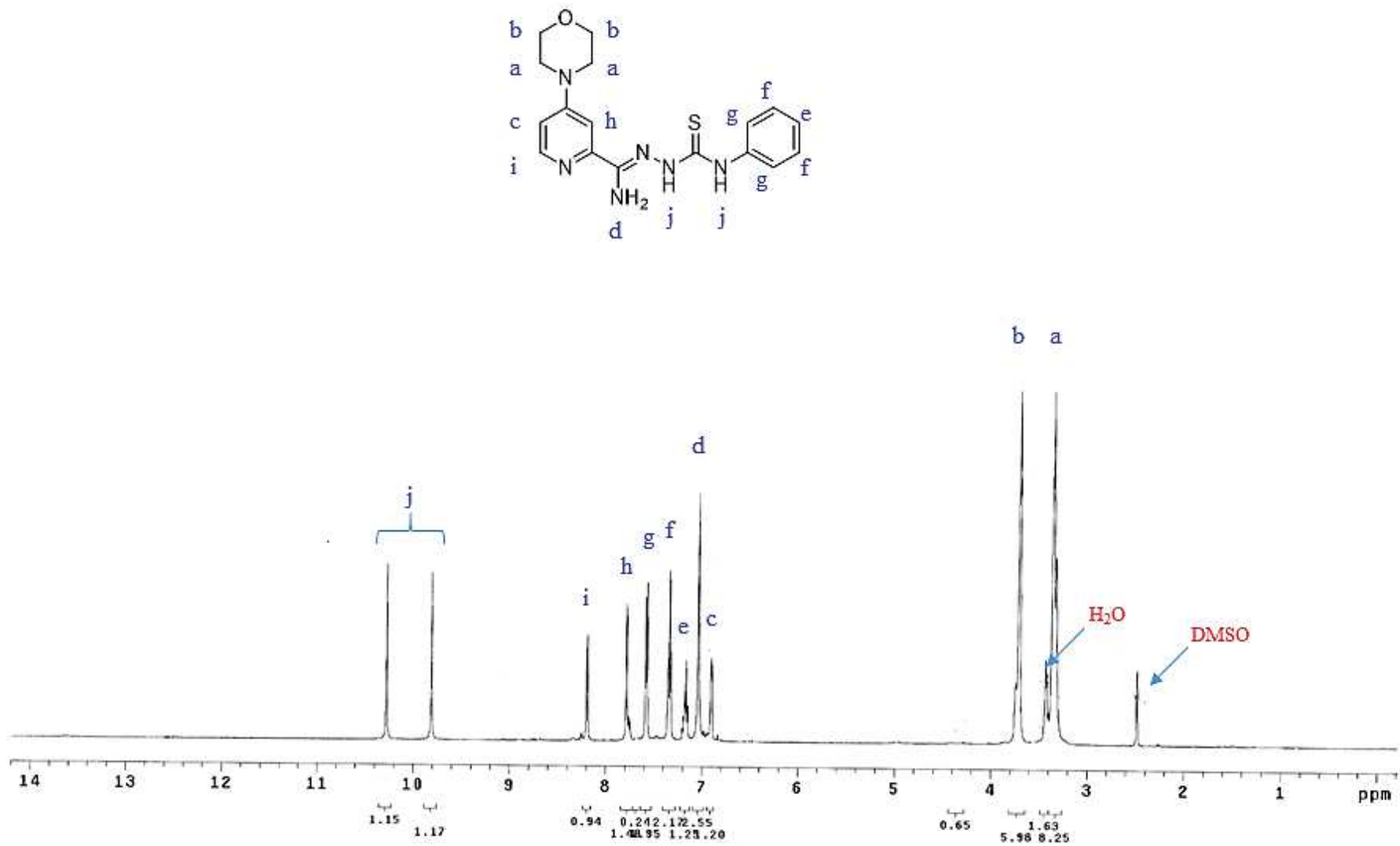
Struktury otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz na podstawie analizy widm IR i  $^1\text{H}$  NMR.

W widmie  $^1\text{H}$  NMR związku **44** (Rys. 46) wykonanym w deuterowanym dimetylosulfotlenku (DMSO) w zakresie alifatycznym występują dwa triplety (**a**, **b**) (3,35 oraz 3,70 ppm), każdy o intensywności czterech protonów. Stała sprzężenia dla obu sygnałów wynosi  $J=5$  Hz. Sygnały te odpowiadają czterem grupom  $\text{CH}_2$ . Protony pierścienia pirydynowego zidentyfikowano jako sygnały w postaci dubletu dubletów (**c**) (6,90 ppm,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz), singletu (**h**) (7,78 ppm) oraz dubletu (**i**) (8,19 ppm,  $J=6$  Hz). Ponadto w zakresie aromatycznym można zaobserwować dwa triplety przy wartościach 7,16 (**e**) i 7,33 (**f**) ppm o stałej sprzężenia  $J=7$  Hz oraz  $J=8$  Hz, a także dublet przy wartości 7,57 (**g**) ppm ze stałą sprzężenia  $J=8$  Hz, pochodzące od protonów pierścienia benzenowego. Łączna integracja tych sygnałów odpowiada pięciu protonom. Obecność grupy aminowej potwierdza singlet przy wartości 7,03 (**d**) ppm, zaś singlety o intensywności jednego protonu występujące przy 9,81 (**j**) oraz 10,27 (**k**) ppm odpowiadają dwóm grupom NH. W widmie IR (Rys. 47) widoczne są pasma absorpcji charakterystyczne dla grupy NH pochodzące od drgań rozciągających w zakresie 3377-3287  $\text{cm}^{-1}$  oraz pochodzące od drgań deformacyjnych przy wartości 1595  $\text{cm}^{-1}$ .

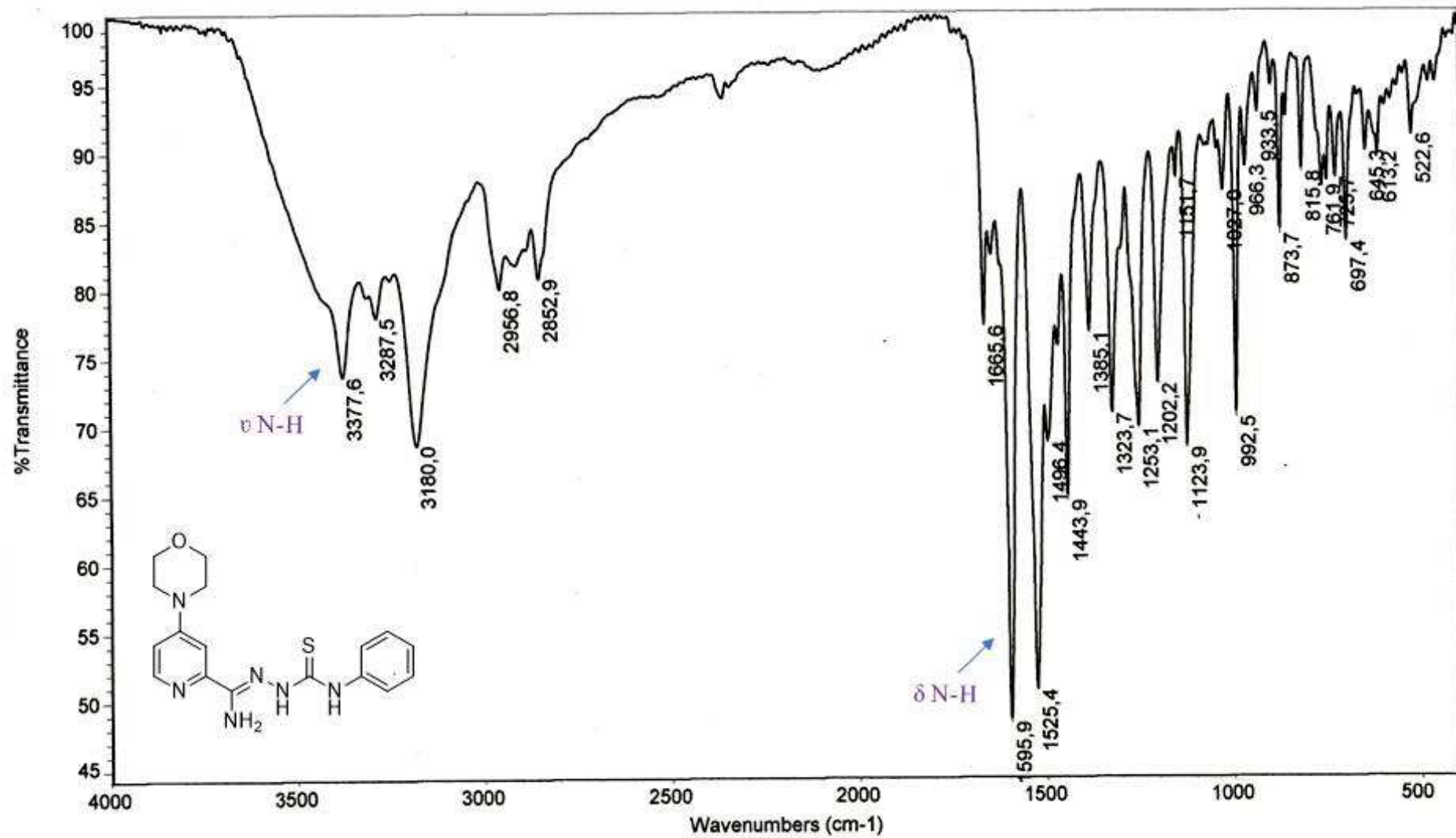


<b>Nr</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R¹</b>	H	H	H	H	H	H	H	H
<b>R²</b>	C₂H₅	C₂H₅	C₂H₅	C₂H₅	C₆H₁₁	C₆H₁₁	C₆H₁₁	C₆H₁₁
<b>Nr</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R¹</b>	H	H	H	H	H	H	H	H
<b>R²</b>	C₆H₅	C₆H₅	C₆H₅	C₆H₅	2,4-diClC₆H₃	2,4-diClC₆H₃	2,4-diClC₆H₃	2,4-diClC₆H₃
<b>Nr</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R¹</b>	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃
<b>R²</b>	C₂H₅	C₂H₅	C₂H₅	C₂H₅	C₆H₁₁	C₆H₁₁	C₆H₁₁	C₆H₁₁
<b>Nr</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>63</b>	<b>64</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R¹</b>	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃	CH₃
<b>R²</b>	C₆H₅	C₆H₅	C₆H₅	C₆H₅	2,4-diClC₆H₃	2,4-diClC₆H₃	2,4-diClC₆H₃	2,4-diClC₆H₃

**Schemat 5**



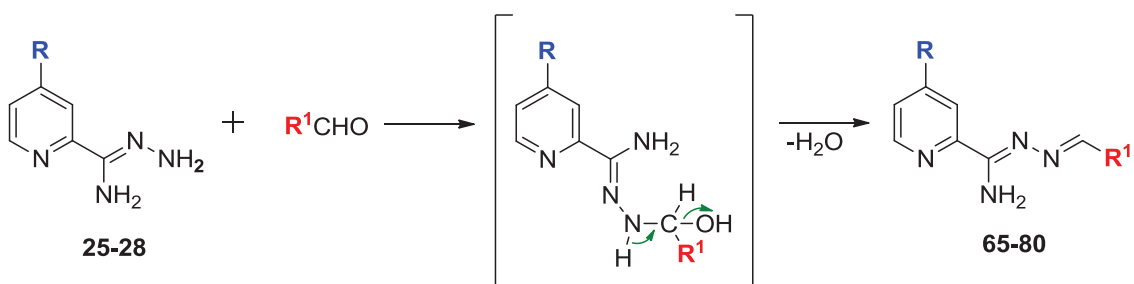
Rys. 46 Widmo  $^1\text{H}$  NMR dla związku 44, wykonane w  $\text{DMSO-d}_6$  przy częstotliwości 500 MHz



Rys. 47 Widmo IR związku 44 wykonane dla tabletki z KBr

#### 4.1.6 Otrzymywanie pochodnych iminowych 65-80

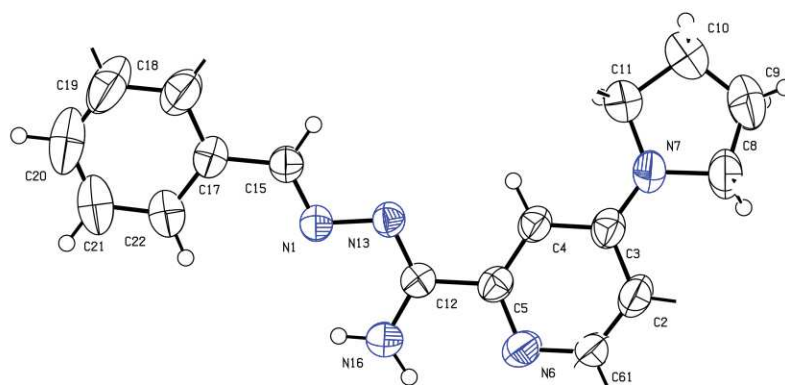
Kolejnym etapem badań było otrzymanie pochodnych iminowych, zwanych zasadami Schiffa, posiadających azometinową (-CH=N-) grupę funkcyjną. Związki te są produktem kondensacji związku karbonylowego, takiego jak aldehyd czy keton, z aminą pierwszorzędową [125,126]. Jednakże aldehydy reagują znacznie szybciej niż ketony, co wynika z efektów elektronowych oraz sterycznych [127]. Reakcja ta zachodzi według mechanizmu addycji-eliminacji. W pierwszym etapie dochodzi do addycji nukleofilowej aminy do atomu węgla grupy karbonylowej z utworzeniem nietrwałego hemiaminalu. Kolejnym etapem jest eliminacja cząsteczki wody i utworzenie iminy. Niekiedy do przeprowadzenia reakcji konieczne jest użycie katalizatora kwasowego. Jednak pH środowiska reakcji musi być tak zbilansowane, aby umożliwić protonowanie atomu tlenu grupy karbonylowej, jednocześnie zapewniając dostateczną ilość wolnego związku azotowego. Protonowanie grupy aminowej prowadzi do powstania kationu, pozbawionego właściwości nukleofilowych [128]. Zasady Schiffa warunkują aktywność biologiczną wielu surowców naturalnych. Skłoniło to naukowców do eksplorowania tej grupy związków. Badania te ujawniły znaczny potencjał przeciwdrobnoustrojowy pochodnych iminowych [129,130].



<b>Nr</b>	<b>65</b>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>68</b>	<b>69</b>	<b>70</b>	<b>71</b>	<b>72</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R<sup>1</sup></b>								
<b>Nr</b>	<b>73</b>	<b>74</b>	<b>75</b>	<b>76</b>	<b>77</b>	<b>78</b>	<b>79</b>	<b>80</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R<sup>1</sup></b>								

Schemat 6

Niepodstawione amidrazony **25-28** poddano kondensacji z odpowiednimi aldehydami. W związku ze znanym z literatury pozytywnym wpływem ugrupowania nitrofurylowego na aktywność przeciwdrobnoustrojową, do zaprojektowanej reakcji wykorzystano aldehyd 5-nitrofurylowy oraz jego analogi takie jak 5-nitrotiofenokarboksyaldehyd, aldehyd 4-nitrobenzoesowy oraz benzoesowy (Schemat 6). Kondensacja zachodziła bez konieczności dodania kwasowego katalizatora. W wyniku prowadzonej reakcji otrzymano pochodne iminowe **65-80** z wydajnością 26-83%.

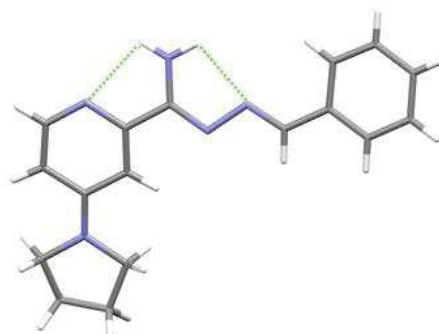


*Rys. 48 Model ORTEP związku 67*

Struktura otrzymanych związków została potwierdzona metodami spektroskopowymi IR,  $^1\text{H}$  NMR oraz analizą elementarną. Dla związku **67** wykonano również badania krystalograficzne, aby określić jego budowę przestrzenną (Rys. 48). Przeprowadzona analiza krystalograficzna potwierdziła obecność wiązania azometinowego pomiędzy atomem azotu N-1, a atomem węgla C-15.

Związek ten krystalizuje w układzie rombowym, w grupie przestrzennej Pbc<sub>a</sub>. Cząsteczka ze względu na sprzężenia oraz wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe typu N-H...N przyjmuje płaską konformację (Rys. 49).



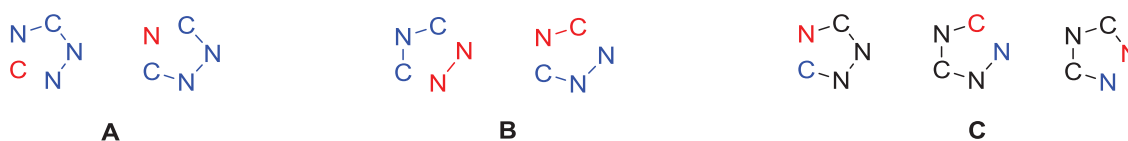


*Rys. 49 Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe związku 67*

#### 4.1.7 Synteza pochodnych 1,2,4-triazolu

Azole stanowią grupę związków szeroko badaną pod kątem aktywności przeciwgruźliczej. Jednakże grupą związków wykazującą znaczącą aktywność tuberkulostatyczną są pochodne 1,2,4-triazolu składające się z pięcioczłonowego pierścienia aromatycznego zawierającego 3 heteroatomy azotu [131–133]. Budowa triazoli sprzyja tworzeniu słabych oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe, jon-dipol czy oddziaływania hydrofobowe i van der Waalsa, z białkami występującymi w organizmach żywych.

Dane literaturowe prezentują liczne sposoby syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu. Opisane metody cyklizacji możemy podzielić na trzy główne grupy (A-C) w zależności od długości i sekwencji atomów w szkielecie (Rys. 50).

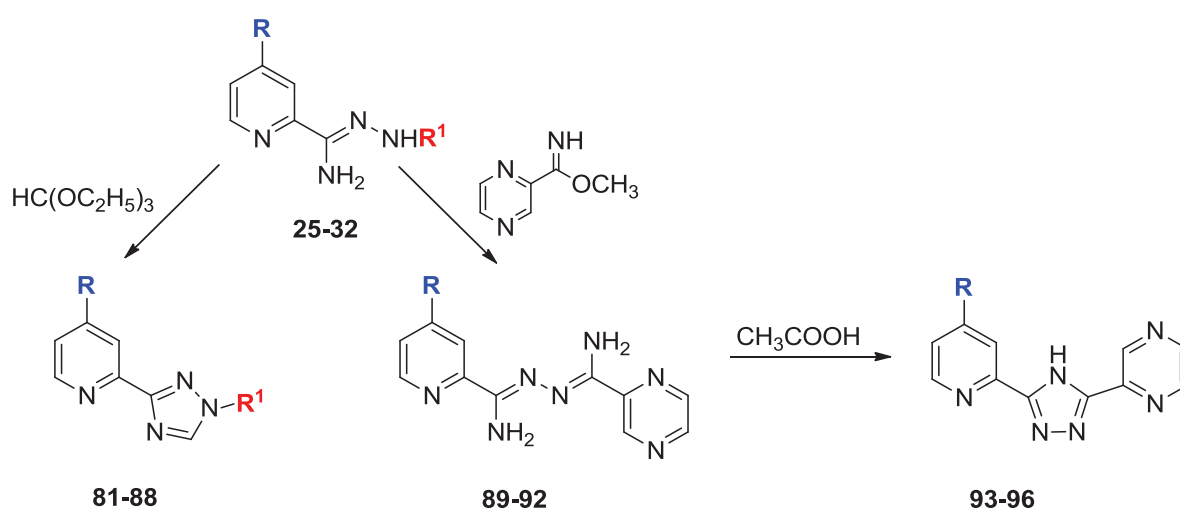


*Rys. 50 Metody syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu*

Metoda **A** polega na przyłączeniu atomu węgla do łańcucha N-C-N-N bądź atomu azotu do łańcucha C-N-N-C z jednoczesnym utworzeniem pierścienia triazolowego [134,135]. W metodzie typu **B** cząsteczka hydrazyny lub jej pochodna przyłącza się do łańcucha o sekwencji C-N-C. Do cyklizacji metodą **B** może również dojść w wyniku działania podstawionego amidu lub cyjanku na łańcuch C-N-N [136,137]. Metoda **C** opiera się na cyklizacji uformowanego szkieletu pod wpływem ciepła lub czynnika kondensującego, jakim może być wodorotlenek sodu, kwas siarkowy(VI) czy kwas

octowy [138,139]. Liczne metody syntetyczne oraz wielowartościowość atomów węgla i azotu umożliwiają otrzymanie triazoli posiadających podstawniki we wszystkich pozycjach cząsteczki [140]. Amidrazony posiadające szkielet o sekwencji N-C-N-N stanowią dobry prekursor do otrzymywania różnorodnych triazoli [141].

W związku z powyższym, w kolejnym etapie badań, otrzymane uprzednio amidrazony, wykorzystano do przeprowadzenia syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu (Schemat 7).



<b>Nr</b>	<b>81</b>	<b>82</b>	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>85</b>	<b>86</b>	<b>87</b>	<b>88</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R'</b>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>Nr</b>	<b>89</b>	<b>90</b>	<b>91</b>	<b>92</b>	<b>93</b>	<b>94</b>	<b>95</b>	<b>96</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		

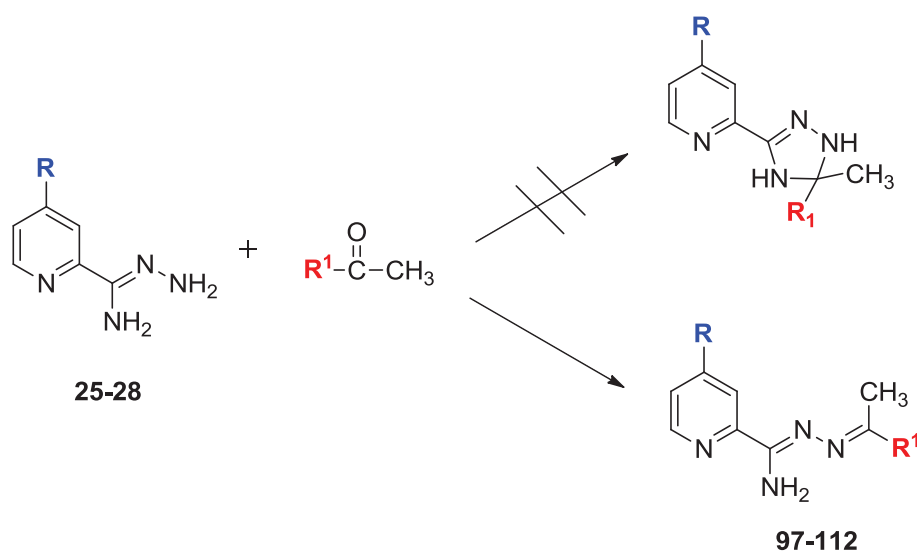
Schemat 7

Wykorzystując zdolność amidrazonów do reagowania z elektrofilowymi związkami węgla, amidrazony **25-28** oraz metyloamidrazony **29-32** ogrzewano z ortomrówczanem trietylu. Metoda ta doprowadziła do otrzymania niepodstawionych pochodnych 1,2,4-triazolu **81-84** oraz podstawionych grupą metylową w pozycji N-1 **85-88**.

W celu otrzymania pochodnych **93-96** zaprojektowano dwuetapową syntezę. W pierwszym etapie amidrazony **25-28** poddano reakcji z metyloiminoestrem kwasu pirazyno-2-karboksylowego otrzymując amido-azyny **89-92**. Kolejnym krokiem była

cyklizacja na gorąco w obecności kwasu octowego. Efektem przeprowadzonych reakcji były pochodne 1,2,4-triazolu **93-96** podstawione w pozycji C-3 pierścieniem pirazyny. Zaprojektowane pochodne 1,2,4-triazolu zostały otrzymane z wydajnością 12-70%.

Struktury otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz na podstawie analizy widm IR i  $^1\text{H}$  NMR. W widmach  $^1\text{H}$  NMR związków **81-84** sygnały pochodzące od protonu grupy N-H w pozycji N-1 występują w zakresie 7,70-8,55 ppm. Ponadto pasma absorpcji pochodzące od wiązań N-H tych grup w widmie IR są obserwowane w zakresie 3424-3343  $\text{cm}^{-1}$ . Dla pochodnych triazolowych **85-88** otrzymanych z metyloamidrazonów nie obserwuje się tych sygnałów, gdyż atom azotu jest podstawiony grupą metylową. W przypadku triazoli **93-96** sygnały protonów grup NH występują powyżej 15,10 ppm. Natomiast w widmach IR pasma pochodzące od drgań deformacyjnych wiązań N-H obserwuje się w zakresie 1519-1589  $\text{cm}^{-1}$ . Szczegółowe opisy widm znajdują się w „Części doświadczalnej” w rozdziałach 5.1.7, 5.1.8 oraz 5.1.10.

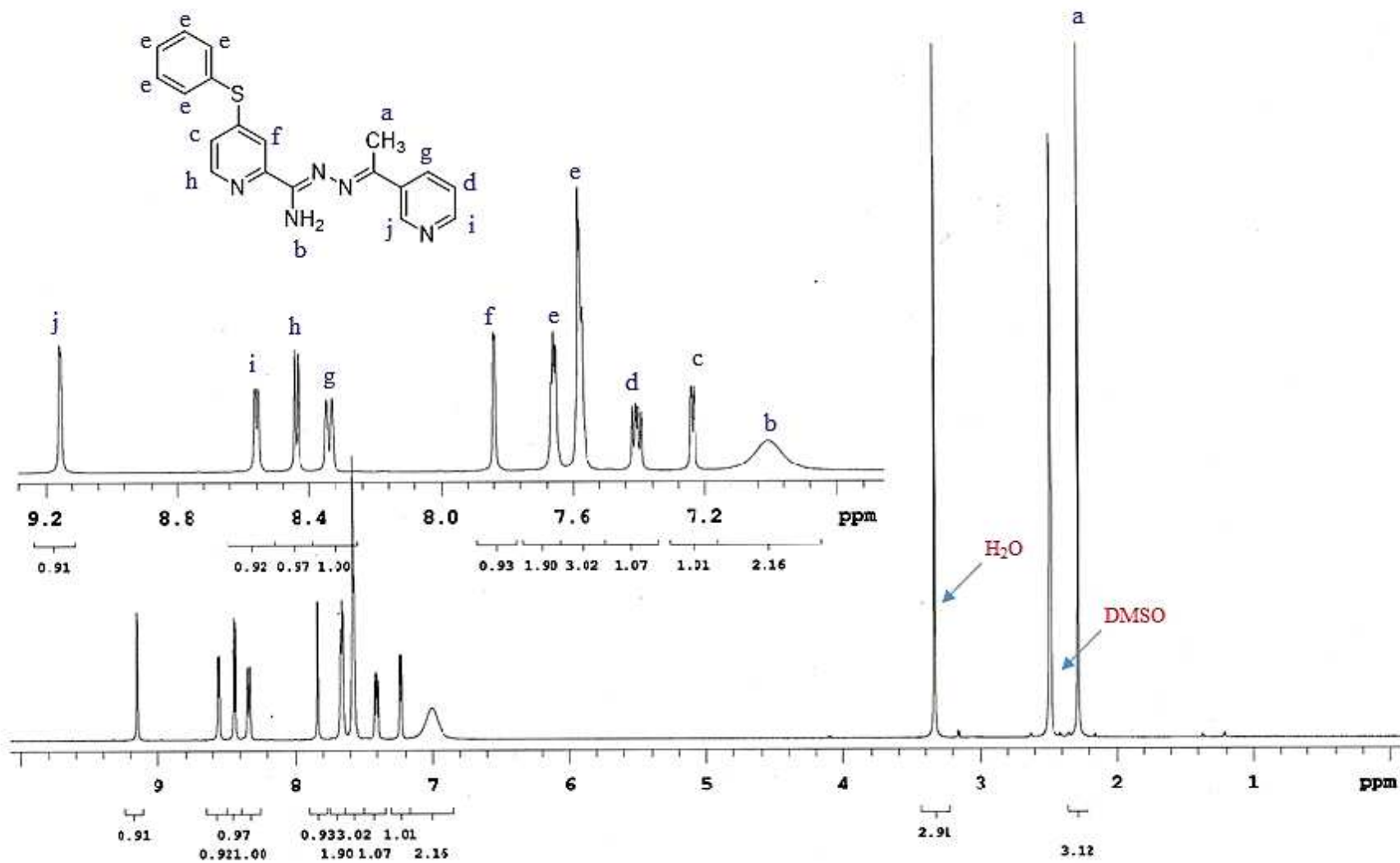


<b>Nr</b>	<b>97</b>	<b>98</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>101</b>	<b>102</b>	<b>103</b>	<b>104</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R<sup>1</sup></b>								
<b>Nr</b>	<b>105</b>	<b>106</b>	<b>107</b>	<b>108</b>	<b>109</b>	<b>110</b>	<b>111</b>	<b>112</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>R<sup>1</sup></b>								

Schemat 8

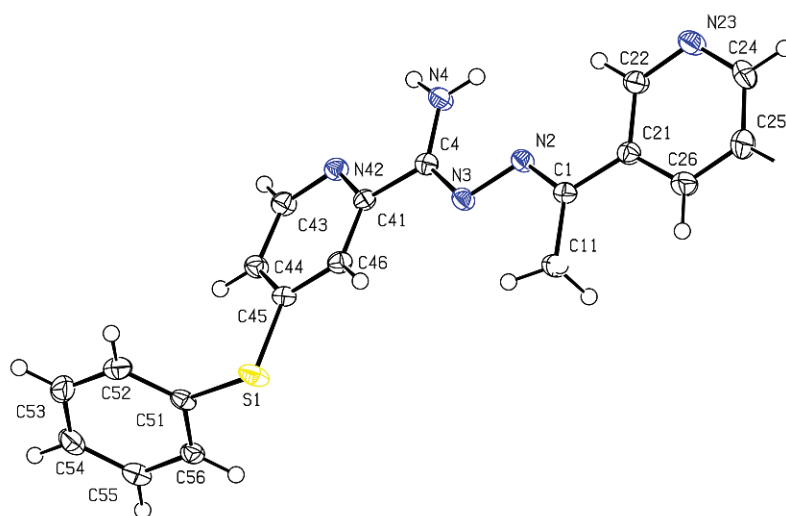
Case oraz Miqdad opisali metodę otrzymywania 1,2,4-triazoli polegającą na cyklizacji amidrazonów z ketonami w kwaśnym środowisku [142,143]. Na tej podstawie zaprojektowano syntezę kolejnej serii pochodnych triazolowych (Schemat 8). Niepodstawione amidrazony **25-28** ogrzewano z heterocyklicznymi metyloketonami w metanolu. Wśród wybranych metyloketonów znajdowały się 2-acetylotiofen, 3-acetyloindol, 3-acetylopirydyna oraz acetylopirazyna. Środowisko reakcji zakwaszono kwasem octowym. Wydajność przeprowadzonych reakcji wynosiła 42-96%. W celu potwierdzenia struktury wykonano widma IR oraz  $^1\text{H}$  NMR. Jednakże analiza otrzymanych danych nie pozwoliła stwierdzić, czy otrzymane związki mają formę cykliczną czy łańcuchową.

Przykładowe widmo  $^1\text{H}$  NMR wykonane dla związku **102** przedstawia singlet przy wartości 2,28 (a) ppm (Rys. 51). Integracja tego sygnału odpowiada trzem protonom grupy metylowej. Sygnały pochodzące od grupy aminowej obserwujemy w postaci szerokiego singletu przy wartości 7,15 (b) ppm. Następnie na widmie można zauważyć dwa dublety dubletów przy przesunięciu 7,24 (c,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz) oraz 7,40 (d,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=5$  Hz) ppm odpowiadające dwóm protonom. Protony te pochodzą od pierścieni pirydyny. W zakresie 7,57-7,66 (e) ppm występują dwa multiplety, których sygnał dały atomy wodoru pierścienia benzenowego. Łączna integracja obu multipletów odpowiada pięciu protonom. Pozostałe atomy wodoru pierścieni pirydynowych widocznie są w widmie w postaci dubletów występujących kolejno przy wartościach 7,84 (f), 8,34 (g), 8,43 (h), 8,56 (i) oraz 9,15 (j) ppm. Stałe sprzężenia wymienionych dubletów wynosiły odpowiednio 2 Hz, 8 Hz, 5 Hz, 5 Hz oraz 2 Hz. Analiza widma sugeruje, iż badany związek wykazuje budowę łańcuchową, a nie cykliczną, jednakże nie daje całkowitej pewności.



Rys. 51 Widmo  $^1\text{H}$  NMR dla związku 102, wykonane w  $\text{DMSO-d}_6$  przy częstotliwości 500 MHz

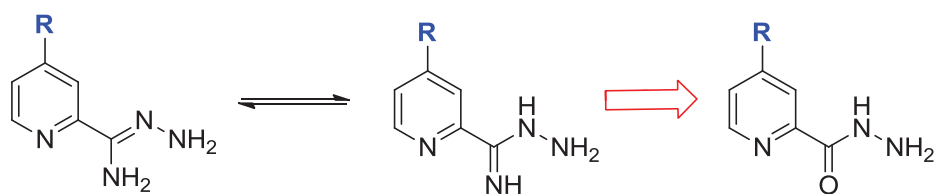
Analiza elementarna również nie była w stanie jednoznacznie określić struktury otrzymanych pochodnych ze względu na taki sam wzór sumaryczny obu możliwych typów budowy. Badanie krystalograficzne (Rys. 52) przeprowadzone dla związku **102** udowodniło, że w wyniku przeprowadzonej reakcji nie dochodzi do cyklizacji z utworzeniem 1,2,4-triazolu, lecz kondensacji z utworzeniem pochodnej iminowej **97-112**.



Rys. 52 Model ORTEP związku **102**

#### 4.1.8 Synteza hydrazydowych analogów wybranych związków

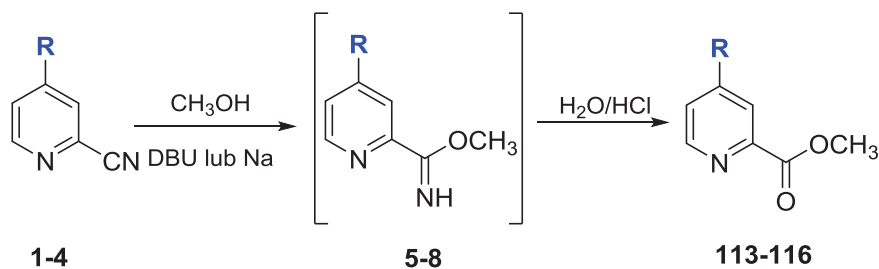
Przedstawione dotychczas reakcje dotyczyły otrzymywania pochodnych amidrazonowych. Klasycznym izosterem grupy N-H jest atom tlenu, zatem wartym przebadania było, czy i w jaki sposób zastąpienie tego ugrupowania w amidrazonach na tlen w hydrazydach wpłynie na aktywność biologiczną (Rys. 53). W związku z szerokim spektrum aktywności biologicznej pochodnych hydrazydowych, w tym także przeciwdrobnoustrojowym wobec bakterii gram dodatnich, gram ujemnych oraz prątków gruźlicy, postanowiono otrzymać analogi hydrazydowe dla wybranych związków posiadających fragment amidrazonowy.



Rys. 53 Struktura pochodnej amidrazonowej oraz jej izosteru

#### 4.1.8.1 Otrzymywanie 4-podstawionych pikolinianów metylu 113-116

Iminoestry stanowią dobry prekursor do dalszych syntez, gdyż z łatwością podlegają wielu reakcjom. Poprzez różne przekształcenia chemiczne można z nich otrzymać karboksyamidy, ortoestry, triazole, a także benzoksazole. Kwasowa hydroliza iminoestrów prowadzi do przekształcenia w estry. Jest to prosty sposób na zamianę grupy C=NH na grupę C=O [144–146].



Nr	113	114	115	116
R	PhO	PhS		

Schemat 9

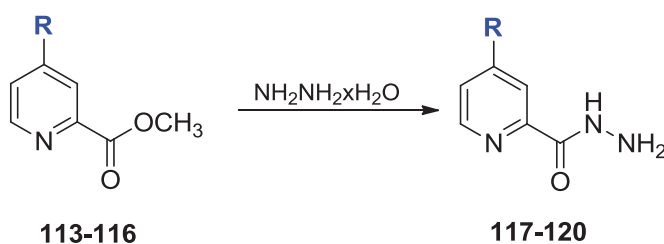
Metodą taką otrzymano metyloestry **113-116**, które stanowiły produkt pośredni do dalszych reakcji (Schemat 9).

W widmach IR wykonanych dla związków **113-116** nie zaobserwowano pasm w zakresie 3600-3200  $\text{cm}^{-1}$ , co świadczy o braku drgań rozciągających pochodzących od wiązania N-H. Natomiast stwierdzono obecność silnych pasm w zakresie 1753-1717  $\text{cm}^{-1}$ , które pochodzą od grupy karbonylowej C=O. Analiza otrzymanych widm potwierdziła, iż metyloiminoestry na drodze hydrolizy uległy przekształceniu w estry kwasowe.

#### 4.1.8.2 Otrzymywanie 4-podstawionych pikolinohydrazydów 117-120

Estry wykazują skłonność do ulegania substytucji nukleofilowej przy acylowym atomie węgla. Wynika to ze zdolności atomu tlenu do wyciągania elektronów oraz małej zawady sterycznej produktu przejściowego, który przyjmuje formę tetraedryczną. W pierwszym etapie reakcji dochodzi do ataku nukleofila na atom węgla, który posiada deficyt elektronów i utworzenia tetraedrycznego produktu pośredniego. Następnie odtworzeniu ulega podwójne wiązanie C=O i eliminowana jest grupa alkoksylova.

Otrzymane estry **113-116** poddano reakcji z wodzianem hydrazyny w środowisku etanolu (Schemat 10). W wyniku przeprowadzonych reakcji zsyntezowano hydrazydy 4-podstawionego kwasu pikolinowego **117-120**. Utworzenie pochodnych hydrazydowych potwierdziła obecność pasm pochodzących od drgań rozciągających grupy N-H w zakresie 3312-3253  $\text{cm}^{-1}$ . Zaobserwowano również pasma w zakresie 1688-1659  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadające drganiom rozciągającym grupy C=O w widmie IR, a przesunięte względem zaobserwowanych w widmach estrów kwasowych.



Nr	117	118	119	120
R	PhO	PhS		

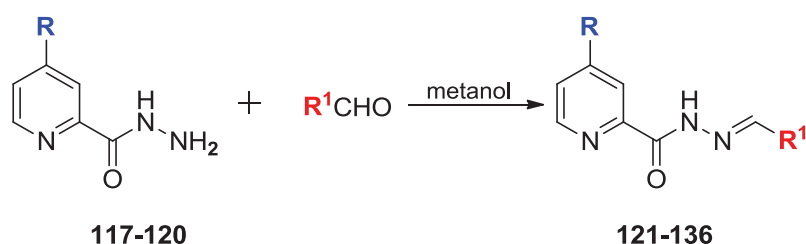
Schemat 10

#### 4.1.8.3 Otrzymywanie hydrazydowych analogów pochodnych iminowych 121-136

Do syntezy hydrazydowych pochodnych iminowych **121-136** wykorzystano reakcję kondensacji z aldehydami aromatycznymi, która została już użyta do syntezy pochodnych iminowych posiadających fragment amidrazonowy (**65-80**).

Hydrazydy **117-120** oraz odpowiednie aldehydy poddano reakcji kondensacji (Schemat 11). Rezultatem przeprowadzonych syntez było 16 nowych pochodnych hydrazydowych z ugrupowaniem azometinowym **121-136**. Wydajność przeprowadzonych reakcji wynosiła 24-78%.





Nr	121	122	123	124	125	126	127	128
R	PhO	PhS			PhO	PhS		
R¹								
Nr	129	130	131	132	133	134	135	136
R	PhO	PhS			PhO	PhS		
R¹								

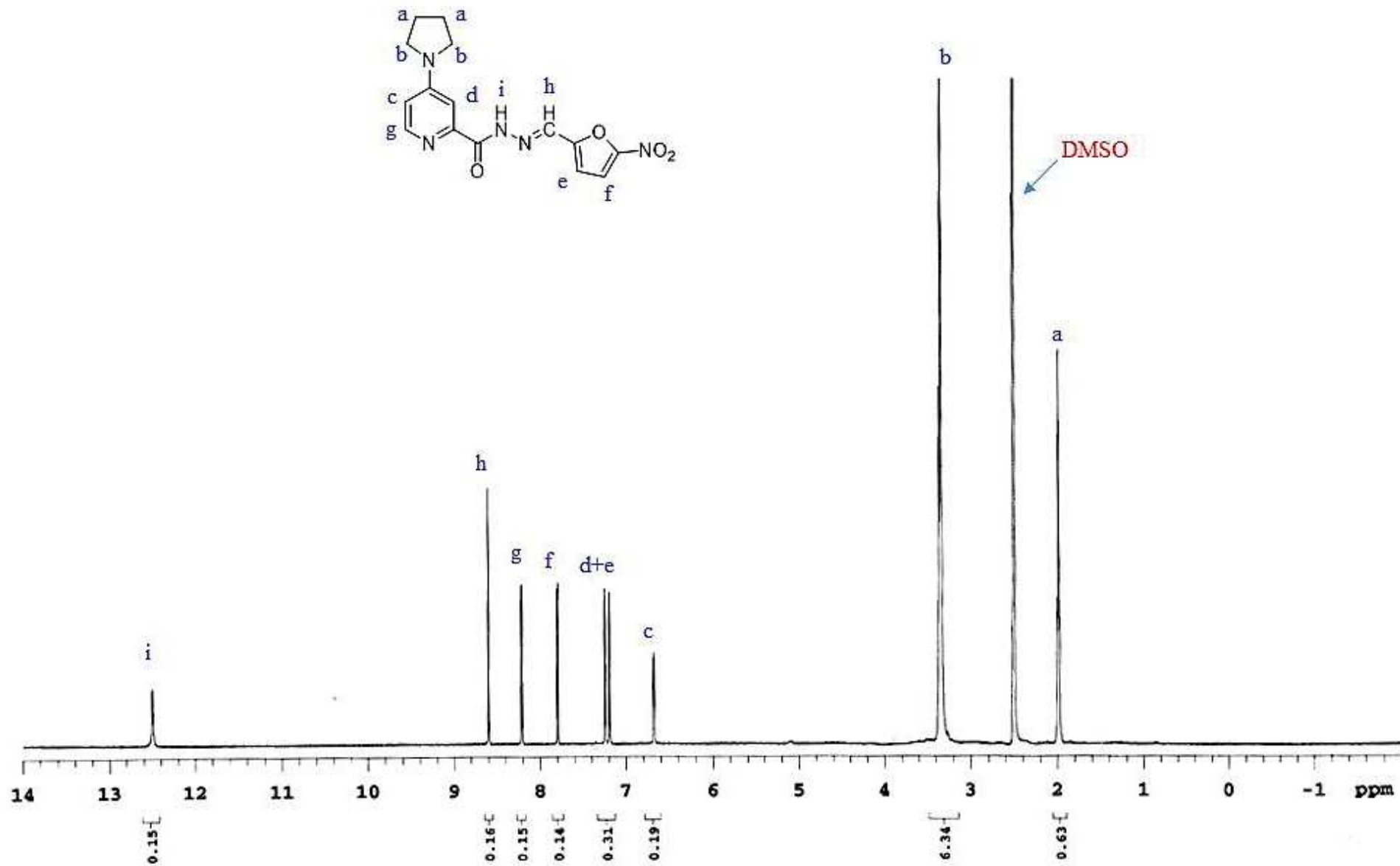
**Schemat 11**

Aby potwierdzić strukturę pochodnych iminowych, wykonano widma IR, <sup>1</sup>H NMR oraz analizę elementarną.

Widmo IR przykładowej pochodnej **135** posiada pasma pochodzące od grupy NH odpowiadające drganiom rozciągającym przy wartości 3421 cm<sup>-1</sup> oraz drganiom deformacyjnym przy wartości 1606 cm<sup>-1</sup>. Ponadto przy wartości 1678 cm<sup>-1</sup> można zaobserwować intensywne pasmo charakterystyczne dla drgań rozciągających wiązania C=O. Obecność grupy NO<sub>2</sub> potwierdzają dwa pasma przy wartościach 1506 cm<sup>-1</sup> odpowiadające drganiom rozciągającym asymetrycznym oraz 1353 cm<sup>-1</sup> odpowiadające drganiom rozciągającym symetrycznym. Szczegółowy opis widma znajduje się w „Części doświadczalnej” w rozdziale 5.1.14.

Widmo <sup>1</sup>H NMR wykonano przy częstotliwości 500 MHz w DMSO-*d*<sub>6</sub> (Rys. 54). W zakresie alifatycznym występują dwa triplety przy 1,98 (a) oraz 3,35 (b) ppm. Każdy z sygnałów odpowiada czterem protonom pochodzącym od grup CH<sub>2</sub> pierścienia piperidynowego. Stała sprzężenia (*J*) dla obu sygnałów wynosi 6 Hz. Protony obecne przy pierścieniu piperidynowym, reprezentowane są w widmie w postaci następujących sygnałów: dubletu dubletów przy przesunięciu 6,68 (c) ppm ze stałymi sprzężenia *J*<sub>1</sub>=3 Hz oraz *J*<sub>2</sub>=3 Hz odpowiadającego jednemu protonowi, dubletu przy przesunięciu 8,20 (g) ppm odpowiadającego jednemu protonowi o stałej sprzężenia *J*=6 Hz oraz multipletu w zakresie 7,20-7,27 ppm. Integracja multipletu odpowiada dwóm protonom. Jeden z nich pochodzi od pierścienia piperidynowego (d), drugi zaś od pierścienia furanowego

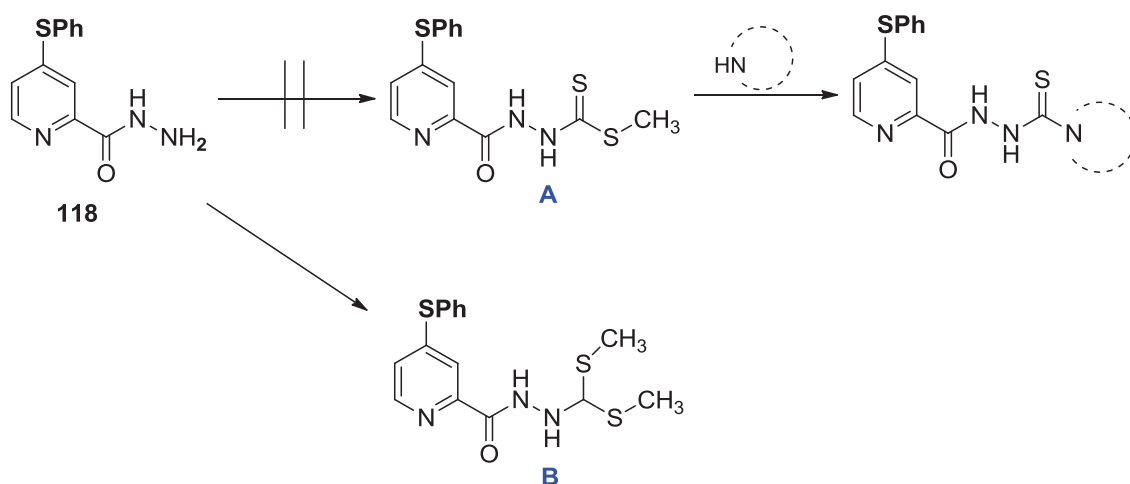
(e). Drugi proton obecny w pierścieniu furanowym można zaobserwować w postaci dubletu ze stałą sprzężenia  $J=5$  Hz przy wartości 7,79 (f) ppm. Singlet pochodzący od protonu grupy azometinowej N=CH występuje przy wartości 8,60 (h) ppm. Przy przesunięciu 12,50 (i) ppm zidentyfikowano singlet pochodzący od protonu grupy NH. Łączna integracja powyższych sygnałów odpowiada 15 protonom, a zatem jest równa liczbie atomów wodoru obecnych w omawianym związku.



Rys. 54 Widmo  $^1\text{H}$  NMR dla związku 135, wykonane w  $\text{DMSO-}d_6$  przy częstotliwości 500 MHz

#### 4.1.8.4 Otrzymywanie hydrazydowych analogów pochodnych cykloalkiloaminiotiosemikarbazydowych

Następnie, aby otrzymać analogi cykloalkiloaminiotiosemikarbazydowe zaprojektowano dwuetapową syntezę polegającą na otrzymaniu w pierwszym etapie estru metylowego kwasu ditiokarbazowego (**A**) (Schemat 12). Kolejnym krokiem była substytucja grupy tiometylowej aminą cykliczną. Hydrazyd **118** poddano reakcji z trietyloaminą (TEA), disiarczkiem węgla oraz jodkiem metylu, który pełnił funkcję czynnika metylującego. Jednakże w wyniku przeprowadzonej reakcji otrzymano pochodną dimetylową (**B**), a nie tak jak planowano pochodną monometylową (**A**). Pomimo skrócenia czasu reakcji nie udało się wyizolować pochodnej monometylowej. Reakcję wykonano ponownie stosując jako czynnik metylujący siarczan dimetylu. Metodą tą także dochodziło do otrzymania pochodnej dimetylowej. Pomimo modyfikacji czasu reakcji oraz stosunków molowych substratów pochodna monometylowa nie została wyizolowana, co uniemożliwiło dalszą syntezę zaplanowaną metodą.



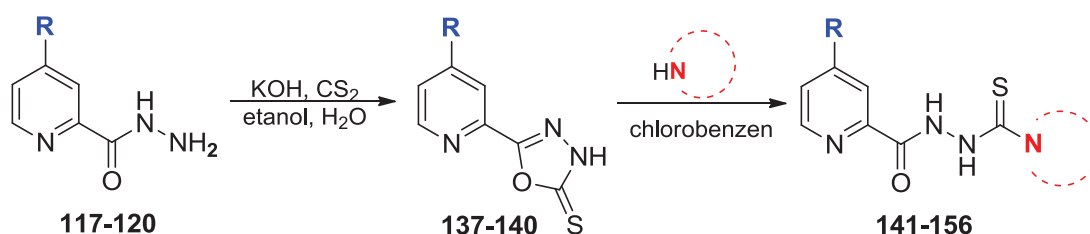
Schemat 12

W związku z powyższym zastosowano nową metodę syntezy polegającą na cyklizacji hydrazydów (**117-120**) w obecności KOH i CS<sub>2</sub>, w etanolu z dodatkiem wody (Schemat 13). W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymano 1,3,4-oksadiazolo-2-tiony **137-140** z wydajnością 79-93%.

W widmach IR dla otrzymanych związków zaobserwowano zanik pasm w zakresie 1688-1659 cm<sup>-1</sup> pochodzących od drgań rozciągających grupy C=O, które były widoczne dla hydrazydów **117-120**. Na widmach można zauważyć natomiast

pojawienie się intensywnych pasm w zakresie 1357-1339  $\text{cm}^{-1}$ , które pochodzą od wiązania C-O-C. Widma w podczerwieni wykonane dla związków **137-140** potwierdzają cyklizację oraz utworzenie pierścienia oksadiazolu. Ponadto w widmach  $^1\text{H}$  NMR obserwujemy pojawienie się szerokiego singletu powyżej 10 ppm, który pochodzi od protonu grupy NH obecnego w pierścieniu oksadiazolowym. Szczegółowe opisy widm znajdują się w „Części doświadczalnej” w rozdziałach 5.1.13 oraz 5.1.15.

W kolejnym etapie oksadiazolotony zostały poddane reakcji z odpowiednimi aminami cyklicznymi w obecności chlorobenzenu. Reakcja ta doprowadziła do otwarcia pierścienia oksadiazolowego i przyłączenia aminy cyklicznej tworząc ponownie związek w formie łańcuchowej. Metodą tą otrzymano pochodne cykloalkilamino tiosemikarbazydowe **141-156** zawierające w swojej strukturze grupę karbonylową z wydajnością 13-98%.



<b>N</b>	<b>137</b>	<b>138</b>	<b>139</b>	<b>140</b>	<b>141</b>	<b>142</b>	<b>143</b>	<b>144</b>	<b>145</b>	<b>146</b>
<b>R</b>	PhO	PhS			PhO	PhS			PhO	PhS
<b>N</b>	-	-	-	-						
<b>N</b>	<b>147</b>	<b>148</b>	<b>149</b>	<b>150</b>	<b>151</b>	<b>152</b>	<b>153</b>	<b>154</b>	<b>155</b>	<b>156</b>
<b>R</b>			PhO	PhS			PhO	PhS		
<b>N</b>										

**Schemat 13**

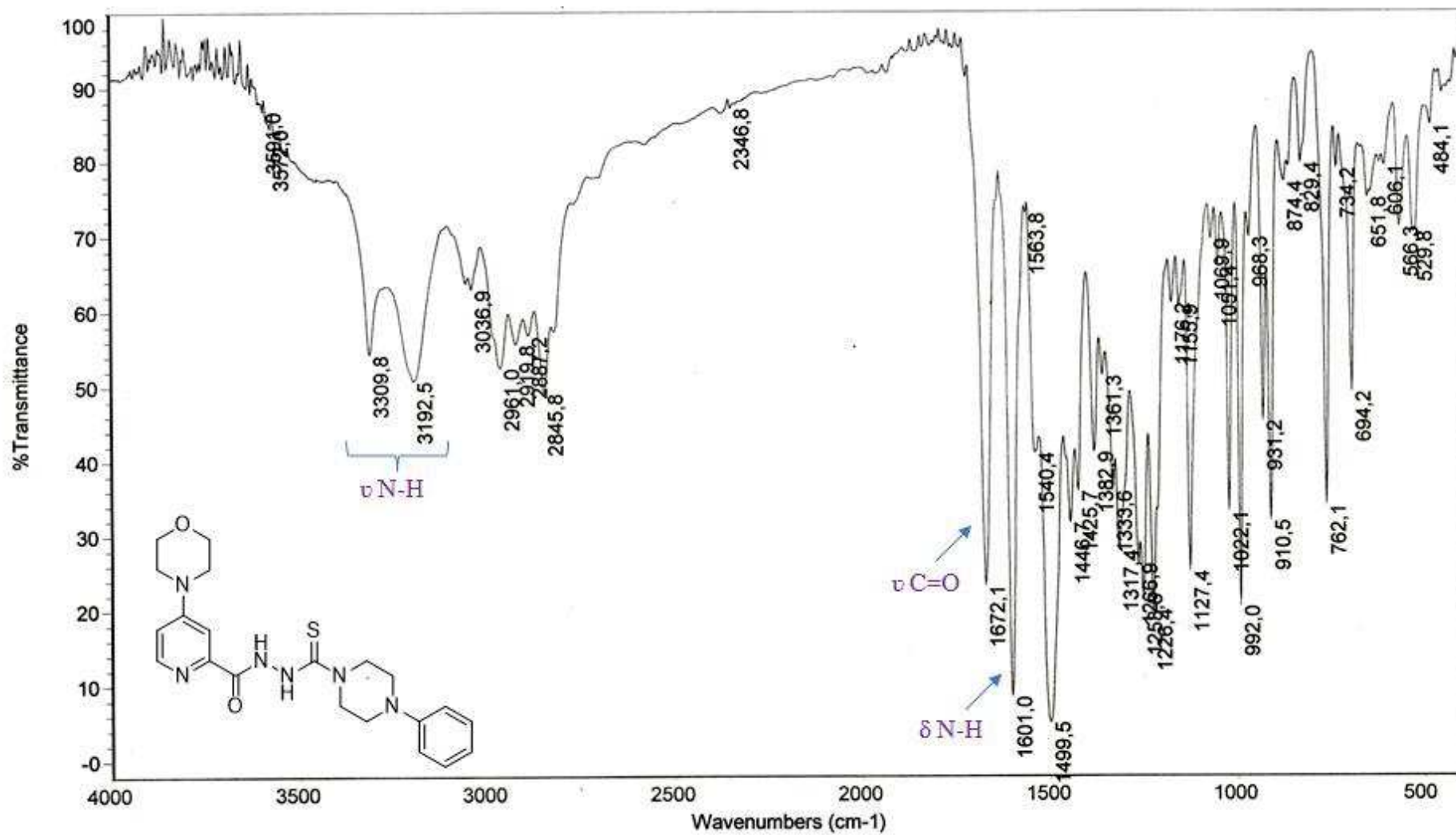
Analiza widm  $^1\text{H}$  NMR oraz IR umożliwiła potwierdzenie struktury otrzymanych pochodnych. Ponadto wykonano także analizę elementarną tej grupy związków.

Analiza widma IR związku **156** (Rys. 55) pozwala zidentyfikować pasma pochodzące od drgań rozciągających ( $3309, 3192 \text{ cm}^{-1}$ ) oraz drgań deformacyjnych ( $1601 \text{ cm}^{-1}$ ) grupy aminowej. Obecność grupy karbonylowej potwierdza intensywne pasmo przy wartości  $1672 \text{ cm}^{-1}$ .

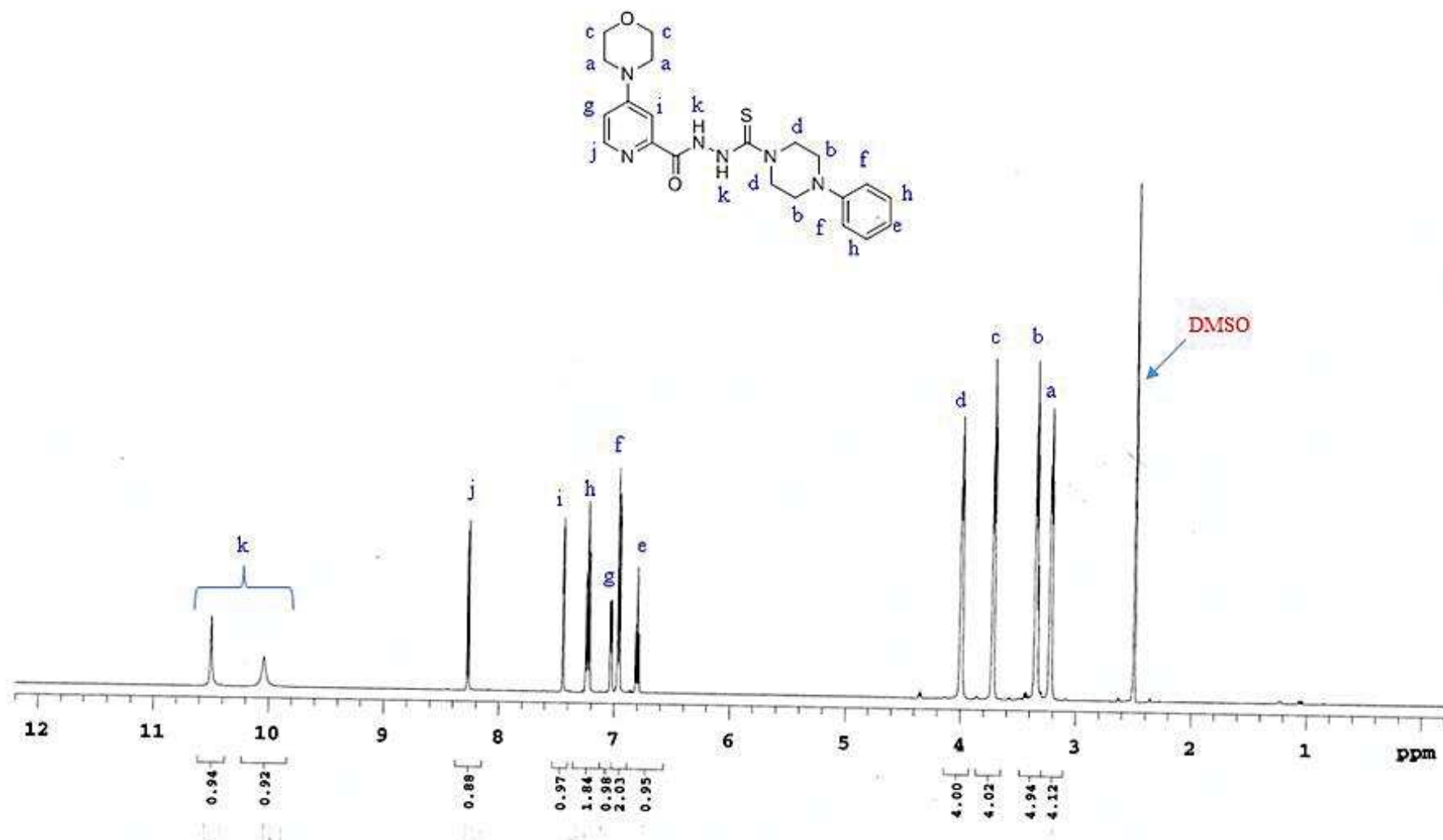
W widmie  $^1\text{H}$  NMR związku **156** zaobserwowano cztery triplety przy przesunięciach 3,22 (a), 3,34 (b), 3,72 (c) oraz 3,99 (d) ppm pochodzące od atomów

wodoru występujących przy pierścieniu morfoliny oraz piperazyny (Rys. 56). Stałe sprzężenia wszystkich wyżej wymienionych tripletów wynosiły 5 Hz. Protony pierścienia benzenowego reprezentowane były w widmie przez następujące sygnały: triplet odpowiadający jednemu protonowi przy 6,80 (e) ppm ( $J=7$  Hz), dublet odpowiadający dwóm protonom przy 6,97 (f) ppm ( $J=8$  Hz) oraz triplet od dwóch protonów przy 7,23 (h) ppm ( $J=7$  Hz). Sygnały pochodzące od pierścienia pirydyny zaobserwowano w postaci dubletu dubletów o stałej sprzężenia  $J_1=3$  Hz i  $J_2=3$  Hz przy wartości 7,03 (g) ppm oraz dwóch dubletów przy wartościach 7,44 (i) i 8,26 (j) ppm ze stałymi sprzężenia  $J=3$  Hz i  $J=6$  Hz. Sygnał każdego z wymienionych dubletów odpowiadał jednemu protonowi. Protony pochodzące od dwóch grup NH zidentyfikowano przy przesunięciach 10,04 (k) oraz 10,49 (k) ppm. Oba protony były reprezentowane przez sygnały w postaci singletów.

Analiza struktury związku **156** została także poszerzona o badania  $^{13}\text{C}$  NMR (Rys. 57). W zakresie charakterystycznym dla związków o budowie alifatycznej zaobserwowano sygnały (46,02, 46,09, 48,15 oraz 66,13 ppm) pochodzące od atomów węgla obecnych w pierścieniu morfolinowym (a i b) oraz piperazynowym (a). W obszarze od 106,28 do 156,24 ppm występują liczne sygnały (c-k) charakterystyczne dla związków aromatycznych. W przypadku badanego związku są to sygnały pochodzące od pierścienia benzenowego oraz pierścienia pirydyny. Łączna liczba oraz intensywność tych sygnałów odpowiada 11 atomom węgla. Dwa sygnały występujące przy najwyższych wartościach przesunięcia chemicznego pochodzą kolejno od atomu węgla tworzącego grupę karbonylową (l, 162,57 ppm) oraz atomu węgla grupy tiokarbonylowej (m, 182,18 ppm).

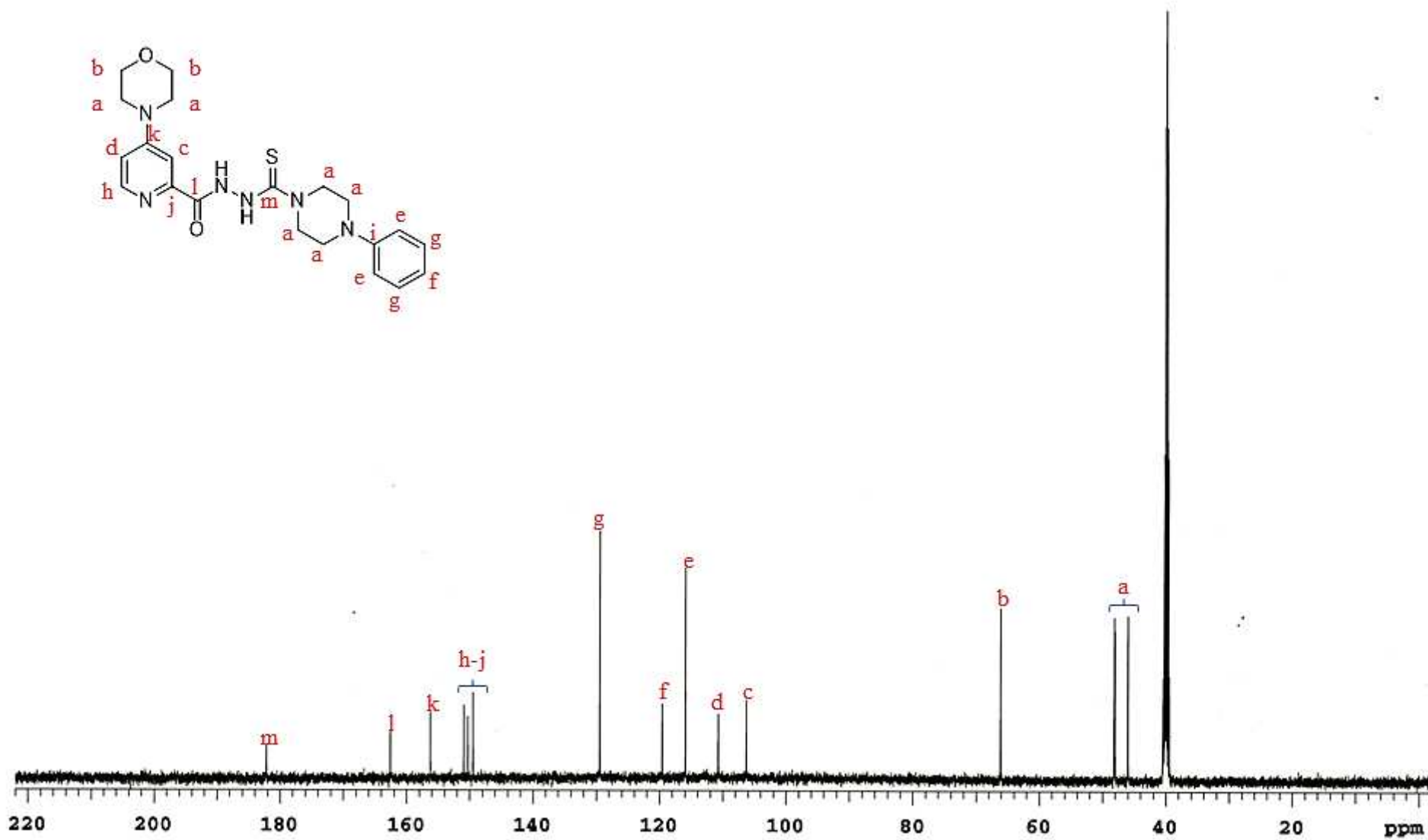


Rys. 55 Widmo IR związku 156



Rys. 56 Widmo  $^1\text{H}$  NMR dla związku 156, wykonane w  $\text{DMSO-}d_6$  przy częstotliwości 500 MHz





Rys. 57 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR dla związku 156, wykonane w  $\text{DMSO-d}_6$  przy częstotliwości 500 MHz

## 4.2 Aktywność biologiczna

### 4.2.1 Aktywność przeciwgruźlicza pochodnych 4-chloropikolinonitrylu

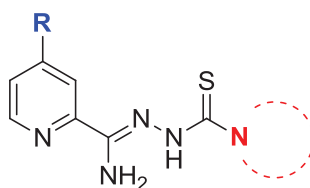
Otrzymane związki zostały przebadane *in vitro* pod kątem aktywności przeciwgruźliczej w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Badanie zostało przeprowadzone na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis*: standardowym H37Rv oraz szczepie klinicznym izolowanym od pacjentów Spec. 210, który wykazał oporność wobec izoniazydu, rifampicyny, etambutolu oraz kwasu *p*-aminosalicylowego. Ich aktywność przeciwpłatkowa była wyrażana poprzez minimalne stężenie hamujące (MIC) definiowane jako minimalne stężenie hamujące wzrost badanych drobnoustrojów.

Związki **9-24**, **33-88**, **93-112** oraz **141-156** zostały przebadane klasyczną metodą probówkową. Aktywność tuberkulostatyczna badanych związków była porównywana z lekami referencyjnymi: izoniazydem (H37Rv MIC 3,1 µg/ml; Spec. 210 MIC 12,5 µg/ml) oraz pirazynamidem (H37Rv MIC 25 µg/ml; Spec. 210 MIC >400 µg/ml). Standardowo oceniano wpływ związku na wzrost bakterii w stężeniu 3,1, 6,2, 12,5, 25, 50 i 100 µg/ml. Dla najaktywniejszych związków badania były poszerzone o następujące stężenia 1,5, 0,8 i 0,4 µg/ml. Natomiast związki **121-136** zostały przebadane metodą mikrorozcieńczeń. Testowane związki były badane w stężeniach od 512 µg/ml do 0,0625 µg/ml. Do porównania zastosowano izoniazyd (INH) jako lek referencyjny (H37Rv MIC 0,125 µg/ml; Spec. 210 MIC 8 µg/ml).

Pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe **9-24** jako pierwsze zostały poddane badaniom aktywności tuberkulostatycznej (Tabela 2). Testowane związki charakteryzowały się umiarkowaną, bądź bardzo dobrą aktywnością przeciwpłatkową z wartością MIC w zakresie 0,4-25 µg/ml. Wszystkie związki z tej grupy wykazywały taką samą aktywność wobec szczepu standardowego H37Rv, jak i szczepu opornego Spec. 210. Analiza otrzymanych wyników ujawniła pozytywny wpływ amin cyklicznych o wysokiej hydrofilowości, takich jak pirolidyna oraz morfolina, na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego na aktywność tuberkulostatyczną. W szczególności pochodne **13-16** posiadające pierścień morfolinowy wykazywały najwyższą aktywność przeciwgruźliczą z wartością MIC 0,4-3,1 µg/ml. Ich aktywność była porównywalna lub wyższa niż leków referencyjnych. Bardzo dobrą aktywność przeciwgruźliczą (MIC 0,4 µg/ml) wykazał także amino-[4-fenoksy)-pirydyn-2-ylo]metylenohydrazyd kwasu pirolidyno-1-karbotionowego (**9**) z grupą fenoksyłową w pozycji C-4 pierścienia

pirydyny oraz pierścieniem pirolidynowym na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego. Obecność ugrupowania fenylopiiperazynowego (**21-24**) charakteryzującego się dużą lipofilowością oraz masą cząsteczkową, powodowała znaczny spadek aktywności przeciwpłatkowej (MIC 6,25-25 µg/ml). Podstawienie w łańcuchu tiosemikarbazydowym pierścieniem piperydyny wydawało się nie mieć istotnego wpływu na aktywność w porównaniu z pozostałymi podstawnikami. Natomiast zasadowość podstawnika położonego w pozycji C-4 pierścienia pirydyny miała wpływ na działanie tuberkulostatyczne badanej grupy związków. Pochodne posiadające w pozycji C-4 pierścienia pirydynowego ugrupowanie pirolidynowe (**11, 15, 19 i 23**), które charakteryzuje się najwyższą zasadowością, wykazywały zwiększoną siłę hamowania wzrostu prątków (MIC 0,4-6,25 µg/ml). Podczas gdy pochodne zawierające grupę tiofenolową (**10, 14, 18 i 22**), o niskiej zasadowości, wykazywały znacznie niższą aktywność (MIC 0,8-25 µg/ml).

**Tabela 2.** Aktywność tuberkulostatyczna pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych **9-24**



**9-24**

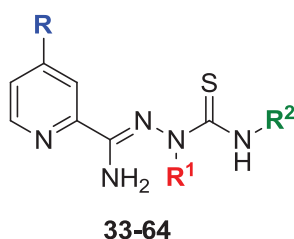
Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H <sub>37</sub> Rv	Spec 210		H <sub>37</sub> Rv	Spec 210
<b>9</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>17</b>	12,5	12,5
<b>10</b>	6,25	6,25	<b>18</b>	12,5	12,5
<b>11</b>	6,25	6,25	<b>19</b>	6,25	6,25
<b>12</b>	6,25	6,25	<b>20</b>	6,25	6,25
<b>13</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	<b>21</b>	25	25
<b>14</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>22</b>	25	25
<b>15</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>23</b>	6,25	6,25
<b>16</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	<b>24</b>	6,25	6,25

MIC-minimalne stężenie hamujące, H37Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicynę, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

Kolejną grupą badanych związków były pochodne tiosemikarbazydowe **33-64** podstawione na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego alkiloaminą (Tabela 3). Stężenie hamujące wzrost prątków w przypadku tej grupy pochodnych było różnorodne od 12,5 do powyżej 100 µg/ml. Aktywność pochodnych zawierających alkiloaminę była znacznie

niższa niż pochodnych posiadających aminę cykliczną. W przeciwieństwie do pochodnych **9-24**, nie zauważono zależności pomiędzy rodzajem podstawnika w pozycji C-4 pierścienia pirydyny a działaniem tuberkulostatycznym. Najwyższą aktywność wykazały dwie pochodne 2-{amino-[4-fenoksy]-pirydyn-2-ylo]metyleno}-*N*-etylohydrazynokarbotioamid (**33**) oraz 2-{amino-[4-pirolidyn-1-ylo]-pirydyn-2-ylo]metyleno}-*N*-cykloheksylohydrazyno-karbotioamid (**39**) zawierające odpowiednio ugrupowanie etylowe oraz pierścień cykloheksylowy na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego. Wartość MIC wobec szczepu H37Rv wynosiła 12,5 µg/ml dla obu związków. Związek **33** wykazywał taką samą aktywność wobec szczepu Spec. 210, natomiast pochodna **39** dwukrotnie słabiej hamowała wzrost szczepu opornego. Podstawienie atomu azotu N-4 grupą metylową (**49-64**) skutkowało zanikiem aktywności przeciwpłatkowej (MIC 50->100 µg/ml).

**Tabela 3.** Aktywność tuberkulostatyczna pochodnych tiosemikarbazydowych **33-64**



Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H37Rv	Spec 210		H37Rv	Spec 210
<b>33</b>	<b>12,5</b>	25	<b>49</b>	-	-
<b>34</b>	25	25	<b>50</b>	50	>100
<b>35</b>	50	50	<b>51</b>	50	100
<b>36</b>	50	100	<b>52</b>	100	100
<b>37</b>	50	100	<b>53</b>	50	50
<b>38</b>	25	50	<b>54</b>	>100	>100
<b>39</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>55</b>	>100	>100
<b>40</b>	25	50	<b>56</b>	50	100
<b>41</b>	50	50	<b>57</b>	100	100
<b>42</b>	50	100	<b>58</b>	50	100
<b>43</b>	100	100	<b>59</b>	100	100
<b>44</b>	100	100	<b>60</b>	50	50
<b>45</b>	50	50	<b>61</b>	50	>100
<b>46</b>	50	50	<b>62</b>	100	100
<b>47</b>	50	50	<b>63</b>	50	100
<b>48</b>	50	100	<b>64</b>	100	100

MIC-minimalne stężenie hamujące, H37Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicyne, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

W celu wyjaśnienia przyczyn różnicy aktywności obu omawianych powyżej grup związków wyznaczono metodami chemii obliczeniowej wartość log P, moment dipolowy (Tabela 4) oraz mapy potencjału elektrostatycznego (Rys. 58) dla wybranych związków. Obliczenia *ab initio* zostały wykonane metodą DFT z wykorzystaniem bazy 6,31G\*\* dostępną w oprogramowaniu Gaussian 03.

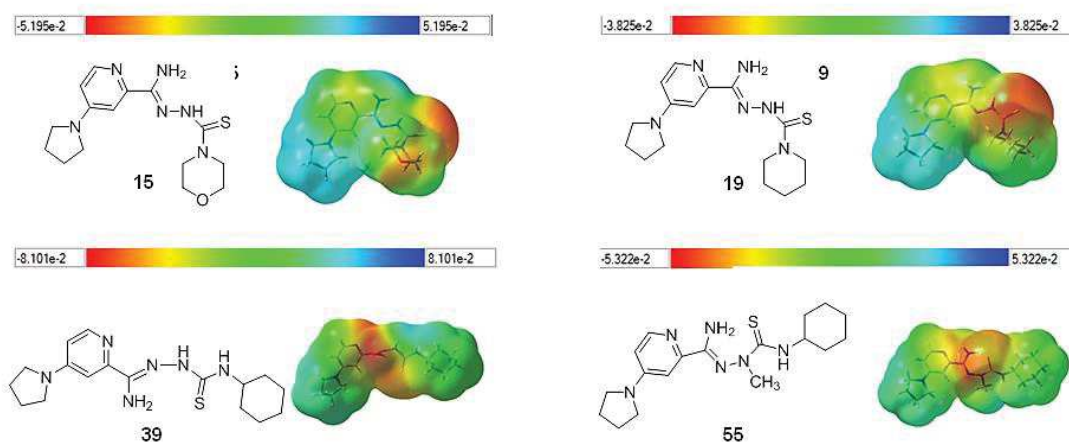
Wśród wybranych do badań związków znalazły się dwie pochodne posiadające na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego aminę cykliczną, morfolinę lub piperydynę (**15**, **19**), oraz dwie pochodne zawierające w tym położeniu cykloheksyloaminę (**39**, **55**).

**Tabela 4.** Energia całkowita (E), moment dipolowy ( $\mu$ ) oraz współczynnik podziału (log P) wybranych pochodnych tiosemikarbazydowych

Nr	MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]	E [a.u.]	$\mu$ [Debye]	log P
<b>15</b>	0.4	-1386.46	8.96	1.06
<b>19</b>	6.25	-1350.59	9.25	2.19
<b>39</b>	12.5	-1389.88	3.26	2.63
<b>55</b>	>100	-1429.16	5.90	2.86

Obliczenia wykonano metodą DFT z wykorzystaniem bazy 6,31G\*\* za pomocą oprogramowania Gaussian 03.

W badanej grupie zaobserwowano, że wraz ze wzrostem wartości log P dochodzi do zmniejszenia aktywności przeciwgruźliczej. Cykloalkiloamino tiosemikarbazydy **15** i **19**, posiadające dobrą aktywność przeciwprątkową, wykazują także duży moment dipolowy. Natomiast pochodne **39** i **55**, o niższej aktywności, charakteryzują się również znacząco niższym momentem dipolowym.

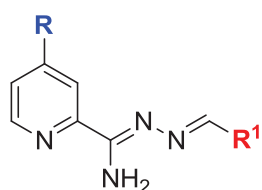


**Rys. 58** Mapy potencjału elektrostatycznego wybranych pochodnych tiosemikarbazydowych

Zamieszczone mapy potencjału elektrostatycznego związków **15** oraz **19** (Rys. 58) obrazują nagromadzenie ładunku ujemnego w obrębie atomu siarki, jak również ładunek dodatni w obrębie pierścienia piroolidynowego. Natomiast w przypadku pochodnych zawierających cykloheksyloaminę, **39** i **55**, ładunek ujemny jest rozproszony w kierunku pierścienia pirydynowego i nie obserwuje się już tak wyraźnego ładunku dodatniego w pierścieniu piroolidynowym. Tymczasem charakterystyczny ładunek dodatni występuje w obrębie protonu związanego z atomem azotu ugrupowania cykloheksyloaminowego.

Pochodne z ugrupowaniem azometinowym (iminowym) **65-80** wykazały aktywność tuberkulostatyczną w zakresie 6,25-50 µg/ml (Tabela 5). Związki posiadające w pozycji R<sup>1</sup> grupę fenyłową bądź *p*-nitrofenyłową (**65-72**) cechowały się taką samą wartością MIC 50 µg/ml. Wartość ta jest znacząco wyższa niż dla leków referencyjnych, co świadczy o ich słabym działaniu tuberkulostatycznym. Podstawienie w pozycji R<sup>1</sup> ugrupowaniem 5-nitrofurylowym (**77-80**) prowadziło do co najmniej czterokrotnego wzrostu aktywności w porównaniu z podstawnikami posiadającymi pierścień fenyłowy. Wartość MIC tych pochodnych dla obu szczepów była niższa niż leku referencyjnego pirazynamidu. Ponadto zdolność do hamowania wzrostu prątków wobec szczepu opornego była na takim samym poziomie lub większa niż izoniazydu.

**Tabela 5.** Aktywność tuberkulostatyczna pochodnych iminowych **65-80**



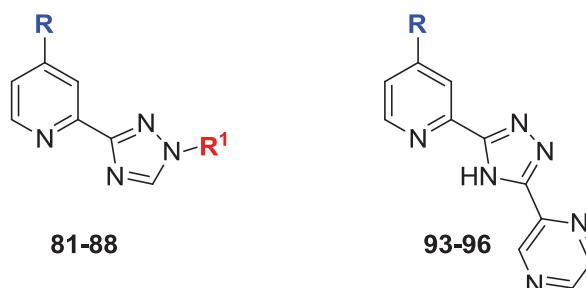
**65-80**

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H <sub>37</sub> Rv	Spec 210		H <sub>37</sub> Rv	Spec 210
<b>65</b>	50	50	<b>73</b>	25	25
<b>66</b>	50	50	<b>74</b>	50	50
<b>67</b>	50	50	<b>75</b>	50	50
<b>68</b>	50	50	<b>76</b>	25	25
<b>69</b>	50	50	<b>77</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>
<b>70</b>	50	50	<b>78</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>
<b>71</b>	50	50	<b>79</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>
<b>72</b>	50	50	<b>80</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>

H37Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicyne, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

Cyklizacja pochodnych amidrazonowych do 1,2,4-triazoli spowodowała spadek bądź zanik aktywności przeciwprątkowej (Tabela 6). Pochodne **81-88** oraz **93-96** charakteryzowały się minimalnym stężeniem hamującym w zakresie 25-100 µg/ml. Z grupy badanych pochodnych jedynie związek **84**, z niepodstawionym pierścieniem triazolowym oraz układem morfolinowym w pozycji 4 pierścienia pirydyny, wykazywał umiarkowaną aktywność tuberkulostatyczną o wartości MIC 25 µg/ml. Jego siła hamowania wzrost prątków gruźlicy szczepu H37Rv była na takim samym poziomie jak leku referencyjnego, jakim był pirazynamid. Co więcej, inhibicja wzrostu komórek szczepu opornego była silniejsza niż w przypadku pirazynamidu.

**Tabela 6.** Aktywność tuberkulostatyczna pochodnych triazolowych **81-88** oraz **93-96**



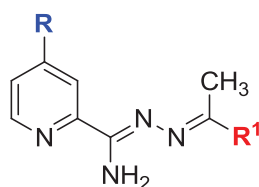
Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H <sub>37</sub> Rv	Spec 210		H <sub>37</sub> Rv	Spec 210
<b>81</b>	50	50	<b>87</b>	50	50
<b>82</b>	50	50	<b>88</b>	50	50
<b>83</b>	50	50	<b>93</b>	50	50
<b>84</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>94</b>	50	50
<b>85</b>	50	50	<b>95</b>	50	50
<b>86</b>	50	50	<b>96</b>	100	100

MIC-minimalne stężenie hamujące, H37Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicyne, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

Pochodne iminowe otrzymane w wyniku reakcji amidrazonów z heterocyklicznymi metyloketonami **97-112** również zostały poddane ocenie aktywności tuberkulostatycznej (Tabela 7). Związki posiadające w pozycji R<sup>1</sup> pierścień heterocykliczny z atomem azotu, taki jak pirazyna, pirydyna oraz indol, wykazywały umiarkowaną bądź słabą aktywność przeciwprątkową (MIC 12,5-50 µg/ml). Na uwagę zasługuje pochodna **107** posiadająca układ pirolidynowy jako podstawnik R oraz pierścień indolu w pozycji R<sup>1</sup>, a hamująca wzrost prątków na poziomie MIC 12,5 µg/ml. Zaobserwowano również, iż obecność pierścienia tiofenowego w pozycji R<sup>1</sup> sprzyja występowaniu aktywności przeciwprątkowej w tej grupie. Pochodne **109-111**, posiadające taki podstawnik wykazywały dobrą aktywność przeciwprątkową w zakresie

6,25-12,5 µg/ml. Siła inhibicji wyżej wymienionych pochodnych była większa niż pirazynamidu dla obu badanych szczepów oraz izoniazydu wobec szczepu opornego Spec. 210. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy rodzajem podstawnika przy pierścieniu pirydyny w pozycji C-4 a aktywnością tuberkulostatyczną.

**Tabela 7.** Aktywność tuberkulostatyczna pochodnych iminowych **97-112**



**97-112**

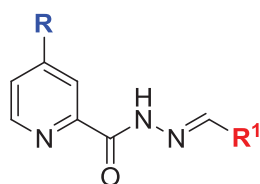
Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H <sub>37</sub> Rv	Spec 210		H <sub>37</sub> Rv	Spec 210
<b>97</b>	50	50	<b>105</b>	50	50
<b>98</b>	25	25	<b>106</b>	25	25
<b>99</b>	50	50	<b>107</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>
<b>100</b>	50	50	<b>108</b>	50	50
<b>101</b>	50	50	<b>109</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>
<b>102</b>	50	50	<b>110</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>
<b>103</b>	25	25	<b>111</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>
<b>104</b>	50	50	<b>112</b>	-	-

MIC-minimalne stężenie hamujące, H<sub>37</sub>Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicyne, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

Pochodne iminowe (**121-136**) będące hydrazydowymi analogami strukturalnymi związków **65-80** wykazały bardzo zróżnicowaną aktywność tuberkulostatyczną od wartości MIC 1 µg/ml do powyżej 512 µg/ml (Tabela 8). Zaobserwowano wzrost aktywności w przypadku obecności podstawnika 5-nitrofurylowego (**133-136**). Wartości MIC wyznaczone dla tych pochodnych były w zakresie 1-16 µg/ml. Podobną tendencję odnotowano w przypadku ich analogów amidrazonowych. Ponadto dobrą aktywnością przeciwprątkową (MIC 4-8 µg/ml) wyróżniały się dwie pochodne posiadające ugrupowanie 5-nitrotiofenowe w swojej strukturze (**130, 132**). Obecność podstawnika fenylowego bądź 5-nitrofenylowego prowadziła do osłabienia aktywności lub jej zaniku (**121-127**). Najwyższą zdolność do inhibicji wzrostu wykazywał związek **134** z wartością MIC wobec szczepu standardowego H<sub>37</sub>Rv oraz wobec szczepu klinicznego Spec 210 odpowiednio 1 µg/ml oraz 2 µg/ml. Wyniki te pokazują, iż pochodna ta silniej hamuje wzrost szczepu klinicznego niż lek referencyjny, jakim jest izoniazyd.



**Tabela 8.** Aktywność tuberkulostatyczna hydrazydowych pochodnych iminowych **121-136**



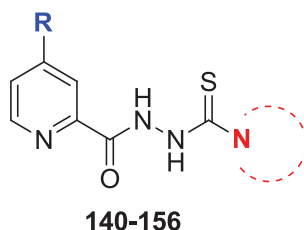
**121-136**

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H <sub>37</sub> Rv	Spec 210		H <sub>37</sub> Rv	Spec 210
<b>121</b>	128	128	<b>129</b>	64	128
<b>122</b>	512	512	<b>130</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>123</b>	>512	>512	<b>131</b>	32	32
<b>124</b>	nd	nd	<b>132</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>125</b>	>512	>512	<b>133</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>126</b>	>512	>512	<b>134</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>127</b>	256	512	<b>135</b>	16	16
<b>128</b>	nd	nd	<b>136</b>	16	16

MIC-minimalne stężenie hamujące, H37Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicyne, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

Tiosemikarbazydy z ugrupowaniem hydrazydowym **141-156** wykazywały znacząco niższą aktywność tuberkulostatyczną (Tabela 9) niż ich amidrazonowe analogi **9-24**. Jedną z najaktywniejszych pochodnych, 4-(fenoksy)-*N'*-(pirolidyno-1-karbonotioylo)pikolinohydrazyd (**141**, MIC 12,5 µg/ml), wykazała ponad 31 razy słabszą aktywność niż jej amidrazonowy analog (**9**, MIC 0,4 µg/ml). Niemniej jednak badana grupa związków posiadała umiarkowaną aktywność przeciwprątkową (MIC 12,5-50 µg/ml). Obecność pierścienia pirolidynowego (**141-144**) na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego powodowała wzrost aktywności przeciwprątkowej (MIC 12,5-25 µg/ml).

**Tabela 9.** Aktywność tuberkulostatyczna hydrazydowych pochodnych tiosemikarbazydowych 140-156



Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>Mycobacterium tuberculosis</i>			szczep <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	H <sub>37</sub> Rv	Spec 210		H <sub>37</sub> Rv	Spec 210
141	12,5	12,5	149	25	25
142	12,5	12,5	150	25	25
143	25	25	151	12,5	12,5
144	12,5	12,5	152	25	25
145	25	25	153	50	50
146	12,5	12,5	154	25	25
147	25	25	155	25	25
148	25	25	156	12,5	12,5

MIC-minimalne stężenie hamujące, H37Rv-standardowy szczep *Mycobacterium tuberculosis*, Spec 210 szczep *Mycobacterium tuberculosis* oporny na izoniazyd, rifampicyne, etambutol oraz kwas p-aminosalicylowy

W grupie pochodnych tiosemikarbazydowych z ugrupowaniem hydrazydowym, podobnie jak w przypadku pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych, można było zaobserwować negatywny wpływ obecności pierścienia fenylopiperazynowego na aktywność (153-156). Obecność podstawnika w pozycji C-4 pierścienia pirydynowego nie wywierała tak istotnego wpływu na aktywność, jak było to zauważalne w przypadku ich analogów z ugrupowaniem amidrazonowym.

#### 4.2.2 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych 4-chloropikolinonitrylu wobec wybranych szczepów bakterii i drożdży

Badania przeciwdrobnoustrojowe dla niektórych związków zostały poszerzone o wybrane szczepy bakterii G(+), G(-) oraz drożdży. Badania były prowadzone na panelu referencyjnych mikroorganizmów z American Type Culture Collection (ATCC), w tym bakterii G(+) (*Staphylococcus aureus*<sup>1</sup> ATCC 25923, *S. aureus*<sup>2</sup> ATCC 43300, *S. aureus*<sup>3</sup> ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus. luteus* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus mutans* ATCC 25175) oraz G(-) (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883,

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Wśród wybranych grzybów znalazły się następujące szczepy *Candida albicans*<sup>1</sup> ATCC 10231, *C. albicans*<sup>2</sup> ATCC 2091, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030 oraz *Candida krusei* ATCC 14243. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa była charakteryzowana poprzez minimalne stężenie hamujące (MIC). Ponadto wyznaczono minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) lub minimalne stężenie grzybobójcze (MFC). Wartości MBC oraz MFC określają najniższe stężenia badanych związków, przy których nie obserwuje się wzrostu mikroorganizmów.

**Tabela 10.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych cykloalkilaminotiosemi-karbazydowych wobec bakterii G(+)

Nr	9		12		13		14		15		16		18	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	0,49	15,6	7,8	15,6	15,6	62,5	0,98	31,3	15,6	>1000	15,6	>1000	250	>1000
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	0,98	15,6	7,8	31,3	7,8	31,3	3,9	15,6	7,8	>1000	15,6	>1000	250	>1000
<i>S. aureus</i> <sup>3</sup>	0,24	15,6	15,6	31,3	125	250	15,6	31,3	31,3	>1000	15,6	>1000	250	>1000
<i>S. epidermidis</i>	0,12	15,6	3,9	15,6	3,9	15,6	0,49	15,6	1,95	1,95	15,6	500	250	250
<i>M. luteus</i>	1,95	7,8	0,98	1,95	0,49	0,49	0,24	0,24	0,49	0,98	7,8	15,6	250	250
<i>B. subtilis</i>	0,49	3,9	1,95	3,9	7,8	15,6	1,95	15,6	0,98	0,98	31,3	>1000	250	1000
<i>B. cereus</i>	0,98	15,6	3,9	3,9	31,3	62,5	7,8	15,6	1,95	1,95	31,3	1000	250	>1000
<i>S. pyogenes</i>	1,95	15,6	3,9	62,5	7,8	62,5	3,9	15,6	7,8	250	1000	>1000	7,8	31,3
<i>S. pneumoniae</i>	7,8	31,3	15,6	125	31,3	62,5	31,3	62,5	250	>1000	>1000	>1000	15,6	250
<i>S. mutans</i>	0,98	0,98	1,95	1,95	7,8	7,8	1,95	1,95	1,95	1,95	1000	>1000	1,95	3,9

Nr	21		22		23		24		CIP		VAN	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	15,6	15,6	31,3	>1000	7,8	>1000	125	1000	0,49	0,49	0,98	7,81
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	15,6	15,6	31,3	>1000	7,8	>1000	62,5	>1000	0,24	0,24	0,49	1,95
<i>S. aureus</i> <sup>3</sup>	15,6	31,3	31,3	>1000	7,8	>1000	125	1000	0,24	0,24	0,49	1,95
<i>S. epidermidis</i>	7,8	7,8	15,6	>1000	1,95	7,8	31,3	500	0,49	0,49	0,98	0,98
<i>M. luteus</i>	3,9	7,8	7,8	7,8	0,24	0,24	1,95	15,6	0,98	1,95	0,12	0,12
<i>B. subtilis</i>	7,8	15,6	15,6	>1000	1,95	7,8	125	1000	0,03	0,12	0,24	0,49
<i>B. cereus</i>	15,6	15,6	15,6	>1000	7,8	>1000	500	>1000	0,12	0,12	0,98	15,6
<i>S. pyogenes</i>	15,6	62,5	15,6	>1000	7,9	31,3	3,9	31,3			0,24	0,49
<i>S. pneumoniae</i>	62,5	125	31,3	250	15,6	31,3	3,9	31,3			0,24	0,49
<i>S. mutans</i>	15,6	15,6	15,6	15,6	3,9	3,9	1,95	3,9			0,98	0,98

MIC-minimalne stężenie hamujące, MBC-minimalne stężenie bakteriobójcze, CIP-ciprofloksacyna, VAN-wankomycyna, czerwonym kolorem oznaczono związki o aktywności wyższej niż leki referencyjne

Poszerzonym badaniom aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostały poddane pochodne cykloalkiloamino tiosemikarbazydowe **9**, **12-16**, **18**, **21-24** (Tabela 10). Badania objęły związki o najwyższej aktywności tuberkulostatycznej.

Badanie wobec bakterii G(+) pozwoliło wyłonić pochodną **9** jako związek o najwyższej aktywności wobec większości badanych szczepów. Związek ten najsilniej hamował wzrost szczepu *S. epidermidis* charakteryzując się wartością MIC 0,12 µg/ml. Wartość ta była niższa niż dla obu leków referencyjnych, ciprofloksacyny oraz wankomycyny. Minimalne stężenie bakteriobójcze wynosiło 15,6 µg/ml, a zatem było wyższe niż leków standardowych. Wartość MIC dla wszystkich badanych szczepów z rodzaju *Bacillus* oraz *Staphylococcus* wynosiła poniżej 1 µg/ml, co świadczy o jego dobrej aktywności przeciwbakteryjnej. Co więcej, aktywność bakteriostatyczna przeciwko *S. aureus*<sup>3</sup> oraz *S. epidermidis* była wyższa niż wobec testowanych szczepów *M. tuberculosis* (MIC 0,4 µg/ml). Ponadto związek **9** charakteryzował się bardzo dobrą aktywnością przeciwko *S. mutans* z wartością MIC (0,98 µg/ml) na tym samym poziomie co wankomycyna.

Warto zwrócić również uwagę na aktywność przeciwbakteryjną pochodnych **13-16**, które wykazały najwyższą aktywność przeciwprątkową (MIC 0,4-3,1 µg/ml). Działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze przeciwko bakteriom G(+) związku **13** było na umiarkowanym poziomie. Tylko dla szczepu *M. luteus* wartość MIC była niższa (0,49 µg/ml) niż dla badanych szczepów *M. tuberculosis* (3,1 µg/ml). Związek **14** wykazywał wyższą aktywność bakteriostatyczną niż tuberkulostatyczną przeciwko szczepom *M. luteus* i *S. epidermidis*. Aktywność bakteriostatyczna związków **15** i **16** dla żadnego z badanych szczepów bakterii G(+) nie była wyższa niż ich aktywność tuberkulostatyczna. Związek **15** wykazywał dobrą aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko szczepom *M. luteus* i *B. subtilis* z wartością MIC poniżej 1 µg/ml.

Pochodne **21-24** posiadające przy łańcuchu tiosemikarbazydowym fragment fenylopiperazyny wykazały umiarkowaną bądź słabą aktywność hamującą wzrost badanych szczepów. Spośród badanych szczepów *M. luteus* wykazał najwyższą wrażliwość wobec testowanych związków z wartością MIC w zakresie 0,24-250 µg/ml. Najniższą aktywnością (MIC 1,95-250 µg/ml) wobec bakterii G(+) cechował się związek **18** posiadający ugrupowanie tiofenolowe w pozycji C-4 pierścienia pirydyny oraz fragment piperydyny na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego.

Wszystkie badane pochodne tiosemikarbazydowe wykazały słabą lub też brak aktywności bakteriostatycznej wobec bakterii G(-) (Tabela 11). Pochodna **9** przy stężeniu 31,3 µg/ml powodowała zahamowanie wzrostu *S. typhimurium* oraz *P. mirabilis*. Przy takim samym stężeniu związek **16** wywołał inhibicję wzrostu komórek *K. pneumoniae*. Niemniej jednak wartości te są znacząco wyższe niż minimalne stężenie hamujące leku referencyjnego.

**Tabela 11.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych cykloalkiloaminiotiosemikarbazydowych wobec bakterii G(-)

Nr	<b>9</b>		<b>12</b>		<b>13</b>		<b>14</b>		<b>15</b>		<b>16</b>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. typhimurium</i>	31,3	>1000	31,3	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i>	125	>1000	15,6	>1000	500	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. mirabilis</i>	31,3	>1000	15,6	>1000	125	>1000	62,5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	31,3	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	31,3	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	250	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Nr	<b>18</b>		<b>21</b>		<b>22</b>		<b>23</b>		<b>24</b>		<b>CIP</b>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. typhimurium</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	0,06	0,06
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,004	0,008
<i>P. mirabilis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	0,03	0,03
<i>K. pneumoniae</i>	500	>1000	>1000	>1000	500	>1000	125	>1000	>1000	>1000	0,12	0,24
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,49	0,98

MIC-minimalne stężenie hamujące, MBC-minimalne stężenie bakteriobójcze, CIP-ciprofloksacyna

Aktywność przeciwgrzybicza testowanych pochodnych była znacząco niższa niż leku referencyjnego nystatyny (Tabela 12). Wartość MIC wobec badanych szczepów wyniosła 7,8-1000 µg/ml. Ponownie najwyższą aktywnością w tej grupie związków charakteryzowała się pochodna **9**. Świadczy to o jej szerokim spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego. Ponadto umiarkowaną aktywność wykazał również związek **23** z wartością MIC 7,8 µg/ml wobec obu szczepów *C. albicans* oraz wartością MIC 15,6 µg/ml wobec pozostałych drożdży. Związek **24** nie wykazywał aktywności przeciwgrzybiczej wobec badanego panelu drożdży.

**Tabela 12.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych cykloalkiloaminotiosemi-karbazydowych wobec drożdży

Nr	9		12		13		14		15		16	
Szczep	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	7,8	7,8	31,3	62,5	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	31,3	>1000
<i>C. albicans</i> <sup>2</sup>	7,8	7,8	31,3	31,3	15,6	31,3	15,6	31,3	15,6	15,6	31,3	500
<i>C. parapsilosis</i>	7,8	7,8	31,3	250	15,6	31,3	15,6	15,6	15,6	>1000	31,3	>1000
<i>C. glabrata</i>	15,6	15,6	31,3	62,5	31,3	250	15,6	62,5	15,6	15,6	1000	>1000
<i>C. krusei</i>	15,6	15,6	15,6	31,3	31,3	62,5	31,3	62,5	15,6	1000	15,6	>1000
Nr	18		21		22		23		24		NYT	
Szczep	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	250	500	15,6	15,6	15,6	31,3	7,8	7,8	>1000	>1000	0,24	0,24
<i>C. albicans</i> <sup>2</sup>	250	250	15,6	15,6	62,5	31,3	7,8	7,8	>1000	>1000	0,48	0,48
<i>C. parapsilosis</i>	250	250	31,3	62,5	62,5	>1000	15,6	15,6	>1000	>1000	0,24	0,48
<i>C. glabrata</i>	250	1000	15,6	62,5	31,3	>1000	15,6	15,6	500	>1000	0,24	0,48
<i>C. krusei</i>	250	500	15,6	31,3	31,3	>1000	15,6	15,6	1000	>1000	0,24	0,24

MIC-minimalne stężenie hamujące, MFC-minimalne stężenie grzybobójcze, NYT-nystatyna

Kolejną grupą związków wybranych do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej były hydrazydowe analogi pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych **141**, **142**, **145-147**, **149**, **152-156**. Testowane związki cechowały się umiarkowaną bądź słabą aktywnością przeciwbakteryjną.

Wartości MIC wobec wybranego panelu bakterii G(+) wynosiły od 7,8 do 500 µg/ml (Tabela 13). Nie zaobserwowano wyraźnej zależności pomiędzy podstawnikami przy łańcuchu tiosemikarbazydowym lub pierścieniu pirydynowym a aktywnością przeciwbakteryjną.

Spośród testowanych związków wyróżniały się pochodne **147** i **156**. *N'*-(morfolino-4-karbonotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (**147**) hamował wzrost szczepów *S. aureus*<sup>1,3</sup> oraz *S. epidermidis* przy stężeniu 7,8 µg/ml, a więc około trzykrotnie niższym niż dla szczepów *M. tuberculosis*. Wartość MBC była co najmniej szesnastokrotnie wyższa niż wartość MIC, zatem związek ten nie wykazywał aktywności bakteriobójczej. 4-morfolino-*N'*-(4-fenylpiperazyno-1-karbonotioylo)pikolinohydrazyd (**156**) wykazał wartość MIC 7,8 µg/ml dla sześciu badanych szczepów bakteryjnych: *S. aureus*<sup>1,3</sup>, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis* oraz *B. cereus*. Związek ten wykazywał aktywność bakteriostatyczną, lecz pozbawiony był aktywności bakteriobójczej.

**Tabela 13.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hydrazydowych pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych wobec bakterii G(+)

Nr	141		142		145		146		147		149		152	
Szczep	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	15,6	250	31,3	>1000	250	>1000	15,6	>1000	7,8	500	31,3	>1000	15,6	250
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	31,3	>1000	31,3	>1000	250	>1000	15,6	>1000	15,6	1000	31,3	>1000	31,3	1000
<i>S. aureus</i> <sup>3</sup>	15,6	250	31,3	>1000	125	>1000	15,6	>1000	7,8	500	31,3	>1000	15,6	250
<i>S. epidermidis</i>	15,6	15,6	15,6	31,3	62,5	125	15,6	>1000	15,6	500	15,6	>1000	15,6	125
<i>M. luteus</i>	7,8	>1000	15,6	>1000	62,5	125	7,8	>1000	7,8	125	15,6	31,3	7,8	125
<i>B. subtilis</i>	15,6	31,3	15,6	31,3	62,5	250	15,6	31,3	15,6	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3
<i>B. cereus</i>	15,6	62,5	15,6	>1000	250	500	15,6	>1000	15,5	>1000	15,6	>1000	15,6	>1000
<i>S. pyogenes</i>	62,5	>1000	62,5	>1000	62,5	>1000	31,3	>1000	500	>1000	62,5	>1000	125	>1000
<i>S. pneumoniae</i>	62,5	>1000	62,5	>1000	250	>1000	62,5	>1000	125	>1000	62,5	>1000	250	>1000
<i>S. mutans</i>	62,5	>1000	31,3	>1000	62,5	>1000	31,3	>1000	125	>1000	31,3	>1000	125	>1000
Nr	153		154		155		156		CIP		VAN			
Szczep	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	62,5	>1000	31,3	>1000	250	>1000	7,8	>1000	0,49	0,49	0,98	7,81		
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	31,3	>1000	31,3	>1000	250	>1000	15,6	>1000	0,24	0,24	0,49	1,95		
<i>S. aureus</i> <sup>3</sup>	31,3	>1000	31,3	>1000	250	>1000	7,8	>1000	0,24	0,24	0,49	1,95		
<i>S. epidermidis</i>	31,3	>1000	15,6	1000	250	>1000	7,8	>1000	0,49	0,49	0,98	0,98		
<i>M. luteus</i>	15,6	>1000	15,6	1000	125	>1000	7,8	>1000	0,98	1,95	0,12	0,12		
<i>B. subtilis</i>	31,3	31,3	15,6	31,3	250	250	7,8	15,6	0,03	0,12	0,24	0,49		
<i>B. cereus</i>	31,3	>1000	31,3	>1000	250	>1000	7,8	>1000	0,12	0,12	0,98	15,6		
<i>S. pyogenes</i>	62,5	>1000	62,5	>1000	31,3	>1000	31,3	>1000			0,24	0,49		
<i>S. pneumoniae</i>	125	1000	125	>1000	62,5	>1000	31,3	>1000			0,24	0,49		
<i>S. mutans</i>	62,5	>1000	62,5	>1000	31,3	>1000	31,3	>1000			0,98	0,98		

MIC-minimalne stężenie hamujące, MBC-minimalne stężenie bakteriobójcze, CIP-ciprofloksacyna, VAN-wankomycyna

Pochodne hydrazydowe wykazywały niższą aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii G(+) niż ich analogi amidrazonowe. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku aktywności tuberkulostatycznej.

Wobec bakterii G(-) pochodne hydrazydowe wykazały różnorodną aktywność bakteriostatyczną od umiarkowanej do jej braku (Tabela 14). Żadna z badanych pochodnych nie wykazała właściwości bakteriobójczych. Najaktywniejszymi związkami, analogicznie jak w przypadku bakterii G(+), były pochodne **147** oraz **156**. Wartości MIC dla tych związków wynosiły od 31,3 do 250 µg/ml.

**Tabela 14.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hydrazydowych pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych wobec bakterii G(-)

Nr	141		142		145		146		147		149	
Szczep	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. typhimurium</i>	125	>1000	500	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	62,5	>1000	1000	>1000
<i>E. coli</i>	125	>1000	500	>1000	1000	>1000	1000	>1000	62,5	>1000	500	>1000
<i>P. mirabilis</i>	125	>1000	62,5	>1000	1000	>1000	62,5	>1000	15,6	>1000	125	>1000
<i>K. pneumoniae</i>	125	>1000	62,5	>1000	>1000	>1000	62,5	>1000	31,3	1000	125	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	250	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	250	>1000	125	>1000
Nr	152		153		154		155		156		CIP	
Szczep	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. typhimurium</i>	250	>1000	1000	>1000	1000	>1000	500	>1000	31,3	>1000	0,06	0,06
<i>E. coli</i>	125	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	62,5	>1000	0,004	0,008
<i>P. mirabilis</i>	31,3	>1000	1000	>1000	1000	>1000	500	>1000	31,3	>1000	0,03	0,03
<i>K. pneumoniae</i>	62,5	>1000	1000	>1000	1000	>1000	500	>1000	31,3	>1000	0,12	0,24
<i>P. aeruginosa</i>	500	>1000	1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	62,5	>1000	0,49	0,98

MIC-minimalne stężenie hamujące, MBC-minimalne stężenie bakteriobójcze, CIP-ciprofloksacyna

Badanie aktywności przeciwgrzybiczej również wykazało, niższą aktywność pochodnych hydrazydowych niż ich analogów amidrazonowych (Tabela 15). Wyjątkiem był związek **156**, który hamował wzrost wybranych drożdży w zakresie stężeń 7,8-15,6 µg/ml. Natomiast jego analog amidrazonowy (**24**) nie wykazywał aktywności przeciwgrzybiczej wobec badanych szczepów.

W związku z brakiem aktywności przeciwgruźliczej pochodnych triazolowych postanowiono sprawdzić ich aktywność pod kątem innych gatunków drobnoustrojów. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej zostało przeprowadzone dla związków **85**, **88** oraz **93-96**. W badaniu zastosowano taki sam panel szczepów jak dla wyżej omawianych związków. Testowane związki wykazały słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową lub jej brak wobec badanych szczepów. Stężenie hamujące wzrost było w zakresie 250->1000 µg/ml. Jedynie związek **94** wykazał wyróżniającą się inhibicję wzrostu wobec szczepu *M. luteus* z wartością MIC 15,6 µg/ml.



**Tabela 15.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hydrazydowych pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych wobec drożdzy

Nr	141		142		145		146		147		149	
Szczep	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	15,6	31,3	31,3	31,3	250	>1000	15,6	>1000	62,5	62,5	31,3	31,3
<i>C. albicans</i> <sup>2</sup>	15,6	31,3	31,3	31,3	250	>1000	15,6	>1000	62,5	125	31,3	250
<i>C. parapsilosis</i>	15,6	31,3	31,3	125	250	>1000	15,6	>1000	62,5	500	31,3	125
<i>C. glabrata</i>	15,6	1000	31,3	62,5	125	>1000	15,6	>1000	31,3	500	15,6	62,5
<i>C. krusei</i>	15,6	500	31,3	>1000	500	>1000	31,3	>1000	62,5	500	31,3	250
Nr	152		153		154		155		156		NYT	
Szczep	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	31,3	125	31,3	>1000	62,5	>1000	250	500	15,6	>1000	0,24	0,24
<i>C. albicans</i> <sup>2</sup>	31,3	500	31,3	>1000	62,5	>1000	250	500	7,8	>1000	0,48	0,48
<i>C. parapsilosis</i>	62,5	250	62,5	>1000	62,5	>1000	250	500	15,6	>1000	0,24	0,48
<i>C. glabrata</i>	31,5	500	31,3	>1000	62,5	>1000	125	>1000	15,6	>1000	0,24	0,48
<i>C. krusei</i>	31,5	500	62,5	>1000	125	>1000	250	>1000	15,6	>1000	0,24	0,24

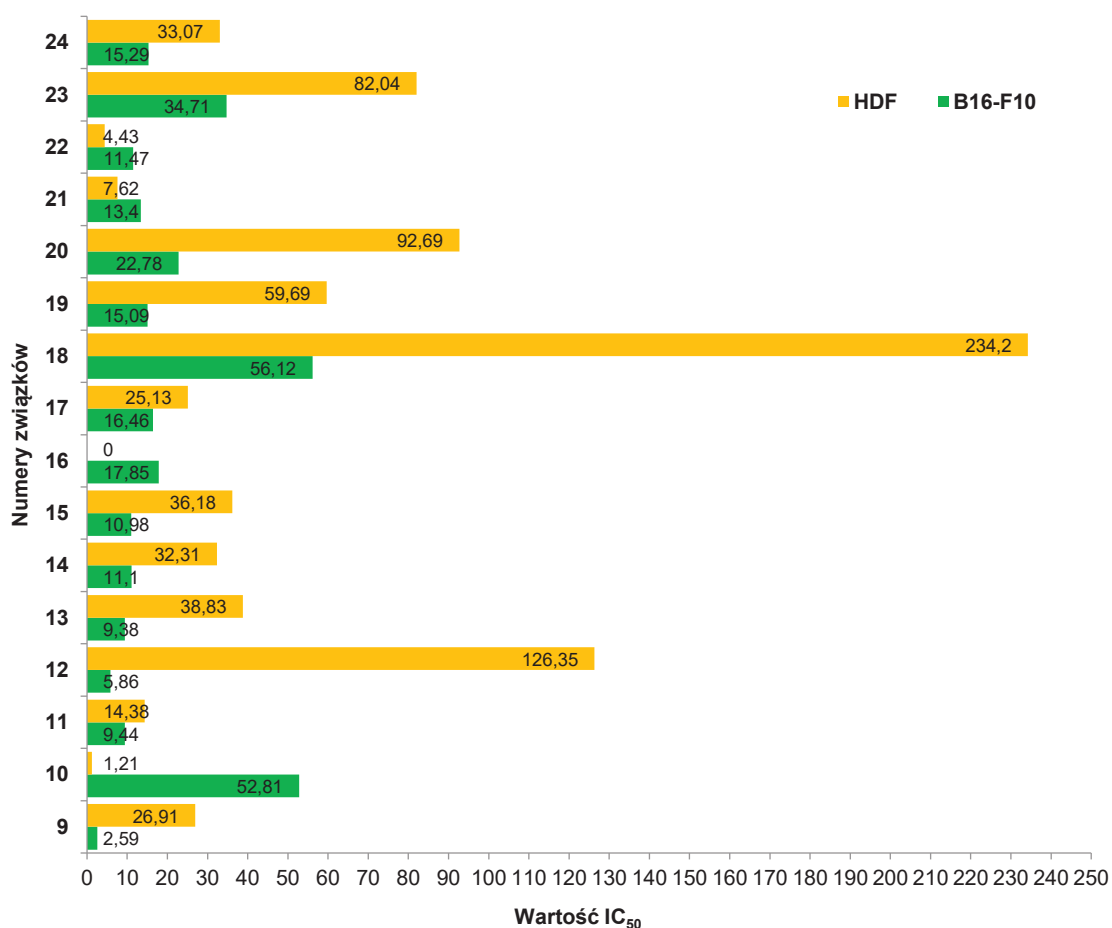
MIC-minimalne stężenie hamujące, MFC-minimalne stężenie grzybobójcze, NYT-nystatyna

#### 4.2.3 Aktywność cytotoksyczna pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych

Amidrazonowe pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe jako związki o najwyższej aktywności przeciwpłatkowej zostały wyselekcjonowane również do oceny ich aktywności cytotoksycznej. Badanie było prowadzone metodą MTT na dwóch liniach komórkowych: fibroblastach ludzkiego naskórka ATCC PCS-201-010 (HDF) oraz komórkach czerniaka mysiego ATCC CRL-6375 (B16-F10). Kultury HDF są atrakcyjnym modelem eksperymentalnym ze względu na ich łatwość pozyskania z biopsji skóry, intensywny wzrost oraz stabilność genetyczną przez 15-20 pasaży. Miarą aktywności cytotoksycznej jest wartość IC<sub>50</sub> (*ang.* Inhibitory concentration), a zatem stężenie badanego związku niezbędne do zahamowania proliferacji komórek w 50%.

Aktywność cytotoksyczna amidrazonowych pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych **9-24** została przebadana na dwóch liniach komórkowych B16-F10 oraz HDF (Rys. 59). Wartości IC<sub>50</sub> znalazły się w zakresie 1,21-234,20 µg/ml. Większość związków z badanej grupy wykazała silniejsze hamowanie wzrostu komórek nowotworowych niż komórek zdrowych. Jedynie pochodne **10**, **21** oraz **22** charakteryzowały się niższą wartością IC<sub>50</sub> wobec komórek fibroblastów niż wobec komórek czerniaka mysiego. Zdolność hamowania wzrostu *M. tuberculosis* w większości

przypadków była większa niż hamowanie wzrostu badanych komórek eukariotycznych. Związek **10** silniej hamował wzrost komórek HDF niż komórek bakteryjnych. Natomiast związek **12** wykazywał silniejszą inhibicję wzrostu komórek nowotworowych niż prątków gruźlicy. Wartość MIC badana wobec *M. tuberculosis* związków **21** i **22** była w obu przypadkach wyższa niż  $IC_{50}$  wyznaczone dla badanych linii komórkowych.



**Rys. 59** Aktywność cytotoksyczna pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych

Analizując aktywność biologiczną pochodnych **9**, **13**, **14**, **15** i **16** o najwyższej aktywności tuberkulostatycznej można stwierdzić, iż mają one dobry profil cytotoksyczny, gdyż wykazują one wyższą zdolność do hamowania wzrostu komórek nowotworowych niż zdrowych. Potwierdza to wskaźnik selektywności, będący ilorazem  $IC_{50}$  wyznaczonego dla fibroblastów ludzkiego naskórka i komórek linii czerniaka mysiego ( $IC_{50}$  HDF/ $IC_{50}$  B16-F10), którego wartość we wszystkich przypadkach była większa od 1 (Tabela 16). Ponadto wartość MIC dla *M. tuberculosis* jest znacząco niższa niż wartości  $IC_{50}$ . Najaktywniejsza pochodna **15** hamowała wzrost prątków 90,45 razy silniej niż wzrost komórek linii HDF. Obliczony wskaźnik selektywności definiowany

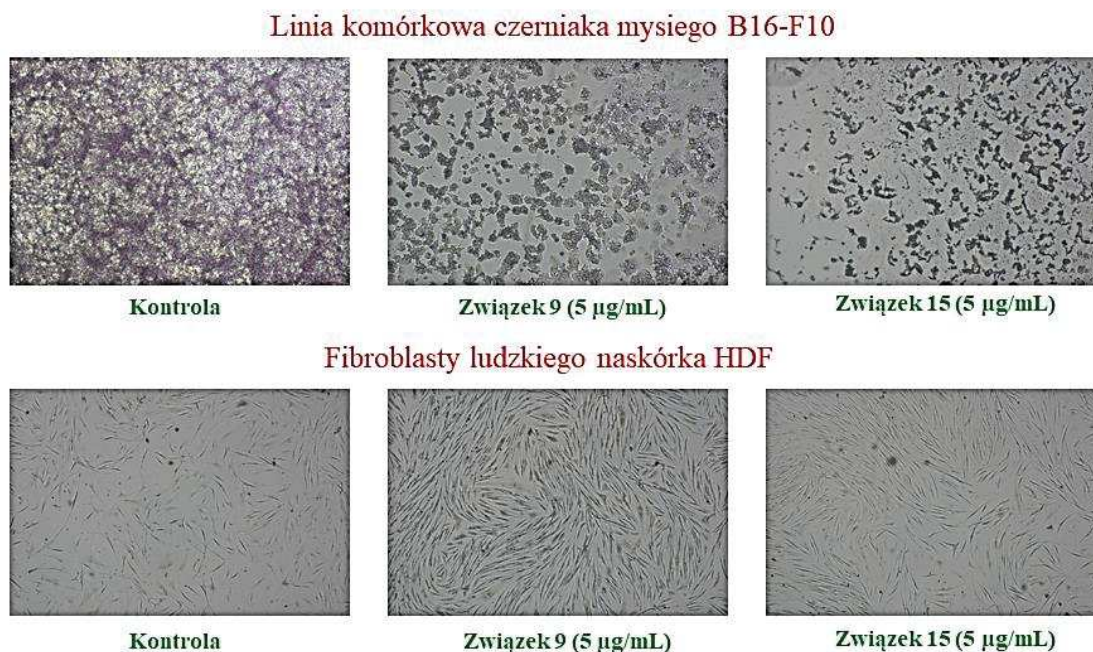
jako iloraz  $IC_{50}$  wyznaczonego dla fibroblastów ludzkiego naskórka i minimalnego stężenia hamującego wzrost prątków gruźlicy ( $IC_{50}$ -HDF/MIC-MT) dla omawianych związków jest w zakresie 12,52-90,45, co świadczy o ich niskiej cytotoksyczności, a w zasadzie jej braku. Wartość  $IC_{50}$  wobec linii fibroblastów dla związku **16** nie została wyznaczona ze względu na słabą aktywność antyproliferacyjną związku w badanych stężeniach.

**Tabela 16.** Współczynniki selektywności dla związków **9**, **13-15**

Nr	SI $IC_{50}$ -HDF/ $IC_{50}$ -B16-F10	SI' $IC_{50}$ -HDF/ MIC-MT
<b>9</b>	10,39	67,27
<b>13</b>	4,13	12,52
<b>14</b>	2,91	40,38
<b>15</b>	3,29	90,45

SI  $IC_{50}$ -HDF/ $IC_{50}$ -B16-F10-współczynnik selektywności będący ilorazem stężenia hamującego w 50% wzrost komórek fibroblastów ludzkiego naskórka i stężenia hamującego w 50% wzrost komórek linii czerniaka mysiego; SI'  $IC_{50}$ -HDF/MIC-MT-współczynnik selektywności będący ilorazem stężenia hamującego w 50% wzrost komórek fibroblastów ludzkiego naskórka i minimalnego stężenia hamującego wzrost prątków gruźlicy

W przypadku dwóch związków o najwyższej aktywności tuberkulostatycznej (**9**, **15**) testy cytotoksyczności zostały rozszerzone o badanie mikroskopowe (Rys. 60).



**Rys. 60** Poszerzone badania mikroskopowe dla związków **9** i **15**

Obserwacje pozwoliły dostrzec zmiany morfologiczne w obecności badanych związków w stężeniu 5 µg/ml. Na zdjęciu kontrolnym zaobserwowano trójwymiarowy i zwarty wzrost komórek czerniaka mysiego B16-F10. Po dodaniu związków **9** i **15** zaobserwowano silne zmiany morfologiczne. Trójwymiarowe struktury zniknęły, pozostały tylko komórki nekrotyczne. Związek **9** powodował zmiany morfologiczne również w fibroblastach ludzkiego naskórka HDF, podczas gdy w obecności pochodnej **15** takie zmiany nie wystąpiły.

Ze względu na stosunkowo wysokie stężenie hamujące proliferację komórek fibroblastów ludzkiego naskórka oraz brak zmian morfologicznych w tych komórkach, związek **15** o najwyższej aktywności przeciwpłatkowej, posiada dobry profil cytotoksyczny. Cechy te czynią go dobrym prekursorem do dalszych badań nad nowym lekiem przeciwgruźliczym.

## 5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 5.1. Synteza

Czystość otrzymanych związków potwierdzono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC. Do analizy użyto płytek wykonanych z żelu krzemionkowego 60F<sub>254</sub> firmy Fluka o grubości 0,2 mm. Stosowano jedno- oraz dwuskładnikowe fazy ruchome: chloroform, octan etylu, metanol, chloroform-octan etylu 1:1 (v/v), chloroform-octan etylu 1:5, chloroform-octan etylu 1:2. Do analizy stosowano rozpuszczalniki marki POCH oraz Chempur. W celu wizualizacji wykorzystano lampę UV o stałej długości fali  $\lambda=254$  nm i  $\lambda=365$  nm.

W celu potwierdzenia struktury wykorzystano metody spektroskopowe takie jak spektroskopia w podczerwieni, protonowy oraz węglowy magnetyczny rezonans jądrowy. Widma w podczerwieni wykonano na spektrofotometrze z transformacją Fouriera firmy Thermo Mattson Satellite. Badana substancja była wprowadzana do aparatu w postaci tabletki wykonanej z KBr. Pasma na widmach opisano za pomocą następujących symboli:  $\nu$ -drżania rozciągające,  $\nu_s$ -drżania rozciągające symetryczne,  $\nu_{as}$ -drżania rozciągające asymetryczne,  $\delta$ -drżania deformacyjne w płaszczyźnie,  $\gamma$ -drżania deformacyjne poza płaszczyznę. Widma <sup>1</sup>H NMR oraz <sup>13</sup>C NMR wykonano w CDCl<sub>3</sub> lub DMSO-*d*<sub>6</sub> na aparacie Varian Unity Plus przy częstotliwości 500 MHz. Widma opisano skrótami: s-singlet, d-dublet, t-triplet, k-kwartet, m-multiplet, dd-dublet dubletów, szs-szeroki singlet.

Ponadto, aby potwierdzić strukturę wykonano analizę elementarną (% C, H, N). Badanie wykonano na aparacie CHNS Perkin-Elmer PE 2400 Series II (Perkin-Elmer, Shelton, CT). Wyniki analizy mieściły się w zakresie  $\pm 0,4\%$  wartości teoretycznych.

Widmo temperaturowe zostało zarejestrowane za pomocą spektrometru NMR Bruker Avance II Plus 700 MHz wyposażonego w szerokopasmową sondę gradientową typu "inverse" z gradientem w osi Z. Próbkę zostały rozpuszczone w CDCl<sub>3</sub>.

Kryształy do analizy rentgenostrukturalnej uzyskano z roztworu metanolu lub mieszaniny metanol-DMF (1:1) poprzez powolne odparowywanie rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej. Pomiar rentgenowski został wykonany przy pomocy dyfraktometru monokrystalicznego firmy Rigaku XtaLAB Synergy-S wyposażonego w źródło promieniowania Cu K $\alpha$  (1,54178 Å). Udoskonalenie struktury kryształów przeprowadzono za pomocą programu SHELX.

Niektóre związki poddano procesowi oczyszczania za pomocą chromatografii kolumnowej. Fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy firmy Sigma Aldrich o rozmiarze ziaren 63-200  $\mu\text{m}$  i wielkości porów 60Å.

Aparat Stuart SMP 30 firmy Bibby Scientific wykorzystano do wyznaczenia temperatury topnienia otrzymanych związków. Uzyskane wyniki nie zostały skorygowane.

Pochodne cykloalkiloamino-1-karbotiohydrazydowe zostały otrzymane według syntezy opisanej przez Agrawala [147].

#### **5.1.1. Metoda ogólna syntezy 4-podstawionych pochodnych pikolinonitrylu 1-4**

40 mmoli (5,60 g) 4-chloropikolinonitrylu oraz 48 mmoli odpowiedniego odczynnika nukleofilowego rozpuszczono w 25 ml dioksanu, a następnie dodano 40 mmoli (6 ml) DBU. Mieszaninę utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Następnie odparowano część rozpuszczalnika i dodano lód. Wytrącony osad odsączono i suszono na powietrzu. Gotowy produkt oczyszczano przez krystalizację.

##### *4-Fenoksy-pikolinonitryl (1)*

Reakcja z fenolem (4,51 g). Wydajność: 88%; t.t. 90-92°C (cykloheksan); IR (KBr): 3086, 3060 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2234 ( $\nu$  C $\equiv$ N); 1647 ( $\nu$  C=N); 1580, 1489, 1413 ( $\nu$  C=C); 1279, 1206 ( $\delta$  C-H) 957, 849, 781, 697 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,15 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,23 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,34 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,51 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,67 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 8,57 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O (196,06) wartości obliczone: C, 73,46; H, 4,11; N, 14,28; wartości zmierzone: C, 73,14; H, 4,07; N, 14,16.

##### *4-Fenylotio-pikolinonitryl (2)*

Reakcja z tiofenolem (4,91 ml). Wydajność: 98%; t.t. 51-53°C (cykloheksan); IR (KBr): 3047 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2234 ( $\nu$  C $\equiv$ N); 1647 ( $\nu$  C=N); 1570, 1437 ( $\nu$  C=C); 835, 759, 691 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,19 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,54-7,63 (m, 5H, ArH); 7,68 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,47 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>S (212,04) wartości obliczone: C, 67,90; H, 3,80; N, 13,20; wartości zmierzone: C, 67,73; H, 3,79; N, 13,02.

##### *4-Pirolidynopikolinonitryl (3)*

Reakcja z pirolidyną (4 ml). Wydajność: 90%; t.t. 132–133°C (metanol); IR (KBr): 2979-2856 ( $\nu$  C-H); 2230 ( $\nu$  C $\equiv$ N); 1602, 1530 ( $\nu$  C=C); 1290, 1235, 1212, 1116 ( $\delta$  C-H); 850, 829 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,95-1,97 (m, 4H, CH $_2$ ); 3,28-3,30 (m, 4H, CH $_2$ ); 6,65 (d, 1H, pirydyna,  $J=4$  Hz); 7,05 (s, 1H, pirydyna); 8,15 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla C $_{10}$ H $_{11}$ N $_3$  (173,10) wartości obliczone: C, 69,34; H, 6,40; N, 24,26; wartości zmierzone: C, 68,98; H, 6,38; N, 23,99.

#### *4-Morfolinopikolinonitryl (4)*

Reakcja z morfoliną (4,18 ml). Wydajność: 89%, t.t. 206-208°C (metanol); IR (KBr): 3055 ( $\nu$  C $_{\text{Ar}}$ -H); 2975, 2855 ( $\nu$  C-H); 2234 ( $\nu$  C $\equiv$ N); 1597 ( $\nu$  C=C); 1258, 1116 ( $\delta$  C-H); 990 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,36 (t, 4H, CH $_2$ ,  $J=5$  Hz); 3,68 (t, 4H, CH $_2$ ,  $J=5$  Hz); 7,05 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,47 (d, 1H, pirydyna,  $J=7$  Hz); 8,24 (d, 1H, pirydyna,  $J=7$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla C $_{10}$ H $_{11}$ N $_3$ O (189,09) wartości obliczone: C, 63,48; H, 5,86; N, 22,21; wartości zmierzone: C, 63,39; H, 5,80; N, 22,17.

### **5.1.2. Metoda syntezy pochodnych cykloalkiloamino- $\alpha$ -karbonylowych 9-24**

#### **Metoda A**

Do roztworu odpowiedniego nitrylu (2 mmol) w metanolu (15 ml) dodano DBU (2,7 mmol, 0,4 ml). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4 h. Po tym czasie dodano 2 mmole odpowiedniego cykloalkiloamino-1-karbotiohydrazidu i kontynuowano ogrzewanie w temperaturze wrzenia przez 15-60 min. Następnie mieszaninę wylano na 40 g lodu i zakwaszono kwasem octowym. Otrzymany osad odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### **Metoda B**

Do roztworu nitrylu (2 mmol) w metanolu (15 ml) dodano DBU (2,7 mmol, 0,4 ml), a następnie mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4 h. Po tym czasie dodano 2 mmole odpowiedniego cykloalkiloamino-1-karbotiohydrazidu i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 15-60 min. Po ochłodzeniu osad odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

### Metoda C

Do 5 ml metanolu dodano 2 mmole metalicznego sodu. Po całkowitym przereagowaniu sodu dodano 2 mmole nitrylu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 12 h. Po tym czasie dodano 2 mmole odpowiedniego cykloalkiloamino-1-karbotiohydrazidu i kontynuowano ogrzewanie w temperaturze wrzenia przez 15 min. Następnie mieszaninę wylano na 40 g lodu i zakwaszono kwasem octowym. Otrzymany osad odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

### Metoda D

Do 5 ml metanolu dodano 2 mmole (0,046 g) metalicznego sodu. Po całkowitym przereagowaniu sodu dodano 2 mmole nitrylu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 12 h. Po tym czasie dodano 2 mmole odpowiedniego cykloalkiloamino-1-karbotiohydrazidu i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 15 min. Po ochłodzeniu osad odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### *4-Fenoksy-N'-(pirolidyn-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (9)*

Reakcja 4-fenoksypikolinonitrylu **1** (0,392 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g) (Metoda A). Czas reakcji: 15 min. Wydajność: 54%, t.t. 99-101°C (etanol); IR (KBr): 3420 ( $\nu$  N-H); 2965, 2868 ( $\nu$  C-H); 1581 ( $\delta$  N-H); 1432 ( $\delta$  C-H); 1232 ( $\nu$  C-N)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,72-1,81 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,53-3,54 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,75 (s, 1H, NH); 7,07 (d, 1H, pirydyna; J=3 Hz); 7,19-7,34 (m, 3H, ArH); 7,50 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,82 (s, 1H, pirydyna); 8,44 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,34 (s, 1H, NH); 12,57 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>OS (341,13): wartości obliczone: C, 59,80; H, 5,61; N, 20,51; wartości zmierzone: C, 59,73; H, 5,41; N, 20,83.

#### *4-Fenylotio-N'-(pirolidyn-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (10)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinonitrylu **2** (0,424 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30 min. Wydajność 40%; t.t. 160-162 °C (etanol); IR (KBr): 3417, 3228, 3130 ( $\nu$  N-H); 3018( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2961, 2863 ( $\nu$  C-H); 1665 ( $\nu$  C=N); 1570 ( $\delta$  N-H); 1422 ( $\delta$  C-H); 1277 ( $\nu$  C-N)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,75-1,77 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,42-3,54 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,73 (s, 2H, NH<sub>2</sub>);



7,42 (s, 1H, pirydyna); 7,55-7,61 (m, 5H, ArH); 8,34 (d, 1H, pirydyna, J=5Hz); 9,24 (s, 1H, pirydyna); 12,52 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 115,83, 121,49, 128,54, 130,64 (2C), 130,76 (3C), 130,89, 135,27, 135,76 (2C), 148,31 (2C), 150,61, 151,40, 177,81 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (357,11) wartości obliczone: C, 57,11; H, 5,36; N, 19,59; wartości zmierzone: C, 57,17; H, 5,12; N, 19,29.

#### *4-(Pirolidyn-1-ylo)-N'-(pirolidyn-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (11)*

Reakcja 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (0,346 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g) (Metoda B). Wydajność: 36%; t.t. 229-230°C (etanol); IR (KBr): 3446, 3287, 3114 (ν N-H); 3021 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2966, 2866 (ν C-H); 1669 (ν C=N); 1608 (δ N-H); 1427 (δ C-H); 1287 (ν C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,81-1,98 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 3,32-3,54 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 6,55-6,57 (m, 1H, pirydyna); 7,08 (s, 1H, NH); 7,23 (s, 1H, pirydyna); 8,17 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,40 (s, 1H, NH); 12,41 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>S (318,16) wartości obliczone: C, 56,58; H, 6,96; N, 26,39; wartości zmierzone: C, 56,68; H, 6,73; N, 26,14.

#### *4-Morfolino-N'-(pirolidyn-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (12)*

Reakcja 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (0,378 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g) (Metoda C). Wydajność: 57%; t.t. 228-230°C (metanol); IR (KBr): 3390 (ν N-H); 3059 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2964, 2858 (ν C-H); 1663 (ν C=N); 1602, 1579 (δ N-H); 1426 (δ C-H); 1234 (ν C-N); 1123 (ν C-O-C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,81 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 3,39-3,40 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,55-3,57 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,72 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 6,94 (t, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,20 (s, 1H, NH); 7,55 (s, 1H, pirydyna); 8,27 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,40 (s, 1H, NH); 12,45 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>OS (334,16) wartości obliczone: C, 53,87; H, 6,63; N, 25,13; wartości zmierzone: C, 54,02; H, 6,52; N, 24,99.

#### *4-Fenoksy-N'-(morfolino-4-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (13)*

Reakcja 4-fenoksypikolinonitrylu **1** (0,392 g) z morfolino-1-karbotiohydrazidem (0,322 g) (Metoda A). Wydajność: 62%; t.t. 159-160°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3419 (ν N-H), 2922, 2852 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1580 (δ N-H), 1463, 1417 (δ C-H), 1238 (ν C-N), 1112 (ν C-O-C) ) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,56-3,58 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,81-3,85 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,01 (s, 1H, NH); 7,23-7,25 (m, 2H, ArH+pirydyna); 7,33 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,51 (t, 3H, ArH, J=7Hz); 7,86 (s, 1H,

pirydyna); 8,60-8,61 (m, 2H, pirydyna+NH); 12,60 (s, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  47,17 (2C), 66,69 (2C), 110,96, 113,99, 121,11, 121,40, 126,39, 131,06 (2C), 144,76, 146,60, 152,18, 153,78, 16,02; 179,32 ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$  (357,13) wartości obliczone: C, 57,12; H, 5,36; N, 19,59; wartości zmierzone: C, 57,13; H, 5,02; N, 19,28.

#### *4-Fenylotio-N'-(morfolino-4-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (14)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinonitrylu **2** (0,424 g) z morfolino-1-karbotiohydrazidem (0,322 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 41%; t.t. 74-76°C (etanol); IR (KBr): 3422 ( $\nu$  N-H); 3052 ( $\nu$   $\text{C}_{\text{Ar}}$ -H); 2923, 2852 ( $\nu$  C-H); 1575 ( $\delta$  N-H); 1439, 1416 ( $\delta$  C-H); 1112 ( $\nu$  C-O-C)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,55-3,80 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ); 6,95 (s, 1H, pirydyna); 7,55-7,63 (m, 6H, 5 $\text{ArH}$ +NH); 8,04 (s, 1H, pirydyna); 8,49 (d, 1H, pirydyna,  $J=5\text{Hz}$ ); 8,60 (s, 1H, NH); 12,56 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{OS}_2$  (373,10) wartości obliczone: C, 54,67; H, 5,13; N, 18,75; wartości zmierzone: C, 54,72; H, 5,03; N, 18,75.

#### *N'-(Morfolino-4-karbotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (15)*

Reakcja 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (0,346 g) z morfolino-1-karbotiohydrazidem (0,322 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 64%; t.t. 208-210°C (metanol); IR (KBr): 3399, 3157 ( $\nu$  N-H); 2923, 2852 ( $\nu$  C-H); 1672 ( $\nu$  C=N); 1599 ( $\delta$  N-H); 1459, 1418 ( $\delta$  C-H); 1256 ( $\nu$  C-N); 1111 ( $\nu$  C-O-C)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,95 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6\text{ Hz}$ ); 3,32-3,33 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,56 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6\text{ Hz}$ ); 3,78 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5\text{ Hz}$ ); 6,57-6,58 (m, 1H, pirydyna); 7,25 (d, 1H, pirydyna,  $J=2\text{ Hz}$ ); 7,54 (s, 1H, NH); 8,18 (d, 1H, pirydyna,  $J=6\text{ Hz}$ ); 8,56 (s, 1H, NH); 12,44 (s, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25,27 (2C), 47,18 (2C), 47,59 (2C), 66,72 (2C), 105,33, 108,84, 144,20, 146,27, 149,47, 152,63, 178,85 ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{OS}$  (334,16) wartości obliczone: C, 53,87; H, 6,63; N, 25,13; wartości zmierzone: C, 54,10; H, 6,56; N, 24,78.

#### *N'-(Morfolino-karbotioylo)-4-morfolinopikolinohydrazonamid (16)*

Reakcja 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (0,378 g) z morfolino-1-karbotiohydrazidem (0,322 g) (Metoda D). Wydajność: 52%; t.t. 223-224°C (metanol); IR (KBr): 3397, 3234 ( $\nu$  N-H); 3088 ( $\nu$   $\text{C}_{\text{Ar}}$ -H); 2960-2853 ( $\nu$  C-H); 1662 ( $\nu$  C=N); 1605 ( $\delta$  N-H); 1412 ( $\delta$  C-H); 1244 ( $\nu$  C-N); 1124 ( $\nu$  C-O-C)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-

$d_6$ ):  $\delta$  3,40 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,56 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4Hz); 3,73 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,79 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 6,98 (s, 1H, pirydyna); 7,58 (s, 2H, pirydyna+NH); 8,29 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,54 (s, 1H, NH); 12,48 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  46,09 (2C), 47,17 (2C), 66,05 (2C), 66,71 (2C), 106,06, 109,87, 144,82, 145,92, 150,28, 156,17, 178,97 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S (350,15) wartości obliczone: C, 51,41; H, 6,33; N, 23,98; wartości zmierzone: C, 51,46; H, 6,14; N, 23,90.

*4-Fenoksy-N'-(piperydino-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (17)*

Reakcja 4-fenoksypikolinonitrylu **1** (0,392 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,318 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30min. Wydajność: 46%; t.t. 74-75°C (etanol); IR (KBr): 3393, 3276, 3144 ( $\nu$  N-H); 3050 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2971, 2924 ( $\nu$  C-H); 1671 ( $\nu$  C=N); 1576 ( $\delta$  N-H); 1471 ( $\delta$  C-H); 1233 ( $\nu$  C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,21-1,57 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 3,40-3,83 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,81 (s, 1H, NH); 6,99 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 7,13-7,53 (m, 5H, ArH); 7,84 (s, 1H, pirydyna) 8,59 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,21 (s, 1H, NH); 12,79 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>OS (355,15) wartości obliczone: C, 60,82; H, 5,95; N, 19,70; wartości zmierzone: C, 60,76; H, 5,70; N, 19,32.

*4-Fenylotio-N'-(piperydino-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (18)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinonitrylu **2** (0,424 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,318 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 67%; t.t. 150-152°C (etanol); IR (KBr): 3412, 3269, 3134 ( $\nu$  N-H); 3031 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2920, 2848 ( $\nu$  C-H); 1668 ( $\nu$  C=N); 1572 ( $\delta$  N-H); 1473 ( $\delta$  C-H); 1245 ( $\nu$  C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,36-1,56 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 3,59-3,82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,77 (s, 1H, NH); 6,93 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,51-7,62 (m, 5H, ArH); 8,02 (s, 1H, pirydyna); 8,48 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,17 (s, 1H, NH); 12,67 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25,28, 26,15 (2C), 47,36 (2C), 118,67, 122,36, 128,41, 130,73, 130,89 (2C), 135,30, 135,59, 143,71, 144,74, 150,30, 152,31, 178,81 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (371,12) wartości obliczone: C, 58,19; H, 5,70; N, 18,85; wartości zmierzone: C, 57,87; H, 5,58; N, 18,55.

*N'-(Piperydino-1-karbotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (19)*

Reakcja 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (0,346 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,318 g) (Metoda B). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 47%; t.t. 198-200°C (etanol); IR (KBr): 3377, 3259, 3135 ( $\nu$  N-H); 3025 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2926, 2850 ( $\nu$  C-H); 1611, 1585 ( $\delta$  N-H); 1421 ( $\delta$  C-H); 1244 ( $\nu$  C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,44-1,57 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 1,91-1,98 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,29-3,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,80-3,88 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,54-6,56 (m, 1H, pirydyna); 7,23 (s, 1H, pirydyna); 7,38 (s, 1H, NH); 8,17 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,35 (s, 1H, NH); 12,56 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  25,27 (4C), 25,33, 26,13 (2C), 47,33, 47,58, 105,17, 108,65, 144,42, 145,28, 149,46, 152,63, 178,36 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>S (332,18) wartości obliczone: C, 57,80; H, 7,28; N, 25,28; wartości zmierzone: C, 57,45; H, 7,29; N, 24,96.

*4-Morfolino-N'-(piperydino-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (20)*

Reakcja 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (0,378 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,318 g) (Metoda C). Wydajność: 61%; t.t. 208-210°C (etanol); IR (KBr): 3399 ( $\nu$  N-H); 3069 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2922, 2852 ( $\nu$  C-H); 1666 ( $\nu$  C=N); 1605 ( $\delta$  N-H); 1427 ( $\delta$  C-H); 1242 ( $\nu$  C-N); 1111 ( $\nu$  C-O-C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,44-1,57 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 3,31-3,40 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,73-3,82 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 6,95 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,40 (s, 1H, NH); 7,56 (s, 1H, pirydyna); 8,28 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,40 (s, 1H, NH); 12,60 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>OS (348,17) wartości obliczone: C, 55,15; H, 6,94; N, 24,12; wartości zmierzone: C, 55,34; H, 6,67; N, 23,78.

*4-Fenoksy-N'-(4-fenylopiperazyno-1-karbotioylo)pikolinohydrazonamid (21)*

Reakcja 4-fenoksypikolinonitrylu **1** (0,392 g) z 4-fenylopiperazyno-1-karbotiohydrazidem (0,472 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 96%; t.t. 147-150°C (etanol-woda 1:1); IR (KBr): 3410 ( $\nu$  N-H); 3056 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2926 ( $\nu$  C-H); 1645, 1581 ( $\delta$  N-H); 1448, 1462 ( $\delta$  C-H); 1225 ( $\nu$  C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3,11-3,13 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,97-3,99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,78-7,02 (m, 5H, 3ArH+NH<sub>2</sub>); 7,20-7,34 (m, 6H, 5ArH+pirydyna); 7,50-7,51 (m, 2H, ArH); 7,87 (s, 1H, pirydyna); 8,60 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 12,65 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  46,30 (2C), 49,01 (2C), 110,95, 113,99, 116,22 (2C), 119,51, 121,11 (2C),

126,38, 129,41 (2C), 131,06 (2C), 144,64, 146,64, 151,68, 152,18, 153,79, 166,02, 179,09 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O (432,17) wartości obliczone: C, 63,87; H, 5,59; N, 19,43; wartości zmierzone: C, 63,66; H, 5,62; N, 19,44.

*N'-(4-Fenylopipezazyno-1-karbotioylo)-4-fenylopipezazolinohydrazonamid (22)*

Reakcja 4-fenylopipezazolinonitrylu **2** (0,424 g) z 4-fenylopipezazyno-1-karbotiohydrazidem (0,472 g) (Metoda A). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 95%; t.t. 164-166°C (metanol); IR (KBr): 3413, 3232 (ν N-H); 3034 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2926 (ν C-H); 1598, 1572 (δ N-H); 1225 (ν C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,10-3,12 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,98-4,00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,78-6,81 (m, 1H, ArH); 6,95-6,97 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,21 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,56-7,64 (m, 5H, ArH); 8,06 (s, 1H, pirydyna); 8,38 (s, 1H, NH); 8,51 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,50 (s, 1H, NH); 12,56 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (448,15) wartości obliczone: C, 61,58; H, 5,39; N, 18,73; wartości zmierzone: C, 61,24; H, 5,33; N, 18,54.

*N'-(4-Fenylopipezazyno-1-karbotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pipezazolinohydrazonamid (23)*

Reakcja 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (0,346 g) z 4-fenylopipezazyno-1-karbotiohydrazidem (0,472 g) (Metoda B). Czas reakcji: 30 min. Wydajność: 72%; t.t. 200-202°C (etanol); IR (KBr): 3419, 3296 (ν N-H); 3081 (ν C-H); 2960, 2854 (ν C-H); 1646 (ν C=N); 1602 (δ N-H); 1420 (δ C-H); 1222 (ν C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,97-1,98 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,48-2,49 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,33-3,35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,97-3,99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,57 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 6,78 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 6,96-6,97 (m, 2H, ArH); 7,21 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,27 (s, 1H, pirydyna); 7,60 (s, 1H, NH); 8,19 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,58 (s, 1H, NH); 12,47 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 46,10 (2C), 46,29 (2C), 49,01 (2C), 66,06 (2C), 106,06, 109,85, 116,22 (2C), 119,50, 129,41 (2C), 144,87, 145,80, 150,28, 151,70, 156,17, 178,73 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>S (409,20) wartości obliczone: C, 61,59; H, 6,64; N, 23,94; wartości zmierzone: C, 61,30; H, 6,70; N, 23,66.

*4-Morfolino-N'-(4-fenylopipezazyno-1-karbotioylo)pipezazolinohydrazonamid (24)*

Reakcja 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (0,378 g) z 4-fenylopipezazyno-1-karbotiohydrazidem (0,472 g) (Metoda C). Wydajność: 71%; t.t. 143-145°C (metanol); IR (KBr): 3424, 3299, 3161 (ν N-H); 3051 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2957, 2846 (ν C-H); 1676 (ν C=N); 1595 (δ N-H); 1426 (δ C-H); 1225 (ν C-N); 1113 (ν C-O-C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,11 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,41 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,73 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,97 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 6,78 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 6,96-6,97 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,22 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,59-7,61 (m, 2H, pirydyna+NH); 8,30 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,54 (s, 1H, NH); 12,51 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>OS (425,20) wartości obliczone: C, 59,27; H, 6,40; N, 23,04; wartości zmierzone: C, 59,18; H, 6,30; N, 23,06.

### 5.1.3. Metoda ogólna syntezy amidrazonów 25-28

Do roztworu nityrylu (10 mmol) w metanolu (75 ml) dodano DBU (13,5 mmol, 2 ml). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4 h. Po tym czasie część rozpuszczalnika odparowano, a następnie dodano 80% roztwór hydratu hydrazyny (31,7 mmol, 1 ml). Roztwór ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 15 min. W kolejnym kroku mieszaninę ochłodzono i dodano eter dietylowy (5 ml). Osad produktu odsączono, wysuszono i rekrystalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### *4-Fenoksypikolinohydrazonamid (25)*

Reakcja z 4-fenoksypikolinonitrylu **1** (1,96 g). Wydajność: 53%; t.t. 104-106°C (metanol); IR (KBr): 3461, 3330, 3201 (ν N-H); 3044 (ν C<sub>Ar</sub>H); 1582, 1566 (δ N-H); 1485, 1437 (ν C=C); 1296, 1234, 1203 (δ C-H); 936, 875, 834 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 5,28 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,69 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,96 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 7,16-7,31 (m, 4H, 3ArH+pirydyna); 7,48 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 8,37 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O (228,10) wartości obliczone: C, 63,15; H, 5,30; N, 24,55; wartości zmierzone: C, 63,41; H, 5,33; N, 24,49.

#### *4-Fenylopiotropikolinohydrazonamid (26)*

Reakcja z 4-fenylopiotropikolinonitrylu **2** (2,12 g). Wydajność: 65%; t.t. 101-103°C (metanol); IR (KBr): 3445, 3351 (ν N-H); 3072, 3051 (ν C<sub>Ar</sub>H); 1574 (δ N-H); 1469, 1439 (ν C=C); 750, 689 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6,46 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,17 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,50-7,58 (m, 4H, 2ArH+NH<sub>2</sub>); 7,61-7,63 (m, 3H, ArH); 7,73 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,40 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 117,27; 121,94; 128,75; 130,57; 130,75 (2C); 130,89; 135,59; 135,66 (2C); 148,72; 150,53 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>S (244,08) wartości obliczone: C, 58,99; H, 4,95; N, 22,93; wartości zmierzone: C, 59,04; H, 4,93; N, 22,81.

#### *4-(Pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (27)*

Reakcja z 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (1,73 g). Wydajność: 68%; t.t. 163-164°C (metanol); IR (KBr): 3393, 3309 ( $\nu$  N-H); 2966, 2856 ( $\nu$  C-H); 1601 ( $\delta$  N-H); 1498 ( $\nu$  C=C);  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,93-1,95 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,24 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz); 5,12 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,64 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,42 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,00 (s, 1H, pirydyna); 8,03 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm;  $\delta$  Analiza elementarna dla C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub> (205,13) wartości obliczone: C, 58,51; H, 7,37; N, 34,12; wartości zmierzone: C, 58,85; H, 7,34; N, 34,06.

#### *4-Morfolinopikolinohydrazonamid (28)*

Reakcja z 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (1,89 g). Wydajność: 98%; t.t. 161-162°C (metanol); IR (KBr): 3380, 3304 ( $\nu$  N-H); 2961, 2852 ( $\nu$  C-H); 1596, 1540 ( $\delta$  N-H); 1448, 1378 ( $\nu$  C=C); 1247, 1122 ( $\delta$  C-H); 990, 867 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,93 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 3,24 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 5,10 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,42 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz); 6,98 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,18 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O (221,13) wartości obliczone: C, 54,28; H, 6,83; N, 31,65; wartości zmierzone: C, 54,24; H, 6,81; N, 31,66.

#### **5.1.4. Metoda ogólna syntezy metyloamidrazonów 29-32**

Do roztworu nitrylu (10 mmol) w metanolu (75 ml) dodano DBU (13,5 mmol, 2 ml). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4 h. Po tym czasie część rozpuszczalnika odparowano, a następnie dodano metylohydrazynę (20 mmol, 1,06 ml). Roztwór ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 15 min. W kolejnym kroku mieszaninę ochłodzono i dodano eter dietylowy (5 ml). Osad produktu odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika, bądź oczyszczano na kolumnie chromatograficznej.

#### *4-Fenoksy-N'-metylo-pikolinohydrazonamid (29)*

Reakcja z 4-fenoksypikolinonitrylu **1** (1,96 g). Wydajność: 13%; t.t. 51-53°C (faza ruchoma octan etylu-chloroform 1:1); IR (KBr): 3437, 3328 ( $\nu$  N-H); 3064, 3015 ( $\nu$  C-H<sub>ArH</sub>, 1582 ( $\delta$  N-H); 1560, 1489, 1442 ( $\nu$  C=C); 1289 ( $\nu$  C-O-C); 939, 792, 694 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 5,70 (szs, 1H, NH); 6,62 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,18-7,42 (m, 4H, 3ArH+pirydyna); 7,48-7,55 (m, 3H, 2ArH+pirydyna);

8,60 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O (242,12) wartości obliczone: C, 64,45; H, 5,82; N, 23,13; wartości zmierzone: C, 64,15; H, 5,70; N, 23,07.

*4-Fenylotio-N'-metylo-pikolinohydrazonamid (30)*

Reakcja z 4-fenylotiopikolinonitrylu **2** (2,12 g). Wydajność: 56%; t.t. 66-67°C (faza ruchoma octan etylu-chloroform 1:2); IR (KBr): 3442, 3236 (ν N-H); 2943, 2862 (ν C-H); 1642 (ν C=N); 1574, 1535 (δ N-H); 1346 (δ C-H); 745, 690 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 5,01 (szs, 1H, NH); 5,67 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,92 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,52-7,59 (m, 4H, ArH+pirydyna); 7,62-7,64 (m, 2H, ArH); 8,28 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>S (258,09) wartości obliczone: C, 60,44; H, 5,46; N, 21,69; wartości zmierzone: C, 60,42; H, 5,40; N, 21,71.

*N'-Metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (31)*

Reakcja z 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (1,73 g). Wydajność: 73%; t.t. 109-110°C (metanol); IR (KBr): 3380, 3217 (ν N-H); 2961, 2857 (ν C-H); 1599 (δ N-H); 1388, 1007 (δ C-H); 809 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,94 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz); 2,76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,25 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 5,12 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,63 (s, 1H, NH); 6,40 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 6,98 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,00 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm. Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub> (219,15) wartości obliczone: C, 60,25; H, 7,81; N, 31,94; wartości zmierzone: C, 60,23; H, 7,80; N, 31,89.

*N'-Metylo-4-morfolinopikolinohydrazonamid (32)*

Reakcja z 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (1,89 g). Wydajność: 75%; t.t. 105-106°C (faza ruchoma octan etylu-chloroform 2:1); IR (KBr): 3459, 3385, 3220 (ν N-H); 2973, 2872 (ν C-H); 1591 (δ N-H); 1445 (ν C=C); 1251, 1120 (δ C-H); 989, 962 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,19-3,21 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,70-3,73 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 5,13 (szs, 1H, NH); 5,68 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,95-6,97 (m, 1H pirydyna,); 7,01 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 8,10 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm. Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O (235,14) wartości obliczone: C, 56,15; H, 7,28; N, 29,77; wartości zmierzone: C, 56,09; H, 7,22; N, 29,68.



### 5.1.5. Metoda ogólna otrzymywania pochodnych tiosemikarbazydowych 33-64

Amidrazon lub metyloamidrazon (1 mmol) rozpuszczono w 5 ml dioksanu, a następnie dodano odpowiedni izotiocyanian (1,1 mmol). Mieszaninę utrzymywano w temperaturze wrzenia od 2 do 25 min. Po zakończeniu ogrzewania mieszaninę ochłodzono i dodano eteru dietylowego. Produkt w postaci osadu odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### *2-[Amino-(4-fenoksyperydyn-2-ylo)metyleno]-N-etylohydrazynokarbotioamid (33)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 8 min. Wydajność: 59%; t.t. 160-161°C (etanol); IR (KBr): 3457, 3431, 3349, 3143 ( $\nu$  N-H); 2970, 2927 ( $\nu$  C-H); 1583, 1536 ( $\delta$  N-H); 1449 ( $\delta$  C-H); 1231 ( $\nu$  C-N); 698 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,11 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 3,52-3,57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,78 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz); 6,90 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,17-7,19 (m, 2H, ArH); 7,28 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,48 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,14 (s, 1H, pirydyna); 8,25 (s, 1H, NH); 8,39 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,97 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>OS (315,12) wartości obliczone: C, 57,12; H, 5,43; N, 22,21; wartości zmierzone: C, 56,85; H, 5,34; N, 22,06.

#### *2-[Amino-(4-fenylopiropydyn-2-ylo)metyleno]-N-etylohydrazynokarbotioamid (34)*

Reakcja 4-fenylopiropikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 6 min. Wydajność: 72%; t.t. 167-168°C (etanol); IR (KBr): 3431, 3363, 3323, 3175 ( $\nu$  N-H); 2970 ( $\nu$  C-H); 1644 ( $\nu$  C=N); 1573 ( $\delta$  N-H); 1529 ( $\nu$  C=C); 1235 ( $\nu$  C-N); 758 ( $\delta$  C<sub>Ar</sub>-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,12 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 3,54-3,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,87 (s, 3H, NH<sub>2</sub>+pirydyna); 7,53-7,54 (m, 3H, ArH); 7,61 (t, 2H, ArH, J=3 Hz); 8,04 (t, 1H, NH, J=5 Hz); 8,12 (s, 1H, pirydyna); 8,31 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,98 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (331,09) wartości obliczone: C, 54,36; H, 5,17; N, 21,13; wartości zmierzone: C, 54,71; H, 5,06; N, 20,79.

#### *2-{Amino-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-etylohydrazynokarbotioamid (35)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)piropikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 5 min. Wydajność: 41%; t.t. 216-217°C

(etanol); IR (KBr): 3381, 3287, 3233, 3172 ( $\nu$  N-H); 2967, 2857 ( $\nu$  C-H); 1601 ( $\delta$  N-H); 1531, 1501 ( $\nu$  C=C); 1240 ( $\nu$  C-N)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,38 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 1,94 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 3,30-3,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,54-3,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,48 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 6,82 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,26 (s, 1H, pirydyna); 8,05-8,08 (m, 2H, pirydyna+NH); 9,38 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>S (292,15) wartości obliczone: C, 53,40; H, 6,89; N, 28,74; wartości zmierzone: C, 53,33; H, 7,01; N, 28,47.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-etylohydrazynokarbotioamid (36)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 64%; t.t. 195-196°C (etanol); IR (KBr): 3429, 3328 ( $\nu$  N-H); 2966, 2925, 2870 ( $\nu$  C-H); 1593 ( $\delta$  N-H); 1534 ( $\nu$  C=C); 1445 ( $\delta$  C-H); 1114 ( $\nu$  C-N); 991 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,13 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 3,32-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,56-3,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,71-3,72 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,84-6,88 (m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,65 (s, 1H, pirydyna); 8,16-8,20 (m, 2H, pirydyna+NH); 9,84 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>OS (308,14) wartości obliczone: C, 50,63; H, 6,54; N, 27,25; wartości zmierzone: C, 50,37; H, 6,26; N, 26,97.

*2-[Amino-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-cykloheksylohydrazynokarbotioamid (37)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z izotiocyanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji: 10 min. Wydajność: 68%; t.t. 205-206°C (etanol); IR (KBr): 3385, 3241, 3183, 3144 ( $\nu$  N-H); 2976, 2932, 2849 ( $\nu$  C-H); 1666 ( $\nu$  C=N); 1582 ( $\delta$  N-H); 1532 ( $\nu$  C=C); 1445 ( $\delta$  C-H); 1218 ( $\nu$  C-N); 777 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,13-1,30 (m, 5H, CH); 1,56-1,81 (m, 5H, CH); 4,04-4,08 (m, 1H, CH); 6,93-6,97 (m, 3H, NH<sub>2</sub>+pirydyna); 7,22 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,31 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,46-7,51 (m, 3H, 2ArH+NH); 7,68 (s, 1H, pirydyna); 8,42 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 10,01 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>OS (369,16) wartości obliczone: C, 61,76; H, 6,27; N, 18,95; wartości zmierzone: C, 61,44; H, 6,10; N, 18,74.

*2-[Amino-(4-fenylotipirydyn-2-ylo)metyleno]-N-cykloheksylohydrazynokarbotioamid (38)*

Reakcja 4-fenylotipikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z izotiocyanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji: 5 min. Wydajność: 58%; t.t. 200-202°C (etanol); IR (KBr): 3398, 3343, 3172 ( $\nu$  N-H); 2929, 2851 ( $\nu$  C-H); 1658 ( $\nu$  C=N); 1573, 1527 ( $\delta$  N-H); 1220 ( $\nu$  C-N); 750 ( $\gamma$  C<sub>Ar</sub>-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,17-1,29 (m, 5H, CH); 1,61-1,84 (m, 5H, CH); 4,05 (s, 1H, CH); 6,91 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,11 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,26 (d, 1H, ArH, J=9 Hz); 7,54-7,55 (m, 3H, ArH); 7,62-7,64 (m, 2H, ArH+NH); 7,71 (s, 1H, pirydyna); 8,35 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,97 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (385,14) wartości obliczone: C, 59,19; H, 6,01; N, 18,16; wartości zmierzone: C, 58,82; H, 5,75; N, 17,87.

*2-{Amino-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-cykloheksylohydrazynokarbotioamid (39)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z izotiocyanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji: 6 min. Wydajność: 46%; t.t. 213-215°C (etanol); IR (KBr): 3468, 3345 ( $\nu$  N-H); 2929, 2853 ( $\nu$  C-H); 1602 ( $\delta$  N-H); 1518 ( $\nu$  C=C); 1209 ( $\nu$  C-N) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,31-1,65 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 1,86-1,94 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 3,29-3,31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 4,14 (s, 1H, CH); 6,50 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 6,83 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,16 (s, 1H, NH); 7,71 (d, 1H, pirydyna, J=9 Hz); 8,06 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,93 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>S (346,19) wartości obliczone: C, 58,93; H, 7,56; N, 24,25; wartości zmierzone: C, 58,81; H, 7,83; N, 24,58.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-cykloheksylohydrazynokarbotioamid (40)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z izotiocyanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji: 3 min. Wydajność: 55%; t.t. 175-176°C (etanol); IR (KBr): 3420, 3332, 3283 ( $\nu$  N-H); 2928, 2851 ( $\nu$  C-H); 1591 ( $\delta$  N-H); 1531 ( $\nu$  C=C); 1448 ( $\delta$  C-H); 1116 ( $\nu$  C-N); 989 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,09-1,55 (m, 5H, CH); 1,64-1,87 (m, 5H, CH); 3,30-3,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,71 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 4,11-4,16 (m, 1H, CH); 6,86-6,91 (m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,55 (s, 1H, NH); 7,78 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 8,17 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,89 (s, 1H, NH) ppm; Analiza

elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>OS (362,19) wartości obliczone: C, 56,33; H, 7,23; N, 23,18; wartości zmierzone: C, 56,29; H, 7,28; N, 23,06.

*2-[Amino-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-fenylohydrazynokarbotioamid (41)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z izotiocyjanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 3 min. Wydajność: 87%; t.t. 177-179°C (etanol); IR (KBr): 3428, 3319, 3278, 3141 (ν N-H); 3068 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2925, 2847 (ν C-H); 1596, 1543 (δ N-H); 1333 (δ C-H); 1194 (ν C-N); 694 (γ C<sub>Ar</sub>-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6,86 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3Hz); 7,10 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,14-7,20 (m, 3H, ArH); 7,29 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,32 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,46-7,53 (m, 4H, ArH); 8,21 (s, 1H, pirydyna); 8,44 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,82 (s, 1H, NH); 10,41 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>OS (363,12) wartości obliczone: C, 62,79; H, 4,71; N, 19,27; wartości zmierzone: C, 62,69; H, 4,63; N, 19,25.

*2-[Amino-(4-fenylopiropydyn-2-ylo)metyleno]-N-fenylohydrazynokarbotioamid (42)*

Reakcja 4-fenylopiropikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z izotiocyjanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 4 min. Wydajność: 77%; t.t. 180-181°C (etanol); IR (KBr): 3427, 3329, 3308, 3169 (ν N-H); 2969 (ν C-H); 1655 (ν C=N); 1574, 1523 (δ N-H); 1431 (δ C-H); 1199 (ν C-N); 692 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6,91-6,92 (m, 1H, pirydyna); 7,07 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,19 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,36-7,44 (m, 3H, ArH); 7,47-7,52 (m, 4H, ArH); 7,59-7,61 (m, 2H, ArH); 8,25 (s, 1H, pirydyna); 8,34 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,64 (s, 1H, NH); 10,41 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (379,09) wartości obliczone: C, 60,13; H, 4,52; N, 18,45; wartości zmierzone: C, 60,12; H, 4,36; N, 18,35.

*2-{Amino-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydydyn-2-ylo]metyleno}-N-fenylohydrazynokarbotioamid (43)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pirolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z izotiocyjanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 4 min. Wydajność: 66%; t.t. 161-163°C (etanol); IR (KBr): 3363, 3281, 3169 (ν N-H); 2963, 2854 (ν C-H); 1599 (δ N-H); 1533, 1498 (ν C=C); 1193 (ν C-N); 694 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,91-1,94 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,32-3,34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,51 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,01 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,13-7,20 (m, 1H, ArH); 7,32-7,38 (m, 3H, pirydyna+2ArH); 7,63 (d, 2H, ArH, J=7 Hz); 8,08 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,76 (s, 1H, NH); 10,29 (s, 1H,

NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25,31 (2C); 47,37 (2C); 103,86; 108,52; 119,31; 125,22; 125,39; 125,55 (2C); 128,52 (2C); 128,82; 139,89; 152,68; 174,80 ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}$  (340,15) wartości obliczone: C, 59,97; H, 5,92; N, 24,69; wartości zmierzone: C, 59,63; H, 5,89; N, 24,34.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-fenylohydrazynokarbotioamid (44)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z izotiocyanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 95,5%; t.t. 121-123°C (etanol); IR (KBr): 3377, 3287, 3180 ( $\nu$  N-H); 2956, 2852 ( $\nu$  C-H); 1595 ( $\delta$  N-H); 1525 ( $\nu$  C=C); 1443 ( $\nu$  C=C); 1323, 1253 ( $\delta$  C-H); 1123 ( $\nu$  C-N); 992 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,35 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5$  Hz); 3,70 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5$  Hz); 6,90 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,03 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7,16 (t, 1H, ArH,  $J=7$  Hz); 7,33 (t, 3H, ArH,  $J=8$  Hz); 7,57 (d, 1H, ArH,  $J=8$  Hz); 7,78 (s, 1H, pirydyna); 8,19 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz); 9,81 (s, 1H, NH); 10,27 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{OS}$  (356,14) wartości obliczone: C, 57,28; H, 5,66; N, 23,58; wartości zmierzone: C, 56,99; H, 5,64; N, 23,62.

*2-[Amino-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-(2,4-dichlorofenyl)hydrazynokarbotioamid (45)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z izotiocyanianem 2,4-dichlorofenylu (0,224 g). Czas reakcji: 5 min. Wydajność: 81%; t.t. 169-170°C (etanol); IR (KBr): 3449, 3352, 3255, 3170 ( $\nu$  N-H); 2925, 2853 ( $\nu$  C-H); 1594, 1538 ( $\delta$  N-H); 1335 ( $\delta$  C-H); 1199 ( $\nu$  C-N); 693 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6,88 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,16-7,18 (m, 4H,  $\text{NH}_2+2\text{ArH}$ ); 7,27 (t, 1H, ArH,  $J=7$  Hz); 7,41-7,48 (m, 3H, ArH); 7,66 (s, 1H, ArH); 7,99 (d, 1H, ArH,  $J=9$  Hz); 8,12 (s, 1H, pirydyna); 8,44 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz); 9,89 (s, 1H, NH); 10,71 (s, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  110,27; 113,27; 120,74 (2C); 125,94; 127,50 (2C); 128,99 (2C); 129,71; 130,47; 130,54; 130,99 (2C); 136,27; 150,60; 152,66; 154,27; 165,10 ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{OS}$  (431,04) wartości obliczone: C, 52,78; H, 3,50; N, 16,20; wartości zmierzone: C, 52,51; H, 3,35; N, 16,15.

*2-[Amino-(4-fenylotiopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-2,4-dichlorofenylohydrazynokarbo-  
tioamid (46)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z izotiocyjanianem 2,4-dichlorofenyłu (0,224 g). Czas reakcji: 4 min. Wydajność: 87%; t.t. 168-170°C (etanol); IR (KBr): 3425, 3325, 3251, 3162 ( $\nu$  N-H); 2950 ( $\nu$  C-H); 1661 ( $\nu$  C=N); 1574 ( $\delta$  N-H); 1531 ( $\nu$  C=C); 1328 ( $\delta$  C-H); 808, 746 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6,86-6,87 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2\text{Hz}$ ,  $J_2=4\text{Hz}$ ); 7,11 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7,40-7,49 (m, 4H, ArH); 7,57-7,58 (m, 2H, ArH); 7,71-7,72 (m, 1H, ArH); 7,93 (d, 1H, ArH,  $J=9\text{Hz}$ ); 8,27 (s, 1H, pirydyna); 8,35 (d, 1H, pirydyna,  $J=5\text{Hz}$ ); 9,77 (s, 1H, NH); 10,72 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{S}_2$  (447,01) wartości obliczone: C, 50,89; H, 3,37; N, 15,62; wartości zmierzone: C, 50,71; H, 3,39; N, 15,47.

*2-{Amino-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-2,4-dichlorofenylohydrazyno-  
karbotioamid (47)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z izotiocyjanianem 2,4-dichlorofenyłu (0,224 g). Czas reakcji: 4 min. Wydajność: 62%; t.t. 177-179°C (etanol); IR (KBr): 3457, 3256, 3189 ( $\nu$  N-H); 2967, 2852 ( $\nu$  C-H); 1602 ( $\delta$  N-H); 1529 ( $\nu$  C=C); 1316 ( $\delta$  C-H); 1191 ( $\nu$  C-N); 808 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,94 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6\text{Hz}$ ); 3,27-3,32 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 6,52 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2\text{Hz}$ ;  $J_2=3\text{Hz}$ ); 7,13 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7,28 (s, 1H, ArH); 7,44 (dd, 1H, ArH,  $J_1=2\text{Hz}$ ,  $J_2=6\text{Hz}$ ); 7,70 (s, 1H, pirydyna); 8,09 (d, 1H, ArH,  $J=6\text{Hz}$ ); 8,57 (d, 1H, pirydyna,  $J=9\text{Hz}$ ); 10,04 (s, 1H, NH); 10,74 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}$  (408,07) wartości obliczone: C, 49,88; H, 4,43; N, 20,53; wartości zmierzone: C, 49,70; H, 4,34; N, 20,83.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-2,4-dichlorofenylohydrazynokarbo-  
tioamid (48)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z izotiocyjanianem 2,4-dichlorofenyłu (0,224 g). Czas reakcji: 4 min. Wydajność: 67%; t.t. 174-175°C (etanol); IR (KBr): 3406, 3308, 3235 ( $\nu$  N-H); 2963, 2853 ( $\nu$  C-H); 1592 ( $\delta$  N-H); 1532 ( $\nu$  C=C); 1326 ( $\delta$  C-H); 1115 ( $\nu$  C-N); 992, 875 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,29-3,33 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,69-3,71 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 6,92 (d, 1H, pirydyna,  $J=3\text{Hz}$ ); 7,11 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7,44 (dd, 1H, ArH,  $J_1=7\text{Hz}$ ,  $J_2=1\text{Hz}$ ); 7,67-7,69 (m, 2H, ArH); 8,19 (d, 1H,

pirydyna, J=6 Hz); 8,25 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 9,95 (s, 1H, NH); 10,68 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>OS (424,06) wartości obliczone: C, 48,00; H, 4,27; N, 19,76; wartości zmierzone: C, 47,77; H, 4,24; N, 19,45.

*2-[Amino(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-etylo-1-metylohydrazynokarbotioamid (49)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenoksypikolinohydrazonamidu **29** (0,242 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 25 min. Wydajność: 91%; t.t. 96-97°C (faza ruchoma octan etylu-chloroform 1:1); IR (KBr): 3375 (ν N-H); 2925, 3242 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 1632 (ν C=N); 1585-1524 (δ N-H); 1291, 1250, 1202 (δ C-H); 695, 577 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,26 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 3,72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,52 (k, 2H, CH<sub>2</sub>, J<sub>1</sub>=6 Hz, J<sub>2</sub>=7 Hz); 6,80 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,16 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,26 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,34-7,37 (m, 3H, pirydyna+ArH+NH); 7,54 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,64 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>OS (329,13) wartości obliczone: C, 58,34; H, 5,81; N, 21,26; wartości zmierzone: C, 58,26; H, 5,80; N, 21,15.

*2-[Amino-(4-fenylopiropydyn-2-ylo)metyleno]-N-etylo-1-metylohydrazynokarbotioamid (50)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenylopiropikolinohydrazonamidu **30** (0,258 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji 4 min. Wydajność: 32%; t.t. 127-128°C (etanol); IR (KBr): 3403, 3340, 3280 (ν N-H); 2978, 2927 (ν C-H); 1628 (ν C=N); 1572 (δ N-H); 1524 (ν C=C); 1336 (δ C-H); 754 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,02 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz) 3,28-3,32 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>); 3,42-3,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,07-7,08 (m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,38 (t, 1H, ArH, J=6Hz); 7,53-7,61 (m, 5H, 4ArH+NH); 7,92 (s, 1H, pirydyna); 8,40 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (345,11) wartości obliczone: C, 55,62; H, 5,54; N, 20,27; wartości zmierzone: C, 55,60; H, 5,24; N, 20,27.

*2-{Amino-[4-(pirolidy-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-etylo-1-metylohydrazynokarbotioamid (51)*

Reakcja *N'*-metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **31** (0,219 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 60%; t.t. 168-170°C (etanol); IR (KBr): 3475, 3355, 3277 (ν N-H); 2967, 2925, 2854 (ν C-H); 1595 (δ N-H);

1514 ( $\nu$  C=C); 1392 ( $\delta$  C-H); 1006 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,03 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 1,92-1,94 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,30-3,32 (m, 7H, 2CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 3,45-3,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,56 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 6,98 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,26 (s, 1H, NH); 7,34 (s, 1H, pirydyna); 8,11 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>S (306,16) wartości obliczone: C, 54,87; H, 7,24; N, 27,43; wartości zmierzone: C, 54,58; H, 7,14; N, 27,62.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-etylo-1-metylohydrazyno karbotioamid (52)*

Reakcja *N'*-metylo-4-morfolinopikolinohydrazonamidu **32** (0,235 g) z izotiocyanianem etylu (0,095 ml). Czas reakcji: 10 min. Wydajność: 62%; t.t. 139-141°C (etanol); IR (KBr): 3471, 3355 ( $\nu$  N-H); 2966, 2865 ( $\nu$  C-H); 1591 ( $\delta$  N-H); 1515 ( $\nu$  C=C); 1446, 1254 ( $\delta$  C-H); 992 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,03 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J=7 Hz); 3,31-3,33 (m, 7H, CH<sub>3</sub>+2CH<sub>2</sub>); 3,44-3,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,71 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 6,97-6,99 (m, 3H, NH<sub>2</sub>+pirydyna); 7,42 (s, 1H, NH); 7,61 (s, 1H, pirydyna); 8,22 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>OS (322,16) wartości obliczone: C, 52,15; H, 6,88; N, 26,06; wartości zmierzone: C, 51,86; H, 6,75; N, 25,97.

*2-[Amino-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-cykloheksylo-1-metylohydrazynokarbotioamid (53)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenoksypikolinohydrazonamidu **29** (0,242 g) z izotiocyanianem cykloheksyłu (0,155 ml). Czas reakcji: 15 min. Wydajność: 45%; t.t. 136-137°C (etanol); IR (KBr): 3379, 3331, 3252 ( $\nu$  N-H); 2928, 2853 ( $\nu$  C-H); 1623 ( $\nu$  C=N); 1578 ( $\delta$  N-H); 1518 ( $\nu$  C=C); 1446, 1358, 1245 ( $\delta$  C-H); 945, 693 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,09 -1,25 (m, 5H, CH); 1,51-1,60 (m, 3H, CH); 1,75-1,77 (m, 2H, CH); 3,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,02-4,03 (m, 1H, CH); 6,93 (d, 1H, ArH, J=8 Hz); 7,13 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,17 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,23 (d, 1H, ArH, J=8 Hz); 7,32 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,50 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,58 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,51 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz), NH-poza zasięgiem widma, ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>OS (383,18) wartości obliczone: C, 62,64; H, 6,57; N, 18,26; wartości zmierzone: C, 62,74; H, 6,51; N, 18,09.



*2-[Amino-(4-fenylotipirydyn-2-ylo)metyleno]-N-cykloheksylo-1-metylohydrazyno karbotioamid (54)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenylotipikolinohydrazonamidu **30** (0,258 g) z izotiocyjanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji 3 min. Wydajność: 40%; t.t. 165-167°C (metanol); IR (KBr): 3435, 3322, 3295 (ν N-H); 2919, 2849 (ν C-H); 1634 (ν C=N); 1567 (δ N-H); 1504 (ν C=C); 1360 (δ C-H); 752, 689 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,10-1,27 (m, 5H, CH); 1,53-1,63 (m, 5H, CH); 3,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,00-4,04 (m, 1H, CH); 6,82 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 7,13 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,22-7,23 (m, 1H, ArH); 7,53-7,54 (m, 3H, 2ArH+NH); 7,62-7,63 (m, 2H, ArH); 7,72 (s, 1H, pirydyna); 8,41 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (399,16) wartości obliczone: C, 60,12; H, 6,31; N, 17,53; wartości zmierzone: C, 60,41; H, 6,25; N, 17,32.

*2-{Amino-[4-(pirolidyn-1-ylo)-pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-cykloheksylo-1-metylohydrazynokarbotioamid (55)*

Reakcja *N'*-metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **31** (0,219 g) z izotiocyjanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 33%; t.t. 175-177°C (etanol); IR (KBr): 3461, 3355, 3308 (ν N-H); 2933, 2854 (ν C-H); 1593 (δ N-H); 1503 (ν C=C); 1355 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,08-1,29 (m, 5H, CH); 1,48-1,58 (m, 3H, CH); 1,79-1,81 (m, 2H, CH); 1,94-1,96 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,32-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 4,06-4,08 (m, 1H, CH); 6,57 (d, 1H, pirydyna, J=5Hz); 6,93 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 7,04 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,20 (s, 1H, NH); 8,11 (d, 1H, pirydyna, J=6Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>S (360,21) wartości obliczone: C, 59,97; H, 7,83; N, 23,31; wartości zmierzone: C, 59,89; H, 7,82; N, 22,99.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-cykolheksylo-1-metylohydrazyno karbotioamid (56)*

Reakcja *N'*-metylo-4-morfolinopikolinohydrazonamidu **32** (0,235 g) z izotiocyjanianem cykloheksylu (0,155 ml). Czas reakcji: 10 min. Wydajność: 47%; t.t. 137-140°C (metanol); IR (KBr): 3461, 3350, 3322 (ν N-H); 2927, 2852 (ν C-H); 1591 (δ N-H); 1507 (ν C=C); 1256 (ν C-N); 992 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,07-1,26 (m, 5H, CH); 1,49-1,81 (m, 5H, CH); 3,32-3,34 (m, 7H, CH<sub>3</sub>+2CH<sub>2</sub>); 3,71 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 4,07-4,09 (m, 1H, CH); 6,94 (d, 1H, pirydyna, J= 8 Hz); 6,98-7,06

(m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,56 (s, 1H, NH); 8,23 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25,10 (2C); 25,59; 32,50 (2C); 38,88; 46,18 (2C); 53,08; 66,16 (2C); 105,51; 110,54; 149,08; 150,28; 155,91; 157,88; 178,90 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>OS (376,20) wartości obliczone: C, 57,42; H, 7,50; N, 22,32; wartości zmierzone: C, 57,65; H, 7,45; N, 21,98.

*2-[Amino-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-fenyl-1-metylohydrazyno karbotioamid (57)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenoksypikolinohydrazonamidu **29** (0,242 g) z izotiocyanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 10 min. Wydajność: 86%; t.t. 149-150°C (etanol); IR (KBr): 3556, 3254, 3230 (ν N-H); 2925 (ν C-H); 1628 (ν C=N); 1579 (δ N-H); 1524 (ν C=C); 1347, 1247 (δ C-H); 950, 694 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,08-7,10 (m, 2H, pirydyna+ArH); 7,22 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,27 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,31-7,34 (m, 3H, NH<sub>2</sub>+ArH); 7,43 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,51 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,79 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 8,51 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,08 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>OS (377,13) wartości obliczone: C, 63,64; H, 5,07; N, 18,55; wartości zmierzone: C, 63,53; H, 4,91; N, 18,71.

*2-[Amino-(4-fenylotiopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-fenyl-1-metylohydrazyno karbotioamid (58)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **30** (0,258 g) z izotiocyanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji 1 min. Wydajność: 48%; t.t. 147-148°C (etanol); IR (KBr): 3414, 3313 (ν N-H); 3056 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2925 (ν C-H); 1632 (ν C=N); 1572 (δ N-H); 1507 (ν C=C); 1340 (δ C-H); 1084 (ν C-N); 749, 706 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,39 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 7,08-7,12 (m, 2H, pirydyna+ArH); 7,27-7,30 (m, 4H, 2ArH+NH<sub>2</sub>); 7,41 (d, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,52-7,53 (m, 3H, ArH); 7,61-7,63 (m, 2H, ArH); 7,98 (s, 1H, pirydyna); 8,41 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,04 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (393,11) wartości obliczone: C, 61,04; H, 4,87; N, 17,80; wartości zmierzone: C, 61,02; H, 4,82; N, 17,47.

*2-{Amino-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-fenyl-1-metylohydrazyno karbotioamid (59)*

Reakcja *N'*-metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **31** (0,219 g) z izotiocyanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 22%; t.t. 123-

125°C (etanol); IR (KBr): 3431, 3246 (ν N-H); 2971, 2854 (ν C-H); 1597 (δ N-H); 1516, 1498 (ν C=C); 1347 (δ C-H); 1009, 704 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,92-1,94 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,31-3,34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,57 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 7,05 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,12 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,25 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,35 (s, 1H, pirydyna); 7,47 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,13 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,05 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>S (354,16) wartości obliczone: C, 60,99; H, 6,26; N, 23,71; wartości zmierzone: C, 60,75; H, 6,03; N, 23,54.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-fenyl-1-metylohydrazynokarbotioamid (60)*

Reakcja *N'*-metylo-4-morfolinopikolinohydrazonamidu **32** (0,235 g) z izotiocyanianem fenylu (0,131 ml). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 68%; t.t. 155-157°C (metanol); IR (KBr): 3489, 3369 (ν N-H); 2966, 2921, 2853 (ν C-H); 1591 (δ N-H); 1507 (ν C=C); 1443 (δ C-H); 1261 (ν C-N); 989 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,36-3,38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,71-3,73 (m, 7H, CH<sub>3</sub>+2CH<sub>2</sub>); 7,03-7,13 (m, 2H, ArH); 7,29-7,32 (m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,47-7,50 (m, 3H, ArH); 7,74 (s, 1H, pirydyna); 8,27 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,11 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>OS (370,16) wartości obliczone: C, 58,36; H, 5,99; N, 22,68; wartości zmierzone: C, 58,33; H, 5,89; N, 22,64.

*2-[Amino-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N-2,4-dichlorofenyl-1-metylohydrazynokarbotioamid (61)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenoksypikolinohydrazonamidu **29** (0,242 g) z izotiocyanianem 2,4-dichlorofenylu (0,224 g). Czas reakcji: 8 min. Wydajność: 31%; t.t. 162-164°C (metanol); IR (KBr): 3374, 3278 (ν N-H); 2919, 2858 (ν C-H); 1639 (ν C=N); 1581 (δ N-H); 1519 (ν C=C); 1331 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,15 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz; J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,20 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,31 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,67-3,88 (m, 1H, ArH); 7,48-7,51 (m 4H, 2ArH+NH<sub>2</sub>); 7,58 (s, 1H, ArH); 7,70 (s, 1H, pirydyna); 8,09 (d, 1H, ArH, J=9 Hz); 8,53 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,15 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>OS (445,05) wartości obliczone: C, 53,82; H, 3,84; N, 15,69; wartości zmierzone: C, 53,45; H, 3,82; N, 15,44.

*2-[Amino-(4-fenylotipirydyn-2-ylo)metyleno]-N-2,4-dichlorofenyl-1-metylohydrazynokarbotioamid (62)*

Reakcja *N'*-metylo-4-fenylotipikolinohydrazonamidu **30** (0,258 g) z izotiocyanianem 2,4-dichlorofenylu (0,224 g). Czas reakcji 2 min. Wydajność: 55%; t.t. 193-194°C (metanol); IR (KBr): 3442, 3368, 3307, 3263 (ν N-H); 3069 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2923, 2847 (ν C-H); 1623 (ν C=N); 1571 (δ N-H); 1332 (δ C-H); 1089 (ν C-Cl); 749 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,16-7,17 (m, 1H, ArH); 7,37-7,43 (m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,52-7,60 (m, 6H, ArH); 7,95 (s, 1H, pirydyna); 8,02 (d, 1H, ArH, J=8 Hz); 8,42 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,11 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (461,03) wartości obliczone: C, 51,95; H, 3,71; N, 15,15; wartości zmierzone: C, 51,64; H, 3,61; N, 14,82.

*2-{Amino-[4-(pirolidy-1-ylo)-pirydyn-2-ylo]metyleno}-N-2,4-dichlorofenyl-1-metylohydrazynokarbotioamid (63)*

Reakcja *N'*-metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **31** (0,219 g) z izotiocyanianem 2,4-dichlorofenylu (0,224 g). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 55%; t.t. 196-197°C (etanol); IR (KBr): 3469, 3350, 3276 (ν N-H); 2922, 2859 (ν C-H); 1597 (δ N-H); 1516, 1492 (ν C=C); 1330 (δ C-H); 1084 (ν C-Cl); 819 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,93-1,96 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,29-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,59 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,35-7,39 (m, 4H, 2ArH+NH<sub>2</sub>); 7,60 (s, 1H, ArH); 8,13 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,32 (d, 1H, pirydyna, J=9 Hz); 9,35 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>S (422,08) wartości obliczone: C, 51,07; H, 4,76; N, 19,85; wartości zmierzone: C, 50,80; H, 4,66; N, 19,49.

*2-[Amino-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N-2,4-dichlorofenyl-1-metylohydrazynokarbotioamid (64)*

Reakcja *N'*-metylo-4-morfolinopikolinohydrazonamidu **32** (0,235 g) z izotiocyanianem 2,4-dichlorofenylu (0,224 g). Czas reakcji: 2 min. Wydajność: 68%; t.t. 155-157°C (metanol); IR (KBr): 3411, 3303, 3250 (ν N-H); 3096 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2966, 2921, 2852 (ν C-H); 1589 (δ N-H); 1525 (ν C=C); 1444, 1251 (δ C-H); 1123 (ν C-N); 990 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,35-3,36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,71-3,73 (m, 7H, CH<sub>3</sub>+2CH<sub>2</sub>); 7,02-7,09 (m, 1H, ArH); 7,39-7,50 (m, 3H, pirydyna+NH<sub>2</sub>); 7,64-7,65 (m, 1H, ArH); 7,73 (s, 1H, pirydyna); 8,18-8,28 (m, 2H, ArH+pirydyna); 9,32 (s, 1H,

NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{18}H_{20}Cl_2N_6SO$  (438,08) wartości obliczone: C, 49,21; H, 4,59; N, 19,13; wartości zmierzone: C, 49,05; H, 4,73; N, 19,26.

#### 5.1.6. Metoda ogólna otrzymywania pochodnych iminowych 65-80

1 mmol amidrazonu (**25-28**) oraz 1 mmol aldehydu rozpuszczono w 10 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 30 min. Po ochłodzeniu roztworu produkt reakcji krystalizował. Otrzymany osad odsączono, suszono na powietrzu oraz poddano rekrytalizacji z odpowiedniego rozpuszczalnika.

##### *N'*-Benzylideno-4-fenoksypikolinohydrazonamid (**65**)

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z aldehydem benzoowym (0,106 ml). Wydajność: 68%; t.t. 159-160°C (etanol); IR (KBr): 3472, 3327 ( $\nu$  N-H); 3057 ( $\nu$  C-H); 1621 ( $\nu$  C=N); 1562 ( $\delta$  N-H); 1486 ( $\nu$  C=C); 1289, 1200 ( $\delta$  C-H); 942 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,09 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,14 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,24 (d, 2H, ArH,  $J=8$  Hz); 7,34 (t, 1H, ArH,  $J=7$  Hz); 7,40-7,41 (m, 3H, ArH); 7,52 (t, 2H, ArH,  $J=7$  Hz); 7,64 (d, 1H, pirydyna,  $J=3$  Hz); 7,88-7,90 (m, 2H, ArH); 8,37 (s, 1H, CH); 8,55 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{19}H_{16}N_4O$  (316,13) wartości obliczone: C, 72,13; H, 5,10; N, 17,71; wartości zmierzone: C, 71,75; H, 5,03; N, 17,49.

##### *N'*-Benzylideno-4-fenylopiotropikolinohydrazonamid (**66**)

Reakcja 4-fenylopiotropikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z aldehydem benzoowym (0,106 ml). Wydajność: 47%; t.t. 76-77°C (etanol); IR (KBr): 3492, 3445, 3368 ( $\nu$  N-H); 3054 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2923 ( $\nu$  C-H); 1623 ( $\nu$  C=N); 1561 ( $\delta$  N-H); 1535 ( $\nu$  C=C); 752, 692 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,05 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,14 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,40-7,41 (m, 3H, ArH); 7,55-7,56 (m, 3H, ArH); 7,61-7,63 (m, 2H, ArH); 7,88-7,91 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 8,35 (s, 1H, CH); 8,44 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{19}H_{16}N_4S$  (332,11) wartości obliczone: C, 68,65; H, 4,85; N, 16,85; wartości zmierzone: C, 68,63; H, 4,79; N, 16,89.

##### *N'*-Benzylideno-(4-pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**67**)

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z aldehydem benzoowym (0,106 ml). Wydajność: 53%; t.t. 249-250°C (etanol); IR (KBr): 3450 ( $\delta$  N-H); 3225 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2962, 2844 ( $\nu$  C-H); 1585 ( $\delta$  N-H); 1490 ( $\nu$  C=C); 1003 ( $\gamma$  C-

H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1,97-1,98 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,32-3,33 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 6,57 (s, 1H, pirydyna); 6,96 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7,32 (s, 1H, pirydyna); 7,40-7,42 (m, 3H, ArH); 7,88 (d, 2H, ArH,  $J=6$  Hz); 8,15 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz); 8,47 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5$  (293,16) wartości obliczone: C, 69,60; H, 6,53; N, 23,87; wartości zmierzone: C, 69,44; H, 6,48; N, 23,51.

#### *N'*-Benzylideno-4-morfolinopikolinohydrazonamid (**68**)

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z aldehydem benzoowym (0,106 ml). Wydajność: 43%; t.t. 228-230°C (etanol); IR (KBr): 3451, 3237 ( $\nu$  N-H); 2967, 2852 ( $\nu$  C-H); 1584 ( $\delta$  N-H); 1536, 1484 ( $\nu$  C=C); 1252, 1123 ( $\delta$  C-H); 990 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  3,33-3,34 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,73-3,78 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 6,91-6,99 (m, 3H,  $\text{NH}_2$ +pirydyna); 7,41-7,43 (m, 3H, ArH); 7,67 (s, 1H, pirydyna); 7,89 (d, 2H, ArH,  $J=6$  Hz); 8,26 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz); 8,47 (s, 1H, CH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  46,18 (2C); 66,18 (2C); 104,94; 110,31; 128,25 (2C); 129,04 (2C); 130,27; 135,94; 149,25; 151,29; 154,24; 155,83; 157,55 ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}$  (309,16) wartości obliczone: C, 66,00; H, 6,19; N, 22,64; wartości zmierzone: C, 66,07; H, 5,96; N, 22,59.

#### *4-Fenoksy-N'*-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazonamid (**69**)

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z aldehydem 4-nitrobenzoowym (0,151 g). Wydajność: 49%; t.t. 195-197°C (etanol); IR (KBr): 3419, 3301 ( $\nu$  N-H); 3079 ( $\nu$   $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ ); 2925 ( $\nu$  C-H); 1592 ( $\delta$  C-H); 1514 ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{NO}_2$ ); 1337 ( $\nu_{\text{s}}$   $\text{NO}_2$ ); 1287, 1247 ( $\delta$  C-H); 1018 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7,16 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,24 (d, 2H, ArH,  $J=8$  Hz); 7,33-7,36 (m, 2H, ArH+NH); 7,51-7,54 (m, 3H, 2ArH+NH); 7,64 (d, 1H, pirydyna,  $J=3$  Hz); 8,17 (d, 2H, ArH,  $J=9$  Hz); 8,24 (d, 2H, ArH); 8,48 (s, 1H, CH); 8,56 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3$  (361,12) wartości obliczone: C, 63,15; H, 4,18; N, 19,38; wartości zmierzone: C, 62,87; H, 4,07; N, 18,99.

#### *4-Fenylotio-N'*-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazonamid (**70**)

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z aldehydem 4-nitrobenzoowym (0,151 g). Wydajność: 61,5%; t.t. 192-193°C (etanol); IR (KBr): 3483, 3369 ( $\nu$  N-H); 3053 ( $\nu$   $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ ); 2924 ( $\nu$  C-H); 1628 ( $\nu$  C=N); 1565 ( $\delta$  N-H); 1507 ( $\nu$  C=C); 1341 ( $\nu_{\text{s}}$   $\text{NO}_2$ ); 751, 725 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7,16

(d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 7,27 (szs, 1H, NH); 7,47 (szs, 1H, NH); 7,55-7,56 (m, 3H, ArH); 7,61-7,63 (m, 2H, ArH); 7,91 (s, 1H, pirydyna); 8,17 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,24 (d, 2H, ArH, J=9 Hz); 8,46-8,47 (m, 2H, pirydyna+CH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (377,09) wartości obliczone: C, 60,46; H, 4,01; N, 18,56; wartości zmierzone: C, 60,09; H, 3,87; N, 18,78.

*N'-(4-Nitrobenzylideno)-(4-pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (71)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z aldehydem 4-nitrobenzoesowym (0,151 g) Wydajność: 54%; t.t. 242-244°C (dioksan); IR (KBr): 3470, 3354 (ν N-H); 2958, 2848 (ν C-H); 1601 (δ N-H); 1513, 1494 (ν C=C); 1341 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,97 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 3,31-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,59 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,21 (szs, 1H, NH); 7,34 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 7,38 (szs, 1H, NH); 8,16-8,18 (m, 3H, 2ArH+CH); 8,25 (d, 2H, ArH, J=9 Hz); 8,59 (s, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (338,15) wartości obliczone: C, 60,34; H, 5,36; N, 24,84; wartości zmierzone: C, 59,98; H, 5,23; N, 24,90.

*4-Morfolino-N'-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazonamid (72)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z aldehydem 4-nitrobenzoesowym (0,151 g). Wydajność: 40%; t.t. 250-252°C (dioksan); IR (KBr): 3456, 3299 (ν N-H); 2922, 2854 (ν C-H); 1594 (δ N-H); 1510 (ν C=C); 1339 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1253, 1123 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,73-3,74 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 6,99 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,23 (szs, 1H, NH); 7,42 (szs, 1H, NH); 7,68 (s, 1H, pirydyna); 8,16-8,28 (m, 5H, 4ArH+CH); 8,58 (s, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (354,14) wartości obliczone: C, 57,62; H, 5,12; N, 23,72; wartości zmierzone: C, 57,80; H, 5,45; N, 23,54.

*4-Fenoksy-N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (73)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 38%; t.t. 148-149°C (etanol); IR (KBr): 3446, 3303 (ν N-H); 3109 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 1620 (ν C=N); 1566 (δ N-H); 1487 (ν C=C); 1327 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 945, 813 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,20 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,25-7,29 (m, 3H, 2ArH+tiofen); 7,45 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,56-7,60 (m, 3H, NH<sub>2</sub>+ArH); 7,81 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 8,10 (d, 1H, tiofen, J=4

Hz); 8,26 (s, 1H, CH); 8,60 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{17}H_{13}N_5O_3S$  (367,07) wartości obliczone: C, 55,58; H, 3,57; N, 19,06; wartości zmierzone: C, 55,41; H, 3,50; N, 19,02.

*4-Fenylotio-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (74)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 83%; t.t. 161-162°C (etanol); IR (KBr): 3384, 3279 ( $\nu$  N-H); 2923, 2844 ( $\nu$  C-H); 1619 ( $\nu$  C=N); 1571 ( $\delta$  N-H); 1486 ( $\nu$  C=C); 1325 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 998, 757 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,29 (s, 1H, pirydyna); 7,44 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,51-7,66 (m, 6H, 5ArH+tiofen); 7,97 (s, 1H, CH); 8,11 (s, 1H, pirydyna); 8,25 (s, 1H, tiofen); 8,50 (s, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{17}H_{13}N_5O_2S_2$  (383,05) wartości obliczone: C, 53,25; H, 3,42; N, 18,26; wartości zmierzone: C, 53,06; H, 3,44; N, 17,87.

*N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-(4-pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (75)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 43%; t.t. 225-226°C (dioksan); IR (KBr): 3467, 3376, 3340 ( $\nu$  N-H); 3076 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2962, 2860 ( $\nu$  C-H); 1595 ( $\delta$  N-H); 1489 ( $\nu$  C=C); 1325 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 996, 814 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2,01-2,02 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,42-3,43 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,63-6,64 (m, 1H, pirydyna); 7,51 (s, 1H, NH); 7,57 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 7,61 (s, 1H, NH); 7,72 (s, 1H, pirydyna); 8,09 (d, 1H, tiofen, J=5 Hz); 8,19 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,25 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{15}H_{16}N_6O_2S$  (344,11) wartości obliczone: C, 52,31; H, 4,68; N, 24,40; wartości zmierzone: C, 52,16; H, 4,49; N, 24,72.

*4-Morfolino-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (76)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 40%; t.t. 246-247°C (dioksan); IR (KBr): 3459, 3339 ( $\nu$  N-H); 3104 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2971, 2925 ( $\nu$  C-H); 1593 ( $\delta$  N-H); 1566, 1481 ( $\nu$  C=C); 1324 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 815 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3,43-3,45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,78-3,79 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,06 (s, 1H, NH); 7,55-7,58 (m, 2H, pirydyna+tiofen); 7,67 (s, 1H, NH); 8,03 (s, 1H, pirydyna); 8,10 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 8,26 (s, 1H, CH); 8,32 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla



C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S (360,10) wartości obliczone: C, 49,99; H, 4,47; N, 23,32; wartości zmierzone: C, 49,64; H, 4,38; N, 23,07.

*4-Fenoksy-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (77)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 65%; t.t. 182-183°C (etanol); IR (KBr): 3430, 3310 (ν N-H); 1619 (ν C=N); 1579 (δ N-H); 1464, 1444 (ν C=C); 1349 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1012, 780 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,15 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,24 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,32-7,36 (m, 3H, NH+furan+ArH); 7,47 (s, 1H, NH); 7,52 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,65 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 7,79 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 8,28 (s, 1H, CH); 8,56 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (351,10) wartości obliczone: C, 58,12; H, 3,73; N, 19,93; wartości zmierzone: C, 57,90; H, 3,61; N, 19,80.

*4-Fenylotio-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (78)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 73%; t.t. 147-148°C (etanol); IR (KBr): 3497, 3378 (ν N-H); 3145, 3055 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2923 (ν C-H); 1630 (ν C=N); 1567 (δ N-H); 1461 (ν C=C); 1351 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1009, 755 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,17 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,31 (s, 1H, NH); 7,38 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 7,43 (s, 1H, NH); 7,56-7,57 (m, 3H, ArH); 7,62-7,63 (m, 2H, ArH); 7,81 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,89 (d, 1H, furan, J=1 Hz); 8,24 (s, 1H, CH); 8,46 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S (367,07) wartości obliczone: C, 55,58; H, 3,57; N, 19,06; wartości zmierzone: C, 55,71; H, 3,41; N, 18,80.

*N'-[(5-Nitrofuran-2-ylo)metyleno]-(4-pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (79)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 27%; t.t. 225-226°C (etanol); IR (KBr): 3412, 3302 (ν N-H); 3158 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2959, 2844 (ν C-H); 1584 (δ N-H); 1462 (ν C=C); 1351 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1004, 810 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,96-1,97 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,31-3,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,59 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,22 (s, 1H, NH); 7,32-7,36 (m, 3H, NH+pirydyna+furan); 7,80 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 8,16 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,36 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (328,13) wartości obliczone: C, 54,87; H, 4,91; N, 25,60; wartości zmierzone: C, 55,17; H, 4,75; N, 25,29.

#### *4-Morfolino-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (80)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 49%; t.t. 180-181°C (etanol); IR (KBr): 3452, 3335 ( $\nu$  N-H); 3124 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2863 ( $\nu$  C-H); 1574 ( $\delta$  N-H); 1524, 1469 ( $\nu$  C=C); 1352 ( $\nu$  NO<sub>2</sub>) 992, 810 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3,32-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,73-3,74 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,00 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,22-7,40 (m, 3H, NH<sub>2</sub>+furan); 7,66 (s, 1H, pirydyna); 7,81 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 8,28 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,36 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (344,12) wartości obliczone: C, 52,32; H, 4,68; N, 24,41; wartości zmierzone: C, 52,41; H, 4,66; N, 24,15.

#### **5.1.7. Ogólna metoda syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu 81-84**

Odpowiedni amidrazon **25-28** (2 mmole) był ogrzewany z (12 mmoli, 2 ml) ortomrówczanem trietylu przez 3 h. Po ochłodzeniu wytrącił się osad, który następnie odsączono i suszono na powietrzu. Gotowy produkt był oczyszczany poprzez krystalizację lub chromatografię kolumnową.

#### *4-Fenoksy-2-(1H-1,2,4-triazol-3-ylo)pirydyna (81)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,456 g). Wydajność: 24%; t.t. 202-204°C (metanol); IR (KBr): 3365 ( $\nu$  N-H); 3132, 3090 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 1582 ( $\delta$  N-H); 1487 ( $\nu$  C=C); 1205, 1068 ( $\delta$  C-H); 693 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,17-7,20 (m, 1H, pirydyna); 7,22-7,26 (m, 4H, ArH); 7,30-7,49 (m, 4H, 2pirydyna+CH+ArH); 8,55 (szs, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O (238,09) wartości obliczone: C, 65,54; H, 4,23; N, 23,52; wartości zmierzone: C, 65,16; H, 4,27; N, 23,31.

#### *4-Fenylotio-2-(1H-1,2,4-triazol-3-ylo)pirydyna (82)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,488 g). Wydajność: 12%; t.t. 106-107°C (faza ruchoma aceton-toluen 1:1); IR (KBr): 3424 ( $\nu$  N-H); 2925, 2854 ( $\nu$  C-H); 1583 ( $\delta$  N-H); 1513, 1441, 1367 ( $\nu$  C=C); 1194, 1102 ( $\delta$  C-H); 809, 749, 690 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,12 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,51-7,62 (m, 6H, 5ArH+CH); 7,92 (s, 1H, pirydyna); 8,40 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,04 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>S (254,06) wartości obliczone: C, 61,40; H, 3,96; N, 22,03; wartości zmierzone: C, 61,11; H, 3,86; N, 22,15.

#### *4-Pirolidyn-1-ylo-2-(1H-1,2,4-triazol-3-ylo)pirydyna (83)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,410 g). Wydajność: 41%; t.t. 261-262°C (pirydyna-woda 1:1); IR (KBr): 3372 (ν N-H); 3104 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2961, 2853 (ν C-H); 1599 (δ N-H); 1540, 1500 (ν C=C); 1001, 815 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,90-1,95 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,20-3,29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,44-6,62 (m, 1H, pirydyna); 7,06-7,10 (m, 1H, pirydyna); 7,27-7,30 (m, 2H, NH+CH); 8,14-8,15 (m, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub> (215,12) wartości obliczone: C, 61,38; H, 6,09; N, 32,54; wartości zmierzone: C, 61,47; H, 6,44; N, 32,82.

#### *4-[2-(1H-1,2,4-Triazol-3-ylo)-pirydyn-4-ylo]morfolina (84)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,442 g). Wydajność: 35%; t.t. 246-248°C (etanol); IR (KBr): 3343 (ν N-H); 2965, 2853 (ν C-H); 1592 (δ N-H); 1539, 1446, 1380 (ν C=C); 1251, 1121 (δ C-H); 990 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,36-3,36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,72-3,73 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,58-6,66 (m, 1H, pirydyna); 6,84-6,89 (m, 1H, CH); 7,70 (szs, 1H, NH); 7,69 (d, 1H, pirydyna, J=30 Hz); 8,27 (d, 1H, pirydyna, J=30 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O (231,11) wartości obliczone: C, 57,13; H, 5,67; N, 30,28; wartości zmierzone: C, 57,01; H, 6,03; N, 30,09.

### **5.1.8. Ogólna metoda syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu 85-88**

*N*-Metyloamidrazon (2 mmole) oraz ortomrówczan trietylu (12 mmoli, 2 ml) rozpuszczono w 1 ml DMF. Mieszaninę utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 3 h. Następnie schłodzono i dodano 10 ml wody. Roztwór wodny ekstrahowano chloroformem (3x15 ml). Następnie roztwór chloroformowy przemyto 3-krotnie nasyconym roztworem NaCl, a następnie suszono MgSO<sub>4</sub>. Odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik. Do kolby dodano 5 ml eteru dietylowego, co spowodowało wytrącenie osadu. Osad odsączono, suszono na powietrzu i poddano rekrytalizacji z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### *2-(1-Metyl-1H-1,2,4-triazol-3-ylo)-4-fenoksypirydyna (85)*

Reakcja *N*-metylo-4-fenoksypikolinohydrazonamidu **29** (0,484 g). Wydajność: 20%; t.t. 114-116°C (eter dietylowy); IR (KBr): 3089 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 1585, 1489 (ν C=C); 1210 (δ C-H) 910 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,01-7,02 (m, 1H, pirydyna); 7,23-7,33 (m, 3H ArH); 7,41 (s, 1H, pirydyna); 7,52-7,53

(m, 2H, ArH); 8,52-8,53 (m, 2H, pirydyna+CH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{14}H_{12}N_4O$  (252,10) wartości obliczone: C, 66,65; H, 4,79; N, 22,21; wartości zmierzone: C, 66,58; H, 4,78; N, 22,16.

*2-(1-Metyl-1H-1,2,4-triazol-3-ylo)-4-fenylotiopirydyna (86)*

Reakcja *N*-metylo-4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **30** (0,516 g). Wydajność: 52%; t.t. 130-132°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3081 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2926, 2844 ( $\nu$  C-H); 1580, 1511 ( $\nu$  C=C); 1361, 1324 ( $\delta$  C-H); 789, 764 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3,89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,07-7,08 (m, 1H, pirydyna); 7,56-7,63 (m, 6H, pirydyna+5ArH); 8,42-8,43 (m, 1H, pirydyna); 8,50 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{14}H_{12}N_4S$  (268,08) wartości obliczone: C, 62,66; H, 4,51; N, 20,88; wartości zmierzone: C, 62,43; H, 4,52; N, 20,66.

*2-(1-Metyl-1H-1,2,4-triazol-3-ylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyna (87)*

Reakcja *N*-metylo-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **31** (0,438 g). Wydajność: 32%; t.t. 161-162°C (eter dietylowy); IR (KBr): 3089 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2964, 2849 ( $\nu$  C-H); 1604, 1496 ( $\nu$  C=C); 987, 809, 769 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,94-1,95 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,30-3,31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,46-6,47 (m, 1H, pirydyna); 7,11 (s, 1H, pirydyna); 8,13 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,48 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{12}H_{15}N_5$  (229,13) wartości obliczone: C, 62,86; H, 6,59; N, 30,54; wartości zmierzone: C, 62,68; H, 6,66; N, 30,23.

*4-[2-(1-Metyl-1H-1,2,4-triazol-3-ylo)pirydyn-4-ylo]morfolina (88)*

Reakcja *N'*-metylo-4-morfolinopikolinohydrazonamidu **32** (0,470 g). Wydajność: 19%; t.t. 133-134°C (eter dietylowy); IR (KBr): 3092 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 2977, 2927, 2843 ( $\nu$  C-H); 1597, 1518, 1446 ( $\nu$  C=C); 1248, 1118 ( $\delta$  C-H); 946 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3,30 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,72 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,86 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,45 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,24 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,51 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{12}H_{15}N_5O$  (245,13) wartości obliczone: C, 58,76; H, 6,16; N, 28,55; wartości zmierzone: C, 58,61; H, 6,21; N, 28,79.

### 5.1.9. Ogólna metoda syntezy amido-azyn 89-92

5 mmoli odpowiedniego amidrazonu (**25-28**) oraz 5 mmoli (0,685 g) pirazynoiminoestru metylowego ogrzewano w 15 ml mieszaniny metanol-woda (1:1) przez 15 min. Następnie roztwór zakwaszono kwasem octowym. Po ochłodzeniu wypadł osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Osad oczyszczano metodą krystalizacji lub chromatografii kolumnowej.

#### *N'*-[Amino(4-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]pirazyn-2-karbohydrazonamid (**89**)

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (1,140 g). Wydajność: 26%; t.t. >300°C (faza ruchoma octan etylu-chloroform 1:1); IR (KBr): 3395, 3293 ( $\nu$  N-H); 1607 ( $\delta$  N-H); 1559, 1467 ( $\nu$  C=C); 1019 ( $\delta$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,12 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,21 (d, 2H, ArH,  $J=8$  Hz); 7,31 (t, 1H, ArH,  $J=8$  Hz); 7,50 (t, 2H, ArH,  $J=8$  Hz); 8,09 (d, 1H, pirydyna,  $J=2$  Hz); 8,51 (szs, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 8,65 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz); 8,74-8,83 (m, 2H, pirazyna); 9,15 (szs, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 9,70 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}$  (333,13) wartości obliczone: C, 61,25; H, 4,54; N, 29,41; wartości zmierzone: C, 61,17; H, 4,71; N, 29,67.

#### *N'*-[Amino(4-fenylopiropyridyn-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohydrazonamid (**90**)

Reakcja 4-fenylopiropikolinohydrazonamidu **26** (1,220 g). Wydajność: 97%; t.t. >300°C (metanol); IR (KBr): 3406, 3301 ( $\nu$  N-H); 1604 ( $\nu$  C=N); 1573 ( $\delta$  N-H); 1468 ( $\nu$  C=C); 1019 ( $\delta$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6,86-6,99 (m, 5H, 4 $\text{NH}+$ pirydyna); 7,57-7,65 (m, 3H, ArH); 8,24 (s, 1H, pirydyna); 8,41 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz); 8,66-8,69 (m, 3H, 2ArH+pirazyna); 9,69-9,74 (m, 2H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{S}$  (349,11) wartości obliczone: C, 58,44; H, 4,33; N, 28,06; wartości zmierzone: C, 58,10; H, 4,11; N, 28,40.

#### *N'*-{Amino[(4-pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}pirazyno-2-karbohydrazonamid (**91**)

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)piropikolinohydrazonamidu **27** (1,025 g). Wydajność: 79%; t.t. >300°C (dimetyloformamid); IR (KBr): 3451, 3424 ( $\nu$  N-H); 2968, 2855 ( $\nu$  C-H); 1633 ( $\nu$  C=N); 1593, 1575 ( $\delta$  N-H); 1468 ( $\nu$  C=C); 1011 ( $\delta$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,03-2,05 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,53-3,54 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 6,86 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=5$  Hz); 7,46 (d, 1H, pirydyna,  $J=2$  Hz); 8,02-8,27 (m, 3H,

pirazyna+2NH); 8,91-8,93 (m, 1H, pirazyna); 8,99 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,51 (s, 1H, pirazyna); 9,90 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub> (310,17) wartości obliczone: C, 58,05; H, 5,85; N, 36,10; wartości zmierzone: C, 57,94; H, 5,99; N, 36,10.

*N'*-[Amino(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]pirazyn-2-karbohydrazonamid (**92**)

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (1,105 g). Wydajność: 38%; t.t. 282-284°C (dimetyloformamid-woda 1:1); IR (KBr): 3400, 3306 (ν N-H); 2980-2855 (ν C-H); 1604 (δ N-H); 1470, 1427 (ν C=C); 1155 (ν C-O-C); 1018, 992 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,38 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,74 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 6,80-6,92 (m, 5H, 2NH<sub>2</sub>+pirydyna); 8,22 (d, 1H, J=6 Hz); 8,63-8,69 (m, 3H, 2pirazyna+pirydyna); 9,73 (d, 1H, pirazyna, J=2 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O (326,16) wartości obliczone: C, 55,20; H, 5,56; N, 34,33; wartości zmierzone: C, 54,88; H, 5,62; N, 33,98.

#### 5.1.10. Ogólna metoda syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu 93-96

1 mmol odpowiedniej amido-azyny (**89-92**) ogrzewano w temperaturze wrzenia z 5 ml kwasu octowego. Odparowano kwas octowy i dodano lodu. Wytrącony osad odsączono, suszono i poddano rekrytalizacji z odpowiedniego rozpuszczalnika.

*2*-[5-(4-Fenoksyperydyn-2-ylo)-4H-1,2,4-triazol-3-ylo]pirazyna (**93**)

Reakcja *N'*-[amino(4-fenoksyperydyn-2-ylo)metyleno]pirazyn-2-karbohydrazonamidu **89** (0,333 g). Wydajność: 35%; t.t. 223-225°C (dimetyloformamid); IR (KBr): 3130, 3065 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2927, 2819 (ν C-H); 1578(δ N-H); 1485, 1469 (ν C=C); 1237, 1200 (δ C-H); 904 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,16-7,18 (m, 1H, pirydyna); 7,29 (d, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,36 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,53-7,56 (m, 3H, pirydyna+2ArH); 8,62-8,73 (m, 3H, pirydyna+2pirazyna); 9,27 (s, 1H, pirazyna); 15,25 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O (316,11) wartości obliczone: C, 64,55; H, 3,82; N, 26,57; wartości zmierzone: C, 64,45; H, 4,00; N, 26,70.

*2*-(5-(4-Fenylotiopyridyn-2-ylo)-4H-1,2,4-triazol-3-ylo)pirazyna (**94**)

Reakcja *N'*-[amino(4-fenylotiopyridyn-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohydrazonamidu **90** (0,349 g). Wydajność: 70%; t.t. 209-210°C (etanol); IR (KBr): 3052, 3020 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2916-2803 (ν C-H); 1586 (δ N-H); 1475, 1371 (ν C=C); 1017 (δ C-H); 786 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,17 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz);

7,52-7,66 (m, 6H, 5ArH+pirydyna); 8,52 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,71-8,75 (m, 2H, pirazyna); 9,25 (s, 1H, pirazyna); 15,10 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 118,05; 121,85; 128,60; 130,77 (2C); 130,81; 130,93 (2C); 135,50 (2C); 143,16; 143,20 (2C); 144,98; 145,57; 150,10 (2C) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>S (332,08) wartości obliczone: C, 61,43; H, 3,64; N, 25,28; wartości zmierzone: C, 61,24; H, 3,58; N, 25,14.

#### *2-(5-(4-(Pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo)-4H-1,2,4-triazol-3-ylo)pirazyna (95)*

Reakcja *N'*-{amino[(4-pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}pirazyno-2-karbo-hydrazoneamidu **91** (0,310 g). Wydajność: 44%; t.t. 275-276°C (etanol); IR (KBr): 3070 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2868 (ν C-H); 1639 (ν C=N); 1542 (δ N-H); 1457 (ν C=C); 1240 (δ C-H); 993 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,98-1,99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,33-3,36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,57-6,58 (m, 1H, pirydyna); 7,24 (s, 1H, pirydyna); 8,22 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,72 (d, 2H, pirazyna, J=24 Hz); 9,31 (s, 1H, pirazyna) 15,50 (szs, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25,35 (2C); 47,39 (2C); 104,55 (2C); 108,45; 143,24 (2C); 144,96 (2C); 145,17; 149,50; 152,46; 161,97 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub> (293,14) wartości obliczone: C, 61,42; H, 5,15; N, 33,43; wartości zmierzone: C, 61,53; H, 5,49; N, 33,37.

#### *{4-[2-(5-Pirazyn-2-ylo)-4H-1,2,4-triazol-3-ylo]pirydyn-4-ylo}morfolina (96)*

Reakcja *N'*-[amino(4-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]pirazyn-2-karbo-hydrazoneamidu **92** (0,326 g). Wydajność: 42%; t.t. 277-278°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3062 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2863, 2781 (ν C-H); 1519 (δ N-H); 1437 (ν C=C); 1140, 1022 (δ C-H); cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,28-3,30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,70-3,73 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,89-6,91 (m, 1H, pirydyna); 7,11 (s, 1H, pirydyna); 8,35 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,78 (d, 2H, pirazyna, J=12 Hz); 9,36 (s, 1H, pirazyna); 15,47 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O (309,13) wartości obliczone: C, 58,24; H, 4,89; N, 31,70; wartości zmierzone: C, 58,05; H, 5,09; N, 31,37.

### **5.1.11. Ogólna metoda syntezy pochodnych iminowych 97-112**

1 mmol odpowiedniego amidrazonu (**25-28**) rozpuszczono w 3 ml metanolu, po czym dodano 0,2 ml kwasu octowego. Następnie dodano 1 mmol heterocyklicznego metyloketonu i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Po zakończeniu ogrzewania mieszaninę reakcyjną wylano na lód i zalkalizowano 10% NaOH. Wytrącony osad

odsączone, suszono na powietrzu oraz oczyszczano poprzez krystalizację lub chromatografię kolumnową.

*4-Fenoksy-N'-[1-(pirazyn-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (97)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z acetylopirazyną (0,126 g). Wydajność: 72%; t.t. 157-158°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3454, 3316 ( $\nu$  N-H); 3047 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 1618 ( $\nu$  C=N); 1560 ( $\delta$  N-H); 1489, 1466 ( $\nu$  C=C); 1242 ( $\nu_{as}$ . C-O-C); 1012, 943 ( $\delta$  C-H), 838, 778, 692 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,10 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,23-7,56 (m, 7H, 2NH+5ArH); 7,78 (s, 1H, pirydyna); 8,53 (m, 3H, 2pirazyna+pirydyna); 9,69 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O (332,14) wartości obliczone: C, 65,05; H, 4,85; N, 25,29; wartości zmierzone: C, 65,00; H, 4,79; N, 25,30.

*4-Fenylotio-N'-[1-(pirazyn-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (98)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z acetylopirazyną (0,126 g). Wydajność: 63%; t.t. 130-131°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3472, 3332 ( $\nu$  N-H); 3039 ( $\nu$  C<sub>Ar</sub>-H); 1620 ( $\nu$  C=N); 1573, 1510 ( $\delta$  N-H); 1465, 1401 ( $\nu$  C=C); 1011 ( $\delta$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,22-7,25 (m, 3H, pirydyna+2NH); 7,59-7,63 (m, 5H, ArH); 7,87 (s, 1H, pirydyna); 8,45 (d, 1H, pirazyna, J=5 Hz); 8,58 (d, 2H, pirazyna, J=6 Hz); 9,68 (s, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>S (348,12) wartości obliczone: C, 62,05; H, 4,63; N, 24,12; wartości zmierzone: C, 61,98; H, 4,61; N, 24,07.

*N'-[1-(Pirazyn-2-ylo)etylideno]-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (99)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z acetylopirazyną (0,126 g). Wydajność: 63%; t.t. 219-220°C (metanol); IR (KBr): 3451, 3306 ( $\nu$  N-H); 2963, 2851 ( $\nu$  C-H); 1605 ( $\nu$  C=N); 1581 ( $\delta$  N-H); 1419, 1460 ( $\nu$  C=C); 1002 ( $\delta$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,78 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 2,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,11-3,14 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,18 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 6,32 (szs, 2H, NH); 6,98 (s, 1H, pirydyna); 7,89 (d, 1H, pirazyna, J=6 Hz); 8,21-8,26 (m, 2H, pirazyna+pirydyna); 9,17 (s, 1H, pirazyna) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  12,96; 25,31 (2C); 47,29 (2C); 104,38; 109,00; 143,61; 143,76; 144,10; 148,64; 150,74; 151,95; 152,18; 157,13; 157,68 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub> (309,17)



wartości obliczone: C, 62,12; H, 6,19; N, 31,69; wartości zmierzone: C, 62,04; H, 6,09; N, 31,47.

*4-Morfolino-N'-[1-(pirazyn-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (100)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z acetylopirazyną (0,126 g). Wydajność: 42%; t.t. 204-205°C (metanol); IR (KBr): 3487, 3366 (ν N-H); 2969, 2857 (ν C-H); 1619 (ν C=N); 1586 (δ N-H); 1510, 1468 (ν C=C); 1248 (ν<sub>as.</sub> C-O-C); 1120 (ν<sub>s.</sub> C-O-C); 992, 963 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,31-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,73-3,75 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,98-7,01 (m, 3H, pirydyna+2NH); 7,77 (s, 1H, pirydyna); 8,28 (d, 1H, pirazyna, J=6 Hz); 8,58-8,62 (m, 2H, pirydyna+pirazyna); 9,70 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O (325,17) wartości obliczone: C, 59,06; H, 5,89; N, 30,13; wartości zmierzone: C, 59,05; H, 5,94; N, 30,19.

*4-Fenoksy-N'-(1-(pirydyn-3-ylo)etylideno)pikolinohydrazonamid (101)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z 3-acetylopirydyną (0,115 ml). Wydajność: 75%; t.t. 119-120°C (eter dietylowy); IR (KBr): 3419, 3311 (ν N-H); 1624 (ν C=N); 1581, 1562 (δ N-H); 1489, 1442 (ν C=C); 1243, 1202 (ν C-O-C); 804, 694 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,03-7,08 (m, 3H, pirydyna+2NH); 7,24 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,34 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,41 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=5 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,52 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,74 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 8,34 (d, 1H, pirydyna, J=9 Hz); 8,53-8,56 (m, 2H, pirydyna); 9,16 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O (331,14) wartości obliczone: C, 68,87; H, 5,17; N, 21,13; wartości zmierzone: C, 68,75; H, 5,13; N, 21,20.

*4-Fenylotio-N'-[1-(pirydyn-3-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (102)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z 3-acetylopirydyną (0,115 ml). Wydajność: 56%; t.t. 134-135°C (metanol); IR (KBr): 3471, 3344 (ν N-H); 3043 (ν C-H); 1608 (ν C=N); 1557, 1538 (δ N-H); 1463, 1416, 1357 (ν C=C); 1008 (δ C-H); 762, 701 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,15 (szs, 2H, NH); 7,24 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,40 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=5 Hz); 7,57-7,58 (m, 3H, ArH); 7,65-7,66 (m, 2H, ArH); 7,84 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,34 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 8,43 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,56 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,15 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz) ppm; Analiza elementarna dla

C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S (347,12) wartości obliczone: C, 65,68; H, 4,93; N, 20,16; wartości zmierzone: C, 65,57; H, 4,93; N, 20,25.

*N'*-[1-(Pirydyn-3-ylo)etylideno]4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**103**)

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z 3-acetylopirydyną (0,115 ml). Wydajność: 69%; t.t. 200-202°C (metanol); IR (KBr): 3450, 3324 (ν N-H); 2961, 2853 (ν C-H); 2961, 2853 (ν C-H); 1589, 1570 (δ N-H); 1492, 1460 (ν C=C); 1003 (δ C-H); 819, 709, 656 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,06 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 2,56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,40-3,41 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,45-6,46 (m, 3H, pirydyna+2NH); 7,32 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=5 Hz; J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,52 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,18-8,21 (m, 2H, pirydyna); 8,60-8,61 (m, 1H, pirydyna); 9,09 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14,17; 25,32 (2C); 47,27 (2C); 104,03; 108,89; 123,72; 134,14; 134,81; 148,25; 148,58; 150,05; 150,95; 152,15; 156,13; 156,24 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub> (308,17) wartości obliczone: C, 66,21; H, 6,54; N, 27,25; wartości zmierzone: C, 66,19; H, 6,46; N, 27,13.

4-Morfolino-*N'*-(1-(pirydyn-3-ylo)etylideno)pikolinohydrazonamid (**104**)

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z 3-acetylopirydyną (0,115 ml). Wydajność: 41%; t.t. 190-191°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3445, 3314 (ν N-H); 2964, 2922, 2853 (ν C-H); 1590, 1570 (δ N-H); 1484, 1444 (ν C=C); 1252, 1125 (δ C-H); 991 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,31-3,34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,74-3,76 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,94-6,98 (m, 3H, pirydyna+2NH); 7,42 (s, 1H, pirydyna); 7,74-7,75 (m, 1H, pirydyna); 8,27-8,35 (m, 2H, pirydyna); 8,57-8,58 (m, 1H, pirydyna); 9,18-9,19 (m, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O (324,17) wartości obliczone: C, 62,95; H, 6,21; N, 25,91; wartości zmierzone: C, 62,91; H, 6,18; N, 25,79.

4-Fenoksy-*N'*-[1-(1H-indol-3-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (**105**)

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z 3-acetyloindolem (0,159 g). Wydajność: 72%; t.t. 201-202°C (metanol); IR (KBr): 3499, 3379 (ν N-H); 3058, 2923 (ν C-H); 1617 (ν C=N); 1562, 1579 (δ N-H); 1488, 1443 (ν C=C); 1241, 1201 (δ C-H); 740 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,50 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,04 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3Hz); 7,10-7,17 (m, 2H, indol); 7,26 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,33 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,41 (d, 1H, indol, J=9 Hz); 7,52 (t, 2H,

ArH, J=7 Hz); 7,74 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 7,87 (s, 1H, indol); 8,38 (d, 1H, pirydyna, J=7 Hz); 8,52 (d, 1H, indol, J=5 Hz); 11,48 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O (369,16) wartości obliczone: C, 71,53; H, 5,18; N, 18,96; wartości zmierzone: C, 71,46; H, 5,16; N, 18,75.

*4-Fenylotio-N'-[1-(1H-indol-3-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (106)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z 3-acetyloindolem (0,159 g). Wydajność: 75%; t.t. 149-150°C (metanol); IR (KBr): 3484, 3368 (ν N-H); 3058, 2923 (ν C-H); 1614 (ν C=N); 1561, 1532 (δ N-H); 1463, 1439 (ν C=C); 742, 690 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,80 (szs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,10-7,16 (m, 2H, ArH); 7,20 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,40 (d, 1H, ArH, J=9 Hz); 7,55-7,58 (m, 3H, ArH); 7,65-7,67 (m, 2H, ArH); 7,83 (s, 1H, pirydyna); 7,88 (d, 1H, ArH, J=3 Hz); 8,35 (d, 1H, ArH, J=6 Hz); 8,42 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 11,48 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S (385,14) wartości obliczone: C, 68,55; H, 4,97; N, 18,17; wartości zmierzone: C, 68,55; H, 5,02; N, 18,21.

*N'-[1-(1H-Indol-3-ylo)etylideno]-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (107)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z 3-acetyloindolem (0,159 g). Wydajność: 96%; t.t. 257-259°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3484, 3354 (ν N-H); 2921, 2853 (ν C-H); 1601 (ν C=N); 1592 (δ N-H); 1534, 1459 (ν C=C); 749 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,97-1,98 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,32-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,54-6,58 (m, 3H, pirydyna+2NH); 7,11-7,17 (m, 2H, indol); 7,39-7,40 (m, 2H, indol); 7,87 (s, 1H, pirydyna); 8,15 (d, 1H, indol, J=6 Hz); 8,40 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 11,45 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub> (346,19) wartości obliczone: C, 69,34; H, 6,40; N, 24,26; wartości zmierzone: C, 69,29; H, 6,34; N, 24,02.

*N'-[1-(1H-Indol-3-ylo)etylideno]-4-morfolinopikolinohydrazonamid (108)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z 3-acetyloindolem (0,159 g). Wydajność: 71%; t.t. 134-136°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3156 (ν N-H); 3043 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2981, 2928 (ν C-H); 1613 (ν C=N); 1577, 1524 (δ N-H); 1492, 1439 (ν C=C); 1242, 1177 (δ C-H); 941, 754, 607 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,33-3,37 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,75-3,76 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,25 (szs, 1H, NH); 6,76 (szs, 1H, NH); 6,96 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz); 7,10-7,17 (m, 2H, indol); 7,40

(d, 1H, indol, J=8 Hz); 7,73 (s, 1H, pirydyna); 7,88 (s, 1H, indol); 8,26 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,39 (d, 1H, indol, J=8 Hz); 11,46 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O (362,19) wartości obliczone: C, 66,28; H, 6,12; N, 23,19; wartości zmierzone: C, 66,22; H, 6,08; N, 23,15.

*4-Fenoksy-N'-[1-(tiofen-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (109)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazonamidu **25** (0,228 g) z 2-acetylotiofenem (0,107 ml). Wydajność: 48%; t.t. 87-88°C (metanol); IR (KBr): 3494, 3376 (ν N-H); 3073 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 1661 (ν C=N); 1616, 1563 (δ N-H); 1415 (ν C=C); 1273, 1244, 1201 (δ C-H); 941 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,85 (s, 1H, NH); 7,04-7,08 (m, 2H, NH+tiofen); 7,26-7,30 (m, 3H, pirydyna+2tiofen); 7,42 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,52-7,59 (m, 4H, ArH); 7,84 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,56 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>SO (336,10) wartości obliczone: C, 64,27; H, 4,79; N, 16,65; wartości zmierzone: C, 64,23; H, 4,88; N, 16,62.

*4-Fenylotio-N'-[1-(tiofen-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (110)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazonamidu **26** (0,244 g) z 2-acetylotiofenem (0,107 ml). Wydajność: 49%; t.t. 166-168°C (faza ruchoma aceton-chloroform 1:1); IR (KBr): 3496, 3377 (ν N-H); 3055 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2922 (ν C-H); 1614, 1565 (δ N-H); 1466, 1425 (ν C=C); 1023 (δ C-H); 750, 691 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,50 (szs, 1H, NH); 6,90 (szs, 1H, NH); 7,09 (dd, 1H, tiofen, J<sub>1</sub>=1Hz, J<sub>2</sub>=4Hz); 7,22 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,47-7,48 (m, 1H, tiofen); 7,56-7,58 (m, 4H, 3ArH+tiofen); 7,64-7,65 (m, 2H, ArH); 7,80 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,42 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (352,08) wartości obliczone: C, 61,34; H, 4,58; N, 15,90; wartości zmierzone: C, 61,23; H, 4,54; N, 15,78.

*4-Pirolidyn-ylo-N'-[1-(tiofen-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (111)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **27** (0,205 g) z 2-acetylotiofenem (0,107 ml). Wydajność: 87%; t.t. 150-151°C (metanol); IR (KBr): 3467, 3324 (ν N-H); 2962, 2854 (ν C-H); 1595, 1572 (δ N-H); 1492, 1460 (ν C=C); 1004 (δ C-H); 700 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,96-1,97 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,31-3,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,36 (szs, 1H, NH); 6,56 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 6,95 (szs, 1H, NH); 7,09 (t, 1H, tiofen, J=4 Hz); 7,35 (s, 1H, pirydyna); 7,47 (d, 1H, tiofen, J=3 Hz); 7,54 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 8,13 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm;

Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S (313,14) wartości obliczone: C, 61,31; H, 6,11; N, 22,34; wartości zmierzone: C, 61,21; H, 6,07; N, 22,30.

#### *4-Morfolino-N'-[1-(tiofen-2-ylo)etylideno]pikolinohydrazonamid (112)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazonamidu **28** (0,221 g) z 2-acetylotiofenem (0,107 ml). Wydajność: 67%; t.t. 115-116°C (faza ruchoma aceton-chloroform 1:1); IR (KBr) 3437, 3398 (ν N-H); 2923, 2857 (ν C-H); 1632 (ν C=N) 1588 (δ N-H); 1470, 1446 (ν C=C); 1255 (ν C-O-C); 1128 (δ C-H); 993 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,46-2,50 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,39 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,32 (s, 1H, NH); 6,75 (s, 1H, NH); 6,98 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,10-7,12 (m, 1H, tiofen); 7,49 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 7,55-7,56 (m, 1H, tiofen); 7,70 (d, 1H, tiofen, J=3 Hz); 8,26 (d, 1H, pirydyna, J=4 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>OS (329,13) wartości obliczone: C, 58,34; H, 5,81; N, 21,26; wartości zmierzone: C, 58,05; H, 5,79; N, 21,37.

#### **5.1.12. Ogólna metoda syntezy 4-podstawionych pikolinianów metylu 113-116**

Do 5 mmoli odpowiedniego nityrylu (1-4) dodano 40 ml metanolu i 1 ml (6,7 mmola) DBU. Mieszaninę ogrzewano 4 h w temperaturze wrzenia. Po tym czasie odparowano część metanolu i dodano 15 ml rozcieńczonego kwasu solnego (1:1). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Po tym czasie roztwór zobojętniono 10% roztworem NaHCO<sub>3</sub>. Następnie przeprowadzono trzykrotną ekstrakcję chlorkiem metylenu (3x10 ml). Otrzymany po ekstrakcji roztwór chlorku metylenu suszono MgSO<sub>4</sub>. Rozpuszczalnik odparowano i dodano wody destylowanej. Wytrącony osad odsączono, suszono i poddano rekrystalizacji.

#### *4-Fenoksypikolinian metylu (113)*

Reakcja 4-fenoksypikolinonityrylu **1** (0,980 g). Wydajność: 99%; t.t. 35-36°C (etanol); IR (KBr) 1745 (ν C=O) 1490, 1440 (ν C=C); 1299 (ν C-O-C); 1227, 1186 (δ C-H); 803, 700 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,20 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>= 2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,24 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,35 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,43 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 7,53 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 8,59 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (229,07) wartości obliczone: C, 68,11; H, 4,84; N, 6,11; wartości zmierzone: C, 68,10; H, 4,84; N, 6,08.

#### *4-Fenylopiropikolinian metylu (114)*

Reakcja 4-fenylopiropikolinonitrylu **2** (1,060 g). Wydajność: 62%; t.t. 47-48°C (etanol); IR (KBr) 1717 ( $\nu$  C=O) 1572, 1434 ( $\nu$  C=C); 1298 ( $\nu$  C-O-C); 1140 ( $\delta$  C-H); 752, 688 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,28 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,58-7,64 (m, 6H, 5ArH+pirydyna); 8,49 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S (245,05) wartości obliczone: C, 63,65; H, 4,52; N, 5,71; wartości zmierzone: C, 63,62; H, 4,46; N, 6,02.

#### *4-(Pirolidyn-1-ylo)piropikolinian metylu (115)*

Reakcja 4-pirolidynopikolinonitrylu **3** (0,865 g). Wydajność: 21%; t.t. 126-127°C (etanol); IR (KBr) 2979, 2927 ( $\nu$  C-H); 1602 ( $\nu$  C=O) 1500, 1461, 1400 ( $\nu$  C=C); 1012 ( $\delta$  C-H); 830 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,94-1,96 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,29 (t, 4H, CH<sub>2</sub>,  $J=7$  Hz); 3,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,98 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,06 (d, 1H, pirydyna,  $J=2$  Hz); 8,15 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (206,11) wartości obliczone: C, 64,06; H, 6,84; N, 13,58; wartości zmierzone: C, 64,04; H, 6,80; N, 13,49.

#### *4-Morfolinopikolinian metylu (116)*

Reakcja 4-morfolinopikolinonitrylu **4** (0,945 g). Wydajność: 21%; t.t. 105-106°C (etanol); IR (KBr) 2969, 2848 ( $\nu$  C-H); 1735 ( $\nu$  C=O) 1596, 1445 ( $\nu$  C=C); 1308, 1121, 1106 ( $\delta$  C-H); 992, 782 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,38 (t, 4H, CH<sub>2</sub>,  $J=6$  Hz); 3,68-3,72 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,06 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,45 (d, 1H, pirydyna,  $J=3$  Hz); 8,25-8,29 (m, 1H, pirydyna) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (222,10) wartości obliczone: C, 59,45; H, 6,35; N, 12,60; wartości zmierzone: C, 59,52; H, 6,53; N, 12,58.

### **5.1.13. Ogólna metoda syntezy 4-podstawionych pikolinohydrazydów 117-120**

5 mmoli estru metylowego odpowiedniego kwasu pikolinowego (**113-116**) rozpuszczono w 5 ml etanolu, po czym dodano 1 ml (1,03 g, 20 mmola) 80% wodzianu hydrazyny. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano 1 h w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu oddzielił się osad, który odsączono, suszono i rekrystalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### *4-Fenoksypikolinohydrazyd (117)*

Reakcja 4-fenoksypikolinianu metylu **113** (1,145 g). Wydajność: 69%; t.t. 110-111°C (etanol); IR (KBr) 3277 (ν N-H); 1661 (ν C=O) 1602, 1562 (δ N-H); 1524, 1489 (ν C=C); 1245 (ν C-O-C); 1205 (δ C-H); 927, 802, 694 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4,55 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,13 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,22 (d, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,33-7,36 (m, 2H, ArH); 7,51-7,54 (m, 2H, ArH+pirydyna); 8,50 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,91 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (229,09) wartości obliczone: C, 62,87; H, 4,84; N, 18,33; wartości zmierzone: C, 62,78; H, 4,84; N, 18,31.

#### *4-Fenylotipikolinohydrazyd (118)*

Reakcja 4-fenylotipikolinianu metylu **114** (1,225 g). Wydajność: 56%; t.t. 99-100°C (etanol); IR (KBr) 3302, 3197 (ν N-H); 1665 (ν C=O) 1574 (δ N-H); 1499, 1440 (ν C=C); 1118 (δ C-H); 752, 687 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4,53 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,22 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz); 7,52-7,63 (m, 6H, 5ArH+pirydyna); 8,39 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,88 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>OS (245,06) wartości obliczone: C, 58,76; H, 4,52; N, 17,13; wartości zmierzone: C, 58,78; H, 4,62; N, 17,26.

#### *4-(Pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (119)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinianu metylu **115** (1,030 g). Wydajność: 76%; t.t. 149-150°C (etanol); IR (KBr) 3312, 3274 (ν N-H); 2943, 2862 (ν C-H); 1661 (ν C=O) 1607, 1538 (δ N-H); 1508, 1482 (ν C=C); 985, 940 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,94-1,96 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,28-3,30 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz); 4,50 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,09 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,56 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,15 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,66 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O (206,12) wartości obliczone: C, 58,24; H, 6,84; N, 27,17; wartości zmierzone: C, 57,96; H, 6,79; N, 27,25.

#### *4-Morfolinopikolinohydrazyd (120)*

Reakcja 4-morfolinopikolinianu metylu **116** (1,110 g). Wydajność: 87%; t.t. 157-158°C (etanol); IR (KBr) 3302, 3196 (ν N-H); 1665 (ν C=O) 1575 (δ N-H); 1499, 1474 (ν C=C); 751, 687 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,32-3,34 (m, 4H,

CH<sub>2</sub>); 3,72 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 4,51 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,96 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,41 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 8,20 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 9,67 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (222,11) wartości obliczone: C, 54,04; H, 6,35; N, 25,21; wartości zmierzone: C, 54,03; H, 6,32; N, 25,32.

#### 5.1.14. Ogólna metoda otrzymywania hydrazydowych pochodnych iminowych 121-135

1 mmol hydrazydu (**117-120**), 1 mmol aldehydu heterocyklicznego oraz 10 ml metanolu ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 30 min. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono i dodano eteru dietylowego. Odsączono, a następnie suszono wytrącony osad. Produkt rekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

##### *N'*-Benzyliдено-4-fenoksypikolinohydrazyd (**121**)

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazydu **117** (0,229 g) z aldehydem benzoesowym (0,106 ml). Wydajność: 78%; t.t. 127-128°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3294, 3239 (ν N-H); 3065 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 1678 (ν C=O); 1573 (δ N-H); 1522, 1488 (ν C=C); 1285 (δ C-H); 757, 693 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,21 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,26 (d, 2H, ArH); 7,36 (t, 1H, ArH, J=8 Hz); 7,43-7,48 (m, 4H, ArH); 7,54 (t, 2H, ArH, J=7 Hz); 7,68-7,70 (m, 2H, ArH+pirydyna); 8,59 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,64 (s, 1H, CH); 12,15 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 110,32; 115,31; 121,46 (2C); 126,54; 127,66 (2C); 129,33 (2C); 130,70; 131,13 (2C); 134,72; 149,95; 151,08; 152,36; 153,67; 160,30; 166,11 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (317,12) wartości obliczone: C, 71,91; H, 4,76; N, 13,24; wartości zmierzone: C, 72,02; H, 4,79; N, 13,16.

##### *N'*-Benzyliдено-4-fenylopiotropikolinohydrazyd (**122**)

Reakcja 4-fenylopiotropikolinohydrazydu **118** (0,245 g) z aldehydem benzoesowym (0,106 ml). Wydajność: 60%; t.t. 142-143°C (metanol); IR (KBr): 3262 (ν N-H); 3053 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 1681 (ν C=O); 1577 (δ N-H); 1529, 1489 (ν C=C); 754, 691 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,30 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,44-7,45 (m, 3H, ArH); 7,58-7,59 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,64-7,69 (m, 5H, ArH); 8,48 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,62 (s, 1H, CH); 12,11 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 119,07; 123,49; 127,63 (2C); 128,35; 129,33 (2C); 130,70; 130,87; 130,95 (2C); 134,72; 135,64 (2C); 148,92; 149,88; 150,18; 152,22; 160,35 ppm; Analiza



elementarna dla  $C_{19}H_{15}N_3SO$  (333,09) wartości obliczone: C, 68,45; H, 4,53; N, 12,60; wartości zmierzone: C, 68,14; H, 4,38; N, 12,36.

*N'*-Benzylideno-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (**123**)

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazynu **119** (0,206 g) z aldehydem benzoowym (0,106 ml). Wydajność: 31%; t.t.  $>300^{\circ}C$  (etanol); IR (KBr): 3271, 3248 ( $\nu$  N-H); 2999, 2965, 2855 ( $\nu$  C-H); 1668 ( $\nu$  C=O); 1602 ( $\delta$  N-H); 1522, 1491 ( $\nu$  C=C); 980, 652 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,97 (t, 4H,  $CH_2$ ,  $J=6$  Hz); 3,33-3,36 (m, 4H,  $CH_2$ ); 6,66 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,18 (d, 1H, pirydyna,  $J=2$  Hz); 7,45-7,46 (m, 3H, ArH); 7,69-7,71 (m, 2H, ArH); 8,20 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz); 8,61 (s, 1H, CH); 11,94 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{17}H_{18}N_4O$  (294,15) wartości obliczone: C, 69,37; H, 6,16; N, 19,03; wartości zmierzone: C, 68,99; H, 6,16; N, 18,93.

*N'*-Benzylideno-4-morfolinopikolinohydrazyd (**124**)

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazynu **120** (0,222 g) z aldehydem benzoowym (0,106 ml). Wydajność: 44%; t.t.  $264-265^{\circ}C$  (metanol); IR (KBr): 3264 ( $\nu$  N-H); 2920, 2892 ( $\nu$  C-H); 1669 ( $\nu$  C=O); 1597 ( $\delta$  N-H); 1522, 1490, 1446 ( $\nu$  C=C); 1270 ( $\nu$  C-O-C); 11130 ( $\delta$  C-H); 992, 919, 767 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,38 (t, 4H,  $CH_2$ ,  $J=5$  Hz); 3,74 (t, 4H,  $CH_2$ ,  $J=5$  Hz); 7,06 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz); 7,45-7,47 (m, 3H, ArH); 7,53 (d, 1H, pirydyna,  $J=2$  Hz); 7,71 (t, 2H, ArH,  $J=6$  Hz); 8,30 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz); 8,62 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{17}H_{18}N_4O_2$  (310,14) wartości obliczone: C, 65,79; H, 5,85; N, 18,05; wartości zmierzone: C, 65,80; H, 5,85; N, 18,00.

4-Fenoksy-*N'*-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazyd (**125**)

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazynu **117** (0,229 g) z aldehydem 4-nitrobenzoowym (0,151 g). Wydajność: 63%; t.t.  $>300^{\circ}C$  (dioksan); IR (KBr): 3282 ( $\nu$  N-H); 1693 ( $\nu$  C=O); 1567 ( $\delta$  N-H); 1525 ( $\nu_{as}$   $NO_2$ ); 1342 ( $\nu_s$   $NO_2$ ); 884 ( $\gamma$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,24-7,27 (m, 3H, pirydyna+2ArH); 7,37 (t, 1H, ArH,  $J=7$  Hz); 7,50-7,56 (m, 3H, pirydyna+2ArH); 7,96 (d, 2H, ArH,  $J=8$  Hz); 8,29 (d, 2H, ArH,  $J=8$  Hz); 8,61 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz); 8,76 (s, 1H, CH); 12,45 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{19}H_{14}N_4O_4$  (362,10) wartości obliczone: C, 62,98; H, 3,89; N, 15,46; wartości zmierzone: C, 62,60; H, 4,10; N, 15,07.

*4-Fenylotio-N'-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazyd (126)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazynu **118** (0,245 g) z aldehydem 4-nitrobenzoesowym (0,151 g). Wydajność: 37%; t.t. 236-238°C (dioksan); IR (KBr): 3307, 3261 ( $\nu$  N-H); 1665 ( $\nu$  C=O); 1580 ( $\delta$  N-H); 1515 ( $\nu_{as}$  NO<sub>2</sub>); 1346 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 753, 690 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,33 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,58-7,61 (m, 3H, ArH); 7,66-7,68 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,95 (d, 2H, ArH, J=9 Hz); 8,30 (d, 2H, ArH, J=9 Hz); 8,52 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,74 (s, 1H, CH); 12,44 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (378,08) wartości obliczone: C, 60,31; H, 3,73; N, 14,81; wartości zmierzone: C, 60,15; H, 3,69; N, 14,53.

*N'-(4-Nitrobenzylideno)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (127)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazynu **119** (0,206 g) z aldehydem 4-nitrobenzoesowym (0,151 g). Wydajność: 26%; t.t. 215-216°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3423, 3288 ( $\nu$  N-H); 1629 ( $\nu$  C=O); 1596 ( $\delta$  N-H); 1504 ( $\nu_{as}$  NO<sub>2</sub>); 1326 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 919, 839, 750 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,97 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 3,32-3,34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,66 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,18 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 7,95 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,19 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,30 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,73 (s, 1H, CH); 12,25 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (339,13) wartości obliczone: C, 60,17; H, 5,05; N, 20,64; wartości zmierzone: C, 59,81; H, 5,28; N, 20,98.

*4-Morfolino-N'-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazyd (128)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazynu **120** (0,222 g) z aldehydem 4-nitrobenzoesowym (0,151 g). Wydajność: 70%; t.t. 230-231°C (etanol); IR (KBr): 3447 ( $\nu$  N-H); 1574 ( $\delta$  N-H); 1557 ( $\nu_{as}$  NO<sub>2</sub>); 1378 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 1298, 1080 ( $\delta$  C-H); 752, 544 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2,63-2,65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,54-3,56 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,98 (d, 1H, pirydyna, J=8 Hz); 8,17 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,31-8,38 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 8,74 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,80 (s, 1H, CH); 12,57 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (355,13) wartości obliczone: C, 57,46; H, 4,82; N, 19,71; wartości zmierzone: C, 57,45; H, 4,81; N, 19,53.

*4-Fenoksy-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazyd (129)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazynu **117** (0,229 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 72%; t.t. 229-231°C (etanol); IR (KBr): 3310, 3268 ( $\nu$  N-H); 3105 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>); 1665 ( $\nu$  C=O); 1595 ( $\delta$  N-H); 1540 ( $\nu_{as}$  NO<sub>2</sub>); 1339 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,21-7,26 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,34-7,37 (m, 2H, tiofen+ArH); 7,51-7,55 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 8,10 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 8,59 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 10,02 (s, 1H, CH); 12,61 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  110,64; 115,52; 121,43 (2C); 126,57; 130,24; 130,92; 131,07; 131,14 (2C); 143,02; 147,01; 151,18; 151,85; 153,62; 160,67; 166,11 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S (368,06) wartości obliczone: C, 55,43; H, 3,28; N, 15,21; wartości zmierzone: C, 55,49; H, 3,26; N, 14,91.

*4-Fenylotio-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazyd (130)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazynu **118** (0,245 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 63%; t.t. 183-184°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3421 ( $\nu$  N-H); 3153 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>); 2976-2855 ( $\nu$  -H); 1678 ( $\nu$  C=O); 1582 ( $\delta$  N-H); 1540 ( $\nu_{as}$  NO<sub>2</sub>); 1503, 1475 ( $\nu$  C=C); 1355 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 753 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,32 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,51 (d, 1H, tiofen, J=5 Hz); 7,57-7,66 (m, 6H, 5ArH+pirydyna); 8,10 (d, 1H, tiofen, J=5 Hz); 8,50 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,80 (s, 1H, CH); 12,58 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  119,22; 123,67; 128,20; 130,15; 130,89 (3C); 135,60 (3C); 142,91; 146,98; 148,92; 149,63; 151,38; 152,33; 160,66 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (384,04) wartości obliczone: C, 53,11; H, 3,15; N, 14,57; wartości zmierzone: C, 53,25; H, 3,21; N, 14,24.

*N'-[(5-Nitrotiofen-2-yl)metyleno]-4-(pirolidyn-1-yl)pikolinohydrazyd (131)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazynu **119** (0,206 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 65%; t.t. 252-254°C (dioksan); IR (KBr): 3184, 3084 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>); 2960, 2869 ( $\nu$  C-H); 1642 ( $\nu$  C=O); 1561 ( $\delta$  N-H); 1485, 1414 ( $\nu$  C=C); 1330 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>) 1212, 1013 ( $\delta$  C-H); 816, 774 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,98-1,99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,34-3,35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,65 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=4 Hz); 7,16 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 7,48 (d, 1H, tiofen, J=5 Hz); 8,11 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 8,19 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,81 (s, 1H, CH); 12,41

(s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S (345,09) wartości obliczone: C, 52,16; H, 4,38; N, 20,28; wartości zmierzone: C, 51,97; H, 4,28; N, 20,16.

#### *4-Morfolino-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazyd (132)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazynu **120** (0,222 g) z 5-nitro-2-tiofenokarboksyaldehydem (0,157 g). Wydajność: 65%; t.t. 214-216°C (metanol); IR (KBr): 3252 (ν N-H); 3086 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 2954 (ν C-H); 1689 (ν C=O); 1601 (δ N-H); 1516 (ν<sub>as</sub> NO<sub>2</sub>); 1339 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,37-3,38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,72-3,73 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,07 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 7,50 (m, 2H, tiofen+pirydyna); 8,10 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 8,29 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,81 (s, 1H, CH); 12,49 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S (361,08) wartości obliczone: C, 49,85; H, 4,18; N, 19,38; wartości zmierzone: C, 49,57; H, 4,51; N, 19,26.

#### *4-Fenoksy-N'-[(5-nitrofuran-2-yl)metyleno]pikolinohydrazyd (133)*

Reakcja 4-fenoksypikolinohydrazynu **117** (0,229 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 31%; t.t. 192-194°C (etanol-woda 1:1); IR (KBr): 3152, 3127 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 1691 (ν C=O); 1601 (δ N-H); 1585 (ν<sub>as</sub> NO<sub>2</sub>); 1350 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,25-7,27 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,36 (t, 1H, ArH, J=7 Hz); 7,45 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 7,78 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 7,54 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,82 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,61-8,62 (m, 1H, pirydyna); 8,72 (s, 1H, CH); 12,67 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 110,58; 114,46; 115,03; 115,65; 120,20; 121,38 (2C); 126,52; 131,09 (2C); 137,49; 150,49; 151,19; 151,85; 152,13; 160,71; 166,07 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (352,08) wartości obliczone: C, 57,96; H, 3,43; N, 15,90; wartości zmierzone: C, 58,01; H, 3,40; N, 15,88.

#### *4-Fenylotio-N'-[(5-nitrofuran-2-yl)metyleno]pikolinohydrazyd (134)*

Reakcja 4-fenylotiopikolinohydrazynu **118** (0,245 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 49%; t.t. 219-221°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3174 (ν N-H); 1673 (ν C=O); 1576 (δ N-H); 1537 (ν<sub>as</sub> NO<sub>2</sub>); 1503, 1471 (ν C=C); 1352 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1247 (ν C-O-C); 759 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,24 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 7,33 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,58-7,7,60 (m, 3H, ArH); 7,64-7,67 (m, 3H, 2ArH+pirydyna); 7,77 (d, 1H, furan, J=4 Hz); 8,50 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 8,59 (s, 1H, CH); 12,63 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 115,02;

115,64; 119,30; 123,74; 128,23; 130,90 (3C); 135,59 (3C); 137,43; 148,94; 149,56; 152,12; 152,35; 160,76 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S (368,06) wartości obliczone: C, 55,43; H, 3,28; N, 15,21; wartości zmierzone: C, 55,78; H, 3,42; N, 15,56.

*N'-[(5-Nitrofuran-2-ylo)metyleno]-4-(pirolidyn-1-yl)pikolinohydrazyd (135)*

Reakcja 4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazynu **119** (0,206 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 42%; t.t. 183-184°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3421 (ν N-H); 3153 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 2976-2855 (ν -H); 1678 (ν C=O); 1606 (δ N-H); 1506 (ν<sub>as</sub> NO<sub>2</sub>); 1353 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1020 (δ C-H); 812 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,98 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 3,35 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz); 6,68 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,20-7,27 (m, 2H, pirydyna+furan); 7,79 (d, 1H, furan, J=5 Hz); 8,20 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz), 8,60 (s, 1H, CH); 12,50 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (329,11) wartości obliczone: C, 54,71; H, 4,59; N, 21,27; wartości zmierzone: C, 54,66; H, 4,94; N, 20,95.

*4-Morfolino-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazyd (136)*

Reakcja 4-morfolinopikolinohydrazynu **120** (0,222 g) z 5-nitro-2-furaldehydem (0,141 g). Wydajność: 41%; t.t. 227-229°C (metanol); IR (KBr): 3264 (ν N-H); 1688 (ν C=O); 1597 (δ N-H); 1533 (ν<sub>as</sub> NO<sub>2</sub>); 1471 (ν C=C) 1392 (ν<sub>s</sub> NO<sub>2</sub>); 1263, 1119 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,38 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,73 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 7,08 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,24 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 7,54 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 7,79 (d, 1H, tiofen, J=4 Hz); 8,30 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 8,60 (s, 1H, CH); NH poza zasięgiem widma; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (345,11) wartości obliczone: C, 52,17; H, 4,38; N, 20,28; wartości zmierzone: C, 52,11; H, 4,35; N, 20,17.

**5.1.15. Ogólna metoda otrzymywania 1,3,4-oksadiazolo-2(3H)tionów 137-140**

4 mmole odpowiedniego hydrazynu (**117-120**) rozpuszczono w 16 ml etanolu. Następnie 4 mmole (0,240 g) KOH rozpuszczono w 2,5 ml wody destylowanej. Oba roztwory połączono i dodano 0,350 ml CS<sub>2</sub>. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Po upływie tego czasu odparowano połowę rozpuszczalnika i dodano 25 ml wody destylowanej. Mieszaninę poreakcyjną zakwaszono kwasem octowym. Wytrącony osad odsączono, suszono na powietrzu i poddano rekryształizacji z odpowiedniego rozpuszczalnika.

*5-(4-Fenoksyperydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3H)-tion (137)*

Reakcja 4-fenoksyperydynohydrazidu **117** (0,916 g). Wydajność: 93%; t.t. 199-200°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3354 (ν N-H); 3045 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 2861 (ν C-H); 1584 (δ N-H); 1510, 1485 (ν C=C); 1340 (ν C-O-C) 1238 (δ C-H); 943, 764, 688 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,17 (dd, 1H, perydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz); 7,27 (d, 2H, ArH, J=8 Hz); 7,34-7,38 (m, 2H, ArH+perydyna); 7,54 (t, 2H, ArH, J=8 Hz); 8,63 (d, 1H, perydyna, J=5 Hz); 14,20 (szs, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S (271,04) wartości obliczone: C, 57,55; H, 3,34; N, 15,49; wartości zmierzone: C, 57,54; H, 3,35; N, 15,58.

*5-(4-Fenylotioperydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3H)-tion (138)*

Reakcja 4-fenylotioperydynohydrazidu **118** (0,980 g). Wydajność: 82%; t.t. 228-229°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3033 (ν C-H<sub>Ar</sub>); 2867, 2698, 2593 (ν C-H); 1578 (δ N-H); 1337 (ν C-O-C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,24 (dd, 1H, perydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=4 Hz); 7,47 (d, 1H, perydyna, J=4 Hz); 7,58-7,7,66 (m, 5H, ArH); 8,51 (d, 1H, perydyna, J=5 Hz); 14,95 (szs, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub> (287,02) wartości obliczone: C, 54,34; H, 3,16; N, 14,62; wartości zmierzone: C, 54,30; H, 3,02; N, 14,64.

*5-[4-(Piperolidyn-1-ylo)perydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3H)-tion (139)*

Reakcja 4-(piperolidyn-1-ylo)perydynohydrazidu **119** (0,824 g). Wydajność: 79%; t.t. 109-110°C (etanol); IR (KBr) 1608, 1565 (δ N-H); 1357 (ν C-O-C); 1241 (δ C-H); 799 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,02 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J= 7 Hz); 3,50-3,52 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,84 (dd, 1H, perydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=4 Hz); 7,36 (d, 1H, perydyna, J=3 Hz); 8,11 (d, 1H, perydyna, J=7 Hz) 11,10 (szs, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>OS (248,07) wartości obliczone: C, 53,21; H, 4,87; N, 22,56; wartości zmierzone: C, 53,00; H, 4,53; N, 22,58 .

*5-(4-Morfolinoperydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3H)-tion (140)*

Reakcja 4-morfolinoperydynohydrazidu **120** (0,888 g). Wydajność: 51%; t.t. 253-254°C (etanol); IR (KBr) 2952, 2882 (ν C-H); 1606 (δ N-H); 1529, 1446 (ν C=C); 1351 (ν C-O-C); 1114 (δ C-H); 997, 947 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,61-3,66 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,71-3,75 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,19 (dd, 1H, perydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz; J<sub>2</sub>=5 Hz);

7,61 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz); 8,22 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz); 10,50 (szs, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S (264,07) wartości obliczone: C, 49,99; H, 4,58; N, 21,20; wartości zmierzone: C, 49,97; H, 4,45; N, 21,36 .

#### **5.1.16. Ogólna metoda otrzymywania hydrazydowych pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych 141-156**

1 mmol odpowiedniego 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu (**137-140**) rozpuszczono w 5 ml chlorobenzenu i dodano 1 mmol odpowiedniej aminy cyklicznej. Roztwór ogrzewano w temperaturze wrzenia od 1 do 4 h. Następnie mieszaninę poreakcyjną ochłodzono i dodano 5 ml eteru dietylowego. Wytrącony osad odsączono, suszono na powietrzu i krystalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

##### *4-Fenoksy-N'-(pirolidyno-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (141)*

Reakcja 5-(4-fenoksyperydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **137** (0,271 g) z pirolidyną (0,080 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 30%; t.t. 145-146°C (etanol); IR (KBr): 3100 (ν N-H), 2962, 2870 (ν C-H), 1644 (ν C=O), 1577 (δ N-H), 1486, 1462 (ν C=C), 1216 (ν C-O-C), 875 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,71-1,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,79-1,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,96 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz), 3,46 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz), 7,08 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz), 7,23 (d, 2H, ArH, J=40 Hz), 7,32-7,37 (m, 2H, ArH+pirydyna), 7,52 (t, 2H, ArH, J=5 Hz), 8,10 (szs, 2H, NH) 8,50 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S (342,12) wartości obliczone: C, 59,63; H, 5,30; N, 16,36; wartości zmierzone: C, 59,39; H, 5,33; N, 16,59.

##### *4-Fenylotio-N'-(pirolidyno-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (142)*

Reakcja 5-(4-fenylotiopyrydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **138** (0,287 g) z pirolidyną (0,080 ml). Czas reakcji: 1,5 h. Wydajność: 55%; t.t. 155-157°C (metanol); IR (KBr): 3434 (ν N-H); 3056 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2967, 2870 (ν C-H); 1680 (ν C=O); 1578 (δ N-H); 1497 (ν C=C); 765, 689 (ν C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,22-1,24 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,52-3,53 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,28-7,64 (m, 7H, 2pirydyna+5ArH); 8,46-8,47 (m, 1H, pirydyna); 9,45 (s, 1H, NH); 10,43 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub> (358,09) wartości obliczone: C, 59,96; H, 5,06; N, 15,63; wartości zmierzone: C, 56,80; H, 4,80; N, 15,67.

*4-(Pirolidyn-1-ylo)-N'-(pirolidyno-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (143)*

Reakcja 5-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **139** (0,248 g) z pirolidyną (0,080 ml). Czas reakcji: 4 h. Wydajność: 23%; t.t. 102-105°C (etanol-eter dietylowy 1:1); IR (KBr): 3481, 3323 ( $\nu$  N-H), 3142 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>), 2977, 2855 ( $\nu$  C-H), 1693 ( $\nu$  C=O), 1611 ( $\delta$  N-H), 1513, 1398 ( $\nu$  C=C), 1136, 1012 ( $\delta$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2,00-2,02 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 3,39-3,40 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 6,64 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=2$ Hz); 7,18-7,22 (m, 1H, pirydyna); 8,10-8,14 (m, 1H, pirydyna); 10,10 (szs, 1H, NH); 10,79 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>OS (319,15) wartości obliczone: C, 56,40; H, 6,63; N, 21,93; wartości zmierzone: C, 56,28; H, 6,70; N, 21,65.

*4-Morfolino-N'-(pirolidyno-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (144)*

Reakcja 5-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **140** (0,264 g) z pirolidyną 0,080 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 30% (etanol); t.t. 133-135°C; IR (KBr): 3200 ( $\nu$  N-H), 2967, 2865 ( $\nu$  C-H), 1676 ( $\nu$  C=O), 1589 ( $\delta$  N-H), 1498, 1447 ( $\nu$  C=C), 1122 ( $\nu$  C-O-C), 914 ( $\delta$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,89-1,90 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,34-3,39 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,54-3,56 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,72 (t, 4H, CH<sub>2</sub>,  $J=5$  Hz), 7,03 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz), 7,43 (d, 1H, pirydyna,  $J=2$  Hz), 8,26 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz), 9,53 (s, 1H, NH), 10,33 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (335,14) wartości obliczone: C, 53,71; H, 6,31; N, 20,88; wartości zmierzone: C, 53,70; H, 6,28; N, 20,84.

*4-Fenoksy-N'-(morfolino-4-karbotioylo)pikolinohydrazyd (145)*

Reakcja 5-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **137** (0,271 g) z morfoliną (0,087 ml). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 39%; t.t. 203-205°C (etanol); IR (KBr): 3206 ( $\nu$  N-H), 3069 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>), 2969, 2856 ( $\nu$  C-H), 1684 ( $\nu$  C=O), 1584 ( $\delta$  N-H), 1487, 1468 ( $\nu$  C=C), 1214 ( $\nu$  C-O-C), 1112 ( $\delta$  C-H), 873 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3,61 (t, 4H, CH<sub>2</sub>,  $J=5$  Hz), 3,82 (t, 4H, CH<sub>2</sub>,  $J=5$  Hz), 7,20 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz), 7,25 (d, 2H, ArH,  $J=21$  Hz), 7,35 (t, 1H, ArH,  $J=7$  Hz), 7,39 (d, 1H, pirydyna,  $J=3$  Hz), 7,51-7,54 (m, 2H, ArH), 8,57 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz), 9,98 (s, 1H, NH), 10,59 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (358,11) wartości obliczone: C, 56,97; H, 5,06; N, 15,63; wartości zmierzone: C, 57,27; H, 4,89; N, 15,69.



*4-Fenylotio-N'-(morfolino-4-karbotioylo)pikolinohydrazyd (146)*

Reakcja 5-(4-fenylotiopirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **138** (0,287 g) z morfoliną (0,087 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 98%; t.t. 162-163°C (etanol); IR (KBr): 3167 (ν N-H); 3046 (ν C<sub>Ar</sub>-H); 2922, 2853 (ν C-H); 1684 (ν C=O); 1579 (δ N-H); 1495 (ν C=C); 1311, 1114 (ν C-O-C); 759, 693 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,61 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 3,81 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=4 Hz); 7,29-7,30 (m, 1H, pirydyna); 7,56-7,58 (m, 4H, 3ArH+pirydyna); 7,63-7,65 (m, 2H, ArH); 8,46 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz); 9,94 (s, 1H, NH); 10,54 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 48,84; 66,11 (2C); 118,61 (2C); 123,48; 128,37; 130,84; 130,93 (2C); 135,63 (2C); 149,18; 149,76; 152,11; 161,99; 183,09 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (374,09) wartości obliczone: C, 54,52; H, 4,85; N, 14,96; wartości zmierzone: C, 54,77; H, 4,77; N, 14,66.

*N'-(Morfolino-4-karbotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (147)*

Reakcja 5-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **139** (0,248 g) z morfoliną (0,087 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 58%; t.t. 105-107°C (metanol); IR (KBr): 2959, 2849 (ν C-H), 1642 (ν C=O), 1605 (δ N-H), 1505, 1434 (ν C=C), 1106 (ν C-O-C), 922 (δ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,96 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz), 3,31 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz), 3,62 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 3,82 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 6,62 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=2 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz), 7,09 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz), 8,15 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz), 10,04 (s, 1H, NH), 10,45 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25,30 (2C), 47,37 (2C), 48,80 (2C), 66,11 (2C), 105,31, 109,46, 148,76, 149,52, 152,55, 162,70, 182,48 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (335,14) wartości obliczone: C, 53,71; H, 6,31; N, 20,88; wartości zmierzone: C, 53,59; H, 6,29; N, 20,73.

*N'-(Morfolino-4-karbotioylo)-4-morfolinopikolinohydrazyd (148)*

Reakcja 5-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **140** (0,264 g) z morfoliną (0,087 ml). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 76% (metanol); t.t. 188-190°C; IR (KBr): 3266, 3232 (ν N-H), 2964, 2920, 2854 (ν C-H), 1684 (ν C=O), 1601 (δ N-H), 1527, 1449 (ν C=C), 1257 (δ C-H), 1120 (ν C-O-C), 992, 895 (γ C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,63 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,72-3,74 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 3,82-3,83 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,03-7,04 (m, 1H, pirydyna); 7,44 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz); 8,27 (d, 1H,

pirydyna,  $J=6$  Hz); 10,03 (s, 1H, NH); 10,46 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{15}H_{21}N_5O_3S$  (351,14) wartości obliczone: C, 51,27; H, 6,02; N, 19,93; wartości zmierzone: C, 51,19; H, 5,97; N, 19,80.

*4-Fenoksy-N'-(piperydino-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (149)*

Reakcja 5-(4-fenoksyperydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **137** (0,271 g) z piperydyną (0,098 ml). Czas reakcji: 3 h. Wydajność: 50%; t.t. 132-133°C (toluen); IR (KBr): 3051, 3009 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>), 2932, 2849 ( $\nu$  C-H), 1629 ( $\nu$  C=O), 1581, 1562 ( $\delta$  N-H), 1498, 1465 ( $\nu$  C=C), 1818 ( $\nu$  C-O-C), 872 ( $\delta$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,41-1,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,51-1,58 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,92 (t, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J=6$  Hz), 3,64 (t, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J=6$  Hz), 7,05 (dd, 1H, pirydyna,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=3$  Hz), 7,23 (d, 2H, ArH,  $J=8$  Hz), 7,33-7,35 (m, 2H, ArH+pirydyna), 7,52 (t, 2H, ArH,  $J=8$  Hz), 8,48 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz), 9,40 (szs, 2H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{18}H_{20}N_4O_2S$  (356,13) wartości obliczone: C, 60,65; H, 5,66; N, 15,72; wartości zmierzone: C, 60,29; H, 5,63; N, 15,61.

*4-Fenylotio-N'-(piperydino-1-karbonotioylo)pikolinohydrazyd (150)*

Reakcja 5-(4-fenylotiopyridyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **138** (0,287 g) z piperydyną (0,098 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 13%; t.t.°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 2935, 2854 ( $\nu$  C-H); 1672 ( $\nu$  C=O); 1575 ( $\delta$  N-H); 1494 ( $\nu$  C=C)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,50-1,60 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 3,78-3,79 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 7,28 (d, 1H, pirydyna,  $J=4$  Hz); 7,56-7,65 (m, 6H, 5ArH+pirydyna); 8,45 (d, 1H, pirydyna,  $J=5$  Hz); 9,78 (s, 1H, NH); 10,53 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{18}H_{20}N_4OS_2$  (372,11) wartości obliczone: C, 58,04; H, 5,41; N, 15,04; wartości zmierzone: C, 57,86; H, 5,45; N, 14,94.

*N'-(Piperydino-1-karbotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (151)*

Reakcja 5-[4-(pirolidyn-1-ylo)perydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **139** (0,248 g) z piperydyną (0,098 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 41%; t.t. 156-157°C (metanol); IR (KBr): 2927, 2842 ( $\nu$  C-H), 1635 ( $\nu$  C=O), 1603 ( $\delta$  N-H), 1504, 1455 ( $\nu$  C=C), 1343, 1247 ( $\delta$  C-H)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,52-1,62 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 1,97-1,99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,32-3,48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,81-3,84 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,62 (d, 1H, pirydyna,  $J=3$  Hz); 7,10 (s, 1H, pirydyna); 8,15 (d, 1H, pirydyna,  $J=6$  Hz); 9,82 (s, 1H, NH); 10,40 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla  $C_{16}H_{23}N_5OS$  (333,16)

wartości obliczone: C, 57,63; H, 6,95; N, 21,00; wartości zmierzone: C, 57,56; H, 6,84; N, 21,16.

*4-Morfolino-N'-(piperydino-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (152)*

Reakcja 5-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **140** (0,264 g) z piperydyną (0,098 ml). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 69% (toluen); t.t. 108-110°C; IR (KBr): 3497, 3388 ( $\nu$  N-H), 3185 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>), 2936, 2854 ( $\nu$  C-H), 1677 ( $\nu$  C=O), 1603 ( $\delta$  N-H), 1497, 1443 ( $\nu$  C=C), 1263 ( $\delta$  C-H), 1123 ( $\nu$  C-O-C), 992, 913 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,52-1,62 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 3,33-3,35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,72 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 3,81 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 7,02 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz), 7,43 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, pirydyna, J=1 Hz), 8,26 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz), 9,80 (szs, 1H, NH), 10,41 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  24,29; 25,75 (2C); 46,02 (2C); 49,56 (2C); 66,13 (2C); 106,23; 110,70; 149,49; 150,27; 156,24; 162,54; 181,51 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (349,16) wartości obliczone: C, 54,99; H, 6,63; N, 20,04; wartości zmierzone: C, 55,15; H, 6,94; N, 20,42.

*4-Fenoksy-N'-(4-fenylopiperazyno-1-karbotioylo)pikolinohydrazyd (153)*

Reakcja 5-(4-fenoksypirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **137** (0,271 g) z *N*-fenylopiperazyną (0,151 ml). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 99%; t.t. 219-221°C (etanol); IR (KBr): 2830 ( $\nu$  C-H), 1658 ( $\nu$  C=O), 1599, 1581 ( $\delta$  N-H), 1488, 1443 ( $\nu$  C=C), 1215 ( $\nu$  C-O-C), 758, 691 ( $\gamma$  C-H) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2,95-2,96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,08-3,12 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,77 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 6,78 (k, 1H, ArH, J<sub>1</sub>=7 Hz, J<sub>2</sub>=8 Hz), 6,91-6,95 (m, 3H, ArH), 7,06 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz), 7,18-7,24 (m, 4H, ArH), 7,33 (t, 1H, ArH, J=7 Hz), 7,37 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz), 7,52 (t, 1H, ArH, J=7 Hz), 8,50 (d, 1H, pirydyna, J=5 Hz), 2NH poza zasięgiem widma; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  45,07, 47,13, 48,44, 48,83, 109,03, 113,75, 115,95, 116,02 (2C), 119,29, 119,59, 121,46, 126,29, 129,41 (2C), 131,06, 150,84, 151,54, 153,88, 154,55, 156,49, 165,86, 175,35 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (433,16) wartości obliczone: C, 63,72; H, 5,35; N, 16,15; wartości zmierzone: C, 63,35; H, 5,04; N, 16,44.

*N'-(4-Fenylopiperazyno-1-karbonotioylo)-4-fenylopiopikolinohydrazyd (154)*

Reakcja 5-(4-fenylopiopirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **138** (0,287 g) z *N*-fenylopiperazyną (0,151 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 95%; t.t. 125-127°C

(metanol); IR (KBr): 3054 ( $\nu$  C-H<sub>Ar</sub>); 2827 ( $\nu$  C-H); 1644 ( $\nu$  C=O); 1598, 1573 ( $\delta$  N-H); 1496, 1439 ( $\nu$  C=C); 1223 ( $\delta$  C-H); 758, 691 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,05 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,12 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,18 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 3,82 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz); 6,75-6,82 (m, 1H, pirydyna); 6,93-6,95 (m, 3H, ArH); 7,17-7,24 (m, 4H, ArH); 7,56-7,64 (m, 4H, 3ArH+pirydyna); 8,42 (d, 1H, pirydyna); 2NH poza zasięgiem widma; ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  44,29; 47,36 (2C); 48,66; 115,92; 116,23 (2C); 118,21; 119,99; 122,36; 128,68; 129,38; 129,49 (2C); 130,67; 130,84; 135,53; 148,92; 151,06; 151,45; 151,57; 157,79; 177,16 ppm; Analiza elementarna dla C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub> (449,13) wartości obliczone: C, 61,44; H, 5,16; N, 15,58; wartości zmierzone: C, 61,12; H, 5,29; N, 15,21.

*N'*-(4-Fenylopiperazyno-1-karbotioylo)-4-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazyd (**155**)

Reakcja 5-[4-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **139** (0,248 g) z *N*-fenylopiperazyną (0,151 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 52%; t.t. 214-215°C (dioksan); IR (KBr): 3155 ( $\nu$  N-H), 2977, 2854 ( $\nu$  C-H), 1642 ( $\nu$  C=O), 1604 ( $\delta$  N-H), 1505, 1429 ( $\nu$  C=C), 1220 ( $\delta$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,08 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=7 Hz), 3,19 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz), 3,31-3,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,93 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 6,59 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz), 6,79 (t, 1H, ArH, J=7 Hz), 6,95 (d, 2H, ArH, J=8 Hz), 7,09 (d, 1H, pirydyna, J=2 Hz), 7,22 (t, 2H, ArH, J=8 Hz), 8,14 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz), 10,00 (szs, 1H, NH), 10,75 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>OS (410,19) wartości obliczone: C, 61,44; H, 6,38; N, 20,47; wartości zmierzone: C, 61,23; H, 6,32; N, 20,29.

*N'*-(4-Fenylopiperazyno-1-karbotioylo)-4-morfolinopikolinohydrazyd (**156**)

Reakcja 5-(4-morfolinopirydyn-2-ylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu **140** (0,264 g) z *N*-fenylopiperazyną (0,151 ml). Czas reakcji: 4 h. Wydajność: 99% (etanol); t.t. 197-198°C; IR (KBr): 3309, 3192 ( $\nu$  N-H), 2961-2845 ( $\nu$  C-H), 1672 ( $\nu$  C=O), 1601 ( $\delta$  N-H), 1499 ( $\nu$  C=C), 992 ( $\delta$  C-H), 762 ( $\gamma$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,22 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5Hz), 3,34 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 3,72 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 3,99 (t, 4H, CH<sub>2</sub>, J=5 Hz), 6,80 (t, 1H, ArH, J=7 Hz), 6,97 (d, 2H, ArH, J=8 Hz), 7,03 (dd, 1H, pirydyna, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=3 Hz), 7,23 (t, 2H, ArH, J=7 Hz), 7,44 (d, 1H, pirydyna, J=3 Hz), 8,26 (d, 1H, pirydyna, J=6 Hz), 10,04 (s, 1H, NH), 10,49 (s, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  46,02 (2C), 48,09 (2C), 48,15 (2C), 66,13 (2C), 106,28, 110,72, 115,92 (2C), 119,59, 129,46 (2C), 149,50, 150,30, 150,93, 156,24, 162,57, 182,18 ppm;

Analiza elementarna dla  $C_{21}H_{26}N_6O_2S$  (426,18) wartości obliczone: C, 59,13; H, 6,14; N, 19,70; wartości zmierzone: C, 59,22; H, 6,03; N, 19,88.

## 5.2. Aktywność biologiczna

### 5.2.1. Aktywność przeciwgruźlicza

Związki **9-24**, **33-88**, **93-112** oraz **141-156** zostały przebadane klasyczną metodą probówkową polegającą na sukcesywnym rozcieńczaniu w modyfikacji Proskauera i Becka na podłożu płynnym Youmansa z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej [148,149]. Zawiesiny bakteryjne przygotowano z 14-dniowych kultur wolno rosnących szczepów i z 48-godzinnych kultur szczepów saprofitycznych [150]. Otrzymane związki były rozpuszczane w glikolu etylenowym w stężeniu 10 mg/ml. Następnie przygotowywano rozcieńczenia w postępie geometrycznym w pożywce Youmansa. Inkubacje prowadzono w temperaturze 37°C przez 21 dni. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) określono jako minimalne stężenie, które hamuje wzrost badanych szczepów gruźlicy. Jako próbę kontrolną stosowano pożywkę niezawierającą testowanych związków.

Natomiast związki **121-136** zostały przebadane metodą mikrorozcieńczeń w 96 dołkowych płytkach mikrolitrowych stosując bulion Middlebrook 7H9 wzbogacony o 10% OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase) [151]. Roztwór podstawowy badanego związku był przygotowywany w DMSO, a następnie rozcieńczany czterokrotnie w bulionie Middlebrook 7H9 wzbogaconym o 10% OADC. Związki rozcieńczono seryjnie w sterylnych 96-studzienkowych płytkach do mikromiareczkowania, stosując 100 µl pożywki bulionowej Middlebrook 7H9 z OADC. Testowane związki były badane w stężeniach od 512 µg/ml do 0,0625 µg/ml. Na każdej płytce zostały także przygotowane próby kontrolne pozbawione substancji hamującej wzrost oraz bez inokulacji. Inkubacje prowadzono analogicznie jak we wcześniejszej metodzie w temperaturze 37°C przez 21 dni. Po okresie inkubacji do każdej studzienki dodano 30 µl roztworu błękitu Alamar, a następnie inkubowano płytkę ponownie przez 24 h. Wzrost był wskazywany przez zmianę koloru z niebieskiego na różowy, a najniższe stężenie związku, które zapobiegło zmianie koloru, odnotowano jako jego MIC [152,153]. Do porównania zastosowano izoniazyd (INH) jako lek referencyjny (H<sub>37</sub>Rv MIC=0,125 µg/ml; Spec. 210 MIC= 8 µg/ml).

Zastosowanie dwóch różnych metod było spowodowane zmianą procedury badawczej w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

### 5.2.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Związki zostały przebadane metodą mikrorozcieńczeń z użyciem bulionu Mueller-Hintona oraz Mueller-Hintona z 5% lizowaną krwią owczą w przypadku bakterii wybrednych oraz niewybrednych lub bulionu Mueller-Hintona z 2% glukozy do wzrostu grzybów. W pierwszym etapie rozpuszczone w DMSO związki rozcieńczano do stężenia 1000 µg/ml w podłożu odpowiednim dla bakterii lub grzybów. Następnie stosując to samo podłoże, wykonano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w celu uzyskania końcowych stężeń testowanych związków w zakresie od 0,98 do 1000 µg/ml. W sterylnych 96-studzienkowych płytkach mikrotitracyjnych umieszczono 200 µl odpowiedniego rozcieńczenia badanych pochodnych w pożywce bulionowej. Inokulę przygotowano ze świeżymi hodowlami drobnoustrojów w sterylnym 0,85% NaCl w celu dostosowania do zmętnienia 0,5 wzorca McFarlanda, a następnie dodano 2 µl do studzienek, aby uzyskać końcową gęstość  $1,5 \times 10^6$  jednostek tworzących kolonie (CFU)/ml dla bakterii i  $5 \times 10^4$  CFU dla drożdży. Płytki ze szczepami bakteryjnymi inkubowano w 35°C przez 24 h natomiast ze szczepami drożdży w 30°C przez 48 h. MIC oceniano wizualnie jako najniższe stężenie wykazujące całkowite zahamowanie wzrostu szczepów referencyjnych. Na każdej mikropłytkce umieszczono także kontrolę DMSO: kontrolę pozytywną (zawierającą inokulum bez substancji testowanych) oraz kontrolę ujemną (zawierającą badane pochodne bez inokulum). Aby wyznaczyć minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) bądź minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) pobierano 10 µl kultury drobnoustroju z każdej studzienki, która wykazywała hamowanie wzrostu i наносono na płytki agarowe. Płytki inkubowano w 35°C przez 24 h. MBC/MFC określano jako najniższe stężenie badanych związków, przy którym nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów. Ciprofloksacyna, wankomycyna oraz nystatyna były stosowane jako leki referencyjne.

### 5.2.3. Aktywność cytotoksyczna

Związki były rozpuszczane w DMSO do stężenia 20 mg/ml, a następnie rozcieńczane wodą dejonizowaną w celu osiągnięcia następujących stężeń 1, 5, 20 oraz 100 µg/ml. Askorbylofosforan magnezu (MAP) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) były stosowane jako kontrola pozytywna. Woda dejonizowana była stosowana jako kontrola negatywna. Ludzkie fibroblasty skórne (ATCC PCS-201-010) i mysie komórki czerniaka B16-F10 (ATCC CRL-6475, Manassas, VA) wysiano w ilości 6000

komórek/studzienkę na 96-studzienkowej płytce z wolnym od fenolu DMEM uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęca (FBS) i pożywką CnT-57 (Zen-Bio), a następnie dodano próbki związków w trzech powtórzeniach. Kulturę inkubowano przez 72 h. MTT (bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy, Sigma, St. Louis, MO) dodano do hodowli komórkowych pod koniec 72-godzinnego okresu inkubacji. Inkubację prowadzono przez dodatkowe 2,5 h. Pożywki hodowlane następnie odrzucono, a wewnątrzkomórkowy produkt redukcji MTT, formazan, rozpuszczono w izopropanolu. Sygnał kolorymetryczny proporcjonalny do liczby komórek mierzono spektrofotometrem BioRadmicroplate 3550-UV przy 550 nm.

## 6. WNIOSKI

W ramach pracy doktorskiej otrzymano 156 pochodnych pikolinonitrylu, z czego 142 nie zostały dotychczas opisane w literaturze. Struktury związków zostały potwierdzone za pomocą spektroskopii IR,  $^1\text{H}$  NMR oraz analizy elementarnej. Dla wybranych związków analiza strukturalna została poszerzona o spektroskopię  $^{13}\text{C}$  NMR. Ponadto dla 3 związków wykonano analizę rentgenograficzną. Struktura związku **12** została także zbadana za pomocą temperaturowej spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR.

Spośród otrzymanych związków 121 zostało przebadanych pod kątem aktywności przeciwgruźliczej na dwóch szczepach *M. tuberculosis*. Badania przeciwdrobnoustrojowe poszerzone o bakterie G(+), G(-) oraz drożdże zostały wykonane dla 28 pochodnych. Aktywność cytotoksyczna została przebadana dla 16 amidrazonowych pochodnych cykloalkiloamino tiosemikarbazydowych. Dzięki niniejszej pracy możliwe było przeprowadzenie analizy zależności struktura aktywność i wyłonienie elementów strukturalnych kluczowych dla występowania działania tuberkulostatycznego.

W oparciu o uzyskane rezultaty sformuowano następujące wnioski:

1. Reakcja 4-podstawionych pirydynometyloiminoestrów (**5-8**) z cykloalkiloamino karbotiohydrazdami prowadzi do otrzymania pochodnych cykloalkiloamino tiosemikarbazydowych (**9-24**). Na podstawie analizy budowy strukturalnej pochodnej **12** można stwierdzić, że przyjmuje ona dwie formy tautomeryczne, w których proton może występować przy atomie azotu N-2 bądź N-3. Proton ten tworzy wiązania wodorowe z atomem azotu N-2 obecnym w układzie heterocyklicznym oraz atomem siarki S-1, co prowadzi do utworzenia formy planarnej. Ponadto w kryształach związek przyjmuje budowę zwiteryonową gromadząc ładunek ujemny na atomie siarki S-1 oraz ładunek dodatni na atomie azotu N-3.
2. W wyniku reakcji metyloiminoestrów (**5-8**) z hydrazyną lub metylohydrazyną powstają amidrazony (**25-32**). Analiza widma  $^1\text{H}$  NMR oraz energia całkowita wyznaczona metodami chemii obliczeniowej świadczą, iż pochodna **25** przyjmuje formę tautomeryczną imidu hydrazydowego.
3. Reakcja kondensacji amidrazonów (**25-32**) z izotiocyanianami doprowadziła do syntezy pochodnych tiosemikarbazydowych (**33-64**) posiadających atom azotu niebędący elementem układu cyklicznego.



4. Stwierdzono, iż reakcja kondensacji amidrazonów (25-28) oraz hydrazydów (117-120) z aldehydami zachodzi bez konieczności dodatku katalizatora kwasowego. W wyniku tej reakcji powstają związki posiadające ugrupowanie azometinowe (65-80, 121-136). Analiza rentgenograficzna wykazała, że dzięki wewnątrzcząsteczkowym wiązaniom wodorowym pomiędzy protonami grupy aminowej, a atomem azotu pierścienia pirydyny i atomem azotu N-1 związek 67 przyjmuje konformację planarną.
5. Ortomrówczan trietylu reaguje z amidrazonami (25-32) ulegając cyklizacji do pochodnych 1,2,4-triazolu (81-88). Pochodne triazolowe (93-96) powstają także w wyniku dwuetapowej reakcji amidrazonów (25-28) z metyloiminoestrami. W pierwszym etapie zachodzi reakcja kondensacji z utworzeniem amido-azyny (89-92), a następnie pod wpływem kwasu octowego dochodzi do zamknięcia i utworzenia struktury cyklicznej. Wbrew założeniom, amidrazony (25-28) w reakcji z heterocyklicznymi metyloketonami nie ulegają reakcji cyklizacji, a jedynie reakcji kondensacji tworząc związki o budowie łańcuchowej (97-112). Strukturę tych związków definitywnie potwierdzono analizą rentgenograficzną wykonaną dla związku 102.
6. Reakcja hydrazydów (117-120) z trietyloaminą (TEA), disiarczkiem węgla oraz jodkiem metylu prowadzi do otrzymania pochodnej dimetylowej, a nie jak oczekiwano pochodnej monometylowej. W związku z tym zastosowano, alternatywną metodę syntezy cykloalkilamino tiosemikarbazydów (141-156). Odpowiednie hydrazydy poddano cyklizacji do oksadiazolotionów (137-140) w wyniku reakcji z disiarczkiem węgla wobec wodorotlenku potasu w mieszaninie wody i etanolu. Następnie pierścień cykliczny został ponownie otwarty w wyniku reakcji z aminą cykliczną, dając produkt końcowy o budowie łańcuchowej.
7. Najwyższą aktywność tuberkulostatyczną wykazały pochodne cykloalkilamino tiosemikarbazydowe (9-24). Obecność pierścienia pirolidyny oraz morfoliny przy łańcuchu tiosemikarbazydowym pozytywnie wpływa na wzrost aktywności przeciwpłatkowej. Podstawnik fenylopiperazynowy nie jest korzystny dla aktywności tuberkulostatycznej. Potwierdza to fakt, iż pochodne posiadające fenylopiperazynę w swojej strukturze wykazywały najniższą aktywność. Stwierdzono, że zamiana aminy cyklicznej przy łańcuchu tiosemikarbazydowym na alkilaminę powoduje spadek aktywności.

Podstawienie protonu grupy NH związków tiosemikarbazydowych grupą metylową również powoduje znaczny spadek aktywność, a wręcz jej zanik. Na podstawie obliczeń kwantowo-chemicznych stwierdzono, iż w grupie pochodnych tiosemikarbazydowych wraz ze wzrostem logP spada zdolność do hamowania wzrostu prątków. Ponadto związki posiadające wysoki moment dipolowy, wykazywały wyższą aktywność tuberkulostatyczną. Zamiana grupy aminowej na grupę karbonylową skutkowała obniżeniem aktywności nawet 31 razy.

8. Amidrazonowe oraz hydrazydowe pochodne iminowe wykazały niższą aktywność niż pochodne cykloalkiloaminiotiosemikarbazydowe, co świadczy o istotnym znaczeniu grupy tioamidowej na działanie przeciwgruźlicze. Wzrost aktywności nastąpił w przypadku obecności ugrupowania 5-nitrofurylowego oraz pierścienia tiofenowego.
9. Cyklizacja z utworzeniem 1,2,4-triazolowych pochodnych pikolinonitrylu spowodowała znaczny spadek aktywności.
10. Związek **9** wykazał najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wybranego do badań panelu bakterii G(+), G(-) oraz drożdży. Wykazał on także najwyższą aktywność przeciwgruźliczą. A zatem stwierdzono, iż związek **9** nie wykazuje selektywnego działania wobec *M. tuberculosis*. Pochodne **15** oraz **16**, o bardzo dobrej aktywności przeciwgruźliczej, charakteryzowały się niższą aktywnością hamującą wzrost bakterii G(+) niż prątków gruźlicy. Stwierdzono, iż badane związki wykazywały niską lub brak aktywności hamującej wzrost bakterii G(-) oraz drożdży. Świadczy to o dużej selektywności tych pochodnych. Zaobserwowano, podobnie jak w przypadku aktywności przeciwgruźliczej, niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową pochodnych hydrazydowych niż ich analogów amidrazonowych.
11. Stwierdzono, że pochodne o budowie 1,2,4-triazolu nie wykazują aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec testowanych szczepów bakterii G(+), G(-), drożdży oraz *M. tuberculosis*.
12. Pochodne cykloalkiloaminiotiosemikarbazydowe o najwyższej aktywności tuberkulostatycznej **9**, **13**, **14**, **15** i **16** wykazały znikomą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej HDF oraz znacząco silniej hamowały wzrost komórek nowotworowych niż nie zmienionych nowotworowo.

13. Stwierdzono, że związek **15**, ze względu na bardzo dobrą aktywność tuberkulostatyczną, znacząco mniejszą aktywność wobec innych testowanych drobnoustrojów oraz dobry profil cytotoksyczny i brak zmian morfologicznych w komórkach fibroblastów, wyróżnia się na tle pozostałych związków i jest dobrym kandydatem do dalszych badań nad rozwojem leków przeciwgruźliczych.

## 7. STRESZCZENIE

Poszukiwanie nowych leków przeciwgruźliczych jest nadal aktualnym tematem badawczym ze względu na rosnącą oporność *Mycobacterium tuberculosis*, pojawienie się szczepów wielolekoopornych (MDR-TB) oraz szczepów o rozszerzonej oporności (XDR-TB). Co więcej, nasilające się zjawisko migracji ludności skutkuje problemami nie tylko w sektorze politycznym, społecznym czy ekonomicznym, ale także w sektorze medycznym. Masowe przemieszczanie się ludności tworzy realne zagrożenie bezpieczeństwa epidemiologicznego wynikające m.in. z innej wirulentności oraz innych wzorców oporności szczepów bakteryjnych obecnych w krajach migrantów. Duży potencjał biologiczny polegający na hamowaniu wzrostu prątków gruźlicy zaobserwowano w grupie pochodnych tiosemikarbazydowych oraz pochodnych pirydyny. Analogiczną tendencję potwierdził zespół badawczy Katedry i Zakładu Chemii Organicznej GUMed.

W części teoretycznej scharakteryzowano izoniazyd i jego pochodne, a także zaprezentowano związki o aktywności tuberkulostatycznej testowane w różnych fazach badań klinicznych. Ponadto dokonano przeglądu literaturowego na temat aktywności przeciwprątkowej związków posiadających w swojej strukturze pierścień pirydyny oraz fragment hydrazynokarbotioamidowy.

W niniejszej pracy doktorskiej zaprojektowano syntezę nowych pochodnych pikolinonitrylu. Wśród zaprojektowanych związków znajdowały się pochodne o budowie tiosemikarbazydowej, iminowej oraz 1,2,4-triazolu.

4-Chloropikolinonitryl posiadający w swojej strukturze pierścień pirydyny stanowił substrat wyjściowy do zaprojektowanych syntez. W pierwszym etapie atom chloru w pozycji C-4 pierścienia pirydyny został poddany reakcji podstawienia (**1-4**). Podstawione pochodne pikolinonitrylu przeprowadzono w metyloiminoestry (**5-8**) w obecności metanolu i DBU, bądź metanolu i sodu metalicznego. Następnie w wyniku reakcji metyloiminoestrów z cykloalkiloaminokarbotiohydrazynami otrzymano pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe (**9-24**) posiadające fragment amidrazonowy. W celu otrzymania pozostałych pochodnych o budowie tiosemikarbazydowej, metyloiminoestry w reakcji z hydrazyną lub metylohydrazyną zostały przeprowadzone w amidrazony (**25-32**), które następnie poddano reakcji z odpowiednimi izotiocyjanianami (**33-64**). Kolejną serię związków stanowiły pochodne iminowe (**65-80**), które otrzymano w wyniku kondensacji amidrazonów z aldehydami.

Zaprojektowano także reakcje cyklizacji amidrazonów lub metyloamidrazonów z ortomrówczanem trietylu, metyloiminoestrami oraz heterocyklicznymi metyloketonami. Reakcje te miały doprowadzić do otrzymania pochodnych 1,2,4-triazolu. Cyklizacja z udziałem ortomrówczanu trietylu oraz metyloiminoestrem przebiegła zgodnie z założeniami (81-88, 93-96). Natomiast nie udało się otrzymać produktów o budowie cyklicznej w wyniku reakcji amidrazonów z metyloketonami. Efektem tej reakcji były pochodne o budowie łańcuchowej posiadające ugrupowanie azometinowe (97-112).

W celu otrzymania hydrazydowych analogów pochodnych iminowych oraz cykloalkiloaminoiosemikarbazydowych, iminoestry poddano kwasowej hydrolizie przekształcając je w estry (113-116). Następnie estry poddano reakcji z hydrazyną, otrzymując hydrazydy (117-120). Hydrazydy stanowiły punkt wyjściowy do pozostałych syntez. W wyniku ich kondensacji z aldehydami otrzymano związki o budowie iminowej (121-136) będące analogami uprzednio otrzymanych pochodnych iminowych, w których grupa aminowa jest zastąpiona grupą karbonylową. Ponadto hydrazydy zostały poddane reakcji cyklizacji z CS<sub>2</sub> w obecności KOH, tworząc odpowiednie oksadiazolotony (137-140). W wyniku ich reakcji z odpowiednią aminą cykliczną pierścień heterocykliczny uległ otwarciu tworząc pochodne cykloalkiloaminoiosemikarbazydowe posiadające w swojej strukturze grupę karbonylową (141-156).

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono syntezę 156 związków. Struktura otrzymanych pochodnych została potwierdzona za pomocą spektroskopii IR, <sup>1</sup>H NMR oraz analizy elementarnej. Dla wybranych związków analiza strukturalna została poszerzona o spektroskopię <sup>13</sup>C NMR, analizę rentgenograficzną oraz widmo temperaturowe <sup>1</sup>H NMR.

Produkty końcowe zostały poddane ocenie aktywności biologicznej pod kątem działania tuberkulostatycznego. Badanie zostało przeprowadzone na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis*: standardowym H37Rv oraz szczepie klinicznym izolowanym od pacjentów Spec. 210, który wykazał oporność wobec izoniazydu, rifampicyny, etambutolu oraz kwasu *p*-aminosalicylowego. Amidrazonowe pochodne cykloalkiloaminoiosemikarbazydowe wykazywały najwyższą aktywność przeciwprątkową. Pięć spośród badanych związków wykazywało zdolność do hamowania wzrostu bakterii (MIC 0,4-3,1 µg/ml) wyższą lub porównywalną z lekiem referencyjnym, jakim był izoniazyd. Zaobserwowano, iż w tej grupie związków obecność

pierścienia morfoliny lub pirolidyny przy łańcuchu tiosemikarbazydowym ma znaczny wpływ na wzrost aktywności.

Dla amidrazonowych i hydrazydowych pochodnych cykloalkiloamino-tiosemikarbazydowych wykonano również poszerzone badania mikrobiologiczne wobec panelu bakterii G(+), G(-) oraz drożdży w celu sprawdzenia selektywności działania. Cykloalkiloamino-tiosemikarbazydy o budowie amidrazonowej zostały także przebadane pod kątem działania cytotoksycznego na linii komórkowej fibroblastów ludzkiego naskórka (HDF) oraz czerniaka mysiego (B16-F10).

Otrzymane wyniki pozwoliły przeprowadzić jakościową analizę zależności struktura aktywność, określić elementy strukturalne odpowiedzialne za występowanie aktywności oraz wybrać grupę związków o najwyższym potencjale tuberkulostatycznym.

## SUMMARY

The search for new antitubercular drugs is still a current research topic due to the increasing resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, the emergence of multidrug resistant strains (MDR-TB) and extensively drug resistant strains (XDR-TB). Moreover, the growing phenomenon of human migration results in problems not only in the political, social or economical sector but also in the medical one. The mass movement of people creates a real threat for epidemiological safety resulting from other virulence and resistance patterns of bacterial strains present in migrant countries. In the group of thiosemicarbazide and pyridine derivatives the high biological potential of inhibiting growth of *Mycobacterium tuberculosis* was observed. The similar trend was confirmed by the research team from the Department of Organic Chemistry at the Medical University of Gdańsk.

In the theoretical part isoniazid and its derivatives were characterized. Compounds with tuberculostatic activity tested in various phases of clinical trials were also presented. In addition, a literature review about antimycobacterial activity of compounds with pyridine and hydrazinecarbothioamide moiety was conducted.

In the presented dissertation the synthesis of novel picolinonitrile derivatives was designed. Derivatives with thiosemicarbazide, imine and 1,2,4-triazole structures occurred among the designed compounds.

4-Chloropicolinonitrile possessing pyridine ring in its structure was a starting substrate to designed syntheses. In the first step the chlorine atom at the C-4 position of the pyridine ring underwent the substitution reaction (**1-4**). Substituted picolinonitrile derivatives were converted into methyliminoesters (**5-8**) in the presence of methanol and DBU or methanol and metallic sodium. Subsequently the cycloalkylaminethiosemicarbazide derivatives (**9-24**) with amidrazone moiety were obtained in the reaction between methyliminoesters and cycloalkylamino-1-carbothiohydrazides. In order to obtain remaining compounds with thiosemicarbazide moiety, methyliminoesters were converted in the reaction with hydrazine or methylhydrazine to the amidrazones (**25-32**), which then reacted with appropriate isothiocyanates (**33-64**). The next series of compounds were imine derivatives (**65-80**) which were obtained by condensation of amidrazones with aldehydes.

The cyclization reactions of amidrazones or methylamidrazones with triethyl orthoformate, methyliminoesters and heterocyclic methylketones were also designed.

These reactions led to obtain the 1,2,4-triazole derivatives. Cyclization with triethyl orthoformate and methyliminoester proceeded as predicted (**81-88, 93-96**). However, the products with cyclic structure in the reaction between amidrazones and methylketones were not obtained. The effect of these reactions were derivatives of chain structure possessing an azomethine group (**97-112**).

In order to obtain hydrazide analogues of imine and cycloalkylaminethiosemicarbazide derivatives iminoesters were subjected to the acidic hydrolysis reactions. These reactions transformed iminoesters into esters (**113-116**). Then hydrazides (**117-120**) were received in the reaction between hydrazine and appropriate esters. The hydrazides were the starting point for further syntheses. As the results of their condensation with aldehydes compounds with imine structure (**121-136**) were obtained. The compounds were analogues of previously obtained imine derivatives, in which the amino group was replaced with a carbonyl group. Moreover, hydrazides were subjected to the cyclization reactions with CS<sub>2</sub> in the presence of KOH to form oxadiazolothiones (**137-140**). As a result of their reactions with the cyclic amines the heterocyclic rings were opened to form cycloalkylaminethiosemicarbazide derivatives with a carbonyl group in their structure (**141-156**).

As a part of this dissertation 156 compounds were synthesized. The structure of obtained compounds were confirmed by IR, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and elemental analysis. For selected compounds the structural analysis was extended by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, X-ray analysis and <sup>1</sup>H NMR temperature spectra.

The final products have been evaluated for their antitubercular activity. The study was conducted on two *Mycobacterium tuberculosis* strains: standard H37Rv and “wild-type” strain isolated from patients Spec. 210, which is resistant against isoniazid, rifampicin, ethambutol and p-aminosalicylic acid.

Amidrazone derivatives of cycloalkylaminethiosemicarbazide exhibited the highest antimycobacterial activity. Five of the tested compounds have the ability to inhibit mycobacterial growth (MIC 0,4-3,1 µg/mL) higher or comparable to the reference drug isoniazid. It was observed that the presence of morpholine or pyrrolidine ring at the end of thiosemicarbazide chain have substantial influence on the increase of antitubercular activity of this group of compounds.

Extended microbiological assays against on bacteria G(+), G(-) and yeasts were performed for amidrazone and hydrazide derivatives of cycloalkylaminethiosemicarbazide to check their selectivity.



Cycloalkylaminethiosemicarbazides with amidrazone moiety were also tested for their cytotoxic activity on human dermal fibroblasts (HDF) and mouse melanoma cell line (B16-F10).

Received results allowed to conduct the qualitative analysis of structure activity relationship, determine the structural element significant for tuberculostatic activity and select a group of compounds with the highest antitubercular potential.

## 8. WYKAZ SKRÓTÓW

ATCC - ang. *American Type Culture Collection*

B16-F10 - linia komórkowa czerniaka mysiego

CADD - komputerowo wspomagane projektowanie leków

CIP - ciprofloksacyna

CRISPR - ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CSD – ang. *Cambridge Structural Database*

DBU - 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en

DMSO - dimetylosulfotlenek

DOTS - ang. *directly observed treatment short-course*

DprE1 - dekaprenylofosforylo- $\beta$ -D-rybozo-20-epimeraza

ethA - gen kodujący monoksygenazę

FAS II - syntaza kwasu tłuszczowego II

HDF - linia komórkowa fibroblastów ludzkiego naskórka

HIV - ludzki wirus niedoboru odporności

IC<sub>50</sub> - stężenie hamujące w 50% wzrost komórek lub aktywność procesów biologicznych

InhA - reduktaza enoilo-ACP

IRIS - zapalny zespół rekonstrukcji immunologicznej

IR - spektroskopia w podczerwieni

KatG - katalazo-peroksydaza

MBC - minimalne stężenie bakteriobójcze

MDR-TB – ang. *multidrug resistant tuberculosis*

MIC - minimalne stężenie hamujące

MmpL3 - mykobakteryjne białko błonowe

MOTT – ang. *mycobacteria other than tuberculosis*

NMR - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

NYT - nystatyna

ORTEP - ang. Oak Ridge Thermal Elipsoid Plot, program komputerowy do wykonywania rysunków struktur krystalicznych

Ptp - białka należące do fosfataz tyrozynowych

QcrB - podjednostka cytochromu bc1

STAND - badanie kliniczne, ang. *Shortening Treatments by Advancing Novel Drugs*

TEA - trietyloamina

TLC - cienkowarstwowa chromatografia cieczowa

VAN - wankomycyna

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia

XDR-TB - ang. *extensively drug resistant tuberculosis*

## 9. PIŚMIENNICTWO

- [1] T.M. Daniel, The history of tuberculosis, *Respir. Med.* 100 (2006) 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>.
- [2] N. Motamedi, G. Pa, A. Marcsik, A.R. Zink, E. Molna, A.G. Nerlich, Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons, *Int. J. Osteoarcheology*. 17 (2007) 380–391. <https://doi.org/10.1002/oa.909>.
- [3] D.J. Carter, P. Glaziou, K. Lönnroth, A. Siroka, K. Floyd, D. Weil, M. Raviglione, R.M.G.J. Houben, D. Boccia, The impact of social protection and poverty elimination on global tuberculosis incidence: a statistical modelling analysis of Sustainable Development Goal 1, *Lancet Glob. Heal.* 6 (2018) 514–522. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30195-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30195-5).
- [4] C.P. Bhunu, S. Mushayabasa, R.J. Smith, Assessing the effects of poverty in tuberculosis transmission dynamics, *Appl. Math. Model.* 36 (2012) 4173–4185. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2011.11.046>.
- [5] Global Tuberculosis Report 2019 Geneva, World Health Organization, 2019. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>.
- [6] Global Tuberculosis Report 2014 Geneva, World Health Organization, 2014. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/137094/9789241564809\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/137094/9789241564809_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- [7] Global Tuberculosis Report 2015 Geneva, World Health Organization, 2015. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/191102/9789241565059\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/191102/9789241565059_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- [8] Global Tuberculosis Report 2016 Geneva, World Health Organization, 2016. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250441/9789241565394-eng.pdf?sequence=1>.
- [9] Global Tuberculosis Report 2017 Geneva, World Health Organization, 2017. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr2017\\_main\\_text.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf).
- [10] Global Tuberculosis Report 2018 Geneva, World Health Organization, 2018. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23553en/s23553en.pdf>.
- [11] M. Korzeniewska-Koseła, Gruźlica w Polsce w 2016 roku, *Przegl. Epidemiol.* 72 (2018) 189–205.
- [12] T. Jagielski, Epidemiologia gruźlicy w perspektywie świata, Europy i Polski, *Wiadomości Lek.* LXIII (2010) 230–246.
- [13] M. Korzeniewska-Koseła, Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2018 roku, in: *Konf. Nauk. Spec. Chorób Płuc w Zakopanem 12-14.VI.2019r.*
- [14] P.Y. Khan, T.A. Yates, M. Osman, R.M. Warren, Y. Van Der Heijden, N. Padayatchi, E.A. Nardell, D. Moore, Transmission of drug-resistant tuberculosis in HIV-endemic settings, *Lancet Infect. Dis.* 19 (2019) e77–e88.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30537-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30537-1).

- [15] M.C. Rebouças, M.O. da Silva, T. Haguilar, C. Brites, E.M. Netto, Tuberculosis incidence among people living with HIV/AIDS with virological failure of antiretroviral therapy in Salvador, Bahia, Brazil, *Brazilian J. Infect. Dis.* 21 (2017) 562–566. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.05.005>.
- [16] T. Chiacchio, E. Petruccioli, V. Vanini, G. Cuzzi, M.P. La Manna, V. Orlando, C. Pinnetti, A. Sampaolesi, A. Antinori, N. Caccamo, D. Goletti, Impact of antiretroviral and tuberculosis therapies on CD4 + and CD8 + HIV/M. tuberculosis-specific T-cell in co-infected subjects, *Immunol. Lett.* 198 (2018) 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.04.001>.
- [17] O. Shuker, J. Villamil, M. Ghitan, E.K. Chapnick, Y.S. Lin, Tuberculosis-immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patient: A case report, *IDCases.* 15 (2019) e00519. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00519>.
- [18] G. Cuomo, I. Franconi, N. Riva, A. Bianchi, M. Digaetano, A. Santoro, M. Codeluppi, A. Bedini, G. Guaraldi, C. Mussini, Migration and health: A retrospective study about the prevalence of HBV, HIV, HCV, tuberculosis and syphilis infections amongst newly arrived migrants screened at the Infectious Diseases Unit of Modena, Italy, *J. Infect. Public Health.* 12 (2019) 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.10.004>.
- [19] A. Macías, A. Sánchez-Montalvá, F. Salvador, A. Villar, T. Tórtola, N. Saborit, I. Molina, Epidemiology and diagnosis of pleural tuberculosis in a low incidence country with high rate of immigrant population: A retrospective study, *Int. J. Infect. Dis.* 78 (2019) 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.005>.
- [20] C. Pereira, P. Gomes, R. Taveira, C. Silva, F. Maltez, R. Macedo, C. Costa, D. Couvin, N. Rastogi, M. Viveiros, J. Perdigão, I. Portugal, Insights on the Mycobacterium tuberculosis population structure associated with migrants from Portuguese-speaking countries over a three-year period in Greater Lisbon, Portugal: Implications at the public health level, *Infect. Genet. Evol.* 71 (2019) 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.025>.
- [21] A. Sánchez-Montalvá, F. Salvador, D. Molina-Morant, I. Molina, Tuberculosis and immigration, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 36 (2018) 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.006>.
- [22] S. Hargreaves, K. Lönnroth, L.B. Nellums, I.D. Oлару, R.R. Nathavitharana, M. Norredam, J.S. Friedland, Multidrug-resistant tuberculosis and migration to Europe, *Clin. Microbiol. Infect.* 23 (2017) 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.009>.
- [23] A. Dias, R. Gaio, P. Sousa, M. Gomes, O. Oliveira, R. Duarte, Migration flow and its impact on tuberculosis notification in Portugal, *Arch. Bronconeumol.* 54 (2018) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.07.023>.
- [24] Y. Hu, S. Zhang, F. Zhao, C. Gao, L. Feng, Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity, *Eur. J. Med. Chem.* 133 (2017) 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.002>.

- [25] K. Mdluli, R.A. Slayden, YaQi Zhu, S. Ramaswamy, X. Pan, D. Mead, D.D. Crane, J.M. Musser, C.E.B. III, Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis  $\beta$ -ketoacyl ACP synthase by isoniazid, *Science* (80-. ). 250 (1998) 1607–1610. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1607>.
- [26] K. Mdluli, T. Kaneko, A. Upton, The tuberculosis drug discovery and development pipeline and emerging drug targets, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (2015) a021154. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021154>.
- [27] V. Lohrasbi, M. Talebi, A. Zahedi, L. Fattorini, M. Drancourt, M. Heidary, D. Darban-sarokhalil, Trends in the discovery of new drugs for Mycobacterium tuberculosis therapy with a glance at resistance, *Tuberculosis*. 109 (2018) 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.002>.
- [28] D. Laurenzo, S.A. Mousa, Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing, *Acta Trop.* 119 (2011) 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.008>.
- [29] A. Nusrath, S. Subbian, L. Elizabeth, N. Selvakumar, Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Infect. Genet. Evol. MEEGID*. 45 (2016) 474–492. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>.
- [30] G. Mori, L.R. Chiarelli, G. Riccardi, R. Pasca, New prodrugs against tuberculosis, *Drug Discov. Today*. 22 (2017) 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.006>.
- [31] C. Vilchèze, J.W.R. Jacobs, The isoniazid paradigm of killing , resistance, and persistence in Mycobacterium tuberculosis, *J. Mol. Biol.* 431 (2019) 3450–3461. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.016>.
- [32] T.A. Vannelli, A. Dykman, P.R.O. De Montellano, The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12824–12829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110751200>.
- [33] C. Vilchèze, W.R.J. JR., Resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: genes, mutations, and causalities, *Microbiol. Spectr.* 2 (2014). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013>.
- [34] T.T. Fajardo, R.S. Guinto, R. V Cellona, R.M. Abalos, E.C. Dela Cruz, R.H. Gelber, A clinical trial of ethionamide and prothionamide for treatment of lepromatous leprosy, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74 (2006) 457–461.
- [35] A. Scardigli, J.A. Caminero, G. Sotgiu, R. Centis, L. D’Ambrosio, G.B. Migliori, Efficacy and tolerability of ethionamide versus prothionamide: a systematic review, *Eur. Respir. J.* 48 (2016) 946–952. <https://doi.org/10.1183/13993003.00438-2016>.
- [36] S. Thee, A.J. Garcia-Prats, P.R. Donald, A.C. Hesselning, H.S. Schaaf, A review of the use of ethionamide and prothionamide in childhood tuberculosis, *Tuberculosis*. 97 (2016) 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.09.007>.
- [37] A. Campanico, R. Moreira, F. Lopes, Drug discovery in tuberculosis . New drug targets and antimycobacterial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 150 (2018) 525–545.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.020>.

- [38] D.T. Hoagland, J. Liu, R.B. Lee, R.E. Lee, New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 102 (2016) 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.026>.
- [39] A. Koch, H. Cox, V. Mizrahi, Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment, *Curr. Opin. Pharmacol.* 42 (2018) 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.013>.
- [40] K. Kruczak, E. Nizankowska-Mogilnicka, Multidrug resistance tuberculosis-Current problems, *Pneumonol. Alergol. Pol.* 77 (2009) 276–283.
- [41] K. Dua, R. Vamshi, S. Dhar, G. Singhvi, M.D. Shastri, D. Kumar, S. Satija, M. Mehta, M. Gulati, T. De Jesus, A. Pinto, G. Gupta, P.M. Hansbro, *Mycobacterium tuberculosis* & oxidative stress complexity: Emerging need for novel drug delivery approaches, *Biomed. Pharmacother.* 107 (2018) 1218–1229. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.101>.
- [42] S. Hameed, S.R. Ahmad, M. Aqeel ur Rehman, H. Nazir, I. Ullah, Drug resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* and predictors associated with the development of drug resistance, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 18 (2019) 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.03.009>.
- [43] Z.S. Bhat, M.A. Rather, M. Maqbool, Z. Ahmad, Drug targets exploited in *Mycobacterium tuberculosis*: Pitfalls and promises on the horizon, *Biomed. Pharmacother.* 103 (2018) 1733–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.176>.
- [44] Y. Liu, M. Matsumoto, H. Ishida, K. Ohguro, M. Yoshitake, R. Gupta, L. Geiter, J. Hafkin, Delamanid: From discovery to its use for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), *Tuberculosis.* 111 (2018) 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.04.008>.
- [45] M.A. Rather, M. Maqbool, Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biomed. Pharmacother.* 95 (2017) 1520–1534. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.036>.
- [46] M. Chen, J. Borlak, W. Tong, High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury, *Hepatology.* 58 (2012) 388–396. <https://doi.org/10.1002/hep.26208>.
- [47] S. Chetty, M. Ramesh, A. Singh-Pillay, M.E.S. Soliman, Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 370–386. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.084>.
- [48] A.K. Singh, X. Carette, L.P. Potluri, J.D. Sharp, R. Xu, S. Prsic, R.N. Husson, Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw625>.
- [49] M.M. Islam, H.M.A. Hameed, J. Mugweru, C. Chhotaray, C. Wang, Y. Tan, J. Liu, X. Li, S. Tan, I. Ojima, W.W. Yew, E. Nuermberger, G. Lamichhane, T. Zhang,

- Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy, *J. Genet. Genomics*. 44 (2017) 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.10.002>.
- [50] S. Chetty, M. Ramesh, A. Singh-Pillay, M.E.S. Soliman, Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 370–386. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.084>.
- [51] P. Njogu, E. Guantai, E. Pavadai, K. Chibale, Computer-aided drug discovery approaches against the tropical infectious diseases malaria, tuberculosis, trypanosomiasis, and leishmaniasis, *ACS Infect. Dis.* 2 (2016) 8–31. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00093>.
- [52] E. Torfs, T. Piller, P. Cos, D. Cappoen, Opportunities for overcoming *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: emerging *Mycobacterial* targets and host-directed therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) E2868. <https://doi.org/10.3390/ijms20122868>.
- [53] S. Tiberia, M. Muñoz-Torrico, R. Duarte, M. Dalcolmo, L. Ambrosio, G.-B. Miglior, New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens, *Pulmonology*. 24 (2018) 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.009>.
- [54] S. Tiberi, N. du Plessis, G. Walzl, M.J. Vjecha, M. Rao, F. Ntoumi, S. Mfinanga, N. Kapata, P. Mwaba, T.D. McHugh, G. Ippolito, G.B. Migliori, M.J. Maeurer, A. Zumla, Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies, *Lancet Infect. Dis.* 18 (2018) e183–e198. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30110-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30110-5).
- [55] A. Shehzad, G. Rehman, M. Ul-Islam, W.A. Khattak, Y.S. Lee, Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis, *Brazilian J. Infect. Dis.* 17 (2013) 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.009>.
- [56] M.D. J Libardo, H.I. Boshoff, C.E. Barry, The present state of the tuberculosis drug development pipeline, *Curr. Opin. Pharmacol.* 42 (2018) 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.001>.
- [57] S.K. Mishra, G. Tripathi, N. Kishore, R.K. Singh, A. Singh, V.K. Tiwari, Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids, *Eur. J. Med. Chem.* 137 (2017) 504–544. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.005>.
- [58] B. Khameneh, R. Diab, K. Ghazvini, F. Bazzaz, Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them, *Microb. Pathog.* 95 (2016) 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>.
- [59] M.E. Abdelaziz, M.M.M. El-Miligy, S.M. Fahmy, M.A. Mahran, A.A. Hazzaa, Design, synthesis and docking study of pyridine and thieno[2,3-b]pyridine derivatives as anticancer PIM-1 kinase inhibitors, *Bioorg. Chem.* 80 (2018) 674–692. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.07.024>.
- [60] T. Li, J. Zhang, J. Pan, Z. Wu, D. Hu, B. Song, Design, synthesis, and antiviral activities of 1,5-benzothiazepine derivatives containing pyridine moiety, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 657–662. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.069>.
- [61] L. Tripathi, R. Singh, J.P. Stables, Design & synthesis of N<sup>3</sup>-[substituted]



- pyridine-4-carbohydrazides as potential anticonvulsant agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.030>.
- [62] N. Marepu, S. Yeturu, M. Pal, 1,2,3-Triazole fused with pyridine/pyrimidine as new template for antimicrobial agents: Regioselective synthesis and identification of potent N-heteroarenes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 28 (2018) 3302–3306. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.09.021>.
- [63] T. Man, S. Banskota, G. Bist, P. Gurung, T. Bahadur, T. Magar, A. Shrestha, J. Kim, E. Lee, Synthesis and biological evaluation of pyridine-linked indanone derivatives: Potential agents for inflammatory bowel disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 28 (2018) 2436–2441. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.012>.
- [64] N.C. Desai, H. Somani, A. Trivedi, K. Bhatt, L. Nawale, V.M. Khedkar, P.C. Jha, D. Sarkar, Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of some novel indole and pyridine based 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antitubercular agents, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 1776–1783. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.043>.
- [65] B. Dulla, B. Wan, S.G. Franzblau, R. Kapavarapu, O. Reiser, J. Iqbal, M. Pal, Construction and functionalization of fused pyridine ring leading to novel compounds as potential antitubercular agents, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 4629–4635. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.096>.
- [66] V. Velezheva, P. Brennan, P. Ivanov, A. Kornienko, S. Lyubimov, K. Kazarian, B. Nikonenko, K. Majorov, A. Apt, Synthesis and antituberculosis activity of indole-pyridine derived hydrazides, hydrazide-hydrazones, and thiosemicarbazones, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 978–985. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.049>.
- [67] D. Zampieri, M.G. Mamolo, L. Vio, M. Romano, N. Skoko, M. Baralle, V. Pau, A. De Logu, Antimycobacterial activity of new N1-[1-[1-aryl-3-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-3-oxo]propyl]-pyridine-2-carboxamidrazone derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 3287–3290. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.053>.
- [68] E.G. Salina, O. Ryabova, A. Vocat, B. Nikonenko, S.T. Cole, V. Makarov, New 1-hydroxy-2-thiopyridine derivatives active against both replicating and dormant *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Infect. Chemother.* 23 (2017) 794–797. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.04.012>.
- [69] F.S. Castelo-Branco, E. Crizanto, D. Lima, J. Luiz, D.O. Domingos, A.C. Pinto, M. Cristina, S. Lourenço, K. Machado, M.M. Costa-lima, C.F. Araujo-lima, C. Alessandra, F. Aiub, I. Felzenszwalb, T. Estevam, M.M. Costa, C. Penido, M.G. Henriques, N. Boechat, New hydrazides derivatives of isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*: Higher potency and lower hepatocytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.* 146 (2018) 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.071>.
- [70] H. Patel, H. Jadhav, I. Ansari, R. Pawara, S. Surana, Pyridine and nitro-phenyl linked 1,3,4-thiadiazoles as MDR-TB inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 167 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.073>.
- [71] A. Blaser, H.S. Sutherland, A.S.T. Tong, P.J. Choi, D. Conole, S.G. Franzblau,

- C.B. Cooper, A.M. Upton, M. Lotlikar, W.A. Denny, B.D. Palmer, Structure-activity relationships for unit C pyridyl analogues of the tuberculosis drug bedaquiline, *Bioorganic Med. Chem.* 27 (2019) 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.02.025>.
- [72] G. Navarrete-Vázquez, G.M. Molina-Salinas, Z.V. Duarte-Fajardo, J. Vargas-Villarreal, S. Estrada-Soto, F. González-Salazar, E. Hernández-Núñez, S. Said-Fernández, Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines, *Bioorganic Med. Chem.* 15 (2007) 5502–5508. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.05.053>.
- [73] D. Mata-Espinosa, G.M. Molina-Salinas, J. Barrios-Payán, G. Navarrete-Vázquez, B. Marquina, O. Ramos-Espinosa, E.I. Bini, I. Baeza, R. Hernández-Pando, Therapeutic efficacy of liposomes containing 4-(5-pentadecyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridine in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 32 (2015) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.03.004>.
- [74] M. Song, S. Wang, Z. Wang, Z. Fu, S. Zhou, H. Cheng, Z. Liang, X. Deng, Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities, and molecular docking studies of N-arylsulfonylindoles containing an aminoguanidine, a semicarbazide, and a thiosemicarbazide moiety, *Eur. J. Med. Chem.* 166 (2019) 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.038>.
- [75] A.A. Aly, A.B. Brown, T.I. El-Emary, A.M. Mohamed Ewas, M. Ramadan, Hydrazinecarbothioamide group in the synthesis of heterocycles, *Arch. Org. Chem.* 2009 (2009) 150–197. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.106>.
- [76] B. Kaya, K. Kaya, A. Koca, B. Ülküseven, Thiosemicarbazide-based iron(III) and manganese(III) complexes. Structural, electrochemical characterization and antioxidant activity, *Polyhedron.* 173 (2019) 114130. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114130>.
- [77] E. Gürsoy, L. Naesens, N. Ulusoy-Güzeldemirci, G. Çapan, Synthesis and antiviral properties of novel indole-based thiosemicarbazides and 4-thiazolidinones, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.12.008>.
- [78] R.J. Nevagi, A.S. Dhake, H.I. Narkhede, P. Kaur, Design, synthesis and biological evaluation of novel thiosemicarbazide analogues as potent anticonvulsant agents, *Bioorg. Chem.* 54 (2014) 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.04.002>.
- [79] R. Donovan, F. Pansy, G. Stryker, J. Bernstein, The chemotherapy of experimental tuberculosis I.: The in vitro activity of thiosemicarbazides, thiosemicarbazones, and related compounds, *J. Bacteriol.* 59 (1950) 667–674.
- [80] W. Seebacher, R. Brun, R. Weis, New 4-aminobicyclo[2.2.2]octane derivatives and their activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma b. rhodesiense*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.10.011>.
- [81] F. Salsi, G. Bulhões, K. Schutjajew, Z. Aparecida, A. Hagenbach, S. De Albuquerque, P. Ivo, U. Abram, Thiosemicarbazones and thiadiazines derived from fluorinated benzoylthioureas: Synthesis, crystal structure and anti-

- Trypanosoma cruzi activity, *J. Fluor. Chem.* 215 (2018) 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2018.08.004>.
- [82] A.A. Al-Amiery, A.A.H. Kadhum, A.B. Mohamad, Antifungal and antioxidant activities of pyrrolidone thiosemicarbazone complexes, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012 (2012) 795812. <https://doi.org/10.1155/2012/795812>.
- [83] A. De Logu, M. Saddi, V. Onnis, C. Sanna, C. Congiu, R. Borgna, M. Teresa, In vitro antimycobacterial activity of newly synthesised S-alkylisothiosemicarbazone derivatives and synergistic interactions in combination with rifamycins against *Mycobacterium avium*, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26 (2005) 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.03.005>.
- [84] A. Sharapova, M. Ol, S. Blokhina, G. Perlovich, Physico-chemical characterization antituberculosis thioacetazone: Vapor pressure, solubility and lipophilicity, *J. Chem. Thermodyn.* 108 (2017) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.12.034>.
- [85] R. Arancibia, A.H. Klahn, M. Lapier, J.D. Maya, A. Ibañez, M.T. Garland, S. Carrère-Kremer, L. Kremer, C. Biot, Synthesis, characterization and in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* evaluations of cyrhetrenyl and ferrocenyl thiosemicarbazones, *J. Organomet. Chem.* 755 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.12.049>.
- [86] P.I. Pedro, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, S.S. Lemos, G.F. de Sousa, A.A. Batista, O.R. Nascimento, J. Ellena, E.E. Castellano, E. Niquet, V.M. Deflon, Vanadium complexes with thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity, *Polyhedron.* 28 (2009) 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2008.11.017>.
- [87] C.G. Oliveira, P. Ivo, S. Maia, P.C. Souza, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, R.B. Viana, A.A. Batista, O.R. Nascimento, V.M. De, Manganese ( II ) complexes with thiosemicarbazones as potential anti- *Mycobacterium tuberculosis* agents, 132 (2014) 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.011>.
- [88] K.L. Stirrett, J.A. Ferreras, V. Jayaprakash, B.N. Sinha, T. Ren, L.E.N. Quadri, Small molecules with structural similarities to siderophores as novel antimicrobials against *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 2662–2668. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.025>.
- [89] S. Singh, P.K. Mandal, N. Singh, A.K. Misra, S. Singh, V. Chaturvedi, S. Sinha, A.K. Saxena, Substituted hydrazinecarbothioamide as potent antitubercular agents: Synthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR), *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 2597–2600. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.02.081>.
- [90] R.A. Rane, S.S. Naphade, P.K. Bangalore, M.B. Palkar, M.S. Shaikh, R. Karpoornath, Synthesis of novel 4-nitropyrrole-based semicarbazide and thiosemicarbazide hybrids with antimicrobial and anti-tubercular activity, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3079–3083. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.018>.
- [91] A. Jallapally, D. Addla, P. Yogeewari, D. Sriram, S. Kantevari, 2-Butyl-4-

- chloroimidazole based substituted piperazine-thiosemicarbazone hybrids as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 5520–5524. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.084>.
- [92] L. Sens, A.C.A. de Souza, L.A. Pacheco, A.C.O. Menegatti, M. Mori, A. Mascarello, R.J. Nunes, H. Terenzi, Synthetic thiosemicarbazones as a new class of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.* 26 (2018) 5742–5750. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.030>.
- [93] Y. Zhang, R. Wang, T. Zhang, W. Yan, Y. Chen, Y. Zhang, M. Zhou, Benzofuranisatin-hydroxyimine/thiosemicarbazide hybrids: Design, synthesis and in vitro anti-mycobacterial activity evaluation, *Chinese Chem. Lett.* 30 (2019) 653–655. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.11.032>.
- [94] D. Sriram, P. Yogeewari, D. Yelamanchili Priya, Antimycobacterial activity of novel N-(substituted)-2-isonicotinoylhydrazinocarbothioamide endowed with high activity towards isoniazid resistant tuberculosis, *Biomed. Pharmacother.* 63 (2009) 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.01.012>.
- [95] D. Sriram, P. Yogeewari, P. Dhakla, P. Senthilkumar, D. Banerjee, T.H. Manjashetty, 5-Nitrofuranyl derivatives: Synthesis and inhibitory activities against growing and dormant mycobacterium species, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 1152–1154. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.088>.
- [96] A.N. Ambhore, S.S. Kamble, S.N. Kadam, R.D. Kamble, M.J. Hebade, S. V. Hese, M. V. Gaikwad, R.J. Meshram, R.N. Gacche, B.S. Dawane, Design, synthesis and in silico study of pyridine based 1,3,4-oxadiazole embedded hydrazinocarbothioamide derivatives as potent anti-tubercular agent, *Comput. Biol. Chem.* 80 (2019) 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.03.002>.
- [97] M.C. Cardia, S. Distinto, E. Maccioni, A. Plumitallo, M.L. Sanna, M. Saddi, A. Delogu, Isonicotinoylhydrazothiazoles and isonicotinoyl-N4-substituted thiosemicarbazides: Synthesis, characterization, and anti-mycobacterial activity, *J. Heterocycl. Chem.* 43 (2006) 1337. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570430529>.
- [98] F.R. Pavan, P.I. d. S. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Deflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1898–1905. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.028>.
- [99] M. Gaele, M. Hussain, G. Surineni, Y. Tan, N.-K. Wong, M. Julius, L. Liu, C. Gift, H. Jiang, Y. Tang, J. Liu, S. Tan, Z. Yu, Z. Liu, H. Lu, C. Fang, Y. Zhou, J. Zhang, Q. Zhu, J. Liu, T. Zhang, Quinoline derivatives kill Mycobacterium tuberculosis by activating glutamate kinase, *Cell Chem. Biol.* 26 (2019) 1187–1194.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.05.003>.
- [100] M.C. Mandewale, U.C. Patil, S. V Shedge, U.R. Dappadwad, R.S. Yamgar, A review on quinoline hydrazone derivatives as a new class of potent antitubercular and anticancer agents, *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 6 (2017) 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.07.005>.

- [101] P.P. Jain, M.S. Degani, A. Raju, A. Anantram, M. Seervi, S. Sathaye, M. Ray, M.G.R. Rajan, Identification of a novel class of quinoline-oxadiazole hybrids as anti-tuberculosis agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 645–649. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.057>.
- [102] T.G. Shruthi, S. Eswaran, P. Shivarudraiah, S. Narayanan, S. Subramanian, Synthesis, antituberculosis studies and biological evaluation of new quinoline derivatives carrying 1,2,4-oxadiazole moiety, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (2019) 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.002>.
- [103] B.S. Holla, M. Mahalinga, M.S. Karthikeyan, P.M. Akberali, N.S. Shetty, Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents, *Bioorganic Med. Chem.* 14 (2006) 2040–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.053>.
- [104] K.D. Thomas, A.V. Adhikari, S. Telkar, I.H. Chowdhury, R. Mahmood, N.K. Pal, G. Row, E. Sumesh, Design, synthesis and docking studies of new quinoline-3-carbohydrazide derivatives as antitubercular agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5283–5292. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.033>.
- [105] V. Monga, A. Nayyar, B. Vaitilingam, P.B. Palde, S. Singh Jhamb, S. Kaur, P.P. Singh, R. Jain, Ring-substituted quinolines. Part 2: Synthesis and antimycobacterial activities of ring-substituted quinolinecarbohydrazide and ring-substituted quinolinecarboxamide analogues, *Bioorganic Med. Chem.* 12 (2004) 6465–6472. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.09.017>.
- [106] S.R. Patel, R. Gangwal, A.T. Sangamwar, R. Jain, Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR study of hydrazide, semicarbazide and thiosemicarbazide derivatives of 4-(adamantan-1-yl)quinoline as anti-tuberculosis agents, *Eur. J. Med. Chem.* 85 (2014) 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.100>.
- [107] C. Orlewska, H. Foks, M. Janowiec, Z. Zwolska-Kwiek, Studies on pyrazine derivatives, XXIX: Synthesis of N1-thioamido substituted pyrazincarboxamidrazones with expected tuberculostatic activity., *Pharmazie.* 50 (1995) 565–566.
- [108] A. Olczak, M.L. Główska, J. Gołka, M. Szczesio, B. Joanna, K. Krystyna, H. Foks, C. Orlewska, Is planarity of pyridin-2-yl- and pyrazin-2-yl-formamide thiosemicarbazones related to their tuberculostatic activity? X-ray structures of two pyrazine-2-carboxamide-N'-carbonothioyl-hydrazones, *J. Mol. Struct.* 830 (2007) 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.07.011>.
- [109] W. Zhan, L. Ji, Z. mei Ge, X. Wang, R. tao Li, A continuous-flow synthesis of primary amides from hydrolysis of nitriles using hydrogen peroxide as oxidant, *Tetrahedron.* 74 (2018) 1527–1532. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.02.017>.
- [110] P. Lignier, J. Estager, N. Kardos, L. Gravouil, J. Gazza, E. Naffrechoux, M. Draye, Swift and efficient sono-hydrolysis of nitriles to carboxylic acids under basic condition: Role of the oxide anion radical in the hydrolysis mechanism, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.04.006>.
- [111] C.M. Tice, L.M. Bryman, Regiocontrolled synthesis of 3-substituted-6-trifluoromethyl-4(3H)-pyrimidinones, *Tetrahedron.* 57 (2001) 2689–2700.

[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00042-4).

- [112] D. Moustafa, C. Sweet, H. Lim, B. Calalpa, P. Kaur, Mn/Cu catalyzed addition of arylboronic acid to nitriles: Direct synthesis of arylketones, *Tetrahedron Lett.* 59 (2018) 3816–3820. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.09.021>.
- [113] T. Das, A. Chakraborty, A. Sarkar, Palladium catalyzed addition of arylboronic acid or indole to nitriles: Synthesis of aryl ketones, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 7198–7202. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.11.009>.
- [114] M. Charaschanya, A.R. Bogdan, Y. Wang, S.W. Djuric, Nucleophilic aromatic substitution of heterocycles using a high-temperature and high-pressure flow reactor, *Tetrahedron Lett.* 57 (2016) 1035–1039. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.01.080>.
- [115] C. Cochon, T. Corre, S. Celerier, S. Brunet, Catalytic fluorination of 2-chloropyridine over metal oxide catalysts in gas phase in the presence of HF, *Appl. Catal. A Gen.* 413–414 (2012) 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2011.11.003>.
- [116] P. Mastalerz, *Chemia organiczna*, in: *Chem. Org.*, 1st ed., Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław, 2000: pp. 547–548.
- [117] D.K. Kim, J. Kim, H.J. Park, Synthesis and biological evaluation of novel 2-pyridinyl-[1,2,3]triazoles as inhibitors of transforming growth factor  $\beta$ 1 type 1 receptor, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2401–2405. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.03.024>.
- [118] D.L. Klaymann, J.P. Scovil, J.F. Bartosevich, C.J. Mason, 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 2. N4,N4-Disubstituted derivatives as potential antimalarial agents, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 1367–1373. <https://doi.org/10.1002/chin.198012247>.
- [119] A.J. Olson, Perspectives on structural molecular biology visualization: From past to present, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 3997–4012. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.009>.
- [120] K.N. Zelenin, O.V. Solod, V.A. Khurstalev, Amidrazones in the synthesis of heterocycles, *Chem. Heterocycl. Compd.* 25 (1989) 717–737.
- [121] R. Paprocka, M. Wiese-Szadkowska, A. Helmin-Basa, L. Mazur, J. Kutkowska, J. Michałkiewicz, B. Modzelewska-Banachiewicz, L. Pazderski, Synthesis and evaluation of new amidrazone-derived hydrazides as a potential anti-inflammatory agents, *Monatshefte Fur Chemie.* 149 (2018) 1493–1500. <https://doi.org/10.1007/s00706-018-2197-8>.
- [122] L. Mazur, B. Modzelewska-Banachiewicz, R. Paprocka, M. Zimecki, U.E. Wawrzyniak, J. Kutkowska, G. Ziółkowska, Synthesis, crystal structure and biological activities of a novel amidrazone derivative and its copper(II) complex - A potential antitumor drug, *J. Inorg. Biochem.* 114 (2012) 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.04.021>.
- [123] A.A. Aly, A.M. Nour-El-Din, Functionality of amidines and amidrazones, *Rev.*

Accounts. (2008) 153–194. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0009.106>.

- [124] K.K. Brown, M.B. Hampton, Biological targets of isothiocyanates, *Biochim. Biophys. Acta.* 1810 (2011) 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.004>.
- [125] F. Rahim, M. Taha, H. Ullah, A. Wadood, A. Rab, M. Sajid, S. Adnan, A. Shah, N. Uddin, M. Gollapalli, Synthesis of new arylhydrazide bearing Schiff bases/thiazolidinone:  $\alpha$ -Amylase, urease activities and their molecular docking studies, *Bioorg. Chem.* 91 (2019) 103112. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103112>.
- [126] S. Özkınalıa, M. Gürb, N. Şenerc, S.M. Çavuş, S. Alkına, Synthesis of new azo schiff bases of pyrazole derivatives and their spectroscopic and theoretical investigations, *J. Mol. Struct.* 1174 (2018) 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.06.070>.
- [127] A. Lealem, I. Mohiuddin, A. Kumar, J. Singh, V. Kumar, K. Kim, A review of the applications of Schiff bases as optical chemical sensors, *Trends Anal. Chem.* 116 (2019) 74–91. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.025>.
- [128] R.T. Morrison, R.N. Boyd, *Chemia organiczna*, 5th ed., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010.
- [129] M. Mesbah, T. Douadi, F. Sahli, S. Boukazoula, S. Chafaa, Synthesis, characterization, spectroscopic studies and antimicrobial activity of three new Schiff bases derived from heterocyclic moiety, *J. Mol. Graph. Model.* 1151 (2018) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.098>.
- [130] M. Cleiton, L. Daniel, L. V Modolo, R.B. Alves, M.A. De Resende, C.V.B. Martins, Â. de Fátimaa, Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities, *J. Adv. Res.* 2 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.004>.
- [131] Y. Ünver, K. Sancak, F. Çelik, E. Birinci, M. Küçük, S. Soylu, N. Burnaz, New thiophene-1,2,4-triazole-5(3)-ones: highly bioactive thiosemicarbazides, structures of Schiff bases and triazole-thiols., *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.014>.
- [132] K.M. Krishna, B. Inturi, G. V Pujar, M.N. Purohit, G.S. Vijaykumar, Design, synthesis and 3D-QSAR studies of new diphenylamine containing 1,2,4-triazoles as potential antitubercular agents, *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 516–529. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.051>.
- [133] N. Seelam, S.P. Shrivastava, S. Prasanthi, G. Supriya, Synthesis and in vitro study of some fused 1,2,4-triazole derivatives as antimycobacterial agents, *J. Saudi Chem. Soc.* 18 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.11.011>.
- [134] R. Jin, Y. Wang, H. Guo, X. Long, J. Li, S. Yue, S. Zhang, G. Zhang, Q. Meng, C. Wang, H. Yan, Y. Tang, S. Zhou, Design, synthesis, biological activity, crystal structure and theoretical calculations of novel 1,2,4-triazole derivatives, *J. Mol. Struct.* 1202 (2020) 127234. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127234>.
- [135] H.A.M. El-Sherief, B.G.M. Youssif, S.N. Abbas Bukhari, A.H. Abdelazeem, M.

- Abdel-Aziz, H.M. Abdel-Rahman, Synthesis, anticancer activity and molecular modeling studies of 1,2,4-triazole derivatives as EGFR inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 156 (2018) 774–789. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.024>.
- [136] S. Azzouni, A. Abdelli, A. Gaucher, Y. Arfaoui, M.L. Efrit, D. Prim, From imidates to vinyl-1,2,4-triazoles: Synthesis, mechanistic aspects and first issues of their reactivity, *Tetrahedron*. 74 (2018) 6972–6978. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.10.050>.
- [137] K.S. Yeung, M.E. Farkas, J.F. Kadow, N.A. Meanwell, A base-catalyzed, direct synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles from nitriles and hydrazides, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 3429–3432. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.02.167>.
- [138] M. Joseph, Synthesis and spectral studies of certain 1,2,4-triazoline-5-thiones, University of Kerala, 1991.
- [139] W.C. Neuhaus, G. Moura-Letts, Alumina-promoted synthesis of N-aryl-1,2,4-triazoles from substituted hydrazines and imides, *Tetrahedron Lett.* 57 (2016) 4974–4977. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.09.086>.
- [140] A.A. Othman, M. Kihel, S. Amara, 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole derivatives as potential antibacterial agents, *Arab. J. Chem.* 12 (2014) 1660–1675. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.09.003>.
- [141] H. Zhang, G.L. V Damu, G. Cai, C. Zhou, Current developments in the syntheses of 1,2,4-triazole compounds, *Curr. Org. Chem.* 18 (2014) 359–406. <https://doi.org/10.2174/13852728113179990025>.
- [142] F.H. Case, The preparation of substituted 1,2,4-triazolines and substituted picolinic acid methylene hydrazides by the action of certain carboxamide hydrazones with ketones, *J. Heterocycl. Chem.* 10 (1973) 353–355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jhet.5570100314>.
- [143] O.A. Miqdad, N.M. Abunada, T.M. Abumialeq, H.M. Hassaneen, Reactivity of amidrazones: Synthesis of new spiro/4,5-dihydro-1,2,4-triazole and 1,2,4-triazole derivatives, *Al-Aqsa Univ. J.* 17 (2013) 29–48.
- [144] M. Boukthir, F. Chabchouba, An overview of some imidates derivatives with anti-microbial activity, *Res. Rev. J. Chem.* 6 (2017) 22–33.
- [145] S. Azzouni, A. Abdelli, A. Gaucher, Y. Arfaoui, M. Lotfi Efrit, D. Prima, From imidates to vinyl-1,2,4-triazoles: Synthesis, mechanistic aspects and first issues of their reactivity, *Tetrahedron*. 74 (2018) 6972–6978. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.10.050>.
- [146] A. Zarguil, S. Boukhris, M.L. El Efrif, A. Souizi, E.M. Essassi, Easy access to triazoles, triazolopyrimidines, benzimidazoles and imidazoles from imidates, *Tetrahedron Lett.* 49 (2008) 5883–5886. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.134>.
- [147] K.C. Agrawal, M.H. Lee, B.A. Booth, E.C. Moore, A.C. Sartorelli, Potential antitumor agents. 11. Inhibitors of alkaline phosphatase, an enzyme involved in the



- resistance of neoplastic cells to 6-thiopurines, *J. Med. Chem.* 17 (1974) 934–938. <https://doi.org/10.1021/jm00255a005>.
- [148] G.P. Youmans, A.S. Youmans, A method for the determination of the rate of growth of tubercle bacilli by the use of small inocula, *J. Bacteriol.* 58 (1949) 247–255.
- [149] G.P. Youmans, Test tube evaluation of tuberculostatic agents, *Am. Rev. Tuberc.* 56 (1947) 376.
- [150] R.M. Atlas, J.W. Snyder, *Handbook of Media for Clinical Microbiology*, in: 2nd ed., CRC Press Book, Boca Raton, 2006.
- [151] CLSI M24, 3rd ed. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes*, 3rd Edition. Vol. 38 No. 21.
- [152] S. Franzblau, R. Witzig, J. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M. Degnan, M. Cook, V. Quenzer, R. Ferguson, R. Gilman, Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 362–6.
- [153] F. Reck, R. Alm, P. Brassil, J. Newman, B. Dejonge, C. Eyermann, G. Breault, J. Breen, J. Comita-Prevoir, M. Cronin, H. Davis, D. Ehmann, V. Galullo, B. Geng, T. Grebe, M. Morningstar, P. Walker, B. Hayter, S. Fisher, Novel N-linked aminopiperidine inhibitors of bacterial topoisomerase type II: broad-spectrum antibacterial agents with reduced hERG activity, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 7834–47. <https://doi.org/10.1021/jm2008826>.