

**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny**



mgr inż. Dagmara Ziembicka

**Synteza, struktura i aktywność przeciwprątkowa
nowych amidrazonowych pochodnych pirydyny i pirazyny**

Miejsca realizacji pracy:

Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Gdański Uniwersytet Medyczny

Zespół Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii,
Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

Promotorzy pracy:

dr hab. Katarzyna Gobis, prof. uczelni

dr hab. inż. Małgorzata Szczesio, prof. uczelni

Gdańsk, 2023

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Promotor,
dr hab. Katarzynie Gobis, prof. uczelni,
za obdarzenie zaufaniem, poświęcony czas,
wrozumiałość oraz wsparcie merytoryczne.*

*Dziękuję Pani Promotor, dr hab. inż. Małgorzacie Szczesio, prof. uczelni,
za inspirację naukową i cenne wskazówki merytoryczne.*

Spis treści

1. WPROWADZENIE.....	1
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	3
2.1. Aktualnie stosowane leki przeciwgruźlicze oraz ich mechanizmy oporności	3
2.2.1 Zmiana przeznaczenia leku	7
2.2.2 Terapia ukierunkowana na gospodarza	9
2.2.3 Systemy dostarczania leków poprzez nanocząstki	12
2.3. Kliniczne perspektywy leków przeciwgruźliczych.....	15
2.4. Projektowanie leków hybrydowych	22
2.4.1 Pirydyna jako farmakofor	22
2.4.2 Pirazyna jako farmakofor	25
2.4.3 Ugrupowanie amidrazonowe jako potencjalny farmakofor	26
2.5. Badania krystalograficzne	29
2.5.1 Przegląd bazy CSD pod kątem pochodnych amidrazonowych	30
2.5.1.1 Oddziaływania w kryształach pochodnych amidrazonowych.....	34
3. CEL PRACY.....	36
4. BADANIA WŁASNE	39
4.1. Synteza	39
4.1.1 Otrzymywanie tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (3–6) i pirydyny (7–10) z atomem chloru w pozycji C6	39
4.1.2 Otrzymywanie 6-podstawionych pochodnych pirazyno-2-karbonitrylu (11–14) i pikolinonitrylu (16–18).....	44
4.1.3 Otrzymywanie 6-podstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (19–34) i pirydyny (35–50)	45
4.1.4 Otrzymywanie 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny (52–60)	50
4.1.5 Otrzymywanie amidrazonów (61–72).....	55
4.1.6 Otrzymywanie dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny (73–92) i pirydyny (97–120)	59
4.2. Badania krystalograficzne	68

4.2.1 Analiza strukturalna pochodnych tiosemikarbazonowych	75
4.2.2 Analiza strukturalna pochodnych iminowych	98
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ BIOLOGICZNYCH	111
5.1. Aktywność przeciwpłatkowa	111
5.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	120
5.3. Aktywność cytotoksyczna	126
6. ANALIZA STRUKTURA-AKTYWNOŚĆ	131
7. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	138
7.1 Synteza	138
7.2 Aktywność przeciwpłatkowa	186
7.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	187
7.4 Aktywność cytotoksyczna	187
8. WNIOSKI	189
9. STRESZCZENIE	192
10. WYKAZ SKRÓTÓW	198
11. PIŚMIENNICTWO	199

1. WPROWADZENIE

Gruźlica jest jedną z najstarszych chorób zakaźnych o zidentyfikowanym czynniku etiologicznym – *Mycobacterium tuberculosis* [1]. W skali światowej, pomimo znacznych postępów na przestrzeni lat, wciąż stanowi ogromny problem epidemiologiczny pozostając jedną z wiodących przyczyn chorobowości i śmiertelności wywołanych przez pojedynczy patogen. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2021 roku, aktywna gruźlica rozwinęła się u 10,6 mln osób, natomiast liczba zgonów spowodowanych tą chorobą wyniosła 1,6 mln, z czego niemal 12% stanowiły zgony związane z koinfekcją ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV) [2]. W przypadku gruźlicy niezbędna jest terapia długoterminowa oraz wielolekowa [3]. Złożony schemat leczenia często związany jest z niedostatecznym przestrzeganiem zaleceń terapeutycznych przez pacjentów, co z kolei skutkuje rozwojem bakterii lekoopornych wywołujących gruźlicę wielolekooporną (MDR-TB) oraz gruźlicę ekstremalnie wielolekooporną (XDR-TB) [4]. Inną przyczyną rosnącej oporności na leki może być ich niedostępność lub niska jakość, niewłaściwy dobór dawki lub długości leczenia, niewystarczająca infrastruktura ochrony zdrowia bądź reinfekcja [4,5]. Liczba chorych na gruźlicę wywołaną przez prątki odporne na rifampicynę lub rifampicynę i izoniazyd wynosiła w 2021 roku 0,45 mln, a jedynie 36% z nich przystąpiła do terapii [2]. Transmisja szczepów lekoopornych jest najbardziej dotkliwa w regionach ubogich ekonomicznie i społecznie, gdzie wyzwanie związane ze zwalczaniem gruźlicy jest największe i potęgowane przez wysokie wskaźniki koincydencji z HIV, którego nosicielstwo sprzyja zarówno zakażeniu, jak i transformacji infekcji utajonej w postać aktywną [6].

W 2014 roku WHO wdrożyło strategię mającą na celu eradykację gruźlicy. Przyjęte w niej założenia końcowe obejmowały m.in. redukcję do 2035 roku, w porównaniu z rokiem 2015, liczby zakażeń o 90%, a liczby zgonów o 95% [7]. Wybuch w 2019 roku pandemii COVID-19 wywołanej przez wirusa SARS-CoV-2 sprawił, iż cele pośrednie zaplanowane na rok 2020 nie zostały osiągnięte powodując znaczne cofnięcie postępu walki z chorobą [8]. Plan działań skoncentrowany został na wzmożonej profilaktyce, opracowywaniu nowych algorytmów diagnostycznych i schematów leczenia, a także wprowadzaniu środków kontroli infekcji, wzmocnieniu systemów opieki zdrowotnej, czy propagowaniu świadomości społecznej. Jednak u podstaw sukcesu projektu leży wspieranie przełomowych badań naukowych oraz innowacyjnych rozwiązań. Szczególnie znaczenie może mieć rozwój nowych szczepionek lub leków przeciwgruźliczych [7,8].

Idealny kandydat na lek przeciwgruźliczy powinien wykazywać działanie bakteriobójcze wobec obu postaci gruźlicy – aktywnej (prątki replikujące) i latentnej (prątki niereplikujące). Powinowactwo do kilku celów molekularnych lub nowy mechanizm działania zapewniłyby jego wyższą skuteczność przeciwko MDR/XDR-TB, a skrócenie czasu podania oraz zminimalizowanie częstotliwości dawkowania ułatwiłoby pacjentom przebycie całego cyklu leczenia. Preferowaną formą aplikacyjną leku jest postać podawana drogą doustną, charakteryzująca się zoptymalizowanymi właściwościami farmakokinetycznymi. Pożądaną cechą tuberkulostatyku jest również jego kompatybilność z innymi obecnie stosowanymi lekami przeciwgruźliczymi bądź przeciwretrowirusowymi, a także odpowiedni profil bezpieczeństwa pozwalający na niwelowanie ryzyka działań niepożądanych, również u dzieci i kobiet w ciąży. Z kolei przystępność cenowa umożliwiłaby jego zastosowanie w krajach o niskim i średnim dochodzie. Ponadto, związek powinien wykazywać wysoką stabilność oraz tolerancję, wąskie spektrum działania oraz niski wskaźnik spontanicznego pojawiania się oporności [3,9].

Wzmoczone działania prowadzone w kierunku poszukiwań nowych leków przeciwgruźliczych przyniosły wymierne efekty przerywając trwającą od kilku dekad stagnację na rynku farmaceutycznym. W ciągu ostatniego dziesięciolecia Agencja Żywności i Leków (FDA) oraz/lub Europejska Agencja Leków (EMA) warunkowo dopuściły do obrotu trzy leki [10]. Wynik ten jest jednak niezadawalający, a zapotrzebowanie na nowe leki wciąż aktualne i pilne. Corocznie setki cząsteczek zgłaszane są jako obiecujące środki przeciwgruźlicze, jednak niewiele z nich kwalifikuje się do badań klinicznych. Większość kandydatów w fazie badań klinicznych ma swoje analogi strukturalne w wyższych fazach bądź jest zmodyfikowaną wersją związków należących do klas o wykazanym już potencjale terapeutycznym. Bazowanie na szeroko zakrojonej wiedzy zdobytej podczas prac rozwojowych pozwala na optymalizację związku wiodącego. Przeprojektowanie struktur starych rodzin leków na gruźlicę bądź takich, które z jakiegoś powodu zostały wyłączone bądź niezakwalifikowane do leczenia, a także repozycjonowanie leków wydaje się być obiecującym kierunkiem badań [11]. Kluczowy wkład w rozwój leków wniosły metody komputerowo wspomaganego projektowania leków (ang. *Computer Aided Drug Design*, CADD), które dzielą się na dwa główne typy: bazujące na strukturach znanych ligandów oraz trójwymiarowej strukturze miejsca wiążącego [12]. Proces odkrywania i identyfikacji leków przeciwgruźliczych może zostać przyspieszony wraz z nowym podejściem jakim jest terapia ukierunkowana na gospodarza, a skuteczność leków poprawiona dzięki zastosowaniu nanocząsteczek jako ich nośników [13].

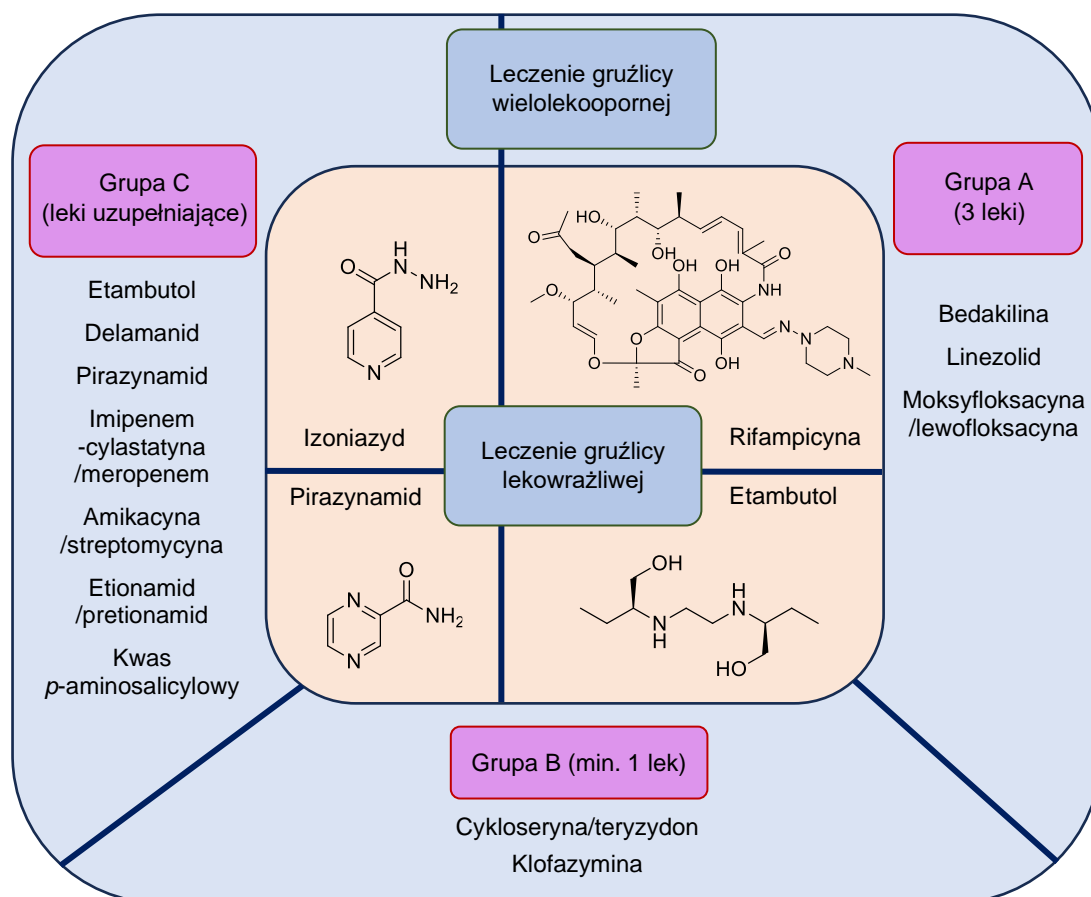
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Aktualnie stosowane leki przeciwgruźlicze oraz ich mechanizmy oporności

Obecnie stosowany schemat leczenia gruźlicy wrażliwej obejmuje 2-miesięczną fazę intensywną (bakteriobójczą), podczas której podawane są izoniazyd, rifampicyna, pirazynamid i etambutol (leki pierwszej linii) oraz po której następuje 4-miesięczna faza kontynuacji (wyjaławiająca) izoniazidem i rifampicyną [3]. MDR-TB – odmiana gruźlicy odporna na działanie izoniazylu i rifampicyny, wymaga okresu terapii wydłużonego nawet do 2 lat oraz zastosowania leków, które klasyfikowane są w trzech grupach (leki drugiej linii). Schemat leczenia MDR-TB uwzględnia przyjmowanie wszystkich leków z grupy A (bedakilina, linezolid, moksyflokscyna/lewoflokscyna) i co najmniej jednego leku z grupy B (cykloseryna/teryzyd, klofazymina). Leki z grupy C (etambutol, delamanid, pirazynamid, imipenem-cylastatyna/meropenem, amikacyna/streptomycyna, etionamid/protionamid, kwas *p*-aminoalicylowy) uzupełniają schemat leczenia w przypadku braku możliwości jego stworzenia wyłącznie z leków z grupy A i B (Rys. 1) [14]. Z kolei XDR-TB definiowana jest jako MDR-TB z wykształconą dodatkową opornością na fluorochinolon oraz antybiotyk podawany parenteralnie (amikacyna, kapreomycyna, kanamycyna) albo bedakilinę/linezolid. W związku z tym, iż odmiana ta jest niewrażliwa na najsilniejsze leki przeciwgruźlicze, pozostałe schematy leczenia są nieefektywne, co wiąże się z niskim wskaźnikiem wyleczalności, na poziomie 30–50% [15].

Mechanizmy oporności na leki przeciwgruźlicze można podzielić na naturalne oraz nabyte [16]. Oporność naturalna determinowana jest genetycznymi uwarunkowaniami bakterii. W przypadku prątków jest to niska przepuszczalność ściany komórkowej blokująca dostęp do celu molekularnego, obecność enzymów inaktywujących leki, obecność w błonie komórkowej pomp wypływowych powodujących eliminację leków, zdolność do modulacji ekspresji genów w celu przystosowania się do działania lub obecności leków oraz wolne tempo wzrostu i uspiony metabolizm wiążące się z fenotypową tolerancją na leki [16,17]. Oporność nabyta, której źródłem są spontaniczne mutacje w genach chromosomowych kodujących cele molekularne leków lub enzymy aktywujące leki, wykształca się w odpowiedzi na presję selekcyjną leków. W przeciwieństwie do innych bakterii prątki nie nabywają oporności w drodze horyzontalnego transferu genów. Mutacje genetyczne w szczepach *M. tuberculosis* mają charakter punktowy (polimorfizm pojedynczego nukleotydu) lub kilkunukleotydowych

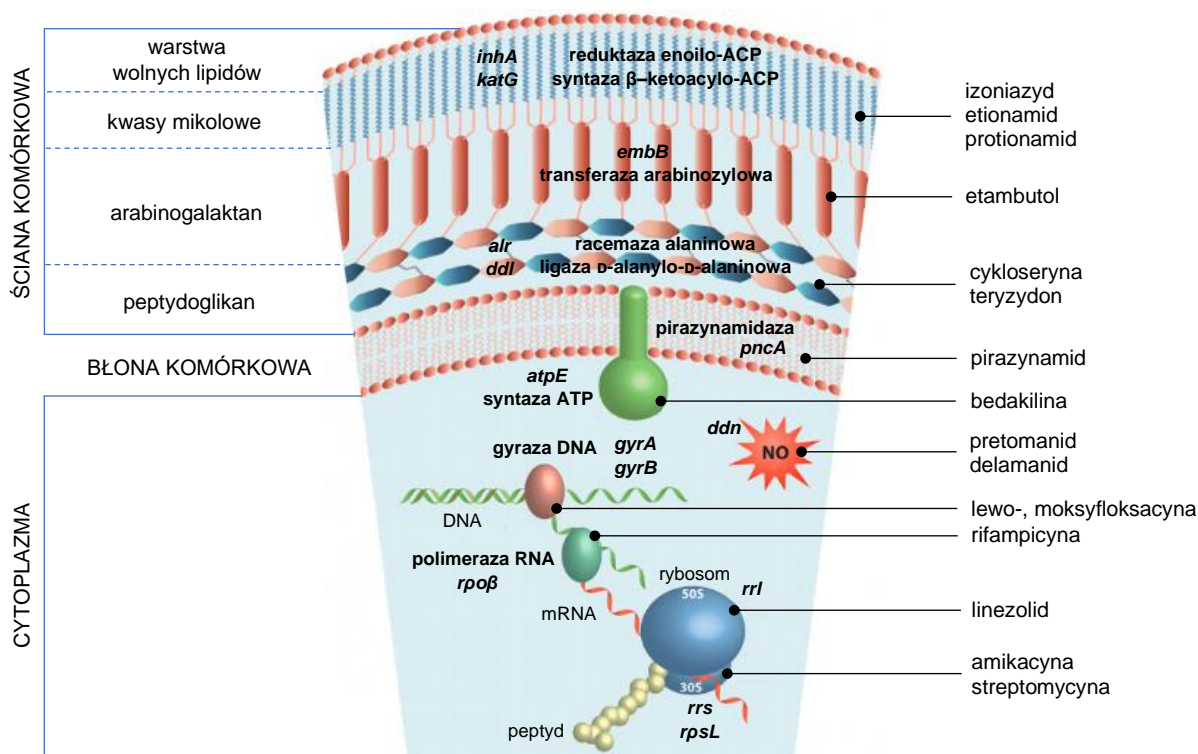
delecji bądź insercji. Możliwość występowania złożonych mutantów opornościowych jest procesem stopniowym, w którym najpierw na skutek niedostatecznego hamowania wzrostu prątków wynikającego z niewłaściwego schematu leczenia następuje wyparcie form lekowrażliwych *M. tuberculosis* przez formy lekooporne, a w konsekwencji utrata efektu terapeutycznego pierwszego leku, a następnie po powieleniu nieprawidłowości utrata efektu terapeutycznego drugiego i kolejnych leków. Mutacje opornościowe nie są zatem ze sobą sprzężone, a badania wykorzystujące sekwencjonowanie całego genomu (ang. *whole genome sequencing*, WGS) dowiodły, iż rozwój oporności następuje w kolejności: izoniazyd, rifampicyna/etambutol, pirazynamid, leki drugiego i trzeciego rzutu. Prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji skutkującej fenotypem lekoopornym w przypadku izoniazydu, etambutolu i streptomycyny wynosi około 1 na 10^6 komórek bakteryjnych, a w przypadku rifampicyny około 1 na 10^8 [16,18].



Rys. 1 Rekomendowane przez WHO wytyczne dotyczące schematu leczenia stosowanego w gruźlicy wrażliwej oraz wielolekoopornej

Kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów oporności prątków ma ich specyficzna budowa. Powierzchnia prętka pokryta jest polisacharydowo-białkową otoczką z niewielką ilością lipidów. Gruba i niezwykle złożona ściana komórkowa mykobakterii stanowi skuteczną barierę przed zagrożeniami środowiskowymi. Główną rolę w nieprzepuszczalności ściany komórkowej odgrywają długołańcuchowe (C₆₀–C₉₀) kwasy mikołowe – α -hydroksy β -alkilo kwasy tłuszczowe posiadające zarówno dłuższe łańcuchy meromikołowe, jak i krótsze łańcuchy α -węglowodorowe. Z warstwą kwasów mikołowych związane są także glikolipidy, takie jak lipoarabinomannan, trehalozo-monomykolan, trehalozo-dimykolan i fosfatydyloinozytolomannozyd [19,20]. Kwasy mikołowe stanowią 50% suchej masy ściany komórkowej i poprzez swój hydrofobowy charakter sprawiają, iż hydrofilowe cząsteczki leku mają słabą zdolność penetracji do wnętrza komórki. Nieodzowną rolę w dyfuzji leków hydrofilowych przez ścianę komórkową odgrywają poryny wypełnione wodą [16]. Związki wysoce lipofilowe ($\log P > 5$) mają z kolei tendencję do gromadzenia się w lipidowych obszarach tkanek. Obserwacja ta jest zgodna z jedną z reguł Lipińskiego, które określają czynniki gwarantujące przenikanie [21]. Kwasy mikołowe następnie związane są z lipopolisacharydem – arabinogalaktanem złożonym z rozgałęzionych łańcuchów D-arabinozy, który z kolei połączony jest kowalencyjnie z peptydoglikanem – oligosacharydem złożonym z N-acetyloglukozaminy oraz kwasu N-glikolilomuraminowego usieciowanego krótkimi peptydami [19]. Wiele genów zaangażowanych w biosyntezę ściany komórkowej jest absolutnie niezbędnych do przetrwania prętka, a oporność na leki związana jest z mutacjami zachodzącymi w tych genach. Mechanizm oporności na izoniazyd i etionamid został opisany w podrozdziale 2.4.1. W oporności na etambutol pośredniczą mutacje w genach tworzących operon *embCAB*, najczęściej w genie *embB* (zmiana w kodonie 306 genu). Geny te kodują mykobakteryjne arabinozylotransferazy. Zablockowanie enzymu hamuje inkorporację D-arabinozy do arabinogalaktanu uniemożliwiając tym samym właściwe kotwiczenie kwasów mikołowych. Cykloseryna jest kompetytywnym inhibitorem dwóch enzymów: ligazy D-alanylo-D-alaninowej (kodowanej przez gen *Ddl*) oraz racemazy alaninowej (kodowanej przez gen *Alr*). Mutacje w tych genach uniemożliwiają hamowanie, kolejno, wytwarzania wiązania peptydowego między dwiema D-alaninami oraz przekształcania D-alaniny w L-alaninę, które są procesami kluczowymi w biosyntezie prekursora biosyntezy peptydoglikanu. Komórki prątków posiadają również antygeny związane z błoną komórkową oraz cytoplazmą. W klinicznych izolatach *M. tuberculosis* opornych na pirazyamid zidentyfikowano szeroki wachlarz mutacji w genie *pncA* kodującym enzym

metabolizujący pirazynamid do jego aktywnej postaci – kwasu pirazynowego. Pirazynamid jest jednym z leków o niewyjaśnionym mechanizmie działania. Uważa się, iż w formie uprotonowanej zaburza potencjał błonowy komórki bakteryjnej. W wyniku jego akumulacji w cytoplazmie następuje drastyczne obniżenie pH prowadzące do upośledzenia wielu szlaków enzymatycznych (w tym związanych z biosyntezą średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych typu I (FAS I)) oraz funkcji transportu błonowego. Mechanizm lekooporności na fluorochinolony związany jest z mutacjami prowadzącymi do zmian strukturalnych w enzymie odpowiedzialnym za syntezę bakteryjnego DNA, a dokładniej w podjednostkach *gyrA* i *gyrB* topoiizomerazy II (gyrazy). Zaburzenie syntezy enzymu prowadzi do śmierci komórki poprzez zahamowanie jej replikacji DNA. Z kolei makrocykliczny pierścień rifampicyny, na poziomie molekularnym, wiąże się z podjednostką β DNA-zależnej polimerazy RNA hamując jej aktywność transkrypcyjną, a tym samym syntezę białek. Mutacje odpowiedzialne za oporność na rifampicynę dotyczą pojedynczego locus, tj. genu *rpo β* kodującego podjednostkę β [16,18,19,22–23]. Pomimo, iż obecnie stosowane leki przeciwgruźlicze działają na wielu poziomach budowy prętka (Rys. 2), to występujące na nie oporności stwarzają pilną potrzebę identyfikacji ich niepoznanych dotąd szlaków metabolicznych.



Rys. 2 Molekularne cele działania, wraz z kodującymi je genami, leków stosowanych w terapii gruźlicy wrażliwej i wielolekoopornej

2.2. Nowe podejścia do odkrywania leków przeciwgruźliczych

Wraz z nadejściem ery genomicznej wysiłki w zakresie odkrywania leków zaczęto opierać o zidentyfikowane cele molekularne niezbędne do przetrwania oraz patogenności *M. tuberculosis*. W tym celu poszukiwano szlaków, równocześnie nie występujących u gospodarza, odpowiedzialnych za metabolizm białek, lipidów, węglowodanów, aminokwasów, nukleotydów, metabolizm energetyczny czy biosyntezę witamin i kofaktorów. Zespół Anishetty'ego zidentyfikował w ten sposób 67 nowych celów nie znajdujących się w bazie danych Konsorcjum Genomiki Strukturalnej (ang. *TB Structural Genomics Consortium*, TBSGC), m.in. kutyazy Rv3451 i Rv3452 odpowiedzialne za wirulencję prątków, czy aceA, aceAa, aceAb, glcB – enzymy cyklu glikakylanowego, które są istotne dla ich przeżycia [24]. Jednakże niewątpliwie ulepszonym podejściem, eliminującym problem z przepuszczalnością i wpływem leku, jest fenotypowe badanie przesiewowe wobec całych komórek bakteryjnych [25]. Kilka modeli badań przesiewowych *in vitro*, m.in. niedotlenienia (model niedotlenienia Wayne'a, LORA) [26,27], niskiego pH [28], niedoboru składników odżywczych [29], wzrostu biofilmu [30] czy systemu wielostresowego [31] zostało wykorzystanych w celu wytypowania silnych związków, które będą skuteczne przeciwko bakteriom w środowisku, z którym będą obcować w rzeczywistych warunkach. Fenotypowe badania przesiewowe często prowadzą do identyfikacji ograniczonych trafień, w tym głównie ukierunkowanych na ścianę i błonę komórkową [32].

Ze względu na złożoność prątków, restrukturyzacja procesu odkrywania leków w celu lepszego przyswojenia nowych postępów w tej dziedzinie jest potrzebą chwili. Aby ożywić ten proces należy, obok tradycyjnego, wprowadzić innowacyjne podejścia.

2.2.1 Zmiana przeznaczenia leku

Konwencjonalny proces odkrywania leków, od momentu określenia struktury wiodącej do momentu wprowadzenia leku na rynek, zajmuje około 10–15 lat i wymaga ogromnego nakładu finansowego. Alternatywną drogą jest repozycjonowanie bądź przekierowywanie leków polegające na nadaniu nowego zastosowania starym lekom, które są włączone do leczenia innej jednostki chorobowej albo związkom, które znajdowały się w II/III fazie badań klinicznych, ale nie zostały dopuszczone do dalszego rozwoju w kierunku pierwotnego przeznaczenia. Podejście to nabrało rozpędu w związku ze skróceniem czasu (do 5–7 lat) i niskimi wymaganiami budżetowymi przy jednoczesnym

wysokim wskaźniku sukcesu i ograniczeniu problemów związanych z bezpieczeństwem [33,34].

Szereg bibliotek leków zatwierdzonych przez FDA zostało przeszukanych pod kątem *M. tuberculosis* w celu wyłonienia kandydatów mogących zostać bezpośrednio zakwalifikowanych do II fazy badań klinicznych. Zespół Brindha spośród 1554 leków badanych względem enzymu ligazy murE wyłonił akarbozę – lek przeciwcukrzycowy jako potencjalny środek przeciwgruźliczy [33]. Battah i wsp. przeprowadzili identyfikację pod kątem aktywności przeciwprątkowej wobec szczepu referencyjnego H₃₇Rv oraz dwóch izolatów klinicznych z fenotypem oporności (H3 i Beijing). 3000 leków poddano wirtualnej analizie przesiewowej wobec metaloenzymów, Zmp1 (metaloproteazy zależnej od cynku) i deformylazy peptydowej, wykazując, iż eltrombopag (agonista receptora trombopoetyny) i arotinolol (obniżający ciśnienie krwi) hamowały wzrost szczepu H₃₇Rv, odpowiednio, w stężeniu 6,25 i 3,125 μM [35]. Prześwietlenie, przez zespół Sundara, 3176 leków przeciwko serynowo-treoninowej kinazie białkowej A (PknA) doprowadziło do identyfikacji leków na bazie witaminy B, mogących znaleźć zastosowanie w terapii gruźlicy [36]. We wszystkich przypadkach podpierano się badaniami *in silico* z zastosowaniem dokowania molekularnego [34–36].

Badania tego typu objęły także fluorochinolony. Są one antybiotykami o szerokim spektrum działania hamującymi enzymy topoisomerazy. Moksyflokscyna, gatiflokscyna i fluorochinolony nowej generacji wykazują obiecującą aktywność przeciwprątkową i są w trakcie przechodzenia badań klinicznych oceniających ich skuteczność w pojedynczym zastosowaniu lub w połączeniu z innymi lekami przeciwgruźliczymi, głównie pod kątem leczenia MDR-TB [37]. Dube wraz zespołem, opierając się na rusztowaniu chinolonu, skonstruował nowe pochodne, a analiza dokowania molekularnego wykazała, iż oddziałują one w tym samym miejscu wiążącym, co inne inhibitory flawoenzymu 2'-epimerazy dekarpenylofosforylo-β-D-rybozy (DprE1). Ponadto jeden związek hamował wzrost szczepu *M. tuberculosis* wykazującego ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP) przy minimalnym stężeniu hamującym (MIC) <0,244 μM, porównywalnie z izoniazidem [38]. Embonian pirwinu, pochodna chinoliny o działaniu przeciworobaczym zakłócająca łańcuch transportu elektronów, w badaniu przeprowadzonym przez zespół Guana wykazała zdolność do hamowania wzrostu zarówno wrażliwych, jak i opornych szczepów gruźlicy z MIC₉₉ (minimalnym stężeniem hamującym 99% drobnoustrojów) w zakresie od 1,55 do 4,8 μg/ml [39]. Harbut i wsp. dowiedli, że auranofin, podawany w reumatoidalnym zapaleniu stawów inhibitor bakteryjnej reduktazy tioredoksyny, jest efektywny zarówno

wobec replikujących, jak i niereplikujących *M. tuberculosis* z MIC o wartości 0,5 µg/ml. Auranofin wykazuje działanie addytywne z izoniazydem i rifampicyną przy średnim wskaźniku frakcjonowanego stężenia hamującego (FIC) wynoszącym odpowiednio 1,0 i 0,9 [40]. Ponadto w II fazie badań klinicznych przeprowadzanych pod kątem aktywności przeciwpłatkowej znalazły się leki: nitazoksanid (lek przeciw pasożytniczy), metmorfin (lek przeciwcukrzycowy), prawastatyna (lek zmniejszający produkcję cholesterolu), a *in vitro* rozwijane są werapamil (bloker kanałów wapniowych), tebipenem (lek przeciwzapalny) czy triodazyna (lek antypsychopatyczny), a także wiele innych [41,42].

2.2.2 Terapia ukierunkowana na gospodarza

Eksploracyjnym podejściem w stosunku do tradycyjnej procedury leczenia, koncentrującej się na ukierunkowaniu na odpowiedzialne za przetrwanie patogenu w organizmie gospodarza szlaki bakteryjne, jest terapia skierowana do gospodarza (ang. *host-directed therapy*, HDT), która skupia swoją uwagę na modulowaniu szlaków komórkowych gospodarza w celu przeciwdziałania wzrostowi bakterii (Rys. 3).

Prątek gruźlicy po dostaniu się do płuc drogą kropelkową fagocytowany jest przez komórki dendrytyczne oraz makrofagi pęcherzykowe, w których zdolny jest do przetrwania i rozmnażania się. Patogen wchłonięty do wnętrza komórki żernej tworzy fagosom, a ten łączy się z lizosomem tworząc fagolizosom. Zatrzymywanie bakterii w makrofagach odbywa się poprzez autofagię, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu, wydzielanie cytokin (TNF, chemokin) oraz rekrutację komórek układu odpornościowego do miejsca zakażenia [43]. Komórki dendrytyczne migrując do węzłów chłonnych inicjują swoistą odpowiedź immunologiczną w postaci limfocytów CD4⁺ i CD8⁺, a te z kolei wracając do miejsca infekcji stymulują zainfekowane makrofagi do wydzielania interferonu gamma (IFN-γ) powodującego ich apoptozę [44]. Aby uniknąć zakażenia bakterią istotne jest zachowanie równowagi między reakcją prozapalną a przeciwzapalną. W tym celu makrofagi uwalniają cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-4, IL-10 [43].

Stan zapalny w makrofagach pęcherzykowych kontrolowany jest przez ikanzoidy, leukotrieny i lipoksyny. Prostaglandyny (PGE₂) wraz z leukotrienami B₄ (LTB₄) propagują stan zapalny, podczas gdy lipoksyna A₄ (LXA₄) go ogranicza [45]. Stosowanie leków przeciwzapalnych, takich jak aspiryna, zmniejsza migrację neutrofilów oraz produkcję TNF-α [44]. Niesteroidowe leki zapalne, takie jak ibuprofen i celekoksyb, ograniczają powstawanie prostaglandyny poprzez hamowanie cyklooksygenaz. Są to, rozwijane

w badaniach klinicznych, terapie wspomagające w celu złagodzenia stanu zapalnego towarzyszącego zakażeniu prątkami [46].

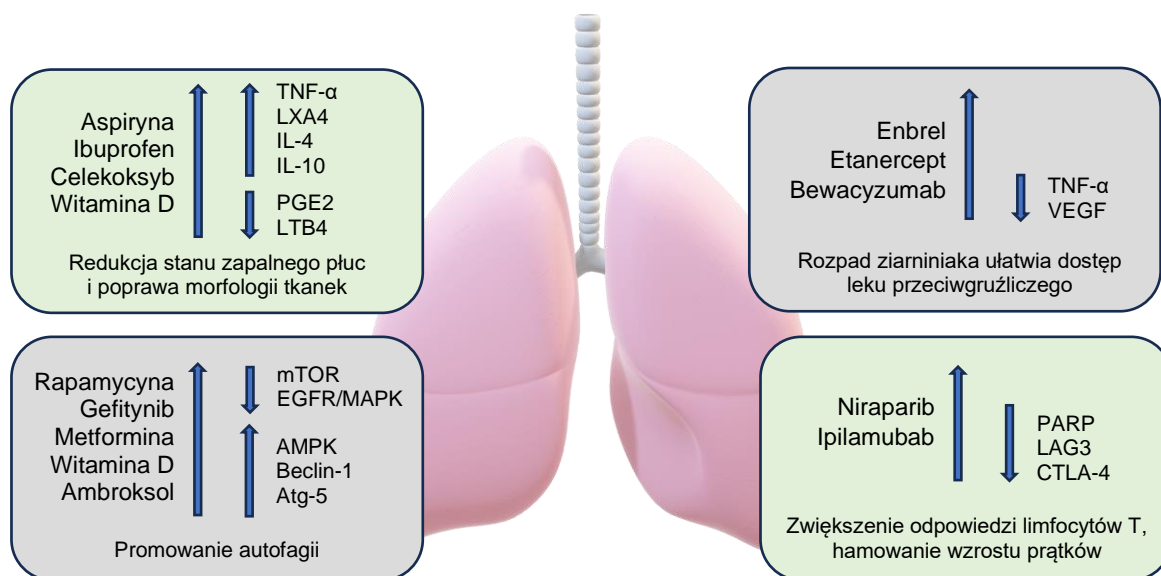
Ziarniniak, powstały w wyniku odpowiedzi immunologicznej na przewlekły bodziec zapalny, to skupisko makrofagów otoczone wałem bakterii, fibroblastów, neutrofilów, komórek dendrytycznych, limfocytów B i T, które w sposób ciągły uwalniają cytokiny i chemokiny w celu ograniczenia infekcji bakteryjnej [47]. Morfologia ziarniniaka decyduje o tym, czy będzie on faworyzował reakcję gojenia czy reakcję destrukcyjną na gospodarza. Aby generować reakcję gojenia należy zachować odpowiednią równowagę między TNF- α , IFN- γ i innymi cytokinami. Tworzenie naczyń wspomaga, sprzyjającą apoptozie, migrację komórek odpornościowych do ziarniniaka. HDT ma na celu namierzenie ziarniniaka poprzez hamowanie i neutralizowanie produkcji TNF- α prowadzące do rozpadu ziarniniaka, co z kolei ułatwia działanie leku przeciwgruźliczego [48,49]. Wykazano, że enbrel i etanercept, inhibitory TNF- α , zmniejszają ilość bakterii, gdy są stosowane w połączeniu z lekami przeciwgruźliczymi [49,50]. Cechą charakterystyczną ziarniniaka, indukowaną przez niedotlenienie w jego mikrośrodowisku, jest zwiększona ekspresja VEGF (czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego) – czynnika odpowiedzialnego za proces angiogenezy. Inhibitory VEGF, takie jak bewacyzumab, wykazują korzystny wpływ poprzez zmniejszenie niedotlenienia i ułatwienie wnikania leków do ziarniniaka [44,49].

Autofagia polega na lizosomalnej degradacji wewnątrzkomórkowego patogenu. Jest ona indukowana w komórkach zainfekowanych prątkami przez różne mechanizmy, takie jak szlak STING (stymulator genów interferonu) [51]. Ponieważ u pacjentów zakażonych *M. tuberculosis* obserwuje się hamowanie autofagii, modulacja autofagii może być indukowana terapią ukierunkowaną na gospodarza, która zwiększy dojrzewanie fagosomów i zabijanie prątków [52]. Lek immunosupresyjny – rapamycyna aktywuje autofagię poprzez hamowanie szlaku kinazy mTOR, jednak jej rola jest ograniczona, gdyż podlega metabolizmowi przez enzym cytochromu P450 3A4 (CYP3A4), którego induktorem jest rifampicyna [53]. Inhibitor kinazy proteinowej – gefitynib aktywuje autofagię poprzez celowanie w szlak kinazy białkowej aktywowanej przez mitogen (MAPK), z którym pośredniczy receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) [54]. Natomiast lek przeciwcukrzycowy – metformina aktywuje autofagię poprzez aktywację AMPK (kinazy białkowej aktywowanej przez AMP) i produkcję mitochondrialnych reaktywnych form tlenu [55]. 1,25-Dihydroksywitamina D promuje autofagię poprzez zwiększenie ekspresji katelicydyny, która wyzwała transkrypcję genów związanych

z autofagią, Beclin-1, Atg-5 [56]. Zespół badawczy Choi'a, wykorzystując mikroskopię HCS, wykrywał indukcję autofagii przez ambroksol (lek mukolityczny) w mysich makrofagach pochodzących ze szpiku kostnego. Zaobserwował, że ambroksol zaburza przeżywalność prątków, ale nie wpływa na hodowlę akseniczną, co dowodzi, iż mechanizm działania pochodzi od gospodarza. Co więcej, ambroksol nasila przeciwprątkowe działanie rifampicyny [57].

W terapii celowanej, właściwe limfocyty T wybierane są w oparciu o ekspresję markera powierzchniowego, który wspomaga przenikanie do pożądanej tkanki, profil ekspresji cytokin i opartej na multimerach identyfikacji specyficznych epitopów, co wspomaga klirens bakterii [46,58]. Inhibitory polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP), takie jak niraparib, mogą zwiększać komórkową odpowiedź odpornościową poprzez poprawę utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach, co podczas infekcji pomaga w rozwoju limfocytów T CD8⁺ pamięci immunologicznej. Gen aktywacji limfocytów (LAG3) zmniejsza specyficzną odpowiedź immunologiczną antygeny CD4, stąd inhibitory LAG3 poprawiają odpowiedź komórkową. Ipilimumab, inhibitor sygnału CTLA-4 (cytotoksycznego antygeny-4 limfocytów T) poprzez aktywację limfocytów T zwiększa ich naciek w prątku prowadząc do śmierci jego komórek [44].

Niektóre z wyżej wymienionych leków poddawane są obecnie próbom klinicznym w celu zbadania ich skuteczności i profilu bezpieczeństwa. Uniwersytet Emory'ego testuje wpływ witaminy D na układ odpornościowy pacjenta z gruźlicą oraz potencjalną rolę katelicydyny (LL-37) jako mechanizm właściwości przeciwprątkowych witaminy D u gospodarza [59]. Badania kliniczne przeprowadzone w Etiopii dowiodły, iż wzbogacenie witaminy D o fenylomaślan wpływa łagodząco na objawy kliniczne gruźlicy [60]. W innym randomizowanym badaniu klinicznym 600 000 j.m. witaminy D wykazało zwiększone ustąpienie odpowiedzi zapalnej gospodarza poprzez promowanie wydzielania IFN- γ u pacjentów [61]. Trwa również badanie kliniczne obejmujące metforminę oraz leki pierwszego rzutu, które dotyczy czasu trwania konwersji posiewu plwociny, bezpieczeństwa i tolerancji kilku kombinacji, a także regulacji autofagii i odpowiedzi immunologicznej u badanych kandydatów [62]. Wyniki badań klinicznych umożliwiłyby stwierdzenie zasadności terapii ukierunkowanej na gospodarza jako terapii wspomagającej w walce z gruźlicą.



Rys. 3 Modulacja szlaków gospodarza w celu zmiany interakcji gospodarz-patogen na korzyść gospodarza

2.2.3 Systemy dostarczania leków poprzez nanocząstki

Często dzieje się tak, że dobre wyniki uzyskane przez leki w fazie badań przedklinicznych nie przekładają się na wyniki w badaniach klinicznych ze względu na krótki okres trwania w osoczu, szybki klirens czy niedostateczne stężenie leku w punkcie uchwytu bakterii [63].

Nanocząstki (zakres wielkości od 1 do 100 nm) obejmują materiały zaprojektowane na poziomie atomowym lub molekularnym. Poprzez przyłączenie lub enkapsulację mogą zostać wykorzystane jako nośnik w lekach o kontrolowanym uwalnianiu [64,65]. Zadaniem wykorzystywanych nanocząstek jest zwiększenie wartości terapeutycznej stosowanych leków poprzez modyfikacje ich czasu retencji, rozpuszczalności i przechodzenie przez bariery biologiczne. Ulepszona w ten sposób biodostępność pozwala na zwiększenie efektywności terapii pacjenta i ograniczenie objawów niepożądanych wynikających z długiego stosowania preparatów leczniczych. Ponadto koniugaty nanocząstka-lek zwiększają tolerancję leku u pacjenta oraz redukują koszty terapii [66,67].

Kontrolowane dostarczanie realizowane jest zgodnie z dwoma głównymi koncepcjami – pasywnego i aktywnego celowania (Rys. 4) [66]. W celowaniu pasywnym nanocząstki zawierające lek kierowane są do obszaru bez wymaganej modyfikacji, takiej jak asocjacja kompleksu ligand-receptor. Makrofagi, monocyty i komórki dendrytyczne z łatwością pobierają nanocząstki w procesie fagocytozy lub endocytozy, tworząc pęcherzyki endocytarne. Endosomy łączą się z lizosomami, których hydrolazy lizosomowe

rozkładają zawartość uwalniając lek w komórkach fagocytarnych. Ponieważ makrofagi są stale rekrutowane do obszaru zakażenia prątkami, nanocząstki zawierające lek są biernie kierowane do zakażonego obszaru [68–70]. Carrera i wsp. dowiedli, iż zastosowanie jako transportera miceli polipeptydowych powlekanych alginianem sodu w pasywnym celowaniu bedakiliny zwiększa aktywność *in vitro* w porównaniu z wolną postacią leku [71]. Nanocząstki chitozanu obciążone bedakiliną, badane przez zespół Rawala pod kątem ich aktywności przeciwprątkowej, nie wykazały toksyczności wobec komórek makrofagowych J774 w porównaniu z bedakiliną podawaną doustnie. Badania farmakokinetyczne wykazały wyższe stężenie bedakiliny w płucach dzięki opracowanej formulacji [72].

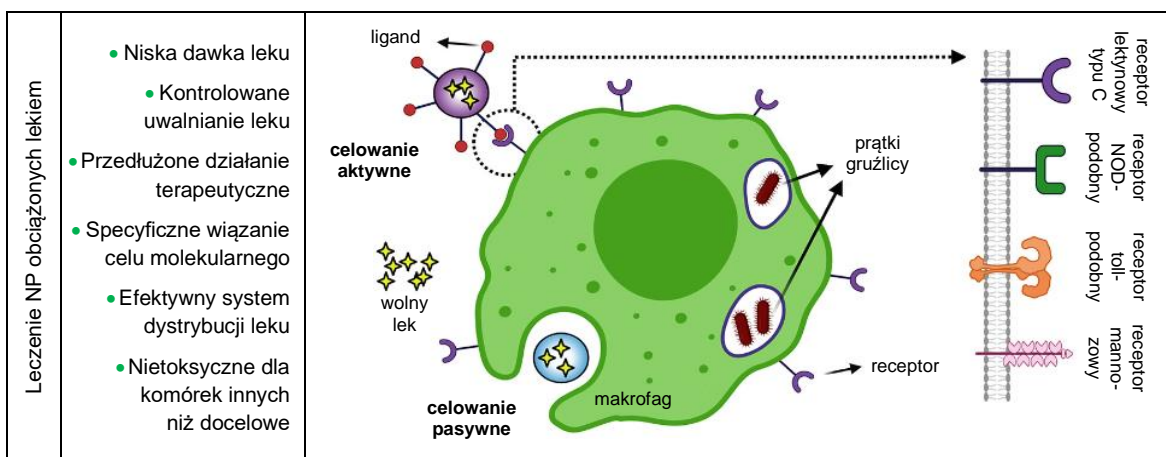
Celowanie aktywne odnosi się do kierowania nanonośników obciążonych lekami w miejsce infekcji. Powłoka nośnika modyfikowana jest specyficznym ligandem naprowadzającym, którego zadaniem jest swoiste związanie się z receptorem na powierzchni chorobowo zmienionej. Oddziaływanie ligand-receptor prowadzi do szybkiego wychwytu nanonośników przez komórki, zwiększając w ten sposób stężenie leku w miejscu docelowym. W przypadku gruźlicy charakterystyczne receptory fagocytów jednojądrzastych (MPS), tj. receptory rozpoznające cząsteczki patogenu (PRRs), takie jak receptory toll-podobne, receptory lektynowe typu C lub receptor mannozowy oraz receptor NOD-podobny, brane są pod uwagę jako receptory docelowe [68]. Receptory mannozy ulegają silnej ekspresji na makrofagach pęcherzykowych, co czyni je potencjalnym celem dostarczania leków przeciwgruźliczych. Costa i wsp. wykazali, iż mannozylowane stałe nanocząstki lipidowe (SLN) były szybciej pobierane przez makrofagi w porównaniu z SLN. Zaobserwowano również, że preinkubacja komórek z mannozą prowadzi do spadku wychwytu mannozylowanego SLN, co potwierdza rolę interakcji ligand-receptor, która powoduje internalizację nanocząstek [73].

Różne klasy nanonośników wykazują wyróżniające się właściwości i w oparciu o system dostarczania leku można je podzielić na lipidowe, emulsyjne i pęcherzykowe systemy dostarczania leków. Te systemy dostarczania leków zwiększają rozpuszczalność leków hydrofobowych oraz poprawiają wchłanianie leków [70].

Nieważne, doustne podawanie nanonośników jest preferowaną drogą wchłaniania nanocząstek. Jednak ograniczenia związane z podawaniem doustnym, takie jak niskie pH w soku żołądkowym, powolny początek działania i metabolizm pierwszego przejścia, ograniczają dostępność leku zawierającego nanocząstki w miejscu objętym chorobą. Podanie dożylnie pozwala uniknąć powyższych ograniczeń i umożliwia wchłonięcie leków do krążenia ogólnoustrojowego oraz dokładniejszą kontrolę podawanej

dawki, ale jego inwazyjny charakter i toksyczność związana z dużą ekspozycją ogólnoustrojową ogranicza jego zastosowanie [68,74]. Dopłucne dostarczanie leku zapewnia lepsze celowanie w makrofagi pęcherzykowe z głębszą depozycją w płucach, ominięcie metabolizmu pierwszego przejścia, lepszą rozpuszczalność leku, szybkie działanie, nieinwazyjną terapię promującą samopodawanie oraz lepszy efekt terapeutyczny, ponieważ kieruje leki bezpośrednio do płuc z wysokim stężeniem leku i zmniejsza częstotliwość dawkowania.

Podczas podawania wziewnego nanoosiłki mogą tworzyć agregaty o dużych, mikrometrowych rozmiarach i powinny unikać osadzania się w górnych drogach oddechowych. Aerodynamiczne cząstki o wielkości 1–5 μm uważa się za odpowiednie do osadzania w płucach. Niektóre z szeroko stosowanych preparatów do inhalacji to inhalator proszkowy, inhalator z aerozolem o odmierzonej dawce i nebulizator [74–76]. Inhalacyjne nanocząstki chitozanu obciążone izoniazydem i rifampicyną wykazały niższą cytotoksyczność i skuteczną redukcję infekcji bakteryjnej u myszy BALB/c po podaniu dopłucnym przy użyciu nebulizacji kompresowej [77]. Aerozolizowane mannozylowane liposomy dostarczają nanoosiłki do makrofagów pęcherzykowych *in vitro* i *in vivo* wydajniej w porównaniu z niezmodyfikowanymi liposomami [78]. Zespół Ma przygotował nadającą się do inhalacji modyfikowaną mannozą stałą nanocząstkę lipidową (MAN-IC-SLN) wypełnioną izoniazydem do celowania w makrofagi. Badanie wykazało, że zmodyfikowane SLN wykazywały wyższy wychwyty komórkowy (97%) w porównaniu z niezmodyfikowanym (42%) [79]. Dowody te przemawiają za stosowaniem nanocząstek do celów terapeutycznych, a odpowiednie badania kliniczne mogą być dalej analizowane w celu ustalenia bezpieczeństwa, skuteczności i farmakokinetyki nanocząstek obciążonych lekiem u pacjentów z gruźlicą.



Rys. 4 Zastosowanie nanocząstek jako nośników leków

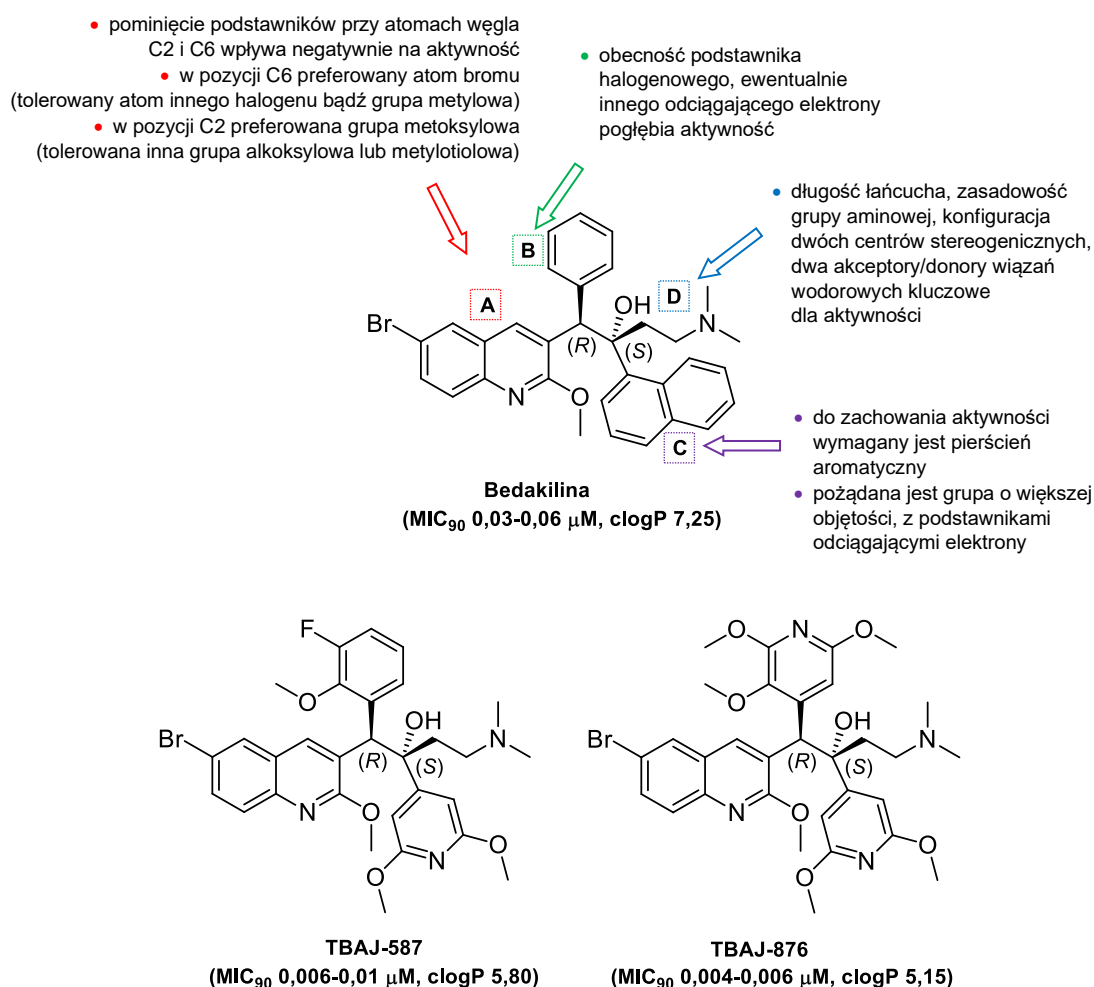
2.3. Kliniczne perspektywy leków przeciwgruźliczych

Aktualnie w fazie badań klinicznych I-III fazy znajduje się 26, a w fazie badań przedklinicznych 6 leków rozwijanych pod kątem ich zastosowania w leczeniu gruźlicy [80]. Przedstawiona analiza struktura-aktywność (SAR) [81–83] potwierdza zasadność optymalizacji struktur wiodących w kierunku wzmocnienia ich działania oraz poprawy profilu bezpieczeństwa czy profilu farmakokinetycznego.

Bedakilina (Sirturo®, Janssen Pharmaceutica, III faza badań klinicznych), zatwierdzona w 2012 roku przez FDA oraz w 2014 roku przez EMA jako element schematu leczenia skojarzonego MDR-TB, jest pierwszym lekiem w klasie diarylochinolin [80]. Została odkryta w fenotypowym badaniu przesiewowym przeprowadzonym na 70 000 związków wobec komórek niepatogennego szczepu modelowego *M. smegmatis* [84]. Wykazuje działanie bakteriobójcze również względem niereplikujących prątków gruźlicy, dzięki czemu ma potencjał do skrócenia terapii, a jej mechanizm działania opiera się na wybiórczym hamowaniu pompy protonowej syntazy ATP, będącej kluczowym enzymem biorącym udział w wytwarzaniu energii *M. tuberculosis*, poprzez wiązanie się do jej podjednostki c [85]. Jednakże ze względu na dużą lipofilowość cząsteczka ta ma tendencję do kumulacji w tkankach gospodarza wydłużając okres półtrwania w fazie eliminacji oraz do hamowania kanałów potasowych hERG prowadząc do wydłużenia odstępu QT (fragmentu zapisu elektrokardiograficznego) [86]. Ponadto, istnieją już doniesienia na temat mutacji w genach, *atpE*, *rv0678* i *pepQ*, wywołujących oporność na bedakilinę [87].

Próba optymalizacji związków z grupy diarylochinolin (Rys. 5) pod kątem ich aktywności wskazała kierunki możliwych modyfikacji w dwóch (B – pierścień fenyłowy i C – pierścień naftalenowy) z czterech jednostek strukturalnych [88]. Na podstawie serii syntez przeprowadzonych przez zespół Sutherlanda wyłonione zostały dwie cząsteczki, TBAJ-587 i TBAJ-876, które aktualnie zakwalifikowane są do I fazy badań klinicznych. Obie charakteryzowały się pogłębioną aktywnością tuberkulostatyczną w teście MABA (ang. *microplate alamar blue assay*) i LORA (ang. *low oxygen recovery assay*) oraz niższą kardiotoxycznością skorelowaną z ich niższą lipofilowością, w zestawieniu z bedakiliną (Rys. 5) [88,89,90]. Innym analogiem bedakiliny, również o tym samym mechanizmie działania, nieco niższej aktywności, ale poprawionym profilu bezpieczeństwa i parametrach farmakokinetycznych, jest sudapirydyna (WX-081, II faza badań

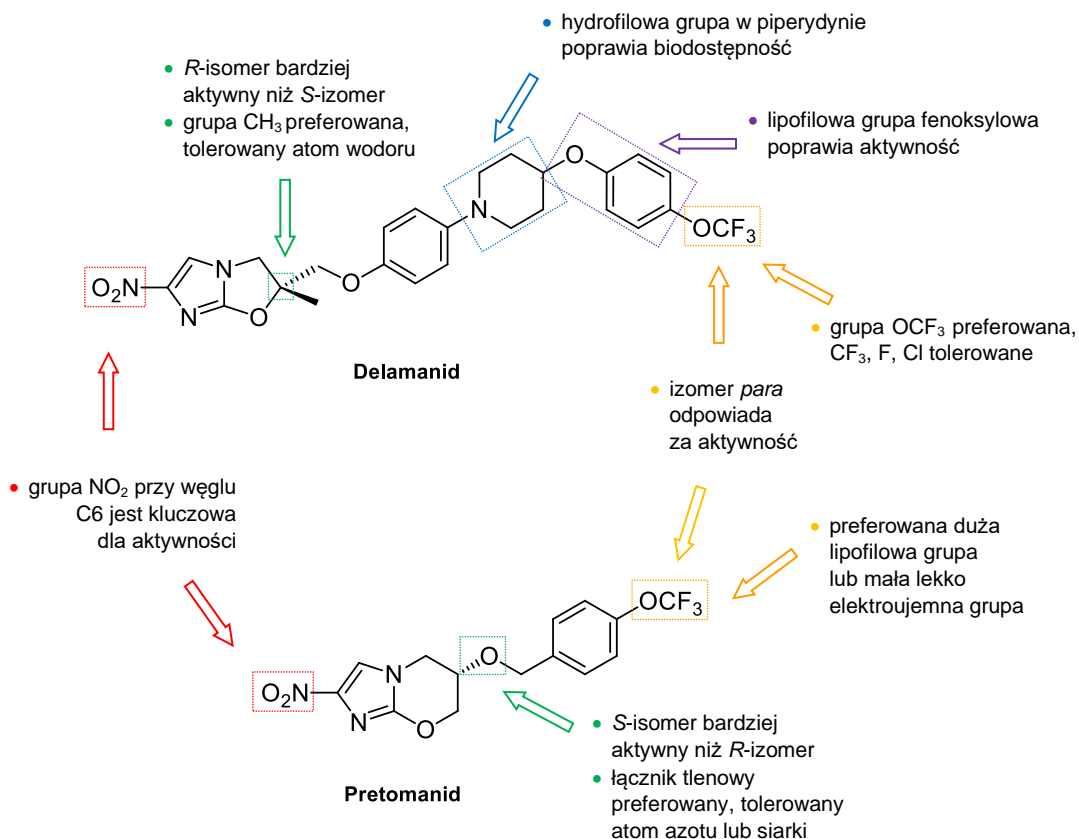
klinicznych), w której szkielet diarylochinolinowy (podjednostka A) przekształcony został w szkielet diarylopirydynowy [80,91].



Rys. 5 Pochodne diarylochinolinowe oraz ich zależność struktura-aktywność

Delamanid (Deltyba, Otsuka Pharmaceuticals), pochodna nitro-dihydroimidazooksazolu oraz pretomanid (PA-824, TB Alliance), pochodna nitroimidazolu, rozwijane aktualnie w III fazie badań klinicznych włączone zostały do terapii MDR-TB kolejno w 2014 roku przez EMA i w 2019 roku przez FDA (Rys. 6) [80,88]. Mechanizm działania obu związków jest dwukierunkowy. W przypadku prątków o aktywnym metabolizmie upośledzają biosyntezę kwasów keto- i/lub metoksymikolowych. U prątków o uśpionym mechanizmie, w warunkach beztlenowych, funkcjonują jako proleki. Ulegają aktywacji poprzez usunięcie grupy nitrowej przy udziale nitroreduktazy zależnej od koenzymu F420. W reakcji tej jako produkty uboczne powstają, w przypadku pretomanidu, reaktywne formy azotu zaburzające aktywność katalityczną enzymów łańcucha oddechowego, czego konsekwencją jest śmierć komórki. Najczęściej występująca

mutacja zachodzi w genie *ddn*, jednak ze względu na różny sposób wiązania obu leków oporność na delamanid nie koreluje z opornością na pretomanid i odwrotnie, dzięki czemu mają potencjał do zamiennego stosowania. Delamanid wykazuje silniejszą aktywność prątkobójczą niż pretomanid, przy niższych zastosowanych stężeniach i dawkach, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. [92].

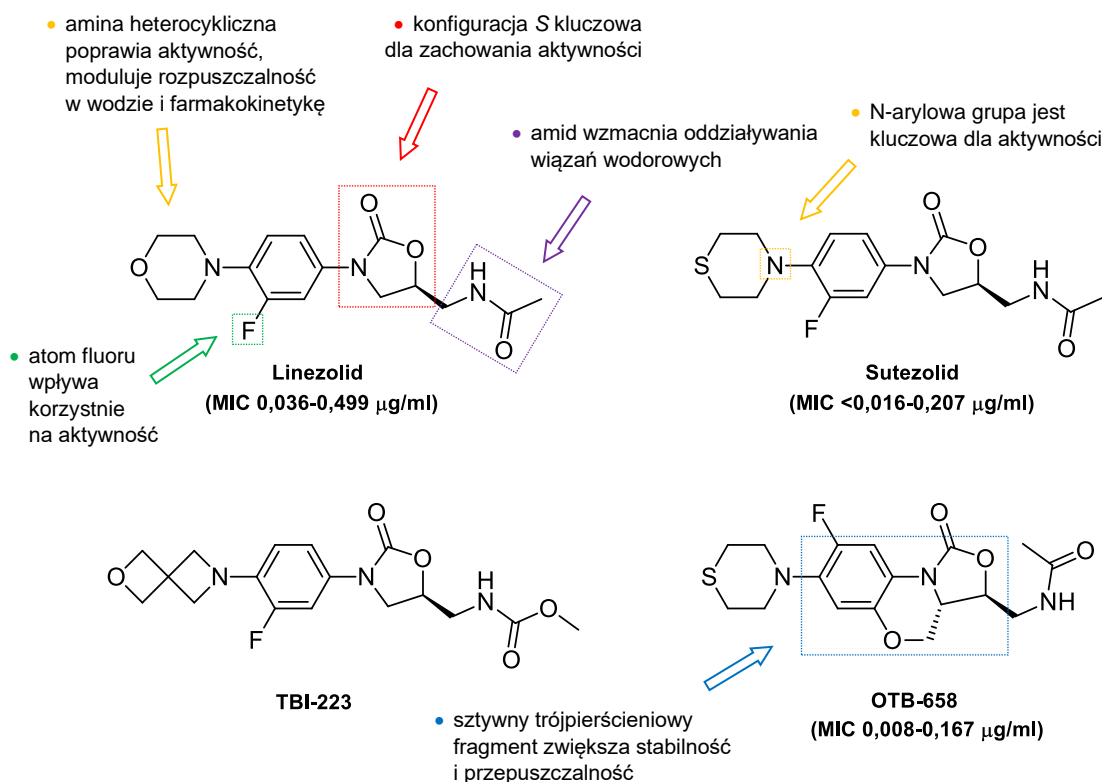


Rys. 6 Pochodne nitroimidazolu oraz ich zależność struktura-aktywność

Linezolid i sutezolid (II faza badań klinicznych) są pierwszymi syntetycznymi lekami należącymi do nowej klasy związków – oksazolidynonów (Rys. 7). Poprzez kompetycyjne wiązanie się z 23S rRNA podjednostki 50S rybosomu uniemożliwiają syntezę białek bakteryjnych [80,93]. Linezolid, zanim został wprowadzony w leczeniu MDR-TB, miał zastosowanie w ciężkich zakażeniach bakteryjnych, takich jak szpitalne zapalenie płuc, dzięki czemu jest dobrym kandydatem dla pacjentów z chorobami współistniejącymi [94]. Potencjał linezolidu i sutezolidu do skrócenia leczenia MDR-TB wiąże się z jego silnym działaniem sterylizującym. Badania kliniczne I fazy dowiodły, iż w przypadku sutezolidu, w przeciwieństwie do linezolidu, nie obserwuje się skutków

ubocznych, takich jak supresja funkcji szpiku kostnego, neuropatia obwodowa czy neuropatia nerwu wzrokowego [95].

Nowymi generacjami oksazolidynonów, testowanymi w badaniach klinicznych I fazy oraz badaniach przedklinicznych, są TBI-223 oraz OTB-658 [80]. Guo z zespołem wykonując zestawienie wyników badań na komórkach *in vitro* i *in vivo*, wobec szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv oraz klinicznych izolatów wrażliwych i opornych, dowiódł, iż każda kolejna wprowadzona modyfikacja strukturalna prowadziła do optymalizacji struktury wiodącej (Rys. 7). OTB-658 wykazał niską częstość występowania mutacji (10^{-8}), co zapobiegałoby pojawianiu się mutacji opornych na leki w schematach skojarzonych [96,97].

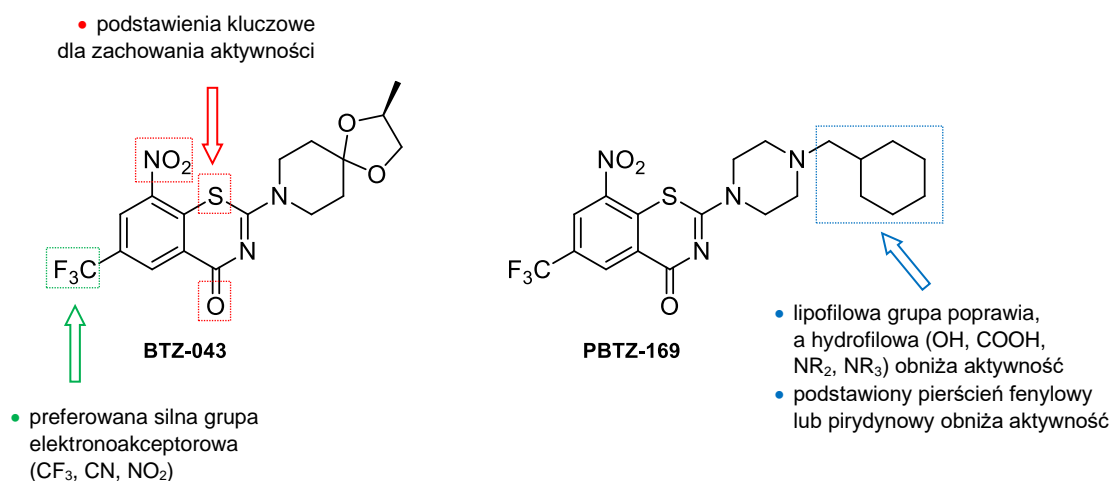


Rys. 7 Pochodne oksazolidynonów oraz ich zależność struktura-aktywność

BTZ043 (II faza badań klinicznych) jest pochodną benzotiazynonu, a jej celem molekularnym jest flawoenzym DprE1 biorący udział w katalizowaniu pierwszego etapu szlaku biosyntezy, arabinogalaktanu i lipoarabinomannanu [98]. W momencie odkrycia BTZ043 był najsilniejszym dotychczas opisanym inhibitorem wzrostu prątków w warunkach *in vitro*. Podczas gdy wartość MIC dla izoniazydu wynosiła 0,02–0,2 $\mu\text{g/ml}$, dla BTZ043 równa była 1 ng/ml. Pomimo iż związek nie wykazywał żadnych oznak

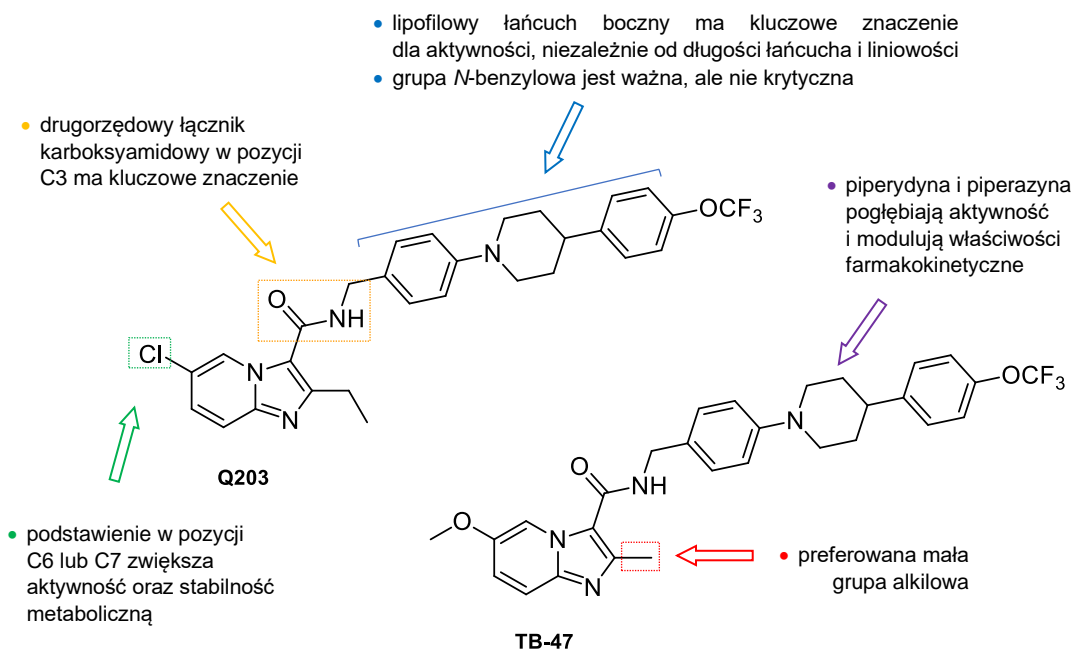
toksyczności czy mutagenności to również nie był porównywalnie wysoko skuteczny w mysim modelu przewlekłej gruźlicy [99].

Zespół Makarova zaprojektował nową serię podstawionych w pozycji N4 2-piperazyno-benzotiazynonów, na podstawie której wytypowano PBTZ-169 (macozinon, I faza badań klinicznych) o sile działania ponad 10-krotnie wyższej w porównaniu z BTZ-043 (Rys. 8). Ponadto wskazał silną korelację pomiędzy lipofilowością związków, a poprawą parametrów farmakodynamicznych skutkującą wzrostem skuteczności *in vivo*. Te, dla których wartość $\log P$ była poniżej 2,5 wykazywały słabsze działanie. BTZ-043 i PBTZ-169 aktywne są również wobec bakterii z rodzaju *Corynebacterium*, a także prątków niegruźliczych *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. bovis* [100].



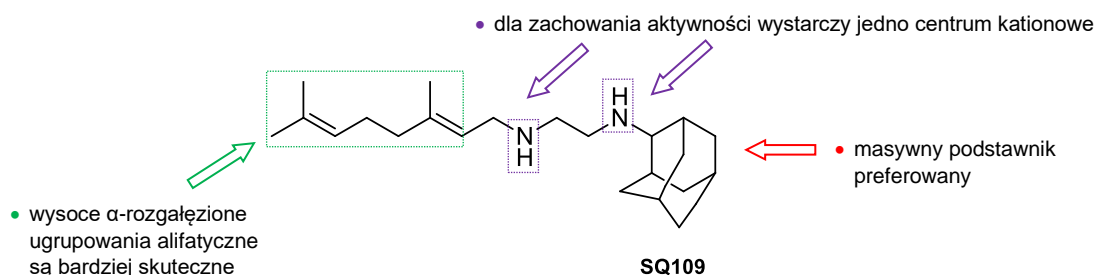
Rys. 8 Pochodne benzotiazynonu oraz ich zależność struktura-aktywność

Q203 (talacebec, II faza badań klinicznych) (Rys. 9), pochodna imidazopirydyny, została odkryta przez zespół badawczy Pethe'a poprzez zastosowanie fenotypowania zakażonych makrofagów metodą obrazowania HCS. Q203 blokuje podjednostkę cytochromu bc1(QcrB) biorącego udział w transferze elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego [101]. Wykazuje działanie bakteriobójcze wobec izolatów MDR/XDR-TB w stężeniu wynoszącym 0,008 $\mu\text{g/ml}$ oraz, pomimo wysokiej lipofilowości posiada doskonały profil bezpieczeństwa i tolerancji [80,102]. Jego pirazolopirydynowy analog (TB-47, badania przedkliniczne) wykazał wyjątkową synergistyczną sterylizującą aktywność z klofazyminą w mysim modelu gruźlicy [103].



Rys. 9 Analiza SAR Q203 i TB-47

Do identyfikacji związku SQ109 (Rys. 10), rozwijanego w II fazie badań klinicznych, wykorzystano przeszukiwanie bibliotek kombinatorycznych analogów opartych na strukturze etambutolu. SQ109 wykazuje aktywność przeciwko szczepom opornym na etambutol (MIC 0,9 μM), co sugeruje, iż charakteryzuje się innym mechanizmem działania niż jego struktura wiodąca. Początkowo sugerowano, iż SQ109 jest inhibitorem MmpL3 – białka błonowego transportującego monomikolan trehalozy, który niezbędny jest do włączenia kwasów mikołowych do ściany komórkowej *M. tuberculosis* [82]. Jednak aktywny jest on również wobec organizmów pozbawionych funkcjonalnego homologu MmpL3, takich jak *Helicobacter pylori*, *Trypanosoma cruzi*, *Candida albicans* i *Plasmodium falciparum*. Ta obserwacja oraz fakt, iż nie zaobserwowano występowania spontanicznych mutantów dowodzi oddziaływania SQ109 z kilkoma celami molekularnymi. Wykazano jego zdolność do rozpraszania pompy protonowej, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia syntezy ATP [81].



Rys. 10 Analiza SAR SQ109

Wraz z pojawieniem się nowych potencjalnych kandydatów w procesie odkrywania leków na gruźlicę ważne jest testowanie i weryfikowanie różnych kombinacji leków i schematów leczenia, w czym czynny udział bierze TB Alliance oraz jego partnerzy. Obecnie w badaniach klinicznych II i III fazy znajdują się około 15 leków, a prowadzone nad nimi prace mają na celu zrozumienie sposobu w jaki leki działają w połączeniu ze sobą oraz w połączeniu z już ustalonym schematem. Terapia skojarzona pozwala na eliminację bakterii znajdujących się w różnych środowiskach gospodarza (ośrodek tlenowy i hipoksyjny), zmniejszenie dawek leków oraz zmniejszenie częstości przyjmowania leków. Zrozumienie właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych leków jest również niezbędne do określenia dystrybucji leków i docelowych bakterii bytujących w makrofagach i kazeinie [104,105].

Badanie Nix-TB testuje profil skuteczności i bezpieczeństwa schematu BPaL obejmującego bedakilinę, pretomanid i linezolid w podaniu przez 6 miesięcy pacjentom z XDR-TB lub nietolerancyjnym MDR-TB (identyfikator badania: NCT02333799). Pomimo toksyczności hematologicznej wywoływanej przez linezolid, wyniki badania odznaczały się 90% skutecznością, a więc wyższą niż tradycyjny schemat leczenia [107]. Badanie ZeNix jest następstwem badania Nix-TB i sprawdza, czy skuteczność schematu BPaL jest utrzymywana przy jednoczesnym zmniejszeniu dawki linezolidu (identyfikator badania: NCT03086486).

W 14-dniowym badaniu klinicznym II fazy NC001 schematu PaMZ (pretomanid, moksyflokscyna, i pirazynamid) (identyfikator badania: NCT01215851) wykazano jego skuteczność w zabijaniu bakterii w 99%. Badanie kliniczne III fazy przeprowadzone w 50 ośrodkach (REMoxTB) sprawdza, czy zastąpienie moksyflokscyny pojedynczym lekiem w standardowym schemacie leczenia mogłoby skrócić czas trwania terapii z 6 do 4 miesięcy u osób podatnych na leki (identyfikator badania: NCT00864383). Badanie to przeszło pozytywną weryfikację [108].

Randomizowane, wielokrajowe badanie kliniczne III fazy STREAM ma na celu ocenę zatwierdzonego przez WHO schematu MDR-TB z innymi schematami obejmującymi kanamycynę, moksyflokscynę, protionamid, lewoflokscynę, klofazyminę i bedakilinę przez 28–40 tygodni w różnych dawkach (identyfikator badania: NCT02409290). Inny nowy schemat leczenia pacjentów z MDR-TB to NEXT (II/III faza badań klinicznych) sprawdzający bezpieczeństwo, skuteczność i znaczenie schematu bez iniekcji jako alternatywę konwencjonalnej terapii w postaci wstrzyknięć (identyfikator badania: NCT02454205). BEAT to otwarte, wieloośrodkowe, randomizowane badanie

kliniczne III fazy oceniające 6-miesięczny schemat leczenia bedakiliną, linezolidem, delamanidem, klofazyminą i lewofloksacyną w porównaniu z obecnym 9-miesięcznym standardem leczenia gruźlicy odpornej na rifampicynę bedakiliną, izoniazydem, etambutolem, pirazynamidem, linezolidem, klofazyminą i lewofloksacyną (identyfikator badania: 04062201).

2.4. Projektowanie leków hybrydowych

Leki hybrydowe (ang. *hybrid drugs*), leki wielocelowe (ang. *multitarget drugs*, MTD), zaprojektowane wielokrotnie ligandy (ang. *designed multiple ligands*, DML) etc. to stosowane w literaturze określenia na cząsteczkę chemiczną powstałą w wyniku połączenia bezpośredniego lub z zastosowaniem łącznika co najmniej dwóch struktur wykazujących aktywność farmakologiczną. Inną, bardziej preferowaną metodą, ze względu na możliwość kontrolowania parametrów fizykochemicznych (masy cząsteczkowej i lipofilowości) hybrydy, jest jej utworzenie przy wykorzystaniu farmakoforów, tj. fragmentów strukturalnych poszczególnych związków składowych odpowiedzialnych za ich potencjał terapeutyczny. Związki otrzymane techniką hybrydyzacji, ze względu na ich zaprojektowanie do interakcji z wieloma celami molekularnymi jednocześnie, wykazują synergiczny efekt działania farmakologicznego. Co więcej, poprawiają profil farmakokinetyczny oraz zmniejszają podatność na oporność, ryzyko występowania działań niepożądanych i prawdopodobieństwo interakcji lek-lek [109]. Leki wielocelowe są szczególnie skuteczne w chorobach o złożonym patomechanizmie, takich jak choroby neurodegeneracyjne czy przewlekłe, w tym gruźlica [109–111].

2.4.1 Pirydyna jako farmakofor

Pirydyna jest sześcioczłonowym pierścieniem planarnym zbudowanym z jednego atomu azotu oraz pięciu atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 oraz posiadającym zdelokalizowany molekularny orbital π spełniający kryteria aromaticzności. Obecność wolnej pary elektronowej zlokalizowanej na atomie azotu determinuje jej własności zasadowe, charakter nukleofilowy (pozycje C2 i C4) oraz zdolność do międzycząsteczkowych oddziaływań z celami molekularnymi leku poprzez asocjację warstwową (ang. *π -stacking*), wiązania wodorowe i koordynację metali, a także wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [112,113].

Układy pirydynowe występują w wielu produktach pochodzenia naturalnego, w tym alkaloidach wykazujących działanie przeciwbólowe (epibatydyna), stymulujące (nikotyna)

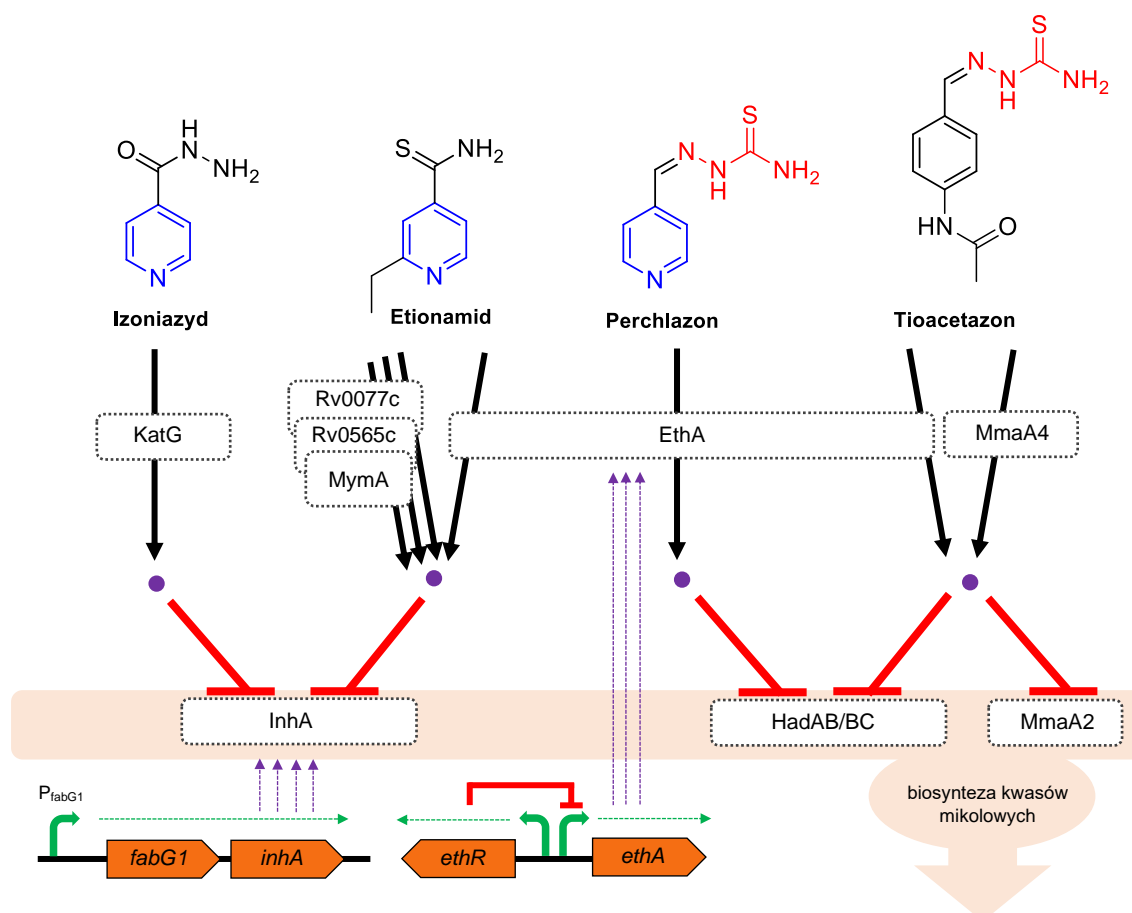
czy wpływające na układ krążenia (plumercydyna). W chemii organicznej z kolei stanowią najczęściej stosowane rusztowanie do projektowania i syntezy potencjalnych substancji leczniczych [112]. Baza US-FDA (Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków) wymienia około 100 leków będących pochodnymi pirydyny, m.in. przeciwnowotworowych (kryzotynib), przeciwzapalnych (piroksydam), antyretrowirusowych (delawirdyna), przeciwbakteryjnych (tedizolid), a także przeciwgruźliczych (etionamid, protionamid, izoniazyd) [114].

Wiele zespołów badawczych podejmowało próbę modyfikacji strukturalnej izoniazydu w obrębie azotowego pierścienia heterocyklicznego. W tym celu pirydynę zastępowano jej izosterami lub bioizosterami, takimi jak: piperydyna, benzen, chinolina, imidazo[1,2- α]pirydyna oraz furoksan. W każdym przypadku wprowadzona zmiana prowadziła do obniżenia bądź zaniku aktywności tuberkulostatycznej (MIC 0,079–600 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu ze związkiem wyjściowym (MIC 0,02 $\mu\text{g/ml}$), tym samym potwierdzając zasadność traktowania pirydyny jako jeden z elementów farmakoforowych podczas poszukiwania związków o tym zastosowaniu [115,116].

Tioacetazon jest jednym z przykładów leku przeciwgruźliczego, który pomimo wycofania ze stosowania u pacjentów, nadal jest przedmiotem badań mających na celu jego optymalizację jako struktury wiodącej. Szczególne zainteresowanie wzbudza ugrupowanie tiosemikarbazonowe, które jest głównym rusztowaniem również w lekach o innym zastosowaniu, np. przeciwnowotworowym (trapiaina) czy przeciwwirusowym (metisazon) [117]. Perchlazon, związek zawierający w swojej strukturze farmakofor pirydyny oraz farmakofor tiosemikarbazonowy, został dopuszczony w 2012 r. w Federacji Rosyjskiej do leczenia seropozytywnych pacjentów cierpiących na MDR/XDR-TB oraz najcięższą postać gruźlicy. Eksperymenty przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały jego efekt terapeutyczny porównywalny z izoniazydem, amikacyną i ofloksacyną. Co więcej, był bardziej skuteczny niż etambutol i ciprofloksacyna oraz został uznany za korzystniejszą alternatywę terapeutyczną fluorochinolonów. Ostatnie badania wskazały na wywołane przez perchlazon podostre narażenie inhalacyjne skutkujące genotoksycznością, którą jednak można zniwelować poprzez podanie dożylnie na nanonośniku modyfikowanym immunoglobuliną G [118].

Perchlazon ma podobny mechanizm działania do tioacetazonu, izoniazydu i etionamidu i wszystkie cztery częściowo dzielą szlaki biotransformacji. Izoniazyd i etionamid jest inhibitorem reduktazy enoilo-ACP kodowanej przez gen *inhA*, a perchlazon i tioacetazon dehydratazy β -hydroksyacylu-ACP kodowanej przez klaster genów

hadA-hadB-hadC. Oba enzymy wchodzą w skład systemu FAS II odpowiadającego za syntezę kwasów mikołowych. Tioacetazon działa dodatkowo na syntezę kwasu metoksymikołowego MmaA2 odpowiedzialną za tworzenie cyklopropanowanych metoksymikołanów. Isoniazyd oraz etionamid jako proleki przekształcane są w toksyczny addukt z NADH (dinukleotydem nikotynamidoadeninowym) w wyniku reakcji z enzymami występującym w *M. tuberculosis* i są to katalaza-peroksydaza (katG) i monoooksygenaza EthA. Alternatywnie etionamid może być aktywowany przez monoooksygenazy MymA, Rv0565c, Rv0077c. Ścieżka aktywacji przez monoooksygenazę EthA jest wspólna dla tioacetazonu, perchlazonu i etionamidu, a oporność krzyżowa między tymi trzema lekami wywoływana jest przez mutacje powodujące utratę funkcji w locus *ethA*. Inna mutacja związana z opornością na tioacetazon została zlokalizowana w genie *mmaA4*, który może być alternatywnym aktywatorem leku. Ze względu na wspólne szlaki aktywacji izoniazydu i etionamidu, nadekspresja genu *inhA* prowadzi do ich oporności krzyżowej. Gen *inhA* i *fabG1* są współtranskrybowane. Natomiast gen *ethA* podlega regulacji transkrypcyjnej przez represor EthR (Rys. 11) [119].



Rys. 11 Model mechanizmów działania izoniazydu, etionamidu, perchlazonu i tioacetazonu

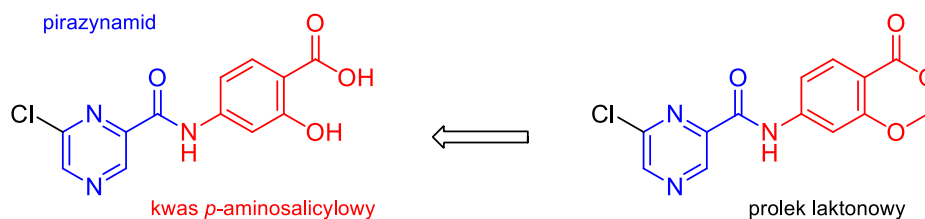
2.4.2 Pirazyna jako farmakofor

Strukturalnie, pirazyna (1,4-diazyna) różni się od pirydyny obecnością drugiego atomu azotu, który pod kątem interakcji z receptorem stanowi dodatkowy akceptor wiązań wodorowych. Ze względu na swój heteroaromatyczny charakter, podobnie jak pirydyna, w unikalny sposób łączy właściwości heteroatomów (oddziaływania polarne) z właściwościami ugrupowań aromatycznych (oddziaływania niepolarne). Drugi atom azotu poprzez wywoływanie ujemnego efektu indukcyjnego zmniejszającego gęstość elektronową wokół sąsiedniego atomu azotu powoduje spadek zasadowości pirazyny w porównaniu z pirydyną [120].

Motywy pirazyny, mimo iż znacznie rzadziej spotykany niż pirydyny, występuje w lekach przeciwzapalnych, przeciwnowotworowych (oltipraz, zibotentan) przeciwcukrzycowych (glipizyd), moczopędnych, a także przeciwgruźliczych (pirazynamid, morinamid) [122].

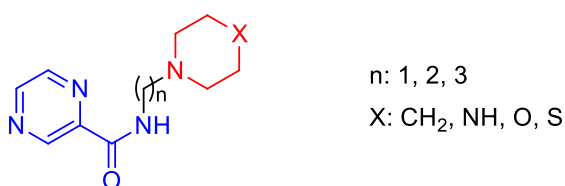
Bouz wraz z zespołem zaprojektował serię związków hybrydowych łączących pirazynamid oraz kwas *p*-aminosalicylowy, które charakteryzowały się szerokim spektrum aktywności przeciwprątkowej oraz selektywnością w stosunku do tych szczepów. Najsilniejszy z nich (MIC 3,13 µg/ml) wykazywał aktywność tuberkulostatyczną wobec szczepu H₃₇Rv na poziomie kwasu *p*-aminosalicylowego oraz znacznie wyższą niż pirazynamid (MIC >100µg/ml). Zachował również swoją aktywność *in vitro* wobec wielolekoopornych szczepów *M. tuberculosis*. W badaniach *in vivo* udowodniono, że jest nietoksyczny w modelach *Galleria mellonella* i danio pręgowanego oraz że zmniejsza liczbę jednostek tworzących kolonie w śledzionach w mysim modelu gruźlicy. Badania biochemiczne wykazały jego ukierunkowanie na mykobakteryjną reduktazę dihydrofolianową (DHFR), która wpływa na biosyntezę kwasu mikołowego. Przeprowadzone *in silico* badania dokowania molekularnego w połączeniu z dynamiką molekularną pozwoliły na zidentyfikowanie sposobu jego wiązania w mykobakteryjnym DHFR. Związek metabolizowany jest przez ludzkie frakcje wątrobowe poprzez powolną hydrolizę wiązania amidowego (czas połowicznego rozpadu ($t_{1/2}$) = 187 min) z wytworzeniem kwasu *p*-aminosalicylowego i jego wyjściowego kwasu 6-chloropirazynowego. Długi $t_{1/2}$ przewyżcza główną wadę kwasu *p*-aminosalicylowego (krótki $t_{1/2}$ wymagający częstego podawania dużych dawek). Wprowadzano również kilka modyfikacji strukturalnych w celu ulepszenia jego działania. Związek występujący w formie δ -laktonu miał silniejsze działanie *in vitro* przeciwko *M.tuberculosis* H₃₇Rv

(MIC 0,78 $\mu\text{g/ml}$). Lakton otwiera się w ludzkim osoczu do związku macierzystego ($t_{1/2} = 21,4 \text{ min}$) (Rys. 12) [122].



Rys. 12 Związek hybrydowy łączący pirazynamid i kwas *p*-aminosalicylowy

Zhou i wsp. zaprojektowali serię związków zawierających w swojej strukturze farmakofor pirazynamidu połączony łącznikiem alkilowym z aminą heterocykliczną należącą do ważnej grupy związków biologicznie czynnych (Rys. 13) [123,124]. Wykazano, iż długość łańcucha alifatycznego i rodzaj pierścienia sześcioczłonowego mają wpływ na ich działanie bakteriostatyczne wobec standardowego szczepu H₃₇Rv. Najsilniejsze okazały się związki zawierające w łańcuchu 2 atomy węgla oraz morfolinę lub tiomorfolinę. Wstrzymywały one wzrost i namnażanie się prątków, odpowiednio, w 99,6% oraz 93,6% przy wartości minimalnego stężenia bakteriostatycznego równej 8,0 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10,2 $\mu\text{g/ml}$. Wartości te dla pirazynamidu wynosiły, odpowiednio, 99,2% oraz 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Dla pozostałych pochodnych otrzymane wyniki były równie obiecujące. Współczynnik bakteriostatyczny był w granicy 80,1–92,0%, a minimalne stężenie bakteriostatyczne wahało się od 15,4 do 27,3 $\mu\text{g/ml}$ [123].

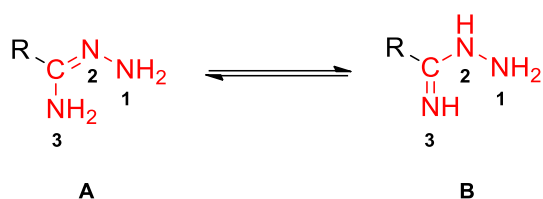


Rys. 13 Pochodne z farmakoforem pirazynamidu i aminy heterocyklicznej

2.4.3 Ugrupowanie amidrazonowe jako potencjalny farmakofor

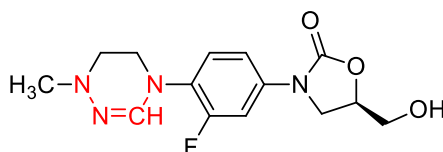
Amidrazony posiadają grupę funkcyjną zbudowaną z atomu węgla i trzech atomów azotu, z których tylko dwa, N1 i N3, mogą ulec podstawieniu. Wykazują zdolność do tautomerii poprzez migrację atomu wodoru między atomami azotu N3 i N2 i w zależności od formy tautomerycznej, w której występują nazywane są, zgodnie z nomenklaturą IUPAC, (karbo)hydrazonamidami (A) lub (karboksy)imidohydrazydami

(B) (Rys. 14). Jako zasady monokwasowe tworzą sole z kwasami nieorganicznymi, wśród których najbardziej znane są chlorowodorki [125,126].



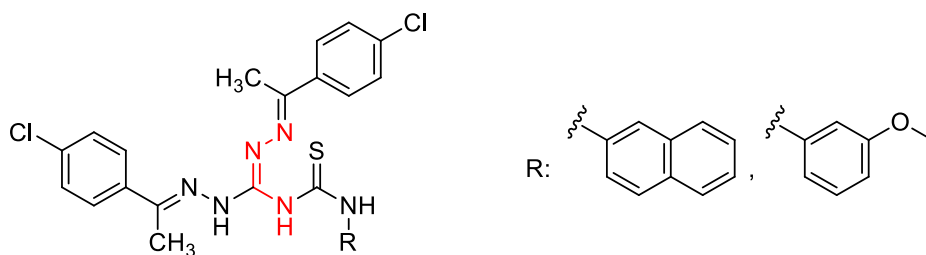
Rys. 14 Formy tautomeryczne amidrazonów

Delpazolid (LCB01-0371), zbudowany na farmakoforze oksazolidynonu, jest pierwszym związkiem zawierającym cykliczne ugrupowanie amidrazonu, który został opracowany do leczenia wielolekoopornej gruźlicy (Rys. 15). Delpazolid pomyślnie przeszedł badania kliniczne I fazy potwierdzając swoje bezpieczeństwo (maksymalna dawka tolerowana u ludzi = 2400 mg). Aktualnie przeprowadzana jest rekrutacja do badania II fazy, które dotyczy połączenia delpazolidu z bedakiliną, moksyflokscyną i delamanidem u pacjentów z nowo rozpoznaną, niepowikłaną, lekooporną gruźlicą płuc (identyfikator badania: NCT04550832).



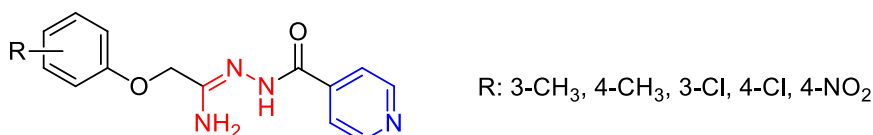
Rys. 15 Struktura delpazolidu – cyklicznego amidrazonu

Tapera wraz z zespołem otrzymali pochodne tiomocznika zawierające ugrupowanie aminoguanidynowe, które według niektórych źródeł traktowane jest jako ugrupowanie amidrazonowe (Rys. 16) [125,127]. W teście MABA, najwyższą aktywność tuberkulostatyczną wobec szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv z wartościami MIC wynoszącymi 0,78 μM oraz 1,56 μM wykazały pochodne zawierające fragment, odpowiednio, naftalenowy oraz anizolowy. Wartości te były jednak niższe w porównaniu z lekiem referencyjnym, jakim był izoniazyd (MIC 0,07 μM). Zastosowanie stężenia testowego 25 μM wobec linii ludzkich komórek embrjonalnych nerek (HEK) spowodowało zahamowanie ich wzrostu na poziomie niższym niż 50%, co świadczy o braku działania cytotoksycznego związków. Mechanizm ich działania polegał na hamowaniu enzymu inhA, co zostało potwierdzone *in vitro* i w badaniach obliczeniowych.



Rys. 16 Pochodne z ugrupowaniem aminoguanidynowym

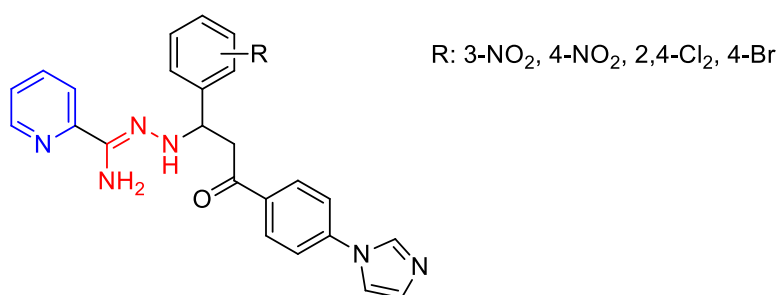
De Logu i wsp. opracowali serię izonikotynoilohydrazonów (Rys. 17), spośród której pięć najbardziej obiecujących związków poddano ocenie *in vitro* wobec 16 klinicznych izolatów *M. tuberculosis* (MIC₅₀ 3,12–12,5 mg/l; MIC₉₀ 6,25–12,5 mg/l) oraz pięciu szczepów referencyjnych, w tym H₃₇Rv (MIC 3,12–6, 25 mg/l) oraz czterech opornych na leki pierwszego rzutu – izoniazyd (MIC 12,5–100 mg/l), rifampicynę, pirazynamid i streptomycynę (MIC 1,56–12,5 mg/l). Jako leki referencyjne zastosowano izoniazyd, rifampicynę, etambutol, kwas *p*-aminosalicylowy i klofazyminę. Badane związki wykazały miana hamujące na poziomie etambutolu i klofazyminy oraz niższe niż izoniazyd (MIC 200 mg/l) i rifampicyna (MIC >100 mg/l) w przypadku szczepu, odpowiednio, INH- i RMP-opornego. Maksymalna nietoksyczna dawka pochodnych wobec linii komórkowej Vero pochodzącej z nerki małpy wynosiła 500–1000 mg/l. W przypadku niektórych kombinacji izonikotynoilohydrazonów z izoniazydem, kwasem *p*-amino-salicylowym, rifampicyną i etambutolem wykazano ich synergiczne działanie wobec szczepów referencyjnych prątków gruźlicy [128].



Rys. 17 Pochodne izonikotynoilohydrazynowe

Zespół Zampieri'ego zsyntezował szereg pochodnych o potencjalnym dwukierunkowym działaniu biologicznym, wprowadzając w tym celu do struktury pierścień imidazolu oraz ugrupowanie pirydyno-2-karboksyamidrazonowe, które kolejno odpowiedzialne są za aktywność przeciwgrzybiczą oraz przeciwprątkową (Rys. 18). Podczas projektowania związków skupiono się na podstawnikach lipofilowych i elektroakceptorowych, które zwiększając lipofilowość cząsteczek umożliwiłyby im przenikanie przez silnie hydrofobową ścianę komórkową prątków. Najniższymi stężeniami hamującymi odznaczały się: pochodne nitrowe wobec *M. tuberculosis* H₃₇Rva

(4,4 μM) oraz *M. scrofulaceum* (9,3 μM), 2,4-dichloropochodna wobec *M. intracellulare*, *M. avium* (33,3 μM) oraz *M. kansasii* (4,2 μM), a także 4-bromopochodna wobec *M. gordonae* (2,0 μM), *M. bovis* i *M. marinum* (8,2 μM). Wartości MIC były 5-krotnie niższe dla prątków gruźlicy, natomiast od 3,5- do 58-krotnie wyższe dla prątków niegruźliczych w zestawieniu z lekiem referencyjnym – izoniazydem. Ponadto, omawiane pochodne nie wykazały efektu cytotoksycznego wobec komórek linii Vero. Dla całej badanej serii nie zaobserwowano oczekiwanego zahamowania wzrostu szczepu *C. albicans* [129].



Rys. 18 Pochodne izonikotynoilohydrazynowe

Istnieje niewiele doniesień z ostatniego dziesięciolecia dotyczących nowych serii syntez z ugrupowaniem amidrazonowym, mimo iż jest ono stosowane w szerokim spektrum działania biologicznego. Stwarza to pewną lukę w nauce, a wiedzę w tym zakresie należałoby poszerzyć. Pochodne o tej strukturze stały się przedmiotem niniejszego opracowania.

2.5. Badania krystalograficzne

Nieocenionym narzędziem w procesie projektowania i odkrywania leków jest krystalografia rentgenowska pozwalająca na ustalenie z rozdzielczością na poziomie atomu pełnej trójwymiarowej struktury makrocząsteczek biologicznych (białek receptorowych), jak również na identyfikację miejsc wiążących i oddziaływań międzycząsteczkowych czy zmienności konformacyjnych towarzyszących utworzeniu kompleksów aktywnych ligand-receptor [130,131]. Dostępne dane eksperymentalne, wspierane metodami CADD (modelowaniem homologicznym, dokowaniem molekularnym, modelowaniem farmakofora czy dynamiką molekularną), umożliwiają typowanie lub optymalizację związków wiodących [132]. W oparciu o informacje uzyskane ze struktur krystalicznych docelowych białek wykryto m.in. wprowadzone na rynek farmaceutyczny kaptopril (lek przeciwnadciśnieniowy, inhibitor konwertazy angiotensyny), imatynib (lek

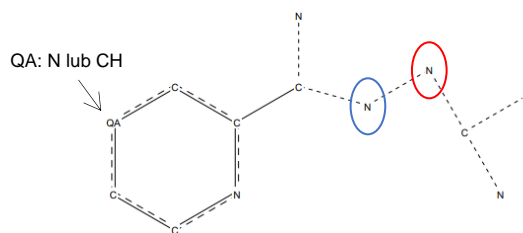
przeciwnowotworowy, inhibitor kinazy Bcr-Abl), relenzę (lek przeciwwirusowy, inhibitor neuraminidazy) czy rytonawir (lek antyretrowirusowy, inhibitor proteazy HIV) [133,134]. Stosując kombinację wymienionych metod projektowania leków wykryto silny inhibitor (NRB04248) kinazy proteiny G (PknG) – enzymu występującego w prątku gruźlicy, niewywołujący efektów cytotoksycznych wobec makrofagów gospodarza [135].

Z kolei posiadanie struktury krystalicznej zbioru ligandów o ustalonym działaniu biologicznym pozwala na dokładniejszą analizę zależności struktura-aktywność, która jest kluczowym etapem we wstępnej fazie projektowania leków. Określona konformacja związków, występujące w nich oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe oraz międzycząsteczkowe, a także upakowanie cząsteczek w kryształach mogą być istotnymi czynnikami wpływającymi na biodostępność i potencjał terapeutyczny [136,137].

2.5.1 Przegląd bazy CSD pod kątem pochodnych amidrazonowych

Krystalograficzna baza danych (ang. *Cambridge Structural Database*, CSD) to zbiór ponad 1,2 mln trójwymiarowych struktur małych cząsteczkowych związków organicznych i metaloorganicznych wyznaczonych głównie metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich [138,139]. Dokonano jej przeszukania pod kątem struktur o budowie zbliżonej do dwóch grup związków, które zostały zsyntezowane i omówione w dalszej części niniejszej dysertacji, a mianowicie tiosemikarbazonowych oraz iminowych pochodnych amidrazonów.

W pierwszym przypadku ważnym elementem było uwzględnienie delokalizacji elektronów w ugrupowaniu tiosemikarbazonowym, co umożliwiło wyszukanie wszystkich przyjmowanych przez związek form (Rys. 19). Spośród 27 znalezionych podobnych struktur (42 cząsteczek – w części niezależnej komórki elementarnej niektórych z nich znajduje się więcej niż jedna cząsteczka) 10 struktur (19 cząsteczek) przyjęło formę neutralną, natomiast 17 struktur (23 cząsteczki) formę zwitterionową. Formy różnią się położeniem protonu przy pozycjach azotowych ugrupowania tiosemikarbazonowego. Występowanie atomu wodoru przy atomie azotu oznaczonym na rysunku 19 kolorem niebieskim odpowiada formie zwitterionowej, natomiast czerwonym formie neutralnej. Zjawisko tautomerii dla tego typu związków zostało szerzej opisane w podrozdziale 4.1.1 i 4.2.1.

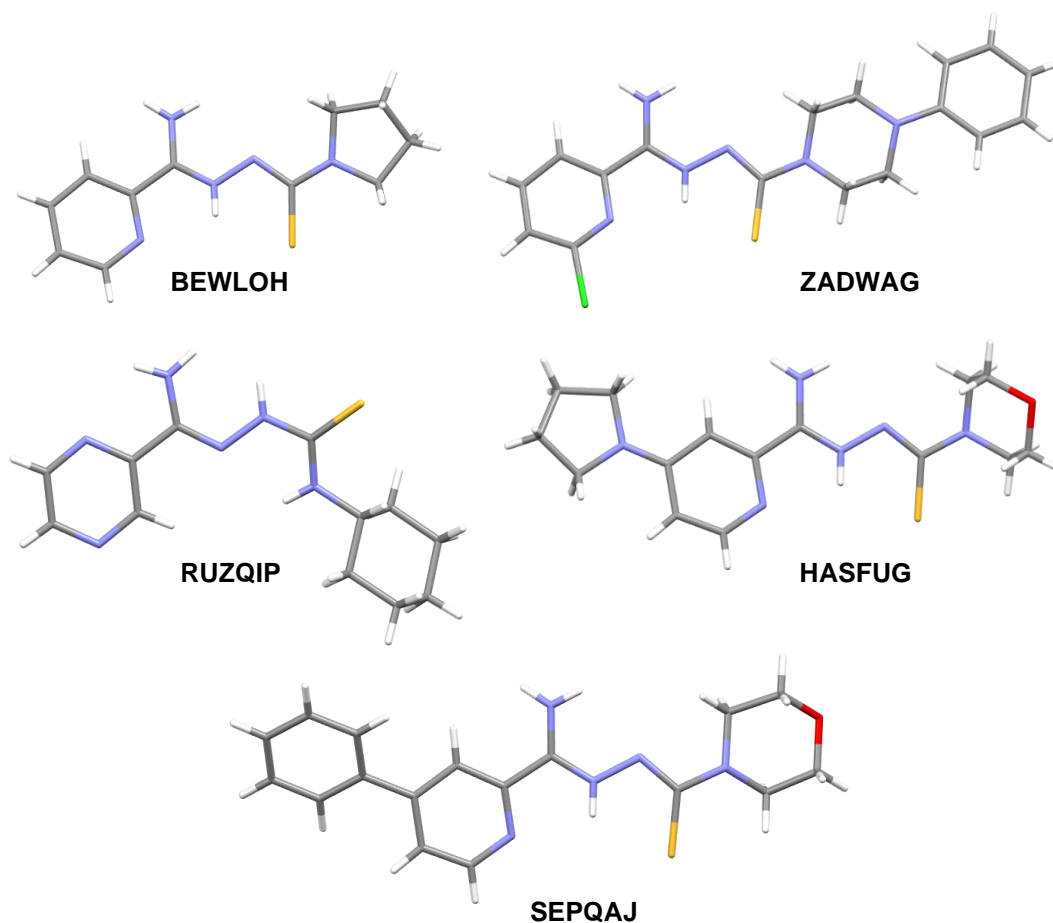


Rys. 19 Fragmenty budowy cząsteczek tiosemikarbazonu użyte do wyszukania analogicznych struktur w bazie CSD

Wśród zdeponowanych struktur 19 stanowiły pochodne pirydyny, natomiast 8 pochodne pirazyny. W grupie tej 15 struktur, oprócz ugrupowania tiosemikarbazonowego, nie zawierało drugiego podstawnika przy pierścieniu heteroaromatycznym, zaś 9 struktur posiadało dodatkowe podstawienie (aminami cyklicznymi lub grupą tio(fenyłową)) w pozycji C4 pierścienia pirydyny, natomiast 3 podstawienie (atomem chloru lub grupą metylową) w pozycji C6 pierścienia pirydyny. W 16 strukturach obecna była amina cykliczna w pozycji terminalnej ugrupowania tiosemikarbazonowego, w 8 amina alifatyczna, a w 3 niepodstawiona grupa aminowa. Spośród tiosemikarbazonów 6 związków wykorzystanych zostało jako środki chelatujące jony metali (rtęci, bizmutu, cynku, kadmu, kobaltu, żelaza i miedzi), a 4 jako prekursorzy do cyklizacji. W 5 przypadkach obserwujemy wbudowanie w strukturę cząsteczki rozpuszczalnika (wody, metanolu, etanolu), a w 2 występowanie nieuporządkowania pierścienia aminy cyklicznej. Dla 15 związków wykonane zostały testy w kierunku ich działania biologicznego.

Szczesio wraz z zespołem wyznaczyła strukturę krystaliczną związku, o kodzie identyfikacyjnym BEWLOH, wykazującym wysoką zdolność do inhibicji wzrostu szczepów *S. aureus* i *M. luteus* (MIC 1,95 µg/ml), a także *S. epidermidis* i *B. cereus* (MIC 7,8 µg/ml), jak również związku o numerze ZADWAG, który był aktywny wobec szczepu *B. subtilis* (MIC 7,8 µg/ml) [140,141]. Almeida i wsp. podjęli się określenia struktury przestrzennej związku o numerze RUZQIP, który cechuje się aktywnością przeciwpłatkową, wobec szczepu H₃₇Rv, z wartością MIC >367,2 µmol/l, co jest wynikiem znacznie niższym w zestawieniu z referencyjnym izoniazydem (MIC 2,27 µmol/l), natomiast wyższym w zestawieniu z referencyjnym pirazynamidem (MIC >812,3 µmol/l) [142]. Zespół Gobis zsyntezował, opisał struktury krystaliczne oraz przebadął pod kątem aktywności tuberkulostatycznej dwie serie 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny. Wyłonione struktury wiodące o numerach HASFUG oraz SEPQAJ

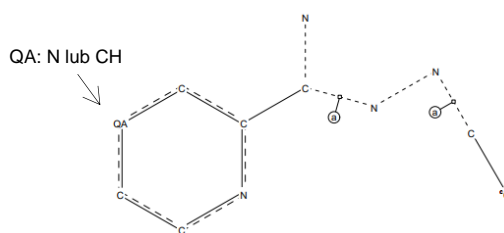
hamowały wzrost szczepów *M. tuberculosis* H₃₇Rv i Spec. 210 w stężeniu, odpowiednio, 0,4 µg/ml oraz 3,1 µg/ml (Rys. 20) [143,144].



Rys. 20 Zdeponowanie w bazie CSD tiosemikarbazonowe pochodne wykazujące działanie biologiczne

Warto zwrócić uwagę, iż jedynie związek o numerze identyfikacyjnym RUZQIP przyjmuje formę neutralną. Jako jedyny nie charakteryzuje się zaangażowaniem amidowego atomu azotu ugrupowania tiosemikarbazonowego w układ cykliczny. Tę samą zależność zauważono w przypadku pozostałych wyszukanych w bazie CSD analogicznych związków. Ponadto zaobserwowano, iż główny fragment cząsteczek o strukturze zwitterionowej (nieobejmujący podstawień przy pierścieniu heteroaromatycznym bądź w łańcuchu bocznym) przyjmuje konformację płaską.

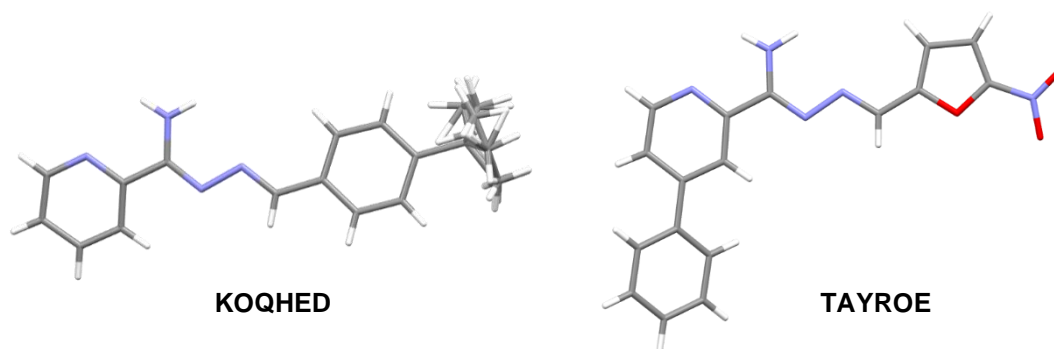
Drugą grupą związków pod kątem której dokonano przeglądu bazy CSD były amidrazonowe pochodne iminowe (Rys. 21). Spośród 10 wytypowanych analogów struktur (15,5 cząsteczek w części niezależnej komórki elementarnej) 9 struktur (11,5 cząsteczek) przyjęło konformację *E* w wiązaniu C=N ugrupowania azometinowego, natomiast jedna struktura (4 cząsteczki) konformację *Z*.



Rys 21. Fragmenty budowy pochodnych iminowych wykorzystane do wyszukania analogicznych struktur w bazie CSD

Jedynie jedna zdeponowana struktura była pochodną pirazynową. Natomiast 3 struktury posiadały dodatkowe podstawienie przy pierścieniu pirydyny w pozycji C4 (grupą fenylową lub atomem chloru), zaś jedna przy pierścieniu pirazyny w pozycji C6 (atomem chloru). We wszystkich pochodnych grupa azometinowa podstawiona została pięcio- lub sześcioczłonowym pierścieniem (hetero)aromatycznym z dołączoną bądź nie grupą funkcyjną. W grupie pochodnych iminowych 4 związki posłużyły do utworzenia kompleksów z jonami miedzi lub żelaza. W jedną strukturę wbudowana została cząsteczka rozpuszczalnika. Wszystkie związki, oprócz trzech które zostały zdeponowane jako komunikat, były badane pod kątem ich biologicznej aktywności.

W dwóch niezależnych badaniach Billington oraz Gobis i ich wsp. podjęli się wyznaczenia struktur przestrzennych pochodnych iminowych odpowiednio o numerach KOQHED oraz TAYRUK oraz przetestowania ich aktywności względem dwóch różnych gatunków prątków (Rys. 22). Pierwszy z nich (KOQHED) osiągnął wartość MIC wobec szczepu *M. fortuitum* w zakresie 8–10 µg/ml, trzykrotnie wyższą niż izoniazyd (MIC 3 µg/ml). Natomiast drugi związek (TAYROE) wykazywał działanie od dwu- do czterokrotnie silniejsze (MIC 6,2 µg/ml) wobec szczepów *M. tuberculosis* H₃₇Rv oraz Spec. 210 w zestawieniu z izoniazydem (MIC 12,5–25 µg/ml) [145,146].



Rys. 22 Zdeponowanie w bazie CSD iminowe pochodne wykazujące działanie tuberkulostatyczne

Oba związki przyjęły konformację *E*. Główny fragment wszystkich zdeponowanych analizowanych cząsteczek przyjmuje budowę planarną. Ponadto zaobserwowano, iż konsekwencją występowania cząsteczek w konfiguracji *Z* jest ich zwinięty kształt, w przeciwieństwie do obserwowanej formy rozciągniętej dla izomerów *E*.

2.5.1.1 Oddziaływania w kryształach pochodnych amidrazonowych

Najczęściej obserwowanym oddziaływaniem w kryształach pochodnych amidrazonowych jest wiązanie wodorowe. Zgodnie z nomenklaturą IUPAC wiązanie wodorowe definiowane jest jako przyciągające oddziaływanie pomiędzy atomem wodoru cząsteczki lub fragmentu cząsteczki D—H, gdzie D jest atomem o większej elektroujemności niż atom wodoru, oraz atomem lub grupą atomów tej samej bądź innej cząsteczki, dla którego istnieje dowód na tworzenie się wiązania. Typowe wiązanie wodorowe opisywane jest jako D—H···A—Z, gdzie kropki oznaczają to wiązanie. Donor wiązania wodorowego reprezentowany jest przez grupę D—H. Akceptorem wiązania wodorowego natomiast może być atom lub anion A, wolna para elektronowa atomu A bądź cząsteczka A—Z, w której atom lub jon A związany jest z atomem Z. Gdy atomy D i A są atomami tego samego pierwiastka, a odległości D—H i A—H są takie same, wiązania wodorowe nazywamy symetrycznymi. W każdym przypadku akceptor jest bogatym w elektrony fragmentem, który może być wolną parą elektronową atomu A bądź wiązaniem wodorowym typu π pomiędzy atomami A—Z, choć nie tylko [147]. Pod względem energetycznym wiązania wodorowe można podzielić na słabe, średnie lub silne. Wybrane właściwości wiązań wodorowych zestawiono w tabeli 1 [148].

Tabela 1. Wybrane właściwości słabych, średnich i silnych wiązań wodorowych

Charakter wiązania	Słabe	Średnie	Silne
Relacja D—H do A···Y	D—H \ll H···A	D—H $<$ H···A	D—H \sim H···A
Odległość H···A (Å)	2,0–3,0	1,5–2,2	1,2–1,5
Odległość D···A (Å)	3,0–4,0	2,5–3,2	2,2–2,5
Wydłużenie D—H (Å)	$\leq 0,01$	0,01–0,05	0,05–0,2
Kąt wiązania (°)	90–180	130–180	175–180
Energia wiązania (kcal/mol)	< 4	4–15	15–40

Posługując się teorią grafów można opisać struktury krystaliczne stabilizowane wiązaniami wodorowymi przy pomocy czterech różnych motywów asocjacji (G) zwanych łańcuchami (ang. *chain*, C), dimerami (ang. *dimer*, D), pierścieniami (ang. *ring*, R), a także motywem asocjacji wewnętrznej (ang. *self*, S). Całkowita liczba atomów (w tym również

atomów wodoru) we wzorze podawana jest w nawiasie po desygnatorze motywu oraz określana jako stopień/wymiar motywu. Sumarycznie daje to deskryptor motywu oddziaływań wodorowych w postaci $G_D^A(n)$, w którym indeks górny stanowi liczbę akceptorów wiązania wodorowego, a indeks dolny liczbę donorów [149].

Wiązanie wodorowe może być oddziaływaniem zarówno między-, jak i wewnątrzcząsteczkowym. Spośród wielu czynników wpływających bezpośrednio na strukturę i trwałość sieci krystalicznej istotną lub dominującą rolę odgrywają międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, ze względu na zjawisko kooperatywności wiązań wodorowych oraz periodyczną konfigurację układów [150]. Wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe z kolei determinują przestrzenną organizację cząsteczki, a także częściowo jej właściwości fizykochemiczne [151]. Ich utworzenie często odpowiedzialne jest za stabilizację struktur tautomerycznych i izomerycznych [152].

Dla wyszukanych w bazie CSD analogów pochodnych amidrazonowych obserwujemy występowanie obu typów wiązań wodorowych. Cząsteczki pochodnych o strukturze tiosemikarbazonu stabilizowane są poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe typu $N-H\cdots S$ i $N-H\cdots N$ (forma zwitterionowa) oraz $N-H\cdots N$ (forma neutralna). Najczęstszymi typami międzycząsteczkowych wiązań wodorowych są również $N-H\cdots S$ oraz $N-H\cdots N$. We wszystkich przypadkach donorem wiązania wodorowego jest grupa aminowa, a akceptorem atom siarki lub atom azotu pierścienia heteroaromatycznego tej samej lub innej cząsteczki. Podobną zależność obserwujemy dla pochodnych o strukturze imin, dla których dominującym typem wiązań są wiązania typu $N-H\cdots N$, w których rolę donora pełni grupa aminowa, natomiast akceptora atom azotu w ugrupowaniu azometinowym lub pierścieniu heteroaromatycznym tej samej lub innej cząsteczki.

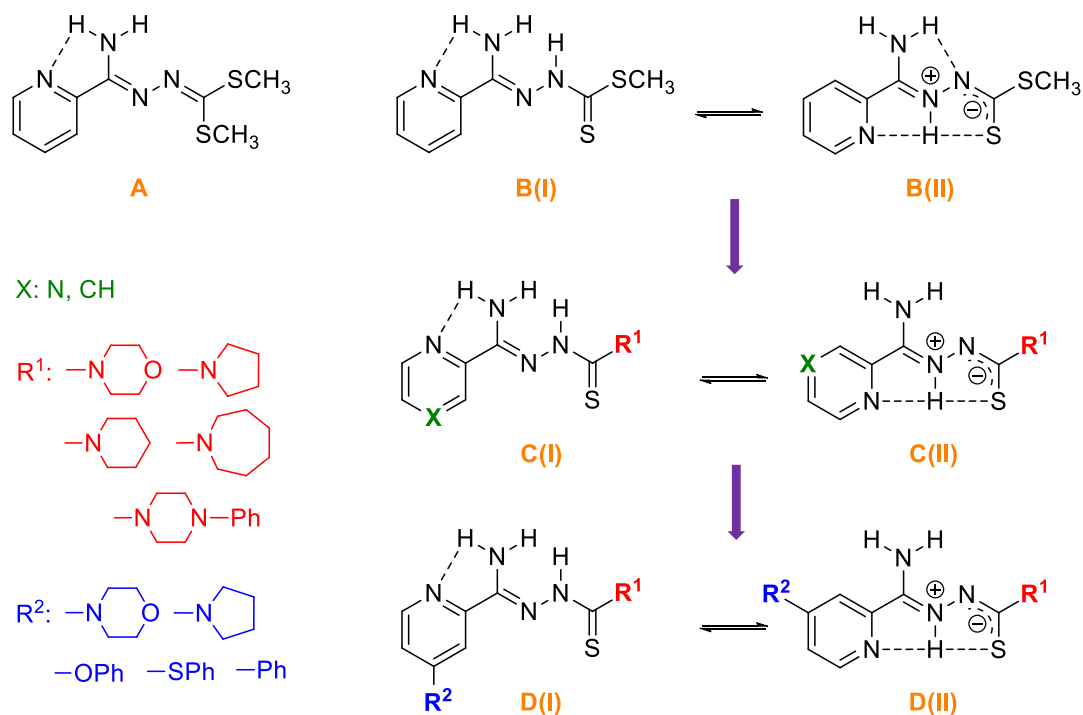
Innym typem oddziaływań międzycząsteczkowych mogącym występować w strukturach zawierających fragment pirydynowy lub pirazynowy są oddziaływania asocjacji warstwowej, nazywane również oddziaływaniami typu $\pi-\pi$ czy π -stacking. Interakcje międzywarstwowe to oddziaływania o charakterze elektrostatycznym powstające pomiędzy chmurami zdelokalizowanych π -elektronów w równoległe ułożonych i umiejscowionych jeden nad drugim lub z lekkim przesunięciem pierścieniach aromatycznych, które najczęściej różnią się rozkładem gęstości elektronowej. Odległość pomiędzy środkami ciężkości pierścieni aromatycznych (centroidami) charakteryzująca tego typu oddziaływania wynosi 3,3–3,8 Å [153].

3. CEL PRACY

Wciąż pojawiające się nowe mutacje szczepów *M. tuberculosis* opornych na stosowane chemioterapeutyki wraz z trwającą stagnacją na rynku farmaceutycznym wzmożyło działania prowadzone w kierunku poszukiwań kandydatów na innowacyjne leki przeciwpłatkowe. Przedmiotem zainteresowań wielu zespołów badawczych, w tym również z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Zespołu Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Politechniki Łódzkiej, jest modyfikacja dwóch leków stosowanych w pierwszej, najintensywniejszej fazie leczenia gruźlicy – izoniazydu oraz pirazynamidu.

Pierwszymi wprowadzanymi modyfikacjami w strukturze izoniazydu była zmiana w obrębie grupy funkcyjnej poprzez wprowadzenie ugrupowania amidrazonowego oraz zmiana miejsca jej połączenia z pierścieniem heteroaromatycznym z C4 na C2. Inspiracją do dalszych badań poczynionych nad pochodnymi amidrazonowymi były *S,S'*-diester (**A**) oraz monoester (**B**) metylowy kwasu *N'*-[1-amino-1-(pirydyn-2-ylo)-metylideno]-ditiokarbazonowego [154,155]. Analiza rentgenograficzna dowiodła, iż dominującą formą tautomeryczną i konformacją diestru jest ta przedstawiona poniżej (**A**), charakteryzująca się w przybliżeniu budową płaską stabilizowaną przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe. Natomiast ester, w postaci krystalicznej, przyjmuje dipolarną konfigurację *Z* (**B(II)**). W tym przypadku zaobserwowano pogłębienie planarności struktury ze względu na obecność aż trzech silnych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Co więcej, związek ten wykazał wysoką aktywność wobec szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv (MIC 3,13 µg/ml). Poczynione obserwacje doprowadziły do postawienia hipotezy roboczej stanowiącej, iż płaskość cząsteczek jest warunkiem wstępnym ich działania przeciwigruźliczego. Dalsze badania prowadzone w tym kierunku miały na celu jej potwierdzenie. Kolejną podjętą modyfikacją, obejmującą zarówno pochodne pirazynowe, jak i pirydynowe, było kondensowanie grupy amidrazonowej dla uzyskania fragmentu tiosemikarbazonowego zakończonego różnymi aminami cyklicznymi (**C**) [156]. Stężenia hamujące wzrost prątków najsilniejszych związków z grupy również sięgały wartości 3,13 µg/ml. Wprowadzenie dodatkowego podstawnika, w postaci amin cyklicznych lub układów aromatycznych, w pozycję C4 pierścienia pirydyny (**D**) doprowadziło do pogłębienia aktywności przeciwpłatkowej do wartości MIC równej 0,4 µg/ml. Ich aktywność powiązano z możliwością występowania związków w formie zwitterionowej, których planarność stabilizowana jest obecnością

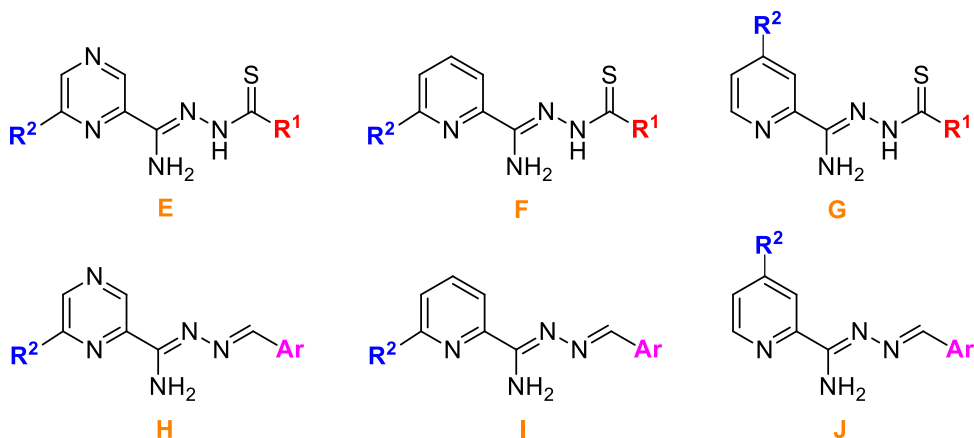
dwóch wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (C(II), D(II)) (Rys. 23) [143,144,157]. Otrzymane wyniki zachęciły do kontynuacji prowadzenia badań mogących potwierdzić wyżej założoną hipotezę badawczą.



Rys. 23 Struktury związków otrzymanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej GUMed, dla których badania krystalograficzne przeprowadzone zostały w Zespole Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii PŁ

Celem pracy doktorskiej było poszukiwanie kandydatów na leki przeciwprątkowe wśród dipodstawionych amidrazonowych pochodnych pirydyny i pirazyny. Cel ten został osiągnięty poprzez zweryfikowanie hipotezy badawczej zakładającej, iż związki o tej budowie wykazują tendencję do tworzenia dużych płaskich układów poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, co sprzyja występowaniu aktywności tuberkulostatycznej. Pierwszym niezbędnym etapem do weryfikacji hipotezy było opracowanie metod i synteza związków zawierających wyżej wymienione elementy strukturalne. Dwoma pierwszymi zaplanowanymi seriami syntez były 2,6-dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirazyny (**E**) i pirydyny (**F**). Następnie uzupełniono serię 2,4-dipodstawionych pochodnych tiosemikarbazonowych (**G**) o niezyskane dotąd podstawienia (Rys. 24). Na tym etapie badano wpływ na aktywność przeciwprątkową rodzaju pierścienia heteroaromatycznego, miejsca połączenia podstawnika z pierścieniem heteroaromatycznym, a także rodzaju wprowadzanego do struktury podstawnika w obu pozycjach. Wyżej dowiedziono, iż brak labilnego atomu wodoru w ugrupowaniu bocznym

nie wyklucza możliwości tworzenia płaskiej struktury. Mając to na uwadze, zaprojektowano kolejne trzy serie związków pozwalające na sprawdzenie istotności ugrupowania tiosemikarbazonowego poprzez jego wymianę na ugrupowanie iminowe. Podobnie jak w poprzednim przypadku podstawienia występowały w pozycjach 2,6 pierścienia pirazyny (**H**), 2,6 pierścienia pirydyny (**I**) i 2,4 pierścienia pirydyny (**J**) (Rys. 24). Podstawniki zostały dobrane w taki sposób, aby różniły się rozmiarem, lipofilowością, właściwościami kwasowo-zasadowymi czy mocą donorową.



Rys. 24 Zaprojektowane pochodne o budowie tiosemikarbazonowej oraz iminowej, dla części których wyznaczona zostanie struktura krystaliczna

Kolejnym etapem było wyznaczenie struktury krystalicznej dla części zsyntezowanych związków, a to pozwoliło na dokonanie analizy konformacyjnej i geometrycznej, a także analizy oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych i międzycząsteczkowych oraz typu upakowania cząsteczek w kryształach.

Ostatnim etapem weryfikacyjnym było zbadanie aktywności tuberkulostatycznej związków względem prątków hodowanych *in vitro*. Umożliwiło to przeprowadzenie analizy zależności struktura-aktywność, która niezbędna jest do określenia czynników strukturalnych i parametrów cząsteczkowych wpływających na aktywność.

Ponadto, istotnym aspektem było wykonanie poszerzonych badań mikrobiologicznych oraz testów cytotoksyczności, które dostarczyły informacji na temat selektywności oraz potencjalnego bezpieczeństwa otrzymanych związków.

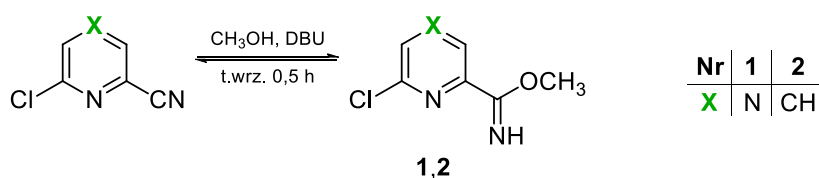
Zrealizowanie wszystkich wyżej zaznaczonych etapów badań pozwoliło na wyłonienie struktur wiodących do dalszych badań nad rozwojem nowych leków przeciwprątkowych.

4. BADANIA WŁASNE

4.1. Synteza

4.1.1 Otrzymywanie tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (3–6) i pirydyny (7–10) z atomem chloru w pozycji C6

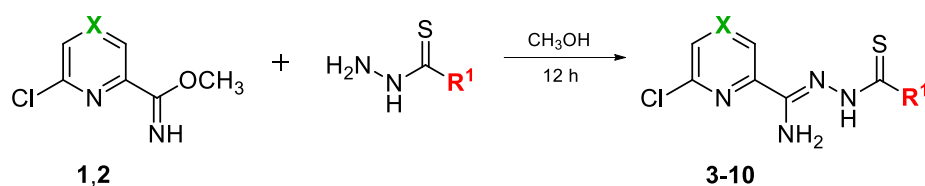
Związkami wyjściowymi do dwóch pierwszych zaprojektowanych serii syntez były dostępne komercyjnie 6-chloropirazyno-2-karbonitryl oraz 6-chloropikolinonitryl. Elektrofilowy charakter atomu węgla grupy nitrylowej czyni ją podatną na różne reakcje chemiczne, w tym addycję nukleofilową, cykloaddycję, hydratację, redukcję czy hydrolizę [158]. Tradycyjne przemiany chemiczne nitryli wiążą się z użyciem mocnych kwasów bądź zasad. W celu zapewnienia odpowiedniego środowiska reakcji alternatywnie stosuje się metody katalityczne [159]. Ogólnie przyjęta metoda konwersji nitryli do iminoestrów wymaga zastosowania alkoholanu sodu [160]. Do otrzymania metyloiminoestrów **1–2**, z których jeden (**2**) został ówczasie opisany w literaturze [161], zastosowano metodę opracowaną w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego polegającą na działaniu na nitryle metanolem w obecności 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enu (DBU) jako katalizatora (Schemat 1). Dodatkową funkcją DBU jest zabezpieczenie przed niepożądaną w tym przypadku wymianą atomu chloru na ugrupowanie metoksyłowe. Reakcje prowadzono przez 0,5 h w temperaturze wrzenia, a ich wydajność wynosiła odpowiednio 60% (**1**) i 90% (**2**). O prawidłowym przebiegu reakcji świadczy obecność na widmach IR pasm drgań rozciągających C-O występujących w zakresie 1156–1217 cm^{-1} , brak pasm w zakresie 2260–2210 cm^{-1} pochodzących od grupy nitrylowej, a także obecność na widmach ^1H NMR, przy wartościach odpowiednio dla każdego ze związków 3,91 i 3,89 ppm, sygnału w postaci singletu o intensywności 3 protonów odpowiadających grupie OCH_3 .



Schemat 1

W części teoretycznej dowiedziono, iż ugrupowanie amidrazonowe, a także azotowe pierścienie heterocykliczne mogą stanowić elementy farmakoforowe. W związku z tym zaprojektowano pochodne tiosemikarbazonowe, również wykazujące potencjał

tuberkulostatyczny, wykorzystujące ugrupowanie amidrazonowe jako łącznik z pierścieniem pirazyny i pirydyny. Otrzymanie pochodnych na bazie zarówno pirazyny, jak i pirydyny pozwoli na sprawdzenie czy również w przypadku syntezowanych szeregów związków można je uznać za bioizostery. Kondensacje przeprowadzano, w metanolu w temperaturze otoczenia przez 12 h, pomiędzy metyloiminoestrem a pochodnymi karbotiohydrazdu zawierającymi w strukturze morfolinę, pirolidynę, piperidynę i dimetyloaminę (Schemat 2). Zastosowano podstawniki różniące się mocą elektronodonorową, zasadowością oraz lipofilowością. Dodatkowym czynnikiem sprawdzającym wpływ na potencjalną aktywność przeciwpłatkową badanych pochodnych było wprowadzenie do łańcucha tiosemikarbazonowego, obok amin cyklicznych, aminy alifatycznej. Karbotiohydrazydy otrzymano w reakcji między hydrazynokarbonditionianem metylu a aminami w wodzie lub alkoholu, zgodnie ze zmodyfikowaną metodą syntezy opisaną przez Klaymana i wsp. [162]. Związki **3–10** uzyskano z wydajnością od 45 do 91%. Metoda syntezy 6-chloro-*N'*-(morfolino-4-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu (**3**) występuje w piśmiennictwie, przy czym autorzy uprzednio wykorzystali pirazyno-4-karbotiohydrazid i benzyloiminoester [163].

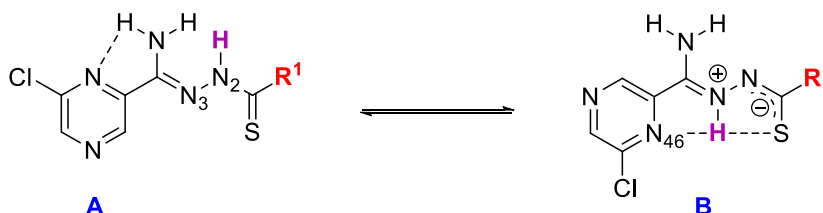


Nr	3	4	5	6	7	8	9	10
X	N	N	N	N	CH	CH	CH	CH
R ¹	-N	-N	-N	-N(CH ₃) ₂	-N	-N	-N	-N(CH ₃) ₂

Schemat 2

Typowym zjawiskiem dla związków o budowie tiosemikarbazonowej jest ich występowanie w różnych odmianach tautomerycznych (Rys. 25). W związku z barierą niskoenergetyczną pomiędzy tautomerami ich wzajemna konwersja może zachodzić spontanicznie lub być indukowana czynnikami, takimi jak rodzaj rozpuszczalnika, temperatura, ciśnienie, stężenie czy pH [164]. Równowaga tautomeryczna stabilizowana jest także przez względną stabilność każdej formy zależną od efektów elektronowych, zawady przestrzennej i oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Jeden z tautomerów może być znacznie bardziej uprzywilejowany w stosunku do drugiego stanowiąc formę

dominującą w określonych warunkach [165]. W związku z tym, iż tautomery różnią się kształtem cząsteczek, pozycją protonu oraz właściwościami akceptorowo-donorowymi mogą różnić się również interakcjami molekularnymi z receptorami, toksycznością, biodostępnością, stabilnością. Określenie najbardziej stabilnego tautomeru odgrywa zatem kluczową rolę w procesie projektowania cząsteczek biologicznie czynnych [164,165].



Rys. 25 Formy tautomeryczne pochodnych tiosemikarbazonowych **3** i **6**

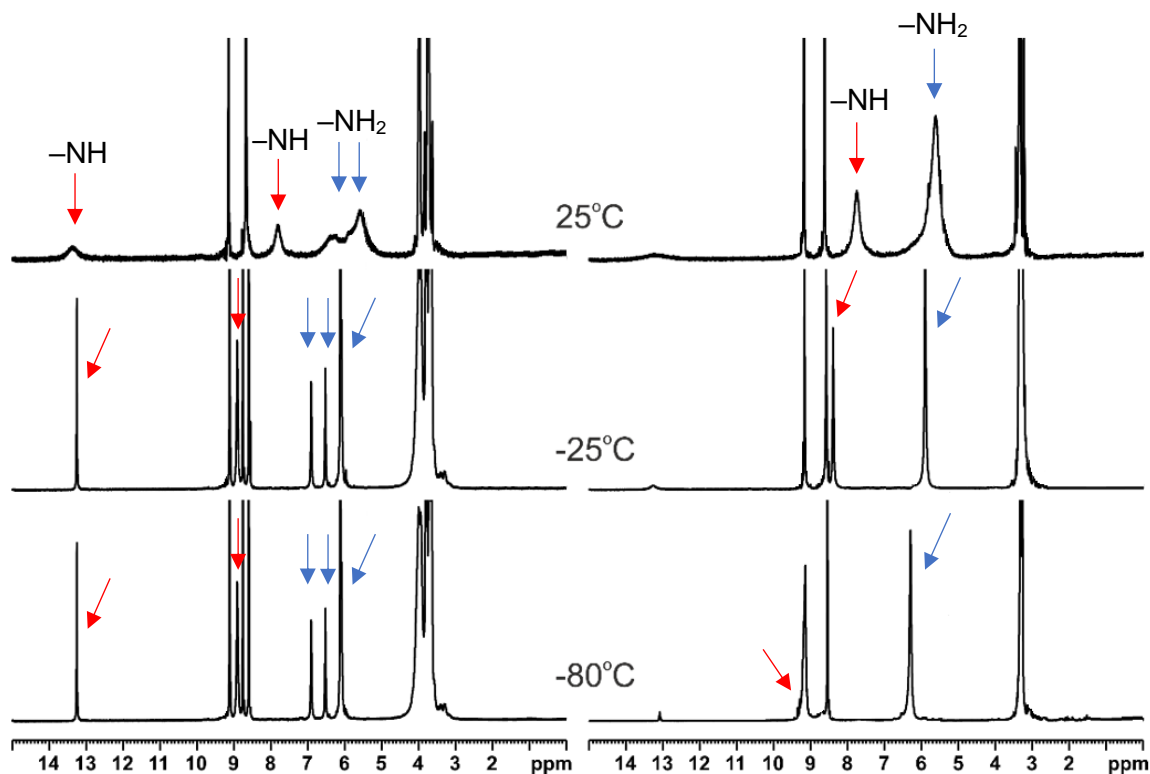
Ze względu na fakt, iż na podstawie widm ^1H NMR wykonanych w temperaturze otoczenia w deuterowanym dimetylosulfotlenku ($\text{DMSO-}d_6$) dla 6-chloro- N' -(morfolino-4-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu (**3**) oraz 2-[amino(6-chloropirazyn-2-ylo)metyleno]- N,N -dimetylohydrazynokarbotioamidu (**6**) nie można było jednoznacznie określić dominującej formy związku wykonano widma zmiennotemperaturowe ^1H NMR w deuterowanym chloroformie (CDCl_3). Podjęto również próbę wyznaczenia względnej stabilności tautomerów obu związków w oparciu o obliczenia kwantowo-chemiczne na poziomie *ab initio*, które przeprowadzone zostały dostępną w oprogramowaniu Gaussian 09 [166] metodą DFT:B3LYP z wykorzystaniem bazy funkcyjnej 6-31G(d,p). Dla obu związków bardziej preferowaną energetycznie formą tautomeryczną okazała się być forma **B** (Tabela 2).

Tabela 2. Obliczona wartość energii całkowitej tautomerów **A** i **B** dla związku **3** i **6**

Nr związku	Energia całkowita [Hartree]	
	A	B
3	-1650,977243	-1650,985374
6	-1498,351091	-1498,352326

Analiza widm wskazuje na dużą mobilność i dynamikę atomów wodoru zlokalizowanych wokół obszaru ulegającego tautomeryzacji (pozycje azotowe) wraz ze zmianą temperatury (Rys. 26). W temperaturze pokojowej protony z grupy $-\text{NH}_2$ oraz grupy $-\text{NH}$ występują w postaci silnie poszerzonych sygnałów, co odpowiada pośredniemu zakresowi dynamiki molekularnej w skali czasu NMR, a tym samym dowodzi zachodzącej przemiany tautomerycznej. Obniżenie temperatury skutkuje znaczącym zwężeniem szerokości sygnałów przy jednoczesnej zmianie wartości natężenia pola

magnetycznego, co z kolei jest jednoznaczne z zahamowaniem występującej tautomerii. Jednak jedynie dla związku **6** udało się zaobserwować w temperaturze -80°C obecność tylko jednej formy tautomerycznej. Pomimo nierównocенności chemicznej protonów w grupie $-\text{NH}_2$ są one równocenne magnetycznie, o czym świadczy sygnał w postaci singletu o intensywności 2 protonów, występujący przy wartości przesunięcia chemicznego równej 6,22 ppm. Sygnał od protonu grupy $-\text{NH}$ znajduje się przy wartości 9,23 ppm. Natomiast sygnał przy wartości 13,11 ppm jest sygnałem zanikającym, pochodzącym od grupy $-\text{NH}$ mniej preferowanej energetycznie formy. Dla związku **3** oprócz tej samej formy tautomerycznej, którą obserwujemy dla związku **6** zauważamy również obecność drugiej, o czym świadczą trzy sygnały, każdy o intensywności jednego protonu (przy wartości 6,64, 7,08, 13,28 ppm). Zmiana położenia atomu wodoru powoduje zmianę otoczenia chemicznego protonów grupy aminowej oraz możliwość tworzenia innych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, czego konsekwencją jest ich nierównocенność magnetyczna i występowanie w postaci osobnych sygnałów.

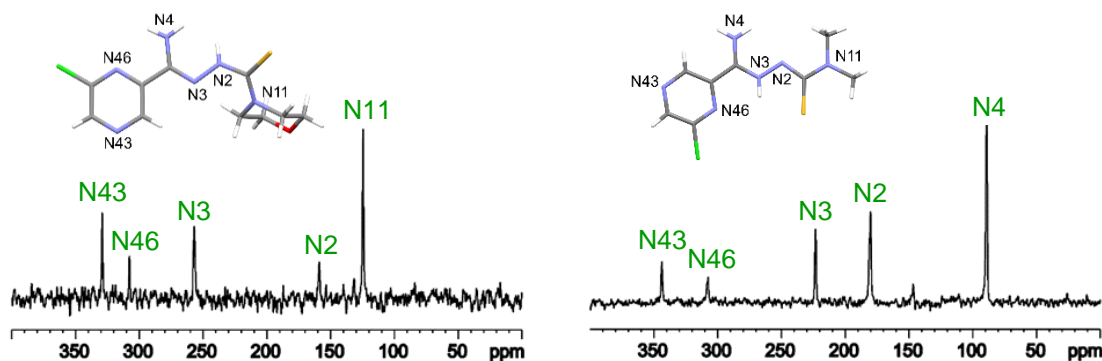


Rys. 26 Zmiennotemperaturowe widma ^1H NMR dla związku **3** (po lewej) i **6** (po prawej) wykonane w CDCl_3 przy częstotliwości rezonansowej 600 MHz

Uzupełnieniem przeprowadzonych analiz zmiennotemperaturowych dla układów w cieczy było określenie homogeniczności próbek dla materiałów w postaci ciała stałego. Jako pierwsza wykonana została analiza rentgenostrukturalna monokryształów, która

dowodła, iż labilny atom wodoru dla związku **3** występuje przy atomie azotu N2 (forma tautomeryczna **A**), a dla związku **6** przy atomie azotu N3 (forma tautomeryczna **B**) (podrozdział 4.2.1). Następnie zarejestrowano widma ^{15}N NMR w fazie stałej metodą CP MAS (ang. *cross polarization magic angle spinning*, polaryzacja skrośna z wirowaniem próbki pod kątem magicznym) (Rys. 27). Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką krystaliczność i jednorodność materiałów – linie rezonansowe są bardzo wąskie, a ich położenie i liczba odpowiada strukturom posiadającym jedną cząsteczkę związku w niezależnej części komórki elementarnej. Niekwestionowanym wsparciem w analizie widm NMR w ciele stałym jest metodologia GIPAW (ang. *gauge including projected augmented wave*) pozwalająca na uwzględnienie periodyczności sieci krystalicznej, a tym samym przeprowadzenie wiarygodnych przypisań sygnałów rezonansowych do odpowiednich atomów azotu [167]. Mając na uwadze niepewną lokalizację atomu wodoru przy pozycjach azotowych skonstruowano dwa modele teoretyczne, w których proton przyłączony był do atomu azotu N2 lub N3 (Tabela 3, Tabela 4). Otrzymane wyniki w pełni potwierdziły, iż dla obu związków w ciele stałym atom wodoru umiejscowiony jest w tych samych pozycjach co w strukturze krystalicznej. Przeprowadzone obliczenia teoretyczne przesunięć chemicznych dla atomów azotu korelowały z liniami rezonansowymi obserwowanymi na widmach eksperymentalnych. Dla obu związków nie udało się zarejestrować po jednym z sygnałów, prawdopodobnie ze względu na dynamikę molekularną.

Podsumowując, można przypuszczać, iż związek **6** zarówno w ciele stałym, jak i w roztworze występuje w postaci bardziej preferowanej energetycznie formy **B**. Natomiast związek **3** w ciele stałym przyjmuje mniej stabilną formę tautomeryczną **A**, a w roztworze mieszaninę obu form.



Rys. 27 Widma ^{15}N CP MAS NMR dla związku **3** (po lewej) i **6** (po prawej) wykonane w fazie stałej przy częstotliwości rezonansowej 400 MHz

Tabela 3. Przesunięcia chemiczne (δ) [w ppm] wyznaczone metodą eksperymentalną ^{15}N CP MAS NMR oraz metodą obliczeniową GIPAW dla związku **3** z protonem zlokalizowanym w pozycji N2 i N3 w strukturze krystalicznej

Pozycja atomu azotu	$\delta_{\text{CP MAS NMR}}$	$\delta_{\text{GIPAW (H na N2)}}$	$\delta_{\text{GIPAW (H na N3)}}$
N2	159,1	168,7	239,5
N3	257,1	264,5	164,9
N4	-	60,9	82,1
N11	124,7	121,3	106,2
N43	329,3	325,4	332,8
N46	307,9	296,5	303,8

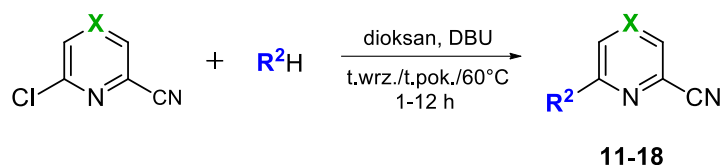
Tabela 4. Przesunięcia chemiczne (δ) [w ppm] wyznaczone metodą eksperymentalną ^{15}N CP MAS NMR oraz metodą obliczeniową GIPAW dla związku **6** z protonem zlokalizowanym w pozycji N2 i N3 w strukturze krystalicznej

Pozycja atomu azotu	$\delta_{\text{CP MAS NMR}}$	$\delta_{\text{GIPAW (H na N2)}}$	$\delta_{\text{GIPAW (H na N3)}}$
N2	180,5	163,4	179,2
N3	223,3	272,0	231,2
N4	89,2	84,4	86,9
N11	-	96,1	96,4
N43	344,6	352,7	348,5
N46	307,8	320,5	303,8

4.1.2 Otrzymywanie 6-podstawionych pochodnych pirazyno-2-karbonitrylu (11–14) i pikolinonitrylu (16–18)

Modyfikacje strukturalne związków wyjściowych możliwe są również w obrębie elektronoakceptorowego atomu fluorowca, który jest grupą łatwo odchodzącą i ulega wymianie w reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej przebiegającej według mechanizmu addycji-eliminacji ($\text{S}_{\text{N}}2\text{Ar}$) [168,169]. Do podstawienia atomu chloru w pozycji C6 pierścienia pirazyny i pirydyny wykorzystano następujące czynniki nukleofilowe: morfolinę, pirolidynę, piperidynę oraz fenol. Podstawniki w pozycji C6 dobrano w taki sposób, aby różniły się lipofilowością, rozmiarem oraz właściwościami kwasowo-zasadowymi. Reakcje prowadzono w środowisku DBU oraz dioksanu z wydajnością 67–100%. 6-Podstawione nityle **11–18** syntezowano w temperaturze pokojowej, temperaturze 60°C lub temperaturze wrzenia przez 1–12 h (Schemat 3). Chloropirazyny wymagają łagodniejszych warunków reakcji niż chloropirydyny [161]. Trzy związki wymagały zastosowania techniki ekstrakcji do ich izolacji, natomiast większość techniki chromatografii kolumnowej do ich oczyszczenia. Obecność na widmach IR pasm absorpcji dla drgań rozciągających w zakresie 2227–2239 cm^{-1} dowodzi, iż grupa nitylowa została zachowana. Nie zaobserwowano natomiast pasm

absorpcyjnych w obszarze 600–800 cm⁻¹ odpowiadających drganiom rozciągającym C-Cl. Wszystkie nityle opisane były wcześniej w literaturze chemicznej [163, 170–176].



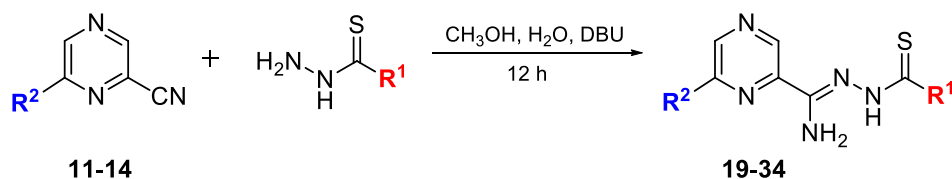
Nr	11	12	13	14	15	16	17	18
X	N	N	N	N	CH	CH	CH	CH
R ²				-OPh				-OPh

Schemat 3

4.1.3 Otrzymywanie 6-podstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (19–34) i pirydyny (35–50)

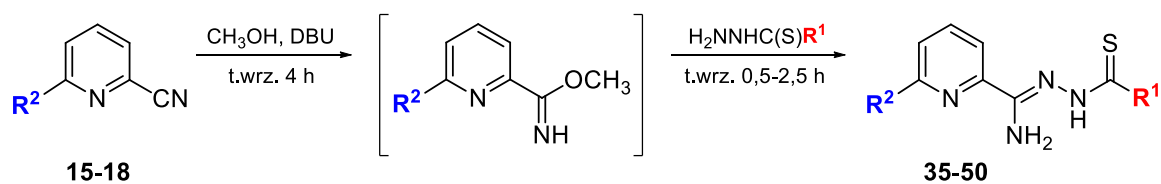
Nityle **11–18** wykorzystano następnie do utworzenia końcowych produktów o budowie tiosemikarbazonu uzupełniających wcześniej otrzymane serie z podstawieniem atomem chloru w pozycji C6. W przypadku pochodnych pirazyny kondensacje z odpowiednimi karbotiohydrazydami przeprowadzano bezpośrednio z nityli **11–14**. Jest to metoda opisana uprzednio w literaturze [177]. Syntezę prowadzono w mieszaninie metanolu, wody oraz DBU nadającego zasadowe środowisko reakcji. Mieszaninę utrzymywano w temperaturze pokojowej przez 12 h (schemat 4). W nielicznych przypadkach konieczne było zakwaszenie roztworu kwasem octowym oraz jego ekstrakcja do chloroformu w celu wyodrębnienia produktu reakcji. Ze względu na fakt, iż tiosemikarbazonowe pochodne pirazyny **19–34** charakteryzowały się dosyć niską wydajnością (9–64%) ich analogi pirydynowe postanowiono otrzymać inną metodą. Podjęto próbę przeprowadzenia nityli **15–18** w metyloiminoestry w środowisku metanolu oraz DBU, jednak reakcja ta jest odwracalna i po osiągnięciu stanu równowagi, niezależnie od czasu ogrzewania w zakresie 4–24 h, z mieszaniny wyodrębnia się po około 50% substratu oraz produktu reakcji. W związku z powyższym postanowiono nie poddawać metyloiminoestrów izolacji, lecz wykorzystać je *in situ* do dalszych kondensacji prowadzących do otrzymania cykloalkilaminotiosemikarbazonowych (**35–37**, **39–41**, **43–45**, **47–49**) oraz *N,N*-dimetyloaminotiosemikarbazonowych (**38**, **42**, **46**, **50**) pochodnych pirydyny (Schemat 5). Po dodaniu karbotiohydrazdu reakcje kontynuowano

w temperaturze wrzenia przez kolejne 0,5–2,5 h. Do izolacji większości pochodnych niezbędne było zakwaszenie produktów reakcji, a w dwóch przypadkach również ekstrakcja przy użyciu chloroformu. Oprócz poprawienia wydajności reakcji (40–86%) udało się również znacznie skrócić czas jej trwania. Otrzymane pochodne, z wyjątkiem związku **19** [163], nie były dotychczas opisane w literaturze. Związek **19** syntezowany był ówczesnie inną metodą – poprzez iminoester benzyłowy.



Nr	19	20	21	22	23	24	25	26
R²								
R¹								
Nr	27	28	29	30	31	32	33	34
R²								
R¹								

Schemat 4



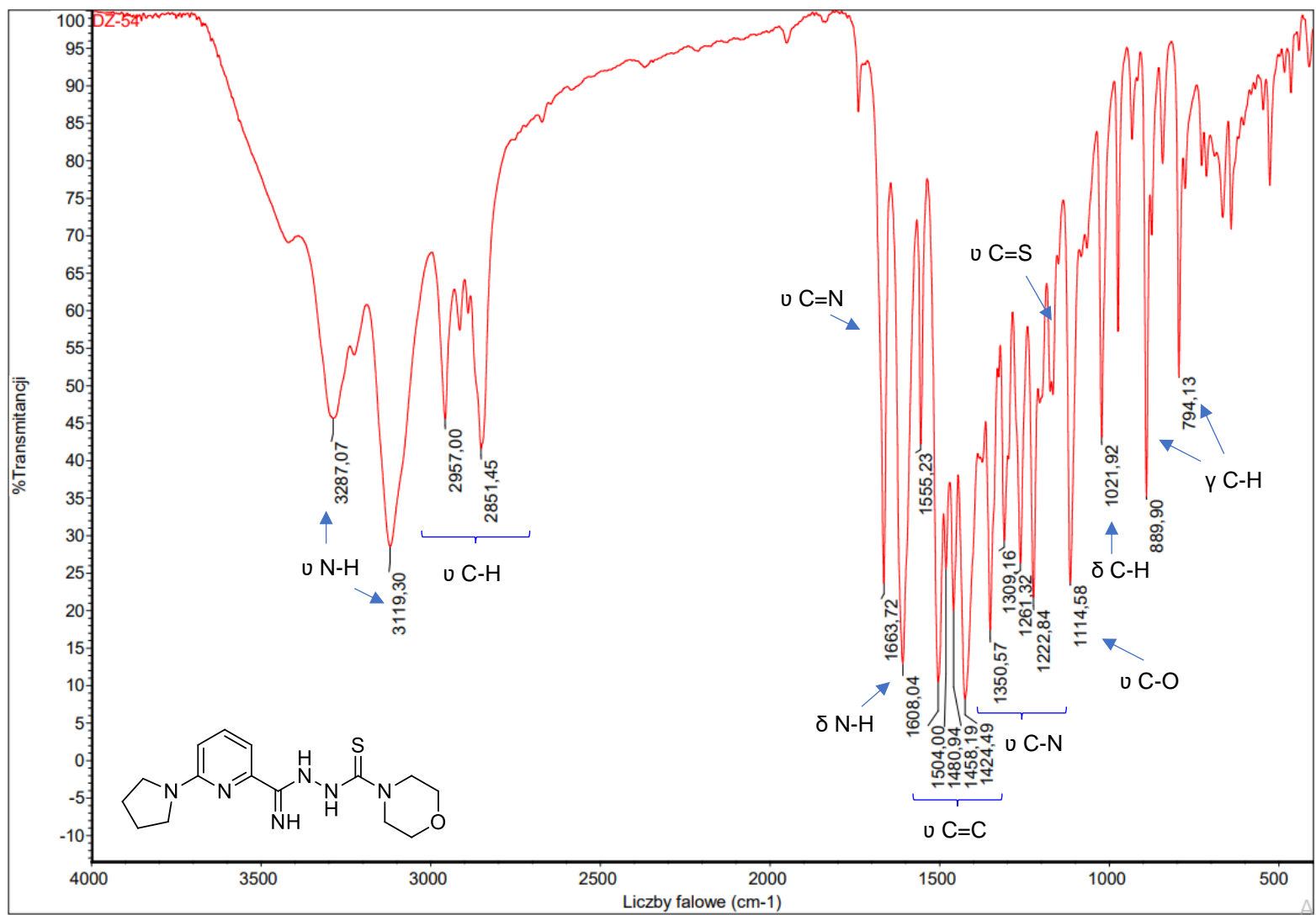
Nr	35	36	37	38	39	40	41	42
R²								
R¹								
Nr	43	44	45	46	47	48	49	50
R²								
R¹								

Schemat 5

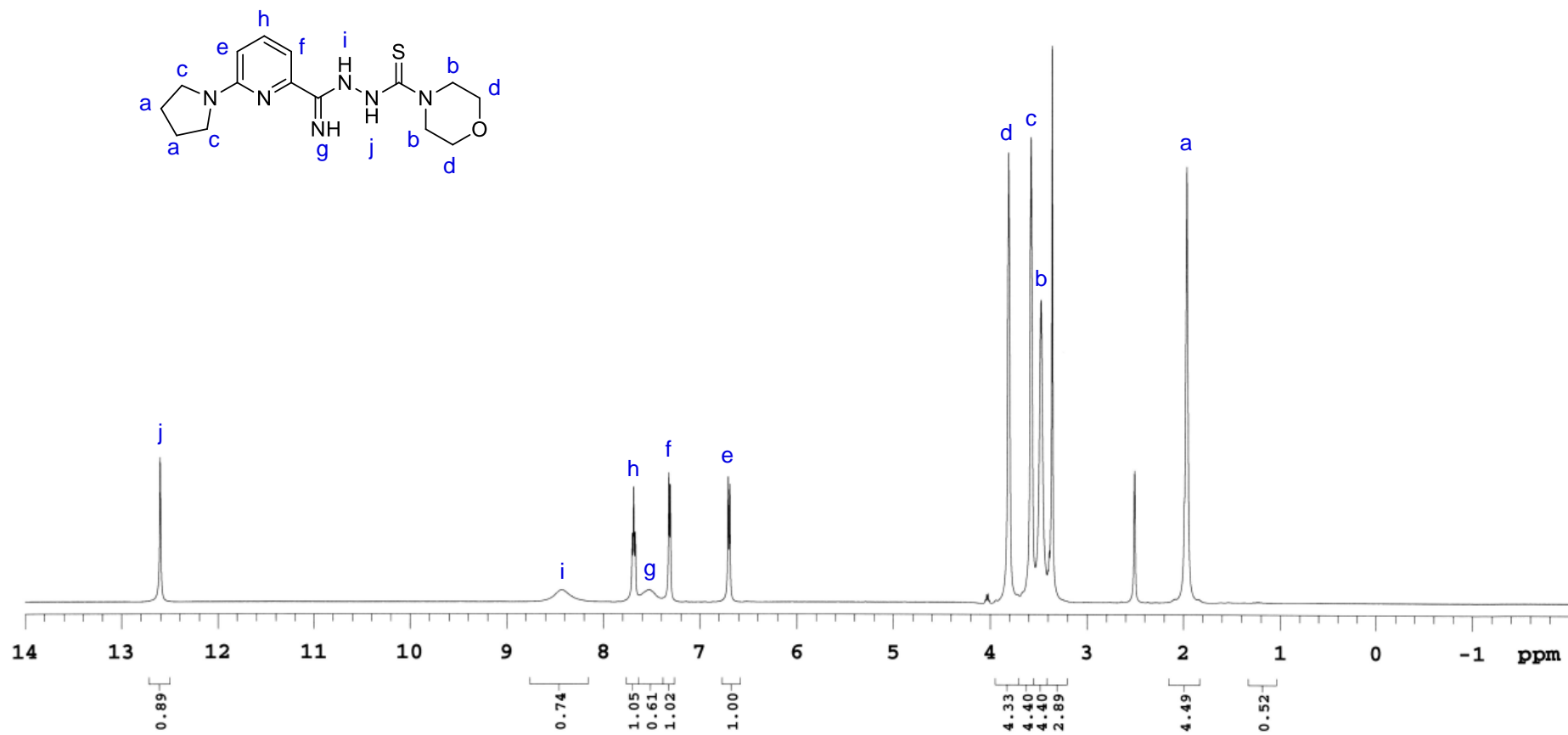
Struktura wszystkich zsyntezowanych 2,6-dipodstawionych pochodnych pirazyny i pirydyny potwierdzona została w oparciu o wyniki analizy elementarnej, a także na podstawie widm IR, ^1H NMR oraz w niektórych przypadkach ^{13}C NMR.

Analiza przykładowego widma IR (KBr) *N'*-(morfolino-4-karbonotioilo)-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu (**39**) (Rys. 28) pozwala na pełne przypisanie pasm absorpcji pochodzących od: drgań rozciągających N-H (przy wartościach 3422, 3286 i 3119 cm^{-1}), drgań rozciągających wiązań C-H pirolidyny i morfoliny (przy wartościach 2957 cm^{-1} i 2851 cm^{-1}), drgań rozciągających C=N (przy wartości 1663 cm^{-1}), drgań deformacyjnych N-H (przy wartościach 1608 cm^{-1} i 1555 cm^{-1}), drgań rozciągających C=C (przy wartościach 1504 cm^{-1} , 1458 cm^{-1} i 1424 cm^{-1}), drgań rozciągających wiązań C-N (przy wartościach 1350 cm^{-1} , 1309 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} i 1222 cm^{-1}), drgań rozciągających C=S (przy wartości 1165 cm^{-1}), drgań rozciągających C-O ugrupowania morfolinowego (przy wartości 1114 cm^{-1}), drgań deformacyjnych w płaszczyźnie C-H (przy wartości 1021 cm^{-1}) oraz drgań deformacyjnych poza płaszczyzną C-H (przy wartościach 889 cm^{-1} i 794 cm^{-1}).

Na widmie ^1H NMR wykonanym w $\text{DMSO-}d_6$ dla tego samego związku (Rys. 29), w obszarze alifatycznym, obserwujemy cztery sygnały w formie szerokich singletów o łącznej integracji równej szesnastu protonom. Sygnały o przesunięciu 1,97 i 3,58 ppm odpowiadają grupom CH_2 (a) i NCH_2 (c) pierścienia pirydynowego, a 3,47 i 3,81 ppm grupom NCH_2 (b) i OCH_2 (d) pierścienia morfolinowego. Obecność grup NH manifestuje się występowaniem dwóch szerokich singletów oraz singletu o intensywności względnej 1:1:1 protonów przy 7,51 ppm (g), 8,43 ppm (i) i 12,60 ppm (j). Kolejne sygnały, dublet (e) (δ 6,70 ppm, $J = 8,5$ Hz), dublet (f) (δ 7,32 ppm, $J = 7,0$ Hz) i triplet (h) (δ 7,69 ppm, $J = 7,8$ Hz) odpowiadają protonom H5, H3 i H4 pierścienia pirydynowego.



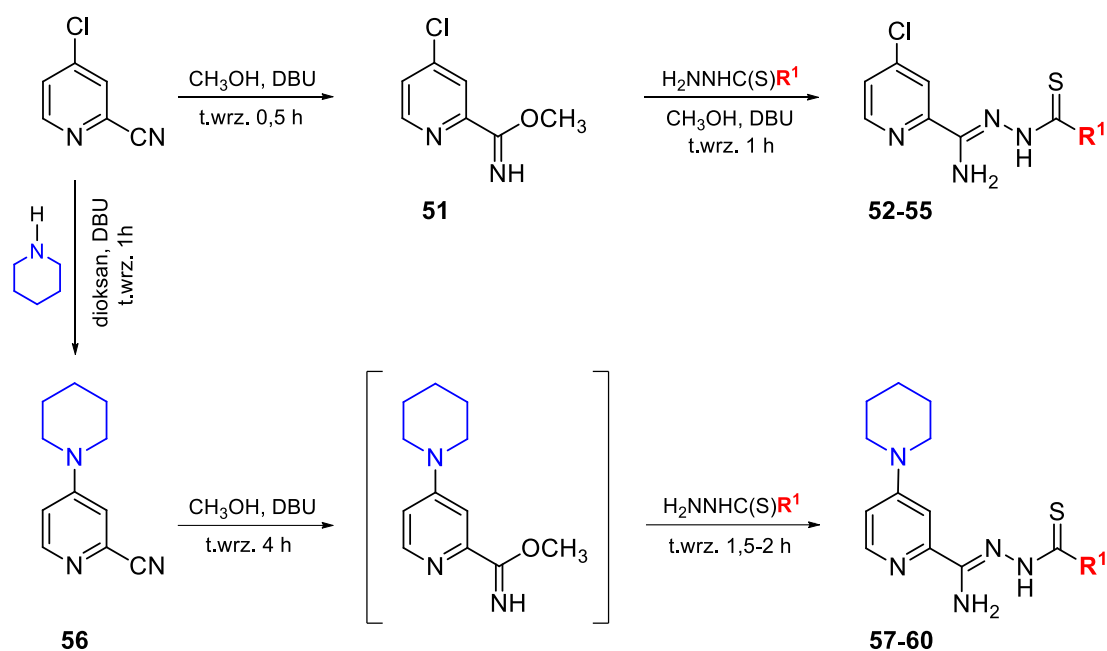
Rys. 28 Widmo IR związku 48, wykonane dla tabletki KBr



Rys. 29 Widmo ^1H NMR związku **48**, wykonane w DMSO-d_6 przy częstotliwości rezonansowej 500 MHz

4.1.4 Otrzymywanie 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny (52–60)

W obu omówionych powyżej grupach atom chloru oraz m.in. pierścień piperydyny wydają się mieć znaczący wpływ na aktywność tuberkulostatyczną, co zostanie wykazane w podrozdziale 5.1. W związku z tym zaprojektowano kolejną serię syntez, dla której materiałem wyjściowym był dostępny w handlu 4-chloropikolinonitryl. Na tym etapie badane było znaczenie zmiany miejsca połączenia tych dwóch grup funkcyjnych z pierścieniem aromatycznym z pozycji C6 na C4. 4-Chloropirydyna jest bardziej reaktywna niż 6-chloropirydyna, ponieważ w przypadku najbardziej stabilnych kompleksów Meisenheimera ładunek ujemny (na atomie azotu pierścienia) jest bardziej oddalony od grupy odchodzącej i grupy podstawianej, które odciągają elektrony poprzez efekt indukcyjny ujemny [178]. 2,4-Dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirydyny syntezowano metodami analogicznymi do tych, które stosowano dla 2,6-dipodstawionych pochodnych pirydyny (Schemat 6). Produkty końcowe z atomem chloru w pozycji C4 **52–55** (wydajność 46–77%) otrzymano poprzez metyloiminoester **51** (wydajność 82%). W tym przypadku kondensacje z morfolino-4-karbotiohydrazidem, piperidyno-1-karbotiohydrazidem, piperydino-1-karbotiohydrazidem i *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem prowadzono w środowisku zasadowym w temperaturze wrzenia przez 1h. Następnie podstawiono atom chloru w związku wyjściowym piperydyną w wyniku reakcji typu S_N2Ar , a powstały produkt pośredni **56** (wydajność 92%) wykorzystano do utworzenia *in situ* iminoestru metylowego, który przekształcono w pożądane związki o strukturze tiosemikarbazonu **57–60** (wydajność 39–75%). Związki **51** i **56** znane są z piśmiennictwa [179,180].



Nr	52	53	54	55	57	58	59	60
R ¹	-N ₂ O	-N ₂	-N ₂	-N(CH ₃) ₂	-N ₂ O	-N ₂	-N ₂	-N(CH ₃) ₂

Schemat 6

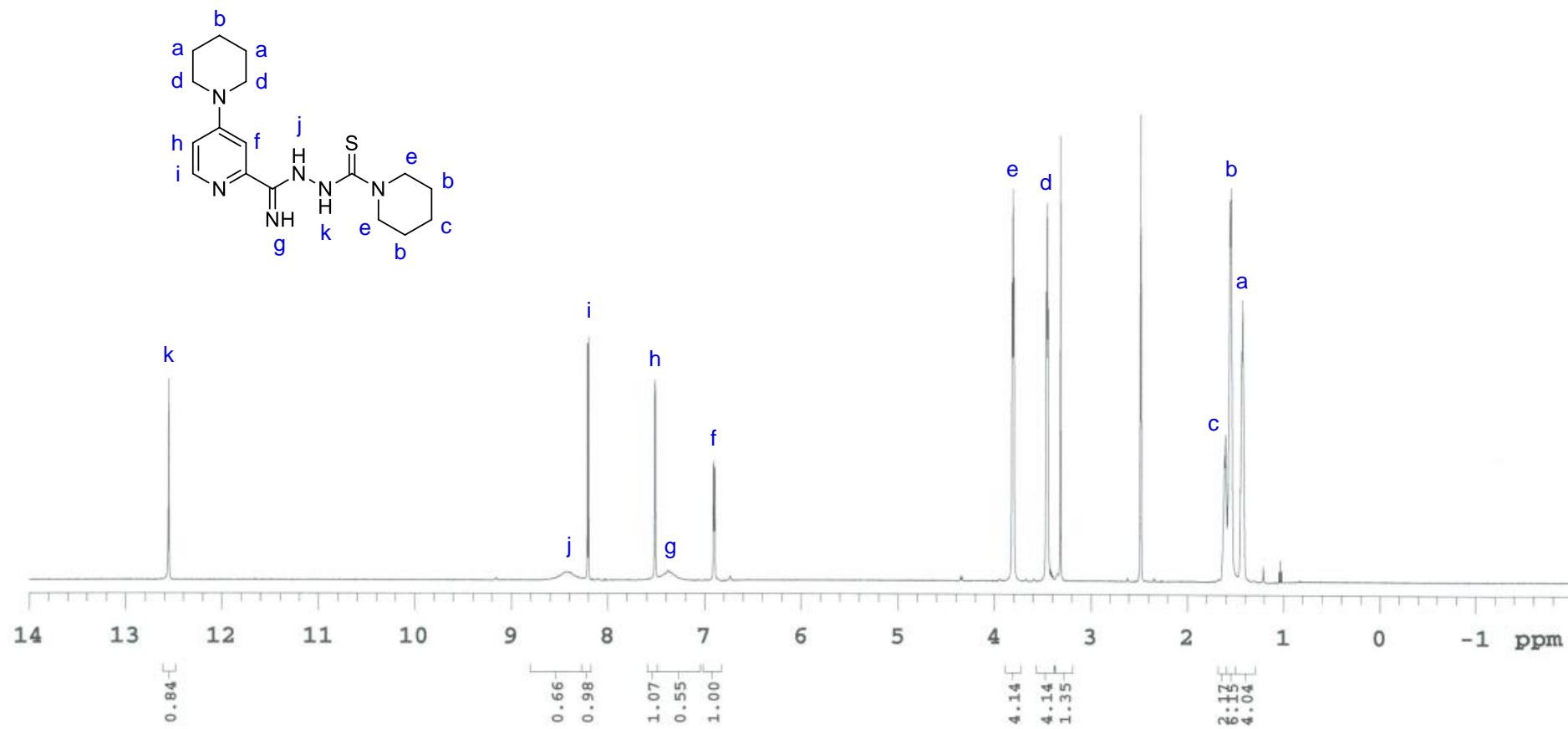
Analiza elementarna oraz analiza spektroskopowa IR oraz ¹H NMR potwierdziły struktury zsyntezowanych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny podstawionych w pozycji C2 i C4.

Na widmie ¹H NMR wykonanym dla związku **59** w deuterowanym dimetylosulfotlenku przy częstotliwości 500 MHz (Rys. 30) jako pierwszy obserwujemy sygnał w postaci multipletu, w zakresie 1,43–1,44 ppm, który posiada integrację odpowiadającą czterem protonom (a) znajdującym się w pierścieniu piperydynowym (w pozycji C4 pierścienia pirydyny). Kolejny multiplet o integracji sześciu protonów (b), w zakresie 1,55–1,57 ppm, pochodzi od dwóch grup CH₂ podstawnika piperydynowego znajdującego się w łańcuchu tiosemikarbazonowym oraz jednej grupy CH₂ tego samego podstawnika znajdującego się przy pierścieniu pirydyny. Natomiast multiplet (zakres 1,60–1,62 ppm) swoją intensywnością odpowiada dwóm protonom (c) grupy CH₂ pierścienia piperydynowego obecnego w łańcuchu bocznym. Przy wartościach 3,46 ppm (d) i 3,81 ppm (e) znajdują się dwa triplety o stałych sprzężenia odpowiednio $J = 5,5$ Hz i $J = 5,3$ Hz. Każdy z nich odpowiada dwóm parom protonów (NCH₂) piperydyny. W zakresie aromatycznym widnieją trzy sygnały pochodzące od pierścienia

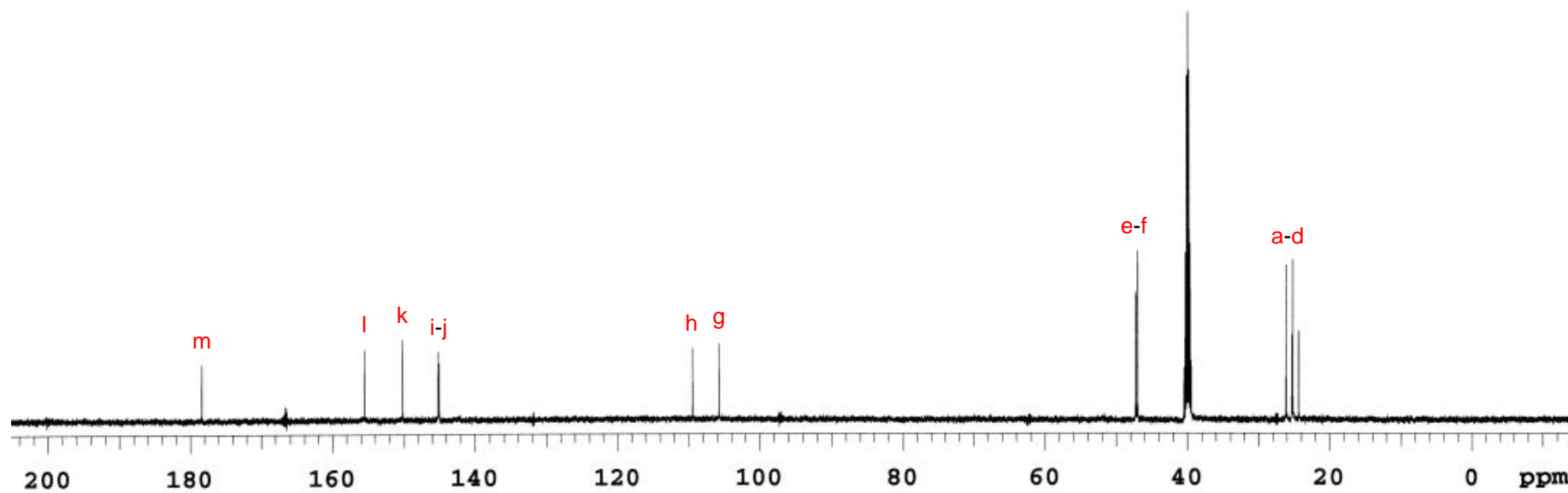
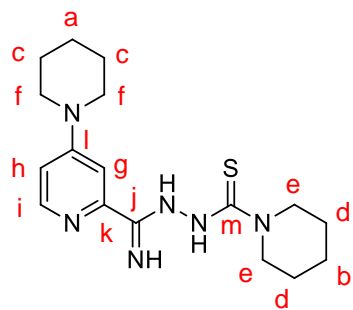
pirydyny: dublet dubletów o stałej sprzężenia $J_1 = 8,5$ Hz i $J_2 = 4,0$ Hz przy 6,90 ppm protonu H3 (f), dublet o niskiej stałej sprzężenia $J = 2,0$ Hz przy 7,52 ppm protonu H5 (h) oraz dublet o stałej sprzężenia $J = 6,5$ Hz przy 8,21 ppm protonu H6 (i). Pojedyncze protony grup NH zidentyfikowano w postaci dwóch szerokich singletów przy wartościach 7,38 ppm (g) i 8,41 ppm (j) oraz singletu przy wartości 12,56 ppm (k).

W widmie ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) (Rys. 31) związku **59** zaobserwowano w zakresie alifatycznym sygnały (24,35, 25,20, 25,31, 26,12, 47,02 oraz 47,30 ppm) pochodzące od atomów węgla znajdujących się w pierścieniu piperydynowym (kolejnie a–f). Dwa sygnały o wyższych przesunięciach odpowiadają atomom węgla (e–f) połączonym wiązaniem z atomem azotu typu amidowego. Wartości przesunięcia chemicznego równe 105,74, 109,45, 145,00, 145,13 i 150,17 ppm przypisano atomom węgla w pierścieniu pirydyny (kolejnie C3 (g), C5 (h), C6 (i), C4 (j) i C2 (k)). Linie rezonansowe przy 155,50 ppm i 178,37 ppm odpowiadają atomom węgla odpowiednio ugrupowania C=NH (l) i C=S (m).

Analiza widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR pozwoliła na identyfikację 26 protonów i 17 atomów węgla, co koreluje ze strukturą 4-(piperydyn-1-ylo)- N' -(piperydino-1-karbonotioilo)pikolinohydrasonamidu.



Rys. 30 Widmo ^1H NMR związku **59**, wykonane w DMSO-d_6 przy częstotliwości rezonansowej 500 MHz

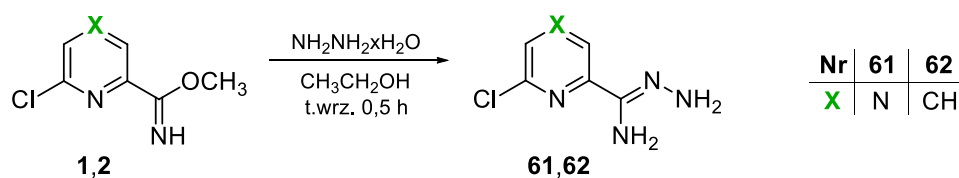


Rys. 31 Widmo ^{13}C NMR związku 59, wykonane w $\text{DMSO-}d_6$ przy częstotliwości rezonansowej 125 MHz

4.1.5 Otrzymywanie amidrazonów (61–72)

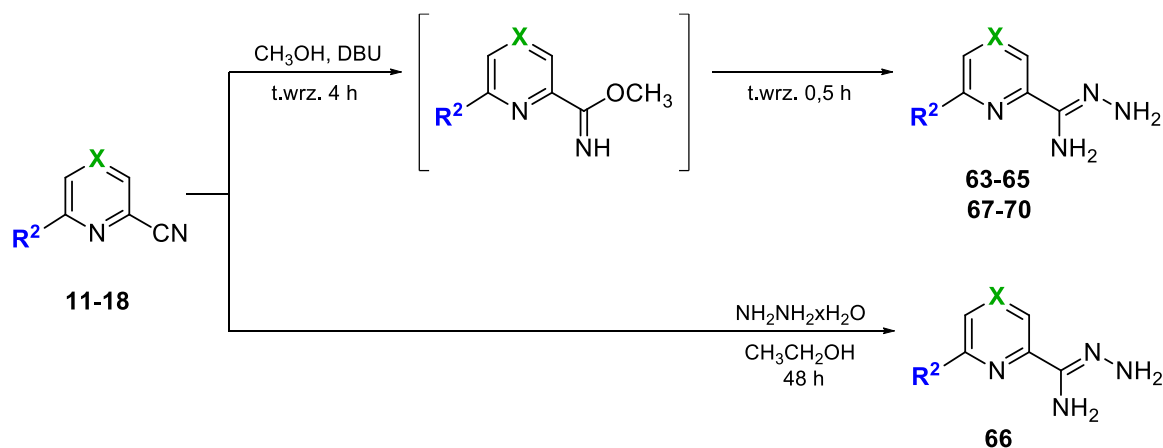
Amidrazony syntezowane są w reakcji hydrazyny z nityrami, iminoestrami i ich solami, amidynami, amidami, tioamidami, ketiminami, acetylenami, karbodiimidanami, a także poprzez redukcję nitrazonów, formazanów czy soli tetrazolowych. W celu uzyskania produktu z wysoką wydajnością konieczne jest użycie jej nadmiaru w stosunku do drugiego substratu [125].

Amidrazony z atomem chloru w pozycji C6 pierścienia pirazyny i pirydyny **61**, **62** uzyskano w reakcji metyloiminoestrów z 80% wodzianem hydrazyny w środowisku etanolowym (Schemat 7). Reakcje prowadzone były w temperaturze wrzenia przez 0,5 h z wydajnością odpowiednio 69% i 82%.



Schemat 7

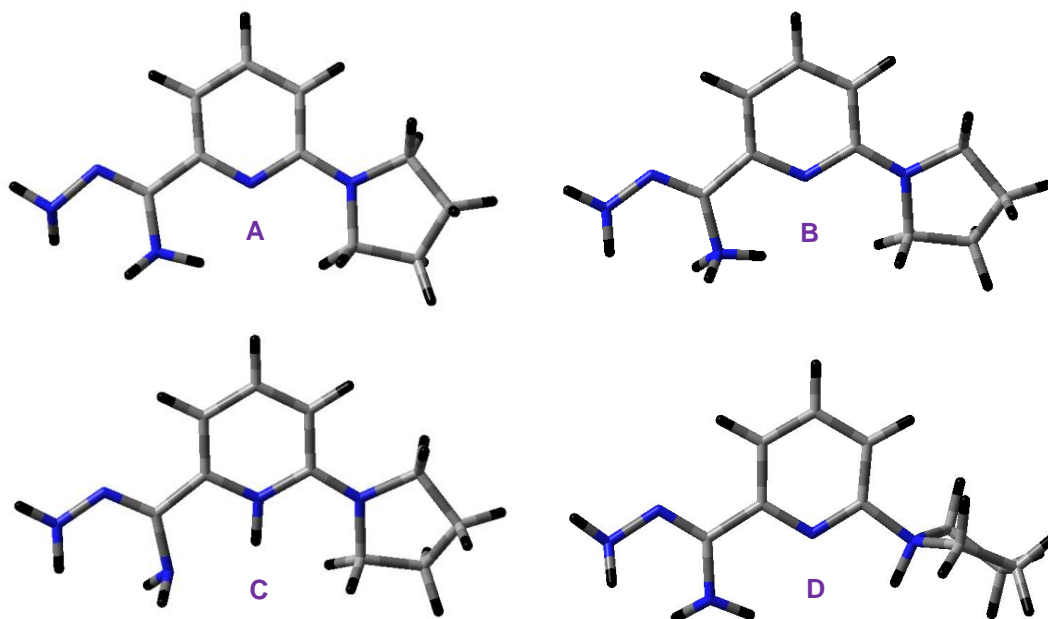
Natomiast iminoestry, które pozwoliły na otrzymanie ich analogów z wprowadzonymi podstawnikami w położeniu **R²** **63–65**, **67–70** (wydajność 59–100%) nie były poddawane izolacji. Mimo, iż iminoestry pirazynowe są łatwiejsze do wyodrębnienia niż pirydynowe, to również w ich przypadku zastosowano metodę *in situ*. Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika dodano wodzian hydrazyny i kontynuowano reakcję przez 0,5–2 h (Schemat 8). Zastosowanie tej metody nie pozwoliło na otrzymanie 6-fenoksypirazyno-2-karbohydrazonamidu (**66**). Prowadzenie reakcji w obecności metanolu zarówno w temperaturze wrzenia, jak i temperaturze pokojowej skutkowało podstawieniem grupy fenoksyłowej grupą metoksyłową. Pożądany produkt reakcji udało się uzyskać z nityru, z wydajnością 69%, przy zastosowaniu etanolu jako rozpuszczalnika, znacznego nadmiaru 99% roztworu wodzianu hydrazyny, łagodnych warunków temperatury i odpowiednio długiego czasu prowadzenia reakcji (48 h) (Schemat 8).



Nr	63	64	65	66	67	68	69	70
X	N	N	N	N	CH	CH	CH	CH
R ²	-N ₄ O	-N ₅	-N ₆	-OPh	-N ₄ O	-N ₅	-N ₆	-OPh

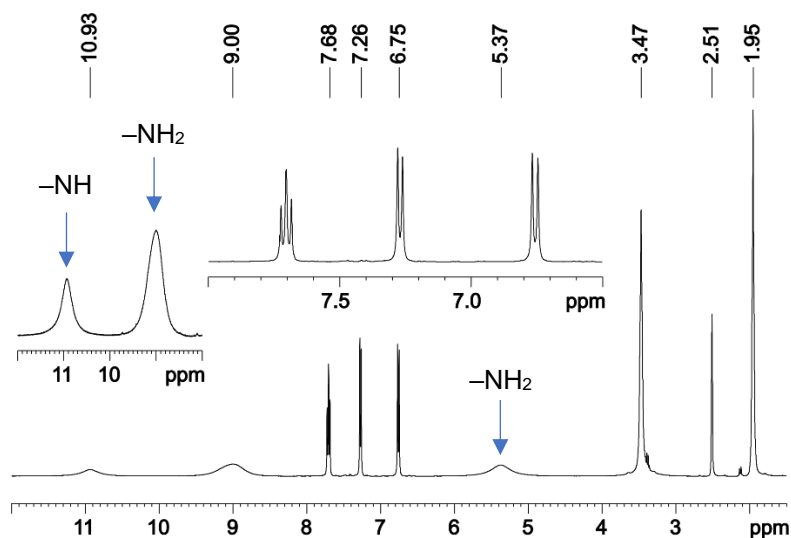
Schemat 8

Do oczyszczenia większości uzyskanych amidrazonów wystarczająca była metoda krystalizacji z rozpuszczalnika. Jeden związek, 6-(pirolidyn-1-yl)picolinohydrazonamid (**68**), wymagał zastosowania techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, gdzie eluentem była mieszanina woda-acetonitryl. Z uwagi, iż do zakwaszenia eluentu wykorzystano kwas solny nastąpiło protonowanie jednego z atomów azotu cząsteczki, co z kolei skłoniło do podjęcia próby określenia położenia tego protonu. Pierwszym etapem tego procesu było wygenerowanie czterech struktur modelowych: bez protonu (**A**) oraz z protonem umieszczonym na ugrupowaniu $-\text{NH}_2$ (**B**), w części aromatycznej (**C**) oraz alifatycznej (**D**) (Rys. 32). Po optymalizacji geometrii okazało się, iż model cząsteczki z protonowaną grupą $-\text{NH}_2$ (**B**) jest niestabilny energetycznie i przekształca się w strukturę protonowaną w pozycji aromatycznej (**C**). Obliczenia *ab initio* DFT przeprowadzone w programie Gaussian 16 [181], na poziomie obliczeniowym B3LYP/6-311++G(d,p), wykazały iż najniższym energetycznie modelem jest struktura z protonem umieszczonym na atomie azotu w pierścieniu pirydynowym (**C**).



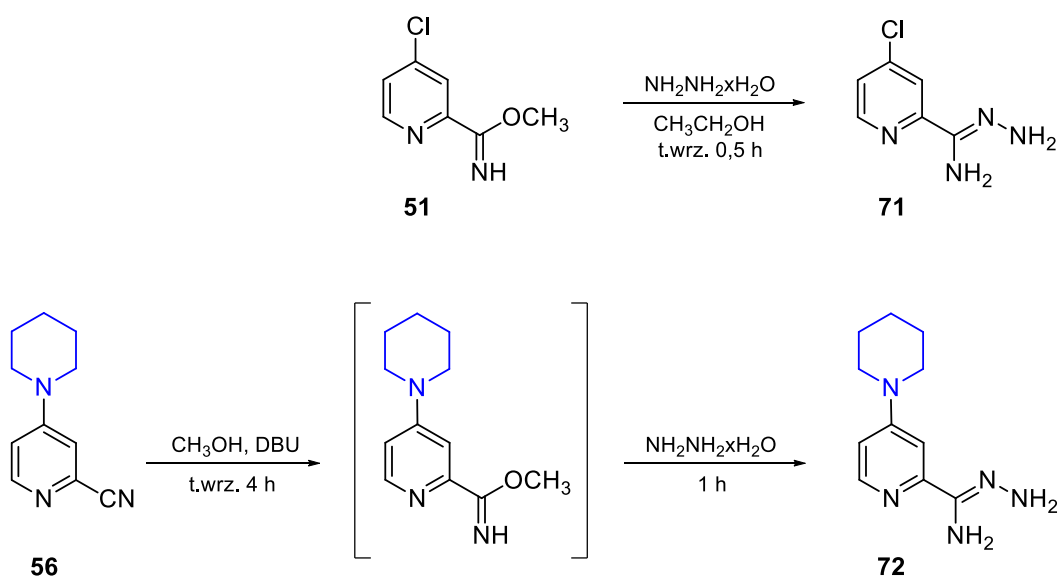
Rys. 32 Modele wyjściowe: bez protonu (**A**), z protonem umieszczonym na ugrupowaniu $-NH_2$ (**B**), pirydynowym atomie azotu (**C**) oraz pirolidynowym atomie azotu (**D**)

Następnie, zarejestrowano w $DMSO-d_6$ widmo 1H NMR (Rys. 33), którego interpretacja pozwoliła przypisać sygnały od protonów połączonych z atomami węgla w pierścieniu pirolidynowym (przy wartościach 1,95 ppm i 3,47 ppm) oraz w pierścieniu pirydynowym (przy wartościach 6,75 ppm, 7,26 ppm, 7,68 ppm). Na widmie widoczne są również trzy szerokie sygnały, których integracja sugeruje obecność dwóch ugrupowań $-NH_2$ (przy wartościach 5,37 ppm i 9,00 ppm) oraz jednego ugrupowania $-NH$ (przy wartości 10,93 ppm). Wymienione ugrupowania znajdują się w strukturze wyjściowej, co zawęży pole poszukiwań do modelu **C** i **D**. Obliczenia teoretyczne dla hipotetycznych modeli **C** i **D** wykazały, iż przesunięcie chemiczne protonu pochodzące z grupy $-NH$ będzie wynosiło 10,4 ppm dla modelu **C** i 5,9 ppm dla modelu **D**, co daje silne przesłanki, aby sądzić, iż model **C** jest tym, który występuje eksperymentalnie.



Rys. 33 Widmo ^1H NMR dla związku **68** wykonane w $\text{DMSO-}d_6$ przy częstotliwości rezonansowej 500 MHz

Syntezę 4-podstawionych amidrazonów **71**, **72** (wydajność 67% i 63%) przeprowadzono metodami analogicznymi do tych, które zastosowano w przypadku ich analogów z podstawnikami w położeniu 6.



Schemat 9

Występowanie ugrupowań $-\text{NH}_2$ w amidrazonach potwierdza obecność na widmach ^1H NMR dwóch sygnałów, w zakresie 5,04–5,74 ppm oraz 5,32–5,84 ppm, o integracji dwóch protonów każdy, a także obecność pasm absorpcyjnych na widmach IR

pochodzących od drgań rozciągających i deformacyjnych wiązań N-H, odpowiednio w zakresie 3462–3203 cm⁻¹ i 1595–1548 cm⁻¹.

Chlorowe pochodne amidrazonu opisane zostały wcześniej w literaturze, a ich synteza w odróżnieniu od związków **61**, **62**, **72** przeprowadzana była z nitrylu i roztworu wodnego hydratu hydrazyny [182–184].

4.1.6 Otrzymywanie dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny (73–92) i pirydyny (97–120)

Niepodstawione amidrazony uznawane są za doskonałe prekursory do syntezy cząsteczek biologicznie aktywnych, a to ze względu na ich szerokie możliwości przekształceń w pięcio-, sześć-, siedmiocłonowe i skondensowane układy heterocykliczne, a także kondensowanie z aldehydami, ketonami, halogenkami alkilowymi, iminoestrami czy izotiocyjanianami [125,185–187].

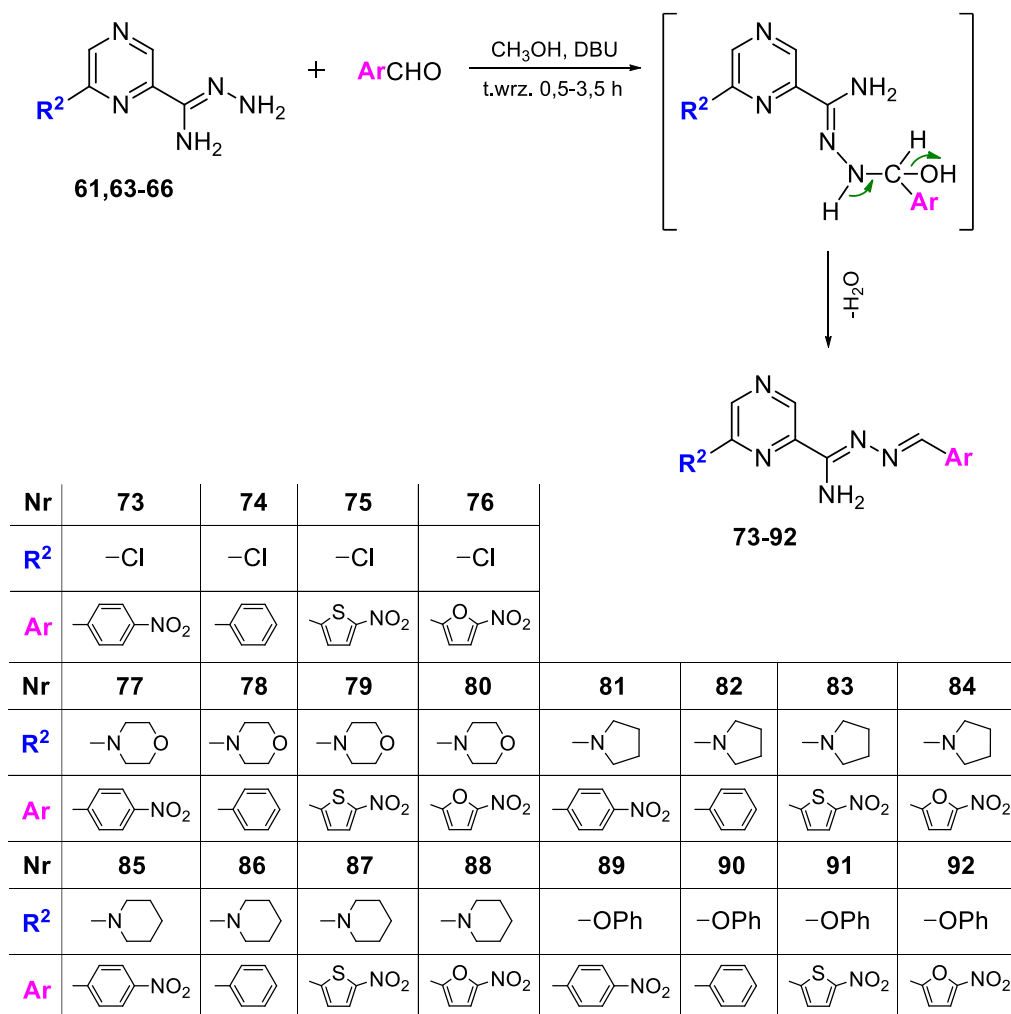
Kolejnym etapem badań było sprawdzenie znaczenia ugrupowania tiosemikarbazonowego dla aktywności przeciwpłatkowej poprzez jego wymianę na ugrupowanie iminowe. Strukturalnie iminy, nazywane również azometinami lub zasadami Schiffa, charakteryzują się obecnością podwójnego wiązania pomiędzy atomami azotu i węgla (–N=CH–). Powstają w wyniku reakcji addycji nukleofilowej związków karbonylowych z aminami pierwszorzędowymi w odpowiednich warunkach [188,189]. Aldehydy są znacznie bardziej reaktywne niż ketony, w przypadku których szczególnie istotny jest dobór katalizatora, rozpuszczalnika, temperatury reakcji czy zakresu pH, a wynika to z efektów sterycznych oraz elektronowych [188]. Synteza imin przebiega dwuetapowo według mechanizmu addycji-eliminacji. Początkowo aminowy atom azotu pełniący rolę nukleofila atakuje elektrofilowy karbonylowy atom węgla tworząc nietrwały produkt pośredni – hemiaminal, a następnie wydzielana jest cząsteczka wody, czego konsekwencją jest utworzenie produktu końcowego – iminy [188,190].

Zaprojektowano trzy serie syntez pochodnych iminowych. Źródła literaturowe donoszą o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego ugrupowania nitrofurylowego [191], w związku z czym do kondensacji z amidrazonami wykorzystano 5-nitrofurano-2-karbaldehyd oraz jego strukturalne analogi: 5-nitrotiofeno-2-karbaldehyd, 5-nitrobenzaldehyd i benzaldehyd. Pozwoliło to na sprawdzenie dodatkowego wpływu na aktywność rodzaju pierścienia aromatycznego, rodzaju ewentualnego heteroatomu w pierścieniu aromatycznym oraz obecności grupy nitrowej przyłączonej do pierścienia.

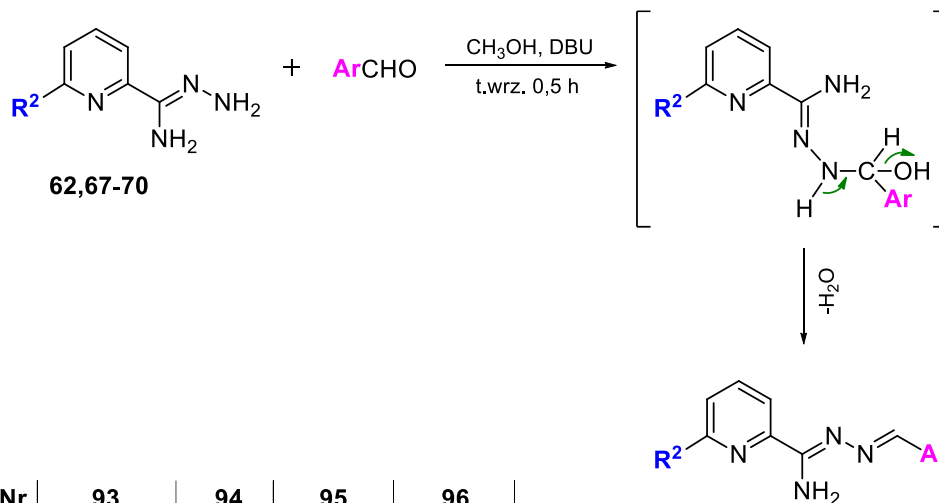
Reakcje prowadzone były w obecności metanolu przez 0,5–3,5 h dla pochodnych pirazyńowych oraz przez 0,5 h dla pochodnych pirydynowych.

Z amidrazonów **61**, **63–66** otrzymano 2,6-dipodstawione iminowe pochodne pirazyńy **73–92** z wydajnością 58–98% (Schemat 10). 2,6-Dipodstawione iminowe pochodne pirydyny **93–112** syntezowane były z wydajnością 39–96% z amidrazonów **62**, **67–70** (Schemat 11). Natomiast wydajność 2,4-dipodstawionych iminowych pochodnych pirydyny **113–120**, których prekursorami były amidrazony **71**, **72**, wynosiła 57–85% (Schemat 12). Synteza związków **73**, **74**, **76**, **115**, **116** znana jest z piśmiennictwa [187,192].

Struktury wszystkich uzyskanych pochodnych o budowie imin zostały zidentyfikowane na podstawie wyników analizy elementarnej oraz metodami spektroskopowymi (IR, ^1H NMR oraz niekiedy ^{13}C NMR). Obecność ugrupowania azometinowego potwierdzał występujący na widmie ^1H NMR sygnał o intensywności jednego protonu w zakresie 8,25–8,64 ppm.

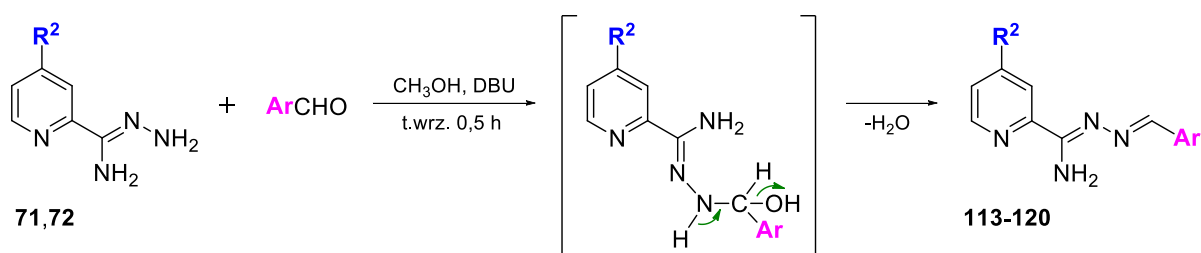


Schemat 10



Nr	93	94	95	96				
R²	-Cl	-Cl	-Cl	-Cl				
Ar								
Nr	97	98	99	100	101	102	103	104
R²								
Ar								
Nr	105	106	107	108	109	110	111	112
R²					-OPh	-OPh	-OPh	-OPh
Ar								

Schemat 11



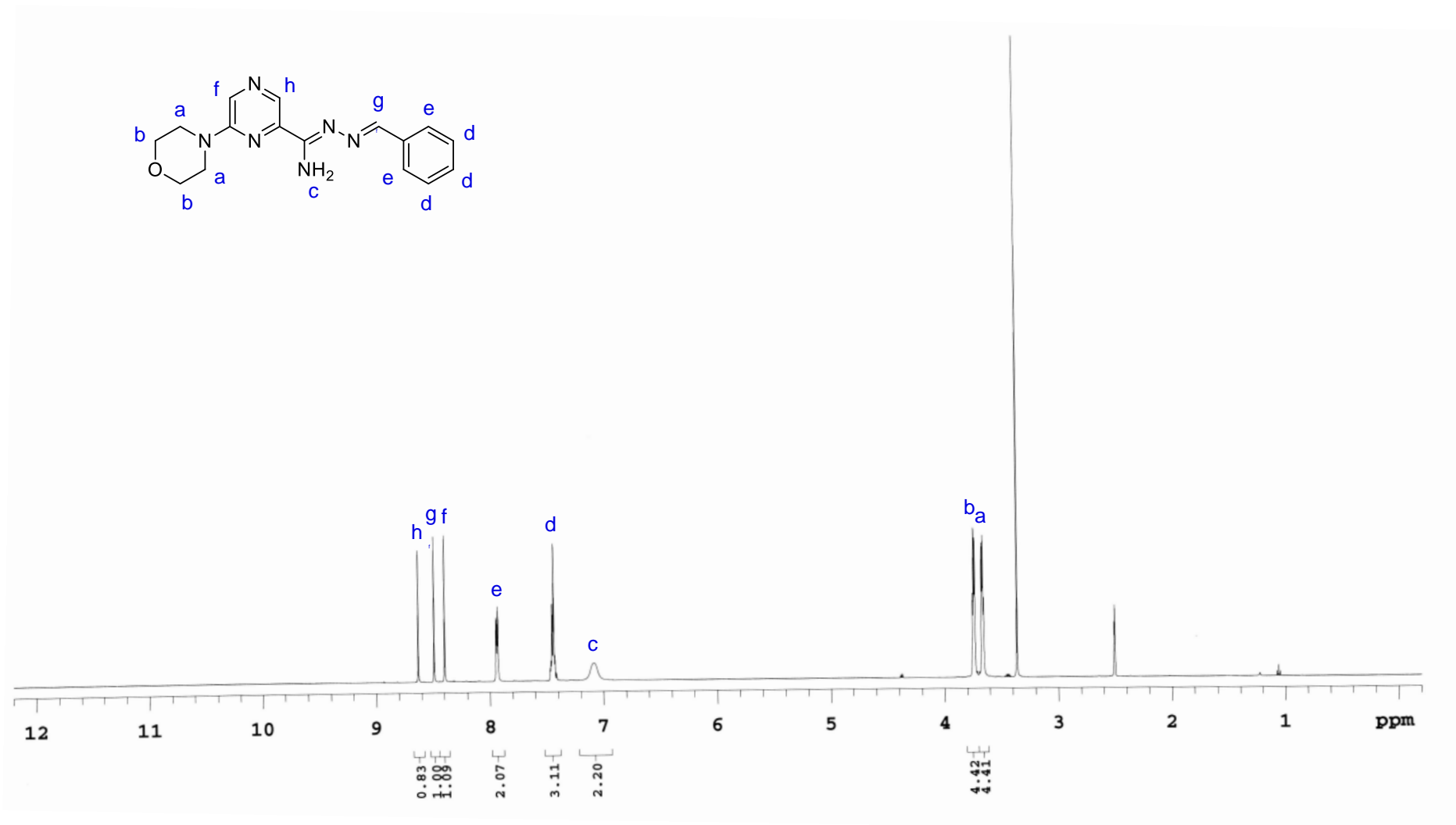
Nr	113	114	115	116	117	118	119	120
R²	-Cl	-Cl	-Cl	-Cl				
Ar								

Schemat 12

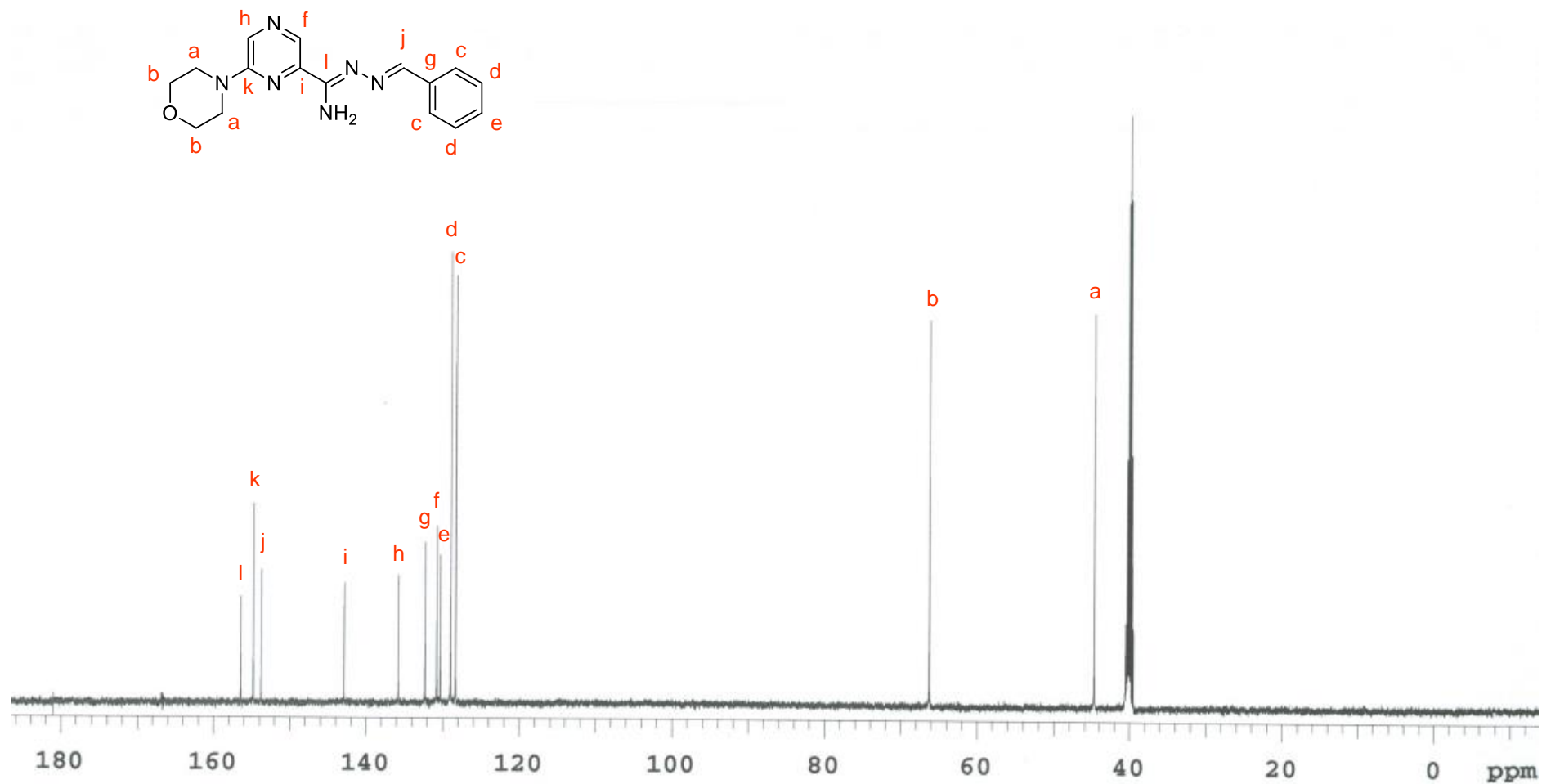
Rysunek 34 przedstawia widmo ^1H NMR zarejestrowane w $\text{DMSO-}d_6$ dla przedstawiciela pirazynowych pochodnych o strukturze imin – *N'*-benzylideno-6-morfolinopirazyno-2-karbohidrazonamidu (**78**). Pierwsze dwa sygnały w formie tripletów, o stałej sprzężenia $J = 4,8$ Hz każdy, z łączną integracją odpowiadającą ośmiu protonom pochodzą kolejno od grup NCH_2 (**a**) (δ 3,67 ppm) i OCH_2 (**b**) (δ 3,75 ppm) pierścienia morfolinowego. Szeroki singlet o intensywności dwóch protonów, przy wartości przesunięcia chemicznego 7,08 ppm, potwierdza obecność grupy NH_2 (**c**). Protony pochodzące od podstawnika fenyłowego przyłączonego do ugrupowania azometinowego dały następujące sygnały: multiplet (**d**) o intensywności trzech protonów w zakresie 7,44–7,46 ppm oraz dublet dubletów (**e**) o intensywności dwóch protonów przy wartości 7,94 ppm, ze stałymi sprzężenia $J_1 = 9,0$ Hz i $J_2 = 5,5$ Hz. Trzy następne linie rezonansowe w postaci singletów reprezentują proton H5 (**f**) pierścienia pirazyny (8,40 ppm), proton (**g**) grupy $\text{N}=\text{CH}$ (8,49 ppm) oraz proton H3 (**h**) pierścienia pirazyny (8,63 ppm).

Analiza struktury związku **78** została poszerzona o badania ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (Rys. 35). Sygnały pochodzące od dwóch grup równocennych atomów węgla obecnych w pierścieniu morfolinowym (**a**, **b**) występują przy wartościach przesunięcia chemicznego 44,72 ppm i 66, 29 ppm. W obszarze od 128,35 ppm do 142,93 ppm oraz przy 154,79 ppm obserwujemy liczne sygnały pochodzące od aromatycznych atomów węgla, a konkretnie od pierścienia benzenowego (**c**, **d**, **e**, **g**) oraz pierścienia pirazynowego (**f**, **h**, **i**, **k**). W obszarze o najniższym natężeniu pola magnetycznego można zidentyfikować również sygnały pochodzące od atomu węgla grupy azometinowej (**j**, 153,78 ppm) oraz od atomu węgla połączonego z grupą aminową (**l**, 156,47 ppm).

Interpretacja liczby sygnałów oraz ich intensywności wskazuje na obecność w cząsteczce 18 protonów oraz 16 atomów węgla, co w pełni potwierdza strukturę analizowanego związku.



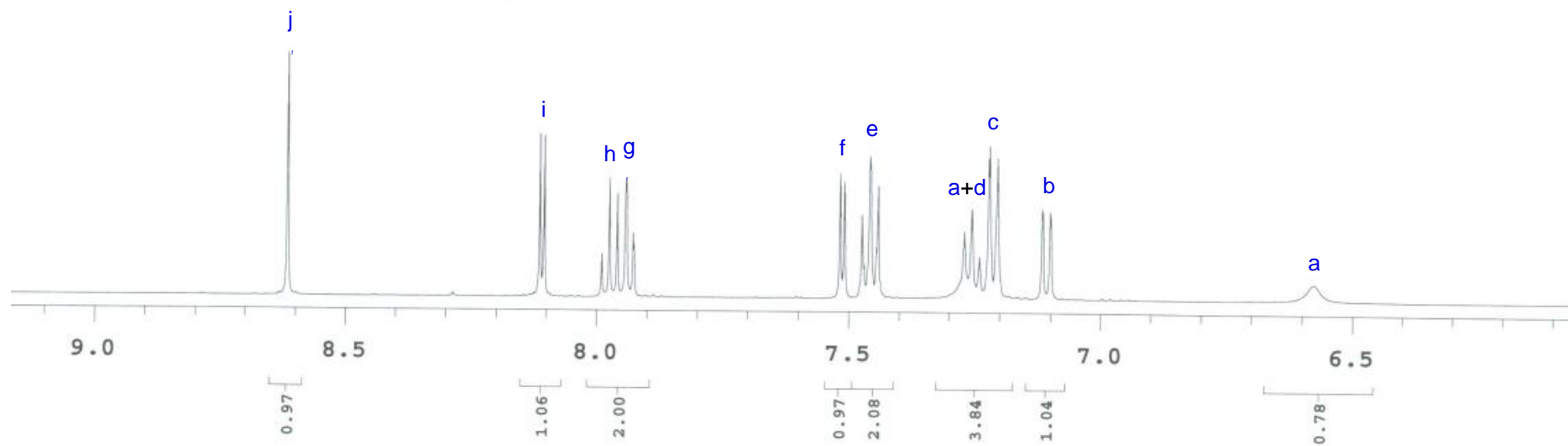
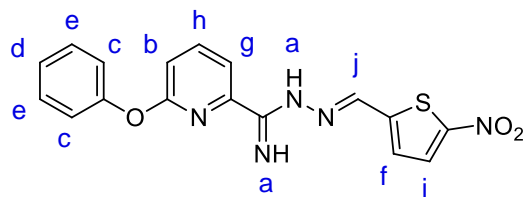
Rys. 34 Widmo ¹H NMR związku 78, wykonane w DMSO-d₆ przy częstotliwości rezonansowej 500 MHz



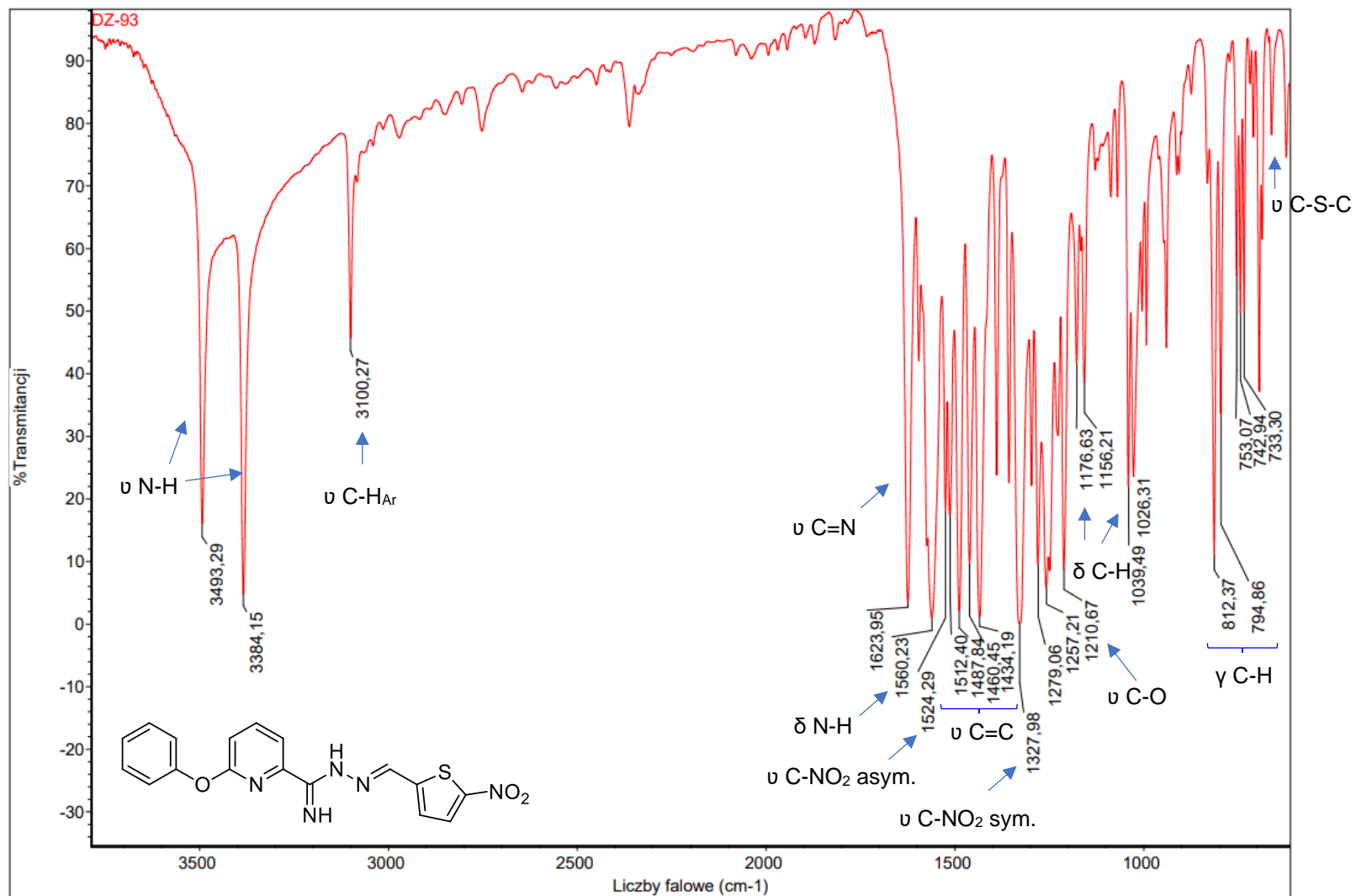
Rys. 35 Widmo ^{13}C NMR związku 78, wykonane w DMSO-d_6 przy częstotliwości rezonansowej 125 MHz

Z kolei z serii pirydynowych pochodnych iminowych jako przedstawiciel posłużył związek **111** zawierający ugrupowanie 5-nitrotiofenowe oraz fenoksyłowe w pozycjach 2 i 6. Ze względu na brak grup alifatycznych w jego budowie, na obrazie widma ^1H NMR wykonanego w deuterowanym dimetylosulfotlenku pominięto zakres dla nich charakterystyczny (Rys. 36). Jako pierwszy obserwujemy sygnał, przy wartości 6,58 ppm, w postaci szerokiego singletu (**a**) o integracji jednego protonu, który odpowiada jednej z grup NH. Dublet o stałej sprzężenia $J = 7,5$ Hz przy 7,11 ppm pochodzi od protonu H5 (**b**) pierścienia pirydyny. Trzy kolejne sygnały w formie dubletu (**c**) (2H), multipletu (**d**) (2H) oraz tripletu (**e**) (2H) demonstrują obecność protonów z pierścienia benzenowego ugrupowania fenoksyłowego i występują przy przesunięciach chemicznych 7,21 ppm ($J = 8,0$ Hz), 7,24–7,28 ppm oraz 7,46 ppm ($J = 8,3$ Hz). Intensywność multipletu wskazuje na obecność dodatkowego protonu i jest nim pojedynczy proton (**a**) grupy NH. Ponadto, w zakresie aromatycznym widoczne są sygnały pochodzące od protonów pierścienia tiofenowego (dublet (**f**): δ 7,51 ppm, $J = 4,5$ Hz; dublet (**i**): δ 8,11 ppm, $J = 4,0$ Hz) oraz pozostałych dwóch protonów H3 i H4 pierścienia pirydyny (dublet (**g**): δ 7,93 ppm, $J = 8,0$ Hz; triplet (**h**): δ 7,97 ppm, $J = 7,8$ Hz). Ostatnia pojedyncza linia rezonansowa przy przesunięciu chemicznym 8,62 ppm potwierdza występowanie protonu z ugrupowania azometinowego.

Analizę związku **111** uzupełniono o interpretację wykonanego dla niego widma IR (KBr) (Rys. 37). Niewątpliwie istotnymi sygnałami charakterystycznymi dla budowy strukturalnej analizowanej pochodnej były występujące przy wysokich liczbach falowych pasma absorpcyjne pochodzące od drgań rozciągających N-H (3493 cm^{-1} oraz 3384 cm^{-1}) oraz C-H pierścieni aromatycznych (3100 cm^{-1}), a także pasmo absorpcji drgań rozciągających C=N widniejące przy wartości 1623 cm^{-1} czy pasmo pochodzące od drgań deformacyjnych N-H przy 1560 cm^{-1} . Obecność podstawników w pozycji **R²** oraz **Ar** potwierdzają dwa intensywne pasma drgań rozciągających asymetrycznych oraz symetrycznych grupy NO_2 przy 1524 cm^{-1} i 1327 cm^{-1} , pasmo drgań rozciągających C-O ugrupowania fenoksyłowego przy 1210 cm^{-1} oraz pasmo drgań rozciągających wiązania C-S-C pierścienia tiofenowego przy 621 cm^{-1} . Ponadto, w obszarach $1512\text{--}1434\text{ cm}^{-1}$, $1176\text{--}1026\text{ cm}^{-1}$ oraz $811\text{--}733\text{ cm}^{-1}$ obserwujemy kolejno pasma absorpcji wywołane przez drgania rozciągające C=C pierścieni aromatycznych, a także drgania deformacyjne C-H w płaszczyźnie i poza płaszczyzną.



Rys. 36 Widmo ^1H NMR związku **III**, wykonane w DMSO-d_6 przy częstotliwości rezonansowej 500 MHz



Rys. 37 Widmo IR związku **III**, wykonane dla tabletki KBr

4.2. Badania krystalograficzne

W celu wyznaczenia struktury przestrzennej cząsteczek związków organicznych, otrzymanych na drodze syntezy, przeprowadzono rentgenowską analizę strukturalną, pozwalającą na dokonanie analizy geometrycznej, analizy oddziaływań między- i wewnątrzcząsteczkowych czy analizy typu upakowania cząsteczek w komórce elementarnej. Wymienione czynniki mogą mieć znaczący wpływ na aktywność biologiczną związków. Badania krystalograficzne przeprowadzono w Zespole Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Politechniki Łódzkiej w ramach programu interdyscyplinarnych studiów doktoranckich. Proces określania struktury krystalicznej jest sekwencją następujących po sobie operacji: krystalizacji zsyntezowanego związku, rejestracji i obróbki danych dyfrakcyjnych, rozwiązania struktury, udokładnienia, walidacji i ewentualnego deponowania wyników [193]. Na drodze krystalizacji otrzymano zdatne do pomiaru monokryształy 35 badanych związków, w tym 22 pochodnych tiosemikarbazonowych oraz 13 pochodnych iminowych. Monokryształy hodowano w roztworach przy zastosowaniu metody powolnego odparowania rozpuszczalnika z zachowaniem stałej temperatury roztworu. Jako rozpuszczalnik zastosowana została mieszanina metanol-DMF w stosunku objętościowym 1:1. Jedyńm wyjątek był związek **39** krystalizowany z mieszaniny izopropanol-DMF-woda (1:1:1 v/v).

W tabeli 5 zebrano dane krystalograficzne, dane pomiarowe i szczegóły dotyczące udokładniania wszystkich otrzymanych trójwymiarowych struktur krystalicznych.

Struktury krystaliczne związków (typu ORTEP) wizualizowane jako atomy w postaci elipsoid drgań termicznych reprezentują prawdopodobieństwo 50%.

Tabela 5. Dane krystalograficzne, dane pomiarowe i szczegóły dotyczące udokładniania 35 otrzymanych struktur

Dane krystalograficzne	3	5	6	9	10	21
Wzór sumaryczny	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₆ OS	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₆ S	C ₈ H ₁₁ ClN ₆ S	C ₁₂ H ₁₆ ClN ₅ S	C ₁₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₁₀ S ₂	C ₁₅ H ₂₃ N ₇ OS
M_r	300,77	298,80	258,74	297,81	515,49	349,46
Układ krystalograficzny	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	rombowy	jednoskośny	jednoskośny
Gupa przestrzenna	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$P2_1/n$	$Pbca$	$P2_1/c$	$P2_1/c$
a, b, c [Å]	7,7678 (1), 26,4167 (3), 6,7311 (1)	7,7179 (3), 27,2582 (13), 6,7828 (2)	5,5554 (2), 11,9856 (3), 17,3647 (5)	9,6740 (1), 14,9316 (1), 38,6437 (3)	18,1631 (4), 9,9649 (2), 13,5152 (3)	9,7186 (3), 14,3295 (5), 12,6329 (3)
α, β, γ [°]	90, 108,691 (2), 90	90, 106,519 (4), 90	90, 90,321 (2), 90	90, 90, 90	90, 104,658 (2), 90	90, 96,135 (2), 90
V [Å ³]	1308,37 (3)	1368,04 (10)	1156,21 (6)	5582,02 (8)	2366,55 (9)	1749,22 (9)
Z	4	4	4	16	4	4
Rodzaj promieniowania	CuK α	CuK α	MoK α	CuK α	CuK α	CuK α
μ [mm ⁻¹]	4,12	3,87	0,49	3,77	4,36	1,80
Wymiary kryształu [mm]	0,6 × 0,2 × 0,15	0,4 × 0,1 × 0,1	0,28 × 0,05 × 0,02	0,66 × 0,13 × 0,07	0,55 × 0,25 × 0,05	0,6 × 0,5 × 0,13
Rejestracja danych						
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	24011, 2715, 2548	10781, 2765, 2462	23889, 3478, 2977	59792, 5858, 5539	45793, 4936, 4567	32908, 3637, 3481
R_{int}	0,048	0,076	0,037	0,041	0,067	0,045
$(\sin\theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,636	0,636	0,736	0,637	0,636	0,637
Udokładnianie						
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,034, 0,093, 1,03	0,060, 0,171, 1,08	0,029, 0,076, 1,05	0,027, 0,069, 1,02	0,029, 0,078, 1,06	0,032, 0,079, 1,04
Liczba refleksów	2715	2765	3478	5858	4936	3637
Liczba parametrów	172	172	147	343	293	244
$\Delta_{max}, \Delta_{min}$ (e Å ⁻³)	0,61, -0,67	0,64, -0,55	0,51, -0,24	0,31, -0,33	0,29, -0,27	0,27, -0,26

Dane krystalograficzne	22	23	27	30	36	39
Wzór sumaryczny	C ₁₂ H ₁₉ N ₇ OS	C ₁₄ H ₂₃ N ₇ O ₂ S	C ₃₀ H ₄₆ N ₁₄ O ₂ S ₂	C ₁₃ H ₂₁ N ₇ S	C ₁₅ H ₂₂ N ₆ OS	C _{15,50} H _{23,44} N ₆ O _{1,22} S
M_r	309,40	353,45	698,93	307,43	334,44	345,46
Układ krystalograficzny	jednoskośny	jednoskośny	rombowy	rombowy	jednoskośny	trygonalny
Gupa przestrzenna	$P2_1/c$	$P2_1/n$	$Pbca$	$Pbca$	Pc	$R\bar{3}:H$
a, b, c [Å]	7,0768 (1), 13,9047 (1), 15,3378 (1)	8,6299 (2), 7,2301 (2), 27,6145 (5)	17,7010 (3), 17,0204 (3), 22,5895 (4)	13,3438 (2), 7,7762 (1), 28,5989 (3)	10,8522 (2), 4,7714 (1), 16,4259 (3)	23,2044 (3), 23,2044 (3), 17,2241 (2)
α, β, γ [°]	90, 94,005 (1), 90	90, 94,241 (2), 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 107,744 (2), 90	90, 90, 120
V [Å ³]	1505,57 (3)	1718,29 (7)	6805,7 (2)	2967,54 (7)	810,07 (3)	8031,7 (2)
Z	4	4	8	8	2	18
Rodzaj promieniowania	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α
μ [mm ⁻¹]	2,01	1,88	1,85	1,99	1,90	1,75
Wymiary kryształu [mm]	0,4 × 0,1 × 0,1	0,35 × 0,15 × 0,10	0,65 × 0,57 × 0,11	0,3 × 0,15 × 0,1	0,35 × 0,1 × 0,1	0,47 × 0,19 × 0,14
Rejestracja danych						
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	83673, 3215, 3095	23126, 3584, 3197	41201, 7118, 5940	31206, 3134, 2877	17588, 3172, 3121	35469, 3757, 3509
R_{int}	0,071	0,067	0,068	0,052	0,054	0,037
$(\sin\theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,635	0,635	0,636	0,636	0,636	0,637
Udokładnianie						
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,035, 0,093, 1,07	0,050, 0,137, 1,07	0,055, 0,157, 1,04	0,034, 0,092, 1,05	0,027, 0,069, 1,08	0,037, 0,094, 1,07
Liczba refleksów	3215	3584	7118	3134	3172	3757
Liczba parametrów	201	232	433	195	211	227
Liczba ograniczeń	0	0	0	0	2	0
$\Delta_{max}, \Delta_{min}$ (e Å ⁻³)	0,26, -0,33	0,90, -0,37	0,49, -0,52	0,24, -0,33	0,17, -0,25	0,57, -0,34

Dane krystalograficzne	40	42	43	44	46	47
Wzór sumaryczny	C ₁₅ H ₂₂ N ₆ S	C ₁₃ H ₂₀ N ₆ S	C ₃₂ H _{48,22} N ₁₂ O _{2,11} S ₂	C ₁₆ H ₂₄ N ₆ S	C ₂₈ H ₄₄ N ₁₂ S ₂	C ₁₇ H ₂₃ N ₅ O ₄ S
M_r	318,44	292,41	698,94	332,47	612,87	393,46
Układ krystalograficzny	jednoskośny	jednoskośny	trygonalny	trójskośny	jednoskośny	rombowy
Gupa przestrzenna	$P2_1/n$	$P2_1/n$	$R\bar{3}:H$	$\bar{P}1$	$P2_1/c$	$Pccn$
a, b, c [Å]	10,2776 (2), 11,0270 (2), 14,7731 (3)	9,1032 (2), 10,9034 (1), 15,3748 (2)	23,47158 (15), 23,47158 (15), 34,2380 (3)	8,46333 (10), 15,03304 (15), 27,4526 (2)	9,3148 (2), 9,3860 (1), 36,2261 (5)	38,0250 (5), 12,37094 (19), 7,92165 (12)
α, β, γ [°]	90, 107,077 (2), 90	90, 107,202 (2), 90	90, 90, 120	98,1961 (8), 90,2187 (8), 100,2120 (9)	90, 94,812 (1), 90	90, 90, 90
V [Å ³]	1600,44 (6)	1457,78 (4)	16335,2 (3)	3400,82 (6)	3156,04 (9)	3726,39 (9)
Z	4	4	18	8	4	8
Rodzaj promieniowania	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α
μ [mm ⁻¹]	1,84	1,97	1,72	1,76	1,85	1,85
Wymiary kryształu [mm]	0,74 × 0,40 × 0,06	0,66 × 0,53 × 0,07	0,6 × 0,4 × 0,2	0,45 × 0,22 × 0,18	0,38 × 0,28 × 0,06	0,54 × 0,25 × 0,20
Rejestracja danych						
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	22970, 3306, 3021	27991, 2926, 2716	65950, 7458, 6866	106334, 14102, 12685	15028, 15028, 13699	14227, 3766, 3545
R_{int}	0,056	0,077	0,078	0,079	-	0,023
$(\sin\theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,636	0,636	0,637	0,636	0,637	0,636
Udokładnianie						
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,039, 0,108, 1,04	0,037, 0,106, 1,10	0,038, 0,100, 1,05	0,047, 0,131, 1,04	0,049, 0,147, 1,05	0,037, 0,091, 1,05
Liczba refleksów	3306	2926	7458	14102	15028	3766
Liczba parametrów	208	196	501	864	409	252
$\Delta_{max}, \Delta_{min}$ (e Å ⁻³)	0,61, -0,37	0,53, -0,37	0,33, -0,35	0,85, -0,54	0,33, -0,30	0,49, -0,45

Dane krystalograficzne	48	50	58	60	76	78
Wzór sumaryczny	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ OS	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ OS·H ₂ O	C ₁₆ H ₂₄ N ₆ S	C ₁₄ H ₂₃ N ₆ S	C ₁₀ H ₇ ClN ₆ O ₃	C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O
M_r	341,43	333,41	332,47	307,44	294,67	310,36
Układ krystalograficzny	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	rombowy
Gupa przestrzenna	$P2_1/c$	Ia	$P2_1/c$	$P2_1/c$	Pc	$P2_12_12_1$
a, b, c [Å]	5,0283 (1), 22,5544 (3), 14,5985 (2)	7,96887 (14), 10,94707 (18), 18,4759 (3)	10,0073 (1), 15,3127 (2), 11,3688 (2)	8,3901 (1), 9,6704 (1), 9,9451 (1)	6,2800 (2), 9,2527 (3), 10,3701 (3)	6,6880 (2), 6,7245 (2), 34,1690 (9)
α, β, γ [°]	90, 97,451 (1), 90	90, 96,2420 (16), 90	90, 96,784 (1), 90	90, 106,968 (1), 90	90, 95,924 (3), 90	90, 90, 90
V [Å ³]	1641,64 (5)	1602,20 (5)	1729,94 (4)	771,78 (2)	599,36 (3)	1536,70 (8)
Z	4	4	4	2	2	4
Rodzaj promieniowania	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α
μ [mm ⁻¹]	1,87	1,95	1,73	1,89	3,03	0,73
Wymiary kryształu [mm]	0,5 × 0,2 × 0,1	0,89 × 0,15 × 0,11	0,5 × 0,2 × 0,16	0,75 × 0,33 × 0,09	0,4 × 0,2 × 0,1	0,5 × 0,2 × 0,2
Rejestracja danych						
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	23458, 3365, 3150	4550, 2248, 2238	28120, 3609, 3336	21255, 3100, 3078	8658, 2133, 2078	17442, 3058, 2935
R_{int}	0,058	0,018	0,044	0,031	0,056	0,037
$(\sin\theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,637	0,635	0,636	0,637	0,636	0,636
Udokładnianie						
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,040, 0,111, 1,06	0,022, 0,058, 1,05	0,032, 0,086, 1,04	0,025, 0,068, 0,83	0,035, 0,093, 1,02	0,028, 0,072, 1,05
Liczba refleksów	3365	2248	3609	3100	2133	3058
Liczba parametrów	229	231	254	193	187	209
Liczba ograniczeń	0	2	0	1	2	0
$\Delta_{max}, \Delta_{min}$ (e Å ⁻³)	0,34, -0,39	0,21, -0,13	0,25, -0,21	0,20, -0,17	0,52, -0,36	0,22, -0,15

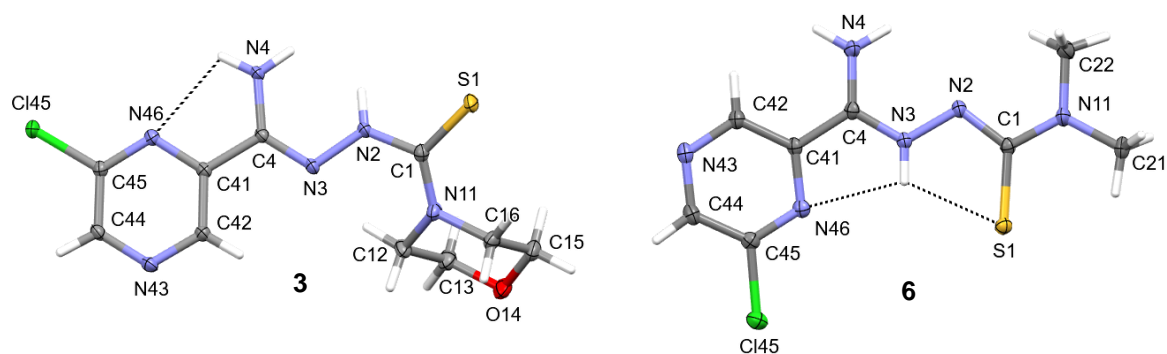
Dane krystalograficzne	80	81	82	84	85	86
Wzór sumaryczny	C ₁₄ H ₁₅ N ₇ O ₄	C ₁₆ H ₁₈ N ₇ O _{2,50}	C ₁₆ H ₂₀ N ₆ O	C ₁₄ H ₁₆ N ₇ O _{3,50}	C ₁₇ H ₂₀ N ₇ O _{2,50}	C ₁₇ H ₂₀ N ₆
M_r	345,33	348,37	312,38	338,34	362,40	308,39
Układ krystalograficzny	jednoskośny	Jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	tetragonalny
Gupa przestrzenna	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>I</i> 2/ <i>a</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>I</i> 2/ <i>a</i>	<i>I</i> 2/ <i>a</i>	<i>I</i> 4 ₁ / <i>a</i>
a, b, c [Å]	11,5860 (3), 13,1750 (3), 10,3408 (2)	12,4565 (1), 7,0328 (1), 36,0053 (4)	6,9029 (1), 29,0996 (2), 7,7759 (1)	12,7940 (2), 6,7959 (2), 35,4637 (7)	12,5511 (2), 7,0708 (1), 37,6949 (3)	21,6543 (1), 21,6543 (1), 13,7732 (2)
α, β, γ [°]	90, 104,461 (3), 90	90, 94,260 (1), 90	90, 104,176 (1), 90	90, 96,805 (2), 90	90, 92,521 (1), 90	90, 90, 90
V [Å ³]	1528,47 (6)	3145,50 (6)	1514,39 (3)	3061,73 (12)	3342,05 (8)	6458,37 (11)
Z	4	8	4	8	8	16
Rodzaj promieniowania	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α
μ [mm ⁻¹]	0,97	0,87	0,74	0,93	0,84	0,64
Wymiary kryształu [mm]	0,6 × 0,1 × 0,1	0,5 × 0,1 × 0,1	0,4 × 0,2 × 0,1	0,5 × 0,15 × 0,15	0,5 × 0,15 × 0,15	0,5 × 0,1 × 0,1
Rejestracja danych						
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	23990, 3206, 2923	37270, 3349, 3112	28158, 3218, 3092	28158, 3218, 3092	61853, 3534, 3377	32882, 3382, 3162
R_{int} ($\sin\theta/\lambda$) _{max} (Å ⁻¹)	0,037 0,636	0,049 0,637	0,035 0,637	0,035 0,637	0,092 0,638	0,036 0,636
Udokładnianie						
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,033, 0,092, 1,05	0,031, 0,086, 1,04	0,034, 0,090, 1,04	0,034, 0,090, 1,04	0,042, 0,120, 1,04	0,036, 0,091, 1,05
Liczba refleksów	3206	3349	3218	3218	3534	3382
Liczba parametrów	227	238	229	229	246	209
Liczba ograniczeń	0	0	3	0	3	0
$\Delta_{\text{max}}, \Delta_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,32, -0,29	0,26, -0,24	0,33, -0,21	0,33, -0,21	0,29, -0,38	0,26, -0,19

Dane krystalograficzne	87	93	101	116	118
Wzór sumaryczny	C ₁₅ H ₁₇ N ₇ O ₂ S	C ₁₃ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	C ₁₇ H ₁₉ N ₆ O _{2.50}	C ₁₁ H ₈ ClN ₅ O ₃	C ₁₈ H ₂₁ N ₅
M_r	359,41	303,71	347,38	293,67	307,40
Układ krystalograficzny	jednoskośny	Trójskośny	jednoskośny	jednoskośny	rombowy
Gupa przestrzenna	$P2_1/c$	$\bar{P}1$	$I2/a$	$P2_1$	$Pbca$
a, b, c [Å]	12,9666 (4), 15,1870 (4), 8,4783 (2)	7,4809 (2), 7,5596 (3), 12,9084 (3)	12,17019 (9), 7,42655 (4), 35,8022 (2)	3,6920 (1), 10,7050 (2), 15,2430 (3)	12,4638 (6), 9,8511 (9), 26,4867 (9)
α, β, γ [°]	90, 103,470 (2), 90	87,350 (2), 80,661 (2), 64,176 (3)	90, 94,4994 (6), 90	90, 92,387 (2), 90	90, 90, 90
V [Å ³]	1623,65 (8)	648,15 (4)	3225,92 (3)	601,92 (2)	3252,1 (4)
Z	4	2	8	2	8
Rodzaj promieniowania	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α	CuK α
μ [mm ⁻¹]	2,01	2,74	0,83	2,99	0,61
Wymiary kryształu [mm]	0,5 × 0,2 × 0,2	0,30 × 0,20 × 0,15	0,69 × 0,39 × 0,17	0,40 × 0,10 × 0,10	0,5 × 0,15 × 0,15
Rejestracja danych					
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	23507, 3297, 3050	13604, 2646, 2455	49585, 3400, 3343	32350, 2587, 2552	47446, 3385, 3051
R_{int}	0,042	0,030	0,025	0,109	0,045
$(\sin\theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,636	0,636	0,636	0,637	0,636
Udokładnianie					
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,029, 0,079, 1,05	0,031, 0,087, 1,03	0,035, 0,093, 1,07	0,037, 0,096, 1,14	0,034, 0,094, 1,05
Liczba refleksów	3297	2646	3400	2587	3385
Liczba parametrów	227	190	235	181	209
Liczba ograniczeń	0	0	0	1	0
$\Delta_{max}, \Delta_{min}$ (e Å ⁻³)	0,27, -0,33	0,34, -0,29	0,26, -0,27	0,64, -0,33	0,22, -0,23

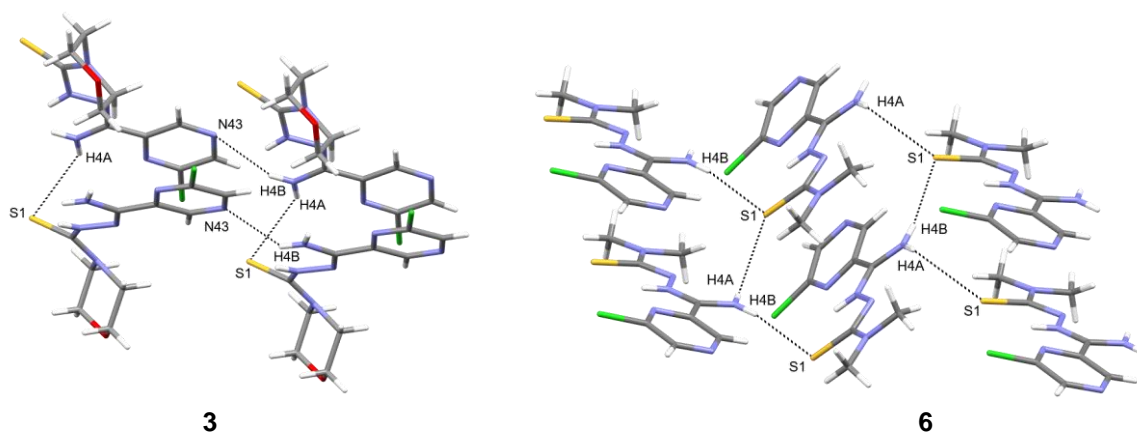
4.2.1 Analiza strukturalna pochodnych tiosemikarbazonowych

Pierwszą grupą poddaną analizie rentgenograficznej były pochodne o strukturze tiosemikarbazonu. Spośród serii 2,6-dipodstawionych pochodnych pirazyny uzyskano 8 struktur krystalicznych.

Ze względu na fakt, iż związki numer **3** i **6** różniące się jedynie podstawieniem w łańcuchu tiosemikarbazonowym wykazały skrajną wartość aktywności przeciwpłatkowej, wynoszącą odpowiednio 512 µg/ml oraz 0,5–1 µg/ml (podrozdział 5.1), postanowiono wykonać ich analizę porównawczą. Przedstawione zestawienie związków pozwoliło potwierdzić założoną w celu pracy hipotezę badawczą. Dowiedziono bowiem, iż każdy z nich wykrył w innej odmianie tautomerycznej, o czym wspomiano już w podrozdziale 4.1.1. Związek **3** przyjmuje mniej preferowaną energetycznie formę neutralną, w której labilny atom wodoru zlokalizowany jest przy atomie azotu N2. Struktura ta stabilizowana jest przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe pomiędzy grupą aminową pełniącą rolę grupy donorowej a atomem azotu pierścienia pirazyny będącego akceptorem protonu (N4—H4A···N46) (Rys. 38). Płaski układ głównego fragmentu cząsteczki zaburzony jest przez wychylenie atomu siarki. Natomiast związek **6** wykazuje budowę zwitterionową, z protonem w pozycji N3 atomu azotu, zdolną do przyjmowania konformacji planarnej. Planarność cząsteczki utrzymywana jest dzięki obecności dwóch silnych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, w których atom azotu N3 jest donorem protonu, a atom siarki (N3—H3···S1) oraz atom azotu pierścienia pirazyny (N3—H3···N46) jego akceptorem (Rys. 38). Wewnątrzcząsteczkowe wiązanie typu N3—H3···S1 opisywane jest zgodnie z teorią grafów Bernsteina jako S(5). Tworzenie kontaktów wodorowych tego typu możliwe jest poprzez następujący obrót pierścienia heteroaromatycznego, czego skutkiem jest ustawienie się atomu azotu pierścienia pirazyny (N46) po stronie grupy –NH oraz obrót wzdłuż wiązania N2-C1 o 180°.



Obie struktury zawierają w niezależnej części komórki elementarnej po jednej cząsteczce biorącej udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. W kryształach pochodnej **3** obecne są pierścieniowe układy wiązań wodorowych ($R_4^4(24)$), w których rolę donora odgrywa grupa $-\text{NH}_2$ a atom azotu pierścienia pirazyny ($\text{N4}-\text{H4B}\cdots\text{N43}$) lub atom siarki ($\text{N4}-\text{H4}\cdots\text{S1}$) jest jego akceptorem (Rys. 39, Tabela 6). W innym układzie pierścieniowym, opisywanym tym samym deskryptorem, donorem wiązania wodorowego do atomu azotu pierścienia pirazyny jest atom azotu N2 ($\text{N2}-\text{H2}\cdots\text{N43}$), a do atomu siarki grupa $-\text{NH}_2$ ($\text{N4}-\text{H4}\cdots\text{S1}$). Natomiast w związku **6** wiązania wodorowe typu $\text{N4}-\text{H4}\cdots\text{S1}$ ($C(7)$) formują układ łańcuchowy (Rys. 39, Tabela 7).



Rys. 39 Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe związku **3** i **6**

Tabela 6. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku **3**

D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N4—H4B \cdots N43 ⁱ	0,86	2,53	3,2577 (19)	142,6
N4—H4B \cdots N43 ⁱⁱ	0,86	2,59	3,222 (2)	130,9
N4—H4A \cdots S1 ⁱⁱⁱ	0,86	2,91	3,4780 (15)	125,5
N2—H2 \cdots N43 ⁱⁱ	0,86	2,58	3,299 (2)	141,6

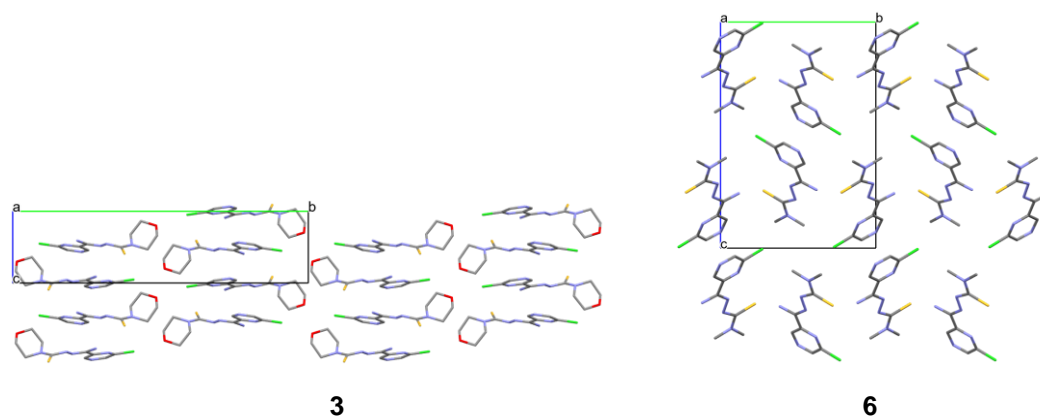
Kod symetrii: (i) $x-1, y, z$; (ii) $x-1, -y+1/2, z-1/2$; (iii) $x, -y+1/2, z-1/2$.

Tabela 7. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku **6**

D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N3—H3 \cdots S1	0,88	2,36	2,8405 (10)	114,3
N4—H4A \cdots S1 ⁱ	0,88	2,96	3,5265 (10)	124,0
N4—H4B \cdots S1 ⁱⁱ	0,88	2,47	3,2857 (10)	154,4

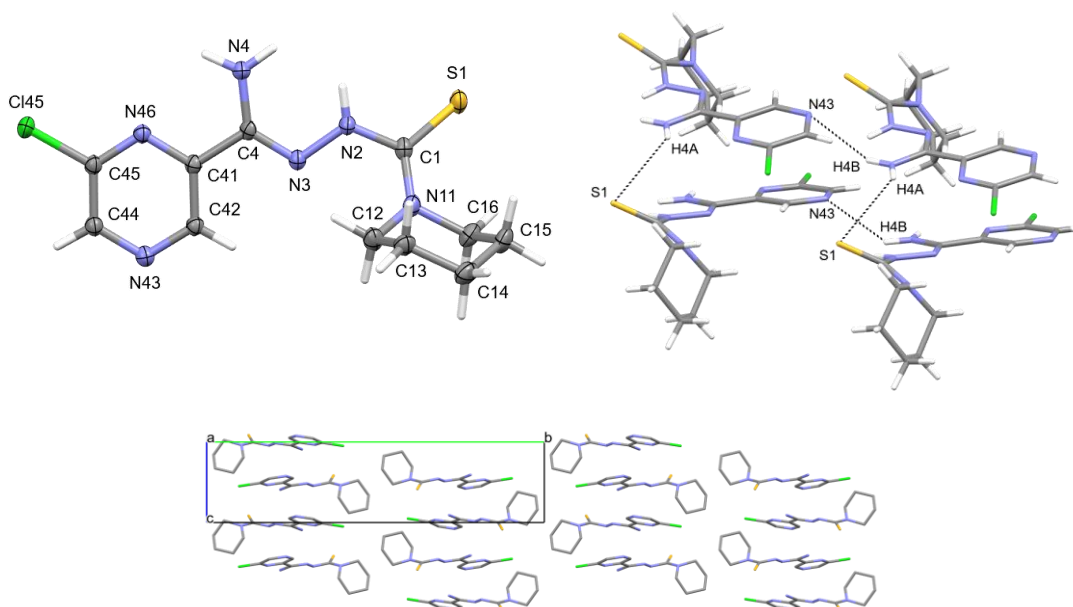
Kod symetrii: (i) $-x+3/2, y+1/2, -z+3/2$; (ii) $-x+1/2, y+1/2, -z+3/2$.

Mimo różnic w konformacji oraz systemie wiązań wodorowych obserwujemy takie samo upakowanie warstwowe dla obu struktur. Cząsteczki zorientowane są głowa-do-ogona (Rys. 40).

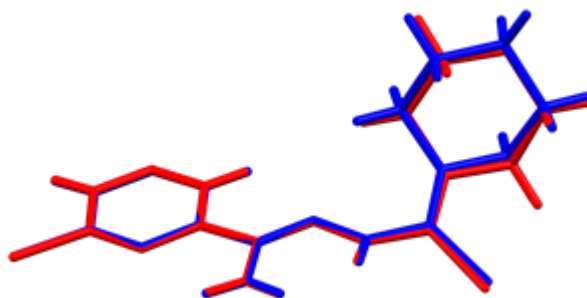


Rys. 40 Upakowanie cząsteczek związku **3** i **6** w strukturze krystalicznej

Interesujący jest fakt, iż związek **5**, który również krystalizuje w formie neutralnej, w przeciwieństwie do nieaktywnego związku **3**, hamuje wzrost prątków gruźlicy w stężeniu 2 µg/ml. Co więcej, nie zauważono żadnych znaczących różnic w tworzonych przez nie systemach wiązań wodorowych, upakowaniu cząsteczek czy po nałożeniu cząsteczek (Rys. 41, Rys. 42, Tabela 8).



Rys. 41 Struktura krystaliczna, schemat wiązań wodorowych i upakowanie w kryształach związku **5**



Rys. 42 Nałożenie cząsteczek związku 3 (kolor czerwony) i 5 (kolor niebieski)

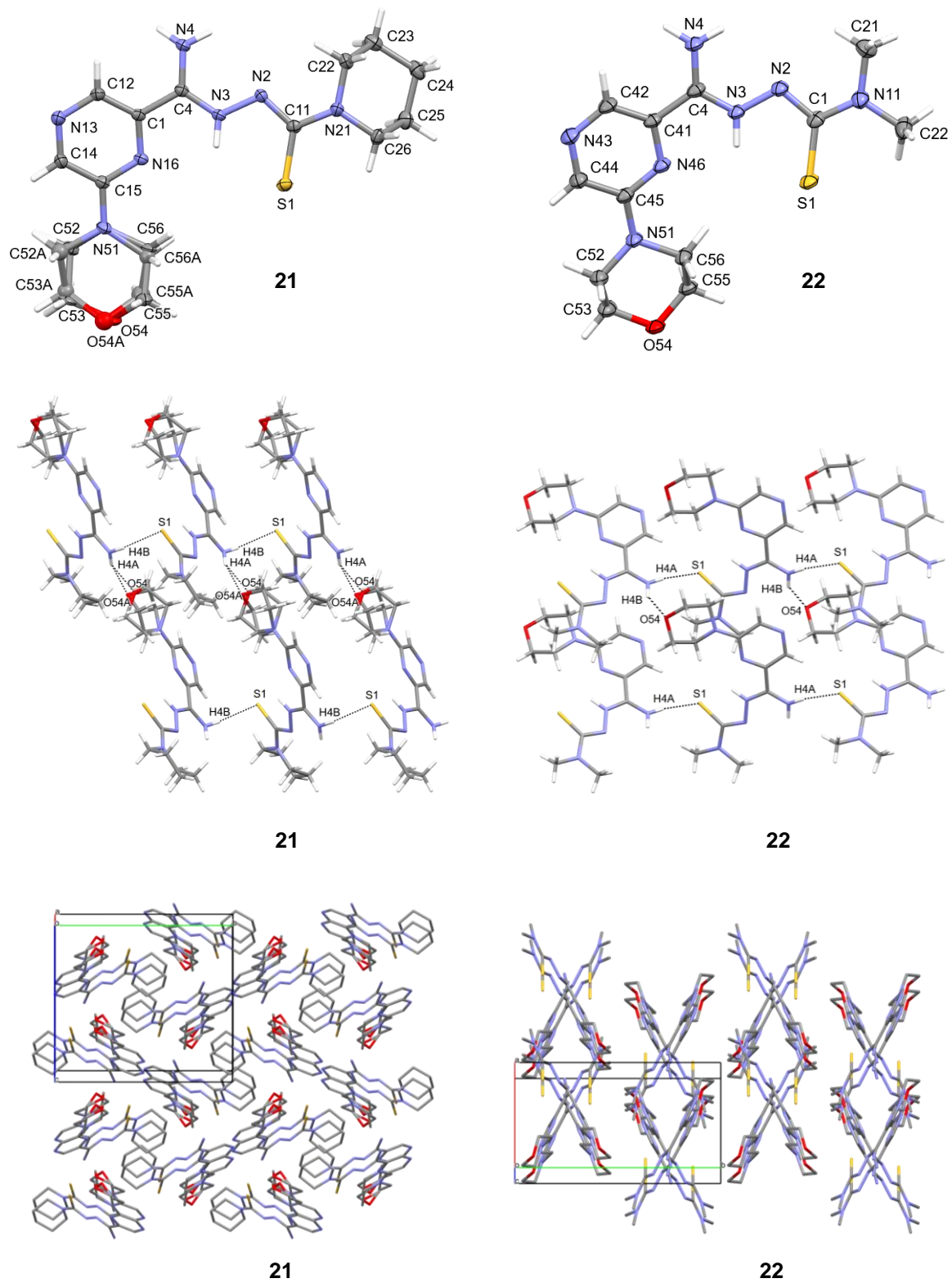
Tabela 8. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 5

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N2—H2···N43 ⁱ	0,88	2,57	3,306 (3)	141,7
N4—H4B···N43 ⁱⁱ	0,88	2,55	3,272 (3)	139,9
N4—H4B···N43 ⁱⁱⁱ	0,88	2,59	3,267 (3)	133,9
N4—H4A···S1 ⁱⁱ	0,88	2,97	3,537 (2)	123,5

Kod symetrii: (i) $x-1, -y+3/2, z-1/2$; (ii) $x-1, y, z$; (iii) $x, -y+3/2, z-1/2$.

Wszystkie pozostałe cząsteczki tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny występowały w stanie krystalicznym w formie jonu obojnaczego i podobnie jak w przypadku związku 3 za ich stabilizację odpowiedzialne były wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe typu N3—H3···S1 wypłaszczające główny fragment cząsteczki.

Struktura krystaliczna związku 21 i 22 ujawnia występowanie wiązań wodorowych N4—H4···S1 tworzących nieskończone łańcuchy (Rys. 43, Tabela 9, Tabela 10). Dodatkowo zaobserwowano międzycząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy donorową grupą aminową a atomem tlenu pierścienia morfolinowego pełniącym rolę akceptora (N4—H4···O54). Zgodnie z teorią grafów wodorowych wiązania te można opisać kolejno deskryptorami C(7) i C(10). Wiązania wodorowe stabilizują warstwowe upakowanie cząsteczek (Rys. 43). W przypadku związku 21 obserwacja elipsoid termicznych wskazuje na nieuporządkowanie układu morfolinowego.



Rys. 43 *Struktura krystaliczna, międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek związku 21 i 22*

Tabela 9. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **21**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,88	2,34	2,8330(10)	115,7
N4—H4A···O54 ⁱ	0,856(16)	2,082(16)	2,8123(15)	142,8(14)
N4—H4A···O54 ⁱ	0,856(16)	2,143(18)	2,961(8)	159,9(14)
N4—H4B···S ⁱⁱ	0,907(16)	2,481(16)	3,3616(11)	163,7(13)

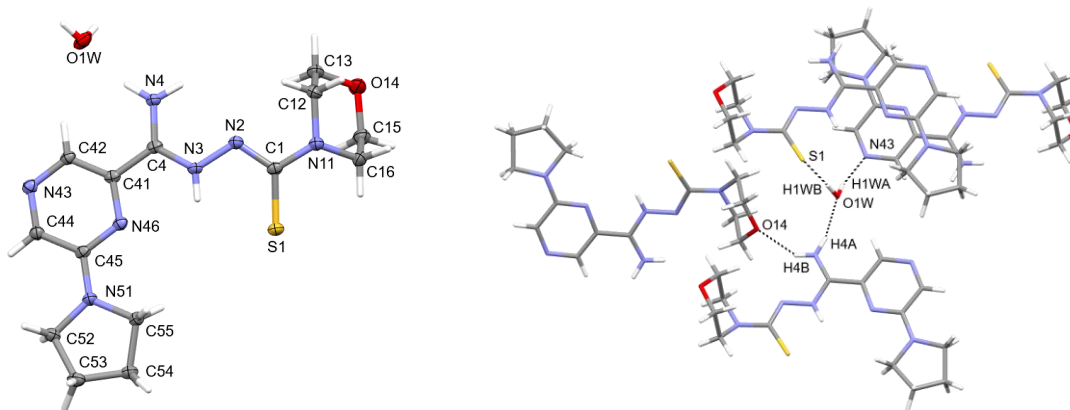
Kod symetrii: (i) $x+1, -y+1/2, z+1/2$; (ii) $x, -y+1/2, z+1/2$.

Tabela 10. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **22**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,910 (18)	2,281 (18)	2,8087 (11)	116,5 (13)
N4—H4A···S1 ⁱ	0,91 (2)	2,44 (2)	3,3497 (13)	172,3 (16)
N4—H4B···O54 ⁱⁱ	0,85 (2)	2,25 (2)	2,9888 (16)	145,9 (18)

Kod symetrii: (i) $x, -y+1/2, z+1/2$; (ii) $x+1, -y+1/2, z+1/2$.

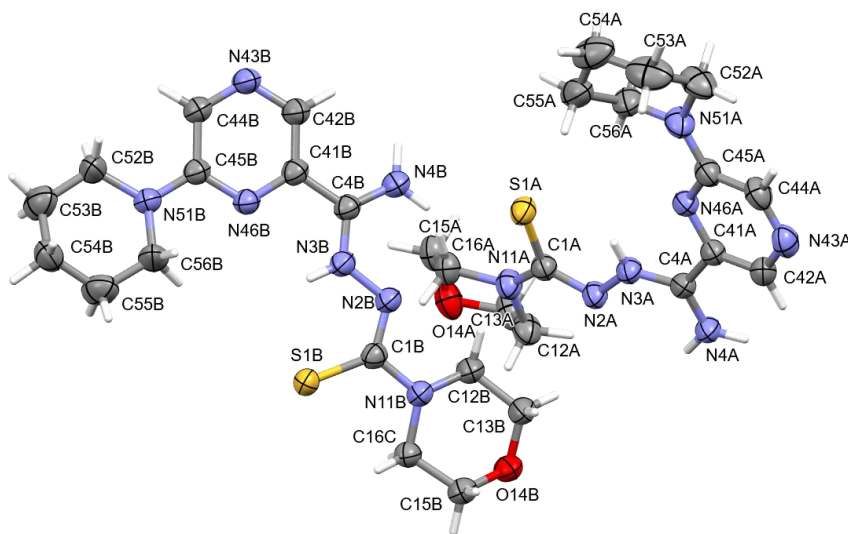
Związek **23** wykrył w formie monohydratu. Cząsteczka wody jest dwukrotnie donorem wiązania wodorowego: z atomem azotu pierścienia pirazyny (O1W—H1W···N43) oraz atomem siarki (O1W—H1W···S1) ($D_4^4(22)$), jak również akceptorem grupy aminowej (N4—H4···O1W). Drugim akceptorem protonu z grupy aminowej jest atom tlenu pierścienia morfolinowego (N4—H4···O14) ($D_3^3(19)$) (Rys. 44, Tabela 11).

**Rys. 44** Struktura krystaliczna oraz międzycząsteczkowe wiązania wodorowe związku **23****Tabela 11.** Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **23**

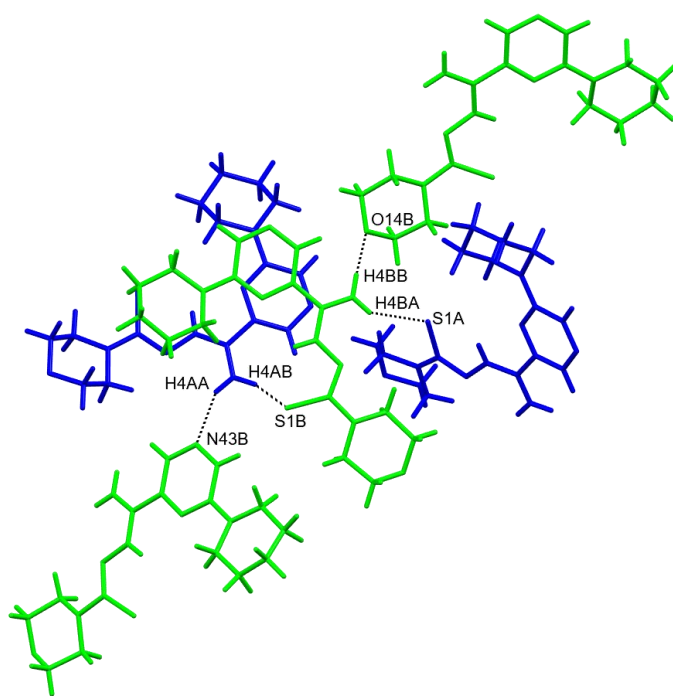
D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1W—H1WA···N43 ⁱ	0,77 (4)	2,07 (4)	2,826 (2)	164 (3)
O1W—H1WB···S1 ⁱⁱ	0,90 (4)	2,44 (4)	3,3354 (18)	175 (3)
N3—H3···S1	0,85 (3)	2,39 (3)	2,8691 (17)	116 (2)
N4—H4A···O1W ⁱ	0,88 (3)	1,93 (3)	2,786 (2)	163 (3)
N4—H4B···O14 ⁱⁱⁱ	0,86 (3)	2,19 (3)	2,921 (2)	142 (2)

Kod symetrii: (i) $-x, -y+2, -z+1$; (ii) $x-1, y, z$; (iii) $-x+1/2, y+1/2, -z+1/2$.

W przypadku związku **27**, w części niezależnej komórki elementarnej znajdują się dwie cząsteczki (Rys. 45). W cząsteczce A grupa aminowa pełni funkcję donora do atomu azotu pierścienia pirazyny (N4A—H4A···N43B) oraz atomu siarki (N4A—H4A···S1B) cząsteczki B. Natomiast w cząsteczce B akceptorem protonu z tej samej grupy jest atom tlenu pierścienia morfolinowego drugiej cząsteczki B (N4B—H4B···O14B) lub atom siarki cząsteczki A (N4B—H4B···S1A) (Rys. 46, Tabela 12). Duże elipsoidy drgań atomów wskazują na częściowe nieuporządkowanie cząsteczek.



Rys. 45 Projektcja (ORTEP) związku **27**

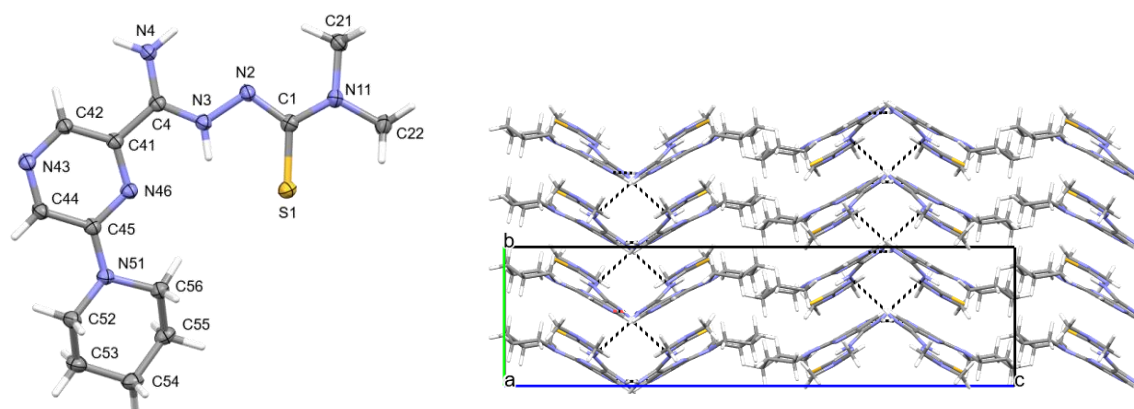


Rys. 46 Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe związku **27**

Tabela 12. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **27**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3A—H3A···S1A	0,88	2,27	2,792 (2)	117,8
N3B—H3B···S1B	0,88	2,40	2,860 (2)	113,2
N4A—H4AA···N43B ⁱ	0,88	2,20	2,972 (3)	145,7
N4A—H4AB···S1B ⁱⁱ	0,88	2,77	3,391 (2)	128,6
N4B—H4BA···S1A	0,88	2,48	3,243 (2)	145,2
N4B—H4BB···O14B ⁱⁱⁱ	0,88	2,27	3,065 (3)	150,6

Rysunek 47 przedstawia strukturę krystaliczną związku **30**. Cząsteczki połączone są poprzez międzycząsteczkowe wiązania wodorowe między grupą aminową oraz atomem azotu pierścienia pirazyny (N4—H4B···N43) lub atomem azotu N2 (N4—H4A···N2), tworząc nieskończone łańcuchy (wstęgi) (Rys. 47, Tabela 13). Zgodnie z teorią grafów wodorowych, wiązania te opisane są odpowiednio jako C(6) i C(5).

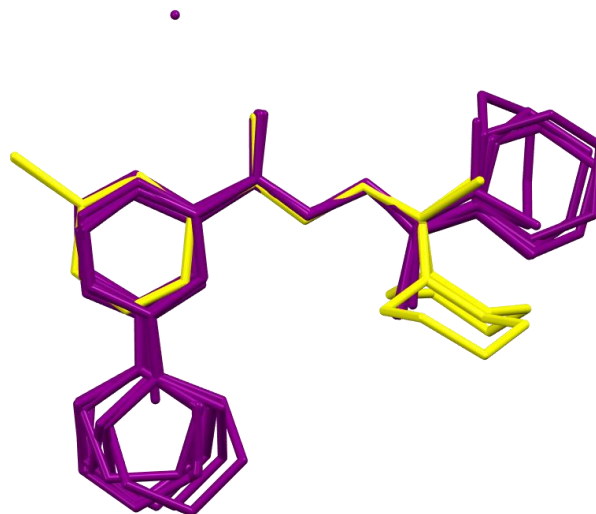
**Rys. 47** Struktura krystaliczna oraz upakowanie cząsteczek związku **30****Tabela 13.** Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **30**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,916 (18)	2,223 (17)	2,8029 (11)	120,7 (14)
N4—H4B···N43 ⁱ	0,88	2,06	2,8825 (15)	154,4
N4—H4A···N2 ⁱⁱ	0,88	2,54	3,3651 (16)	155,6

Kod symetrii: (i) $x+1/2, y, -z+1/2$; (ii) $-x+1, y-1/2, -z+1/2$.

Nałożenie struktur 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny po fragmencie N4(H₂)-C4-N3-N2-C1(S) przedstawiono na rysunku 48. Jedynie związki w postaci jonu obojnaczego przyjmują wydłużoną formę. Widoczny jest również wspomniany obrót pierścienia heteroaromatycznego oraz obrót wzdłuż wiązania N2-C1. Atomy chloru oraz siarki związków przyjmujących formę neutralną ustawiają się po przeciwnej stronie w porównaniu z pochodnymi krystalizującymi w formie

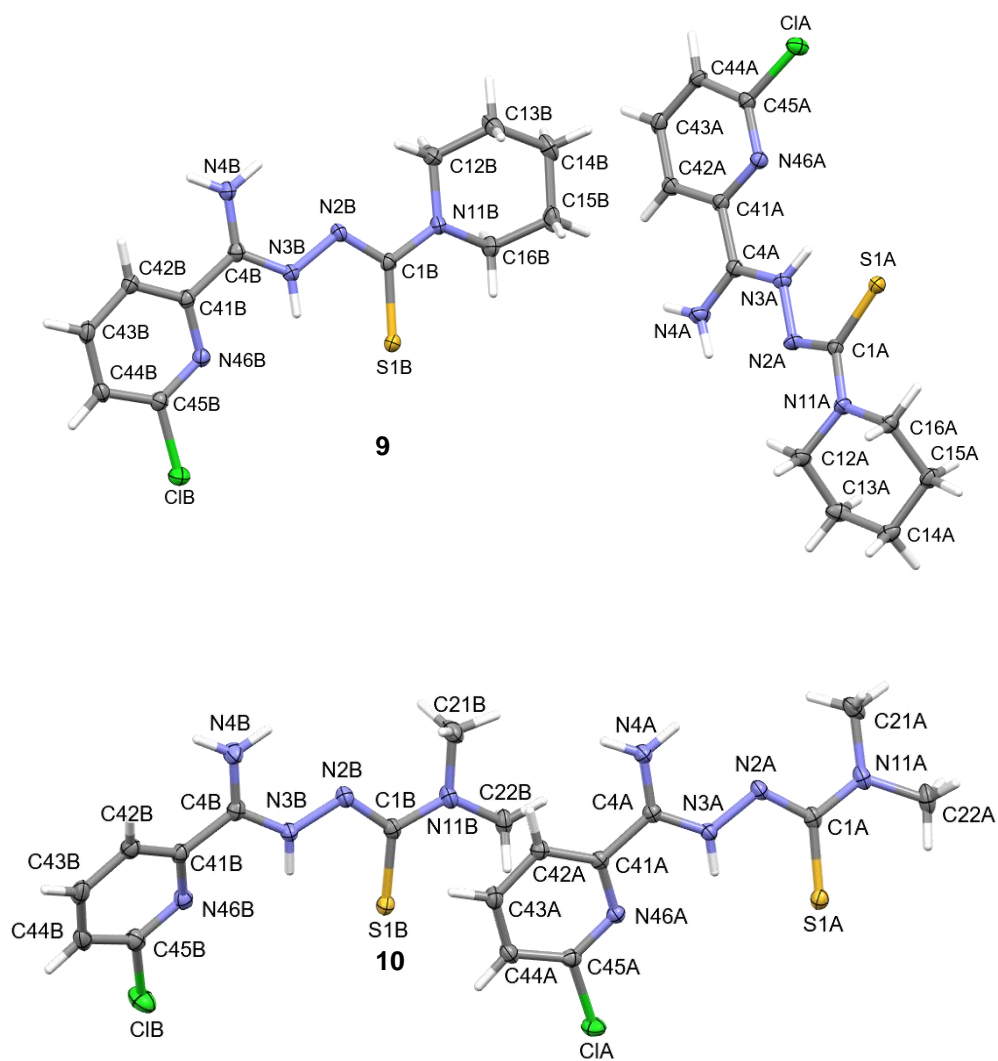
zwitterionowej. Ponadto zauważalne jest zaburzenie planarności głównego fragmentu cząsteczek w formie obojętnej wywołane przez odchylenie atomu siarki.



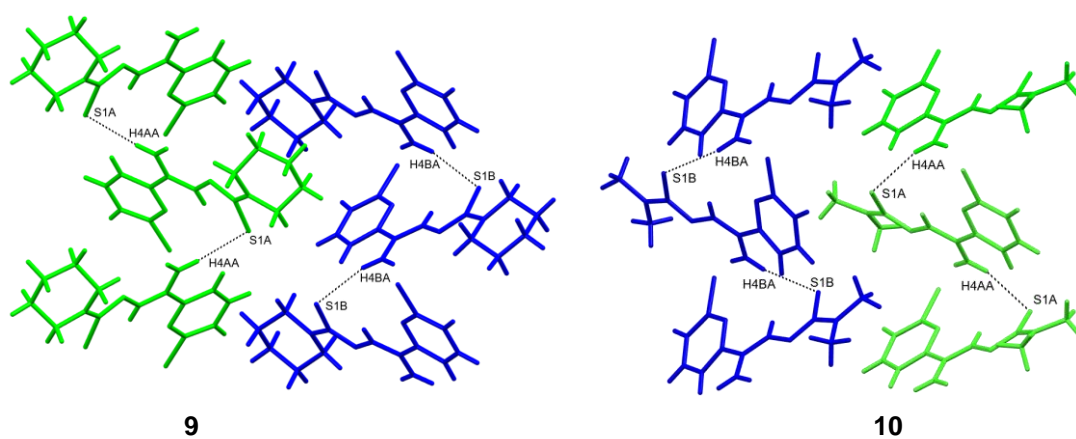
Rys. 48 *Nalozenie struktur krystalicznych 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (kolor żółty – forma neutralna, kolor purpurowy – forma zwitterionowa)*

Kolejna seria – 2,6-dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirydyny, która zostanie omówiona pod kątem krystalograficznym liczyła 12 związków. Wszystkie związki w stanie krystalicznym charakteryzowały się odmianą zwitterionową, w której wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe $N3-H3 \cdots S1$ (S(5)) odpowiadały za planarną konformację cząsteczek.

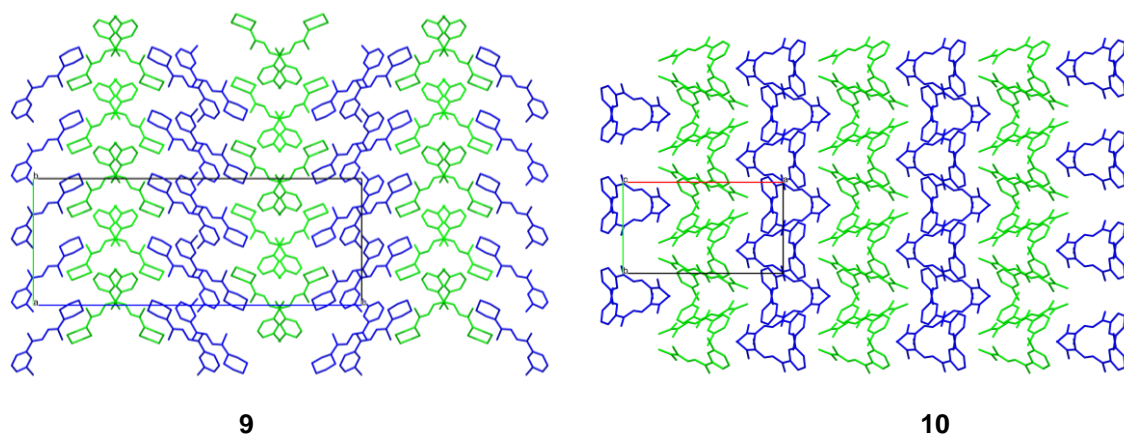
W kryształach pochodnych **9** i **10**, w części niezależnej komórki elementarnej obecne są 2 cząsteczki (Rys. 49). W obu przypadkach obserwujemy tworzenie tych samych schematów wiązań wodorowych. Cząsteczki A, tak samo jak cząsteczki B tworzą między sobą łańcuchowe wiązania wodorowe typu $N4-H4 \cdots S1$. Ponadto, pomiędzy cząsteczkami A związku **9** tworzą się wiązania wodorowe, w których atom chloru jest akceptorem wodoru z grupy aminowej (Rys. 50, Tabela 14, Tabela 15). Są to typy łańcucha scharakteryzowane jako C(7) zgodnie z teorią grafów wiązań wodorowych. W całej strukturze łańcuchy tworzą ułożenie równoległe, co obrazuje schemat upakowania cząsteczek w komórce elementarnej (Rys. 51).



Rys. 49 Model ORTEP związku 9 i 10



Rys. 50 Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe związku 9 i 10



Rys. 51 Upakowanie cząsteczek związku 9 i 10

Tabela 14. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 9

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3B—H3B···S1B	0,88	2,34	2,8275 (11)	115,3
N3A—H3A···S1A	0,88	2,40	2,8544 (11)	112,6
N4B—H4BA···S1B ⁱ	0,88	2,49	3,3418 (11)	162,4
N4A—H4AB···ClA ⁱⁱ	0,88	2,60	3,3706 (11)	146,8
N4A—H4AA···S1A ⁱⁱⁱ	0,88	2,52	3,3725 (11)	164,5

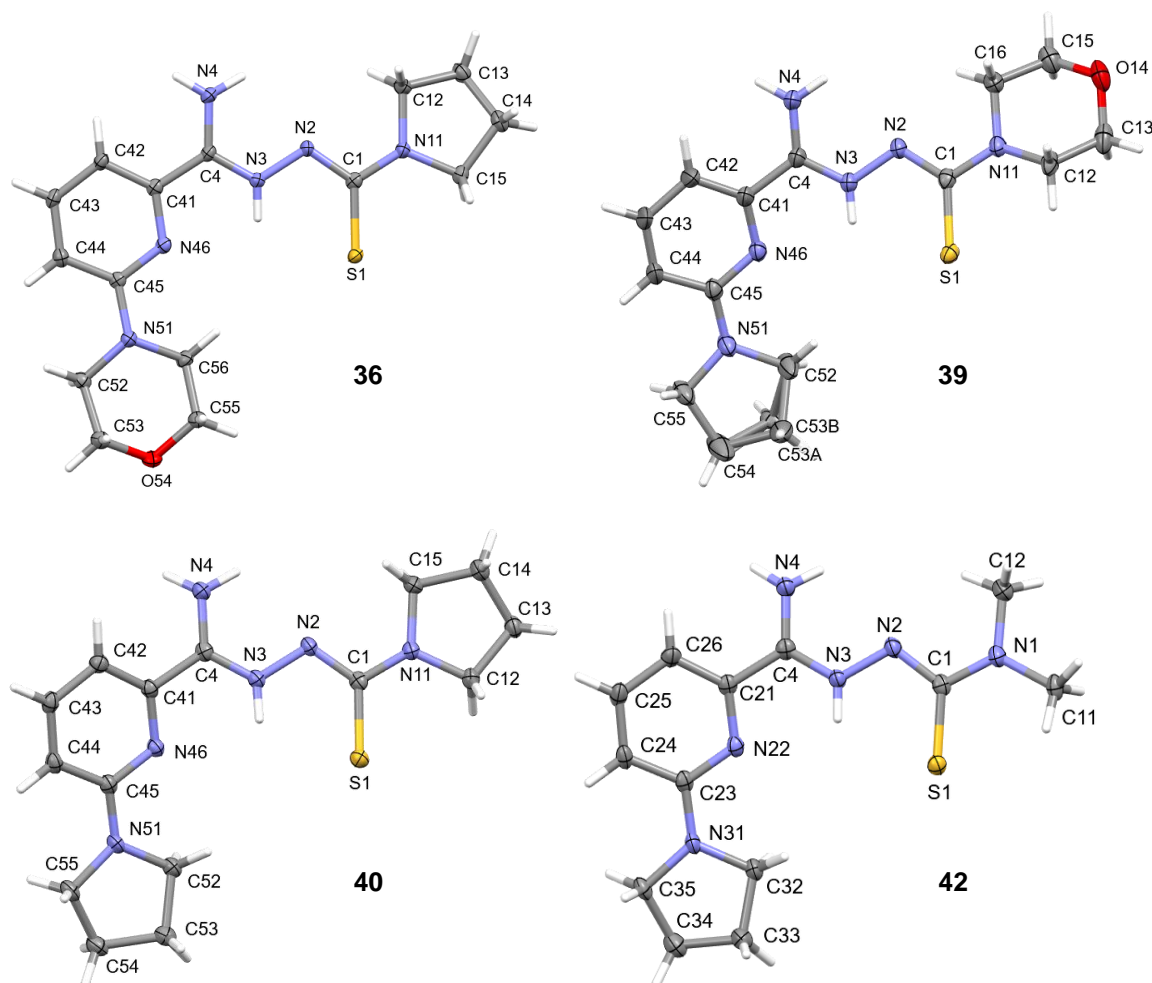
Kod symetrii: (i) $x+1/2, -y+1/2, -z+1$; (ii) $-x+1/2, y-1/2, z$; (iii) $x-1/2, y, -z+1/2$.

Tabela 15. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 10

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3B—H3B···S1B	0,88	2,31	2,8225 (12)	116,8
N3A—H3A···S1A	0,88	2,34	2,8373 (11)	115,5
N4A—H4AA···S1A ⁱ	0,88	2,51	3,3606 (12)	163,2
N4B—H4BA···S1B ⁱⁱ	0,88	2,54	3,3862 (12)	162,7

Kod symetrii: (i) $-x+1, y+1/2, -z+1/2$; (ii) $-x, y+1/2, -z+1/2$.

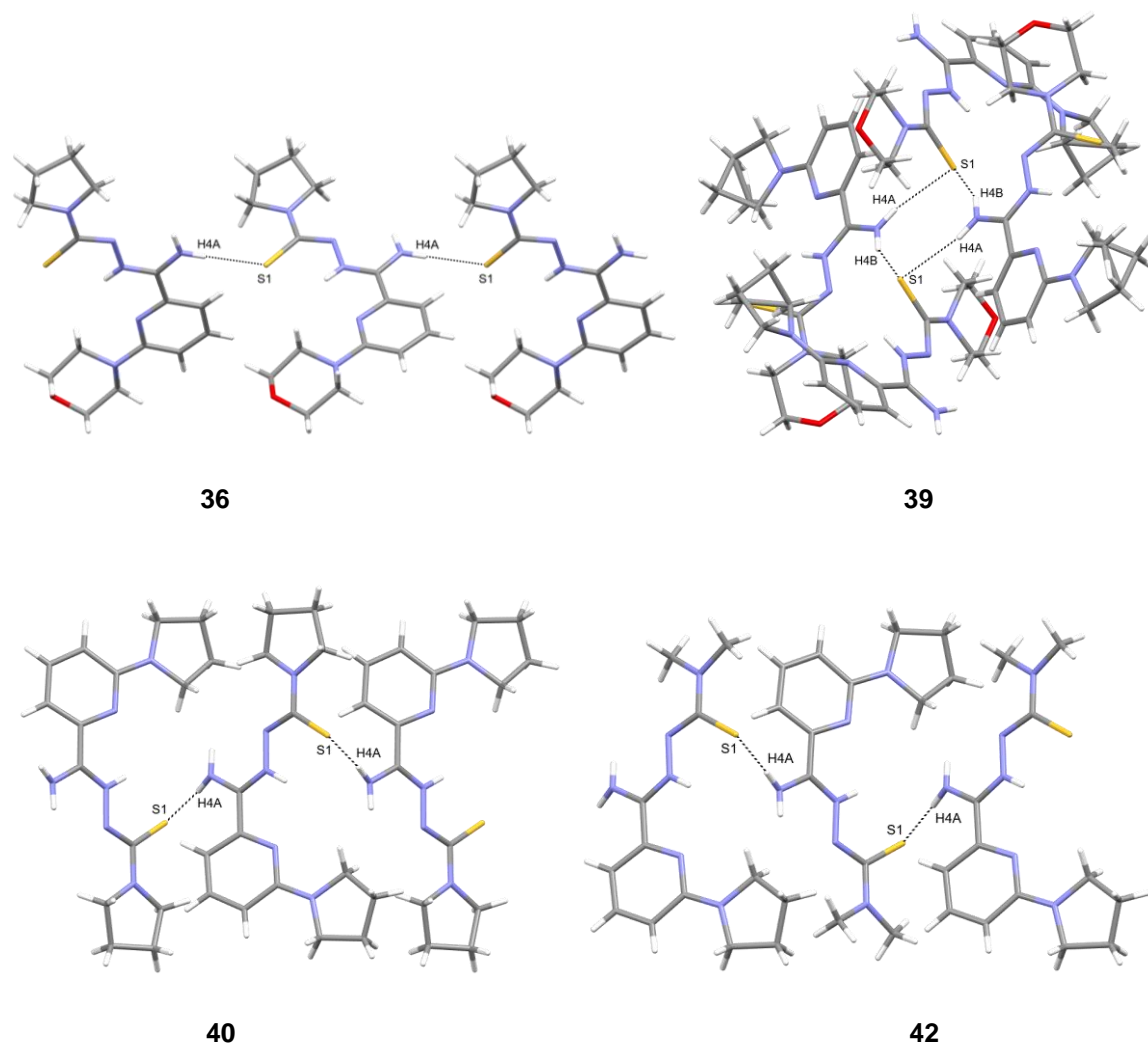
Związki **36**, **39**, **40** i **42** wykryły z jedną cząsteczką w części niezależnej (Rys. 52). Układ pirolidynowy związku **39** charakteryzuje się nieuporządkowaniem.



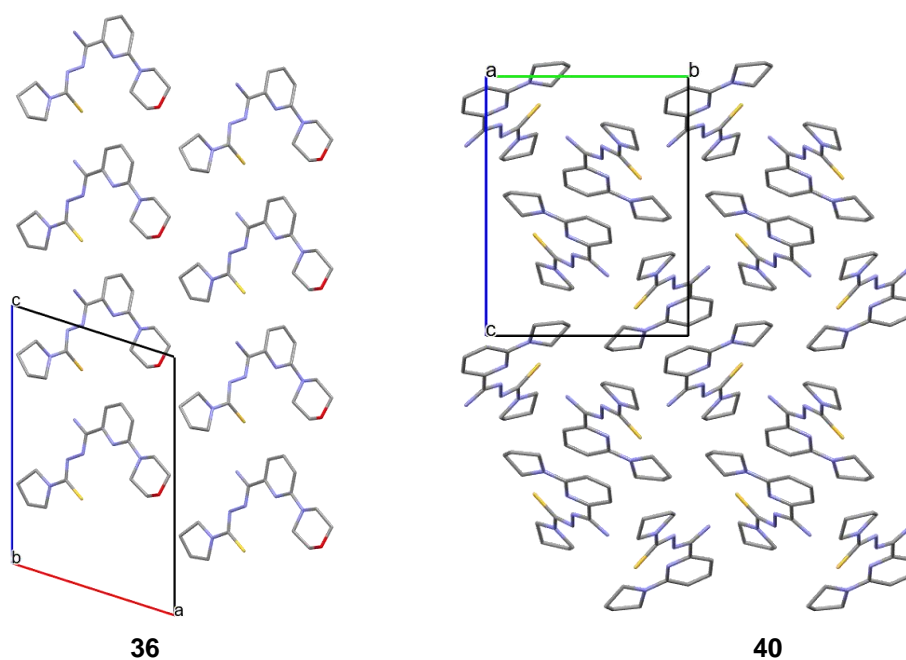
Rys. 52 Struktura krystaliczna związków **36**, **39**, **40**, **42**

Typem układu wiązań wodorowych występującym w kryształach związków **36**, **40** i **42** jest układ łańcuchowy. W tworzeniu łańcuchów, które można opisać zgodnie z teorią grafów wodorowych jako C(7), biorą udział atomy N4—H4 \cdots S1. Każda z cząsteczek występuje w nich zarówno w charakterze donora, jak i akceptora (Rys. 53). Wzajemne ułożenie molekuł można określić jako równoległe w przypadku związku **36**, natomiast antyrównoległe w przypadku związków **40** i **42**. Taki typ oddziaływań międzycząsteczkowych wpływa na warstwowe upakowanie cząsteczek (Rys. 54). Dodatkowym aspektem dla kryształu związku **42** jest występowanie oddziaływań typu N—H \cdots π oraz π — π pomiędzy cząsteczkami ułożonymi równoległe. Wiązania wodorowe typu N—H \cdots π charakteryzują się odległością, wynoszącą 3,587 Å pomiędzy atomem

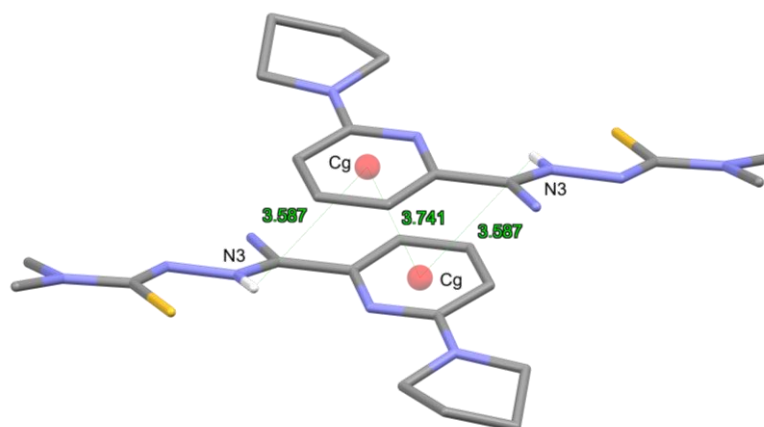
wodoru H3 a środkiem ciężkości (Cg) pierścienia aromatycznego sąsiedniej cząsteczki. Odległość pomiędzy centroidami, definiowana jako oddziaływanie π - π , wynosi 3,741 Å (Rys. 55). W strukturze krystalicznej związku **39** obecne są natomiast rozwidlone wiązania wodorowe typu N4—H4 \cdots S1 \cdots H4—N4. Tworzący się układ pierścieniowy przedstawiony na rysunku 52 opisywany jest grafem $R_4^2(8)$. Geometrię wiązań wodorowych omawianych związków zebrano w tabelach 16–19.



Rys. 53 Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe związku **36**, **39**, **40**, **42**



Rys. 54 Warstwowe upakowanie cząsteczek związku 36 i 40



Rys. 55 Odległości charakteryzujące oddziaływania $N-H\cdots\pi$ oraz $\pi-\pi$ w kryształach związku 42

Tabela 16. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku 36

D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N3—H3 \cdots S1	0,88 (3)	2,44 (3)	2,883 (2)	112 (2)
N4—H4A \cdots S1 ⁱ	0,88	2,51	3,296 (2)	149,8

Kod symetrii: (i) $x, -y+1, x+1/2$.

Tabela 17. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku 39

D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N3—H3 \cdots S1	0,86 (2)	2,43 (2)	2,8734 (12)	112,4 (18)
N4—H4A \cdots S1 ⁱ	0,87 (2)	2,55 (2)	3,3997 (13)	167 (2)
N4—H4B \cdots S1 ⁱⁱ	0,87 (2)	2,68 (2)	3,4601 (13)	150 (2)

Kod symetrii: (i) $-y+4/3, x-y+2/3, z-1/3$; (ii) $y-1/3, -x+y+1/3, -z+4/3$.

Tabela 18. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **40**

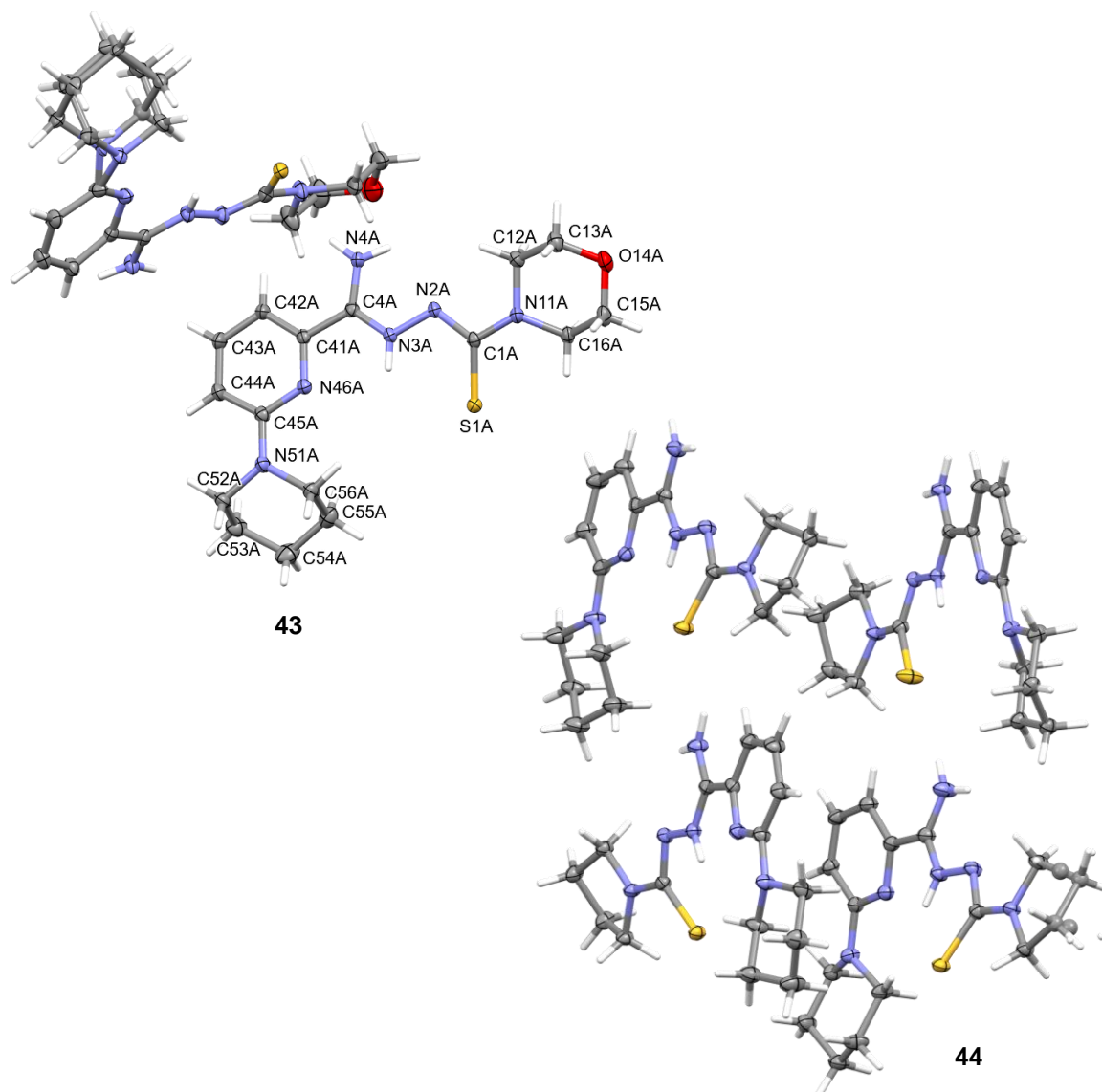
D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,89 (2)	2,392 (19)	2,8874 (13)	115,3 (15)
N4—H4A···S1 ⁱ	0,89 (2)	2,45 (2)	3,3295 (13)	171,8 (17)

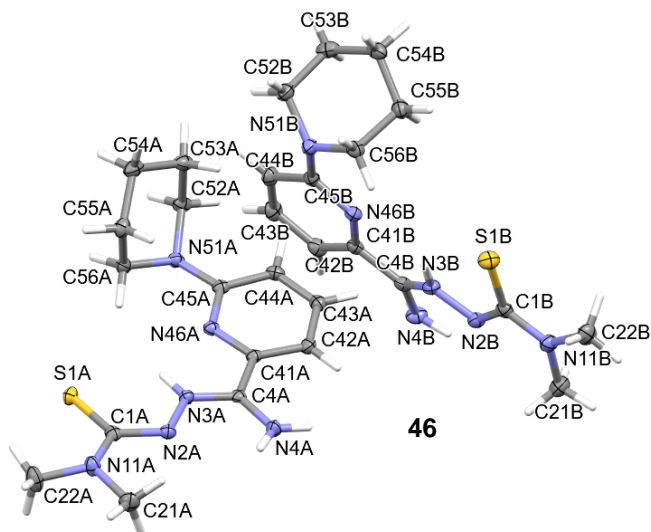
Kod symetrii: (i) $-x+3/2, y-1/2, -z+1/2$.**Tabela 19.** Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **42**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4A···S1 ⁱ	0,90 (2)	2,44 (2)	3,3250 (14)	170,1 (19)
N3—H3···S1	0,86 (2)	2,388 (19)	2,8616 (13)	115,2 (15)

Kod symetrii: (i) $-x+1/2, y-1/2, -z+1/2$.

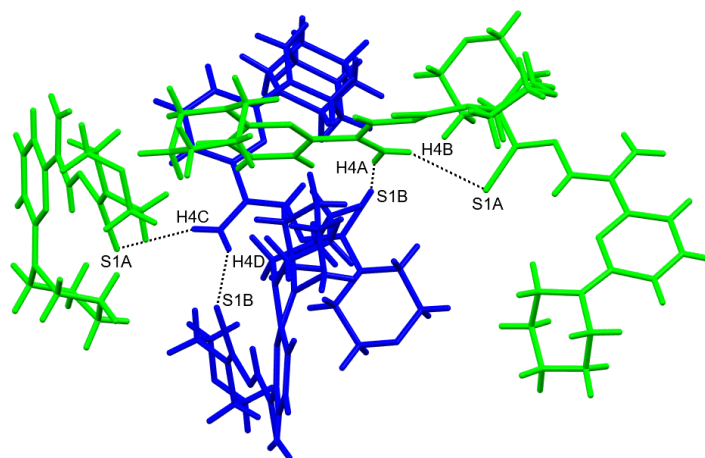
Związek **43** i **46** krystalizował z dwoma cząsteczkami w jednostce asymetrycznej, a związek **44** z czterema (Rys. 56). Zaobserwowano nieuporządkowanie pierścienia piperydynowego w jednej z cząsteczek związku **43**.





Rys. 56 Struktura krystaliczna związku 43, 44 i 46

W kryształach związków **43** formowane są rozgałęzione wiązania wodorowe typu $N4-H4 \cdots S1 \cdots H4-N4$, opisywane grafem $D_3^3(12)$. Biorą w nich udział dwie molekuly tego samego typu i jedna drugiego w obu konfiguracjach (Rys. 57, Tabela 20). W strukturze **44** molekuly A i B oraz molekuly C i D formują łańcuchowe wiązania wodorowe typu $N4-H4 \cdots S1$ ($C_2^2(14)$) wzdłuż kierunku $[110]$. Łańcuchy tworzą warstwy ułożone równoległe do płaszczyzny $(\bar{1}11)$ w kryształach (Rys. 58, Tabela 21). W strukturze **46** jedna z molekuł tworzy dimer poprzez wiązania wodorowe $N4B-H4BA \cdots S1B$ ($R_2^2(14)$), natomiast druga tworzy łańcuchy wiązań wodorowych $N4A-H4AA \cdots S1A$ ($C(7)$), które stabilizują upakowanie cząsteczek w kryształach (Rys. 59, Tabela 22).

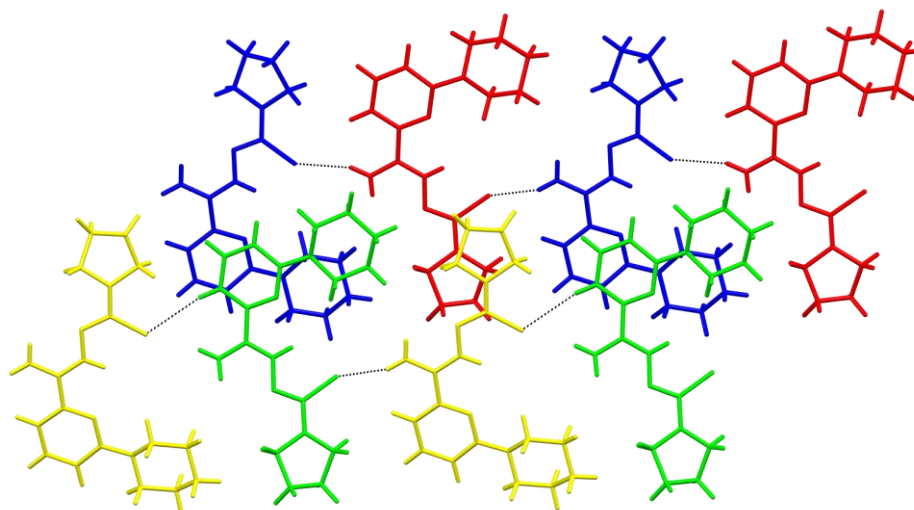


Rys. 57 Schemat wiązań wodorowych w kryształach związku 43

Tabela 20. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **43**

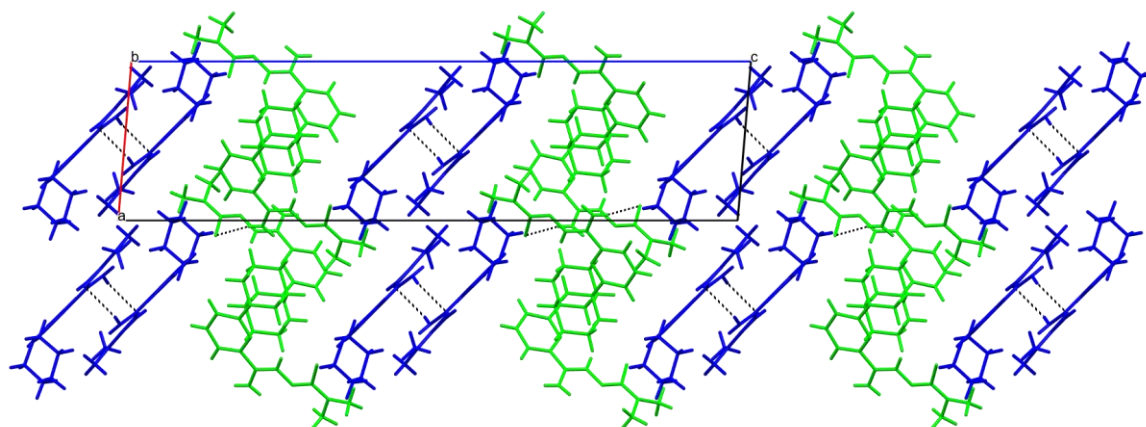
D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3A—H3A···S1A	0,856 (18)	2,475 (18)	2,8923 (12)	110,8 (14)
N4A—H4A···S1B	0,89 (2)	2,49 (2)	3,3485 (13)	164,3 (16)
N4A—H4B···S1A ⁱ	0,84 (2)	2,86 (2)	3,5748 (12)	143,9 (16)
N3B—H3B···S1B	0,871 (19)	2,349 (18)	2,8316 (12)	115,2 (14)
N4B—H4C···S1A ⁱⁱ	0,86 (2)	2,59 (2)	3,4157 (12)	160,3 (17)
N4B—H4D···S1B ⁱⁱⁱ	0,81 (2)	2,58 (2)	3,3085 (13)	150,8 (17)

Kod symetrii: (i) $x-y+2/3, x+1/3, -z+4/3$; (ii) $-y+4/3, x-y+2/3, z-1/3$; (iii) $x-y+1, x, -z+1$.

**Rys. 58** Wiązania wodorowe występujące pomiędzy cząsteczkami związku **44****Tabela 21.** Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **44**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3A—H3A···S1A	0,88 (2)	2,36 (2)	2,8476 (15)	115,3 (18)
N4A—H4AB···S1B	0,88 (3)	2,48 (3)	3,3022 (16)	156 (2)
N3B—H3B···S1B	0,83 (2)	2,35 (2)	2,8530 (15)	120 (2)
N4B—H4BA···S1A ⁱ	0,89 (3)	2,50 (3)	3,3494 (16)	161 (2)
N3C—H3C···S1C	0,89 (2)	2,27 (2)	2,8196 (14)	119,5 (17)
N4C—H4CB···S1D ⁱ	0,90 (3)	2,48 (3)	3,3307 (16)	157 (2)
N3D—H3D···S1D	0,87 (2)	2,35 (2)	2,8551 (15)	117,0 (19)
N4D—H4DA···S1C	0,88 (3)	2,45 (3)	3,2760 (17)	156 (2)

Kod symetrii: (i) $x-1, y-1, z$.



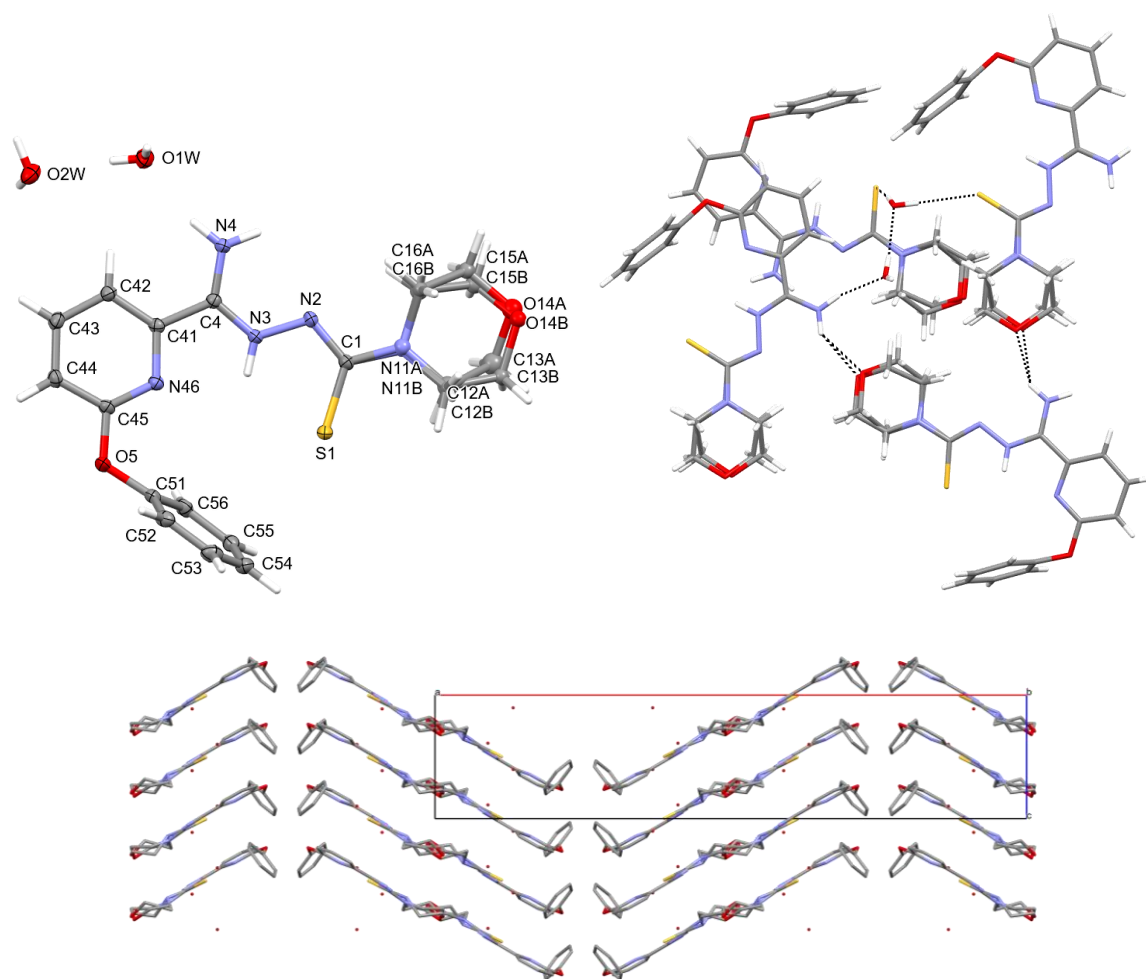
Rys. 59 Upakowanie cząsteczek w kryształach związku 46

Tabela 22. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 46

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3B—H3B···S1B	0,87 (3)	2,35 (3)	2,841 (2)	116 (2)
N4B—H4BA···S1B ⁱ	0,90 (3)	2,66 (3)	3,421 (2)	143 (3)
N3A—H3A···S1A	0,91 (3)	2,34 (3)	2,8420 (19)	115 (2)
N4A—H4AA···S1A ⁱⁱ	0,89 (3)	2,45 (3)	3,317 (2)	164 (3)

Kod symetrii: (i) $-x+1, -y+1, -z+1$; (ii) $-x+2, y-1/2, -z+3/2$.

W strukturę związku 47 wbudowane zostały dwie cząsteczki wody biorące udział w procesie tworzenia wiązań wodorowych, w tym również między sobą. Jedna z cząsteczek, razem z atomami tlenu nieuporządkowanego pierścienia morfolinowego, jest akceptorem protonu w wiązaniu z grupą aminową (N4—H4···O14, N4—H4···O1) ($D_3^3(15)$). Natomiast druga cząsteczka wody jest dwukrotnie donorem wiązania wodorowego z atomami siarki (O2—H2···S1) (D(2)). Związek 47 upakuje się w strukturze warstwowo (Rys. 60) (Tabela 23).



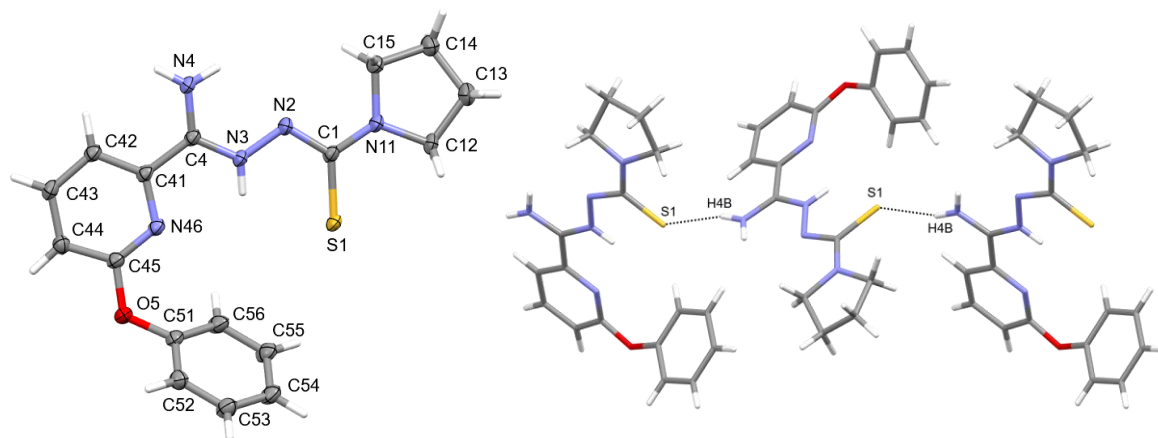
Rys. 60 Struktura krystaliczna, międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek związku 47

Tabela 23. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 47

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1W—H1WA···O2W	0,76 (2)	2,01 (2)	2,7698 (18)	174 (2)
O1W—H1WB···S1 ⁱ	0,86 (2)	2,51 (2)	3,3673 (13)	177,1 (18)
O2W—H2WA···S1 ⁱⁱ	0,86 (2)	2,45 (2)	3,3097 (12)	172,8 (18)
O2W—H2WB···S1 ⁱⁱⁱ	0,86 (2)	2,41 (2)	3,2556 (13)	169,1 (18)
N3—H3···S1	0,88	2,32	2,8131 (13)	115,4
N4—H4B···O14A ^{iv}	0,88	2,20	2,928 (4)	139,2
N4—H4B···O14B ^{iv}	0,88	2,25	3,001 (3)	143,8
N4—H4B···O1W	0,88	2,08	2,9164 (17)	159,7

Kod symetrii: (i) $x, -y+3/2, z+1/2$; (ii) $x, y+1, z$; (iii) $x, -y+3/2, z-1/2$; (iv) $-x+1, y+1/2, -z+3/2$.

Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe typu N4—H4···S1 w kryształach związku **48** tworzą układ łańcuchowy C(7) (Rys. 61, Tabela 24).



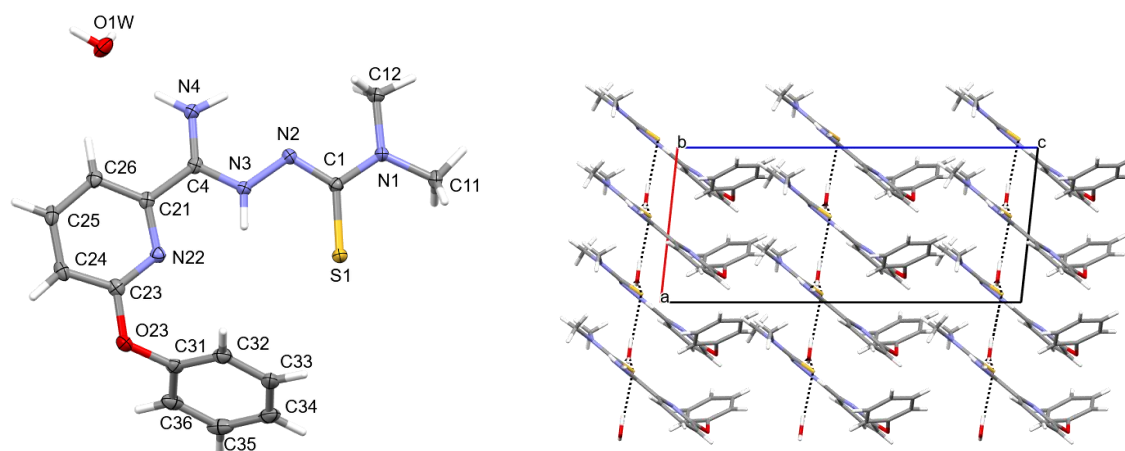
Rys. 61 Model ORTEP oraz wiązania wodorowe między cząsteczkami związku **48**

Tabela 24. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **48**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,85 (2)	2,40 (2)	2,8449 (14)	113,2 (18)
N4—H4A···S1 ⁱ	0,85 (2)	2,48 (2)	3,3061 (15)	165 (2)

Kod symetrii: (i) $x+1, -y+1/2, z+1/2$.

Związek **50** krystalizuje w formie monohydratu, a wbudowana cząsteczka wody uczestniczy w tworzeniu łańcuchów wiązań wodorowych ($C_2^2(9)$), dwukrotnie jako donor do atomu siarki (O1W—H1W···S1) oraz raz jako akceptor grupy aminowej (N4—H4···O1). Występujące międzycząsteczkowe wiązania wodorowe stabilizują warstwowe upakowanie cząsteczek (Rys. 62, Tabela 25).



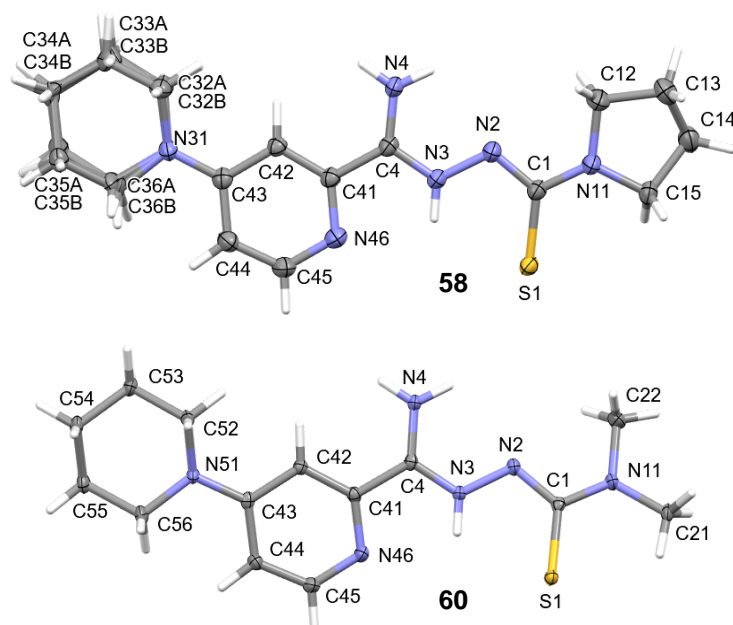
Rys. 62 Struktura krystaliczna oraz upakowanie cząsteczek w kryształach związku **50**

Tabela 25. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **50**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4A···O1W	0,93 (3)	1,92 (3)	2,808 (2)	160 (2)
O1W—H1WA···S1 ⁱ	0,87 (4)	2,41 (4)	3,2734 (19)	173 (4)
O1W—H1WB···S1 ⁱⁱ	0,86 (4)	2,45 (4)	3,3018 (18)	168 (3)

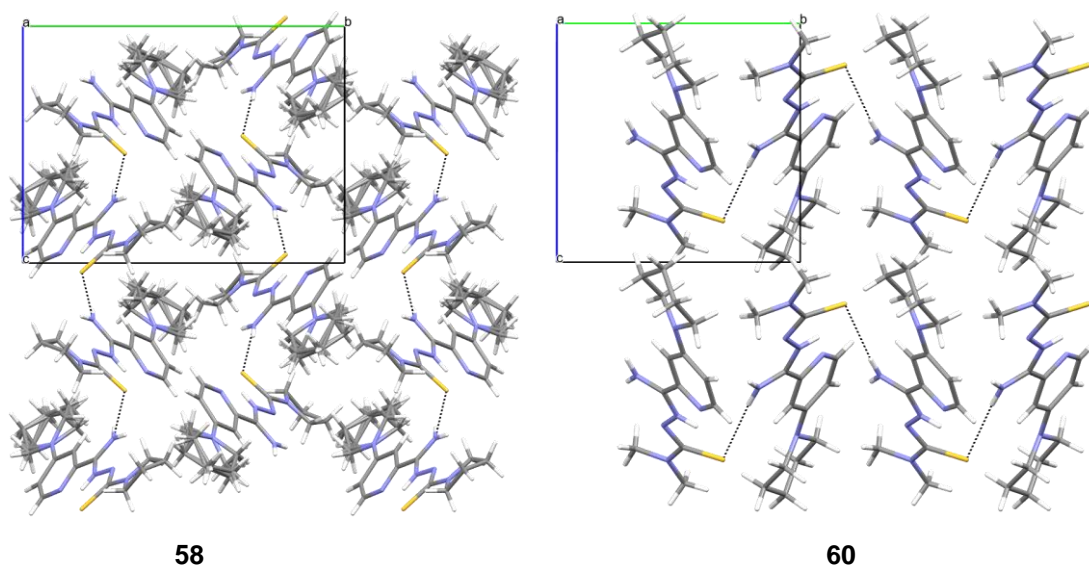
Kod symetrii: (i) $x-1/2, -y+1, z$; (ii) $x, y+1, z$.

Ostatnie dwie wyznaczone struktury krystaliczne z grupy pochodnych tiosemikarbazonowych to związki podstawione w pozycjach 2,4 pierścienia pirydyny (**58**, **60**) (Rys. 63). Obie przyjmują dipolarną konfigurację z silnymi wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi (S(5)) stabilizującymi obserwowaną strukturę płaską. Ugrupowanie piperydynowe związku **58** ma dużą swobodę i wykazuje nieuporządkowanie, co potwierdza obserwacja ich czynników temperaturowych.



Rys. 63 Struktura krystaliczna związku **58** i **60**

Nieskończone łańcuchy wiązań wodorowych, scharakteryzowane zgodnie z teorią grafów wodorowych jako C(7), formowane są przez atomy N4—H4···S1. Każda cząsteczka pełni rolę donora i akceptora. Cząsteczki w łańcuchu są do siebie wzajemnie prostopadle ułożone (Rys. 64, Tabela 26, Tabela 27).



Rys. 64 Upakowanie związku 58 i 60

Tabela 26. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 58

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,88	2,40	2,8618 (10)	113,0
N4—H4A···S1 ⁱ	0,88	2,40	3,2464 (10)	162,3

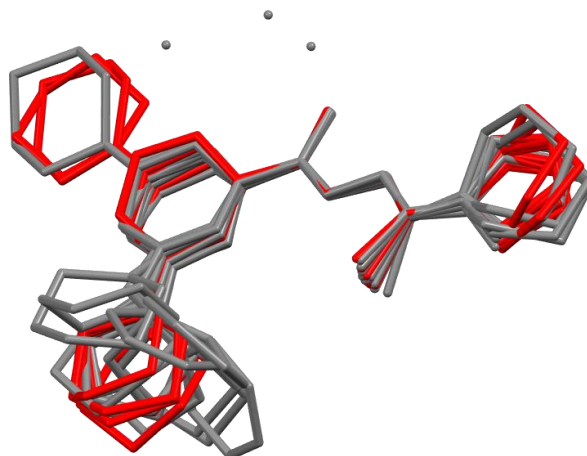
Kod symetrii: (i) $x+1/2, -y+1/2, z-1/2$.

Tabela 27. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 60

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N3—H3···S1	0,88	2,40	2,8663 (17)	113,2
N4—H4A···S1 ⁱ	0,88	2,49	3,3150 (17)	156,6

Kod symetrii: $-x+1, y-1/2, -z+1$.

Nałożenie cząsteczek po fragmencie N4(H₂)-C4-N3-N2-C1(S) wykonano również dla struktur 2,6 i 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny (Rys. 65). Warto zwrócić uwagę, iż pochodne o najwyższej aktywności przeciwpłatkowej (zaznaczone kolorem czerwonym) charakteryzowały się podobną geometrią, a ich podstawniki w pozycji C6 lub C4 wykazywały najmniejsze odchylenia od płaszczyzny pierścienia heteroaromatycznego.



Rys. 65 Nałożenie struktur krystalicznych 2,6- i 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny (kolor czerwony – związki silnie aktywne wobec *M. tuberculosis*, kolor szary – związki umiarkowanie aktywne)

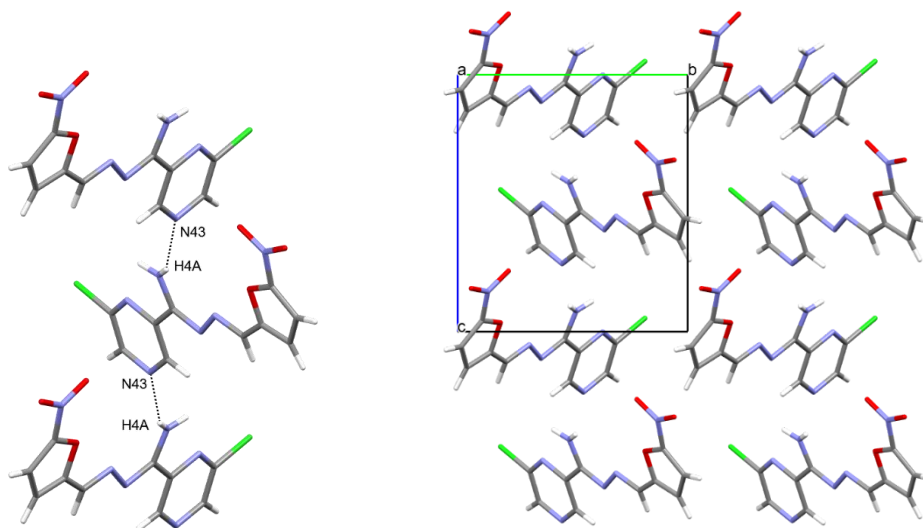
Podsumowując spośród 22 rozwiązanych struktur pochodnych tiosemikarbazonowych 20 krystalizowało w formie zwitterionowej, a 2 w formie neutralnej. Postanowiono dokonać pomiaru długości wiązań występujących w obu formach oraz porównać je ze standardowymi długościami wiązań, w celu potwierdzenia przyjmowanej tezy (Tabela 28). Według danych dostępnych w bazie CSD zakres długości wiązania pojedynczego C-N wynosi 1,45–1,48 Å, wiązania podwójnego C=N 1,26–1,30 Å, a podwójnego C=S 1,64–1,69 Å. Analiza długości wiązań wykazuje, iż w przypadku form zwitterionowych następuje znaczne skrócenie długości wiązań C1-N2 i C4-N4 w porównaniu z czystym wiązaniem pojedynczym, a także wydłużenie wiązania C1-S1 w zestawieniu z typowym wiązaniem podwójnym.

Tabela 28. Zestawienie długości wiązań pochodnych tiosemikarbazonowych występujących w formie neutralnej oraz zwitterionowej

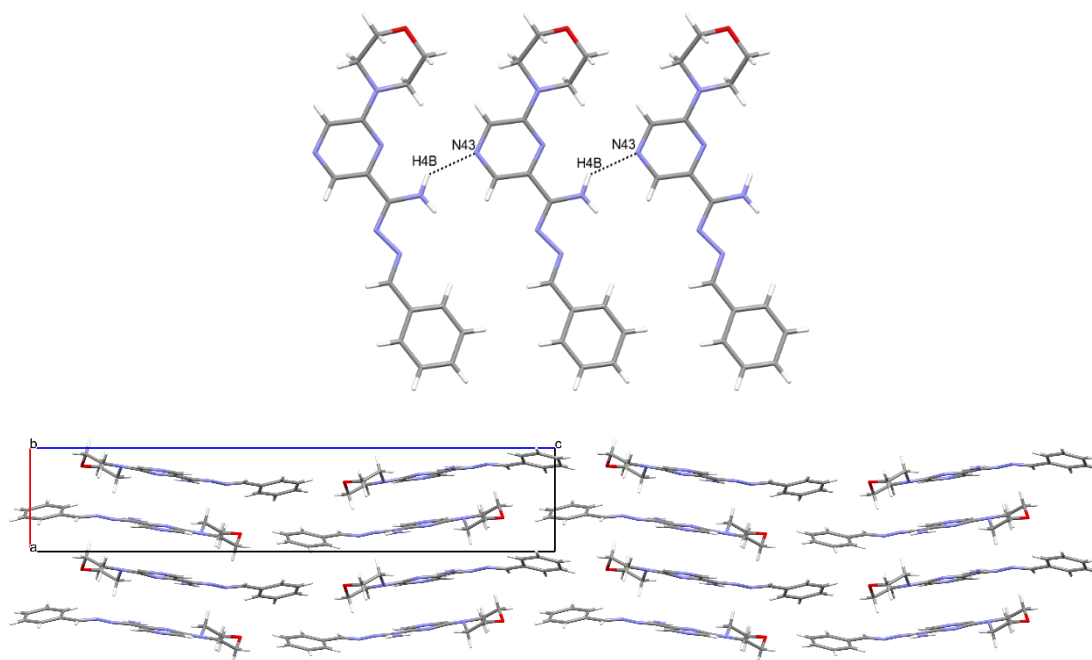
Forma	Długość wiązania (Å)			
	C1=S1	C1-N2	N3-C4	C4-N4
Zwitterionowa	1,72–1,74	1,32–1,34	1,30–1,31	1,32–1,34
Neutralna	1,70	1,37–1,38	1,29	1,37

Ponadto zmierzono kąt torsyjny dla atomów N46-C41-C4-N4, który dla formy neutralnej wynosił $-2,25^\circ$ (**5**) lub $1,78^\circ$ (**3**), a dla formy zwitterionowej zawierał się w zakresie $160,37-179,55^\circ$ oraz od $-179,94^\circ$ do $-166,27^\circ$, co z kolei potwierdza następujący obrót pierścienia heteroaromatycznego.

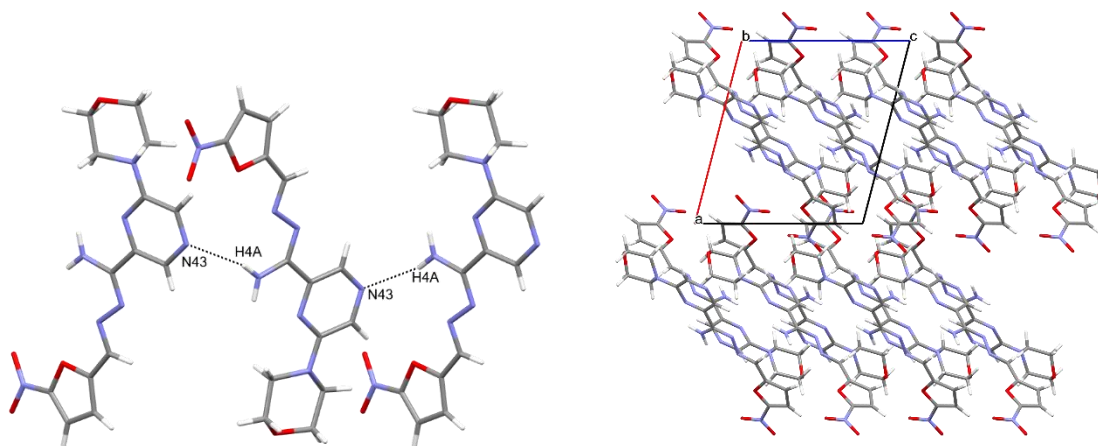
Poprzez międzycząsteczkowe wiązania wodorowe N4—H4···N43 (typu C(6)) molekuly formują nieskończone łańcuchy, co z kolei skutkuje ich warstwowym ułożeniem w kryształach (Rys. 67–69, Tabela 29–31). Ponadto, w strukturze **80** obserwujemy występowanie oddziaływania typu π -stacking. Odległość między środkami ciężkości pierścieni aromatycznych wynosi 3,873 Å (Rys. 70).



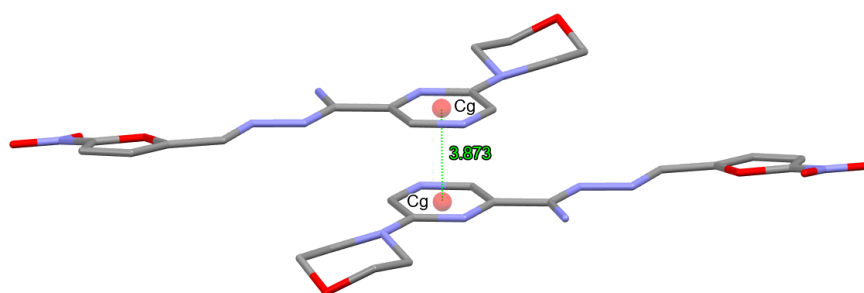
Rys. 67 *Wiązania wodorowe między cząsteczkami oraz upakowanie w kryształach związku 76*



Rys. 68 *Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek związku 78*



Rys. 69 Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek związku 80



Rys. 70 Odległość charakteryzująca oddziaływanie typu π -stacking w kryształach związku 80

Tabela 29. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku 76

D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N4—H4A \cdots N43 ⁱ	0,77 (6)	2,33 (6)	3,000 (4)	146 (5)

Kod symetrii: (i) $x-1, -y+1, z-1/2$.

Tabela 30. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku 78

D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N4—H4B \cdots N43 ⁱ	0,88	2,32	2,9974 (18)	133,6

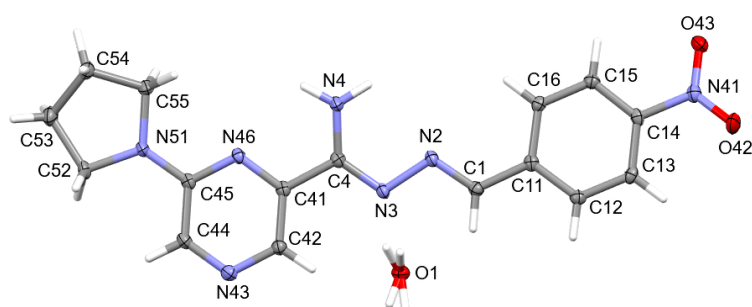
Kod symetrii: (i) $x, y+1, z$.

Tabela 31. Geometria wiązań wodorowych (\AA , $^\circ$) związku 80

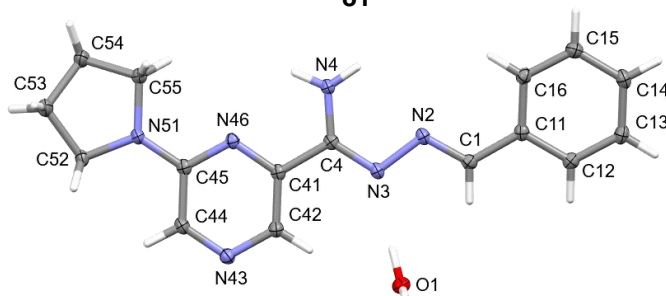
D—H \cdots A	D—H	H \cdots A	D \cdots A	D—H \cdots A
N4—H4A \cdots N43 ⁱ	0,88	2,35	2,9896 (14)	130,2

Kod symetrii: (i) $-x+1, y-1/2, -z+3/2$.

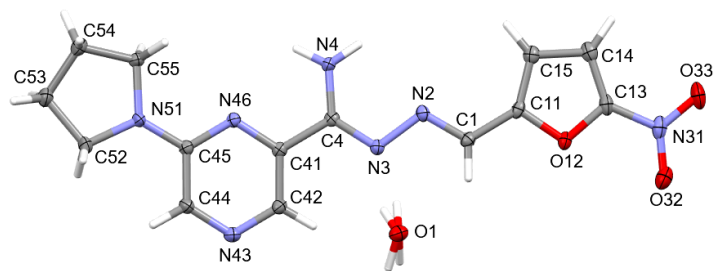
Związki **81**, **82**, **84** i **85** wykryzalizowały w formie hydratu przyjmując konformację *E* (Rys. 71). Warto zwrócić uwagę, iż w przypadku pochodnej **84** nastąpił obrót ugrupowania 5-nitrofurylowego o 180°, porównując do jego położenia w kryształach pochodnych **76** i **80**. Wbudowana w struktury związków **81**, **84** i **85** cząsteczka wody wykazuje nieuporządkowanie. Cząsteczki te budują ten sam system wiązań wodorowych, który zgodnie z teorią grafów można opisać jako $R_6^6(24)$. Cząsteczka wody jest dwukrotnie donorem protonu do atomu azotu N3 (O—H···N), natomiast akceptorem protonu z grupy aminowej (N—H···O). Inne międzycząsteczkowe wiązanie wodorowe (C(6)) tworzy się między grupą aminową a atomem azotu pierścienia pirazyny N43 (N—H···N) (Rys. 72). Ten sam typ oddziaływań międzycząsteczkowych przekłada się na ten sam typ upakowania cząsteczek w strukturze krystalicznej (Rys. 73). W kryształach pochodnej **82** tworzą się układy pierścieniowe ($R_4^4(16)$), w których łącznikiem między cząsteczkami związku są cząsteczki wody. Obecne są trzy rodzaje motywów wiązań wodorowych: O1—H1···N3, O1—H1···N43, N4—H4···O1, które stabilizują warstwowe upakowanie cząsteczek (Rys. 74). Geometrię wiązań wodorowych związków przedstawiono w tabelach 32–35.



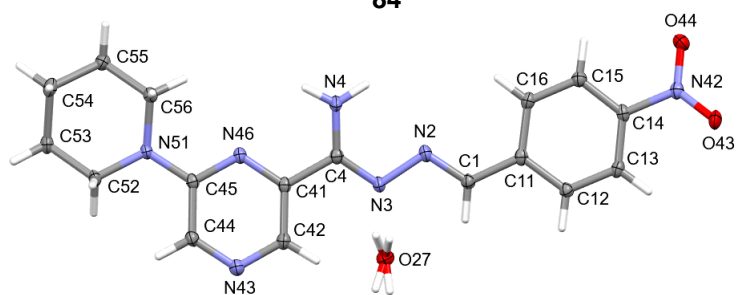
81



82

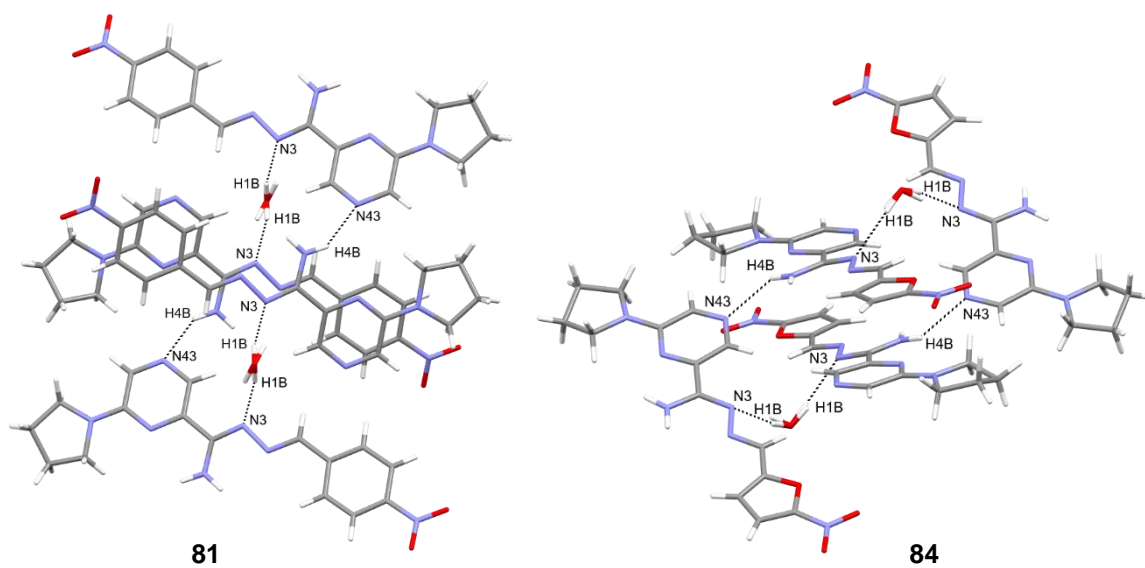


84



85

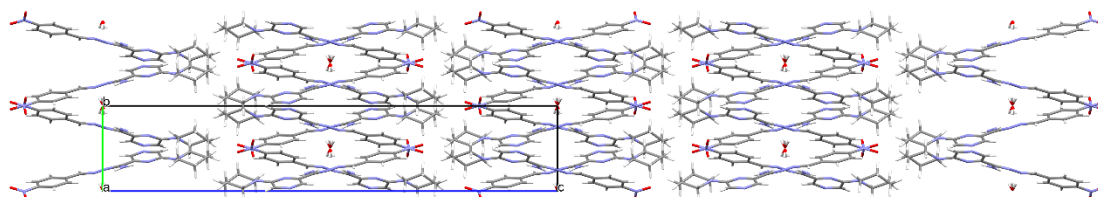
Rys. 71 Model ORTEP związku 81, 82, 84, 85



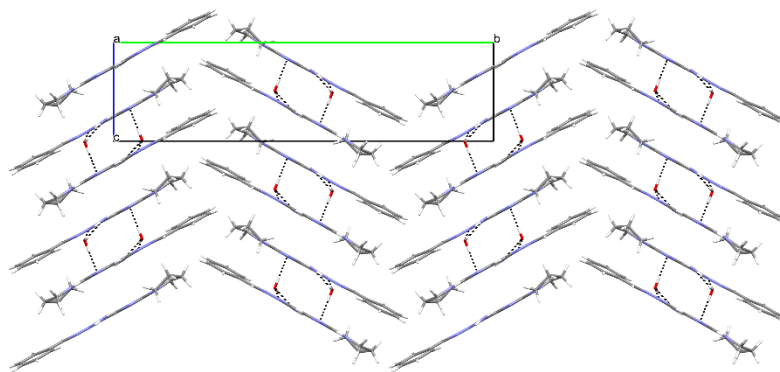
81

84

Rys. 72 Wiązania między cząsteczkami związku 81 i 84



Rys. 73 Upakowanie związku 85



Rys. 74 Upakowanie związku **82** wraz z zaznaczonym układem wiązań wodorowych typu pierścieniowego

Tabela 32. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **81**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1—H1A··· N3	0,90 (5)	2,12 (5)	2,9720 (11)	159 (3)
O1—H1B··· N3 ⁱ	0,87 (4)	2,12 (5)	2,9720 (11)	164 (3)
N4—H4A··· O1 ⁱⁱ	0,88	2,45	3,2070 (11)	144,7
N4—H4B··· N43 ⁱⁱⁱ	0,88	2,66	3,3503 (12)	136,2

Kod symetrii: (i) $-x+1/2, y, -z+1$; (ii) $-x+1, -y+1, -z+1$; (iii) $x+1/2, -y+2, z$.

Tabela 33. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **82**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1—H1A··· N3	0,891 (13)	1,976 (13)	2,8565 (13)	169,4 (14)
O1—H1B··· N43 ⁱ	0,884 (13)	2,256 (14)	3,0607 (13)	151,3 (14)
N4—H4A··· O1 ⁱⁱ	0,874 (18)	2,208 (18)	3,0532 (13)	162,6 (15)

Kod symetrii: (i) $-x+2, -y+1, -z+1$; (ii) $x-1, y, z$.

Tabela 34. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **84**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1—H1A··· N3 ⁱ	0,86 (5)	2,20 (5)	3,0245 (12)	160 (3)
O1—H1B··· N3	0,94 (5)	2,10 (5)	3,0245 (12)	168 (3)
N4—H4A··· O1 ⁱⁱ	0,88	2,58	3,3800 (12)	152,0
N4—H4B··· N43 ⁱⁱⁱ	0,88	2,30	3,0285 (13)	139,8

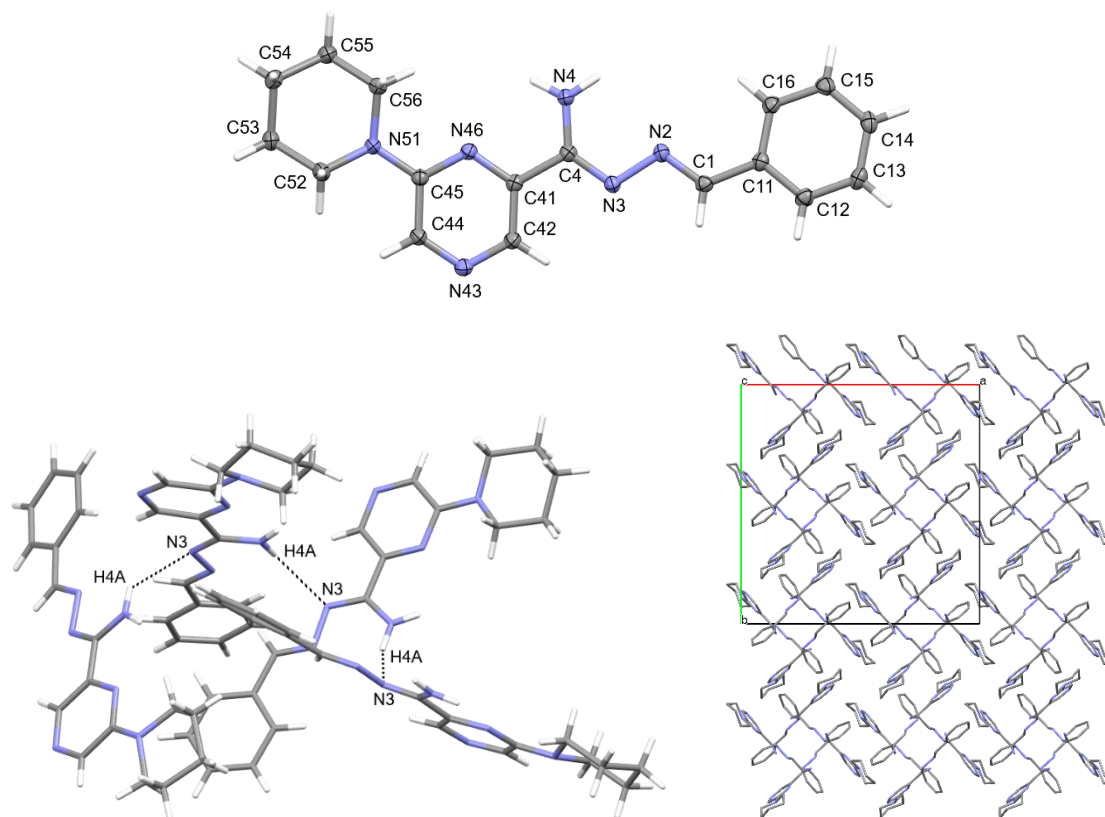
Kod symetrii: (i) $-x+3/2, y, -z+1$; (ii) $-x+1, -y+2, -z+1$; (iii) $x-1/2, -y+1, z$.

Tabela 35. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **85**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O27—H27A··· N3	0,880 (18)	2,14 (2)	2,9873 (12)	162 (3)
O27—H27B··· N3 ⁱ	0,878 (18)	2,13 (2)	2,9873 (12)	164 (3)
N4—H4A··· O27 ⁱⁱ	0,88	2,55	3,3295 (13)	148,0
N4—H4B··· N43 ⁱⁱⁱ	0,88	2,47	3,1482 (14)	134,4

Kod symetrii: (i) $-x+1/2, y, -z+1$; (ii) $-x+1, -y+1, -z+1$; (iii) $x+1/2, -y+2, z$.

W strukturze krystalicznej związku **86**, o konfiguracji *E*, formują się łańcuchowe wiązania wodorowe typu N4—H4A···N3 opisywane jako C(4), a cząsteczki upakowują się w „jodełkę” (Rys. 75, Tabela 36).



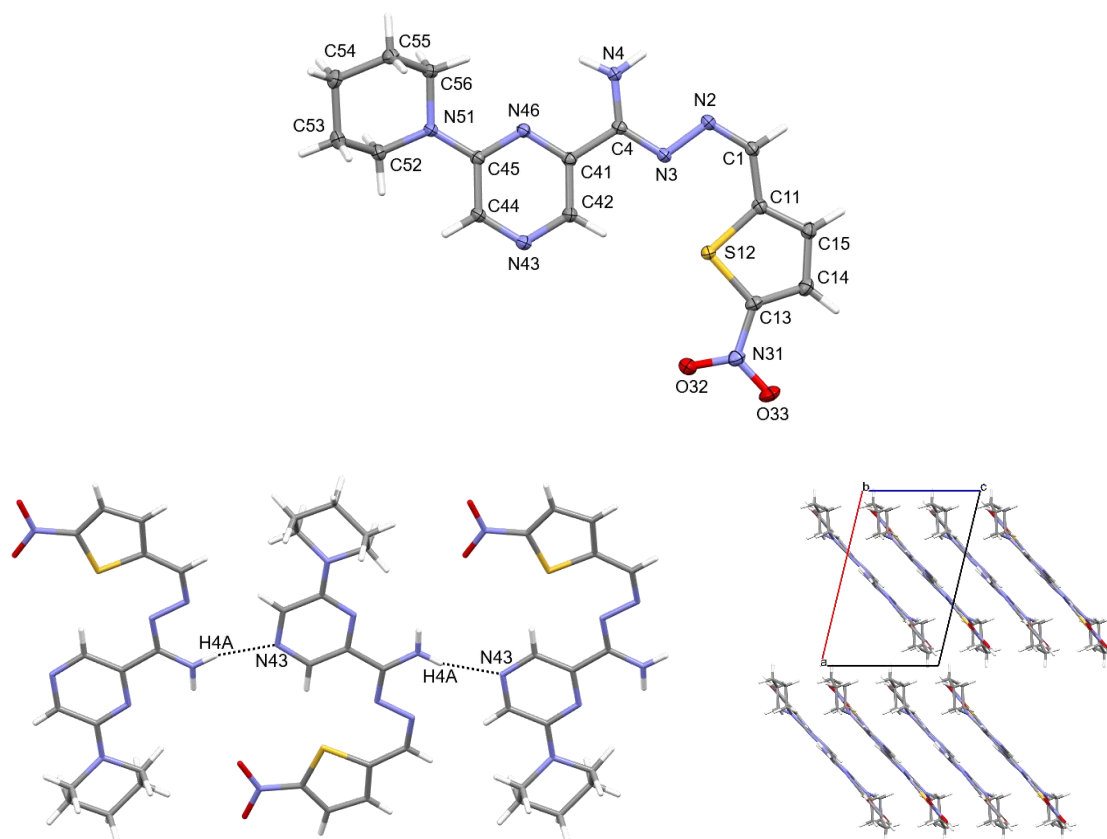
Rys. 75 Struktura krystaliczna, międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek związku **86**

Tabela 36. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **86**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4A···N3 ⁱ	0,88	2,38	3,0674 (13)	134,7

Kod symetrii: (i) $y+1/4, -x+5/4, z+1/4$.

Struktura pochodnej **87** przyjmuje konfigurację *Z*, czego konsekwencją jest zwinięta forma cząsteczki w przeciwieństwie do wydłużonej postaci przyjmowanej przez izomery *E*. Warstwowe upakowanie cząsteczek stabilizowane jest przez międzycząsteczkowe wiązania wodorowe typu N4—H4···N43 (C(6)) tworzące nieskończone łańcuchy (Rys. 76, Tabela 37).



Rys. 76 Struktura krystaliczna, międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek związku **87**

Tabela 37. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **87**

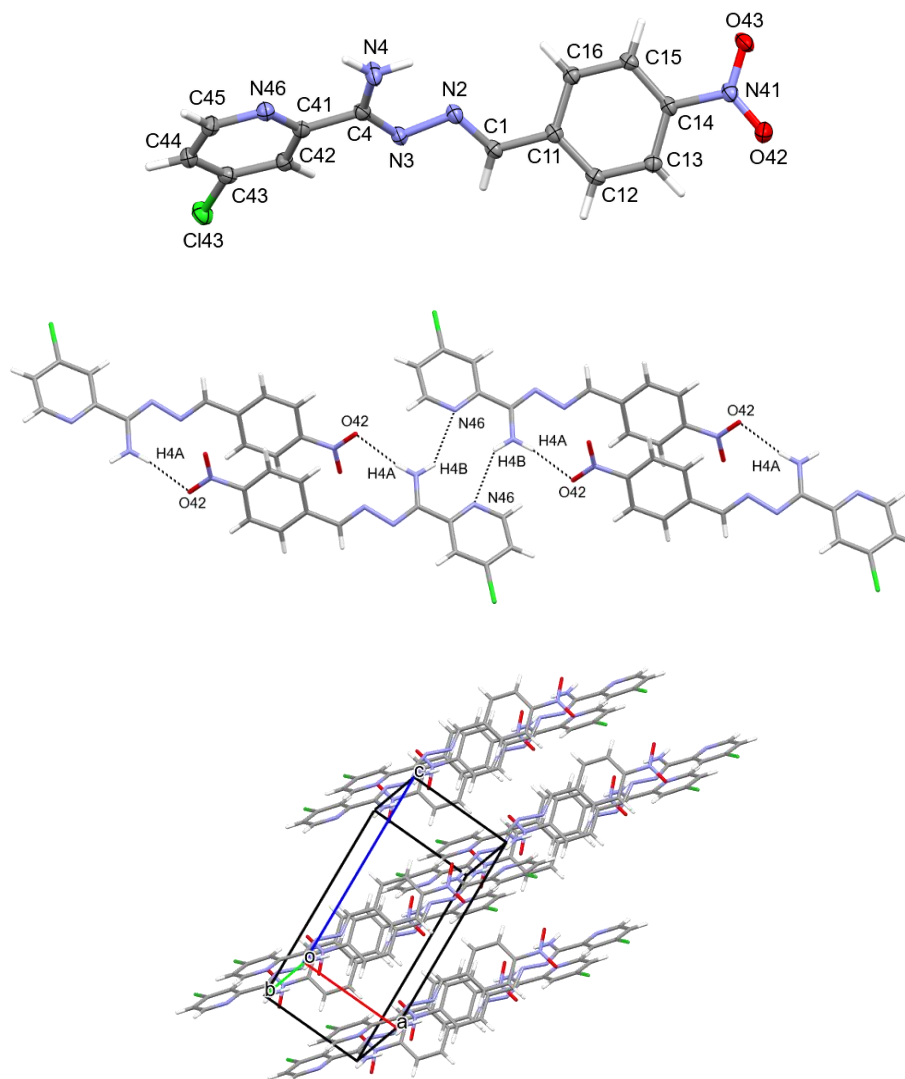
D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4A···N43 ⁱ	0,88	2,16	3,0045 (15)	160,4

Kod symetrii: (i) $-x+1, y+1/2, -z+3/2$.

Ostatnie cztery przeanalizowane pod kątem krystalograficznym związku należą do pochodnych iminowych: dwóch podstawionych w pozycjach 2,6 pierścienia pirydyny oraz dwóch w pozycjach 2,4 pierścienia pirydyny. Wszystkie cząsteczki przyjmują konfigurację *E* oraz posiadają jedną cząsteczkę w części niezależnej komórki elementarnej.

W strukturze związku **93** można zaobserwować skręt wiązania C1=N2, co wiąże się z brakiem płaskiej konformacji obserwowanej dla wszystkich pozostałych pochodnych. Jego kąt torsyjny C1-N2-N3-C4 wynosi $-155,99^\circ$, podczas gdy dla pozostałych związków zawiera się w zakresie $169,55\text{--}178,16^\circ$ oraz od $-179,83^\circ$ do $-168,54^\circ$. Ponadto, zaobserwowano inny typ oddziaływań międzycząsteczkowych niż ten, który wykazywały pozostałe omówione związki zawierające w podstawieniu grupę nitrową. Grupa aminowa

pełni rolę donora protonu do jednego z atomów tlenu grupy nitrowej (N4—H4··· O42) oraz atomu azotu pierścienia pirydyny (N4—H4B··· N46). Zgodnie z teorią grafów wiązań wodorowych można je scharakteryzować jako $C_4^4(32)$. Upakowanie cząsteczek jest warstwowe (Rys. 77, Tabela 38).



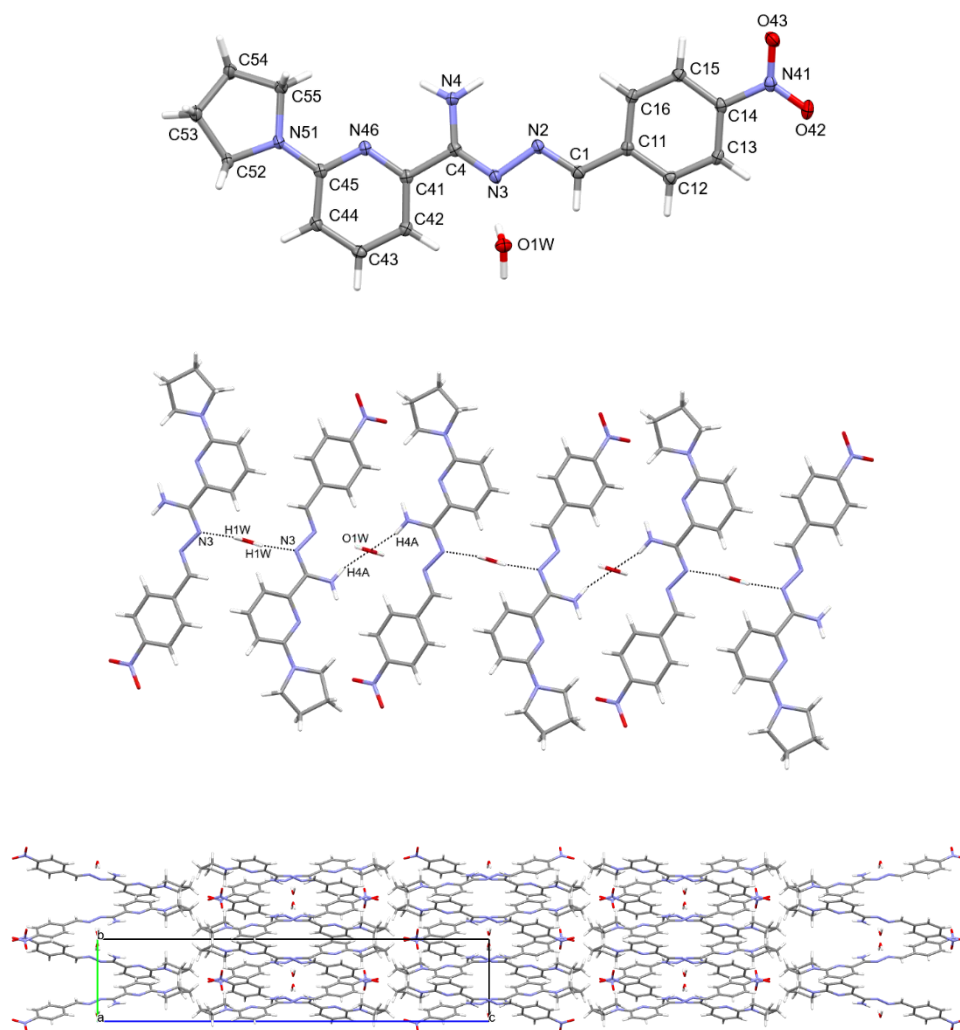
Rys. 77 Projektcja ORTEP, międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie cząsteczek w kryształach związku **93**

Tabela 38. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **93**

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4A···O42 ⁱ	0,88	2,31	3,1390 (17)	157,9
N4—H4B···N46 ⁱⁱ	0,88	2,60	3,3519 (18)	143,3

Kod symetrii: (i) $-x+1, -y+2, -z+1$; (ii) $-x+2, -y+1, -z+2$.

W strukturę związku **101** wbudowana została cząsteczka wody biorąca udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych zarówno jako donor protonu (O1W—H1···N3) ($D_2^2(5)$), jak i jego akceptor (N4—H4··· O1W) ($D_2^1(3)$). Upakowanie cząsteczek kształtuje się w sposób podobny do tego jaki obserwowano dla innych hydratów (Rys. 78, Tabela 39).



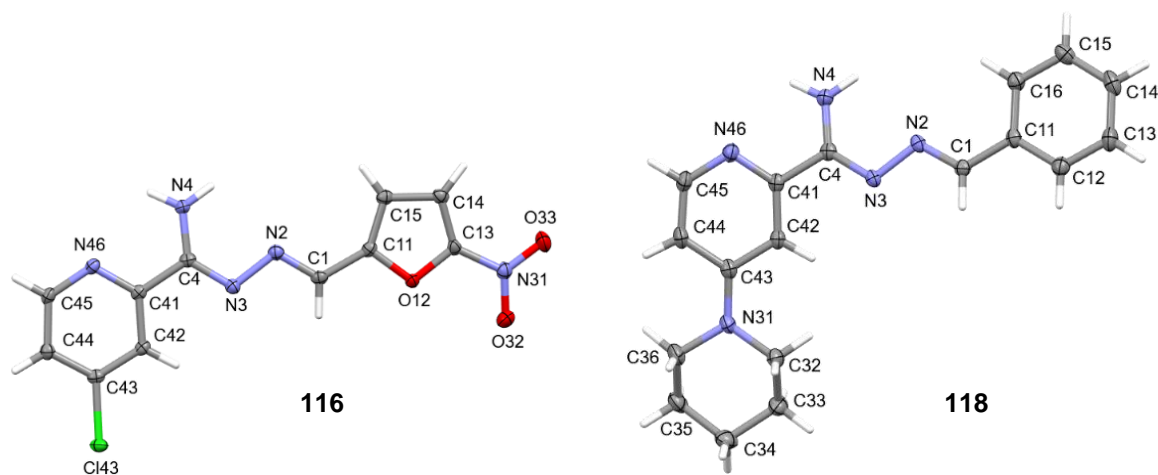
Rys. 78 Struktura krystaliczna, międzycząsteczkowe wiązania wodorowe oraz upakowanie związku **101**

Tabela 39. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku **101**

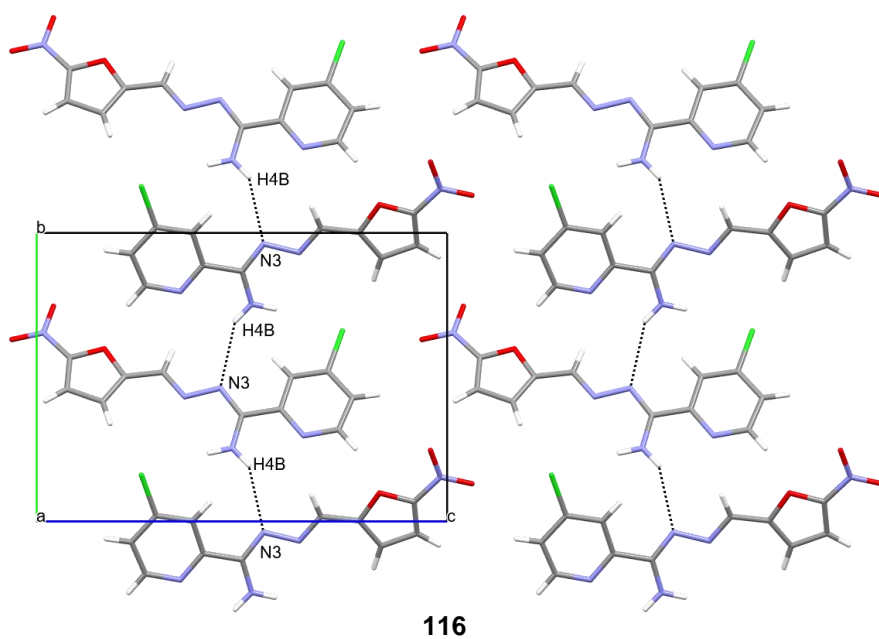
D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1W—H1W···N3 ⁱ	0,859 (15)	2,088 (15)	2,9391 (11)	170,7 (15)
N4—H4A··· O1W ⁱⁱ	0,88	2,39	3,1774 (12)	149,7

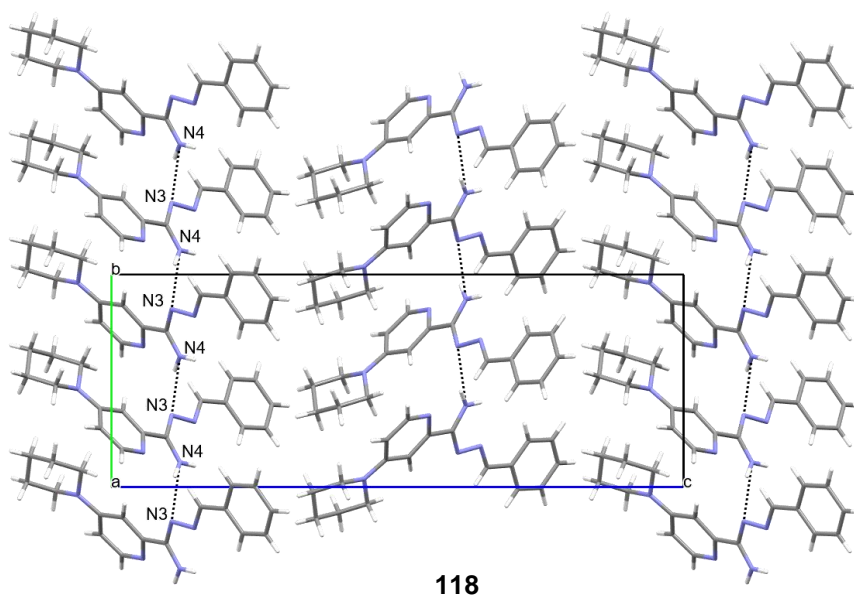
Kod symetrii: (i) $-x+3/2, y, -z+1$; (ii) $-x+1, -y+1, -z+1$.

Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe typu N4—H4···N3 w strukturze krystalicznej związku **116** i **118** tworzą układy łańcuchowe C(4) stabilizujące warstwowe upakowanie cząsteczek (Rys. 79, Rys. 80, Tabela 40, Tabela 41). Dla pochodnej **116**, podobnie jak w przypadku pochodnej **84**, zaobserwowano obrót ugrupowania 5-nitrofurylowego o 180° w zestawieniu z jego położeniem w kryształach pochodnych **76** i **80**. Co więcej, w strukturze **116** występuje, podobnie jak w strukturze **80**, oddziaływanie typu π - π pomiędzy cząsteczkami ułożonymi równolegle, a odległość między centroidami wyniosła 3,692 Å (Rys. 81).

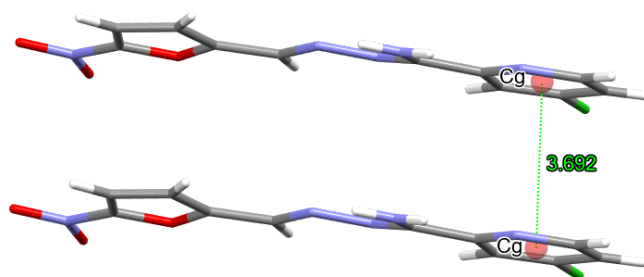


Rys. 79 Projekcja (ORTEP) związku **116** i **118**





Rys. 80 Upakowanie cząsteczek związku 116 i 118



Rys. 81 Odległość charakterystyczna oddziaływanie typu π - π w kryształach związku 116

Tabela 40. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 116

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4B··· N3 ⁱ	0,88	2,68	3,450 (3)	147,5

Kod symetrii: (i) $-x, y-1/2, -z+1$.

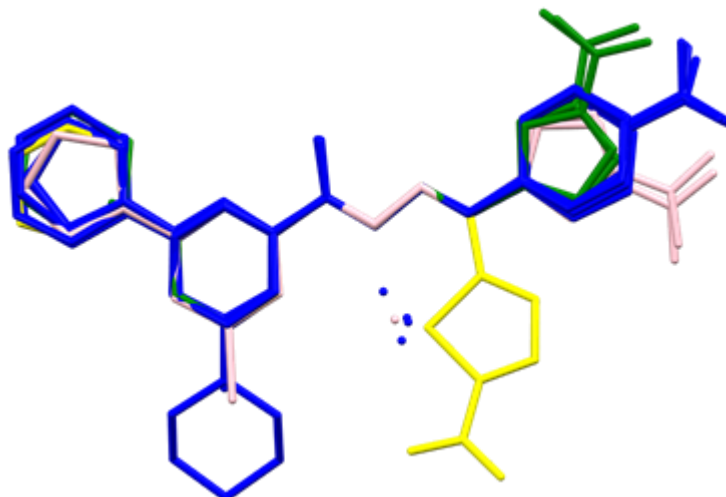
Tabela 41. Geometria wiązań wodorowych (Å, °) związku 118

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4B··· N3 ⁱ	0,88	2,19	2,9923 (12)	151,0

Kod symetrii: (i) $-x+1/2, y+1/2, z$.

W celu oceny różnic konformacyjnych dokonano nałożenia struktur wszystkich pochodnych iminowych po fragmencie N4(H₂)-C4-N3-N2-C1 (Rys. 82). Żółtym kolorem zaznaczono związek, który jako jedyny spośród badanych przyjął konfigurację Z, która

determinowała zwinięty kształt cząsteczki. Kolorem zielonym oraz różowym z kolei oznaczono pochodne z podstawnikiem 5-nitrofurylowym. Jak już sygnalizowano dwa z nich charakteryzowały się obrotem pierścienia o 180° zwracając się atomem tlenu po stronie atomu wodoru ugrupowania azometinowego. Warto zwrócić uwagę, iż były to związki o najwyższej aktywności tuberkulostatycznej.



Rys. 82 Nałożenie struktur krystalicznych pochodnych iminowych (kolor żółty i niebieski – związki nieaktywne, kolor zielony – związek aktywny oraz umiarkowanie aktywny, kolor różowy – związki silnie aktywne)

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ BIOLOGICZNYCH

5.1. Aktywność przeciwprątkowa

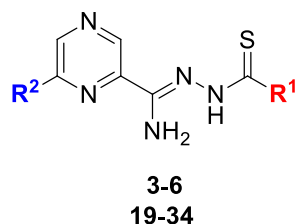
Nowo zsyntezowane związki zostały przetestowane w badaniach *in vitro* pod kątem aktywności przeciwprątkowej. Badanie przeprowadzono w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis*: referencyjnym H₃₇Rv oraz klinicznym Spec. 210, który charakteryzuje się opornością na powszechnie stosowane tuberkulostatyki (izoniazyd, rifampicynę, etambutol i kwas *p*-aminosalicylowy). Aktywność przeciwprątkową wyznaczano metodą mikrorozcieńczeń w bulionie, a jej miarą było minimalne stężenie hamujące definiowane jako najniższe stężenie związku zapobiegające rozwojowi drobnoustrojów w odniesieniu do próby kontrolnej bez testowanej substancji. Wrażliwość drobnoustrojów oceniana była na stężenia w zakresie od 512 µg/ml do 0,0312 µg/ml, zatem każdy związek osiągający wartość MIC poniżej 512 µg/ml uznawano za wywierający wpływ na aktywność wobec *M. tuberculosis*. Jako lek referencyjny zastosowano izoniazyd, którego wartość MIC kształtowała się na poziomie 0,125 µg/ml w przypadku szczepu H₃₇Rv oraz 8 µg/ml w przypadku szczepu Spec. 210 dla pochodnych tiosemikarbazonowych, natomiast dla pochodnych iminowych wartości te wynosiły odpowiednio 0,0312 µg/ml oraz 2 µg/ml.

Pierwszą serią związków poddaną ocenie działania tuberkulostatycznego były 2,6-dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirazyny **3–6**, **19–34** (Tabela 42). Analizowane pochodne wykazały zróżnicowaną aktywność w przedziale stężeń MIC od 0,5 µg/ml do powyżej 512 µg/ml. Zaobserwowano pewną tendencję wskazującą, iż obecność ugrupowania morfolinowego zarówno w pozycji C6 pierścienia pirazyny (**19–22**), jak również w łańcuchu bocznym (**3**, **23**, **27**) powoduje całkowity zanik aktywności. Ten sam lub nieco słabszy efekt wykazuje podstawienie pozycji 6 pirolidyną (**23–26**). Natomiast wprowadzenie ugrupowania piperydynowego bądź fenoksyłowego skutkowało wzrostem aktywności do umiarkowanej (16–32 µg/ml) lub dobrej (4–8 µg/ml). 6-(piperydyn-1-ylo)-*N'*-(piperydino-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (**29**) i 6-fenoksy-*N'*-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (**32**) hamowały wzrost prątków gruźlicy w stężeniu 4 µg/ml, a więc odnosząc się do szczepu opornego, z 2-krotnie wyższą mocą niż lek referencyjny. Jednak na szczególną uwagę zasługują związki, w których został zachowany atom chloru w pozycji **R²** oraz dokonano podstawienia pirolidyną (**4**), piperydyną (**5**) i dimetyloaminą (**6**) w pozycji **R¹** (MIC 0,5–2 µg/ml). Dwa z nich (**4**, **6**) osiągnęły minimalne stężenie hamujące 4-krotnie

wyższe dla szczepu standardowego, natomiast 8-krotnie niższe dla szczepu opornego w porównaniu z izoniazydem. Warto zwrócić uwagę, iż pary związków **4** i **32**, a także **5** i **29** zawierają tę samą aminę cykliczną w ugrupowaniu bocznym, co pozwala na wysnućie wstępnych wniosków dotyczących elementów strukturalnych wywierających korzystny wpływ na aktywność tuberkulostatyczną.

Konsekwencją nabycia oporności jest konieczność stosowania zwiększonych dawek środków chemioterapeutycznych i taką zależność obserwujemy w przypadku związku **4** i **6**. Jednak dla zdecydowanej większości pochodnych wartości MIC wobec szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv były na tym samym poziomie co wobec szczepu *M. tuberculosis* Spec. 210. Wykazanie przez prątki nieoporne oraz oporne takiej samej wrażliwości na badane związki może oznaczać ominięcie przez nie celów molekularnych charakterystycznych dla chemioterapeutyków przeciwgruźliczych warunkujących oporność szczepu Spec. 210 [194,195].

Tabela 42. Aktywność przeciwpłątkowa 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny **3–6**, **19–34**



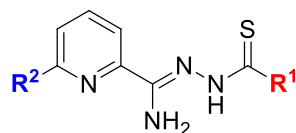
Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H ₃₇ Rv	Spec. 210		H ₃₇ Rv	Spec. 210
3	512	512	25	256	256
4	0,5	1	26	512	512
5	2	2	27	512	512
6	0,5	1	28	16	16
19	>512	>512	29	4	4
20	>512	>512	30	8	8
21	>512	>512	31	32	32
22	>512	>512	32	4	4
23	>512	>512	33	16	16
24	256	256	34	16	16

Kolejną badaną grupą związków były 2,6-dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirydyny **7–10, 35–50** (Tabela 43). Pomimo iż podobnie jak w przypadku pochodnych pirazyny pochodne pirydyny wykazały cały przekrój stężeń w jakich hamowały wzrost prątków gruźlicy (MIC 0,5–512 µg/ml), to jednak jedynie dwa związki (**35, 38**) charakteryzowały się brakiem aktywności wobec szczepu referencyjnego oraz bardzo niską lub niską aktywnością wobec szczepu klinicznego. Oba zawierały podstawnik morfolinowy w pozycji C6 pierścienia pirydyny, a mniej aktywny z nich również ten sam podstawnik w pozycji terminalnej łańcucha bocznego. Dla pozostałych pochodnych (**36, 37, 39, 43, 47**) nie zaobserwowano tak negatywnego wpływu ugrupowania morfolinowego jak miało to miejsce w przypadku ich analogów pirazynowych, a ich skuteczność działania wobec szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv można określić jako dobrą lub umiarkowaną (MIC 8–32 µg/ml). W zbliżonych stężeniach (MIC 8–16 µg/ml) wzrost prątków nieopornych hamowały związki z ugrupowaniem fenoksylowym oraz związki z podstawnikiem dimetyloaminowym (**42, 46, 48–50**). Dalsza analiza potwierdziła wcześniej zauważoną zależność wskazującą, iż związki zawierające atom chloru w pozycji C6 pierścienia oraz pirolidynę (**8**) i piperydynę (**9**) umiejscowione w łańcuchu tiosemikarbazonowym wykazują wysoką zdolność do inhibicji wzrostu komórek bakteryjnych obu szczepów *M. tuberculosis* (MIC 1–2 µg/ml). Dodatkowo równie aktywne okazały się być pochodne posiadające pierścień pirolidyny (**40, 41**) i piperydyny (**44, 45**) w pozycji C6 pierścienia pirydynowego oraz te same pierścienie w łańcuchu bocznym (MIC 0,5–4 µg/ml). W tej grupie związków najbardziej obiecujące pochodne (**44, 45**) były, w zestawieniu z izoniazydem, 16-krotnie mniej aktywne wobec szczepu nieopornego oraz, co istotniejsze, 16-krotnie silniej aktywne wobec szczepu opornego. Różnica w aktywności pomiędzy tą serią związków oraz poprzednią jest szczególnie widoczna w przypadku pochodnych z pirolidyną w obu podstawieniach. Wartość MIC dla 6-(pirolidyn-1-ylo)-*N'*-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu (**24**) wynosiła 256 µg/ml, podczas gdy dla 6-(pirolidyn-1-ylo)-*N'*-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamidu (**40**) równa była 1–2 µg/ml. Mimo iż najaktywniejsze wobec szczepu standardowego pochodne pirydyny były 4-krotnie słabsze od ich pirazynowych analogów, to analiza całościowa obu grup pozwala jednoznacznie na stwierdzenie, iż dla testowanych 2,6-dipodstawionych pochodnych tiosemikarbazonowych zamiana pierścienia pirazyny na pierścień pirydyny wpływa korzystnie na ich aktywność przeciwpłątkową. Szczególnie jest to widoczne w zdolności związków omawianej grupy do hamowania wzrostu szczepu opornego prątków, która była

dla 16 z 20 pochodnych od 2- do 16-krotnie wyższa niż leku referencyjnego. Interesujące jest, iż dla omawianych pochodnych pirydyny szczep oporny wykazuje niższe miana hamujące niż szczep standardowy.

Szczep *M. tuberculosis* H₃₇Rv stosowany jest jako szczep referencyjny w większości badań mikrobiologicznych, w tym testów lekooporności czy badań nad poszukiwaniem nowych leków przeciwprątkowych. Sekwencjonowanie całego genomu szczepu referencyjnego oraz szczepów klinicznych ujawniło znaczną różnorodność genetyczną wśród klinicznych izolatów *M. tuberculosis*. Udowodniono również brak występowania niektórych genów w genomie *M. tuberculosis* H₃₇Rv w porównaniu z genomami szczepów klinicznych, np. genów kodujących cyklazę adenylanową (MT1360), transferazę glikozylową (MT1800) czy oksydoreduktazę (MT1801). Ta różnorodność genetyczna obserwowana w badaniach porównujących genom H₃₇Rv z genomami izolatów klinicznych wpływa na różnice w patogenności i wirulencji szczepów oraz jest wyjaśnieniem zmienności fenotypowej szczepów. Fakt ten może wyjaśniać wyższe wartości MIC dla szczepu referencyjnego w porównaniu do szczepów klinicznych [196-199].

Tabela 43. Aktywność przeciwprątkowa 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny 7–10, 35–50

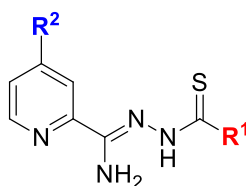


7-10
35-50

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H ₃₇ Rv	Spec. 210		H ₃₇ Rv	Spec. 210
7	32	32	41	4	1
8	2	1	42	16	4
9	2	1	43	8	1
10	16	4	44	2	0,5
35	512	256	45	2	0,5
36	16	4	46	8	4
37	16	4	47	8	4
38	512	128	48	8	4
39	16	4	49	8	4
40	2	1	50	16	8

Do ostatniej serii badań nad aktywnością tuberkulostatyczną związków o strukturze tiosemikarbazonu wykorzystano 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny **52–55**, **57–60** (Tabela 44). Na podstawie wstępnej analizy struktura-aktywność przeprowadzonej dla 2,6-dipodstawionych pochodnych pirazyny i pirydyny zawężono serię do związków zawierających atom chloru oraz piperydynę jako podstawniki w pozycji C4 pierścienia pirydyny. Pozwoliło to na potwierdzenie zaobserwowanej wcześniej tendencji wskazującej na istotność ugrupowania pirolidynowego oraz piperydynowego w terminalnej pozycji łańcucha tiosemikarbazonowego. Porównując najaktywniejsze związki pomiędzy grupami, w których jedyną różnicą jest miejsce połączenia grupy funkcyjnej z pierścieniem pirydyny można wywnioskować, iż nieco bardziej korzystna jest pozycja 6. Najniższe stężenie hamujące wobec szczepu standardowego, wynoszące 2 µg/ml, osiągnęły 4-chloro-*N'*-(piperydino-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (**54**) oraz 4-(piperydyn-1-ylo)-*N'*-(piperydino-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (**69**), a więc związki zawierające w pozycji **R¹** piperydynę. Ich 6-podstawione analogi (**17**, **45**) osiągnęły wartość MIC na tym samym poziomie. Jednak biorąc pod uwagę skuteczność działania wobec opornych prątków można zaobserwować nieco słabszy efekt dla związków z podstawieniem w pozycji 4 (MIC 0,5–4 µg/ml) w porównaniu ze związkami z podstawieniem w pozycji C6 (MIC 0,5–1 µg/ml). Podobną zależność można zauważyć dla pochodnych zawierających w pozycji **R¹** pirolidynę. Związki **53** i **68** osiągnęły stężenie hamujące dwukrotnie wyższe (MIC 4 µg/ml) w porównaniu ze swoimi 6-podstawionymi analogami pirolidynowymi, ale również z 4-podstawionymi analogami piperydynowymi. W tym samym stężeniu wzrost prątków gruźlicy hamował związek **52** z atomem chloru w pozycji **R²** oraz morfoliną w pozycji **R¹**. Zatem w tej grupie związków podstawnik morfolinowy wywiera najmniej negatywny wpływ. Moc działania wobec szczepu referencyjnego pozostałych nieomówionych pochodnych (**55**, **67**, **70**) można określić jako umiarkowaną (MIC 8 µg/ml). Podobnie jak w poprzednim przypadku wszystkie związki odznaczały się doskonałą aktywnością wobec szczepu opornego (MIC 0,5–8 µg/ml) w porównaniu z referencyjnym izoniazidem (8 µg/ml). Dla większości z nich wartość MIC osiągnęła wyższą wartość dla szczepu referencyjnego w porównaniu ze szczepem klinicznym.

Tabela 44. Aktywność przeciwpłatkowa 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny **52–55**, **57–60**



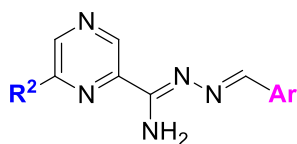
52-55
67-60

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H ₃₇ Rv	Spec. 210		H ₃₇ Rv	Spec. 210
52	4	2	57	8	4
53	4	1	58	4	2
54	2	0,5	59	2	4
55	8	8	60	8	4

Kolejnymi trzema grupami testowanymi pod kątem ich potencjalnej aktywności przeciwpłatkowej były pochodne o strukturze imin. Dla 2,6-dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny **73–92** wartości MIC zawierały się w zakresie od 0,5 µg/ml do powyżej 512 µg/ml (Tabela 45). Połączenie ugrupowania azometinowego z podstawnikami *p*-nitrofenylowym oraz fenylovym skutkowało w zdecydowanej większości przypadków zanikiem aktywności (MIC od 256 do ≥512 µg/ml). Natomiast wzrost aktywności zaobserwowano w obecności pięciocłonowych układów heteroaromatycznych (**75**, **76**, **80**, **83**, **84**, **88**, **91**). W zależności od pochodnej i badanego szczepu można ją ocenić jako wysoką (MIC 0,5–4 µg/ml) lub umiarkowaną (MIC 8–32 µg/ml). Ciekawym przypadkiem jest *N'*-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (**83**), którego siła inhibicji wzrostu szczepu opornego była 32-krotnie wyższa (MIC 16 µg/ml) niż szczepu standardowego (MIC 512 µg/ml). W przypadku pochodnych z atomem chloru (**75–76**) oraz ugrupowaniem fenoksylovym (**91–92**) w pozycji **R²** podstawnik 5-nitrotiofenowy wydaje się posiadać większe znaczenie niż podstawnik 5-nitrofurylový. Szczególnie jest to zauważalne w przypadku drugiej pary związków, w której pochodna **91** (MIC 2–4 µg/ml) wywiera od 128 do 256 silniejsze działanie, w zależności od szczepu, w stosunku do pochodnej **92** (MIC 512 µg/ml). Odwrotną zależność zauważono dla pozostałych trzech podstawień przy pierścieniu pirazyny (**79–80**, **83–84**, **87–88**). Dla najaktywniejszych pochodnych szczep kliniczny wykazywał niższe miana hamujące niż szczep referencyjny. Na tle grupy wyróżniały się dwie pochodne zawierające w pozycji **Ar** podstawnik 5-nitrofurylový

oraz pierścien pirolidynowy (**84**) lub piperidynowy (**88**) w położeniu 6 pierścienia pirazyny. Warto zwrócić uwagę, iż są to aminy, które w przypadku pochodnych tiosemikarbazonowych zostały wytypowane jako elementy farmakoforowe. Pochodne **84** i **88** hamowały wzrost prątków gruźlicy przy stężeniu 1 µg/ml (szczep H₃₇Rv) oraz 0,5 µg/ml (szczep Spec. 210), a więc odpowiednio 32-krotnie słabiej oraz 4-krotnie mocniej niż referencyjny izoniazyd (MIC 0,0312 µg/ml i 2 µg/ml). Porównując te krotności do wartości uzyskanych dla pochodnych tiosemikarbazonowych można stwierdzić, iż dla 2,6-dipodstawionych pochodnych pirazyny wymiana ugrupowania bocznego na grupę iminową wpływa niekorzystnie na ich działanie tuberkulostatyczne.

Tabela 45. Aktywność przeciwpłątkowa 2,6-dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny **73–92**



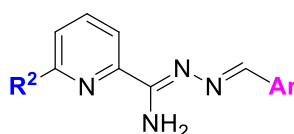
73-92

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H ₃₇ Rv	Spec. 210		H ₃₇ Rv	Spec. 210
73	256	256	83	512	16
74	256	256	84	1	0,5
75	16	4	85	>512	512
76	32	32	86	>512	512
77	>512	>512	87	>512	>512
78	>512	>512	88	1	0,5
79	512	512	89	512	512
80	8	4	90	512	512
81	>512	256	91	4	2
82	>512	512	92	512	512

2,6-Dipodstawione iminowe pochodne pirydyny **93–112** charakteryzowały się minimalnym stężeniem hamującym wzrost szczepów *M. tuberculosis* w zakresie od 1 µg/ml do powyżej 512 µg/ml (Tabela 46). W pierwszej kolejności warto zwrócić uwagę, iż zamiana pierścienia pirazyny na pierścień pirydyny wywołała pogłębienie działania przeciwpłątkowego związków podstawionych w pozycji terminalnej łańcucha bocznego ugrupowaniem 5-nitrofurylowym (MIC 1–8 µg/ml). Przykładowo, rozpatrując wartości MIC wykazane wobec szczepu opornego, nastąpił 5-krotny wzrost aktywności dla pochodnej z atomem chloru (**76** vs. **96**) (MIC 32 µg/ml vs. 4 µg/ml) oraz 256-krotny

dla pochodnej z ugrupowaniem fenoksylowym (**92** vs. **112**) (MIC 512 µg/ml vs. 2 µg/ml) w pozycji C6 pierścienia pirydyny. Pochodna z morfoliną (**80** vs. **100**) natomiast 4-krotnie silniej hamowała wzrost szczepu H₃₇Rv (MIC 8 µg/ml vs. 2 µg/ml). Ponownie najistotniejszym wpływem na aktywność odznaczały się pochodne zawierające w pozycji **R²** pirolidynę (**104**) i piperydynę (**108**) z wartością MIC na poziomie 1 µg/ml wobec obu szczepów. Ich siła inhibicji wobec szczepu klinicznego była 2-krotnie niższa niż ich pirazyńskich analogów, jednak w dalszym ciągu 2-krotnie wyższa niż izoniazydu. Ponadto, związki zawierające pirolidynę (**103**) oraz piperydynę (**107**) przy pierścieniu pirazyńskim oraz podstawnik 5-nitrotiofenowy w ugrupowaniu azometinowym wykazały, odpowiednio, umiarkowaną (MIC 32 µg/ml) lub wysoką (MIC 1–4 µg/ml) aktywność tuberkulostatyczną. Pozostałe pochodne, w tym również z grupą *p*-nitrofenylową oraz fenyłową, wykazały w zdecydowanej przewadze niski potencjał lub jego brak, z wartością MIC w zakresie od 128 µg/ml do powyżej 512 µg/ml. Ze względu na fakt, iż omawiana grupa jest liczniejsza pod kątem aktywnych związków od poprzedniej, można uznać, iż bardziej preferowanym pierścieniem heteroaromatycznym w przypadku testowanych 2,6-dipodstawionych pochodnych iminowych jest pirydyna. Jednak zestawiając ją z grupą 2,6-dipodstawionych pochodnych tiosemikarbazonowych wypada mniej korzystnie.

Tabela 46. Aktywność przeciwpłatkowa 2,6-dipodstawionych iminowych pochodnych pirydyny **93–112**

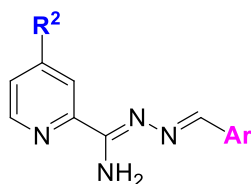


93-112

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H ₃₇ Rv	Spec. 210		H ₃₇ Rv	Spec. 210
93	256	512	103	32	32
94	256	512	104	1	1
95	128	256	105	512	512
96	4	4	106	512	512
97	64	256	107	4	1
98	>512	256	108	1	1
99	256	32	109	256	512
100	2	2	110	128	128
101	>512	>512	111	128	128
102	512	512	112	8	2

Ostatnią badaną grupą pod kątem potencjalnej aktywności przeciwpłatkowej były iminowe pochodne pirydyny podstawione w położeniu 2 i 4 (**113–120**) (Tabela 47). Obecność pierścienia piperydyny w pozycji C4 pierścienia pirydyny nie wywierała tak istotnego wpływu jak było to zauważalne w przypadku ich analogów z podstawieniem w pozycji C6. *N'*-[(5-Nitrofuran-2-ylo)metyleno]-4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**120**) wykazywał, w zależności od szczepu, 16- lub 32-krotnie niższą aktywność (MIC 16–32 µg/ml) w porównaniu z *N'*-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]-6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidem (**108**). Zaobserwowano również zanik działania dla pochodnej z podstawnikiem 5-nitrotiofenowym (**119**) (MIC 1–4 µg/ml vs. 512 µg/ml). Z kolei odwrotną zależność zauważono dla pochodnej podstawionej chlorem w pozycji **R**². Dla pochodnej z ugrupowaniem 5-nitrofurylowym (**116**) zmiana miejsca połączenia grupy funkcyjnej z pierścieniem heteroaromatycznym z 6 na 4 skutkowało 128- oraz 64-krotnym spadkiem wartości MIC (do 0,25 µg/ml oraz 0,5 µg/ml), odpowiednio dla szczepu referencyjnego oraz opornego. Z kolei w zestawieniu z lekiem referencyjnym obserwujemy 4-krotnie słabszy efekt wobec szczepu H₃₇Rv oraz 4-krotnie mocniejszy wobec szczepu Spec. 210, co pozwala wytypować tę pochodną jako związek o najwyższym potencjale tuberkulostatycznym spośród testowanych grup związków o strukturze imin, jednak wciąż niższym niż jej analogi tiosemikarbazonowe. Nie mniej jednak, potwierdza to zasadność traktowania, zarówno atomu chloru, jak i podstawnika 5-nitrofurylowego jako ugrupowania farmakoforowego. Pochodne z atomem chloru wywierały również umiarkowany wpływ w przypadku struktur z grupą *p*-nitrofenylową (**113**) lub podstawnikiem 5-nitrotiofenowym (**115**) (MIC 16–32 µg/ml). Pozostałe nieomówione związki były nieaktywne (MIC ≥ 512 µg/ml).

Tabela 47. Aktywność przeciwpłatkowa 2,4-dipodstawionych iminowych pochodnych pirydyny 113–120



113-120

Nr	MIC (µg/ml)		Nr	MIC (µg/ml)	
	szczep <i>M. tuberculosis</i>			szczep <i>M. tuberculosis</i>	
	H ₃₇ Rv	Spec. 210		H ₃₇ Rv	Spec. 210
113	32	16	117	>512	>512
114	>512	>512	118	>512	512
115	32	16	119	512	512
116	0,25	0,5	120	16	32

5.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Dla związków, które osiągnęły minimalne stężenie hamujące MIC ≤ 4 µg/ml wobec co najmniej jednego szczepu *M. tuberculosis* wykonano poszerzone badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej w warunkach *in vitro* w celu sprawdzenia selektywności ich działania. Selektywność leków pozwala na zintensyfikowanie skuteczności terapii przy minimalnym ryzyku działań niepożądanych oraz interakcji z innymi lekami [200]. Badanie przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie przy wykorzystaniu metody mikrorozcieńczeń w bulionie. Wartości MIC testowanych pochodnych wyznaczano wobec panelu referencyjnych szczepów mikroorganizmów z Amerykańskiej Kolekcji Rodzajów Kultur (ang. *American Type Culture Collection, ATCC*), w tym szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) oraz grzybów (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 102231, *Candida glabrata* ATCC 90030). Oceniana była wrażliwość drobnoustrojów na stężenia w zakresie od 1000 µg/ml do 0,06 µg/ml, zatem każdy związek osiągający wartość MIC poniżej

1000 µg/ml uznawano za wywierający wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Jako leki referencyjne zastosowano wankomycynę (VAN) (bakterie G(+)), ciprofloksacynę (CIP) (bakterie G(-)) i nystatynę (NYT) (drożdże).

Wśród 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny **4–6**, **29**, **32** (Tabela 48) najwyższą selektywność wobec prątków gruźlicy wykazywał związek **29** (**R**¹ = piperydyna, **R**² = piperydyna). Jednak, mimo braku aktywności wobec większości badanych szczepów mikroorganizmów, charakteryzował się dobrą aktywnością wobec dwóch szczepów bakterii Gram-dodatnich, tj. *S. epidermidis* (MIC 15,6 µg/ml) i *M. luteus* (MIC 62,5 µg/ml). Pochodne **4**, **5** i **32** silnie hamowały wzrost większości szczepów bakterii Gram-dodatnich, a dwa z nich także grzybów z rodzaju *Candida*. Ich siła działania była w większości przypadków na tym samym poziomie lub wyższa niż referencyjnej wankomycyny, natomiast dla związku **4** i **5** dwukrotnie niższa wobec szczepu *C. parapsilosis* w porównaniu z referencyjną nystatyną. Aktywność bakteriostatyczna (MIC 0,12–0,98 µg/ml) oraz aktywność fungistyczna (MIC 0,49–1,95 µg/ml) związku **5** była wyższa niż jego aktywność tuberkulostatyczna (MIC 2 µg/ml). Związek **6** jako jedyny, w umiarkowanym stopniu, hamował wzrost trzech z czterech szczepów bakterii Gram-ujemnych (MIC 125 µg/ml).

Tabela 48. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny **4–6**, **29**, **32**

Nr związku	4	5	6	29	32	
Szczep	MIC (µg/ml)					
Bakterie G(+)						VAN
<i>B. subtilis</i>	0,98	0,98	0,98	-	0,49	0,24
<i>B. cereus</i>	0,98	0,98	3,9	>1000	7,8	0,98
<i>M. luteus</i>	0,12	0,12	62,5	62,5	0,49	0,12
<i>S. aureus</i>	0,98	0,98	1,95	1000	0,49	0,98
<i>S. epidermidis</i>	0,12	0,24	31,3	15,6	0,49	0,98
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	1000	1000	1,95
Bakterie G(-)						CIP
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	125	>1000	1000	0,02
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	125	>1000	1000	0,12
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	1000	>1000	1000	0,49
<i>P. mirabilis</i>	>1000	>1000	125	>1000	1000	0,03
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	>1000	1000	0,06
Drożdże						NYT
<i>C. parapsilosis</i>	0,49	0,49	250	1000	62,5	0,24
<i>C. albicans</i>	7,8	1,95	7,8	>1000	7,8	0,48
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	>1000	125	0,24

Analiza wyników przeprowadzona dla 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny **8–10, 36–37, 39–50** (Tabela 49) pozwoliła na wyłonienie dwóch kandydatów z selektywną zdolnością hamowania wzrostu szczepów *M. tuberculosis*. Wartości MIC dla związku **41** (**R¹** = piperydina, **R²** = pirolidyna) oraz **45** (**R¹** = piperydina, **R²** = piperydina) wobec całego panelu referencyjnych szczepów mikroorganizmów wynosiły ≥ 1000 $\mu\text{g/ml}$. Warto zwrócić uwagę, iż są to związki, które wraz z pochodnymi **8, 9, 40, 44** cechowały się najwyższą aktywnością przeciwpłatkową, przy czym związek **45** wyższą niż związek **41**, spośród badanej grupy i jako jedyne osiągnęły pożądany efekt. Związki **8–10, 40, 42, 46, 48–49** hamowały wzrost min. trzech szczepów bakterii Gram-dodatnich w stężeniu niższym (MIC $< 0,49$ $\mu\text{g/ml}$) niż szczepów prątków gruźlicy (MIC 1–16 $\mu\text{g/ml}$). Ponadto, w przypadku obu szczepów z rodzaju *Staphylococcus* były bardziej aktywne niż lek referencyjny (MIC 0,98 $\mu\text{g/ml}$). Związki **36–37, 39, 43–44, 50**, z pominięciem szczepu *E. faecalis*, hamowały wzrost szczepów bakterii Gram-dodatnich w stężeniach 0,49–15,6 $\mu\text{g/ml}$. Bakterie Gram-ujemne, a szczególnie szczep *P. mirabilis* (MIC 62, 5 $\mu\text{g/ml}$) wykazały wrażliwość jedynie wobec związku **8** i **10**. Aktywność fungistyczną, dobrą do umiarkowanej (MIC 7,8–62,5 $\mu\text{g/ml}$), stwierdzono dla sześciu pochodnych (**8–10, 42, 44, 46**).

Tabela 49. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny **8–10, 36, 37, 39–50**

Nr związku	8	9	10	36	37	39	40	41	42
Szczep	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
Bakterie G(+)									
<i>B. subtilis</i>	0,98	<0,49	<0,49	7,8	3,9	3,9	<0,49	>1000	0,98
<i>B. cereus</i>	0,98	<0,49	<0,49	7,8	15,6	7,8	7,8	>1000	7,8
<i>M. luteus</i>	<0,49	<0,49	<0,98	7,8	15,6	7,8	<0,49	>1000	0,49
<i>S. aureus</i>	<0,49	<0,49	<0,49	7,8	7,8	7,8	<0,49	>1000	0,49
<i>S. epidermidis</i>	<0,49	<0,49	<0,49	3,9	1,95	1,95	<0,49	>1000	0,49
<i>E. faecalis</i>	7,8	15,6	125	>1000	>1000	>1000	7,8	>1000	7,8
Bakterie G(-)									
<i>E. coli</i>	250	1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i>	250	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	1000	1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. mirabilis</i>	62,5	500	62,5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. typhimurium</i>	250	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Drożdże									
<i>C. parapsilosis</i>	7,8	62,5	7,8	1000	>1000	>1000	1000	1000	31,3
<i>C. albicans</i>	7,8	7,8	7,8	500	1000	250	250	1000	31,3
<i>C. glabrata</i>	7,8	250	15,6	1000	>1000	>1000	>1000	1000	15,6

Nr związku	43	44	45	46	47	48	49	50	
Szczep MIC (µg/ml)									
Bakterie G(+)									VAN
<i>B. subtilis</i>	7,8	1,95	>1000	0,98	>1000	<0,49	<0,98	0,98	0,24
<i>B. cereus</i>	7,8	1,95	>1000	7,8	>1000	3,9	1,95	3,9	0,98
<i>M. luteus</i>	0,98	1,95	>1000	0,49	125	<0,49	<0,49	1,95	0,12
<i>S. aureus</i>	1,95	0,49	>1000	0,49	259	<0,98	<0,49	1,95	0,98
<i>S. epidermidis</i>	0,98	0,49	>1000	0,49	31,3	<0,49	<0,49	0,98	0,98
<i>E. faecalis</i>	15,6	7,8	>1000	7,8	>1000	7,8	7,8	7,8	1,95
Bakterie G(-)									CIP
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	0,02
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,12
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	0,49
<i>P. mirabilis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,03
<i>S. typhimurium</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,06
Drożdże									NYT
<i>C. parapsilosis</i>	1000	7,8	>1000	31,3	>1000	1000	1000	500	0,24
<i>C. albicans</i>	1000	15,6	>1000	31,3	>1000	1000	>1000	500	0,48
<i>C. glabrata</i>	>1000	125	>1000	15,6	>1000	1000	500	500	0,24

Związki należące do grupy 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny **52–55**, **57–60** (Tabela 50) odznaczają się najszerszym spektrum działania. Szczególnie związek **53**, wykazujący bardzo silną zdolność inhibicji wzrostu bakterii Gram-dodatnich (MIC 0,12–1,95 µg/ml) i drożdży (MIC 0,98–3,9 µg/ml) oraz od umiarkowanej do dość niskiej (MIC 62,5–250 µg/ml) bakterii Gram-ujemnych, wyróżniał się na tle pozostałych. Podobnie jak w poprzednich badanych grupach najwyższą wrażliwość wykazały bakterie Gram-dodatnie, których wzrost w zdecydowanej większości hamowany był w zakresie stężeń MIC 0,06–3,9 µg/ml, podczas gdy MIC wobec *M. tuberculosis* wynosił 0,5–8 µg/ml. Rozpatrując aktywność jedynie wobec bakterii Gram-dodatnich należy zwrócić uwagę na związek **59** (**R**¹ = piperidyna, **R**² = piperidyna), który okazał się być najaktywniejszy (MIC 0,06–0,12 µg/ml), tym samym odnosząc całkowicie odwrotny efekt w porównaniu z jego analogiem (**45**) podstawionym w pozycji C6 (MIC ≥1000 µg/ml) oraz osiągając od 2 do 16-krotnie niższą wartość MIC, w zależności od szczepu, niż lek referencyjny. Mimo zróżnicowania pod kątem aktywności wszystkie pochodne wywierały również wpływ na szczepy drożdży (MIC 0,98–250 µg/ml) oraz, z wyłączeniem dwóch związków, szczepy bakterii Gram-ujemnych (MIC 31,3–500 µg/ml).

Tabela 50. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny **52–55, 57–60**

Nr związku	52	53	54	55	57	58	59	60	
Szczep MIC (µg/ml)									
Bakterie G(+)									VAN
<i>B. subtilis</i>	1,95	0,12	0,12	0,98	0,98	1,95	0,12	0,98	0,24
<i>B. cereus</i>	15,6	0,98	0,98	1,95	1,95	1,95	0,12	3,9	0,98
<i>M. luteus</i>	1,95	0,12	0,12	1,95	0,49	0,24	0,06	0,49	0,12
<i>S. aureus</i>	3,9	0,49	0,98	1,95	1,95	1,95	0,06	3,9	0,98
<i>S. epidermidis</i>	1,95	0,12	0,24	0,98	0,98	0,98	0,06	0,98	0,98
<i>E. faecalis</i>	>1000	1,95	1,95	62,5	3,9	1,95	0,12	3,9	1,95
Bakterie G(-)									CIP
<i>E. coli</i>	>1000	125	>1000	125	125	250	500	250	0,02
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	250	>1000	250	250	125	1000	250	0,12
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	125	>1000	125	125	125	500	250	0,49
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	31,3	62,5	250	250	0,03
<i>S. typhimurium</i>	>1000	62,5	>1000	62,5	125	125	500	250	0,06
Drożdże									NYT
<i>C. parapsilosis</i>	15,6	1,95	7,8	7,8	31,3	62,5	250	31,3	0,24
<i>C. albicans</i>	15,6	0,98	31,3	3,9	31,3	62,5	250	62,5	0,48
<i>C. glabrata</i>	15,6	3,9	62,5	7,8	31,3	31,3	250	15,6	0,24

Wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla 2,6-dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny **75, 80, 84, 88** zestawiono w tabeli 51. Związki **84** (R^2 = pirolidyna) i **88** (R^2 = piperidyna) nie wykazały wpływu wobec żadnego z testowanych szczepów mikroorganizmów (MIC \geq 1000 µg/ml). Natomiast związek **80** (R^2 = morfolina) hamował jedynie wzrost szczepu *C. parapsilosis* w bardzo wysokim stężeniu MIC 500 µg/ml. Wszystkie trzy związki cechują się zatem selektywnością działania wobec *M. tuberculosis*. Jest to dość zaskakujący wynik, ponieważ pochodne te zawierają w strukturze znany z szerokiego spektrum działania mikrobiologicznego podstawnik 5-nitrofurylowy. Warto zwrócić uwagę, iż związki **84** i **88** były wobec prątków gruźlicy najaktywniejsze w grupie (MIC 0,5–1 µg/ml). Siła inhibicji pochodnej **75** wobec szczepu *B. subtilis*, *S. aureus* i *S. epidermidis* (MIC 7,8–15,6 µg/ml) była większa niż wobec szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv (MIC 16 µg/ml).

Tabela 51. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa 2,6-dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny **75, 80, 84, 88**

Nr związku	75	80	84	88	
Szczep MIC (µg/ml)					
Bakterie G(+)					VAN
<i>B. subtilis</i>	15,6	>1000	>1000	>1000	0,24
<i>B. cereus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,98
<i>M. luteus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,12
<i>S. aureus</i>	7,8	>1000	>1000	>1000	0,98
<i>S. epidermidis</i>	7,8	>1000	>1000	>1000	0,98
<i>E. faecalis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	1,95
Bakterie G(-)					CIP
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,02
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,12
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,49
<i>P. mirabilis</i>	-	>1000	>1000	>1000	0,03
<i>S. typhimurium</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,06
Drożdże					NYT
<i>C. parapsilosis</i>	250	500	>1000	1000	0,24
<i>C. albicans</i>	500	>1000	>1000	1000	0,48
<i>C. glabrata</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	0,24

Żaden ze związków z grupy 2,6- i 2,4-dipodstawionych iminowych pochodnych pirydyny **96, 100, 84, 104, 107, 112, 116** (Tabela 52) nie uzyskał w pełni pożądanego efektu selektywności. Przykładowo, pochodne **100** i **104** w stopniu umiarkowanym (MIC 125 µg/ml), a pochodna **108** w stopniu dość wysokim (MIC 7,8 µg/ml) hamowały wzrost szczepu *C. parapsilosis*. Wrażliwość wobec związków **96, 107** i **112** wykazały, w różnej konfiguracji, trzy szczepy bakterii Gram-dodatnich (MIC 1,95–31,3 µg/ml), a w przypadku związku **96** również drożdży (MIC 7,8–15,6 µg/ml). Najbardziej skuteczny z wszystkich grup pochodnych iminowych wobec prątków gruźlicy związek **116**, okazał się być również najaktywniejszy wobec innych testowanych drobnoustrojów. Jego aktywność przeciwbakteryjna w stosunku do szczepu *B. cereus*, *S. aureus* i *S. epidermidis* była na poziomie charakteryzującym wankomycynę.

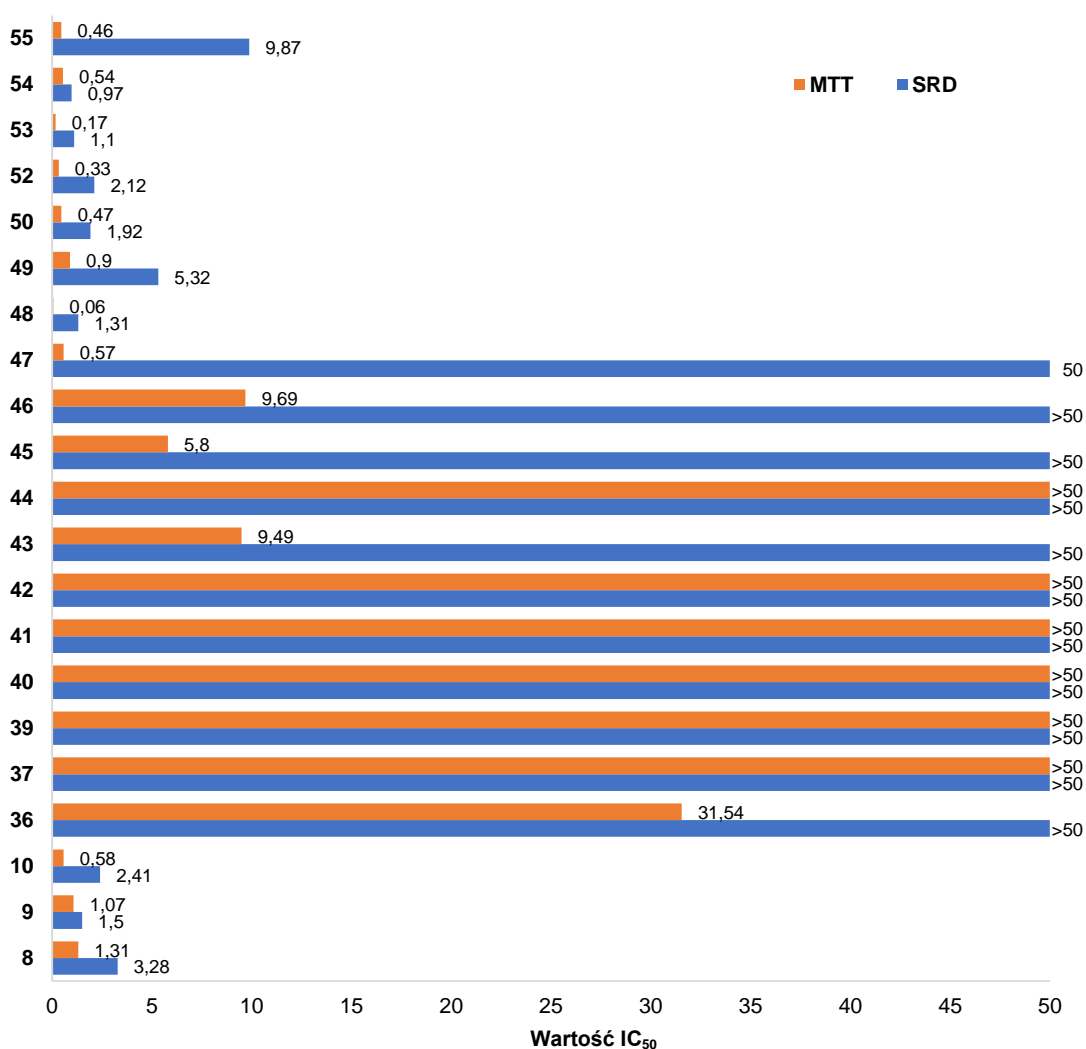
Tabela 52. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa 2,6- i 2,4-dipodstawionych iminowych pochodnych pirydyny **96, 100, 84, 104, 107, 112, 116**

Nr związku	96	100	104	107	108	112	116	
Szczep MIC (µg/ml)								
Bakterie G(+)								VAN
<i>B. subtilis</i>	-	-	250	7,8	-	31,3	1,95	0,24
<i>B. cereus</i>	7,8	500	>1000	>1000	>1000	31,3	0,98	0,98
<i>M. luteus</i>	>1000	1000	125	>1000	>1000	500	>1000	0,12
<i>S. aureus</i>	7,8	1000	>1000	7,8	>1000	31,3	0,98	0,98
<i>S. epidermidis</i>	1,95	1000	>1000	7,8	>1000	125	0,49	0,98
<i>E. faecalis</i>	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,95
Bakterie G(-)								CIP
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,02
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,12
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,49
<i>P. mirabilis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,03
<i>S. typhimurium</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,06
Drożdże								NYT
<i>C. parapsilosis</i>	15,6	125	125	125	15,6	>1000	7,8	0,24
<i>C. albicans</i>	15,6	250	500	125	>1000	>1000	15,6	0,48
<i>C. glabrata</i>	7,8	1000	1000	>1000	>1000	>1000	15,6	0,24

5.3. Aktywność cytotoksyczna

Spośród najbardziej rokujących związków pod względem aktywności wobec *M. tuberculosis*, wytypowano część do oceny ich aktywności cytotoksycznej. Oznaczenie cytotoksyczności nowo zsyntezowanych związków w hodowlach *in vitro* jest niezbędne do określenia prawidłowego działania oraz bezpieczeństwa potencjalnego leku. Badanie przeprowadzono w firmie Sunny BioDiscovery w Santa Paula, CA, USA przy wykorzystaniu dwóch metod: MTT oraz SRB. Test MTT służy do pomiaru metabolizmu mitochondrialnego oraz aktywności łańcucha oddechowego komórek, natomiast test SRB jest wyznacznikiem ilości białek w komórkach żywych [201]. Do badania wykorzystano nienowotworogenną, unieśmiertelnioną linię komórkową keratynocytów ludzkich (ang. *homo sapiens aneuploid immortal keratinocyte*, HaCaT). Atrakcyjność modelu komórkowego HaCaT wynika z zachowania fizjologicznych właściwości pierwotnych keratynocytów, np. potencjału do różnicowania, a także z wiarygodności i powtarzalności wyników [202]. Miarą aktywności cytotoksycznej jest wartość IC₅₀ (ang. *half-maximal inhibitory concentration*), a więc stężenie testowanego związku niezbędne do zahamowania proliferacji/żywności komórek w 50%.

Spośród związków o strukturze tiosemikarbazonu przetestowane zostały wszystkie najaktywniejsze wobec prątków gruźlicy 2,6-dipodstawione pochodne pirydyny **8–10**, **36–37**, **39–50** oraz 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny z zachowanym atomem chloru **52–55**. Wartości parametru IC_{50} zawierały się w zróżnicowanym zakresie od 0,06 do ponad 50 $\mu\text{g/ml}$ (Rys. 83). Dla 15 z 21 pochodnych zarejestrowano wyższy efekt cytotoksyczny w przypadku zastosowania metody MTT, w zestawieniu z metodą SRB ($IC_{50}(\text{MTT}) < IC_{50}(\text{SRB})$). 10 związków wykazało silniejsze hamowanie wzrostu komórek nienowotworowych niż komórek bakteryjnych minimum jednego ze szczepów. Przykładowo, dla związku **53** wartość IC_{50} wyznaczona metodą MTT wynosiła 0,54 $\mu\text{g/ml}$, a metodą SRB 0,97 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy jego wartość MIC wobec szczepu H₃₇Rv równa była 2 $\mu\text{g/ml}$, a wobec szczepu Spec. 210 0,5 $\mu\text{g/ml}$.



Rys. 83 Aktywność cytotoksyczna tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny

Z uwagi, iż wytypowane związki wykazywały różne stężenia hamujące w stosunku do szczepu referencyjnego oraz opornego *M. tuberculosis*, a także rozpatrywane są aktywności cytotoksyczne wyznaczone na podstawie dwóch różnych testów postanowiono wyznaczyć ich wskaźniki selektywności (Tabela 53). Wskaźnik selektywności definiowany jest jako iloraz wartości IC_{50} wyznaczonego w stosunku do badanej linii komórkowej HaCaT za pomocą każdej z metod oraz wartości MIC względem każdego szczepu prątków gruźlicy. Za niewywołujące toksycznego efektu uważa się związki, dla których SI wynosi powyżej wartości 1. Analiza wyliczonych współczynników selektywności pozwoliła podzielić związki na trzy grupy. Do pierwszej należą związki silnie cytotoksyczne (**10**, **47–53**, **55**). Mimo iż w niektórych przypadkach obserwujemy sytuację, w której metabolizm komórek eukariotycznych zostaje zwolniony bądź następuje ich przestawienie na glikolizę ($SI_{MTT} < 1$), jednak z zachowaniem pełnej żywotności komórek ($SI_{SRB} > 1$), to jest to wciąż niepożądany wynik. W drugiej grupie można wyróżnić pochodne **8**, **9**, **54**, które wykazują cytotoksyczność w stężeniu stosowanym wobec szczepu referencyjnego *M. tuberculosis*, natomiast nie wywołują toksycznego działania w stężeniu niezbędnym do zahamowania wzrostu szczepu opornego. Ostatnia grupa (**36**, **37**, **39–46**) to związki całkowicie bezpieczne dla komórek nienowotworowych, dla których wartości współczynnika selektywności, zarówno wobec obu metod, jak i obu wyznaczonych stężeń hamujących wzrost prątków gruźlicy, zawierały się w zakresie od 1,19 do ponad 100.

Zauważono pewną tendencję pomiędzy aktywnością cytotoksyczną związków z tej grupy, a ich budową strukturalną. Toksyczny efekt wywoływały wszystkie związki posiadające ugrupowanie fenoksylowe w pozycji C6 pierścienia pirydyny bądź atom chloru, zarówno w pozycji C6, jak i C4. Działanie to było niezauważalne w obecności związków z aminami cyklicznymi przy pierścieniu pirydyny. Obok pochodnych z atomem chloru, najaktywniejsze wobec *M. tuberculosis* były pochodne zawierające w obu podstawieniach w różnej konfiguracji pierścień pirolidyny i piperidyny **40–41**, **44–45**. Z punktu widzenia całościowej analizy aktywności biologicznej najistotniejszy jest brak działania cytotoksycznego związków **41** i **45**, które obok silnej aktywności przeciwprątkowej wykazały się również brakiem aktywności wobec innych testowanych drobnoustrojów. Pochodna **45** hamowała wzrost prątków od 2,9 do ponad 100 razy silniej niż proliferację/żywotność komórek linii HaCaT.

Tabela 53. Współczynniki selektywności wyznaczone dla tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny

Nr	SI IC ₅₀ HaCaT/ MIC MT H ₃₇ Rv		SI IC ₅₀ HaCaT/ MIC MT Spec. 210	
	MTT	SRB	MTT	SRB
8	0,66	1,64	1,31	3,28
9	0,54	0,75	1,07	1,50
10	0,04	0,15	0,15	0,60
36	1,97	>3,13	7,89	>12,50
37	>3,13	>3,13	>12,50	>12,50
39	>3,13	>3,13	>12,50	>12,50
40	>25,00	>25,00	>50,00	>50,00
41	>12,50	>12,50	>50,00	>50,00
42	>3,13	>3,13	>12,50	>12,50
43	1,19	>6,25	9,49	>50,00
44	>25,00	>25,00	>100,00	>100,00
45	2,90	>25,00	11,60	>100,00
46	1,21	6,25	2,42	12,50
47	0,07	6,25	0,14	12,50
48	0,01	0,16	0,02	0,33
49	0,11	0,67	0,23	1,33
50	0,03	0,12	0,06	0,24
52	0,08	0,53	0,17	1,06
53	0,04	0,28	0,17	1,10
54	0,27	0,49	1,08	1,94
55	0,06	1,23	0,06	1,23

Testom aktywności cytotoksycznej poddano również wybrane pochodne iminowe (**76, 96, 100, 107, 108, 112, 116**). Dla wszystkich z nich wartość IC₅₀ wyznaczona przy pomocy obu metod wynosiła powyżej 50 µg/ml, podczas gdy wartość MIC wobec *M. tuberculosis* najmniej aktywnego z nich 16 µg/ml, a najbardziej 0,25 µg/ml. Wyznaczone współczynniki selektywności zawierały się w zakresie od powyżej 3,13 do powyżej 200, co świadczy o braku cytotoksyczności testowanych pochodnych (Tabela 54). Niestety badanie nie zostało przeprowadzone dla związków **84, 88 i 104**, które razem ze związkami **108 i 116** były najbardziej rokującymi przedstawicielami z grupy pochodnych o strukturze imin, w tym szczególnie pochodnych **84 i 88**, które wykazywały najsilniejsze działanie tuberkulostatyczne oraz brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Z uwagi na dysponowanie wynikami dla ich analogów strukturalnych **73–76, 93–95, 97, 105, 106, 109, 110, 113–115**, które jednoznacznie wskazały na brak efektu cytotoksycznego (IC₅₀ > 50 µg/ml) pochodnych iminowych, w tym także tych z podstawieniem ugrupowaniem fenoksyłowym bądź atomem chloru, można jedynie

przypuszczać, że również nieprzetestowane cząsteczki będą nietoksyczne wobec komórek eukariotycznych.

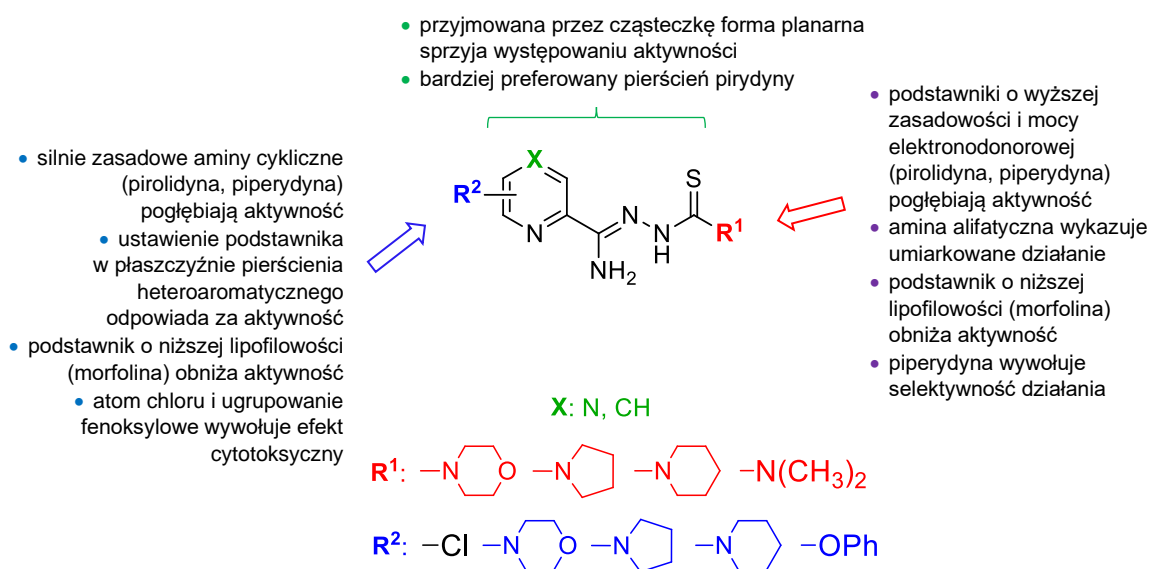
Tabela 54. Współczynniki selektywności wyznaczone dla pochodnych iminowych

Nr	SI IC ₅₀ HaCaT/ MIC MT H ₃₇ Rv	SI IC ₅₀ HaCaT/ MIC MT Spec. 210
	MTT/SRB	MTT/SRB
75	>3,13	>12,5
96	>12,5	>12,5
100	>25	>25
107	>12,5	>50
108	>50	>50
112	>6,25	>25
116	>200	>100

6. ANALIZA STRUKTURA-AKTYWNOŚĆ

Ostatnim etapem zaplanowanych badań było przeprowadzenie analizy zależności struktura-aktywność w obrębie poszczególnych grup zsyntezowanych związków. Pod uwagę wzięto również struktury krystaliczne uzyskane dla części pochodnych. Obok aktywności przeciwpłatkowej uwzględniono aktywność przeciwdrobnoustrojową i cytotoksyczną. Przeprowadzona analiza SAR pozwoliła na wskazanie czynników strukturalnych oraz parametrów cząsteczkowych odpowiedzialnych za aktywność związków oraz wyłonienie struktur wiodących do dalszych badań nad rozwojem leków przeciwpłatkowych.

Pierwszą grupą związków wziętych pod uwagę były 3 serie o strukturze tiosemikarbazonu: 2,6-dipodstawione pochodne pirazyny, 2,6-dipodstawione pochodne pirydyny oraz 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny. Analizy dokonano pod kątem trzech jednostek strukturalnych (Rys. 84).



Rys. 84 Analiza struktura-aktywność przeciwpłatkowa pochodnych tiosemikarbazonowych

Pierwszą jednostkę stanowił pierścień heteroaromatyczny połączony fragmentem amidrazonowym z ugrupowaniem tiosemikarbazonowym. Potwierdzono, iż pochodne pirazyny i pirydyny mogące tworzyć duże płaskie układy stabilizowane poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe (forma zwitterionowa) charakteryzują się działaniem przeciwpłatkowym. Pochodne pirazyny były mniej aktywne niż pochodne pirydyny. Może to wynikać z faktu, iż pirazyna jest mniej zasadowa niż pirydyna, a jej dodatkowy atom azotu bierze udział, jako akceptor, w tworzeniu dodatkowych

międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Najczęściej obserwowanym typem występujących międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, również w przypadku związków najaktywniejszych, są układy łańcuchowe (N4—H4···S1), odpowiedzialne za warstwowe upakowanie cząsteczek.

Kolejną jednostką strukturalną poddaną analizie było podstawienie w pozycji **R²**. Zauważono szczególny wpływ na inhibicję wzrostu prątków gruźlicy w obecności atomu chloru oraz pierścienia pirolidyny i/lub piperydyny w pozycji C6 lub C4 pierścienia heteroaromatycznego (**4, 5, 8, 9, 29, 40, 41, 44, 45, 53, 54, 58, 59**). Atom chloru jest podstawnikiem o najniższej masie cząsteczkowej i jako jedyny wykazuje właściwości elektronoakceptorowe. Natomiast pirolidyna i piperydyna są podstawnikami najbardziej zasadowymi. Ponadto, analiza struktur krystalicznych z tymi podstawieniami (**40, 44, 58**) dowiodła, iż wykazują one najniższe odchylenia od płaszczyzny pierścienia pirydyny w porównaniu z innymi podstawnikami w tej pozycji. To z kolei poszerza planarność cząsteczki i udawania słuszność założonej w celu pracy hipotezy badawczej. Ugrupowanie fenoksylove to podstawnik o najwyższej masie cząsteczkowej i najwyższej lipofilowości, a związki zawierające jego fragment (**31, 33, 34, 47–50**) w strukturze charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością wobec *M. tuberculosis*. Negatywny wpływ na aktywność tuberkulostatyczną obserwuje się również w obecności najmniej lipofilowej morfoliny występującej w pozycji 6 pierścienia heteroaromatycznego (**19–22, 35–38**). W przypadku całkowicie nieaktywnych pochodnych pirazynowych (**21, 22**) atom tlenu pierścienia morfolinowego bierze udział w formowaniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Brak tego typu wiązania wodorowego dla pochodnej pirydynowej (**36**) powoduje wzrost aktywności do umiarkowanej.

Oceniano także wpływ na działanie tuberkulostatyczne rodzaju aminy podstawionej w terminalnej pozycji łańcucha bocznego (**R¹**). Poza jednym przypadkiem (**6**) obecność aminy alifatycznej wiązała się z umiarkowaną zdolnością pochodnych do inhibicji wzrostu komórek bakteryjnych. Również w tym położeniu pierścień morfoliny wydaje się wpływać niekorzystnie na aktywność związków, co jest szczególnie zauważalne w przypadku pochodnych pirazynowych (**3, 19, 23, 27, 31**). Wyżej wykazaną zależność pomiędzy uczestnictwem atomu tlenu morfoliny w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych a aktywnością związków spełniały pochodne **23, 27, 39** i **43**, natomiast nie spełniały pochodne **3** i **47**. W przypadku umiarkowanie aktywnej pochodnej **47** tworzenie się wiązań z atomem tlenu morfoliny może być związane z wbudowanymi w strukturę krystaliczną dwiema cząsteczkami wody, które determinują inny niż najczęściej

występujący typ wiązań wodorowych. Natomiast, mimo braku tworzących się wiązań wodorowych typu N—H···O, za brak aktywności pochodnej **3** może odpowiadać przyjmowana przez nią forma neutralna. Dowiedziono jednak, iż występowanie związku w ciele stałym w formie neutralnej nie jest czynnikiem wykluczającym jego aktywność. W formie neutralnej krystalizował również silnie aktywny związek **5**. Jednak w tym przypadku znaczenie prawdopodobnie ma obecność pierścienia piperydynowego w pozycji **R¹**. Zauważono bowiem szczególnie istotny wpływ podstawnika piperydynowego (**5**, **9**, **29**, **41**, **45**, **54**, **59**) i pirolidynowego (**4**, **8**, **9**, **29**, **40**, **44**, **53**, **58**) w łańcuchu tiosemikarbazonowym na aktywność przeciwprątkową. Warto zwrócić uwagę, iż piperydyna i pirolidyna o zbliżonej zasadowości są bardziej zasadowe niż morfolina i dimetyloamina. Charakteryzują się również wyższą lipofilowością. Ponadto piperydyna i pirolidyna wykazują silniejsze właściwości elektronodonorowe w porównaniu z morfoliną.

Podsumowując, dla pochodnych tiosemikarbazonowych szczególne znaczenie dla zdolności do inhibicji wzrostu prątków gruźlicy mają: atom chloru oraz pierścien pirolidyny i piperydyny w pozycji **R²**, a także te same aminy cykliczne w pozycji **R¹**. Dowiedziono, iż związki zawierające atom chloru są cytotoksyczne wobec komórek eukariotycznych. Podobną zależność zauważono w obecności ugrupowania fenoksylogo. Uzupełnienie badań biologicznych o aktywność przeciwdrobnoustrojową pozwoliło na wyłonienie dwóch struktur wiodących wśród 2,6-dipodstawionych pochodnych pirydyny. Związki zawierały w pozycji **R¹** piperydynę, a w pozycji **R²** pirolidynę (**41**) lub piperydynę (**45**), przy czym związek **45** cechował się wyższą aktywnością wobec *M. tuberculosis*.

Mając na uwadze brak cytotosyczności wywoływanej przez aminy cykliczne w pozycji **R²** oraz selektywność wobec prątków gruźlicy pierścienia piperydyny w pozycji **R¹** wytypowano 9 związków, dla których poszerzono analizę SAR o wyznaczenie metodami chemii obliczeniowej wartości log*P*, wartości energii całkowitej obu możliwych do przyjęcia przez związki form oraz map potencjału elektrostatycznego (Tabela 55, Rys. 85). Wśród związków znalazło się 7 zsyntezowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej (**27–29**, **43–45**, **59**) oraz 2 otrzymane przez Krause stanowiące uzupełnienie serii 2,4-dipodstawionych pochodnych pirydyny o podstawienie morfoliną (**DMK-20**) i pirolidyną (**DMK-16**) w pozycji **R²** [157].

Analizując zależność pomiędzy aktywnością a lipofilowością, związki podzielono na trzy grupy: 2,6-podstawione pochodne pirazyny, 2,6-dipodstawione pochodne pirydyny,

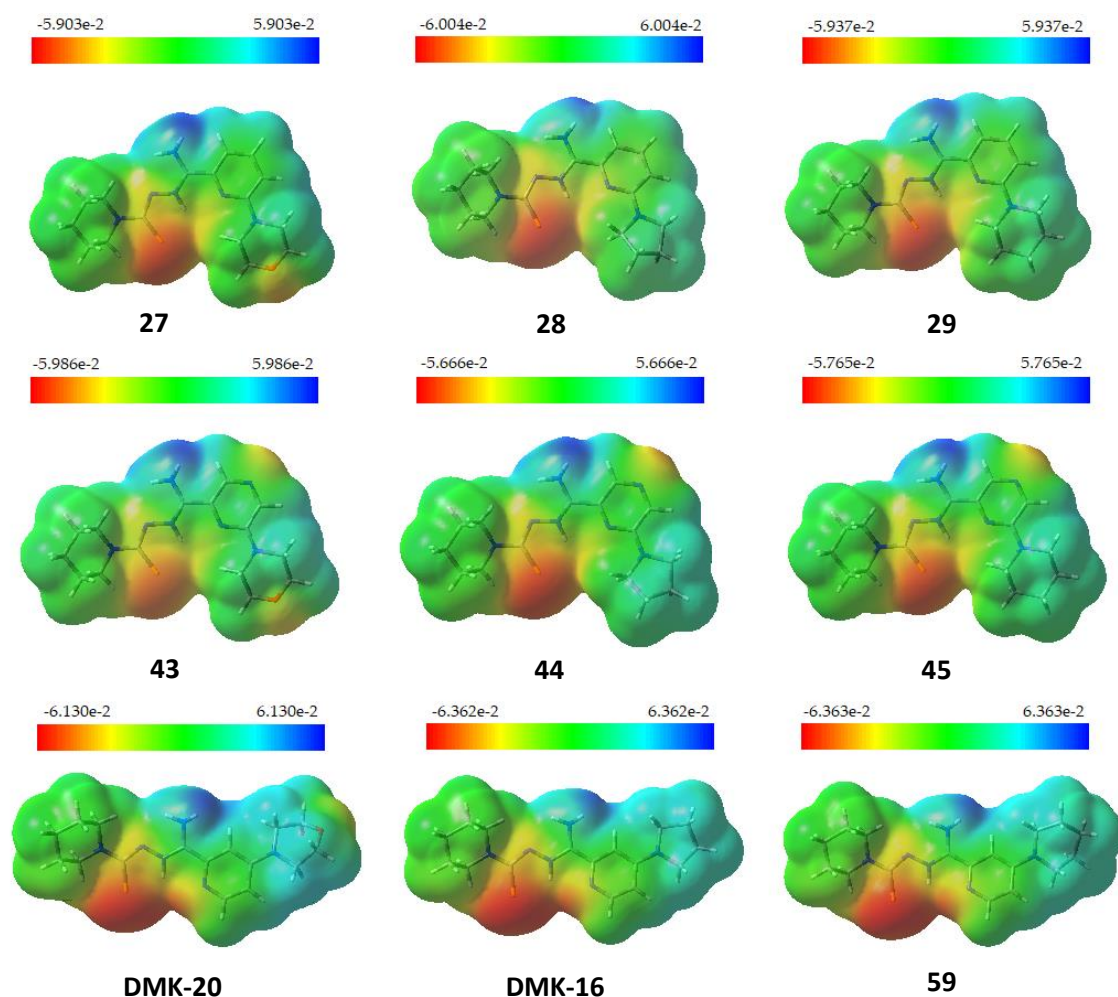
i 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny. W każdej z nich zauważono, że im silniejsze działanie przeciwpłatkowe, tym wyższa wartość $\log P$. Jak już wspomniano, ze względu na specyficzną strukturę ściany komórkowej *M. tuberculosis* leki powinny być odpowiednio lipofilowe, aby zwiększyć ich przepuszczalność i wchłanianie oraz silniejsze wiązanie z błoną/białkiem. Jednakże zbyt duża lipofilowość pociąga za sobą niższą rozpuszczalność, co w połączeniu z intensywnym metabolizmem pierwszego przejścia może prowadzić do niskiej biodostępności leku. Optymalna wartość $\log P$ dla leków przeciwgruźliczych mieści się w przedziale 1,3–4,1, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami [203]. Jedyne związki niespełniające tej zasady (**27**) nie jest aktywny wobec *M. tuberculosis*.

Tabela 55. Obliczona wartość energii całkowitej form neutralnych (E_n), energii całkowitej form zwitterionowych (E_z) oraz współczynnika podziału ($\log P$) dla związków **27–29**, **43–45**, **DMK-20**, **DMK-16**, **59**

Nr	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	E_n (a.u.)	E_z (a.u.)	$\log P$
27	>512	-1442,11	-1442,13	0,85
28	256	-1366,91	-1366,93	1,57
29	4	-1406,22	-1406,24	1,99
43	16	-1426,07	-1426,10	2,19
44	4	-1350,89	-1350,90	2,91
45	2	-1390,18	-1390,21	3,32
DMK-20	6,25	-1426,07	-1426,08	1,48
DMK-16	6,25	-1350,87	-1350,89	2,19
59	2	-1390,18	-1390,20	2,61

Z uwagi, iż obliczenia *ab initio* DFT (Gaussian 9, poziom obliczeniowy B3LYP/6-31G(d,p)), wykazały iż niezależnie od związku niższym energetycznie modelem jest struktura zwitterionowa, dla takich form wyznaczono rozkład potencjału elektrostatycznego. Struktura krystaliczna pochodnej **27** potwierdziła występowanie związku w formie obojnaczej. Na pokazanych powierzchniach potencjału elektrostatycznego kolor czerwony odpowiada fragmentowi struktury o największej gęstości elektronowej, natomiast kolor niebieski reprezentuje obszar o najniższej gęstości elektronowej. Cechą wspólną wszystkich pochodnych jest akumulacja ładunku ujemnego w obrębie elektroujemnego atomu siarki i ładunku dodatniego na jednym z protonów grupy $-\text{NH}_2$. Ponadto, mapy pokazują, że potencjały obszaru ujemnego znajdują się w obrębie atomu tlenu morfoliny (**27**, **43**, **DMK-20**), drugiego atomu azotu pierścienia

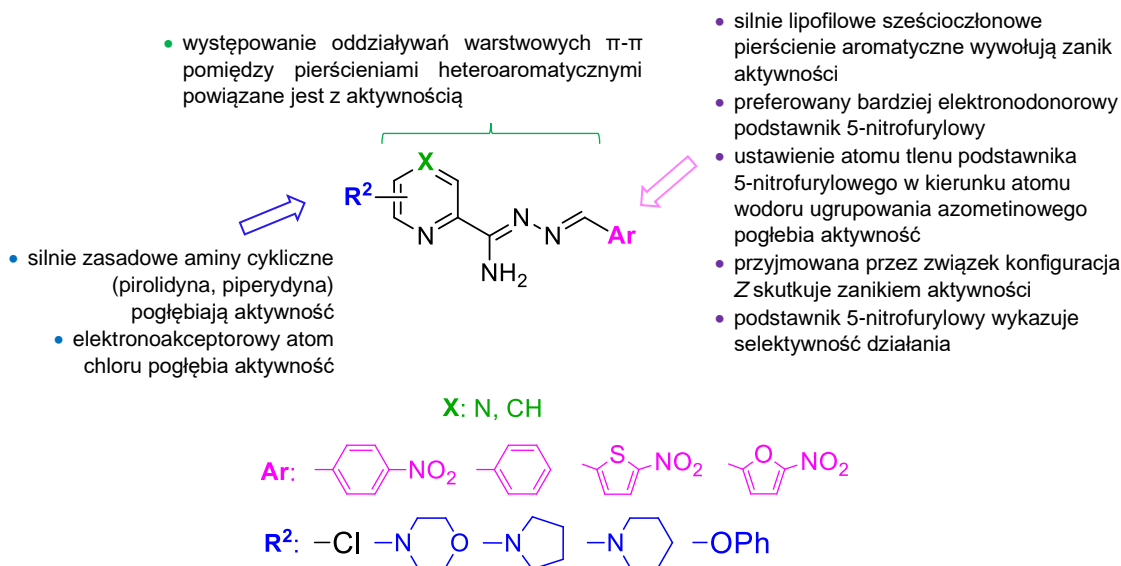
pirazyny (**43–45**) i atomu azotu pierścienia 2,4-dipodstawionej pirydyny (**DMK-20, DMK-16, 59**). Z kolei obszary potencjału dodatniego są zlokalizowane wokół 4-podstawionej aminy cyklicznej. Efekt ten jest mniej wyraźny w 6-podstawionych pochodnych pirazyny ze względu na skręcenie cząsteczki i zniesienie ładunku przez atom siarki i drugi atom azotu pierścienia pirazyny. W przypadku 6-podstawionych pochodnych pirydyny ładunek dodatni jest rozproszony w kierunku atomów wodoru pierścienia pirydynowego. Mapy potencjału elektrostatycznego mogą dostarczyć cennych informacji o właściwościach elektrycznych cząsteczek, a te z kolei mogą być użyteczne podczas budowania farmakoforów [204].



Rys. 85 Mapy molekularnego potencjału elektrostatycznego związków **27–29, 43–45, DMK-20, DMK-16, 59**

Drugą grupę związków stanowiły 3 serie o strukturze imin podstawionych w pozycjach 2,6 pierścienia pirazyny, 2,6 pierścienia pirydyny oraz 2,4 pierścienia

pirydyny (Rys. 86). Również w tym przypadku analizy dokonano pod kątem trzech jednostek strukturalnych.



Rys. 86 Analiza struktura-aktywność przeciwpłatkowa pochodnych iminowych

Jednostka pierwsza obejmowała ugrupowanie iminowe związane łącznikiem amidrazonowym z pierścieniem heterocyklicznym w pozycji C2. Udowodniono, iż w stanie krystalicznym zachowana jest planarność całych cząsteczek, natomiast omawiany fragment stabilizowany jest wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi. Jedynie w przypadku związku **93** obserwujemy skręt przy wiązaniu azometinowym, jednak nie można określić jego wpływu na aktywność przeciwpłatkową ze względu na fakt, iż zarówno ten, jak i inne związki o analogicznych podstawieniach jej nie wykazywały. Powtarzającym się typem występujących międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, również w przypadku związków najaktywniejszych, są układy łańcuchowe (N4—H4···N3). Ponadto dla dwóch silnie aktywnych związków (**80**, **116**) wykazano obecność oddziaływań warstwowych π - π pomiędzy pierścieniami heteroaromatycznymi.

Najsilniejszy wpływ na inhibicję wzrostu pratków gruźlicy zaobserwowano w obecności pirolidyny i piperidyny w pozycji C6 (**R²**) pierścienia pirazyny i pirydyny oraz w obecności atomu chloru w pozycji C4 pierścienia pirydyny. Te same podstawienia wyróżniały się w przypadku pochodnych tiosemikarbazonowych.

Podstawienie pozycji sześciocłonowymi pierścieniami aromatycznymi silnie zwiększającymi lipofilowość cząsteczek skutkowało zanikiem aktywności tuberkulostatycznej. Natomiast jej wzrost obserwowano w przypadku obecności ugrupowania 5-nitrofurylowego (**80**, **84**, **88**, **96**, **100**, **104**, **108**, **112**, **116**) oraz niekiedy

5-nitrotiofenowego (**75**, **91**, **107**). Podstawnik 5-nitrofurylowy wykazuje silniejsze właściwości elektronodonorowe niż podstawnik 5-nitrotiofenowy oraz najbardziej zbliżoną lipofilowość do pirolidyny i piperydyny, które jak udowodniono wyżej miały silny wpływ jako podstawnik w pozycji **R¹** łańcucha tiosemikarbazonowego. Można przypuszczać, iż za brak aktywności związku **87** zawierającego podstawnik 5-nitrotiofenowy odpowiada przyjęta przez niego konfiguracja Z. Tę samą tendencję zauważono dla zdeponowanego w bazie CSD związku o numerze TAYRUK różniącego się jedynie podstawieniem przy pierścieniu pirydyny [146]. Ponadto na podstawie struktur krystalicznych związków zaobserwowano, iż podstawnik 5-nitrofurylowy występuje w dwóch położeniach różniących się obrotem o 180° wokół wiązania C1-C11. Pogłębioną aktywnością przeciwprątkową cechują się te związki (**84**, **116**), dla których atom tlenu podstawnika zwrócony jest w kierunku azometinowego atomu wodoru. Te samo położenie podstawnika odnotowano dla również aktywnego związku o numerze TAYROE [146].

Reasumując, dla pochodnych iminowych szczególne znaczenie na zdolność do inhibicji wzrostu prątków gruźlicy wywierają: atom chloru oraz pierścień pirolidyny i piperydyny w pozycji **R²**, a także ugrupowanie 5-nitrofurylowe w pozycji **Ar**. Nie wykazano efektu cytotoksycznego wobec komórek HaCaT dla związków poddanych testom. Selektywne działanie wobec prątków gruźlicy okazały się być 2,6-dipodstawione pochodne pirazyny zawierające w pozycji **Ar** ugrupowanie 5-nitrofurylowe, a w pozycji **R²** pirolidynę (**84**) lub piperydynę (**88**). Związki te wytypowane zostały jako struktury wiodące.

7. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

7.1 Synteza

Materiały wyjściowe, odczynniki i rozpuszczalniki użyte w trakcie syntez były firmy Sigma-Aldrich i posiadały czystość analityczną. Czystość związków potwierdzono metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC przy wykorzystaniu jako fazy stacjonarnej płytek aluminiowych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego 60F₂₅₄ o grubości 0,2 mm firmy Merck. Chromatogram rozwijano metodą wstępującą, stosując jedno- oraz dwuskładnikowe eluenty, w tym najczęściej chloroform, octan etylu, octan etylu-chloroform (2:1, 1:1, 1:2, 1:5), aceton-toluen (1:1), chloroform-metanol (1:1). Do wizualizacji plamek wykorzystano lampę UV o stałej długości fali $\lambda=254$ nm i $\lambda=365$ nm.

Niektóre związki poddano procesowi oczyszczania z zastosowaniem kolumnowej chromatografii cieczowej, której fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy firmy Merck o wielkości porów 60 Å i wielkości ziaren 70–230 mesh. Faza ruchoma składała się z układów octan etylu-chloroform (2:1, 1:1, 1:2). Jeden związek oczyszczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Oczyszczanie przeprowadzono na kolumnie Phenomenex Luna C18(2) (rozmiar kolumny: 21,20 x 100 mm; wielkość cząstek: 10 μ m; rozmiar porów: 100 Å). Zastosowano detekcję UV (detektor Flash 10 DAD) przy długości fali 214 nm, a surowy związek eluowano z kolumny w liniowym gradiencie acetonitrylu w wodzie dejonizowanej przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 10,0 ml/min. Obydwa eluenty zawierały dodatek 0,1% (1:1 v/v) HCl. Czyste frakcje (>95%) zebrano i liofilizowano.

Do wyznaczenia temperatury topnienia otrzymanych związków wykorzystano Aparat Stuart SMP30 firmy Bibby Scientific.

Identyfikacja zsyntezowanych związków została przeprowadzona metodami spektroskopowymi, takimi jak spektroskopia w podczerwieni, protonowy i węglowy magnetyczny rezonans jądrowy. Widma IR wykonano metodą transmisyjną przy użyciu spektrofotometru z transformacją Fouriera firmy Thermo Mattson Satellite FTIR. Dla substancji stałych wykorzystano technikę tabletki z KBr, natomiast w przypadku olejów technikę zawiesin olejowych w oleju parafinowym. Pasma na widmach opisane zostały za pomocą następujących symboli: ν – drgania rozciągające, δ – drgania deformacyjne w płaszczyźnie, γ – drgania deformacyjne poza płaszczyzną. Widma ¹H NMR i ¹³C NMR wykonano w DMSO-*d*₆ spektrometrem Varian Unity Plus

przy częstotliwościach odpowiednio 500 MHz i 125 MHz. Do opisanie ich użyto następujących skrótów: s – singlet, sz. s – szeroki singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, t – triplet, m – multiplet.

Widma zmiennotemperaturowe zarejestrowane zostały w CDCl_3 na spektrofotometrze Bruker Avance III 600 MHz wyposażonym w sondę gradientową szerokopasmową typu "inverse" z gradientem w osi Z. Natomiast widma ^{15}N CP MAS zarejestrowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości rotacji 8 kHz, na spektrofotometrze Bruker Avance 400 MHz.

Ponadto, w celu potwierdzenia struktur wykonano analizę elementarną (% C, H, N) przy użyciu analizatora PerkinElmer PE 2400 Series II CHNS/O. Wyniki analizy mieściły się w zakresie $\pm 0,4\%$ wartości teoretycznych.

Metoda syntezy metyloiminoestrów (1, 2)

30 mmoli odpowiedniego nitylu oraz 13 mmoli (2 ml) DBU rozpuszczono w 50 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 0,5 h. Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika i dodaniu lodu do poprzedniej objętości wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

6-Chloropirazyno-2-karbimidan metylu (1)

Reakcja z 6-chloropirazyno-2-karbonitrylem (2,92 ml). Wydajność: 60%; t.t. 76–77°C (metanol); IR (KBr): 3310, 3237 (ν N-H), 3039, 3018 (ν $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 2997, 2949, 2845 (ν C-H), 1653 (ν C=N), 1558 (δ N-H), 1523, 1452, 1426 (ν C=C), 1352 (ν C-N), 1217, 1200 (ν C-O), 1093, 1069 (δ C-H), 883, 859, 760 (γ C-H), 741 (ν C-Cl) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3,91 (s, 3H, CH_3), 8,98 (s, 1H, pirazyna), 8,99 (s, 1H, pirazyna), 9,30 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}$ (171,02): wartości obliczone C, 42,00; H, 3,52; N, 24,49; wartości zmierzone C, 42,18; H, 3,66; N, 24,29.

6-Chloropikolinimidan metylu (2)

Reakcja z 6-chloropikolinonitrylem (4,14 g). Wydajność: 90%; t.t. 65–68°C (metanol); IR (KBr): 3453, 3308 (ν N-H), 3092, 3052, 3004 (ν $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 2950, 2846 (ν C-H), 1649 (ν C=N), 1562 (δ N-H), 1451, 1424, 1410 (ν C=C), 1337, 1264 (ν C-N), 1186, 1156 (ν C-O), 1078 (δ C-H), 874, 841, 811 (γ C-H), 746, 726 (ν C-Cl) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3,89 (s, 3H, CH_3), 7,69 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,81 (d, 1H, pirydyna,

$J = 7,0$ Hz), 8,04 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 9,09 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla $C_7H_7ClN_2O$ (170,02): wartości obliczone C, 49,28; H, 4,14; N, 16,42; wartości zmierzone C, 49,48; H, 3,94; N, 16,66.

Metoda ogólna syntezy tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny i prydyny z atomem chloru w pozycji C6 (3–10)

2,5 mmola odpowiedniego metyloiminoestru oraz 2,5 mmola odpowiedniego karbotiohydrazidu rozpuszczono w 11 ml metanolu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po ochłodzeniu wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

6-Chloro-N'-(morfolino-4-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (3)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbimidanu metylu **1** (0,428 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,403 g). Wydajność: 79%; t.t. 177–180°C (metanol); IR (KBr): 3400, 3304, 3261 (ν N-H), 3052, 3027 (ν C_{Ar} -H), 2973, 2917, 2855 (ν C-H), 1636 (ν C=N), 1591 (δ N-H), 1528, 1476, 1434 (ν C=C), 1359, 1279 (ν C-N), 1172 (ν C=S), 1111 (ν C-O), 1020, 1008 (δ C-H), 886, 848 (γ C-H), 676 (ν C-Cl) cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3,57–3,67 (m, 4H, 2CH₂), 3,85–3,89 (m, 4H, 2CH₂), 6,93 (s, 1H, NH), 8,81 (s, 1H, pirazyna), 9,12 (s, 1H, pirazyna), 9,27 (s, 1H, NH), 12,57 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla $C_{10}H_{13}ClN_6OS$ (300,06): wartości obliczone C, 39,93; H, 4,36; N, 27,94; wartości zmierzone C, 39,98; H, 4,26; N, 27,99.

6-Chloro-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (4)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbimidanu metylu **1** (0,428 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,363 g). Wydajność: 80%; t.t. 176–178°C (metanol); IR (KBr): 3298, 3191 (ν N-H), 3058 (ν C_{Ar} -H), 2965, 2880 (ν C-H), 1648 (ν C=N), 1559 (δ N-H), 1521, 1476, 1438 (ν C=C), 1359, 1334, 1255, 1229 (ν C-N), 1174 (ν C=S), 1035, 1009 (δ C-H), 886, 849 (γ C-H), 684 (ν C-Cl) cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,85 (s, 4H, 2CH₂), 3,74 (s, 4H, 2CH₂), 6,82 (s, 2H, NH₂), 8,78 (s, 1H, pirazyna), 9,13 (s, 1H, pirazyna), 9,43 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla $C_{10}H_{13}ClN_6S$ (284,06): wartości obliczone C, 42,18; H, 4,60; N, 29,51; wartości zmierzone C, 42,10; H, 4,63; N, 29,31.

6-Chloro-N'-(piperydyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (5)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbimidanu metylu **1** (0,428 g) z piperidyno-1-karbotiohydrydem (0,398 g). Wydajność: 45%; t.t. 159–162°C (metanol); IR (KBr): 3377, 3266, 3215, 3132 (ν N-H), 3046 (ν C_{Ar}-H), 2912, 2847 (ν C-H), 1668 (ν C=N), 1601 (δ N-H), 1508, 1486 (ν C=C), 1362, 1299, 1250 (ν C-N), 1164 (ν C=S), 1065 (δ C-H), 913, 782 (γ C-H), 692 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,46 (sz. s, 2H, CH₂), 1,61 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,85 (s, 4H, 2CH₂), 6,88 (s, 1H, NH), 8,79 (s, 1H, pirazyna), 9,12 (s, 1H, pirazyna), 9,43 (s, 1H, NH), 12, 73 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₅ClN₆S (298,08): wartości obliczone C, 44,22; H, 5,06; N, 28,13; wartości zmierzone C, 44,57; H, 5,03; N, 28,31.

2-[Amino(6-chloropirazyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (6)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbimidanu metylu **10** (0,428 g) z *N,N*-dimetylohydrazynokarbotioamidem (0,298 g). Wydajność: 78%; t.t. 161–162°C (metanol); IR (KBr): 3400, 3304, 3261 (ν N-H), 3052, 3027 (ν C_{Ar}-H), 2973, 2917, 2855 (ν C-H), 1636 (ν C=N), 1591 (δ N-H), 1528, 1476, 1434 (ν C=C), 1359, 1279 (ν C-N), 1172 (ν C=S), 1111 (ν C-O), 1020, 1008 (δ C-H), 886, 848 (γ C-H), 676 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,26 (s, 6H, 2CH₃), 6,83 (s, 1H, NH), 8,79 (s, 1H, pirazyna), 9,17 (s, 1H, pirazyna), 9,34 (s, 1H, NH), 12, 58 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₈H₁₁ClN₆S (258,05): wartości obliczone C, 37,14; H, 4,29; N, 32,48; wartości zmierzone C, 37,33; H, 4,03; N, 32,31.

6-Chloro-N'-(morfolino-4-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (7)

Reakcja 6-chloropikolinimidanu metylu **2** (0,425 g) z morfolino-4-karbotiohydrydem (0,403 g). Wydajność: 91%; t.t. 161–162°C (metanol); IR (KBr): 3359, 3213, 3126 (ν N-H), 3061 (ν C_{Ar}-H), 2964, 2940, 2843 (ν C-H), 1668 (ν C=N), 1600, 1574 (δ N-H), 1504, 1416 (ν C=C), 1351, 1301, 1227 (ν C-N), 1138 (ν C=S), 1115 (ν C-O), 1024 (δ C-H), 889, 802 (γ C-H), 760 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,58 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 3,84 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 6,83 (s, 1H, NH), 7,77 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,93 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 8,14 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,68 (sz. s, 1H, NH), 12,52 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₄ClN₅OS (299,06): wartości obliczone C, 44,07; H, 4,71; N, 23,36; wartości zmierzone C, 44,18; H, 4,85; N, 23,49.

6-Chloro-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo) pikolinohydrazonamid (8)

Reakcja 6-chloropikolinimidanu metylu **2** (0,425 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazydem (0,363 g). Wydajność: 59%; t.t. 153–157°C (metanol); IR (KBr): 3417, 3230 (ν N-H), 3099, 3016 (ν C_{Ar}-H), 2968, 2875 (ν C-H), 1630 (ν C=N), 1579, 1556 (δ N-H), 1448, 1406 (ν C=C), 1345, 1309 (ν C-N), 1155 (ν C=S), 1138, 1078 (δ C-H), 864, 807 (γ C-H), 760 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,85 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,74 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,72 (s, 1H, NH), 7,56 (sz. s, 1H, pirydyna), 7,90 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,00 (sz. s, 1H, pirydyna), 9,31 (s, 1H, NH), 12,52 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₄ClN₅S (283,07): wartości obliczone C, 46,56; H, 4,97; N, 24,68; wartości zmierzone C, 46,75; H, 4,84; N, 24,32.

6-Chloro-N'-(piperydino-4-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (9)

Reakcja 6-chloropikolinimidanu metylu **2** (0,425 g) z piperydino-1-karbotiohydrazydem (0,398 g). Wydajność: 62%; t.t. 152–153°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3393, 3214, 3120 (ν N-H), 3065 (ν C_{Ar}-H), 2928, 2845 (ν C-H), 1655 (ν C=N), 1598, 1573 (δ N-H), 1465, 1432 (ν C=C), 1356, 1299, 1243 (ν C-N), 1188 (ν C=S), 1136, 1025 (δ C-H), 884, 797 (γ C-H), 755 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,46 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,60 (sz. s, 2H, CH₂), 3,85 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,77 (s, 1H, NH), 7,75 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 7,92 (s, 1H, pirydyna), 8,11 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 9,31 (s, 1H, NH), 12,67 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₁₆ClN₅S (297,08): wartości obliczone C, 48,40; H, 5,42; N, 23,52; wartości zmierzone C, 48,29; H, 5,05; N, 23,52.

2-[Amino(6-chloropirydyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (10)

Reakcja 6-chloropikolinimidanu metylu **2** (0,425 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazydem (0,298 g). Wydajność: 51%; t.t. 152–153°C (metanol, toluen); IR (KBr): 3410, 3217, 3123 (ν N-H), 3055, 3007 (ν C_{Ar}-H), 2972, 2917 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1598, 1575 (δ N-H), 1507, 1429 (ν C=C), 1377, 1302, 1246 (ν C-N), 1186 (ν C=S), 1150, 1049 (δ C-H), 910, 792, 764 (γ C-H), 726 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,20 (sz. s, 6H, 2CH₃), 6,74 (s, 1H, NH), 7,75 (sz. s, 1H, pirydyna), 7,92 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,12 (sz. s, 1H, pirydyna), 9,25 (s, 1H, NH), 12,53 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₉H₁₂ClN₅S (257,05): wartości obliczone C, 41,94; H, 4,69; N, 21,17; wartości zmierzone C, 42,01; H, 4,31; N, 26,81.

Metoda ogólna syntezy 6-podstawionych podstawionych nityli (11–18)

Metoda A (11, 13, 15, 16, 18)

40 mmoli odpowiedniego nitylu, 48 mmoli odpowiedniego odczynnika nukleofilowego oraz 40 mmoli (6 ml) DBU rozpuszczono w 25 ml dioksanu. Mieszaninę mieszano (11), ogrzewano w temperaturze 60°C (13) lub w temperaturze wrzenia (15, 16) przez 1 h lub 12 h (18). Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika i dodaniu lodu do poprzedniej objętości wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację lub techniką chromatografii kolumnowej, a następnie poprzez krystalizację.

Metoda B (12, 14, 17)

40 mmoli odpowiedniego nitylu, 48 mmoli odpowiedniego odczynnika nukleofilowego oraz 40 mmoli (6 ml) DBU rozpuszczono w 25 ml dioksanu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika i dodaniu lodu do poprzedniej objętości utworzyła się oleista zawiesina, którą zobojętniono stężonym kwasem solnym, a następnie ekstrahowano chloroformem (3 x 20 ml). Połączone warstwy organiczne suszono bezwodnym MgSO₄. Środek suszący odsączono, a rozpuszczalnik odparowano. Po trzykrotnym przemyciu bezwodnym eterem dietylowym wytrącił się osad (12) lub wydzielił olej (14, 17). Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację lub techniką chromatografii kolumnowej, a następnie poprzez krystalizację.

6-Morfolinopirazyno-2-karbonitryl (11)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbonitrylu (3,89 ml) z morfoliną (4,14 ml). Wydajność: 85%; t.t. 116–118°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 2:1, następnie krystalizacja z metanolu); IR (KBr): 3067 (ν C_{Ar}-H), 2982, 2912, 2871 (ν C-H), 2237 (ν C≡N), 1575 (ν C=N), 1516, 1446 (ν C=C), 1267, 1231 (ν C-N) 1118, 1068 (ν C-O), 1068 (δ C-H), 873 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,57 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 3,68 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 8,31 (s, 1H, pirazyna), 8,62 (s, 1H, pirazyna) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,42 (2C), 66,03 (2C), 116,99, 126,22, 135,92, 136,59, 154,02 ppm; Analiza elementarna dla C₉H₁₀N₄O (190,02): wartości obliczone C, 56,83; H, 5,30; N, 29,46; wartości zmierzone C, 56,64; H, 5,16; N, 29,51.

6-(Pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitryl (12)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbonitrylu (3,89 ml) z pirolidyną (4,01 ml). Wydajność: 67%; t.t. 76–78°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 2:1, następnie krystalizacja z metanolu); IR (KBr): 3063 (ν C_{Ar}-H), 2979, 2951, 2863 (ν C-H), 2229 (ν C≡N), 1584 (ν C=N), 1519, 1491, 1421 (ν C=C), 1228 (ν C-N), 1161, 1059 (δ C-H), 874, 855 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,94 (sz. s, 4H, 2CH₂), 2,48 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 1,8 Hz), 8,20 (s, 1H, pirazyna), 8,24 (s, 1H, pirazyna) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,22 (2C), 46,72 (2C), 117,27, 126,70, 134,41, 136,39, 151,99 ppm; Analiza elementarna dla C₉H₁₀N₄ (174,09): wartości obliczone C, 62,05; H, 5,79; N, 32,16; wartości zmierzone C, 61,95; H, 5,48; N, 32,06.

6-(Piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitryl (13)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbonitrylu (3,89 ml) z piperydyną (4,74 ml). Wydajność: 100%; t.t. 68–69°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 2:1, następnie krystalizacja z metanolu); IR (KBr): 3081, 3008 (ν C_{Ar}-H), 2948, 2858 (ν C-H), 2227 (ν C≡N), 1579 (ν C=N), 1516, 1451, 1417 (ν C=C), 1278, 1239, 1208 (ν C-N), 1136, 1041 (δ C-H), 850 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,52–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,60–1,63 (m, 2H, CH₂), 3,60 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 8,20 (s, 1H, pirazyna), 8,60 (s, 1H, pirazyna) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,32, 25,34 (2C), 45,16 (2C), 117,11, 126,32, 134,74, 136,43, 153,71 ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₁₂N₄ (188,11): wartości obliczone C, 63,81; H, 6,43; N, 29,77; wartości zmierzone C, 63,57; H, 6,68; N, 29,95.

6-Fenoksypirazyno-2-karbonitryl (14)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbonitrylu (3,89 ml) z fenolem (4,51 g). Wydajność: 86%; t.t. – (olej) (faza ruchoma CHCl₃); IR (KBr): 3071, 3008 (ν C_{Ar}-H), 2969, 2848 (ν C-H), 2228 (ν C≡N), 157 (ν C=N), 1509, 1431, 1417 (ν C=C), 1278, 1236 (ν C-N), 1126, 1041 (δ C-H), 855 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,27 (d, 2H, 2ArH, *J* = 7,5 Hz), 7,31 (t, 1H, ArH, *J* = 7,8 Hz), 7,48 (t, 2H, 2ArH, *J* = 7,0 Hz), 8,88 (s, 1H, pirazyna), 8,93 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₇N₃O (197,06): wartości obliczone C, 67,00; H, 3,58; N, 21,31; wartości zmierzone C, 67,08; H, 3,33; N, 21,27.

6-Morfolinopikolinonitryl (**15**)

Reakcja 6-chloropikolinonitrylu (5,52 g) z morfoliną (4,14 ml). Wydajność: 100%; t.t. 132–134°C (metanol); IR (KBr): 3098, 3069 (ν C_{Ar}-H), 2968, 2926, 2854 (ν C-H), 2230 (ν C≡N), 1595 (ν C=N), 1473, 1447 (ν C=C), 1334, 1309, 1254 (ν C-N), 1116, 1071 (ν C-O), 1027 (δ C-H), 885, 797 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,47 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 3,66 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 7,17 (d, 1H, pirydyna, *J* = 9,0 Hz), 7,22 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,71 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,3 Hz) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 45,00 (2C), 66,20 (2C), 112,39, 118,40, 118,68, 130,64, 139,09, 159,43 ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₁₁N₃O (189,09): wartości obliczone C, 63,48; H, 5,86; N, 22,21; wartości zmierzone C, 63,39; H, 5,94; N, 22,24.

6-(Pirolidyn-1-ylo)pikolinonitryl (**16**)

Reakcja 6-chloropikolinonitrylu (5,52 g) z pirolidyną (4,01 ml). Wydajność: 91%; t.t. 73–75°C (metanol); IR (KBr): 3097, 3075 (ν C_{Ar}-H), 2959, 2865 (ν C-H), 2230 (ν C≡N), 1595 (ν C=N), 1499, 1458 (ν C=C), 1339, 1300, 1247, 1207 (ν C-N), 1022 (δ C-H), 793 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,92–1,95 (m, 4H, 2CH₂), 3,37 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,5 Hz), 6,76 (d, 1H, pirydyna, *J* = 9,0 Hz), 7,08 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,62 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,3 Hz) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,34 (2C), 46,85 (2C), 112,05, 116,69, 118,73, 130,93, 138,17, 157,15 ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₁₁N₃ (173,10): wartości obliczone C, 69,34; H, 6,40; N, 24,26; wartości zmierzone C, 69,38; H, 6,17; N, 24,52.

6-(Piperydyn-1-ylo)pikolinonitryl (**17**)

Reakcja 6-chloropikolinonitrylu (5,52 g) z piperydyną (4,74 ml). Wydajność: 92%; t.t. – (olej) (faza ruchoma AcOEt:CHCl₃ 1:5); IR (KBr): 3019 (ν C_{Ar}-H), 2939, 2856 (ν C-H), 2234 (ν C≡N), 1595 (ν C=N), 1487, 1446 (ν C=C), 1254, 1215 (ν C-N), 1026 (δ C-H), 771 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,51–1,54 (m, 4H, 2CH₂), 1,60–1,62 (m, 2H, CH₂, *J* = 5,0 Hz), 3,54 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,5 Hz), 7,11 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,15 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,64 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,54, 25,36 (2C), 45,60 (2C), 112,19, 117,41, 118,56, 130,75, 138,86, 159,04 ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₃N₃ (187,11): wartości obliczone C, 70,56; H, 7,00; N, 22,44; wartości zmierzone C, 70,43; H, 6,88; N, 22,29.

6-Fenoksypikolinonitryl (**18**)

Reakcja 6-chloropikolinonitrylu (5,52 g) z fenolem (4,51 g). Wydajność: 91%; t.t. 72–74°C (faza ruchoma AcOEt:CHCl₃ 1:5); IR (KBr): 3080, 3041 (ν C_{Ar}-H), 2992 (ν C-H), 2239 (ν C≡N), 1586 (ν C=N), 1491, 1433 (ν C=C), 1321, 1258 (ν C-N), 1148 (ν C-O), 1069 (δ C-H), 767, 704 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,21 (d, 2H, 2ArH, *J* = 8,0 Hz), 7,29 (t, 1H, ArH, *J* = 7,5 Hz), 7,42 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,48 (t, 2H, 2ArH, *J* = 7,0 Hz), 7,79 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 8,09 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,3 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₈N₂O (196,06): wartości obliczone C, 73,46; H, 4,11; N, 14,28; wartości zmierzone C, 74,43, H, 4,27, N, 14,18.

Metoda ogólna syntezy 6-podstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (**19–34**)

Metoda A (**19, 20, 22, 24–34**)

3 mmole odpowiedniego nitrylu i 1,3 mmola (0,2 ml) DBU rozpuszczono w 5 ml metanolu. Po 5 minutach mieszania dodano 3 mmole odpowiedniego karbotiohidrazydu rozpuszczonego w mieszaninie 15 ml metanolu i 2 ml wody. Całość podgrzano do temperatury wrzenia, a następnie mieszano przez 12 h w temperaturze otoczenia. Po ochłodzeniu (**22, 30**) lub dodaniu lodu (**19, 20, 24–28, 31–34**) i zakwaszeniu kwasem octowym (**29**) wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono techniką chromatografii kolumnowej lub poprzez krystalizację.

Metoda B (**21, 23**)

3 mmole odpowiedniego nitrylu i 1,3 mmola (0,2 ml) DBU rozpuszczono w 5 ml metanolu. Po 5 minutach mieszania dodano 3 mmole odpowiedniego karbotiohidrazydu rozpuszczonego w mieszaninie 15 ml metanolu i 2 ml wody. Całość podgrzano do temperatury wrzenia, a następnie mieszano przez 12 h w temperaturze otoczenia. Po dodaniu lodu i zakwaszeniu kwasem octowym utworzyła się oleista zawiesina, którą ekstrahowano chloroformem (3 x 10 ml). Połączone warstwy organiczne suszono bezwodnym MgSO₄. Środek suszący odsączono, a rozpuszczalnik odparowano. Po trzykrotnym przemyciu bezwodnym eterem dietylowym wytrącił się osad, który oczyszczono poprzez krystalizację lub techniką chromatografii kolumnowej, a następnie poprzez krystalizację.

N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-6-morfolinopirazyno-2-karbohydrazonamid (19)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbonitrylu **11** (0,570 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,483 g). Wydajność: 43%; t.t. 112–115°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3377 (ν N-H), 3044 (ν C_{Ar}-H), 2925, 2863 (ν C-H), 1685, 1638 (ν C=N), 1581 (δ N-H), 1533, 1424 (ν C=C), 1352, 1301, 1259 (ν C-N), 1151 (ν C=S), 1111 (ν C-O), 1065, 1025 (δ C-H), 892, 776 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,57 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 3,70–3,73 (m, 8H, 4CH₂), 3,82 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 6,85 (s, 1H, NH), 7,72 (sz. s, 1H, NH), 8,54 (s, 1H, pirazyna), 8,56 (s, 1H, pirazyna), 12, 64 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₂₁N₇O₂S (351,15): wartości obliczone C, 47,85; H, 6,02; N, 27,90; wartości zmierzone C, 47,87; H, 5,92; N, 27,59.

6-Morfolino-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (20)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbonitrylu **11** (0,570 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,435 g). Wydajność: 50%; t.t. 142–145°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3361 (ν N-H), 3095 (ν C_{Ar}-H), 2962, 2862 (ν C-H), 1667, 1621 (ν C=N), 1581 (δ N-H), 1526, 1435 (ν C=C), 1374, 1293, 1241 (ν C-N), 1169 (ν C=S), 1114 (ν C-O), 999 (δ C-H), 915, 878, 851 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,84 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,8 Hz), 3,55–3,62 (m, 8H, 4CH₂), 3,70–3,72 (m, 4H, 2CH₂), 6,74 (s, 1H, NH), 8,52 (s, 1H, pirazyna), 8,54 (s, 1H, pirazyna), 9,31 (s, 1H, NH), 12, 66 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₂₁N₇OS (335,15): wartości obliczone C, 50,13; H, 6,31; N, 29,23; wartości zmierzone C, 50,08; H, 6,00; N, 28,87.

6-Morfolino-N'-(piperydino-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (21)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbonitrylu **11** (0,570 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,477 g). Wydajność: 64%; t.t. 170–171°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 1:2, następnie krystalizacja z etanolu); IR (KBr): 3422, 3300, 3166 (ν N-H), 2926, 2851 (ν C-H), 1627 (ν C=N), 1576 (δ N-H), 1528, 1470, 1448 (ν C=C), 1299, 1261, 1243 (ν C-N), 1116 (ν C-O), 1067, 1000 (δ C-H), 874 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,43 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,56–1,58 (m, 2H, CH₂), 3,68–3,71 (m, 8H, 4CH₂), 3,82 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 6,79 (s, 1H, NH), 7,80 (sz. s, 1H, NH), 8,51 (s, 1H, pirazyna), 8,53 (s, 1H, pirazyna), 12, 77 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,26, 26,10 (2C), 44,58 (2C), 47,36 (2C), 66,08 (2C), 129,29, 135,26, 136,76, 142,61, 153,18, 178,89 ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₃N₇OS (349,17):

wartości obliczone C, 51,55; H, 6,63; N, 28,06; wartości zmierzone C, 51,90; H, 6,48; N, 28,06.

2-[Amino(6-morfolinopirazyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (22)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbonitrylu **11** (0,570 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,357 g). Wydajność: 30%; t.t. 190–193°C (metanol); IR (KBr): 3362, 3285, 3242, 3154 (ν N-H), 2965, 2912, 2856 (ν C-H), 1676 (ν C=N), 1608, 1576 (δ N-H), 1532, 1479, 1442 (ν C=C), 1382, 1355, 1307, 1245 (ν C-N), 1144 (ν C=S), 1111 (ν C-O), 1063, 995 (δ C-H), 892, 776 (γ C-H) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3,15 (s, 6H, 2CH₃), 3,68–3,71 (m, 8H, 4CH₂), 6,74 (s, 1H, NH), 7,68 (sz. s, 1H, NH), 8,51 (s, 1H, pirazyna), 8,54 (s, 1H, pirazyna), 12, 64 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₁₉N₇OS (309,14): wartości obliczone C, 46,59; H, 6,19; N, 31,69; wartości zmierzone C, 46,24; H, 6,24; N, 32,00.

N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (23)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **12** (0,522 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,483 g). Wydajność: 16%; t.t. 188–190°C (metanol); IR (KBr): 3326, 3136 (ν N-H), 3066 (ν C_{Ar}-H), 2952, 2916, 2839 (ν C-H), 1672 (ν C=N), 1587 (δ N-H), 1534, 1455 (ν C=C), 1399, 1371, 1286, 1265 (ν C-N), 1202 (ν C=S), 1100 (ν C-O), 1027, 1002 (δ C-H), 887, 848, 825 (γ C-H) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,97 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,51–3,57 (m, 8H, 4CH₂), 3,81 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,79 (sz. s, 1H, NH), 7,64 (sz. s, 1H, NH), 8,19 (s, 1H, pirazyna), 8,43 (s, 1H, pirazyna), 12, 59 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₂₁N₇OS (335,15): wartości obliczone C, 50,13; H, 6,31; N, 29,23; wartości zmierzone C, 49,99; H, 6,45; N, 29,35.

6-(Pirolidyn-1-ylo)-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (24)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **12** (0,522 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,435 g). Wydajność: 32%; t.t. 181–185°C (metanol); IR (KBr): 3394, 3212 (ν N-H), 2967, 2868 (ν C-H), 1653 (ν C=N), 1579 (δ N-H), 1524, 1485, 1428 (ν C=C), 1340, 1304, 1292 (ν C-N), 1203 (ν C=S), 1114, 993 (δ C-H), 905, 844 (γ C-H) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,83 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,97 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,51 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,75 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,65 (sz. s, 1H, NH), 7,91 (sz. s, 1H, NH), 8,16 (s, 1H, pirazyna), 8,41 (s, 1H, pirazyna), 12, 61 (sz. s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna

dla C₁₄H₂₁N₇S (319,16): wartości obliczone C, 52,64; H, 6,63; N, 30,69; wartości zmierzone C, 52,99; H, 6,36; N, 30,32.

N'-(Piperydino-1-karbonotioilo)-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (**25**)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **12** (0,522 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,477 g). Wydajność: 33%; t.t. 163–164°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3415, 3212 (ν N-H), 3054 (ν C_{Ar}-H), 2920, 2853 (ν C-H), 1661 (ν C=N), 1599 (δ N-H), 1531, 1425 (ν C=C), 1343, 1291, 1245 (ν C-N), 1138 (ν C=S), 1099, 1024 (δ C-H), 886, 848, 828 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,44 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,58 (sz. s, 2H, CH₂), 1,98 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,52 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,84 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,71 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 1H, NH), 8,17 (s, 1H, pirazyna), 8,42 (s, 1H, pirazyna), 12,73 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,28 (3C), 26,11 (2C), 46,55 (2C), 47,34 (2C), 127,74, 135,05, 137,15, 143,10, 151,19, 178,84 ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₃N₇S (333,17): wartości obliczone C, 54,03; H, 6,95; N, 29,40; wartości zmierzone C, 54,12; H, 6,57; N, 29,10.

N,N-{Amino[6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyn-2-ylo]metyleno}-*N,N*-dimetylohydrazynokarbotioamid (**26**)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **12** (0,522 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,357 g). Wydajność: 47%; t.t. 163–166°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3299, 3174 (ν N-H), 3024 (ν C_{Ar}-H), 2978, 2921, 2871 (ν C-H), 1672 (ν C=N), 1589 (δ N-H), 1533, 1503, 1458 (ν C=C), 1375, 1296, 1243 (ν C-N), 1145 (ν C=S), 1107 (δ C-H), 913, 881, 844 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,97 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,16 (sz. s, 6H, 2CH₃), 3,51 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,67 (sz. s, 1H, NH), 7,62 (sz. s, 1H, NH), 8,17 (s, 1H, pirazyna), 8,42 (s, 1H, pirazyna), 12,60 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₁₉N₇S (293,14): wartości obliczone C, 49,13; H, 6,53; N, 33,42; wartości zmierzone C, 48,79; H, 6,15; N, 33,28.

N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (**27**)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **13** (0,564 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,483 g). Wydajność: 58%; t.t. 186–189°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 1:1, następnie krystalizacja z metanolu); IR (KBr): 3378, 3283, 3229, 3165 (ν N-H), 3083 (ν C_{Ar}-H), 2932, 2853 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1612, 1577 (δ N-H), 1529, 1416 (ν C=C), 1337, 1301, 1257 (ν C-N), 1107 (ν C-O), 1066,

1019 (δ C-H), 891, 838, 772 (γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,54–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,62–1,63 (m, 2H, CH₂), 3,55 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,5$ Hz), 3,71 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,3$ Hz), 3,80 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,5$ Hz), 6,79 (s, 1H, NH), 7,68 (sz. s, 1H, NH), 8,43 (s, 1H, pirazyna), 8,54 (s, 1H, pirazyna), 12, 61 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₃N₇OS (349,17): wartości obliczone C, 51,56; H, 6,63; N, 28,06; wartości zmierzone C, 51,37; H, 6,67; N, 27,71.

6-(Piperydyn-1-ylo)-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (28)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **13** (0,564 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,435 g). Wydajność: 38%; t.t. 173–176°C (faza ruchoma AcOEt:CHCl₃ 1:1, nast. metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3413, 3269, 3217, 3134 (ν N-H), 3058 (ν C_{Ar}-H), 2941, 2852 (ν C-H), 1669 (ν C=N), 1598 (δ N-H), 1533, 1430 (ν C=C), 1365, 1287, 1235 (ν C-N), 11588 (ν C=S), 1111, 1024 (δ C-H), 915, 849, 800 (γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,54–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,62 (sz. s, 2H, CH₂), 1,81 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,54 (sz. s, 2H, CH₂), 3,62 (sz. s, 2H, CH₂), 3,71–3,73 (m, 4H, 2CH₂), 6,68 (s, 1H, NH), 8,41 (s, 1H, pirazyna), 8,52 (s, 1H, pirazyna), 9,29 (s, 1H, NH), 12, 61 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₃N₇S (333,17): wartości obliczone C, 54,03; H, 6,95; N, 29,40; wartości zmierzone C, 54,36; H, 7,35; N, 29,79.

6-(Piperydyn-1-ylo)-N'-(piperydino-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (29)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **13** (0,564 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,477 g). Wydajność: 57%; t.t. 170–171°C (bezw. etanol); IR (KBr): 3388 (ν N-H), 3093 (ν C_{Ar}-H), 2924, 2847 (ν C-H), 1674 (ν C=N), 1584 (δ N-H), 1526, 1473, 1424 (ν C=C), 1310, 1271, 1234 (ν C-N), 1138 (ν C=S), 1053, 1023 (δ C-H), 886, 854, 835 (γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,43 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,54–1,57 (m, 6H, 3CH₂), 1,62–1,63 (m, 2H, CH₂), 3,71 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,3$ Hz), 3,82 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,3$ Hz), 6,72 (s, 1H, NH), 7,70 (sz. s, 1H, NH), 8,41 (s, 1H, pirazyna), 8,52 (s, 1H, pirazyna), 12, 75 (s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 24,52, 25,27, 25,41 (2C), 26,11 (2C), 45,30 (2C), 47,36 (2C), 128,14, 135,18, 136,79, 142,84, 152,95, 178,88 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₅N₇S (347,19): wartości obliczone C, 55,30; H, 7,25; N, 28,22; wartości zmierzone C, 55,40; H, 7,07; N, 28,01.

2-{Amino[6-(piperydyn-1-ylo)pirazyn-2-ylo]metyleno}-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (30)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **13** (0,564 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,357 g). Wydajność: 34%; t.t. 170–173°C (etanol); IR (KBr): 3402, 3131 (ν N-H), 2934, 2858 (ν C-H), 1674 (ν C=N), 1617, 1583 (δ N-H), 1527, 1495, 1454 (ν C=C), 1376, 1298, 1220 (ν C-N), 1151 (ν C=S), 1111 (ν C-O), 1102, 1024 (δ C-H), 919, 835 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,54–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,62–1,63 (m, 2H, CH₂), 3,14 (s, 6H, 2CH₃), 3,70–3,71 (m, 4H, 2CH₂), 6,68 (sz. s, 1H, NH), 7,64 (sz. s, 1H, NH), 8,41 (s, 1H, pirazyna), 8,52 (s, 1H, pirazyna), 12, 62 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₃H₂₁N₇S (307,16): wartości obliczone C, 50,79; H, 6,89; N, 31,89; wartości zmierzone C, 50,51; H, 6,70; N, 31,84.

6-Fenoksy-N'-(morfolino-4-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (31)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbonitrylu **14** (0,591 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,483 g). Wydajność: 9%; t.t. 151–154°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3418, 3215, 3216 (ν N-H), 2981, 2852 (ν C-H), 1668 (ν C=N), 1592 (δ N-H), 1544, 1490, 1416 (ν C=C), 1321, 1257, 1228 (ν C-N), 1193 (ν C=S), 1113 (ν C-O), 1024, 1005 (δ C-H), 889, 792, 764 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,54–3,55 (m, 4H, 2CH₂), 3,79 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,52 (sz. s, 1H, NH), 7,26 (t, 1H, ArH, *J* = 7,0 Hz), 7,36 (d, 2H, 2ArH, *J* = 7,5 Hz), 7,44 (t, 2H, 2ArH, *J* = 7,5 Hz), 8,48 (sz. s, 1H, NH), 8,72 (s, 1H, pirazyna), 9,02 (s, 1H, pirazyna), 12, 31 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆O₂S (358,12): wartości obliczone C, 53,62; H, 5,06; N, 23,45; wartości zmierzone C, 53,30; H, 4,94; N, 23,68.

6-Fenoksy-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (32)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbonitrylu **14** (0,591 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,435 g). Wydajność: 32%; t.t. 173–174°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3416, 3210, 3122 (ν N-H), 3047 (ν C_{Ar}-H), 2963, 2866 (ν C-H), 1664 (ν C=N), 1591 (δ N-H), 1543, 1490, 1431 (ν C=C), 1338, 1312, 1271 (ν C-N), 1194 (ν C=S), 1104 (ν C-O), 1006 (δ C-H), 907, 759 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,85 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,53 (sz. s, 2H, CH₂), 3,75 (sz. s, 2H, CH₂), 6,42 (s, 2H, NH₂), 7,26–7,36 (m, 3H, 3ArH), 7,47 (t, 2H, 2ArH, *J* = 7,3 Hz), 8,45 (s, 1H, pirazyna), 8,91 (s, 1H, pirazyna), 9,39

(s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆OS (342,13): wartości obliczone C, 56,12; H, 5,30; N, 24,54; wartości zmierzone C, 55,81; H, 4,92; N, 24,94.

6-Fenoksy-N'-(piperydino-1-karbonotioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (33)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbonitrylu **14** (0,591 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,477 g). Wydajność: 43%; t.t. 144–146°C (metanol); IR (KBr): 3421, 3213, 3126 (ν N-H), 2934, 2850 (ν C-H), 1666 (ν C=N), 1590 (δ N-H), 1543, 1469, 1416 (ν C=C), 1324, 1245 (ν C-N), 1194 (ν C=S), 1103 (ν C-O), 1023, 1004 (δ C-H), 882, 792, 761 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,43 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,58 (sz. s, 2H, CH₂), 3,81–3,83 (m, 4H, 2CH₂), 6,47 (s, 1H, NH), 7,27–7,37 (m, 3H, 3ArH), 7,44 (d, 2H, 2ArH, *J* = 7,5 Hz), 8,69 (s, 1H, pirazyna), 9,00 (s, 1H, pirazyna), 9,35 (s, 1H, NH), 12,47 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₂₀N₆OS (356,14): wartości obliczone C, 57,28; H, 5,66; N, 23,58; wartości zmierzone C, 56,94; H, 5,25; N, 23,58.

2-[Amino(6-fenoksypirazyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (34)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbonitrylu **14** (0,591 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,357 g). Wydajność: 40%; t.t. 150–152°C (metanol); IR (KBr): 3412, 3212, 3128 (ν N-H), 3048 (ν C_{Ar}-H), 2926 (ν C-H), 1666 (ν C=N), 1593 (δ N-H), 1544, 1490, 1416 (ν C=C), 1374, 1326, 1252 (ν C-N), 1200 (ν C=S), 1105 (ν C-O), 1071, 1024 (δ C-H), 801, 765 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,12 (s, 6H, 2CH₃), 6,41 (s, 1H, NH), 7,26 (d, 2H, 2ArH, *J* = 5,5 Hz), 7,34 (d, 1H, ArH, *J* = 7,0 Hz), 7,41 (d, 2H, 2ArH, *J* = 6,5 Hz), 8,67 (s, 1H, pirazyna), 8,99 (s, 1H, pirazyna), 9,28 (s, 1H, NH), 12,31 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₁₆N₆OS (316,11): wartości obliczone C, 53,15; H, 5,10; N, 26,56; wartości zmierzone C, 52,88; H, 4,85; N, 26,49.

Metoda ogólna syntezy tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny (35–50)

Metoda A (35, 39, 41, 43, 45, 49)

2 mmole odpowiedniego nitrylu oraz 2,7 mmola (0,4 ml) DBU rozpuszczono w 15 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Następnie, dodano 2 mmole odpowiedniego karbotiohydrazidu oraz kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 0,5–2 h. Po dodaniu lodu (**35, 41, 49**) i zakwaszeniu kwasem octowym (**39, 43, 45**) wytrącił się osad. Produkt reakcji oczyszczono techniką chromatografii kolumnowej lub poprzez krystalizację.

Metoda B (**36, 38, 40, 42, 47, 48, 50**)

2 mmole odpowiedniego nityrylu oraz 2,7 mmola (0,4 ml) DBU rozpuszczono w 15 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Następnie, dodano 2 mmole odpowiedniego karbotiohidrazydu oraz kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 0,5–2 h. Po ochłodzeniu wytrącił się osad. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

Metoda C (**37, 44, 46**)

2 mmole odpowiedniego nityrylu oraz 2,7 mmola (0,4 ml) DBU rozpuszczono w 15 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Następnie, dodano 2 mmole odpowiedniego karbotiohidrazydu oraz kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 1–2 h. Po dodaniu lodu i zakwaszeniu kwasem octowym utworzyła się oleista zawiesina, którą ekstrahowano chloroformem (3 x 15 ml). Połączone warstwy organiczne suszono bezwodnym MgSO₄. Środek suszący odsączono, a rozpuszczalnik odparowano. Po trzykrotnym przemyciu bezwodnym eterem dietylowym wytrącił się osad, który oczyszczono techniką chromatografii kolumnowej lub poprzez krystalizację.

N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-6-morfolinopikolinohydrazonamid (35)

Reakcja 6-morfolinopikolinonityrylu **15** (0,378 g) z morfolino-4-karbotiohidrazydem (0,322 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 72%; t.t. 132–134°C (etanol, metanol); IR (KBr): 3400, 3237, 3142 (ν N-H), 3068 (ν C_{Ar}-H), 2962, 2847 (ν C-H), 1678 (ν C=N), 1607, 1562 (δ N-H), 1477, 1421 (ν C=C), 1350, 1314, 1222 (ν C-N), 1206 (ν C=S), 1115 (ν C-O), 1023 (δ C-H), 890, 810 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,57 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 3,61 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 3,71 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 3,81 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 7,10 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,44 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,61 (sz. s, 1H, NH), 7,78 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 8,46 (sz. s, 1H, NH), 12,64 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₂N₆O₂S (350,15): wartości obliczone C, 51,41; H, 6,33; N, 23,98; wartości zmierzone C, 51,38; H, 6,13; N, 24,04.

6-Morfolino-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (36)

Reakcja 6-morfolinopikolinonityrylu **15** (0,378 g) z pirolidyno-1-karbotiohidrazydem (0,290 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 45%; t.t. 169–170°C (etanol); IR (KBr): 3391, 3206, 3111 (ν N-H), 2952, 2857 (ν C-H), 1659 (ν C=N), 1599, 1560 (δ N-H), 1470, 1430 (ν C=C), 1377, 1297, 1273, 1239 (ν C-N), 1197 (ν C=S), 1121 (ν C-O), 1060 (δ C-H), 875, 796 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,83 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,55 (sz. s,

4H, 2CH₂), 3,61 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,71 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,5$ Hz), 6,67 (s, 1H, NH), 7,08 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,5$ Hz), 7,41 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,77 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 8,11 (sz. s, 1H, NH), 12,65 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₂N₆OS (334,16): wartości obliczone C, 53,87; H, 6,63; N, 25,13; wartości zmierzone C, 53,86; H, 6,46; N, 25,07.

6-Morfolino-N'-(piperydino-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (37)

Reakcja 6-morfolinopikolinonitrylu **15** (0,378 g) z piperydino-1-karboniohydrazydem (0,318 g). Czas reakcji: 1,5 h. Wydajność: 64%; t.t. 170–171°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 1:2, następnie krystalizacja z etanolu); IR (KBr): 3390, 3206 (ν N-H), 3093, 3008 (ν C_{Ar}-H), 2921, 2849 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1601, 1559 (δ N-H), 1478, 1430 (ν C=C), 1338, 1317, 1248 (ν C-N), 1113 (ν C-O), 1028 (δ C-H), 880, 871, 791 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,45 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,57–1,59 (m, 2H, CH₂), 3,62–3,63 (m, 4H, 2CH₂), 3,71 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$ Hz), 3,84 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,3$ Hz), 7,09 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,5$ Hz), 7,42 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,61 (s, 1H, NH), 7,77 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,28 (sz. s, 1H, NH), 12,78 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,30, 26,10 (2C), 45,29 (2C), 47,35 (2C), 66,27 (2C), 110,58, 110,87, 139,56, 142,19, 144,20, 158,32, 178,58 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₄N₆OS (348,17): wartości obliczone C, 55,15; H, 6,94; N, 24,12; wartości zmierzone C, 55,3; H, 6,78; N, 23,94.

2-[Amino(6-morfolinopirydyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbonioamid (38)

Reakcja 6-morfolinopikolinonitrylu **15** (0,378 g) z *N,N*-dimetylokarboniohydrazydem (0,238 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 69%; t.t. 213–215°C (metanol); IR (KBr): 3373, 3293, 3167 (ν N-H), 3023 (ν C_{Ar}-H), 2960, 2888, 2855 (ν C-H), 1677 (ν C=N), 1609, 1557 (δ N-H), 1483, 1443 (ν C=C), 1383, 1324, 1242 (ν C-N), 1178 (ν C=S), 1112 (ν C-O), 1057 (δ C-H), 869, 788 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,16 (s, 6H, 2CH₃), 3,61 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$ Hz), 3,71 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$ Hz), 7,08 (d, 1H, pirydyna, $J = 9,0$ Hz), 7,42 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,59 (s, 1H, NH), 7,77 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,28 (sz. s, 1H, NH), 12,78 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₃H₂₀N₆OS (308,14): wartości obliczone C, 50,63; H, 6,54; N, 27,25; wartości zmierzone C, 50,49; H, 6,31; N, 26,89.

[N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (39)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinonitrylu **16** (0,346 g) z morfolino-4-karbotiohydrydem (0,322 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 86%; t.t. 180–182°C (faza ruchoma AcOEt:CHCl₃ 1:1); IR (KBr): 3422, 3286, 3119 (ν N-H), 2957, 2851 (ν C-H), 1663 (ν C=N), 1608, 1555 (δ N-H), 1504, 1458, 1424 (ν C=C), 1350, 1309, 1261, 1222 (ν C-N), 1165 (ν C=S), 1114 (ν C-O), 1021 (δ C-H), 889, 794 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,97 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,47 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,58 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,81 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,70 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,32 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,51 (sz. s, 1H, NH), 7,69 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz), 8,43 (sz. s, 1H, NH), 12,60 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,41 (2C), 46,83 (2C), 47,24 (2C), 66,73 (2C), 108,77, 110,85, 138,64, 142,23, 145,75, 156,16, 179,11 ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₂N₆OS (334,16): wartości obliczone C, 53,87; H, 6,63; N, 25,13; wartości zmierzone C, 53,74; H, 6,65; N, 24,79.

6-(Pirolidyn-1-ylo)-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (40)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinonitrylu **16** (0,346 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrydem (0,290 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 61%; t.t. 200–201°C (bezwodny etanol); IR (KBr): 3407, 3243 (ν N-H), 3061 (ν C_{Ar}-H), 2969, 2838 (ν C-H), 1664 (ν C=N), 1599, 1556 (δ N-H), 1497, 1460, (ν C=C), 1368, 1299 (ν C-N), 1161 (ν C=S), 1101, 1015 (δ C-H), 917, 727 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,83 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,5 Hz), 1,96 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,47 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,56 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,0 Hz), 6,65 (s, 1H, NH), 6,67 (d, 1H, pirydyna, *J* = 9,0 Hz), 7,28 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 7,67 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,3 Hz), 8,20 (sz. s, 1H, NH), 12,59 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,25 (2C), 25,41 (2C), 46,82 (2C), 48,60 (2C), 108,53, 110,54, 138,62, 142,38, 144,26, 156,15, 176,41 ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₂₂N₆S (318,16): wartości obliczone C, 56,58; H, 6,96; N, 26,39; wartości zmierzone C, 56,51; H, 7,03; N, 26,15.

N'-(Piperydino-1-karbonotioilo)-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (41)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinonitrylu **16** (0,346 g) z piperydino-1-karbotiohydrydem (0,318 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 82%; t.t. 171–172°C (faza ruchoma AcOEt:CHCl₃ 1:5); IR (KBr): 3405, 3211 (ν N-H), 3065 (ν C_{Ar}-H), 2929, 2852 (ν C-H), 1666 (ν C=N), 1604, 1575 (δ N-H), 1504, 1469, 1420 (ν C=C), 1373, 1339, 1307, 1246 (ν C-N), 1163 (ν C=S), 1024 (δ C-H), 884, 789 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-

d_6): δ 1,45 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,57–1,59 (m, 2H, CH₂), 1,97 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,48 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,84 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,0$ Hz), 6,68 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,5$ Hz), 7,29 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,51 (sz. s, 1H, NH), 7,68 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,25 (sz. s, 1H, NH), 12,72 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 25,32, 25,40 (2C), 26,11 (2C), 46,80 (2C), 47,33 (2C), 108,56, 110,57, 138,62, 142,40, 144,69, 156,09, 178,49 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₄N₆S (332,18): wartości obliczone C, 57,80; H, 7,28; N, 25,28; wartości zmierzone C, 57,52; H, 7,42; N, 25,31.

2-{Amino[6-(pirolidyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (42)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinonitrylu **16** (0,346 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,238 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 68%; t.t. 193–195°C (etanol); IR (KBr): 3410, 3191 (ν N-H), 3052 (ν C_{Ar}-H), 2975, 2832 (ν C-H), 1667 (ν C=N), 1604, 1555 (δ N-H), 1499, 1457 (ν C=C), 1378, 1306, 1250 (ν C-N), 1164 (ν C=S), 1104, 1015 (δ C-H), 915, 788 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,96 (t, 4H, 2CH₂, $J = 6,0$ Hz), 3,16 (s, 6H, 2CH₃), 3,47 (sz.s, 4H, 2CH₂), 6,68 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,5$ Hz), 7,30 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,50 (sz. s, 1H, NH), 7,68 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,8$ Hz), 8,25 (sz. s, 1H, NH), 12,60 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₃H₂₀N₆S (292,15): wartości obliczone C, 53,40; H, 6,89; N, 28,74; wartości zmierzone C, 53,55; H, 6,92; N, 28,60.

N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (43)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **17** (0,374 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,322 g). Czas reakcji: 1,5 h. Wydajność: 73%; t.t. 177–178°C (faza ruchoma AcOEt:CHCl₃ 1:1); IR (KBr): 3280, 3221, 3134 (ν N-H), 3082 (ν C_{Ar}-H), 2932, 2848 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1607, 1557 (δ N-H), 1496, 1461 (ν C=C), 1382, 1350, 1252, 1223 (ν C-N), 1114 (ν C-O), 1020 (δ C-H), 889, 791 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,53–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,62 (t, 2H, CH₂, $J = 5,5$ Hz), 3,57 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$ Hz), 3,67 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,3$ Hz), 3,81 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,3$ Hz), 7,08 (d, 1H, pirydyna, $J = 9,0$ Hz), 7,34 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,52 (sz. s, 1H, NH), 7,71 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,42 (sz. s, 1H, NH), 12,63 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 24,76, 25,44 (2C), 45,94 (2C), 47,24 (2C), 66,72 (2C), 109,58, 111,09, 139,32, 142,10, 145,53, 158,07, 179,93 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₄N₆OS (348,17):

wartości obliczone C, 55,15; H, 6,94; N, 24,12; wartości zmierzone C, 55,35; H, 6,76; N, 23,89.

6-(Piperydyn-1-ylo)-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (44)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **17** (0,374 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 57%; t.t. 166–168°C (toluen); IR (KBr): 3433, 3295 (ν N-H), 3054 (ν C_{Ar}-H), 2931, 2853 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1603, 1558 (δ N-H), 1535, 1461 (ν C=C), 1361, 1337, 1252 (ν C-N), 1189 (ν C=S), 1111, 1026 (δ C-H), 914, 787 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,53–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,62–1,63 (m, 2H, CH₂), 1,83 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,56 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,66 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,62 (s, 1H, NH), 7,05 (d, 1H, pirydyna, *J* = 9,0 Hz), 7,31 (d, 1H, pirydyna, *J* = 6,5 Hz), 7,69 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,20 (sz. s, 1H, NH), 12,62 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,77, 25,24 (2C), 25,46 (2C), 45,95 (2C), 48,60 (2C), 109,35, 110,77, 139,29, 142,23, 144,04, 158,07, 176,51 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₄N₆S (332,18): wartości obliczone C, 57,80; H, 7,28; N, 25,28; wartości zmierzone C, 57,49; H, 7,20; N, 24,88.

6-(Piperydyn-1-ylo)-N'-(piperydyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (45)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **17** (0,374 g) z piperydyno-1-karbotiohydrazidem (0,318 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 71%; t.t. 188–190°C (bezw. etanol); IR (KBr): 3408, 3222, 3118 (ν N-H), 3026 (ν C_{Ar}-H), 2934, 2851 (ν C-H), 1671 (ν C=N), 1604, 1558 (δ N-H), 1477, 1428 (ν C=C), 1341, 1313, 1248 (ν C-N), 1184 (ν C=S), 1108, 1025 (δ C-H), 887, 795 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,45–1,54 (m, 8H, 4CH₂), 1,57–1,63 (m, 4H, 2CH₂), 3,67 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 3,84 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 7,06 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,32 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,51 (sz. s, 1H, NH), 7,69 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,23 (sz. s, 1H, NH), 12,75 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,76, 25,32, 25,43 (2C), 26,11 (2C), 45,90 (2C), 47,33 (2C), 109,38, 110,80, 139,29, 142,25, 144,45, 158,00, 178,56 ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₂₆N₆S (346,19): wartości obliczone C, 58,93; H, 7,56; N, 24,25; wartości zmierzone C, 58,70; H, 7,44; N, 24,34.

2-{Amino[6-(piperydyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (46)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **17** (0,374 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,238 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 67%; t.t. 157–158°C (toluen); IR (KBr): 3416, 3135 (ν N-H), 3063 (ν C_{Ar}-H), 2941, 2850 (ν C-H), 1672 (ν C=N), 1611, 1573 (δ N-H), 1470, 1439 (ν C=C), 1362, 1336, 1245 (ν C-N), 1195 (ν C=S), 1106, 1024 (δ C-H), 884, 801 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,53–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,62–1,63 (m, 2H, CH₂), 3,16 (s, 6H, 2CH₃), 3,67 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,5 Hz), 7,06 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,32 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,52 (sz. s, 1H, NH), 7,70 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,28 (sz. s, 1H, NH), 12,63 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₂₂N₆S (306,16): wartości obliczone C, 54,87; H, 7,24; N, 27,43; wartości zmierzone C, 43,59; H, 7,22; N, 27,05.

6-Fenoksy-N'-(morfolino-4-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (47)

Reakcja 6-fenoksypikolinonitrylu **18** (0,392 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,322 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 41%; t.t. 131–134°C (etanol); IR (KBr): 3453, 3373, 3173 (ν N-H), 3049 (ν C_{Ar}-H), 2970, 2851 (ν C-H), 1683 (ν C=N), 1588, 1574 (δ N-H), 1441 (ν C=C), 1341, 1253, 1227 (ν C-N), 1197 (ν C=S), 1108 (ν C-O), 1023 (δ C-H), 908, 803 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,55 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 3,78 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 6,48 (sz. s, 1H, NH), 7,20 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,23 (t, 1H, ArH, *J* = 7,5 Hz), 7,28 (d, 2H, 2ArH, *J* = 7,5 Hz), 7,43 (t, 2H, 2ArH, *J* = 7,8 Hz), 7,70 (sz. s, 1H, NH), 7,88 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 8,10 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz), 8,45 (sz. s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 47,16 (2C), 66,69 (2C), 115,09, 116,86, 121,55 (2C), 125,52, 130,45 (2C), 142,48, 142,57, 144,64, 153,29, 162,80, 179,66 ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₁₉N₅O₂S (357,13): wartości obliczone C, 57,13; H, 5,36; N, 19,59; wartości zmierzone C, 57,09; H, 5,21; N, 19,36.

6-Fenoksy-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (48)

Reakcja 6-fenoksypikolinonitrylu **18** (0,392 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 41%; t.t. 170–173°C (etanol); IR (KBr): 3417, 3212, 3114 (ν N-H), 3038 (ν C_{Ar}-H), 2968, 2852 (ν C-H), 1666 (ν C=N), 1591, 1574 (δ N-H), 1445, 1424 (ν C=C), 1342, 1273, 1237 (ν C-N), 1193 (ν C=S), 1107 (ν C-O), 1026 (δ C-H), 906, 797 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,81 (sz. s, 2H, CH₂), 1,85 (sz. s, 2H, CH₂), 3,53 (sz. s, 2H, CH₂), 3,74 (sz. s, 2H, CH₂), 6,36 (s, 2H, NH₂), 7,14–7,29 (m, 4H, 1H

pirydyna + 3ArH), 7,44 (t, 2H, 2ArH, $J = 6,5$ Hz), 7,76 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 8,08 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 9,23 (s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 25,26 (2C), 48,59, 52,86, 115,55, 116,58, 121,43 (2C), 125,43, 130,40 (2C), 142,42, 142,72, 143,23, 153,37, 162,75, 176,98 ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{OS}$ (341,13): wartości obliczone C, 59,80; H, 5,61; N, 20,51; wartości zmierzone C, 59,47; H, 5,21; N, 20,27.

6-Fenoksy-N'-(piperydino-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (49)

Reakcja 6-fenoksypikolinonitrylu **18** (0,392 g) z piperydino-1-karbotiohydrazidem (0,318 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 44%; t.t. 177–177°C (etanol); IR (KBr): 3416, 3135 (ν N-H), 3063 (ν C_{Ar} -H), 2948, 2850 (ν C-H), 1672 (ν C=N), 1611, 1573 (δ N-H), 1470, 1440 (ν C=C), 1336, 1246 (ν C-N), 1195 (ν C=S), 1106 (ν C-O), 1024 (δ C-H), 884, 801 (γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,56 (sz. s, 6H, 3CH₂), 3,27 (sz. s, 2H, CH₂), 3,34 (sz. s, 2H, CH₂), 5,86 (s, 2H, NH₂), 6,97 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,18 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,0$ Hz), 7,24 (t, 1H, ArH, $J = 7,5$ Hz), 7,45 (t, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 7,73 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,88 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 10,22 (sz. s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{OS}$ (355,15): wartości obliczone C, 60,82; H, 5,96; N, 19,70; wartości zmierzone C, 60,62; H, 5,77; N, 20,03.

2-[Amino(6-fenoksypirydyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (50)

Reakcja 6-fenoksypikolinonitrylu **18** (0,392 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,238 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 20%; t.t. 105–108°C (etanol); IR (KBr): 3416, 3135 (ν N-H), 3063 (ν C_{Ar} -H), 2941, 2850 (ν C-H), 1672 (ν C=N), 1611, 1573 (δ N-H), 1470, 1440 (ν C=C), 1362, 1336, 1245 (ν C-N), 1195 (ν C=S), 1105 (ν C-O), 1024 (δ C-H), 884, 801 (γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3,13 (s, 6H, 2CH₃), 6,38 (sz. s, 1H, NH), 7,01 (sz. s, 1H, NH), 7,17 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,5$ Hz), 7,24 (t, 1H, ArH, $J = 7,3$ Hz), 7,28 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,0$ Hz), 7,43 (t, 2H, 2ArH, $J = 7,5$ Hz), 7,85 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,0$ Hz), 8,08 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 9,17 (sz. s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{OS}$ (315,12): wartości obliczone C, 57,12; H, 5,43; N, 22,21; wartości zmierzone C, 56,84; H, 5,36; N, 21,98.

Metoda syntezy 4-podstawionego metyloiminoestru (51)

30 mmoli (4,14 g) 4-chloropikolinonitrylu oraz 13 mmoli (2 ml) DBU rozpuszczono w 50 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 0,5 h. Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika i dodaniu lodu do poprzedniej objętości wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

4-Chloropikolinimidan metylu (51)

Wydajność: 82%; t.t. 47–48°C (etanol); IR (KBr): 3455, 3399, 3348, 3279 (ν N-H), 3088 (ν C_{Ar}-H), 2980 (ν C-H), 1639 (ν C=N), 1568 (δ N-H), 1548 (ν C=C), 1352 (ν C-N), 1175, 1156 (ν C-O), 1088 (δ C-H), 883, 809, (γ C-H), 729 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,90 (s, 3H, CH₃), 7,74 (sz. s, 1H, pirydyna), 7,84 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,69 (sz. s, 1H, pirydyna), 9,23 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₇H₇ClN₂O (170,02): wartości obliczone C, 49,28; H, 4,14; N, 16,42; wartości zmierzone C, 49,28; H, 4,24; N, 16,76.

Metoda ogólna tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny z atomem chloru w pozycji C4 (52–55)

2 mmole metyloiminoestru **51** oraz 2,3 mmola (0,35 ml) DBU rozpuszczono w 5 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 0,5 h. Następnie, dodano 2 mmole odpowiedniego karbotiohydrazynu oraz kontynuowano ogrzewanie przez kolejną 1 h. Po zakwaszeniu kwasem octowym wytrącił się osad. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

4-Chloro-N'-(morfolino-4-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (52)

Reakcja 4-chloropikolinimidanu metylu **51** (0,340 g) z morfolino-4-karbotiohydrazynem (0,322 g). Wydajność: 77%; t.t. 188–189°C (etanol); IR (KBr): 3322, 3271, 3217, 3129 (ν N-H), 3039 (ν C_{Ar}-H), 2967, 2835 (ν C-H), 1670 (ν C=N), 1601, 1573 (δ N-H), 1458, 1416 (ν C=C), 1344, 1284, 1264, 1224 (ν C-N), 1165 (ν C=S), 1115 (ν C-O), 1024 (δ C-H), 892, 842, 758 (γ C-H), 701 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,57 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,84 (sz. s, 4H, 2CH₂), 7,81–7,99 (m, 2H, 1H pirydyna + 1H NH), 8,35 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,57 (sz. s, 1H, NH), 8,75 (d, 1H, pirydyna, *J* = 5,0 Hz), 12,66 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₄ClN₅OS (299,06): wartości obliczone C, 44,07; H, 4,71; N, 23,36; wartości zmierzone C, 44,43; H, 4,33; N, 23,28.

4-Chloro-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (53)

Reakcja 4-chloropikolinimidanu metylu **51** (0,340 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazydem (0,290 g). Wydajność: 56%; t.t. 179–180°C (etanol); IR (KBr): 3411, 3228, 3130 (ν N-H), 3061, 3001 (ν C_{Ar}-H), 2960, 2868 (ν C-H), 1672 (ν C=N), 1597, 1574 (δ N-H), 1451, 1435 (ν C=C), 1356, 1274, 1237 (ν C-N), 1193 (ν C=S), 1118, 1079 (δ C-H), 917, 849, 764 (γ C-H), 718 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,83–1,88 (m, 4H, 2CH₂), 3,57 (sz. s, 2H, CH₂), 3,72 (sz. s, 2H, CH₂), 6,84 (s, 1H, NH), 7,60 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,02 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,55 (d, 1H, pirydyna, *J* = 4,5 Hz), 9,25 (s, 1H, NH), 12,65 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₄ClN₅S (283,07): wartości obliczone C, 46,56; H, 4,97; N, 24,68; wartości zmierzone C, 46,53; H, 4,93; N, 24,54.

4-Chloro-N'-(piperydyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (54)

Reakcja 4-chloropikolinimidanu metylu **51** (0,340 g) z piperydyno-1-karbotiohydrazydem (0,318 g). Wydajność: 50%; t.t. 162–163°C (etanol); IR (KBr): 3413, 3234, 3136 (ν N-H), 3058, 3016 (ν C_{Ar}-H), 2932, 2850 (ν C-H), 1668 (ν C=N), 1596, 1574 (δ N-H), 1472, 1428 (ν C=C), 1330, 1289, 1247 (ν C-N), 1220 (ν C=S), 1119, 1076 (δ C-H), 849, 758 (γ C-H), 698 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,46 (sz. s, 4H, 2CH₂), 1,60 (sz. s, 2H, CH₂), 3,86 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,90 (s, 1H, NH), 7,79 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,32 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,74 (sz. s, 1H, pirydyna), 9,20 (s, 1H, NH), 12,80 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₁₆ClN₅S (297,08): wartości obliczone C, 48,40; H, 5,42; N, 23,52; wartości zmierzone C, 48,01; H, 4,81; N, 23,17.

2-[Amino(4-chloropirazyn-2-ylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (55)

Reakcja 4-chloropikolinimidanu metylu **51** (0,340 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazydem (0,238 g). Wydajność: 46%; t.t. 159–160°C (etanol); IR (KBr): 3418, 3278, 3244, 3149 (ν N-H), 3029 (ν C_{Ar}-H), 2990, 2919 (ν C-H), 1673 (ν C=N), 1595, 1576 (δ N-H), 1506, 1481 (ν C=C), 1380, 1344, 1294, 1239 (ν C-N), 1144 (ν C=S), 1063 (δ C-H), 850, 765 (γ C-H), 701 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,21 (s, 6H, 2CH₃), 6,80 (s, 1H, NH), 7,83 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,10 (sz. s, 1H, pirydyna), 8,60 (sz. s, 1H, pirydyna), 9,20 (s, 1H, NH), 12,68 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₉H₁₂ClN₅S (257,05): wartości obliczone C, 41,94; H, 4,69; N, 27,17; wartości zmierzone C, 42,03; H, 4,67; N, 26,89.

Metoda syntezy 4-podstawionego nitrylu (**56**)

40 mmoli (5,52 g) 4-chloropikolinonitrylu, 48 mmoli (4,74 ml) piperydyny oraz 40 mmoli (6 ml) DBU rozpuszczono w 25 ml dioksanu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika i dodaniu lodu do poprzedniej objętości wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono techniką chromatografii kolumnowej, a następnie poprzez krystalizację.

4-(Piperydyn-1-ylo)pikolinonitryl (**56**)

Wydajność: 92%; t.t. 79–81°C (chromatografia kolumnowa z fazą ruchomą AcOEt:CHCl₃ 2:1, następnie krystalizacja z metanolu); IR (KBr): 3002 (ν C_{Ar}-H), 2916, 2851 (ν C-H), 2233 (ν C≡N), 1596 (ν C=N), 1500, 1442 (ν C=C), 1266, 1215 (ν C-N), 1023 (δ C-H), 817 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,52–1,55 (m, 4H, 2CH₂), 1,60–1,63 (m, 2H, CH₂), 3,43 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,5 Hz), 7,02 (dd, 1H, pirydyna, *J*₁ = 9,0 Hz, *J*₂ = 3,0 Hz), 7,45 (d, 1H, pirydyna, *J* = 3,0 Hz), 8,18 (d, 1H, pirydyna, *J* = 6,0 Hz) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,27, 25,05 (2C), 46,89 (2C), 110,72, 113,40, 118,82, 133,86, 151,38, 154,46 ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₃N₃ (187,11): wartości obliczone C, 70,56; H, 7,00; N, 22,44; wartości zmierzone C, 70,62; H, 7,03; N, 22,31.

Metoda ogólna syntezy 4-podstawionych tiosemikrazonowych pochodnych piperydyny (**57–60**)

2 mmole nitrylu **56** oraz 2,7 mmola (0,4 ml) DBU rozpuszczono w 15 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Następnie, dodano 2 mmole odpowiedniego karbotiohydrazynu oraz kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 2–2,5 h. Po dodaniu lodu i zakwaszeniu kwasem octowym wytrącił się osad. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

N'-(Morfolino-4-karbonotioilo)-4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**57**)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **56** (0,374 g) z morfolino-4-karbotiohydrazidem (0,322 g). Czas reakcji: 2,5 h. Wydajność: 39%; t.t. 189–191°C (etanol); IR (KBr): 3403, 3240 (ν N-H), 3094 (ν C_{Ar}-H), 2932, 2842 (ν C-H), 1664 (ν C=N), 1606, 1578 (δ N-H), 1486, 1416 (ν C=C), 1348, 1311, 1244 (ν C-N), 1115 (ν C-O), 1024 (δ C-H), 891, 848, 759 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,57–1,59 (m, 4H, 2CH₂), 1,63–1,65 (m, 2H, CH₂), 3,49 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,5 Hz), 3,58 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5),

3,80 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,0$ Hz), 6,95 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz), 7,55–7,57 (m, 2H, 1H pirydyna + 1H NH), 8,24 (d, 1H, pirydyna, $J = 6,0$ Hz), 8,58 (sz. s, 1H, NH), 12,46 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₄N₆OS (348,17): wartości obliczone C, 55,15; H, 6,94; N, 24,12; wartości zmierzone C, 55,45; H, 6,98; N, 23,79.

4-(Piperydyn-1-ylo)-N'-(pirolidyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (58)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **56** (0,374 g) z pirolidyno-1-karbotiohydrazidem (0,290 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 75%; t.t. 201–203°C (etanol); IR (KBr): 3393, 3238 (ν N-H), 3064 (ν C_{Ar}-H), 2932, 2850 (ν C-H), 1663 (ν C=N), 1604, 1578 (δ N-H), 1487, 1425 (ν C=C), 1374, 1309, 1234 (ν C-N), 1193 (ν C=S), 1123, 1097 (δ C-H), 907, 849, 812 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,57–1,58 (m, 4H, 2CH₂), 1,63–1,64 (m, 2H, CH₂), 1,83 (t, 4H, 2CH₂, $J = 6,5$ Hz), 3,48 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$), 3,56 (t, 4H, 2CH₂, $J = 6,0$ Hz), 6,92 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz), 7,19 (sz. s, 1H, NH), 7,53 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,0$ Hz), 8,22 (d, 1H, pirydyna, $J = 6,5$ Hz), 8,44 (sz. s, 1H, NH), 12,43 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₂₄N₆S (332,18): wartości obliczone C, 57,80; H, 7,28; N, 25,28; wartości zmierzone C, 57,40; H, 7,24; N, 24,99.

4-(Piperydyn-1-ylo)-N'-(piperydyno-1-karbonotioilo)pikolinohydrazonamid (59)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **56** (0,374 g) z piperydyno-1-karbotiohydrazidem (0,318 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 71%; t.t. 188–190°C (etanol); IR (KBr): 3403, 3240 (ν N-H), 3067 (ν C_{Ar}-H), 2931, 2845 (ν C-H), 1665 (ν C=N), 1606, 1577 (δ N-H), 1483, 1421 (ν C=C), 1378, 1356, 1309, 1241 (ν C-N), 1123, 1097 (δ C-H), 884, 852, 822 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,43–1,44 (m, 4H, 2CH₂), 1,55–1,57 (m, 6H, 3CH₂), 1,60–1,62 (m, 2H, CH₂), 3,46 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,5$ Hz), 3,81 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,3$ Hz), 6,90 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz), 7,38 (sz. s, 1H, NH), 7,52 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,0$ Hz), 8,21 (d, 1H, pirydyna, $J = 6,5$ Hz), 8,41 (sz. s, 1H, NH), 12,56 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,35, 25,20 (2C), 25,31, 26,12 (2C), 47,02 (2C), 47,30 (2C), 105,74, 109,45, 145,00, 145,13, 150,17, 155,50, 178,37 ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₂₆N₆S (346,19): wartości obliczone C, 58,93; H, 7,56; N, 24,25; wartości zmierzone C, 58,73; H, 7,61; N, 24,24.

2-{Amino[4-(piperydyn-1-ylo)pirydyn-2-ylo]metyleno}-N,N-dimetylohydrazynokarbotioamid (60)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **56** (0,374 g) z *N,N*-dimetylokarbotiohydrazidem (0,238 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 71%; t.t. 180–181°C (etanol); IR (KBr): 3381, 3240, 3213 (ν N-H), 3073 (ν C_{Ar}-H), 2935, 2854 (ν C-H), 1660 (ν C=N), 1606, 1579 (δ N-H), 1511, 1467, 1443 (ν C=C), 1365, 1301, 1243 (ν C-N), 1118, 1062 (δ C-H), 917, 857, 809 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,55–1,56 (m, 4H, 2CH₂), 1,60–1,62 (m, 2H, CH₂), 3,14 (s, 6H, 2CH₃), 3,46 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 6,91 (dd, 1H, pirydyna, *J*₁ = 8,0 Hz, *J*₂ = 4,0 Hz), 7,30 (sz. s, 1H, NH), 7,52 (d, 1H, pirydyna, *J* = 2 Hz), 8,20 (d, 1H, pirydyna, *J* = 6,5 Hz), 8,42 (sz. s, 1H, NH), 12,43 (s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₂₂N₆S (306,16): wartości obliczone C, 54,87; H, 7,24; N, 27,43; wartości zmierzone C, 54,69; H, 7,48; N, 27,50.

Metoda ogólna syntezy amidrazonów (61–72)

Metoda A (61, 62, 71)

15 mmoli odpowiedniego metyloiminoestru rozpuszczono w 5 ml etanolu, a następnie dodano 25 mmoli (1,4 ml) 80% wodzianu hydrazyny. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 0,5 h. Po ochłodzeniu wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

Metoda B (63–65, 67–70, 72)

10 mmoli odpowiedniego nitrylu oraz 13,5 mmola (2 ml) DBU rozpuszczono w 75 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 h. Po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika i dodaniu 40 mmoli (2 ml) 80% wodzianu hydrazyny kontynuowano ogrzewanie przez 0,5–2 h. Po ochłodzeniu i dodaniu 30 g lodu wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację z metanolu, a w jednym przypadku techniką RP-HPLC.

Metoda syntezy amidrazonu 66

10 mmoli (1,97 g) nitrylu **14** rozpuszczono w 35 ml etanolu, a następnie dodano 103 mmole (5 ml) 99% wodzianu hydrazyny. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po ochłodzeniu wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację z metanolu.

6-Chloropirazyno-2-karbohidrazonamid (61)

Reakcja z 6-chloropirazyno-2-karbimidanu metylu **1** (2,57 g). Wydajność: 69%; t.t. 153–156°C (metanol); IR (KBr): 3412, 3327, 3266 (ν N-H), 1651 (ν C=N), 1577, 1559 (δ N-H), 1514, 1445, 1404 (ν C=C), 1364, 1329 (ν C-N), 1178, 1135, 1062, 1009 (δ C-H), 878, 865 (γ C-H), 742 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5,74 (s, 2H, NH₂), 5,84 (s, 2H, NH₂), 7,35 (s, 1H, pirazyna), 8,51 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₅H₆ClN₅ (171,03): wartości obliczone C, 35,00; H, 3,52; N, 40,82; wartości zmierzone C, 35,27; H, 3,32; N, 40,51.

6-Chloropikolinohidrazonamid (62)

Reakcja z 6-chloropikolinimidanu metylu (2,55 g). Wydajność: 82%; t.t. 193–195°C (metanol); IR (KBr): 3448, 3282 (ν N-H), 1644 (ν C=N), 1583, 1556 (δ N-H), 1455, 1404 (ν C=C), 1164, 1140, 1075, 991 (δ C-H), 844, 802 (γ C-H), 733, 646 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5,51 (s, 2H, NH₂), 5,64 (s, 2H, NH₂), 7,41 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 7,79 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 7,87 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₆H₇ClN₄ (170,04): wartości obliczone C, 42,24; H, 4,14; N, 32,84; wartości zmierzone C, 42,41; H, 3,95; N, 32,65.

6-Morfolinopirazyno-2-karbohidrazonamid (63)

Reakcja z 6-morfolinopirazyno-2-karbonitrylu **11** (1,90 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 100%; t.t. 146–149°C (metanol); IR (KBr): 3415, 3320, 3210 (ν N-H), 3089 (ν C_{Ar}-H), 2963, 2900, 2853 (ν C-H), 1648 (ν C=N), 1567 (δ N-H), 1524, 1438 (ν C=C), 1261 (ν C-N), 1173, 1072, 1024, 1000, 978 (δ C-H), 1118 (ν C-O), 881, 842, 745 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,55 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 3,70 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 5,38 (s, 2H, NH₂), 5,64 (s, 2H, NH₂), 8,11 (s, 1H, pirazyna), 8,34 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₉H₁₄N₆O (222,12): wartości obliczone C, 48,64; H, 6,35; N, 37,81; wartości zmierzone C, 48,77; H, 6,32; N, 37,51.

6-(Pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamid (64)

Reakcja z 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbonitrylu **12** (1,74 g). Czas reakcji: 2,5 h. Wydajność: 86%; t.t. 223–226°C (metanol); IR (KBr): 3438, 3353, 3338 (ν N-H), 3075 (ν C_{Ar}-H), 2970, 2864 (ν C-H), 1640 (ν C=N), 1577 (δ N-H), 1519, 1483, 1456, 1437 (ν C=C), 1349, 1208 (ν C-N), 1180, 1161, 994 (δ C-H), 838, 790 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,92–1,95 (m, 4H, 2CH₂), 3,44 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,5 Hz), 5,32

(s, 2H, NH₂), 5,60 (s, 2H, NH₂), 7,77 (s, 1H, pirazyna), 8,22 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₉H₁₄N₆ (206,13): wartości obliczone C, 52,41; H, 6,84; N, 40,75; wartości zmierzone C, 52,77; H, 6,52; N, 40,51.

6-(Piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (65)

Reakcja z 6-(piperydyn-1-ylo)pirazynokarbonitrylu **13** (1,88 g). Czas reakcji: 1,5 h. Wydajność: 84%; t.t. 105–108°C (metanol); IR (KBr): 3355 (ν N-H), 2932, 2852 (ν C-H), 1647, 1611 (ν C=N), 1575 (δ N-H), 1523, 1445 (ν C=C), 1271, 1255 (ν C-N), 1182, 1125, 1023, 997 (δ C-H), 851, 750 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,55–1,60 (m, 6H, 3CH₂), 3,58 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 5,35 (s, 2H, NH₂), 5,58 (s, 2H, NH₂), 8,10 (s, 1H, pirazyna), 8,24 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₁₆N₆ (220,14): wartości obliczone C, 54,53; H, 7,32; N, 38,15; wartości zmierzone C, 54,50; H, 7,52; N, 38,51.

6-Fenoksypirazyno-2-karbohydrazonamid (66)

Reakcja z 6-fenoksypirazyno-2-karbonitrylu **14** (1,97 g). Wydajność: 69%; t.t. 58–61°C (metanol); IR (KBr): 3332, 3203 (ν N-H), 3066 (ν C_{Ar}-H), 1641, 1621 (ν C=N), 1574 (δ N-H), 1529, 1489, 1461, 1415 (ν C=C), 1282 (ν C-N), 1186 (ν C-O), 1071, 1023, 1009 (δ C-H), 875, 786, 755 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5,35 (s, 2H, NH₂), 5,61 (s, 2H, NH₂), 7,22–7,27 (m, 3H, 3ArH), 7,44–7,47 (m, 2H, 2ArH) 8,27 (s, 1H, pirazyna), 8,80 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₁N₅O (229,10): wartości obliczone C, 57,63; H, 4,84; N, 30,55; wartości zmierzone C, 57,77; H, 4,32; N, 30,57.

6-Morfolinopikolinohydrazonamid (67)

Reakcja z 6-morfolinopikolinonitrylu **15** (1,89 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 59%; t.t. 73–78°C (metanol); IR (KBr): 3451 (ν N-H), 2976, 2926, 2858 (ν C-H), 1646 (ν C=N), 1594 (δ N-H), 1473, 1449 (ν C=C), 1255 (ν C-N), 1168, 1067, 985 (δ C-H), 1116 (ν C-O), 863,797 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,44 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 3,69 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 5,18 (sz. s, 2H, NH₂), 5,59 (s, 2H, NH₂), 6,69 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 7,20 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 7,49 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₁₅N₅O (221,13): wartości obliczone C, 54,28; H, 6,83; N, 31,65; wartości zmierzone C, 54,33; H, 6,95; N, 31,34.

Chlorek 2-karbamohydrazonoilo-6-pirolidyn-1-ylo)pirydyniowy (68)

Reakcja z 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinonitrylu **16** (1,73 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 86%; t.t. 67–69°C; IR (KBr): 3442, 3377 (ν N-H), 3075 (ν C_{Ar}-H), 2961, 2863 (ν C-H), 1652 (ν C=N), 1595 (δ N-H), 1497, 1481, 1458 (ν C=C), 1339, 1299, 1247 (ν C-N), 1159, 1021 (δ C-H), 869, 793 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,95 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,47 (sz. s, 4H, 2CH₂), 5,37 (sz. s, 2H, NH₂), 6,75 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 6,26 (d, 1H, pirydyna, *J* = 9,0 Hz), 7,68 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 9,00 (sz. s, 2H, NH₂), 10,93 (sz. s, 1H, NH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₁₆ClN₅ (241,11): wartości obliczone C, 49,69; H, 6,67; N, 28,97; wartości zmierzone C, 49,80; H, 6,99; N, 28,74.

6-(Piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (69)

Reakcja z 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **17** (1,87 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 78%; t.t. 59–61°C (metanol); IR (KBr): 3462 (ν N-H), 2933, 2849 (ν C-H), 1652 (ν C=N), 1587, 1565 (δ N-H), 1482, 1460, 1447 (ν C=C), 1266, 1249 (ν C-N), 1175, 1123, 1025, 981 (δ C-H), 854, 792, 737 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,53–1,58 (m, 6H, 3CH₂), 3,50 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 5,14 (sz. s, 2H, NH₂), 5,50 (s, 2H, NH₂), 6,67 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,10 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,43 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₁₇N₅ (219,15): wartości obliczone C, 60,25; H, 7,81; N, 31,94; wartości zmierzone C, 60,15; H, 7,97; N, 32,15.

6-Fenoksypikolinohydrazonamid (70)

Reakcja z 6-fenoksypikolinonitrylu **18** (1,96 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 61%; t.t. 100–102°C (metanol); IR (KBr): 3442 (ν N-H), 1646, 1623 (ν C=N), 1586, 1566 (δ N-H), 1490, 1444 (ν C=C), 1253 (ν C-N), 1199 (ν C-O), 1153, 1022, 955 (δ C-H), 806, 789, 761 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5,04 (sz. s, 2H, NH₂), 5,32 (s, 2H, NH₂), 6,85 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 7,13–7,16 (m, 2H, 2ArH), 7,21 (t, 1H, ArH, *J* = 7,0 Hz), 7,43 (t, 2H, 2ArH, *J* = 7,8 Hz), 7,60 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 7,77 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₁₂N₄O (228,10): wartości obliczone C, 63,15; H, 5,30; N, 24,55; wartości zmierzone C, 63,37; H, 5,19; N, 24,57.

4-Chloropikolinohydrazonamid (71)

Reakcja z 4-chloropikolinimidanu metylu **51** (2,55 g). Wydajność: 67%; t.t. 107–109°C (etanol); IR (KBr): 3398, 3348, 3281 (ν N-H), 3094, 3056 (ν C_{Ar}-H), 1643, 1610 (ν C=N), 1576, 1548 (δ N-H), 1464, 1421 (ν C=C), 1325 (ν C-N), 1134, 1094, 1037, 991 (δ C-H),

879, 813, 747 (γ C-H), 729, 684, 652 (ν C-Cl) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 5,49 (s, 2H, NH_2), 5,77 (s, 2H, NH_2), 7,44 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz), 7,90 (d, 1H, pirydyna, $J = 1,5$ Hz), 8,47 (d, 1H, pirydyna, $J = 5,5$ Hz) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_6\text{H}_7\text{ClN}_4$ (170,04): wartości obliczone C, 42,24; H, 4,14; N, 32,84; wartości zmierzone C, 42,48; H, 4,07; N, 32,68.

4-(Piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (72)

Reakcja z 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinonitrylu **56** (1,87 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 63%; t.t. 63–65°C (metanol); IR (KBr): 3434, 3287 (ν N-H), 2927, 2858 (ν C-H), 1651 (ν C=N), 1584, 1564 (δ N-H), 1477, 1430 (ν C=C), 1269, 1251 (ν C-N), 1171, 1128, 1020, 989 (δ C-H), 845, 790, 740 (γ C-H) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,54–1,58 (m, 6H, 3 CH_2), 3,49 (7, 4H, 2 CH_2 , $J = 5,3$ Hz), 5,11 (sz. s, 2H, NH_2), 5,61 (s, 2H, NH_2), 6,69 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz), 7,13 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,0$ Hz), 7,46 (d, 1H, pirydyna, $J = 5,5$ Hz) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_5$ (219,15): wartości obliczone C, 60,25; H, 7,81; N, 31,94; wartości zmierzone C, 60,11; H, 7,88; N, 32,05.

Metoda ogólna syntezy dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny i pirydyny (73–120)

1 mmol odpowiedniego hydrazonamidu oraz 1 mmol odpowiedniego aldehydu heterocyklicznego rozpuszczono w 10 ml metanolu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 0,5–2,5 h. Po ochłodzeniu roztworu wytrącił się osad, który odsączono i suszono na powietrzu. Produkt reakcji oczyszczono poprzez krystalizację.

6-Chloro-N'-(4-nitrobenzylideno)pirazyno-2-karbohydrazonamid (73)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbohydrazonamidu **61** (0,171 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 85%; t.t. 236–237°C (dioksan); IR (KBr): 3472, 3364 (ν N-H), 3083, 3059 (ν C_{Ar} -H), 1617 (ν C=N), 1557 (δ N-H), 1525 (ν C- NO_2 asym.), 1489, 1458, 1430 (ν C=C), 1359, 1291 (ν C-N), 1331 (ν C- NO_2 sym.), 1212, 1157, 1145, 1020, 991 (δ C-H), 808, 733 (γ C-H), 646 (ν C-Cl) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7,42 (sz. s, 1H, NH), 7,67 (sz. s, 1H, NH), 8,26 (d, 2H, 2ArH, $J = 9,0$ Hz), 8,29 (d, 2H, 2ArH, $J = 9,5$ Hz), 8,64 (s, 1H, CH), 8,96 (s, 1H, pirazyna), 9,34 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_6\text{O}_2$ (304,05): wartości obliczone C, 47,30; H, 2,98; N, 27,58; wartości zmierzone C, 46,94; H, 2,58; N, 27,40.

N'-Benzylideno-6-chloropirazyno-2-karbohydrazonamid (**74**)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbohydrazonamidu **61** (0,171 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 98%; t.t. 121–123°C (etanol); IR (KBr): 3462, 3333 (ν N-H), 3062 (ν C_{Ar}-H), 1630 (ν C=N), 1557 (δ N-H), 1511, 1454 (ν C=C), 1363, 1340 (ν C-N), 1166, 1135, 1007, 953 (δ C-H), 882, 851, 749 (γ C-H), 696, 654 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,22 (sz. s, 2H, NH₂), 7,45–7,47 (m, 3H, 3ArH), 7,96–7,98 (m, 2H, 2ArH), 8,53 (s, 1H, CH), 8,93 (s, 1H, pirazyna), 9,33 (s, 1H, pirazyna) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 128,61 (2C), 129,06 (2C), 130,74, 135,54, 141,66, 145,79, 146,55, 147,60, 154,87, 156,08 ppm; Analiza elementarna dla C₁₂H₁₀ClN₅ (259,06): wartości obliczone C, 55,50; H, 3,88; N, 26,97; wartości zmierzone C, 55,61; H, 3,49; N, 26,62.

6-Chloro-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohydrazonamid (**75**)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbohydrazonamidu **61** (0,171 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 93%; t.t. 174–177°C (dioksan); IR (KBr): 3489, 3351, 3275 (ν N-H), 3082, 3064, 3036 (ν C_{Ar}-H), 1625 (ν C=N), 1558 (δ N-H), 1515 (ν C-NO₂ asym.), 1490, 1420 (ν C=C), 1354 (ν C-N), 1327 (ν C-NO₂ sym.), 1203, 1170, 1114, 1083, 1039, 1009, 981 (δ C-H), 815, 732 (γ C-H), 679 (ν C-Cl), 569 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,66 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 7,77 (sz. s, 1H, NH), 7,87 (sz. s, 1H, NH), 8,16 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 8,37 (s, 1H, CH), 9,03 (s, 1H, pirazyna), 9,48 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₇ClN₆O₂S (310,00): wartości obliczone C, 38,66; H, 2,27; N, 27,05; wartości zmierzone C, 38,92; H, 2,14; N, 26,91.

6-Chloro-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohydrazonamid (**76**)

Reakcja 6-chloropirazyno-2-karbohydrazonamidu **61** (0,171 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 91%; t.t. 215–218°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3450, 3268 (ν N-H), 3075, 3062 (ν C_{Ar}-H), 1621, 1595 (ν C=N), 1564 (δ N-H), 1510 (ν C-NO₂ asym.), 1473, 1446 (ν C=C), 1389, 1301 (ν C-N), 1344 (ν C-NO₂ sym.), 1241 (ν C-O-C asym.), 1168, 1141 (δ C-H), 1010 (ν C-O-C sym.), 809, 736 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,47 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,54 (s, 2H, NH₂), 7,85 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 8,43 (s, 1H, CH), 8,97 (s, 1H, pirazyna), 9,32 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₀H₇ClN₆O₃ (294,03): wartości obliczone C, 40,76; H, 2,39; N, 28,52; wartości zmierzone C, 40,62; H, 2,08; N, 28,30.

6-Morfolino-N'-(4-nitrobenzylideno)pirazyno-2-karbohydrazonamid (77)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbohydrazonamidu **63** (0,222 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 3,5 h. Wydajność: 85%; t.t. 236–238°C (etanol-dioksan 1:1); IR (KBr): 3465, 3342 (ν N-H), 3073, 3046 (ν C_{Ar}-H), 2966, 2880, 2834 (ν C-H), 1627, 1607 (ν C=N), 1569 (δ N-H), 1522 (ν C-NO₂ asym.), 1503, 1447, 1401 (ν C=C), 1339 (ν C-NO₂ sym.), 1259 (ν C-N), 1206, 1172, 1027, 999 (δ C-H), 1120 (ν C-O), 885, 852, 830, 749 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67–3,69 (m, 4H, 2CH₂), 3,75 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 7,29 (s, 1H, NH), 7,48 (s, 1H, NH), 8,21 (d, 2H, 2ArH, *J* = 8,5 Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,0 Hz), 8,42 (s, 1H, pirazyna), 8,60 (s, 1H, CH), 8,63 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₇N₇O₃ (355,14): wartości obliczone C, 54,08; H, 4,82; N, 27,59; wartości zmierzone C, 53,78; H, 4,48; N, 27,55.

N'-Benzylideno-6-morfolinopirazyno-2-karbohydrazonamid (78)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbohydrazonamidu **63** (0,222 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 77%; t.t. 205–207°C (etanol); IR (KBr): 3453, 3304 (ν N-H), 3053, 3022 (ν C_{Ar}-H), 2972, 2842 (ν C-H), 1613 (ν C=N), 1564 (δ N-H), 1526, 1444, 1400 (ν C=C), 1262, 1215 (ν C-N), 1172, 1151, 1012, 1001 (δ C-H), 1122 (ν C-O), 864, 761 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 3,75 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 7,08 (sz. s, 2H, NH₂), 7,44–7,46 (m, 3H, 3ArH), 7,94 (dd, 2H, 2ArH, *J*₁ = 9,0 Hz, *J*₂ = 5,5 Hz), 8,40 (s, 1H, pirazyna), 8,49 (s, 1H, CH), 8,63 (s, 1H, pirazyna) ppm; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 44,72 (2C), 66,29 (2C), 128,35 (2C), 129,00 (2C), 137,98, 130,38, 132,33, 135,82, 142,93, 153,77, 154,79, 156,47 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆O (310,15): wartości obliczone C, 61,92; H, 5,85; N, 27,08; wartości zmierzone C, 61,74; H, 5,78; N, 27,29.

6-Morfolino-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohydrazonamid (79)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbohydrazonamidu **63** (0,222 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 88%; t.t. 230–234°C (etanol, dioksan); IR (KBr): 3442, 3262 (ν N-H), 3093 (ν C_{Ar}-H), 2990, 2961, 2902, 2850 (ν C-H), 1614 (ν C=N), 1578 (δ N-H), 1526 (ν C-NO₂ asym.), 1485, 1448, 1419, 1404 (ν C=C), 1323 (ν C-NO₂ sym.), 1257, 1219 (ν C-N), 1175, 1069, 1047, 1003 (δ C-H), 1116 (ν C-O), 881, 868, 813, 734 (γ C-H), 570 (ν C-S-C), cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,71–3,74 (m, 8H, 4CH₂), 7,62 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 7,68 (s, 1H, NH), 7,75 (s, 1H, NH), 8,14 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,0 Hz), 8,31 (s, 1H, CH), 8,50 (s, 1H, pirazyna), 8,81 (s, 1H,

pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla $C_{14}H_{15}N_7O_3S$ (361,10): wartości obliczone C, 46,53; H, 4,18; N, 27,13; wartości zmierzone C, 46,32; H, 3,78; N, 26,73.

6-Morfolino-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohydrazonamid (80)

Reakcja 6-morfolinopirazyno-2-karbohydrazonamidu **63** (0,222 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 77%; t.t. 238–241°C (etanol-dioksan 5:1); IR (KBr): 3451, 3287 (ν N-H), 2955, 2899, 2863, 2850 (ν C-H), 1625 (ν C=N), 1571 (δ N-H), 1532 (ν C-NO₂ asym.), 1503, 1476, 1446, 1401 (ν C=C), 1349 (ν C-NO₂ sym.), 1303 (ν C-N), 1246 (ν C-O-C asym.), 1178, 1147, 961 (δ C-H), 1117 (ν C-O), 1003 (ν C-O-C sym.), 827, 811, 740 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,68 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 3,74 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 7,32 (s, 1H, NH), 7,40 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,45 (s, 1H, NH), 7,85 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 8,39 (s, 1H, CH), 8,44 (s, 1H, pirazyna), 8,62 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla $C_{14}H_{15}N_7O_4$ (345,12): wartości obliczone C, 48,70; H, 4,38; N, 28,39; wartości zmierzone C, 48,76; H, 4,04; N, 28,08.

N'-(4-Nitrobenzylideno)-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (81)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu **64** (0,206 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 2 h. Wydajność: 90%; t.t. 253–255°C (dioksan); IR (KBr): 3461, 3339 (ν N-H), 2970, 2873 (ν C-H), 1629 (ν C=N), 1573 (δ N-H), 1526 (ν C-NO₂ asym.), 1503, 1449, 1412 (ν C=C), 1329 (ν C-NO₂ sym.), 1217 (ν C-N), 1158, 1102, 1030, 995 (δ C-H), 852, 751 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,97–1,99 (m, 4H, 2CH₂), 3,55 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,5 Hz), 7,01 (s, 1H, NH), 7,50 (s, 1H, NH), 8,07 (s, 1H, pirazyna), 8,21 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,0 Hz), 8,29 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,0 Hz), 8,53 (s, 1H, CH), 8,60 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla $C_{16}H_{17}N_7O_2$ (339,14): wartości obliczone C, 56,63; H, 5,05; N, 28,89; wartości zmierzone C, 56,51; H, 4,83; N, 28,59.

N'-Benzylideno-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (82)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu **64** (0,206 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 1,5 h. Wydajność: 92%; t.t. 211–213°C (etanol); IR (KBr): 3450, 3317 (ν N-H), 3055, 3020 (ν C_{Ar}-H), 2969, 2864 (ν C-H), 1614 (ν C=N), 1565 (δ N-H), 1526, 1480, 1437, 1405 (ν C=C), 1345, 1233 (ν C-N), 1159, 1146, 1025, 988 (δ C-H), 860, 760 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,99 (t, 4H, 2CH₂, *J* =

6,5 Hz), 3,53 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,5 Hz), 6,85 (sz. s, 1H, NH), 7,11 (sz. s, 1H, NH), 7,43–7,46 (m, 3H, 3ArH), 7,93 (dd, 2H, 2ArH, *J*₁ = 9,5 Hz, *J*₂ = 6,0 Hz), 8,04 (s, 1H, pirazyna), 8,48 (s, 1H, CH), 8,51 (s, 1H, pirazyna) ppm; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 25,31 (2C), 46,55 (2C), 128,29 (2C), 128,83, 129,00 (2C), 130,34, 132,12, 135,84, 143,10, 151,76, 154,65, 156,60 ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆ (294,16): wartości obliczone C, 65,29; H, 6,16; N, 28,55; wartości zmierzone C, 65,13; H, 6,32; N, 28,84.

N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid
(83)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu **64** (0,206 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 93%; t.t. 214–217°C (dioksan); IR (KBr): 3426, 3256 (ν N-H), 3073 (ν C_{Ar}-H), 2961, 2866 (ν C-H), 1617 (ν C=N), 1577 (δ N-H), 1526 (ν C-NO₂ asym.), 1495, 1404 (ν C=C), 1324 (ν C-NO₂ sym.), 1221, 1205 (ν C-N), 1155, 1025, 997, 981 (δ C-H), 814, 731 (γ C-H), 622 (ν C-S-C), cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,98 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,5 Hz), 3,55 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,3 Hz), 7,43 (s, 1H, NH), 7,61 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,0 Hz), 7,76 (s, 1H, NH), 8,13–8,14 (m, 2H, tiofen + pirazyna), 8,31 (s, 1H, CH), 8,71 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₁₅N₇O₂S (345,10): wartości obliczone C, 48,69; H, 4,38; N, 28,39; wartości zmierzone C, 48,82; H, 4,44; N, 28,21.

N'-[(5-Nitrofuran-2-ylo)metyleno]-6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid
(84)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu **64** (0,206 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 75%; t.t. 225–227°C (dioksan); IR (KBr): 3455, 3328 (ν N-H), 3050 (ν C_{Ar}-H), 2972, 2922, 2870 (ν C-H), 1626 (ν C=N), 1572 (δ N-H), 1522 (ν C-NO₂ asym.), 1504, 1483, 1469, 1435 (ν C=C), 1383, 1304 (ν C-N), 1350 (ν C-NO₂ sym.), 1246 (ν C-O-C asym.), 1157, 1114, 986, 962 (δ C-H), 1023 (ν C-O-C sym.), 855, 823, 755 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,97–1,99 (sz. s, 4H, 2CH₂), 3,53–3,54 (sz. s, 4H, 2CH₂), 7,23 (s, 1H, NH), 7,31 (s, 1H, NH), 7,39 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,84 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 8,08 (s, 1H, pirazyna), 8,38 (s, 1H, CH), 8,51 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₄H₁₅N₇O₃ (329,12): wartości obliczone C, 51,06; H, 4,59; N, 29,77; wartości zmierzone C, 51,23; H, 4,37; N, 29,67.

N'-(4-Nitrobenzylideno)-6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamid (85)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamidu **65** (0,220 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 88%; t.t. 203–206°C (dioksan); IR (KBr): 3461, 3339 (ν N-H), 3098, 3064 (ν C_{Ar}-H), 2969, 2950, 2869 (ν C-H), 1629 (ν C=N), 1573 (δ N-H), 1525 (ν C-NO₂ asym.), 1503, 1450, 1407 (ν C=C), 1329 (ν C-NO₂ sym.), 1217 (ν C-N), 1158, 1101, 1029, 995 (δ C-H), 852, 833, 751 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,63–1,66 (m, 6H, 3CH₂), 3,70 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 7,21 (s, 1H, NH), 7,45 (s, 1H, NH), 8,21 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,5 Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, *J* = 8,5 Hz), 8,41 (s, 1H, pirazyna), 8,54 (s, 1H, CH), 8,59 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₁₉N₇O₂ (353,16): wartości obliczone C, 57,78; H, 5,42; N, 27,75; wartości zmierzone C, 57,99; H, 5,27; N, 27,84.

N'-Benzylideno-6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamid (86)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamidu **65** (0,220 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 58%; t.t. 189–191°C (etanol); IR (KBr): 3455, 3301 (ν N-H), 3072, 3052, 3022 (ν C_{Ar}-H), 2938, 2853, 2835 (ν C-H), 1614 (ν C=N), 1564 (δ N-H), 1523, 1447, 1403 (ν C=C), 1259, 1220 (ν C-N), 1185, 1154, 1126, 999, 971 (δ C-H), 857, 762 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,59–1,60 (m, 4H, 2CH₂), 1,64 (t, 2H, CH₂, *J* = 4,3 Hz), 3,68 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 6,97 (sz. s, 1H, NH), 7,05 (sz. s, 1H, NH), 7,43–7,47 (m, 3H, 3ArH), 7,92–7,94 (m, 2H, 2ArH), 8,38 (s, 1H, pirazyna), 8,48 (s, 1H, CH), 8,53 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₂₀N₆ (308,17): wartości obliczone C, 66,21; H, 6,54; N, 27,25; wartości zmierzone C, 65,96; H, 6,14; N, 27,28.

N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamid (87)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohidrazonamidu **65** (0,220 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 93%; t.t. 210–213°C (dioksan); IR (KBr): 3429, 3255, 3206 (ν N-H), 3004 (ν C_{Ar}-H), 2925, 2853 (ν C-H), 1618 (ν C=N), 1576 (δ N-H), 1525 (ν C-NO₂ asym.), 1486, 1417, 1404 (ν C=C), 1355, 1233, 1217 (ν C-N), 1320 (ν C-NO₂ sym.), 1184, 1124, 998 (δ C-H), 862, 813, 804, 734 (γ C-H), 623 (ν C-S-C), cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,58–1,60 (m, 4H, 2CH₂), 1,64–1,66 (m, 2H, CH₂), 3,72 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 7,59 (s, 1H, NH), 7,62 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 7,72 (s, 1H, NH), 8,14 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 8,31 (s, 1H, CH), 8,49

(s, 1H, pirazyna), 8,72 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₁₇N₇O₂S (359,12): wartości obliczone C, 50,13; H, 4,77; N, 27,28; wartości zmierzone C, 50,36; H, 4,41; N, 27,54.

N'-[(5-Nitrofurano-2-ylo)metyleno]-6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (88)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pirazyno-2-karbohydrazonamidu **65** (0,220 g) z 5-nitrofurano-2-karbalddehydem (0,141 g). czas reakcji: 1 h. Wydajność: 77%; t.t. 206–208°C (etanol); IR (KBr): 3482, 3415, 3383 (ν N-H), 2940, 2853 (ν C-H), 1636 (ν C=N), 1570 (δ N-H), 1524 (ν C-NO₂ asym.), 1508, 1477, 1402 (ν C=C), 1351 (ν C-NO₂ sym.), 1301, 1257 (ν C-N), 1221 (ν C-O-C asym.), 1125, 1076, 999 (δ C-H), 1018 (ν C-O-C sym.), 858, 811, 736 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,59–1,60 (m, 4H, 2CH₂), 1,64 (t, 2H, CH₂, *J* = 4,0 Hz), 3,69 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 7,27 (s, 1H, NH), 7,36 (s, 1H, NH), 7,40 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,84 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 8,38 (s, 1H, CH), 8,42 (s, 1H, pirazyna), 8,53 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₁₇N₇O₃ (343,14): wartości obliczone C, 52,47; H, 4,99; N, 28,56; wartości zmierzone C, 52,19; H, 4,60; N, 28,43.

6-Fenoksy-N'-(4-nitrobenzylideno)pirazyno-2-karbohydrazonamid (89)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbohydrazonamidu **66** (0,229 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 88%; t.t. 206–208°C (diokan); IR (KBr): 3477, 3333 (ν N-H), 3097, 3045 (ν C_{Ar}-H), 1629 (ν C=N), 1566 (δ N-H), 1533 (ν C-NO₂ asym.), 1508, 1461, 1419 (ν C=C), 1334 (ν C-NO₂ sym.), 1295 (ν C-N), 1190 (ν C-O), 1104, 1031, 1010 (δ C-H), 875, 847, 782, 750 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,55 (sz. s, 1H, NH), 7,27–7,32 (m, 3H, 3ArH), 7,46–7,50 (m, 2H, 2ArH), 7,53 (sz. s, 1H, NH), 8,18 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,0 Hz), 8,26 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,0 Hz), 8,57 (s, 1H, pirazyna), 8,60 (s, 1H, CH), 9,08 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₈H₁₄N₆O₃ (362,11): wartości obliczone C, 59,67; H, 3,89; N, 23,19; wartości zmierzone C, 59,99; H, 4,27; N, 22,84.

N'-Benzylideno-6-fenoksypirazyno-2-karbohydrazonamid (90)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbohydrazonamidu **66** (0,229 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 66%; t.t. 102–104°C (etanol); IR (KBr): 3454, 3334, 3306 (ν N-H), 3053, 3021 (ν C_{Ar}-H), 1621 (ν C=N), 1577 (δ N-H), 1532, 1491, 1461, 1416 (ν C=C), 1289 (ν C-N), 1190 (ν C-O), 1071, 1019, 1009, 954 (δ C-H), 786, 755 (γ C-H)

cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,27 (sz. s, 1H, NH), 7,15 (sz. s, 1H, NH), 7,27–7,32 (m, 3H, 3ArH), 7,41–7,44 (m, 3H, 3ArH), 7,48 (t, 2H, 2ArH, *J* = 8,0 Hz), 7,89–7,91 (m, 2H, 2ArH), 8,49 (s, 1H, CH), 8,55 (s, 1H, pirazyna), 9,07 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₈H₁₅N₅O (317,13): wartości obliczone C, 68,13; H, 4,76; N, 22,07; wartości zmierzone C, 68,43; H, 5,02; N, 21,84.

6-Fenoksy-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohidrazonamid (91)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbohidrazonamidu **66** (0,229 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 1,5 h. Wydajność: 58%; t.t. 126–130°C (dioksan); IR (KBr): 3486, 3381, 3279 (ν N-H), 3082 (ν C_{Ar}-H), 1624 (ν C=N), 1566 (δ N-H), 1527 (ν C-NO₂ asym.), 1489, 1421 (ν C=C), 1328 (ν C-NO₂ sym.), 1297 (ν C-N), 1196 (ν C-O), 1009 (δ C-H), 819, 774, 732 (γ C-H), 570 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,27 (sz. s, 1H, NH), 7,15 (sz. s, 1H, NH), 7,21 (d, 2H, 2ArH, *J* = 8,0 Hz), 7,24–7,28 (m, 1H, ArH), 7,46 (t, 2H, 2ArH, *J* = 8,3 Hz), 7,51 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 8,49 (s, 1H, pirazyna), 8,55 (s, 1H, CH), 9,07 (s, 1H, pirazyna), 8,62 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₂N₆O₃S (368,07): wartości obliczone C, 52,17; H, 3,28; N, 22,81; wartości zmierzone C, 52,37; H, 3,27; N, 22,84

6-Fenoksy-N'-[(5-nitrofurano-2-ylo)metyleno]pirazyno-2-karbohidrazonamid (92)

Reakcja 6-fenoksypirazyno-2-karbohidrazonamidu **66** (0,229 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 1 h. Wydajność: 78%; t.t. 202–204°C (dioksan); IR (KBr): 3479, 3431, 3362 (ν N-H), 1629 (ν C=N), 1569 (δ N-H), 1537 (ν C-NO₂ asym.), 1507, 1482, 1451, 1416 (ν C=C), 1347 (ν C-NO₂ sym.), 1291 (ν C-N), 1245 (ν C-O-C asym.), 1194 (ν C-O), 1159, 1137, 1068, 962 (δ C-H), 1018 (ν C-O-C sym.), 809, 778, 755, 737 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,69 (sz. s, 1H, NH), 7,27–7,32 (m, 4H, 3ArH + NH), 7,37 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,48 (t, 2H, 2ArH, *J* = 8,0 Hz), 7,81 (d, 1H, furan, *J* = 3,5 Hz), 8,40 (s, 1H, CH), 8,58 (s, 1H, pirazyna), 9,07 (s, 1H, pirazyna) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₂N₆O₄ (352,09): wartości obliczone C, 54,55; H, 3,43; N, 23,85; wartości zmierzone C, 54,65; H, 3,27; N, 23,73.

6-Chloro-N'-(4-nitrobenzylideno)pikolinohidrazonamid (93)

Reakcja 6-chloropikolinohidrazonamidu **62** (0,170 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 94%; t.t. 192–194°C (dioksan); IR (KBr): 3479, 3374 (ν N-H), 3080 (ν C_{Ar}-H), 1625, 1594 (ν C=N), 1557 (δ N-H), 1514 (ν C-NO₂ asym.), 1456,

1407 (ν C=C), 1340 (ν C-NO₂ sym.), 1160, 1104, 1016, 991 (δ C-H), 854, 812, 744 (γ C-H), 689, 652 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,22 (sz. s, 1H, NH), 7,57 (sz. s, 1H, NH), 7,70 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,01 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz), 8,21–8,24 (m, 3H, 2ArH + pirydyna), 8,28 (d, 2H, 2ArH, *J* = 8,5 Hz), 8,60 (s, 1H, CH) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 121,13, 124,20 (2C), 126,68, 129,24 (2C), 141,10, 142,10, 148,26, 149,90, 151,54, 152,86, 157,23 ppm; Analiza elementarna dla C₁₃H₁₀ClN₅O₂ (303,05): wartości obliczone C, 51,41; H, 3,32; N, 23,06; wartości zmierzone C, 51,16; H, 2,98; N, 23,16.

N'-Benzylideno-6-chloropikolinohydrazonamid (**94**)

Reakcja 6-chloropikolinohydrazonamidu **62** (0,170 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 95%; t.t. 93–95°C (etanol); IR (KBr): 3468, 3333 (ν N-H), 3061 (ν C_{Ar}-H), 1629 (ν C=N), 1570, 1553 (δ N-H), 1530, 1457, 1409 (ν C=C), 1340, 1261 (ν C-N), 1155, 1134, 1015, 988 (δ C-H), 842, 809, 752, 743 (γ C-H), 694, 657 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,98 (sz. s, 1H, NH), 7,15 (sz. s, 1H, NH), 7,43–7,46 (m, 3H, 3ArH), 7,68 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 7,94 (dd, 2H, 2ArH, *J*₁ = 9,0 Hz, *J*₂ = 4,5 Hz), 8,00 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz), 8,21 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,50 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₃H₁₁ClN₄ (258,07): wartości obliczone C, 60,35; H, 4,29; N, 21,66; wartości zmierzone C, 60,01; H, 4,39; N, 21,28.

6-Chloro-*N'*-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (**95**)

Reakcja 6-chloropikolinohydrazonamidu **62** (0,170 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 96%; t.t. 245–247°C (dioksan); IR (KBr): 3395, 3295 (ν N-H), 3096 (ν C_{Ar}-H), 1640 (ν C=N), 1581, 1556 (δ N-H), 1522 (ν C-NO₂ asym.), 1489, 1456 (ν C=C), 1328 (ν C-NO₂ sym.), 1217, 1204 (ν C-N), 1154, 1044, 997 (δ C-H), 810, 745, 732 (γ C-H), 645 (ν C-Cl), 575 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,54 (s, 1H, NH), 7,64 (d, 1H, tiofen, *J* = 5,0 Hz), 7,69 (s, 1H, NH), 7,78 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,5 Hz), 8,15 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,0 Hz), 8,20 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz), 8,34–8,36 (m, 2H, pirydyna + CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₈ClN₅O₂S (309,01): wartości obliczone C, 42,66; H, 2,60; N, 22,61; wartości zmierzone C, 42,59; H, 2,24; N, 22,42.

6-Chloro-*N'*-[(5-nitrofurano-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (**96**)

Reakcja 6-chloropikolinohydrazonamidu **62** (0,170 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 89%; t.t. 174–178°C (dioksan-woda 1:1); IR

(KBr): 3462, 3355 (ν N-H), 3088 (ν C_{Ar}-H), 1630, 1602 (ν C=N), 1575, 1558 (δ N-H), 1507 (ν C-NO₂ asym.), 1474, 1455 (ν C=C), 1354 (ν C-NO₂ sym.), 1301 (ν C-N), 1253 (ν C-O-C asym.), 1157, 1071, 1035, 961 (δ C-H), 1011 (ν C-O-C sym.), 807, 737 (γ C-H), 652 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,37 (s, 2H, NH₂), 7,44 (d, 1H, furan, $J = 3,5$ Hz), 7,71 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,84 (d, 1H, furan, $J = 4,0$ Hz), 8,02 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,21 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,39 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₈ClN₅O₃ (293,03): wartości obliczone C, 44,99; H, 2,75; N, 23,85; wartości zmierzone C, 44,93; H, 2,36; N, 23,83.

6-Morfolino-N'-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazonamid (97)

Reakcja 6-morfolinopikolinohydrazonamidu **67** (0,221 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 69%; t.t. 192–194°C (etanol); IR (KBr): 3466, 3319 (ν N-H), 3066 (ν C_{Ar}-H), 2966, 2847 (ν C-H), 1624 (ν C=N), 1575 (δ N-H), 1504 (ν C-NO₂ asym.), 1474, 1445 (ν C=C), 1335 (ν C-NO₂ sym.), 1251 (ν C-N), 1124 (ν C-O), 1103, 1027, 986, 970 (δ C-H), 853, 841, 826, 800, 742 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,57 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$ Hz) 3,74 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,0$ Hz), 6,98 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,19 (s, 1H, NH), 7,36 (s, 1H, NH), 7,58 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,68 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,8$ Hz), 8,20 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,58 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₁₈N₆O₃ (354,14): wartości obliczone C, 57,62; H, 5,12; N, 23,72; wartości zmierzone C, 57,66; H, 5,08; N, 23,85.

N'-Benzylideno-6-morfolinopikolinohydrazonamid (98)

Reakcja 6-morfolinopikolinohydrazonamidu **67** (0,221 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 62%; t.t. 149–151°C (toluen); IR (KBr): 3478, 3355 (ν N-H), 3080, 3054, 3025 (ν C_{Ar}-H), 2966, 2847 (ν C-H), 1610 (ν C=N), 1579, 1569 (δ N-H), 1480, 1448 (ν C=C), 1259, 1250 (ν C-N), 1114 (ν C-O), 1063, 1010, 984, 964, 956 (δ C-H), 800, 760, 735 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,55 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,0$ Hz) 3,74 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,0$ Hz), 6,94–6,97 (m, 3H, pirydyna + NH₂), 7,42–7,47 (m, 3H, 3ArH), 7,56 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,67 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,3$ Hz), 7,92 (dd, 2H, 2ArH, $J_1 = 9,5$ Hz, $J_2 = 6,5$ Hz), 8,46 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₇H₁₉N₅O (309,16): wartości obliczone C, 66,00; H, 6,19; N, 22,64; wartości zmierzone C, 65,64; H, 6,15; N, 22,61.

6-Morfolino-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (99)

Reakcja 6-morfolinopikolinohydrazonamidu **67** (0,221 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 70%; t.t. 178–181°C (etanol, dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3481, 3360 (ν N-H), 3093 (ν C_{Ar}-H), 2964, 2896, 2844 (ν C-H), 1587, 1568 (δ N-H), 1522 (ν C-NO₂ asym.), 1485, 1456, 1418, 1404 (ν C=C), 1324 (ν C-NO₂ sym.), 1250, 1201 (ν C-N), 1104 (ν C-O), 1063, 1039, 1018, 988, 981 (δ C-H), 865, 812, 799, 781, 733 (γ C-H), 569 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,59 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz) 3,73 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz), 7,05 (d, 1H, pirydyna, *J* = 9,0 Hz), 7,53 (s, 1H, NH), 7,59–7,61 (m, 2H, tiofen + NH), 7,74 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,83 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,13 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 8,29 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₁₆N₆O₃S (360,10): wartości obliczone C, 49,99; H, 4,48; N, 23,32; wartości zmierzone C, 50,14; H, 4,06; N, 23,71.

6-Morfolino-N'-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (100)

Reakcja 6-morfolinopikolinohydrazonamidu **67** (0,221 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 52%; t.t. 225–227°C (etanol); IR (KBr): 3470, 3320 (ν N-H), 2975, 2902, 2846 (ν C-H), 1624 (ν C=N), 1576 (δ N-H), 1522 (ν C-NO₂ asym.), 1510, 1477, 1455 (ν C=C), 1354 (ν C-NO₂ sym.), 1308 (ν C-N), 1250 (ν C-O-C asym.), 1184, 1070, 990, 964 (δ C-H), 1110 (ν C-O), 1018 (ν C-O-C sym.), 872, 810, 783, 734 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,56 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,5 Hz) 3,74 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 4,8 Hz), 7,00 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,19 (s, 1H, NH), 7,34 (s, 1H, NH), 7,39 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,57 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,69 (t, 1H, pirydyna, *J* = 7,8 Hz), 7,84 (d, 1H, furan, *J* = 3,5 Hz), 8,36 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₁₆N₆O₄ (344,12): wartości obliczone C, 52,32; H, 4,68; N, 24,41; wartości zmierzone C, 52,14; H, 4,51; N, 24,22.

N'-(4-Nitrobenzylideno)-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (101)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **68** (0,205 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 56%; t.t. 161–165°C (etanol); IR (KBr): 3468, 3373, 3339 (ν N-H), 2972, 2948, 2851 (ν C-H), 1631, 1619 (ν C=N), 1592, 1577 (δ N-H), 1503 (ν C-NO₂ asym.), 1474, 1456, 1400 (ν C=C), 1331 (ν C-NO₂ sym.), 1275, 1247 (ν C-N), 1153, 1102, 1028, 974 (δ C-H), 853, 829, 802, 742 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,97 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 6,3 Hz) 3,47 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,59 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,06 (s, 1H, NH), 7,38 (s, 1H, NH), 7,44 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0

Hz), 7,60 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,8$ Hz), 8,18 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,57 (s, 1H, CH) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 25,45 (2C), 46,78 (2C), 108,93, 109,06, 124,19 (2C), 128,87 (2C), 137,98, 142,46, 148,00, 148,34, 151,48, 156,41, 159,01 ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2$ (338,15): wartości obliczone C, 60,34; H, 5,36; N, 24,84; wartości zmierzone C, 60,00; H, 4,97; N, 24,76.

N'-Benzylideno-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**102**)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **68** (0,205 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 53%; t.t. 156–159°C (etanol); IR (KBr): 3457, 3354 (ν N-H), 3078, 3057, 3025 (ν C_{Ar}-H), 2972, 2851, 2820 (ν C-H), 1613 (ν C=N), 1579, 1567 (δ N-H), 1523, 1493, 1457, 1397 (ν C=C), 1277, 1247 (ν C-N), 1157, 1061, 1021, 975 (δ C-H), 859, 797, 739 (γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,97 (t, 4H, 2CH₂, $J = 6,3$ Hz) 3,47 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,56 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 6,84 (sz. s, 1H, NH), 7,00 (sz. s, 1H, NH), 7,41–7,46 (m, 4H, pirydyna + 3ArH), 7,58 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,91 (d, 2H, 2ArH, $J = 7,0$ Hz), 8,46 (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, 69,58; H, 6,48; N, 24,13.

N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**103**)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **68** (0,205 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 56%; t.t. 181–182°C (etanol, dioksan); IR (KBr): 3489, 3369 (ν N-H), 3021 (ν C_{Ar}-H), 2967, 2857, 2847 (ν C-H), 1588, 1563 (δ N-H), 1517 (ν C-NO₂ asym.), 1485, 1457, 1399 (ν C=C), 1321 (ν C-NO₂ sym.), 1213, 1204 (ν C-N), 1164, 1043, 1018, 989, 968 (δ C-H), 878, 803, 742, 734 (γ C-H), 570 (ν C-S-C) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,97 (t, 4H, 2CH₂, $J = 6,5$ Hz) 3,49 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,66 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,37 (s, 1H, NH), 7,55 (d, 1H, tiofen, $J = 4,5$ Hz), 7,61–7,63 (m, 2H, pirydyna + NH), 7,74 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,13 (d, 1H, tiofen, $J = 4,5$ Hz), 8,28 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ (344,11): wartości obliczone C, 52,31; H, 4,68; N, 24,40; wartości zmierzone C, 52,46; H, 4,27; N, 24,81.

N'-[(5-Nitrofurano-2-ylo)metyleno]-6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**104**)

Reakcja 6-(pirolidyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **68** (0,205 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 39%; t.t. 207–208°C (etanol);

IR (KBr): 3436, 3264 (ν N-H), 2974, 2862 (ν C-H), 1628, 1615 (ν C=N), 1580 (δ N-H), 1497, 1481, 1462, 1403 (ν C=C), 1352 (ν C-NO₂ sym.), 1308, 1280 (ν C-N), 1253 (ν C-O-C asym.), 1183, 1156, 1061, 976 (δ C-H), 1021 (ν C-O-C sym.), 801, 782, 733 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,97 (t, 4H, 2CH₂, $J = 6,5$ Hz) 3,47 (sz. s, 4H, 2CH₂), 6,61 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (s, 2H, NH₂), 7,36 (d, 1H, furan, $J = 3,5$ Hz), 7,43 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,60 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,8$ Hz), 7,84 (d, 1H, furan, $J = 4,0$ Hz), 8,36 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₅H₁₆N₆O₃ (328,13): wartości obliczone C, 54,87; H, 4,91; N, 25,60; wartości zmierzone C, 54,87; H, 4,83; N, 25,75.

N'-(4-Nitrobenzylideno)-6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**105**)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **69** (0,219 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 57%; t.t. 141–143°C (etanol); IR (KBr): 3477, 3385, 3347 (ν N-H), 3076 (ν C_{Ar}-H), 2940, 2856, 2823 (ν C-H), 1630 (ν C=N), 1574 (δ N-H), 1507 (ν C-NO₂ asym.), 1450, 1395 (ν C=C), 1336 (ν C-NO₂ sym.), 1254 (ν C-N), 1128, 1104, 1019, 983 (δ C-H), 853, 840, 804, 744 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,58–1,63 (m, 6H, 3CH₂) 3,61 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,8$ Hz), 6,97 (d, 1H, pirydyna, $J = 9,0$ Hz), 7,09 (s, 1H, NH), 7,32 (s, 1H, NH), 7,48 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,0$ Hz), 7,62 (t, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 8,19 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,57 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₈H₂₀N₆O₂ (352,16): wartości obliczone C, 61,35; H, 5,72; N, 23,85; wartości zmierzone C, 61,12; H, 5,32; N, 23,75.

N'-Benzylideno-6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**106**)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **69** (0,219 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 61%; t.t. 141–143°C (etanol-woda 1:1); IR (KBr): 3491, 3373 (ν N-H), 3075, 3057, 3024 (ν C_{Ar}-H), 2935, 2851 (ν C-H), 1621 (ν C=N), 1581, 1568 (δ N-H), 1511, 1482, 1459, 1447 (ν C=C), 1310, 1269, 1249 (ν C-N), 1173, 1124, 1002, 982 (δ C-H), 856, 797, 758, 734 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,58–1,63 (m, 6H, 3CH₂) 3,59 (t, 4H, 2CH₂, $J = 4,5$ Hz), 3,86 (sz. s, 1H, NH), 6,94 (m, 2H, pirydyna + NH), 7,43–7,47 (m, 4H, 3ArH + pirydyna), 7,60 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,8$ Hz), 7,91 (d, 2H, 2ArH, $J = 6,5$ Hz), 8,46 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₈H₂₁N₅ (307,18): wartości obliczone C, 70,33; H, 6,89; N, 22,78; wartości zmierzone C, 70,34; H, 6,87; N, 22,97.

N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**107**)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **69** (0,219 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 55%; t.t. 151–152°C (etanol); IR (KBr): 3502, 3381 (ν N-H), 3092, 3061 (ν C_{Ar}-H), 2938, 2925, 2844 (ν C-H), 1611 (ν C=N), 1568 (δ N-H), 1521 (ν C-NO₂ asym.), 1488, 1446, 1420, 1401 (ν C=C), 1321 (ν C-NO₂ sym.), 1251, 1202 (ν C-N), 1123, 1039, 981 (δ C-H), 812, 795, 732 (γ C-H), 577 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,57–1,59 (m, 4H, 2CH₂), 1,62–1,64 (m, 2H, CH₂), 3,63 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,3 Hz), 7,03 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,42 (s, 1H, NH), 7,57 (s, 1H, NH), 7,60 (d, 1H, tiofen, *J* = 4,5 Hz), 7,65 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,76 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 8,13 (d, 1H, tiofen, *J* = 5,0 Hz), 8,28 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆O₂S (358,12): wartości obliczone C, 53,62; H, 5,06; N, 23,45; wartości zmierzone C, 53,25; H, 5,07; N, 23,27.

N'-[(5-Nitrofuran-2-ylo)metyleno]-6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**108**)

Reakcja 6-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **69** (0,219 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 82%; t.t. 160–164°C (etanol); IR (KBr): 3489, 3371 (ν N-H), 2972, 2927, 2850 (ν C-H), 1625 (ν C=N), 1572 (δ N-H), 1503 (ν C-NO₂ asym.), 1472, 1460 (ν C=C), 1349 (ν C-NO₂ sym.), 1298 (ν C-N), 1238 (ν C-O-C asym.), 1126, 983, 960 (δ C-H), 1013 (ν C-O-C sym.), 858, 819, 796, 738 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,57–1,63 (m, 6H, 3CH₂), 3,60 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 6,98 (d, 1H, pirydyna, *J* = 8,5 Hz), 7,15 (s, 1H, NH), 7,25 (s, 1H, NH), 7,37 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 7,48 (d, 1H, pirydyna, *J* = 7,0 Hz), 7,62 (t, 1H, pirydyna, *J* = 8,0 Hz), 7,84 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 8,36 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆O₃ (342,14): wartości obliczone C, 56,13; H, 5,30; N, 24,55; wartości zmierzone C, 56,46; H, 4,88; N, 25,07.

6-Fenoksy-*N'*-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazonamid (**109**)

Reakcja 6-fenoksypikolinohydrazonamidu **70** (0,228 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 75%; t.t. 173–176°C (etanol); IR (KBr): 3504, 3479, 3441, 3393, 3368 (ν N-H), 3068 (ν C_{Ar}-H), 1633 (ν C=N), 1574, 1558 (δ N-H), 1508 (ν C-NO₂ asym.), 1488, 1455, 1427 (ν C=C), 1339 (ν C-NO₂ sym.), 1279, 1257 (ν C-N), 1209 (ν C-O), 1154, 1105, 1023, 990 (δ C-H), 807, 788, 743 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,54 (sz. s, 1H, NH), 7,12 (dd, 1H, pirydyna, *J*₁ = 9,5 Hz, *J*₂ = 3,5 Hz), 7,24 (d, 2H, 2ArH, *J* = 8,0 Hz), 7,28 (t, 1H, ArH, *J* = 7,3 Hz), 7,45–7,50 (m, 3H, 2ArH + NH),

7,96–8,02 (m, 2H, pirydyna), 8,18 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,60 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla $C_{19}H_{15}N_5O_3$ (361,12): wartości obliczone C, 63,15; H, 4,18; N, 19,38; wartości zmierzone C, 63,54; H, 3,79; N, 19,73.

N'-Benzylideno-6-fenoksypikolinohydrazonamid (**110**)

Reakcja 6-fenoksypikolinohydrazonamidu **70** (0,228 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 79%; t.t. 122–123°C (etanol); IR (KBr): 3503, 3392 (ν N-H), 3086, 3063, 3018 (ν C_{Ar}-H), 1624 (ν C=N), 1563 (δ N-H), 1522, 1488, 1459, 1429 (ν C=C), 1279, 1255 (ν C-N), 1213 (ν C-O), 1177, 1153, 1082, 1067, 1011, 992 (δ C-H), 819, 805, 759, 738 (γ C-H) cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 6,30 (sz. s, 1H, NH), 7,09 (sz. s, 1H, NH), 7,11 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 3,0$ Hz), 7,24 (d, 2H, 2ArH, $J = 7,5$ Hz), 7,28 (t, 1H, ArH, $J = 7,5$ Hz), 7,43–7,46 (m, 3H, 3ArH), 7,48 (t, 2H, 2ArH, $J = 7,8$ Hz), 7,89–7,92 (m, 2H, 2ArH), 7,96–8,00 (m, 2H, pirydyna), 8,48 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla $C_{19}H_{16}N_4$ (316,13): wartości obliczone C, 72,13; H, 5,10; N, 17,71; wartości zmierzone C, 72,01; H, 4,72; N, 17,71.

6-Fenoksy-*N'*-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (**111**)

Reakcja 6-fenoksypikolinohydrazonamidu **70** (0,228 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 81%; t.t. 205–207°C (etanol); IR (KBr): 3493, 3384 (ν N-H), 3040, 3014 (ν C_{Ar}-H), 1623 (ν C=N), 1560 (δ N-H), 1524 (ν C-NO₂ asym.), 1512, 1487, 1460, 1434 (ν C=C), 1327 (ν C-NO₂ sym.), 1254 (ν C-N), 1210 (ν C-O), 1176, 1156, 1039, 1026 (δ C-H), 811, 794, 752, 742, 733 (γ C-H), 621 (ν C-S-C) cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 6,58 (sz. s, 1H, NH), 7,11 (d, 1H, pirydyna, $J = 7,5$ Hz), 7,21 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,0$ Hz), 7,24–7,28 (m, 2H, ArH + NH), 7,46 (t, 2H, 2ArH, $J = 8,3$ Hz), 7,51 (d, 1H, tiofen, $J = 4,5$ Hz), 7,93 (d, 1H, pirydyna, $J = 8,0$ Hz), 7,97 (t, 1H, pirydyna, $J = 7,8$ Hz), 8,11 (d, 1H, tiofen, $J = 4,0$ Hz), 8,62 (s, 1H, CH) 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, 55,84; H, 3,19; N, 18,67.

6-Fenoksy-*N'*-[(5-nitrofuran-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (**112**)

Reakcja 6-fenoksypikolinohydrazonamidu **70** (0,228 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 58%; t.t. 184–185°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3475, 3437, 3356 (ν N-H), 3094 (ν C_{Ar}-H), 1618 (ν C=N), 1572 (δ N-H), 1505 (ν C-NO₂ asym.), 1479, 1457, 1392 (ν C=C), 1348 (ν C-NO₂ sym.), 1309 (ν C-N), 1254

(ν C-O-C asym.), 1204 (ν C-O), 1070, 963 (δ C-H), 1023 (ν C-O-C sym.), 811, 776 (γ C-H) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7,67 (sz. s, 1H, NH), 7,10 (d, 1H, pirydyna, $J = 6,5$ Hz), 7,21 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,0$ Hz), 7, 23 (sz. s, 1H, NH), 7,25 (t, 1H, ArH, $J = 7,5$ Hz), 7,34 (d, 1H, furan, $J = 4,0$ Hz), 7,46 (t, 2H, 2ArH, $J = 7,8$ Hz), 7,80 (d, 1H, furan, $J = 3,5$ Hz), 7,96–7,97 (m, 2H, pirydyna), 8,36 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ (351,10): wartości obliczone C, 58,12; H, 3,73; N, 19,93; wartości zmierzone C, 58,17; H, 3,51; N, 19,56.

4-Chloro-N'-(4-nitrobenzylideno)pikolinohydrazonamid (113)

Reakcja 4-chloropikolinohydrazonamidu **51** (0,170 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 72%; t.t. 231–232°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3465, 3351 (ν N-H), 3072, 3045 (ν C_{Ar}-H), 1624 (ν C=N), 1572 (δ N-H), 1507 (ν C-NO₂ asym.), 1471, 1429 (ν C=C), 1339 (ν C-NO₂ sym.), 1107, 1003, 949 (δ C-H), 851, 836, 732 (γ C-H), 699, 685 (ν C-Cl) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7,41 (sz. s, 2H, NH₂), 7,72 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 3,0$ Hz), 8,22 (d, 2H, 2ArH, $J = 9,0$ Hz), 8,26 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,0$ Hz), 8,28 (d, 2H, 2ArH, $J = 8,5$ Hz), 8,62 (s, 1H, CH), 8,68 (d, 1H, pirydyna, $J = 5,5$ Hz) ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$ (303,05): wartości obliczone C, 51,41; H, 3,32; N, 23,06; wartości zmierzone C, 51,18; H, 2,95; N, 22,78.

N'-(Benzylideno)-4-chloropikolinohydrazonamid (114)

Reakcja 4-chloropikolinohydrazonamidu **51** (0,170 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Wydajność: 73%; t.t. 126–127°C (metanol-woda 1:1); IR (KBr): 3474, 3327, 3301 (ν N-H), 3080, 3056, 3026 (ν C_{Ar}-H), 1618 (ν C=N), 1571 (δ N-H), 1471, 1446, 1427 (ν C=C), 1338, 1271 (ν C-N), 1174, 1098, 1006, 953 (δ C-H), 872, 819, 753, 729 (γ C-H), 645 (ν C-Cl) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7,09 (s, 2H, NH₂), 7,44–7,47 (m, 3H, 3ArH), 7,69 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 3,0$ Hz), 7,93 (dd, 2H, 2ArH, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 5,5$ Hz), 8,25 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,0$ Hz), 8,52 (s, 1H, CH), 8,65 (d, 1H, pirydyna, $J = 5,0$ Hz) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ 121,40, 125,81, 128,45 (2C), 129,06 (2C), 130,54, 135,71, 144,00, 150,57, 152,75, 155,37, 155,98 ppm; Analiza elementarna dla $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$ (258,07): wartości obliczone C, 60,35; H, 4,29; N, 21,66; wartości zmierzone C, 60,47; H, 4,00; N, 21,43.

4-Chloro-N'-[(5-nitrotiofen-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (115)

Reakcja 4-chloropikolinohydrazonamidu **51** (0,170 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 85%; t.t. 217–218°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3483, 3442, 3346 (ν N-H), 3099 (ν C_{Ar}-H), 1614 (ν C=N), 1566, 1551 (δ N-H), 1523 (ν C-NO₂ asym.), 1486, 1419 (ν C=C), 1336 (ν C-NO₂ sym.), 1273, 1204 (ν C-N), 1099, 1041, 997, 984 (δ C-H), 814, 751, 732 (γ C-H), 707, 683 (ν C-Cl), 572 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,55–7,72 (m, 3H, tiofen + NH₂) 7,80 (s, 1H, pirydyna), 8,12 (sz. s, 1H, tiofen), 8,32 (s, 1H, CH), 8,44 (s, 1H, pirydyna), 8,72 (d, 1H, pirydyna, *J* = 4,0 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₈ClN₅O₂S (309,01): wartości obliczone C, 42,66; H, 2,60; N, 22,61; wartości zmierzone C, 42,59; H, 2,24; N, 22,42.

4-Chloro-N'-[(5-nitrofurano-2-ylo)metyleno]pikolinohydrazonamid (116)

Reakcja 4-chloropikolinohydrazonamidu **51** (0,170 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 69%; t.t. 173–174°C (dioksan-woda 1:1); IR (KBr): 3468, 3345 (ν N-H), 3098, 3080 (ν C_{Ar}-H), 1624, 1594 (ν C=N), 1571, 1551 (δ N-H), 1510 (ν C-NO₂ asym.), 1482, 1461 (ν C=C), 1349 (ν C-NO₂ sym.), 1300 (ν C-N), 1244 (ν C-O-C asym.), 1172, 1099, 1031, 960 (δ C-H), 1015 (ν C-O-C sym.), 835, 811, 736 (γ C-H), 698, 677 (ν C-Cl) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,44 (d, 1H, furan, *J* = 3,5 Hz), 7,45 (s, 1H, NH), 7,55 (s, 1H, NH), 7,74 (dd, 1H, pirydyna, *J*₁ = 7,5 Hz, *J*₂ = 3,5 Hz), 7,84 (d, 1H, furan, *J* = 4,0 Hz), 8,23 (d, 1H, pirydyna, *J* = 2,0 Hz), 8,41 (s, 1H, CH), 8,68 (d, 1H, pirydyna, *J* = 5,5 Hz) ppm; Analiza elementarna dla C₁₁H₈ClN₅O₃ (293,03): wartości obliczone C, 44,99; H, 2,75; N, 23,85; wartości zmierzone C, 44,77; H, 2,35; N, 23,62.

N'-(4-Nitrobenzylideno)-4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (117)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **56** (0,219 g) z 4-nitrobenzaldehydem (0,151 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 59%; t.t. 216–218°C (etanol); IR (KBr): 3412, 3288 (ν N-H), 3076, 3036 (ν C_{Ar}-H), 2924, 2849, 2806 (ν C-H), 1620 (ν C=N), 1594 (δ N-H), 1513 (ν C-NO₂ asym.), 1483, 1447 (ν C=C), 1336 (ν C-NO₂ sym.), 1248 (ν C-N), 1125, 1106, 1015, 994 (δ C-H), 858, 829, 749 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,56–1,61 (m, 6H, 3CH₂) 3,38 (t, 4H, 2CH₂, *J* = 5,0 Hz), 6,95 (dd, 1H, pirydyna, *J*₁ = 9,0 Hz, *J*₂ = 3,5 Hz), 7,21 (s, 1H, NH), 7,40 (s, 1H, NH), 7,65 (d, 1H, pirydyna, *J* = 3,0 Hz), 8,17 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,5 Hz), 8,20 (d, 1H, pirydyna, *J* = 6,0 Hz), 8,25 (d, 2H, 2ArH, *J* = 9,0 Hz), 8,59 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₈H₂₀N₆O₂ (352,16):

wartości obliczone C, 61,35; H, 5,72; N, 23,85; wartości zmierzone C, 61,02; H, 5,46; N, 23,69.

N'-Benzylideno-4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**118**)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **56** (0,219 g) z benzaldehydem (0,102 ml). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 63%; t.t. 229–230°C (etanol); IR (KBr): 3451, 3249 (ν N-H), 3024 (ν C_{Ar}-H), 2937, 2920, 2851 (ν C-H), 1612 (ν C=N), 1583 (δ N-H), 1485, 1448 (ν C=C), 1255, 1221 (ν C-N), 1154, 1123, 1006, 988 (δ C-H), 857, 819, 762 (γ C-H) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,57–1,59 (m, 6H, 3CH₂) 3,38–3,39 (m, 4H, 2CH₂), 6,93 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz), 7,00 (sz. s, 2H, NH₂), 7,39–7,43 (m, 3H, 3ArH), 7,63 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,0$ Hz), 7,89 (d, 2H, 2ArH, $J = 6,5$ Hz), 8,18 (d, 1H, pirydyna, $J = 6,0$ Hz), 8,47 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₈H₂₁N₅ (307,18): wartości obliczone C, 70,33; H, 6,89; N, 22,78; wartości zmierzone C, 70,40; H, 6,53; N, 22,79.

N'-[(5-Nitrotiofen-2-ylo)metyleno]-4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**119**)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **56** (0,219 g) z 5-nitrotiofeno-2-karbaldehydem (0,157 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 57%; t.t. 200–203°C (dioksan); IR (KBr): 3461, 3328 (ν N-H), 3095, 3028 (ν C_{Ar}-H), 2938, 2857, 2834 (ν C-H), 1614, 1591 (ν C=N), 1569 (δ N-H), 1518 (ν C-NO₂ asym.), 1488, 1477, 1448, 1417 (ν C=C), 1326 (ν C-NO₂ sym.), 1254, 1212 (ν C-N), 1123, 1038, 992 (δ C-H), 860, 812, 734 (γ C-H), 574 (ν C-S-C) cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,62 (sz. s, 6H, 3CH₂), 3,48 (sz. s, 4H, 2CH₂), 7,00 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz), 7,52 (s, 1H, NH), 7,57 (d, 1H, tiofen, $J = 4,5$ Hz), 7,63 (s, 1H, NH), 7,97 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,5$ Hz), 8,09 (d, 1H, tiofen, $J = 4,5$ Hz), 8,23 (d, 1H, pirydyna, $J = 5,5$ Hz), 8,25 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆O₂S (358,12): wartości obliczone C, 53,62; H, 5,06; N, 23,45; wartości zmierzone C, 53,45; H, 4,68; N, 23,32.

N'-[(5-Nitrofurano-2-ylo)metyleno]-4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamid (**120**)

Reakcja 4-(piperydyn-1-ylo)pikolinohydrazonamidu **56** (0,219 g) z 5-nitrofurano-2-karbaldehydem (0,141 g). Czas reakcji: 0,5 h. Wydajność: 82%; t.t. 215–218°C (etanol); IR (KBr): 3425, 3300 (ν N-H), 2922, 2834 (ν C-H), 1613, 1597 (ν C=N), 1579 (δ N-H), 1509 (ν C-NO₂ asym.), 1458 (ν C=C), 1352 (ν C-NO₂ sym.), 1298 (ν C-N), 1248 (ν C-O-C asym.), 1185, 1122, 1004, 992 (δ C-H), 1022 (ν C-O-C sym.), 825, 813, 781, 734

(γ C-H) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,55–1,60 (m, 6H, 3CH₂) 3,38 (t, 4H, 2CH₂, $J = 5,0$ Hz), 6,95 (dd, 1H, pirydyna, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz), 7,23 (s, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, furan + NH), 7,63 (d, 1H, pirydyna, $J = 2,5$ Hz), 7,81 (d, 1H, furan, $J = 4,0$ Hz), 8,20 (d, 1H, pirydyna, $J = 6,0$ Hz), 8,37 (s, 1H, CH) ppm; Analiza elementarna dla C₁₆H₁₈N₆O₃ (342,14): wartości obliczone C, 56,13; H, 5,30; N, 24,55; wartości zmierzone C, 56,52; H, 5,62; N, 24,17.

7.2 Badania krystalograficzne

Monokryształy zdadne do dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego uzyskano z roztworu metanol-DMF (1:1 v/v) lub izopropanol-DMF-woda (1:1:1 v/v) metodą powolnego odparowania rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej. Pomiar dyfrakcyjne przeprowadzono na dyfraktometrze monokrystalicznym firmy Rigaku XtaLAB Synergy-S z detektorem PILATUS 300K, w niskiej temperaturze (100,0 (2) K), przy wykorzystaniu źródła promieniowania CuK α (1,54184 Å) i MoK α (1,54178 Å). Dane dyfrakcyjne przetworzono przy wykorzystaniu oprogramowania CrysAlis Pro [205]. Struktury krystaliczne rozwiązano metodami bezpośrednimi oraz udokładniono metodą najmniejszych kwadratów w całym zakresie F^2 , za pomocą programu SHELX [206,207]. Wizualizacji i analizy geometrii cząsteczek wykonano w programie Mercury [208]. Do przygotowania danych krystalograficznych, danych pomiarowych i szczegółów dotyczących udokładniania zastosowano program PubliCIF [209].

7.2 Aktywność przeciwprątkowa

Zsyntezowane związki przebadano metodą mikrorozcieńczeń w 96-dołkowych płytkach mikrolitrowych wykorzystując bulion Middlebrook 7H9 wzbogacony o 10% dodatek wzrostu OADC (ang. *Oleic Albumin Dextrose Catalase*, kwas oleinowy, albumina, dekstroza, katalaza) [210]. Inokulum przygotowano ze świeżych kultur Lowensteina-Jensena w bulionie Middlebrook 7H9 wzbogaconym 10% OADC w taki sposób, aby dopasować do zmętnienia 0,5 wzorca McFarlanda, a następnie zawiesinę rozcieńczono w stosunku 1:100. Roztwór podstawowy badanego związku sporządzono w DMSO, a następnie rozcieńczono czterokrotnie w bulionie Middlebrook 7H9 wzbogaconym 10% OADC. Następnie w sterylnych 96-studzienkowych płytkach do mikromiareczkowania wykonano seryjne rozcieńczenia związków, stosując 100 μl pożywki bulionowej Middlebrook 7H9 z OADC. Badane związki testowano w stężeniach od 512 $\mu\text{g/ml}$ do 0,0625 $\mu\text{g/ml}$. Każda płytka zawierała próbę kontrolną pozbawioną substancji

hamującej wzrost oraz próbę kontrolną bez inokulacji. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 21 dni. Po okresie inkubacji do każdej studzienki dodano 30 µl roztworu błękitu Alamar, po czym inkubowano płytkę ponownie przez 24 h. Wzrost prątków jest wskazywany przez zmianę koloru z niebieskiego na różowy. Najniższe stężenie związku zapobiegające zmianie koloru odnotowano jako jego MIC [211,212]. Do porównania zastosowano izoniazyd jako lek referencyjny.

7.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Zsyntezowane związki przebadano metodą mikrorozcieńczeń w 96-dołkowych płytkach mikrolitrowych wykorzystując bulion Mueller-Hinton oraz bulion Mueller-Hinton z 5% dodatkiem lizowanej krwi owczej do wzrostu odpowiednio bakterii wybrednych oraz niewybrednych. Natomiast do wzrostu grzybów zastosowano bulion Mueller-Hinton z 2% dodatkiem glukozy. Badane związki rozpuszczono w DMSO, a następnie rozcieńczono do stężenia 1000 µg/ml w podłożu odpowiednim dla bakterii lub grzybów. Stosując to samo podłoże wykonano seryjne dwukrotne rozcieńczenia uzyskując w ten sposób końcowe stężenia testowanych związków w zakresie od 1000 µg/ml do 0,06 µg/ml. Następnie, 200 µl odpowiedniego rozcieńczenia testowanych związków w pożywce bulionowej umieszczono w sterylnych 96-studzienkowych płytkach mikrotitracyjnych. Inokulum przygotowano ze świeżych hodowli drobnoustrojów w sterylnym 85% NaCl w celu osiągnięcia zmętnienia o wartości 0,5 standardu McFarlanda. Po dodaniu do studzienek 2 µl zawiesiny uzyskano końcową gęstość $1,5 \times 10^6$ jednostek tworzących kolonie (CFU)/ml dla bakterii oraz 5×10^4 CFU/ml dla drożdży. Każda płytka zawierała kontrolę DMSO (w stężeniu końcowym 10%), kontrolę pozytywną (zawierającą inokulum bez badanych pochodnych) oraz kontrolę ujemną (zawierającą badane pochodne bez inokulum). Inkubację płytek ze szczepami bakteryjnymi prowadzono w temperaturze 35°C przez 24 h, natomiast ze szczepami drożdży w temperaturze 30°C przez 48 h. Wzrost drobnoustrojów oceniany jest wizualnie, a najniższe stężenie związku powodującego jego całkowite zahamowanie określone jest jako MIC [213]. Do porównania zastosowano ciprofloksacynę, wankomycynę i nystatynę jako leki referencyjne.

7.4 Aktywność cytotoksyczna

Badane związki rozpuszczono w DMSO do stężenia 20 mg/ml, a następnie rozcieńczono wodą dejonizowaną w celu uzyskania stężeń 0,016, 0,08, 0,4, 2, 10 i 50 µg/ml. Ludzkie keratynocyty – HaCaT (AddexBio, San Diego, Kalifornia, USA; płeć: mężczyzna;

wiek: 62 lata; tkanka: skóra) wysiano w ilości 30 000 komórek/studzienkę na 96-dołkowej płytce z wolnym od fenolu medium DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) uzupełnionym 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i antybiotykami (penicyliną, streptomycyną i amfoterycyną B) (HiMedia, Indie / Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), do których dodano próbki związków w trzech powtórzeniach. Dwie pierwsze studzienki stanowią komórki rozpuszczone w etanolu służące jako próba kontrolna. Płytki zawierające hodowle komórkowe przechowywano w inkubatorze, w którym panowała temperatura 37°C oraz wilgotna atmosfera nasycona 5% CO₂. Po upływie 72 h, w przypadku metody MTT, do studzienek dodano 200 µl roztworu pomarańczowego barwnika MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-yl)-2,5-difenyłu) w PBS (zbuforowany jałowy roztwór soli fizjologicznej, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) i kontynuowano inkubację przez kolejne 4 h. Pożywki hodowlane odrzucono, a do formazanu – wewnątrzkomórkowego produktu reakcji MTT o ciemnoniebieskiej barwie dodano 2 ml izopropanolu i mieszano do rozpuszczenia jego kryształów. Natomiast w przypadku metody SRB, po zakończonej inkubacji przyklejone komórki utrwalono zimnym 50% kwasem trójfluorooctowym (500 µl) w 4°C przez 1 h, po czym studzienki przepłukano wodą i wysuszono. Do każdej studzienki dodano 500 µl 0,4% roztworu SRB (fluoryzujący na czerwono barwnik anionowy sulforodaminy B, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) rozpuszczonego w 1% kwasie octowym, pozostawiono do czasu zabarwienia komórek, a następnie niezwiązane cząstki wypłukano poprzez kilkukrotne przemycie studzienek 1% kwasem octowym. Dodanie do każdej studzienki 1500 µl 10 mM buforu tris(hydroksymetylo)aminometanu (Tris Base) powoduje rozpuszczenie związanego barwnika [214]. Sygnał kolorymetryczny proporcjonalny do liczby komórek uzyskano przy użyciu czytnika mikroplatek Molecular Devices MAX190 i SoftMax3.1.2PRO.

8. WNIOSKI

W ramach pracy doktorskiej otrzymano 120 pochodnych pirdyny i pirazyny, w tym 99 nieopisanych dotychczas w literaturze. Budowa związków potwierdzona została analizą elementarną oraz metodami spektroskopowymi IR, ^1H NMR oraz niekiedy ^{13}C NMR. Struktura związku **3** i **6** została zbadana z wykorzystaniem zmiennotemperaturowej spektroskopii ^1H NMR oraz techniki ^{15}N CP MAS NMR. Ponadto struktury 35 zsyntezowanych związków potwierdzone zostały badaniami rentgenograficznymi monokryształów.

W aspekcie badań biologicznych przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, 96 związków przebadane zostało wobec dwóch szczepów (referencyjnego oraz klinicznego) *M. tuberculosis*, 41 pochodnych wobec panelu referencyjnych szczepów mikroorganizmów innego rodzaju niż prątki gruźlicy, a 43 pochodne wobec niekancerogennych komórek HaCaT.

W oparciu o uzyskane rezultaty sformułowano następujące wnioski:

1. Pochodne o strukturze tiosemikarbazonu można otrzymać trzema różnymi metodami. W wyniku reakcji metyloiminoestrów (**1**, **2**, **51**) z karbotiohydrazydami otrzymano pochodne tiosemikarbazonowe z zachowanym atomem chloru przy pierścieniu pirazyny (**3–6**) i pirydyny (**7–10**, **52–55**). 6-Podstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirazynowe (**19–34**) uzyskano w wyniku działania karbotiohydrazydami na nityle (**11–14**). 6-Podstawione (**35–50**) oraz 4-podstawione (**57–60**) tiosemikarbazonowe pochodne pirydynowe kondensowano z karbotiohydrazydów oraz metyloiminoestrów utworzonych *in situ* z nityli (**15–18**, **56**).
2. Badania krystalograficzne dowiodły, iż pochodne tiosemikarbazonowe występują w postaci dwóch form tautomerycznych. Spośród 22 uzyskanych struktur krystalicznych 20 przyjęło formę zwitterionową, a 2 formę neutralną. Energia całkowita wyznaczona metodami chemii obliczeniowej dla obu możliwych form wskazała, iż bardziej stabilna energetycznie jest forma zwitterionowa. Analiza widm zmiennotemperaturowych ^1H NMR w połączeniu z analizą widm ^{15}N CP MAS NMR oraz struktur krystalicznych związku **3** i **6** dowiodła, iż pochodna **3** w roztworze jest mieszaniną obu form, a w ciele stałym przyjmuje formę neutralną, natomiast pochodna **6** wykazuje, zarówno w roztworze jak i ciele stałym budowę zwitterionową.

3. Związki o budowie zwitterionowej przyjmują konformację planarną stabilizowaną dzięki obecności dwóch silnych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Tworzenie kontaktów wodorowych tego typu możliwe jest poprzez następujący obrót pierścienia heteroaromatycznego oraz obrót wzdłuż wiązania N2-C1 o 180°. Konsekwencją przyjęcia przez związek formy neutralnej jest utrata planarności jego głównego fragmentu.
4. Amidrazony (**61–72**) uzyskiwane są w wyniku reakcji wodzianu hydrazyny z nitylem lub metyloiminoestrami poddanymi bądź niepoddanymi izolacji. Wspomagając się metodami *ab initio* wykonano analizę widma ¹H NMR, co pozwoliło na stwierdzenie, iż protonowanie amidrazonu **68** nastąpiło przy atomie azotu pierścienia pirydyny.
5. Reakcja kondensacji amidrazonów (**61–72**) z aldehydami, zachodząca w warunkach nie wymagających zastosowania dodatku katalizatora kwasowego, prowadzi do utworzenia związków z ugrupowaniem azometinowym (**73–92**, **93–112**, **113–120**).
6. Analiza rentgenograficzna dowiodła, iż pochodne iminowe mają tendencję do przyjmowania konfiguracji *E*, którą zaobserwowano u 12 z 13 badanych związków. Konsekwencją przyjęcia przez cząsteczkę konfiguracji *Z* jest utrata konformacji rozciągniętej obserwowanej u izomerów *E*.
7. Cała grupa pochodnych tiosemikarbazonowych wykazywała wysoką zdolność do inhibicji wzrostu prątków gruźlicy, co pozwoliło na potwierdzenie założonej w celu pracy hipotezy badawczej. Pochodne te były szczególnie aktywne wobec prątków opornych. Ponadto, dowiedziono iż występowanie związku w formie neutralnej nie wyklucza jego potencjalnej aktywności. Spośród badanych serii najbardziej aktywne okazały się być 2,6-dipodstawione pochodne pirydyny.
8. Grupa pochodnych iminowych cechowała się zdecydowanie niższym potencjałem tuberkulostatycznym. Na jej tle wyróżniały się jedynie pojedyncze związki.
9. W obu grupach wpływ podstawników na aktywność kształtował się w podobny sposób. Najbardziej aktywne były pochodne posiadające atom chloru oraz pirolidynę i piperydynę przy pierścieniu heteroaromatycznym, a także te same aminy cykliczne w ugrupowaniu tiosemikarbazonowym lub podstawnik 5-nitrofurylowy w ugrupowaniu iminowym.

10. Zauważono, że czynnikami mogącymi mieć silny wpływ na aktywność jest zasadowość podstawników oraz lipofilowość cząsteczki, która powinna się mieścić w odpowiednim zakresie. Ponadto, w przypadku pochodnych tiosemikarbazonowych związki o planarności poszerzonej o podstawienie przy pierścieniu heteroaromatycznym charakteryzowały się pogłębioną aktywnością. Dla pochodnych iminowych z kolei zauważono znaczenie występowania oddziaływań asocjacji warstwowej oraz odpowiednie ustawienie podstawnika w łańcuchu bocznym.
11. Zdecydowana większość pochodnych zarówno tiosemikarbazonowych, jak i iminowych cechowała się poszerzoną aktywnością mikrobiologiczną. Całkowitą selektywność wobec *M. tuberculosis* wykazały jedynie cztery związki (**41, 45, 84, 88**).
12. Pochodne tiosemikarbazonowe z podstawionym atomem chloru lub ugrupowaniem fenoksylowym wywierały cytotoksyczny efekt na komórki eukariotyczne. Wszystkie testowane związki z grupy pochodnych iminowych cechowały się natomiast jej brakiem.
13. Przeprowadzona analiza zależności struktura-aktywność pozwoliła na wyłonienie dwóch struktur wiodących wśród pirydynowych pochodnych tiosemikarbazonowych (**41, 45**) oraz kolejnych dwóch z szeregu pirazynowych pochodnych iminowych (**84, 88**).

9. STRESZCZENIE

Gruźlica identyfikowana jest przez WHO jako choroba stanowiąca globalne zagrożenie, a czynniki negatywnie wpływające na jej sytuację epidemiologiczną, takie jak konieczność długotrwałego stosowania podczas terapii kombinacji leków wywołujących objawy niepożądane, prowadzą do niepowodzenia procesu terapeutycznego, a w konsekwencji rozpowszechniania szczepów lekoopornych i wielolekoopornych. W pełni uzasadnione jest zatem wzmożenie poszukiwań nowych, efektywniejszych i bezpieczniejszych chemioterapeutyków.

W części teoretycznej scharakteryzowano aktualnie stosowane leki przeciwgruźlicze oraz ich mechanizmy oporności. Wskazano nowe podejścia do odkrywania i projektowania leków przeciwgruźliczych, w tym zaznaczono również wkład badań krystalograficznych w tym procesie. Potwierdzono zasadność optymalizacji struktur wiodących na przykładzie leków rozwijanych w różnych fazach badań klinicznych. Przegląd literaturowy, przeprowadzony pod kątem aktywnych wobec *M. tuberculosis* związków na bazie pochodnych pirazyny, pirydyny czy amidrazonu, udowodnił słuszność traktowania tych elementów strukturalnych jako ugrupowania farmakoforowe. Ponadto, dokonano przeszukania bazy CSD pod kątem związków o strukturze tiosemikarbazonowej i iminowej, a także opisano najczęściej występujące dla nich oddziaływania w stanie krystalicznym.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zaprojektowano syntezę łącznie sześciu serii nowych dipodstawionych amidrazonowych pochodnych pirazyny i pirydyny. Fragment amidrazonowy stanowił łącznik między pierścieniem heteroaromatycznym a ugrupowaniem tiosemikarbazonowym i iminowym. Pirazyna zawierała podstawienia w pozycjach 2,6 pierścienia, natomiast pirydyna w pozycjach 2,6 i 2,4. Materiałami wyjściowymi do zaplanowanych syntez były 6-chloropirazyno-2-karbonitryl, 6-chloropikolinonitryl i 4-chloropikolinonitryl. Przekształcenie związków bazowych w metyloiminoestry (**1**, **2**, **51**), które poddano reakcji kondensacji z pochodnymi karbotiohydrazdu, zawierającymi w strukturze pirolidynę, morfolinę, piperydynę i dimetyloaminę, pozwoliło na utworzenie pochodnych tiosemikarbazonowych (**3–6**, **7–10**, **52–55**). W celu uzupełnienia zapoczątkowanych trzech pierwszych serii syntez, atom chloru w pozycji 6 pierścienia pirazyny oraz pirydyny podstawiony został pirolidyną, morfoliną, piperydyną oraz ugrupowaniem fenoksyłowym (**11–18**). Grupa halogenowa w pozycji 4 pierścienia pirydyny zastąpiona została jedynie piperydyną (**56**). Dla tych

związków kondensacje z odpowiednim karbotiohydrazidem przeprowadzone zostały bezpośrednio z nitryli w przypadku pochodnych pirazykowych (19–34) bądź poprzez metyloiminoester utworzony *in situ* w przypadku pochodnych pirydynowych (35–50, 57–60). Następnym etapem niezbędnym do otrzymania trzech kolejnych serii produktów końcowych była synteza amidrazonów (61–72). Uzyskano je w wyniku reakcji wodzianu hydrazyny z nitrylem lub metyloiminoestrami poddanymi bądź niepoddanymi izolacji. W wyniku działania na amidrazony aldehydami (4-nitrobenzoesowym, benzoesowym, 5-nitrotiofeno-2-karboksyaldehydem oraz 5-nitro-2-furaldehydem) otrzymano pochodne o strukturze imin (73–92, 93–112, 113–120).

Ogółem zsyntezowano 120 związków, z których 96 stanowiło produkty końcowe. Struktura wszystkich pochodnych potwierdzona została wynikami analizy elementarnej oraz spektroskopowej IR i ^1H NMR, a w niektórych przypadkach również ^{13}C NMR. Dla dwóch związków wykonano zmiennotemperaturowe widma ^1H NMR oraz ^{15}N CP MAS.

Ponadto, metodami analizy rentgenograficznej wyznaczono strukturę krystaliczną 35 pochodnych, co pozwoliło na dokonanie ich analizy geometrycznej i konformacyjnej, a także na określenie typów najczęstszych oddziaływań występujących w kryształach zbadanych związków. Dowiedziono, iż związki o budowie tiosemikarbazonu mają tendencję do przyjmowania formy zwitterionowej (20 z 22), a związki o budowie iminowej konfiguracji *E* (12 z 13).

Produkty końcowe badano pod kątem ich potencjalnej aktywności przeciwprątkowej na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis* – referencyjnym H₃₇Rv oraz klinicznym Spec. 210 wykazującym oporność, m.in. na izoniazyd. Najbardziej interesującą grupą okazały się być 2,6-dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirydyny, w której aż 16 z 20 pochodnych wykazywały od 2- do 16-krotnie wyższą zdolność do inhibicji wzrostu szczepu opornego w zestawieniu z izoniazylem. Nie mniej jednak w każdej z serii znajdowały się silnie aktywne związki wobec obu testowanych szczepów, co potwierdza słuszność obranego kierunku badań. Dla najbardziej rokujących związków wykonano poszerzone badania mikrobiologiczne wobec panelu referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich, bakterii Gram-ujemnych oraz drożdży w celu sprawdzenia selektywności ich działania. Natomiast bezpieczeństwo ich stosowania przeprowadzano w testach cytotoksyczności na linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT). Wyniki dodatkowych badań biologicznych znacznie zawężyły grono potencjalnych kandydatów na lek przeciwprątkowy.

Wyłoniono dwie struktury wiodące wśród pirydynowych pochodnych tiosemikarbazonowych oraz kolejne dwie z szeregu pirazynowych pochodnych iminowych. Analiza zależności struktura-aktywność wskazała, iż szczególne znaczenie dla selektywnego działania tuberkulostatycznego ma obecność pirolidyny i piperydyny umiejscowionych przy pierścieniu heteroaromatycznym oraz piperydyny w ugrupowaniu tiosemikarbazonowym bądź podstawnika 5-nitrofurylowego w ugrupowaniu iminowym. Co więcej, analiza struktur krystalicznych dowiodła, iż w przypadku pochodnych tiosemikarbazonowych kluczową rolę w kwestii aktywności odgrywa możliwość tworzenia przez cząsteczki dużych planarnych układów stabilizowanych wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi oraz orientacja podstawnika bocznego w płaszczyźnie pierścienia heteroaromatycznego. Natomiast w kryształach pochodnych iminowych zauważono obrót pierścienia 5-nitrofurylowego w kierunku azometinowego atomu wodoru oraz obecność oddziaływań asocjacji warstwowej.

SUMMARY

Tuberculosis is identified by WHO as a disease constituting a global threat, and there are factors which have a negative impact on its epidemiological situation, such as a need for long-term use of drug combinations causing side effects during therapy, which conduce to the failure of therapeutic process and consequently, to the dissemination of drug-resistant and multidrug resistant strains. Therefore, it is substantial to intensify the search for new, more effective ones and safer chemotherapy drugs.

Theoretical part outlines currently used anti-tuberculosis drugs and their resistance mechanisms. New approaches has been indicated to the discovery and design of anti-tuberculosis drugs, including the contribution of crystallographic research to this process. The validity of optimizing lead structures has been confirmed as exemplified by pharmaceuticals developed in various phases of clinical trials. Literature review has conducted for active compounds against *M. tuberculosis* based on pyrazine, pyridine or amidrazone derivatives proved that treating these structural elements as pharmacophore groups is valid. In addition, the CSD database has been searched for compounds with thiosemicarbazone and imine structures, and the most common interactions occurring for them in the crystalline state have been described.

As part of this doctoral dissertation, synthesis of a total of six series of new disubstituted amidrazone derivatives of pyrazine and pyridine has been designed. The amidrazone section has made up a link between the heteroaromatic ring and the thiosemicarbazone and imine moiety. Pyrazine has contained substitutions in 2.6 positions of the ring, while pyridine in 2.6 and 2.4 positions. Base materials for planned syntheses were 6-chloropyrazine-2-carbonitrile, 6-chloropicolinonitrile and 4-chloropicolinonitrile. Transformation of base compounds into methylimino esters (**1**, **2**, **51**), which have been subjected to a reaction of condensation with carbothiohydrazide derivatives containing pyrrolidine, morpholine, piperidine in the structure and dimethylamine, has allowed for the creation of thiosemicarbazone derivatives (**3–6**, **7–10**, **52–55**). In order, to complete the first three initiated series of syntheses, chlorine atom in the 6-position of pyrazine and pyridine rings has been substituted for pyrrolidine, morpholine, piperidine and a phenoxy moiety (**11–18**). Halogen group in 4-position of the pyridine ring, has been replaced only by piperidine (**56**). For these compounds, condensations with the appropriate carbothiohydrazide has been carried out directly from nitriles in case of pyrazine derivatives (**19–34**) or through a methylimino ester formed *in situ* in case of pyridine derivatives

(35–50, 57–60). The following phase, essential to obtain three further series of final products has been an amidrazones synthesis (61–72). These has been obtained by hydrazine hydrate with nitrile or methylimino esters reaction, either subjected to isolation or not. As a result of the action on amidrazones with aldehydes (4-nitrobenzoic, benzoic, 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde and 5-nitro-2-furaldehyde) there were obtained derivatives with an imine structure (73–92, 93–112, 113–120).

A total of 120 compounds have been synthesized, of which 96 constituted final products. The structure of all derivatives has been confirmed by the results of elemental and IR as well as ^1H NMR spectroscopic analyses, and in some cases also ^{13}C NMR. Variable-temperature ^1H NMR spectra and ^{15}N CP MAS NMR spectra have been performed for two compounds.

Moreover, crystal structure of 35 derivatives has been determined by using X-ray analysis methods, which has enabled to conduct its geometric and conformational analysis, and also to determine the types of most common interactions occurring in the crystal of the tested compounds. It has been proven that compounds with the thiosemicarbazone structure tend to adopt the zwitterion form (20 out of 22), and compounds with the imine structure have *E* configuration (12 out of 13).

The final products have been tested for their potential antimycobacterial activity on two strains of *M. tuberculosis* - reference H₃₇Rv and clinical Spec. 210 showing resistance, including on isoniazid. The most interesting group turned out to be 2,6-disubstituted thiosemicarbazone pyridine derivatives, in which as many as 16 out of 20 derivatives have showed a 2- to 16-fold higher ability to inhibit the growth of a resistant strain compared to isoniazid. Nevertheless, each series has contained strongly active compounds against both tested strains, which confirms validity of the chosen research direction. For the most promising compounds, extended microbiological tests have been performed against a panel of reference strains of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeast in order to check the selectivity of their action. However, safety of their use has been carried out in cytotoxicity tests on the human keratinocyte cell line (HaCaT). The results of additional biological tests has significantly narrowed the group of potential antituberculosis drug candidates.

Two leading structures have been identified among pyridine thiosemicarbazone derivatives and two more from a series of pyrazine imine derivatives. The structure-activity dependency analysis has indicated that the presence of pyrrolidine and piperidine situated at the heteroaromatic ring and piperidine in the thiosemicarbazone moiety or the

5-nitrofuryl substituent in the imine moiety has been particularly important for the selective tuberculostatic effect. Moreover, analysis of crystal structures has demonstrated that in the instance of thiosemicarbazone derivatives, ability of the molecules to form large planar systems, stabilized by intramolecular hydrogen bonds and orientation of the side substituent in the plane of the heteroaromatic ring plays a key role in terms of activity. However, in the crystal of imine derivatives, rotation of 5-nitrofuryl ring towards the azomethine hydrogen atom and the presence of layer association interactions have been noticed.

10. WYKAZ SKRÓTÓW

ATCC – kolekcja szczepów mikroorganizmów

CADD – projektowanie wspomagane komputerowo

CP MAS – połączenie techniki polaryzacji skośnej i rotacji pod kątem magicznym

CSD – krystalograficzna baza danych

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

DMSO – dimetylosulfotlenek

EMA – Europejska Agencja Leków

FDA – Agencja Żywności i Leków

HaCaT – nienowotworogenna, nieśmiertelna linia komórkowa keratynocytów człowieka

IC₅₀ – stężenie hamujące w 50% wzrost komórek lub aktywność procesów

IFN- γ – interferon gamma aktywujący mechanizmy odpornościowe organizmu człowieka

IR – spektroskopia w podczerwieni

log*P* – współczynnik podziału woda/oktanol, parametr lipofilowości

LORA – ang. low-oxygen recovery assay

MABA – mikroplótkowy test AlamarBlue

MDR-TB – gruźlica wielolekooporna

MIC – minimalne stężenie hamujące

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

NP – nanocząstki

ORTEP – obraz przestrzenny cząsteczki związku

SLN – mannozylowane stałe nanocząstki lipidowe

SRB – sulforodamina B

TNF- γ – czynnik martwicy nowotworu, cytokina prozapalna

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

XDR-TB – gruźlica ekstremalnie odporna na leki

11. PIŚMIENICTWO

- [1] Chandra, P.; Grigsby, S.J.; Philips, J.A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20*, 750–766.
- [2] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2022. Dostępny online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>.
- [3] Hoagland, D.T.; Liu, J.; Lee, R.B.; Lee, R.E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *102*, 55–72.
- [4] Allué-Guardia, A.; García, J.I.; Torrelles, J.B. Evolution of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 612675.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Drug-Resistant, T.B. Dostępny online: <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/>.
- [6] Montales, M.T.; Chaudhury, A.; Beebe, A.; Patil, S.; Patil, N. HIV-associated TB syndemic: a growing clinical challenge worldwide, *Front. Public Health* **2015**, *3*, 281.
Waters, R.; Ndengane, M.; Abrahams, M.R.; Diedrich, C.R.; Wilkinson, R.J.; Coussens, A.K. The *Mtb*-HIV syndemic interaction: why treating *M. tuberculosis* infection may be crucial for HIV-1 eradication. *Future Virol.* **2020**, *15*, 101–125.
- [7] World Health Organization. The End TB Strategy. Dostępny online: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy>.
- [8] World Health Organization. Implementing the End TB Strategy: the essentials, 2022 update. Dostępny online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240065093>.
- [9] Quan, D.; Nagalingam, G.; Payne, R.; Triccas, J.A. New tuberculosis drug leads from naturally occurring compounds. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *56*, 212–220.
- [10] Perrin, C.; Athersuch, K.; Elder, G.; Martin, M.; Alsalhani, A. Recently developed drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a research and development case study. *BMJ Global Health* **2022**, *7*, e007490.
- [11] Reddy, D.S.; Sinha, A.; Kumar, A.; Saini, V.K. Drug re-engineering and repurposing: A significant and rapid approach to tuberculosis drug discovery. *Arch. Pharm.* **2022**, *335*, 2200214.
- [12] Ejalonibu, M.A.; Ogundare, S.A.; Elrasahedy, A.A.; Ejalonibu, M.A.; Lawal, M.M.; Mhlongo, N.N.; Kumalo, H.M. Drug Discovery for *Mycobacterium tuberculosis* Using Structure-Based Computer-Aided Drug Design Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13259.

- [13] Khoza, L.J.; Kumar, P.; Dube, A.; Demana, P.H.; Choonara, Y.E. Insights into innovative therapeutics for drug-resistant tuberculosis: Host-directed therapy and autophagy inducing modified nanoparticles. *Int J Pharm.* **2022**, *622*, 121893.
- [14] WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. Dostępny online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240048126>.
- [15] CDC Fact Sheet. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR TB). Dostępny online: <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/drtb/xdrtb.htm>.
- [16] Brammachary, U.; Ramachandra, V.; Palavesam, Cuppusamy Kapalamurthy, V.R.; Muralidhar, A.; Muthaiah, M. Mechanisms and Action of Drug Resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. In Antibiotic Resistance - New Insights.; Mustafa, G.; Saxena, S.K. Edyt.; Wydawca: IntechOpen Limited, Wielka Brytania, 2022.
- [17] Allué-Guardia, A.; García, J.I.; Torrelles, J.B. Evolution of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 612675.
- [18] Dookie, N.; Rambaran, S.; Padayatchi, N.; Mahomed, S.; Naidoo, K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother* **2018**, *73*, 1138–1151.
- [19] Vilchèze, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 2278.
- [20] Ghazaei, C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J Res Med Sci.* **2018**, *23*, 63.
- [21] Piccaro, G.; Poce, G.; Biava, M.; Giannoni, F.; Fattorini, L. Activity of lipophilic and hydrophilic drugs against dormant and replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antibiot.* **2015**, *68*, 711–714.
- [22] Bhagwat, A.; Deshpande, A.; Parish, T. How *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance has shaped anti-tubercular drug discovery. *Front Cell Infect Microbiol.* **2022**, *12*, 974101.
- [23] Zhang, Y.; Shi, W.; Zhang, W.; Mitchison, D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.* **2013**, *2*, 1–12.

- [24] Anishetty, S.; Pulimi, M.; Pennathur, G. Potential drug targets in *Mycobacterium tuberculosis* through metabolic pathway analysis. *Comput. Biol. Chem.* **2005**, *29*, 368–378.
- [25] Ollinger, J.; Kumar, A.; Roberts, D.M.; Bailey, M.A.; Casey, A.; Parish, T. A high-throughput whole cell screen to identify inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* **2019**, *14*, e0205479.
- [26] Wayne, L.G.; Hayes, L.G. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence, *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 2062–2069.
- [27] Cho, S.H.; Warit, S.; Wan, B.; Hwang, C.H.; Pauli, G.F.; Franzblau, S.G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1380–1385.
- [28] Early, J.V.; Mullen, S.; Parish, T. A Rapid Method to Determine the Bactericidal Activity of Compounds against Non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* at Low pH, *bioRxiv* **2019**, 578195.
- [29] Zhang, M.; Sala, C.; Hartkoorn, R.C.; Dhar, N.; Mendoza-Losana, A.; Cole, S.T. Streptomycin-starved *Mycobacterium tuberculosis* 18b, a drug discovery tool for latent tuberculosis, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5782–5789.
- [30] Wang, F.; Sambandan, D.; Halder, R.; Wang, J.; Batt, S.M.; Weinrick, B.; Ahmad, I.; Yang, P.; Zhang, Y.; Kim, J. Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* **2013**, *110*, 2510–2517.
- [31] Gold, B.; Warriar, C.; Nathan, C. A multistress model for high throughput screening against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* **2021**, *2315*, 611–635.
- [32] Kumar, A.; Chettiar, S.; Parish, T. Current challenges in drug discovery for tuberculosis. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12*, 1–4.
- [33] Brindha, S.; Sundaramurthi, J.C.; Velmurugan, D.; Vincent, S.; Gnanadoss, J.J. Docking-based virtual screening of known drugs against murE of *Mycobacterium tuberculosis* towards repurposing for TB. *Bioinformatics* **2016**, *12*, 368–373.

- [34] Brindha, S.; Sundaramurthi, J.C.; Vincent, S.; Velmurugan, D.; Gnanadoss, J.J. In Silico and in Vitro Screening of FDA-Approved Drugs for Potential Repurposing against Tuberculosis, *bioRxiv* **2017**, 228171.
- [35] Battah, B.; Chemi, G.; Butini, S.; Campiani, G.; Brogi, S.; Delogu, G.; Gemma, S. A repurposing approach for uncovering the anti-tubercular activity of FDA approved drugs with potential multi-targeting profiles. *Molecules* **2019**, *24*, 4373.
- [36] Sundar, S.; Thangamani, L.; Manivel, G.; Kumar, P.; Piramanayagam, S. Molecular docking, molecular dynamics and MM/PBSA studies of FDA approved drugs for protein kinase a of Mycobacterium tuberculosis; application insights of drug repurposing, *Inf. Med. Unlocked* **2019**, *16*, 100210.
- [37] Maitra, A.; Bates, S.; Kolvekar, T.; Devarajan, P.V.; Guzman, J.D.; Bhakta, S. Repurposing-a ray of hope in tackling extensively drug resistance in tuberculosis. *Int. J. Infect. Dis.* **2015**, *32*, 50–55.
- [38] Dube, P.S.; Legoabe, L.J.; Jordaan, A.; Jesumoroti, O.J.; Tshiwawa, T.; Warner, F.T.; Beteck, R.M. Easily accessed nitroquinolones exhibiting potent and selective anti-tubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *213*, 113207.
- [39] Guan, Q.; Zhan, L.; Liu, Z.-H.; Pan, Q.; Chen, X.-L.; Xiao, Z.; Qin, C.; Zhang, X.-L. Identification of pyrvinium pamoate as an anti-tuberculosis agent *in vitro* and *in vivo* by SOSA approach amongst known drugs, *Emerg. Microb. Infect.* **2020**, *9*, 302–312.
- [40] Harbut, M.B.; Vilcheze, C.; Luo, X.; Hensler, M.E.; Guo, H.; Yang, B.; Chatterjee, A.K.; Nizet, V.; Jacobs, W.R.; Schultz, P.G.; Wang, F. Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* **2015**, *112*, 4453–4458.
- [41] Fatima, S.; Bhaskar, A.; Dwivedi, V.P. Repurposing immunomodulatory drugs to combat tuberculosis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1149.
- [42] An, Q.; Li, C.; Chen, Y.; Deng, Y.; Yang, T.; Luo, Y. Repurposed drug candidates for antituberculosis therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *192*, 112175.
- [43] Kiliñç, G.; Saris, A.; Ottenhoff, T.H.; Haks, M.C. Host-directed therapy to combat mycobacterial infections. *Immunol. Rev.* **2021**, *301*, 62–83.

- [44] Kolloli, A.; Subbian, S. Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis. *Front. Med.* **2017**, *4*, 171.
- [45] Ringholz, F.C.; Buchanan, P.J.; Clarke, D.T.; Millar, R.G.; McDermott, M.; Linnane, B.; Harvey, B.J.; McNally, P.; Urbach, V. Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2014**, *44*, 394–404.
- [46] Young, C.; Walzl, G.; Du Plessis, N. Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* **2020**, *13*, 190–204.
- [47] Ramakrishnan, L.; Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 352–366.
- [48] Torfs, E.; Piller, T.; Cos, P.; Cappoen, D. Opportunities for overcoming *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: emerging mycobacterial targets and host-directed therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2868.
- [49] Kiran, D.; Podell, B.K.; Chambers, M.; Basaraba, R.J. Host-directed therapy targeting the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: a review. *Semin. Immunopathol.* **2016**, *38*, 167–183.
- [50] Ndlovu, H.; Marakalala, M.J. Granulomas and inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 434.
- [51] Watson, R.O.; Manzanillo, P.S.; Cox, J.S. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* **2012**, *150*, 803–815.
- [52] Paik, S.; Kim, J.K.; Chung, C.; Jo, E.-K. Autophagy: a new strategy for host-directed therapy of tuberculosis, *Virulence* **2019**, *10*, 448–459.
- [53] Corcelle, E.A.; Puustinen, P.; M. Jäättelä, M. Apoptosis and autophagy: targeting autophagy signalling in cancer cells – ‘trick or treats’? *FEBS J.* **2009**, *276*, 6084–6096.
- [54] Stanley, S.A.; Barczak, A.K.; Silvis, M.R.; Luo, S.S.; Sogi, K.; Vokes, M.; Bray, M.-A.; Carpenter, A.E.; Moore, C.B.; Siddiqi, N.; Rubin, E.J. Hung, D.T. Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1003946.

- [55] Gries, R.; Sala, C.; Rybniker, J. Host-directed therapies and anti-virulence compounds to address anti-microbial resistant tuberculosis infection. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 2688.
- [56] Yuk, J.-M.; Shin, D.-M.; Lee, H.-M.; Yang, C.-S.; Jin, H.S.; Kim, K.-K.; Lee, Z.-W.; Lee, S.-H.; Kim, J.-M.; Jo, E.-K. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe* **2009**, *6*, 231–243.
- [57] Choi, S.W.; Gu, Y.; Peters, R.S.; Salgame, P.; Ellner, J.J.; Timmins, G.S.; Deretic, V. Ambroxol induces autophagy and potentiates rifampin antimycobacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01019–01018.
- [58] Rao, M.; Ippolito, G.; Mfinanga, S.; Ntoumi, F.; Yeboah-Manu, D.; Vilaplana, C.; Zumla, A.; Maeurer, M. Improving treatment outcomes for MDR-TB – novel host-directed therapies and personalised medicine of the future. *Int. J. Infect.* **2019**, *80*, 62–67.
- [59] Tukvadze, N.; Sanikidze, E.; Kipiani, M.; Hebbar, G.; Easley, K.A.; Shenvi, N.; Kempker, R.R.; Frediani, J.K.; Mirtskhulava, V.; Alvarez, J.A.; Lomtadze, N.; Vashakidze, L.; Hao, L.; Rio, C.D.; Tangpricha, V.; Blumberg, H.M.; Ziegler, T.R. High-dose vitamin D3 in adults with pulmonary tuberculosis: a double-blind randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102*, 1059–1069.
- [60] Bekele, A.; Gebreselassie, N.; Ashenafi, S.; Kassa, E.; Aseffa, G.; Amogne, W.; Getachew, M.; Aseffa, A.; Worku, A.; Raqib, R.; Agerberth, B.; Hammar, U.; Bergman, P.; Aderaye, G.; Andersson, J.; Brighenti, S. Daily adjunctive therapy with vitamin D 3 and phenylbutyrate supports clinical recovery from pulmonary tuberculosis: a randomized controlled trial in Ethiopia. *J. Intern. Med.* **2018**, *284*, 292–306.
- [61] Salahuddin, N.; Ali, F.; Hasan, Z.; Rao, N.; Aqeel, M.; Mahmood, F. Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonary tuberculosis'. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1–11.
- [62] Padmapriyadarsini, C.; Bhavani, P.K.; Natrajan, M.; Ponnuraja, C.; Kumar, H.; Gomathy, S.N.; Guleria, R.; Jawahar, S.M.; Singh, M.; Balganes, T.; Swaminathan, S. Evaluation of metformin in combination with rifampicin containing antituberculosis therapy in patients with new, smear-positive pulmonary tuberculosis (METRIF): study protocol for a randomised clinical trial. *BMJ Open* **2019**, *9*, e024363.

- [63] Prideaux, B.; Via, L.E.; Zimmerman, M.D.; Eum, S.; Sarathy, J.; O'brien, P.; Chen, C.; Kaya, F.; Weiner, D.M.; Chen, P.-Y.; Song, T.; Lee, M.; Shim, T.; Cho, J.S.; Kim, W.; Cho, S.N.; Olivier, K.N.; Barry, C.E.; Dartois, V. The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1223–1227.
- [64] Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; del Pilar Rodriguez-Torres, M.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H.S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 1–33.
- [65] Nasiruddin, M.; Neyaz, M.; Das, S. Nanotechnology-based approach in tuberculosis treatment. *Tuberculosis Res. Treat* **2017**, *2017*, 1–12.
- [66] Mitchell, M.J.; Billingsley, M.M.; Haley, R.M.; Wechsler, M.E.; Peppas, N.A.; Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101–124.
- [67] da Silva, P.B.; de Freitas, E.S.; Bernegossi, J.; Gonçalez, M.L.; Sato, M.R.; Leite, C.Q.F.; Pavan, F.R.; Chorilli, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of tuberculosisda review. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12*, 241–260.
- [68] Baranyai, Z.; Soria-Carrera, H.; Alleva, M.; Millán-Placer, A.C.; Lucía, A.; Martín-Rapún, R.; Aínsa, J.A.; de la Fuente, J.M. Nanotechnology-based targeted drug delivery: an emerging tool to overcome tuberculosis. *Adv. Ther.* **2021**, *4*, 2000113.
- [69] Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M.A.; Alkawareek, M.Y.; Dreaden, E.C.; Brown, D.; Alkilany, A.M.; Farokhzad, O.C.; Mahmoudi, M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4218–4244.
- [70] Singh, J.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A.K. Advances in nanotechnology-based carrier systems for targeted delivery of bioactive drug molecules with special emphasis on immunotherapy in drug resistant tuberculosis—a critical review. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 1676–1698.
- [71] Soria-Carrera, H.; Lucía, A.; De Matteis, L.; Aínsa, J.A.; de la Fuente, J.M.; Martín-Rapún, R. Polypeptidic micelles stabilized with sodium alginate enhance the activity of encapsulated bedaquiline. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19*, 1800397.

- [72] Rawal, T.; Patel, S.; Butani, S. Chitosan nanoparticles as a promising approach for pulmonary delivery of bedaquiline. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **2018**, *124*, 273–287.
- [73] Costa, A.; Sarmiento, B.; Seabra, V. Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **2018**, *114*, 103–113.
- [74] Tan, Z.M.; Lai, G.P.; Pandey, M.; Srichana, T.; Pichika, M.R.; Gorain, B.; Bhattamishra, S.K.; Choudhury, H. Novel approaches for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1196.
- [75] Kuzmov, A.; Minko, T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. *J. Contr. Release* **2015**, *219*, 500–518.
- [76] Parumasivam, T.; Chang, R.Y.K.; Abdelghany, S.; Ye, T.T.; Britton, W.J.; Chan, H.-K. Dry powder inhalable formulations for anti-tubercular therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *102*, 83–101.
- [77] Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A.K. Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis. *Artif Cell Nanomed Biotechnol.* **2016**, *44*, 997–1001.
- [78] Chono, S.; Kaneko, K.; Yamamoto, E.; Togami, K.; Morimoto, K. Effect of surfacemannose modification on aerosolized liposomal delivery to alveolar macrophages. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2010**, *36*, 102–107.
- [79] Ma, C.; Wu, M.; Ye, W.; Huang, Z.; Ma, X.; Wang, W.; Wang, W.; Huang, Y.; Pan, X. Wu, C. Inhalable solid lipid nanoparticles for intracellular tuberculosis infection therapy: macrophage-targeting and pH-sensitive properties. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *11*, 1218–1235.
- [80] Clinical pipeline. Working Group on New TB Drug. Stop TB Partnership. Dostępny online: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>.
- [81] Appetecchia, F.; Consalvi, S.; Scarpecci, C.; Biava, M.; Poce, G. SAR Analysis of Small Molecules Interfering with Energy-Metabolism in Mycobacterium tuberculosis. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 227.
- [82] Kumar, D.; Negi, B.; Rawat, D. The anti-tuberculosis agents under development and the challenges ahead. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*

- [83] Yuan, S.; Shen, D.-D.; Bai, Y.-R.; Zhang, M.; Zhou, T.; Sun, C.; Zhou, L.; Wang, S.-Q.; Liu, H.-M. Oxazolidinone: A promising scaffold for the development of antibacterial drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *250*, 115239.
- [84] Kaneko, T.; Cooper, C.; Mdluli, K. Challenges and opportunities in developing novel drugs for TB. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1373–1400.
- [85] Krah, A.; Grüber, G.; Bond, P.J. Binding properties of the anti-TB drugs bedaquiline and TBAJ-876 to a mycobacterial F-ATP synthase. *Current Research in Structural Biology* **2022**, *4*, 274–284.
- [86] Sarathy, J.P.; Gruber, G.; Dick, T. Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline. *Antibiotics* **2019**, *8*, 261.
- [87] Guo, Q.; Bi1, J.; Lin, Q.; Ye, T.; Wang, Z.; Wang, Z.; Liu, L.; Zhang, G. Whole Genome Sequencing Identifies Novel Mutations Associated with Bedaquiline Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 807095.
- [88] Appetecchia, F.; Consalvi, S.; Scarpecci, C.; Biava, M.; Poce, G. SAR Analysis of Small Molecules Interfering with Energy-Metabolism in Mycobacterium tuberculosis. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 227.
- [89] Sutherland, H.S.; Tong, A.S.T.; Choi, P.J.; Blaser, A.; Conole, D.; Franzblau, S.G.; Lotlikar, M.U.; Cooper, C.B.; Upton, A.M.; Denny, W.A.; Palmer, B.D. 3,5-Dialkoxypyridine analogues of bedaquiline are potent antituberculosis agents with minimal inhibition of the hERG channel. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1292–1307.
- [90] Sutherland, H.S.; Tong, A.S.T.; Choi, P.J.; Blaser, A.; Franzblau, S.G.; Cooper, C.B.; Upton, A.M.; Lotlikar, M.U.; Denny, W.A.; Palmer, B.D. Variations in the C-unit of bedaquiline provides analogues with improved biology and pharmacology. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115213.
- [91] Huang, Z.; Luo, W.; Xu, D.; Guo, F.; Yang, M.; Zhu, Y.; Shen, L.; Chen, S.; Tang, D.; Li, L.; Li, Y.; Wang, B.; Franzblau, S.G.; Ding, C.Z. Discovery and preclinical profile of sudapyridine (WX-081), a novel anti-tuberculosis agent. *Bioorg Med Chem Lett* **2022**, *71*, 128824.
- [92] Mudde, S.E.; Upton, A.M.; Lenaerts, A.; Bax, H.I.; De Steenwinkel, J.E.M. Delamanid or pretomanid? A Solomonic judgement! *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 880–902.

- [93] Wang, C.; Wang, G.; Huo, F.; Xue, Y.; Jia, J.; Dong, L.; Zhao, L.; Wang, F.; Huang, H.; Duan, H. Novel oxazolidinones harbor potent in vitro activity against the clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China. *Front. Med.* **2022**, *9*, 1067516.
- [94] Wu, W.; Li, L.; Duan, S.; Wang, Y. Clinical effectiveness and reliability of linezolid in the treatment of pulmonary tuberculosis complicated with severe pneumonia: a meta-analysis. *Am J Transl Res.* **2022**, *14*, 7622–7631.
- [95] Yew, W.-W.; Chan, D.P.; Chang, K.-C. Does linezolid have a role in shortening treatment of tuberculosis? *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1060–1062.
- [96] Guo, S.; Wang, B.; Fu, L.; Chen, X.; Zhang, W.; Huang, H.; Lu, Y. In Vitro and In Vivo Activity of Oxazolidinone Candidate OTB-658 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2021**, *65*, e00974–21.
- [97] Yuan, S.; Shen, D.-D.; Bai, Y.-R.; Zhang, M.; Zhou, T.; Sun, C.; Zhou, L.; Wang, S.-Q.; Liu, H.-M. Oxazolidinone: A promising scaffold for the development of antibacterial drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *250*, 115239.
- [98] Amado, P.S.M.; Woodley, C.; Cristiano, M.L.S.; O’Neill, P.M. Recent Advances of DprE1 Inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*: Computational Analysis of Physicochemical and ADMET Properties. *ACS Omega* **2022**, *7*, 40659–40681.
- [99] Trefzer, C.; Rengifo-Gonzalez, M.; Hinner, M.J. Benzothiazinones: prodrugs that covalently modify the decaprenylphosphoryl-b-D-ribose-2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13663–13665.
- [100] Makarov, V.; Lechartier, B.; Zhang, M.; Neres, J.; van der Sar, A.M.; Raadsen, S.A.; Hartkoorn, R.C.; Ryabova, O.B.; Vocat, A.; Decosterd, L.A.; Widmer, N.; Buclin, T.; Bitter, W.; Andries, K.; Pojer, F.; Dyson, P.J.; Cole, S.T. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 372–383.
- [101] Pethe, K.; Bifani, P.; Jang, J.; Kang, S.; Park, S.; Ahn, S.; Jiricek, J.; Jung, J.; Jeon, H.K.; Cechetto, J. i in. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1157–1160.
- [102] Wang, J.; Jing, W.; Shi, J.; Huo, F.; Shang, Y.; Wang, F.; Chu, N.; Pang, Y. Bipolar

distribution of minimum inhibitory concentration of Q203 across mycobacterial species. *Microb. Drug Resist.* **2021**, *27*, 1013–1017

[103] Yu, W.; Yusuf, B.; Wang, S.; Tian, X.; Hameed, H.M.A.; Lu, Z.; Chiwala, G.; Alam, Md.S.; Cook, G.M.; Maslov, D.A.; Zhong N.; Zhang, T. Sterilizing Effects of Novel Regimens Containing TB47, Clofazimine, and Linezolid in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2021**, *65*, e0070621.

[104] Kerantzas, C.A.; Jacobs, W.R. Origins of combination therapy for tuberculosis: lessons for future antimicrobial development and application. *mBio* **2017**, *8*, e01586–01516.

[105] Dartois, V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 159–167

[106] Conradie, F.; Diacon, A.H.; Ngubane, N.; Howell, P.; Everitt, D.; Crook, A.M.; Mendel, C.M.; Egizi, E.; Moreira, J.; Timm, J.; McHugh, T.D.; Wills, G.H.; Bateson, A.; Hunt, R.; Niekerk, C.V.; Li, M.; Olugbosi, M.; Spigelman, M. Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 893–902.

[107] Diacon, A.H.; Dawson, R.; von Groote-Bidlingmaier, F.; Symons, G.; Venter, A.; Donald, P.R.; van Niekerk, C.; Everitt, D.; Winter, H.; Becker, P.; Mendel, C.M.; Spigelman, M.K. 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. *Lancet* **2012**, *380*, 986–993

[108] Gillespie, S.H.; Crook, A.M.; McHugh, T.D.; Mendel, C.M.; Meredith, S.K.; Murray, S.R.; Pappas, F.; Phillips, P.P.; Nunn, A.J. Four-month moxifloxacin-based regimens for drug-sensitive tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1577–1587

[109] Singh, A.K.; Kumar, A.; Singh, H.; Sonawane, P.; Paliwal, H.; Thareja, S.; Pathak, P.; Grishina, M.; Jaremko, M.; Emwas, A.H.; Yadav, J.P.; Verma, A.; Khalilullah, H.; Kumar, P. Concept of Hybrid Drugs and Recent Advancements in Anticancer Hybrids, *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1071

[110] Makhoba, X.H.; Viegas-Jr. C.; Mosa, R.A.; Viegas, F.P.D.; Poee, O.J. Potential Impact of the Multi-Target Drug Approach in the Treatment of Some Complex Diseases, *Drug Des Devel Ther.* **2020**, *14*, 3235–3249

- [111] Application of Hybrid Drug Design Strategy in Medicinal Chemistry. Dostępny online: <https://www.frontiersin.org/research-topics/42139/application-of-hybrid-drug-design-strategy-in-medicinal-chemistry>.
- [112] Islam, B.; Islam, I.; Nath, N.; Emran, T.B.; Rahman, R.; Sharma, R.; Matin, M.M. Recent Advances in Pyridine Scaffold: Focus on Chemistry, Synthesis, and Antibacterial Activities, *Biomed Res Int.* **2023**, *2023*, 9967591
- [113] Khan, F.-A.; Yaqoob, Ali, S.; Tanveer, N.; Wang, Y.; Ashraf, S.; Hasan, K.A.; Khalifa, S.A.M., Shou, Q.; Ul-Haq, Z., Jiang, Zi.-H; El-Seedi, H.R. Designing Functionally Substituted Pyridine-Carbohydrazides for Potent Antibacterial and Devouring Antifungal Effect on Multidrug Resistant (MDR) Strains, *Molecules* **2023**, *28*, 212.
- [114] Ling, Y.; Hao, Z.-Y.; Liang, D.; Zhang, C.-L.; Liu, Y.-F.; Wang, Y. The Expanding Role of Pyridine and Dihydropyridine Scaffolds in Drug Design. *Drug Des. Devel. Ther.* **2021**, *15*, 4289–4338
- [115] Vinsova, J.; Imramovský, A.; Jampilek, J.; Monreal, J.F.; Dolezal, M. Recent Advances on Isoniazide Derivatives, Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry **2008**, *7*, 12–31.
- [116] Dos Santos, J.L.; Dutra, L.A.; De Melo, T.R.F.; Chung, M.C. New Antitubercular Drugs Designed by Molecular Modification. In *Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*; Cardona, P.-J. Edyt. InTechOpen Limited, Wielka Brytania, 2012; 169–186.
- [117] Radaman, E.S. Synthesis and mass spectrometry of some arylidene-hydrazinyl-thiazolines and their 2-arylidene-N-(3-chlorophenyl)hydrazinecarbothioamide precursors. *SN Appl. Sci.* **2019**, *1*, 1–10.
- [118] Malík, I.; Čižmárik, J.; Pecháčová, M. Focus on perchlozone, an anti-tuberculosis drug from the Russian Federation. *Čes. slov. Farm.* **2020**, *69*, 203–210
- [119] Ushtanit, A.; Mikhailova, Y.; Krylova, L.; Grigorash, D.; Makarova, M.; Safonova, S.; Zimenkov, D. Perchlozone Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* **2023**, *12*, 590.

- [120] Juhaš, M.; Zitko, J. Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 8901–8916.
- [121] Kumar, S.; Das, N. Chapter 5 - Self-assembly of pyrazine-based metallamacrocycles: Design, synthesis, and applications. *Supramolecular Coordination Complexes* **2023**, 101–133.
- [122] Bouz, G.; Šlechta, P.; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Paterová, P.; Bárta, P.; Novák, M.; Kůcera, R.; Dal, N.-J.K.; Fenaroli, F.; Zemanová, J.; Forbak, M.; Korduláková, J.; Pavliš, O.; Kubíčková, P.; Doležal, M.; Zitko, J. Hybridization Approach Toward Novel Antituberculars: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Compounds Combining Pyrazinamide and 4-Aminosalicylic Acid. *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9*, 79–96.
- [123] Zhou, S.; Yang, S.; Huang, G. Design, synthesis and biological activity of pyrazinamide derivatives for anti-*Mycobacterium tuberculosis*. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2017**, *32*, 1183–1186.
- [124] Khamitova, A.K.; Berillo, D.A. Prospects for Creating New Medicines Based on Nitrogen-Containing Organic Compounds. *J. drug deliv. ther.* **2021**, *8(4)*, 556.
- [125] Aly, A.A.; El-Din, A.M.N. Functionality of amidines and amidrazones. *Arkivoc.* **2008**, *1*, 153–194.
- [126] International Union of Pure and Applied Chemistry. Amidrazones. In Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013, 1. ed.; Favre, H.A.; Powell, W.H. Edyt.; Wydawca: Royal Society of Chemistry, Wielka Brytania, 2013; P-66.4.2.
- [127] Tapera, M.; Kekeçmuhammed, H.; Sahin, K.; Krishna, V.S.; Lherbet, C.; Homberset, H.; Chebaiki, M.; Tønjum, T.; Mourey, L.; Zorlu, Y.; Durdagi, S.; Sarıpinar, E. Synthesis, characterization, anti-tuberculosis activity and molecular modeling studies of thiourea derivatives bearing aminoguanidine moiety. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1270*, 133899.
- [128] De Logu, A.; Onnis, V.; Saddi, B.; Congiu, C.; Schivo, M.L.; Cocco, M.T. Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 275–282.

- [129] Zampieri, D.; Mamolo, M.G.; Vio, L.; Romano, M.; Skoko, N.; Baralle, M.; Pau, V.; De Logu, A. Antimycobacterial activity of new N¹-[1-[1-aryl-3-[4-(1*H*-imidazol-1-yl)phenyl]-3-oxo]propyl]-pyridine-2-carboxamidrazone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26*, 3287–3290.
- [130] Smart, O.S.; Horský, V.; Gore, S.; Svobodová Vařeková, R.; Bendová, V.; Kleywegt, G.J.; Valenkar, S. Validation of ligands in macromolecular structures determined by X-ray crystallography. *Acta Cryst.* **2018**, *D74*, 228–236.
- [131] Takaya, D.; Niwa, H.; Mikuni, J.; Nakamura, K.; Handa, N.; Tanaka, A.; Yokoyama, S.; Honma, T. Protein ligand interaction analysis against new CaMKK₂ inhibitors by use of X-ray crystallography and the fragment molecular orbital (FMO) method. *J. Mol. Graph. Model.* **2020**, *99*, 107599.
- [132] Dos Santos Nascimento, I.J.; De Aquino¹, T.M.; da Silva-Júnior, E.F. The New Era of Drug Discovery: The Power of Computer-aided Drug Design (CADD). *Lett. Drug Des. Discov.* **2022**, *19*, 951–955.
- [133] Maveyraud, L.; Mourey, L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules* **2020**, *25*, 1030.
- [134] Rondeau, J.-M.; Schreuder, H. Chapter 22 - Protein Crystallography and Drug Discovery. W: The Practice of Medicinal Chemistry, 4th ed.; Wermuth, C.G.; Aldous, D.; Raboisson, P.; Rognan, D. Edyt.; Wydawca: Academic Press, Stany Zjednoczone, 2015 511–533.
- [135] Singh, N.; Tiwari, S.; Srivastava, K.K.; Siddiqi, M.I. Identification of Novel Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* PknG Using Pharmacophore Based Virtual Screening, Docking, Molecular Dynamics Simulation, and Their Biological Evaluation. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 1120–1129.
- [136] Sarfraz, M.; Sultana, N.; Tariq, M.I.; Parvez, M. Synthesis, molecular packing and anti-cholinesterase activity of some new C-2 N-substituted anthranilamide derivatives. *Z. fur Krist. - Cryst. Mater.* **2019**, *9*, 605–611.
- [137] Mammino, L. Intramolecular Hydrogen Bonding and Conformational Preferences of Arzanol—An Antioxidant Acylphloroglucinol. *Molecules* **2017**, *22*, 1294.

- [138] Ferrence, G.M.; Tovee, C.A.; Holgate, S.J.W.; Johnson, N.T.; Lightfoot, M.P.; Nowakowska-Orzechowska, K.L.; Ward, S.C.; Lightfoot, P. *CSD Communications* of the Cambridge Structural Database. *IUCrJ* **2023**, *10*, 6–15.
- [139] Groom, C.R.; Bruno, I.J.; Lightfoot, M.P.; Ward, S.C. The Cambridge Structural Database. *Acta Cryst.* **2016**, *B72*, 171–179.
- [140] Szczesio, M.; Gołka, J.; Korona-Główniak, I.; Orlewska, C.; Gobis, K.; Olczak, A. Planarity of heteroaryldithiocarbazic acid derivatives showing tuberculostatic activity: structure–activity relationships. *Acta Cryst.* **2018**, *C74*, 400–405.
- [141] Szczesio, M.; Gobis, K.; Korona-Główniak, I.; Mazerant-Politowicz, I.; Ziembicka, D.; Foks, H.; Głóówka, M.; Olczak, A. Synthesis, structure and biological activity of four new picolinohydrazone derivatives. *Acta Cryst.* **2019**, *C76*, 673–680.
- [142] Almeida, J.C.L.; Amim, R.S.; Pessoa, C.; Lourenço, M.C.S.; Mendes, I.C.; Lessa, J.A. Bismuth(III) complexes with pyrazineformamide thiosemicarbazones: Investigation on the antimicrobial and cytotoxic effects. *Polyhedron* **2020**, *189*, 114709.
- [143] Gobis, K.; Szczesio, M.; Olczak, A.; Pawlak, T.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Krause, M.; Głóówka, M.L. Relationship between the Crystal Structure and Tuberculostatic Activity of Some 2-Amidinothiosemicarbazone Derivatives of Pyridine. *Materials* **2022**, *15*, 349.
- [144] Gobis, K.; Szczesio, M.; Olczak, A.; Mazerant-Politowicz, I.; Ziembicka, D.; Pacholczyk-Sienicka, B.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Głogowska, A.; Korona-Główniak, I.; Fruziński, A. *N'*-Substituted 4-Phenylpicolinohydrazone derivatives with Thiosemicarbazone Moieties as New Potential Antitubercular Agents: Synthesis, Structure and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Materials* **2022**, *15*, 5513.
- [145] Billington, D.C.; Lowe, P.R.; Rathbone, D.L.; Schwalbe, C.H. A new amidrazone derivative with antimycobacterial activity. *Acta Cryst.* **2000**, *C56*, e211–e212.
- [146] Gobis, K.; Szczesio, M.; Olczak, A.; Korona-Główniak, I.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Mazerant-Politowicz, I.; Ziembicka, D.; Głóówka, M.L. Differences in the Structure and Antimicrobial Activity of Hydrazones Derived from Methyl 4-Phenylpicolinimidate. *Materials* **2022**, *15*, 3085.
- [147] Arunan, E.; Desiraju, G.R.; Klein, R.A.; Sadlej, J.; Scheiner, S.; Alkorta, I.; Clary, D.C.; Crabtree, R.H.; Dannenberg, J.J.; Hobza, P.; Kjaergaard, H.G.; Legon, A.C.;

Mennucci, B.; Nesbitt, D.J. Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 1637–1641.

[148] Atwood, J.L.; Steed, J.W.; Aoyama, Y.; Balzani, V.; Desiraju, G.R.; Gale, P.A.; Gokel, G.W.; Harris, K.D.M.; Hosseini, M.W.; Lipkowski, J.; Nassimbeni, L.R.; Raston, C.L.; Rebek, J.; Reinhoudt, D.V.; Ripmeester, J.A.; Rogers, R.D.; Tucker, J.H.R.; Zaworotko, M. Hydrogen bonding. W: Encyclopedia of Supramolecular Chemistry. Atwood, J.L.; Steed, J.W. Edyt.; Wydawca: CRC Press, Stany Zjednoczone, 2004, 658–665.

[149] Bernstein, J.; Davis, R.E.; Shimoni, L.; Chang, N.-L. Patterns in Hydrogen Bonding: Functionality and Graph Set Analysis in Crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1555–1573.

[150] L. Sobczyk, red., Wiązanie wodorowe, PWN, Warszawa, 1969.

[151] Gawinkowski, S.; Prakash, O. Searching for correlations between geometric and spectroscopic parameters of intramolecular hydrogen bonds in porphyrin-like macrocycles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 22319.

[152] Dobosz, R.; Mućko, J.; Gawinecki, R. Using Chou's 5-Step Rule to Evaluate the Stability of Tautomers: Susceptibility of 2-[(Phenylimino)-methyl]-cyclohexane-1,3-diones to Tautomerization Based on the Calculated Gibbs Free Energies. *Energies* **2020**, *13*, 183.

[153] Choudhury, R.; Chitra, R. Stacking interaction between homostacks of simple aromatics and the factors influencing these interactions. *CrystEngComm* **2010**, *12*, 2113–2121.

[154] Główka, M.L.; Martynowski, D.; Olczak, A.; Kozłowska, K.; Ołubek, Z.; Orlewska, C.; Foks, H. Crystal and molecular structures of 1,1-bis(methylthio)-4-(2-pyridyl)-2,3,5-triaza-1,3-pentadiene and its 5-phenyl derivative. *Pol. J. Chem.* **1999**, *73*, 845–851.

[155] Orlewska, C.; Foks, H.; Sowiński, P.; Martynowski, D.; Olczak, A.; Główka, M.L. Synthesis, structure and tuberculostatic activity of N'-(amino-pyridal-methylene)-hydrazinecarbodithioic acid methyl esters. *Pol. J. Chem.* **2001**, *75*, 1237–1245.

[156] Olczak, A.; Główka, M.L.; Gołka, J.; Szczesio, M.; Bojarska, J.; Kozłowska, K.; Foks, H.; Orlewska, C. 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.* **2007**, *830*, 171–175.
- [157] Krause, M.; Foks, H.; Ziembicka, D.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Głogowska, A.; Korona-Głowniak, I.; Bojanowski, K. 4-Substituted picolinohydrazonamides as a new class of potential antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *190*, 112106.
- [158] Sruthi, P.R.; Anas, S. An overview of synthetic modification of nitrile group in polymers and applications. *J. Polym. Sci.* **2020**, *58*, 1039–1061.
- [159] Xia, Y.; Jiang, H.; Wu, W. Recent Advances in Chemical Modifications of Nitriles. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *48*, 6658–6669.
- [160] Tice, C.M.; Bryman, L.M. Regiocontrolled synthesis of 3-substituted-6-trifluoromethyl-4(3*H*)-pyrimidinones. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2689–2700.
- [161] Konteatis, Z.D.; Popovici-Muller, J.; Travins, J.M.; Zahler, R.; Cai, Z.; Zhou, D. Preparation of triazinediamine derivatives for use as antitumor agents. U.S. Patent WO2015003640, 15 January 2015.
- [162] Gobis, K.; Foks, H.; Zwolska, Z.; Augustynowicz-Kopec, E. Synthesis of 2-aminoaryl-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles in a thermal 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *Phosphorus Sulfur* **2005**, *180*, 2653–2666.
- [163] Foks, H.; Trapkowska, I.; Janowiec, M.; Zwolska, Z.; Augustynowicz-Kopec, E. Studies on Pyrazine Derivatives. 38. Synthesis, Reactions, and Tuberculostatic Activity of Pyrazinyl-substituted Derivatives of Hydrazinocarbodithioic Acid. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2004**, *40*, 1185–1193.
- [164] Kozyra, P.; Kaczor, A.; Karczmarzyk, Z.; Wysocki, W.; Pitucha, M. Experimental and computational studies of tautomerism pyridine carbonyl thiosemicarbazide derivatives. *Struct. Chem.* **2023**, *34*.
- [165] Bharatam, P.V.; Valanju, O.R.; Wani, A.A.; Dhaked, D.K. Importance of tautomerism in drugs. *Drug Discov. Today* **2023**, *28*, 1–8.
- [166] Frisch, J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.P.; Izmaylov, A.F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.;

Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J.A.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.J.; Brothers, E.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J.M.; Klene, M.; Knox, J.E.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.G.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Farkas, Ö.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cioslowski, J.; Fox D.J. Gaussian 09 Revision D.01, 2009. Gaussian, Inc., Wallingford CT.

[167] Pawlak, T.; Sudgen, I.; Bujacz, G.; Iuga, D.; Brown, S.P.; Potrzebowski, M.J. Synergy of Solid-State NMR, Single-Crystal X-ray Diffraction, and Crystal Structure Prediction Methods: A Case Study of Teriflunomide (TFM). *Cryst. Growth Des.* **2021**, *21*, 3328–3343.

[168] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. Organic Chemistry, 2nd ed.; Oxford University Press, United Kingdom, 2012.

[169] Walsh, K.; Sneddon, H.F.; Moody, C.J. Amination of Heteroaryl Chlorides: Palladium Catalysis or S_NAr in Green Solvents? *ChemSusChem* **2013**, *6*, 1455–1460.

[170] Foks, H.; Manowska, W. Aminomethylation of pyridine- and pyrazinecarbothioamides. V. 6-Chloro- and 6-aminopyrazine-2-carbothioamides in the Mannich reaction. *Acta Pol. Pharm.* **1976**, *33*, 55–65.

[171] Foks, H.; Janowiec, M. Pyrazine derivatives. XIV. Synthesis and tuberculostatic activity of pyrazine amidrazones. *Acta Pol. Pharm.* **1979**, *36*, 155–160.

[172] Foks, H.; Janowiec, M. Pyrazine derivatives. VI. Synthesis and tuberculostatic activity of 6-alkoxy- and 6-phenoxy pyrazine-2-carbothioamides. *Acta Pol. Pharm.* **1978**, *35*, 143–147.

[173] Das, A.; Maji, B. Direct C(3)5–H Polyfluoroarylation of 2-Amino/alkoxy Pyridines Enabled by a Transient and Electron-deficient Palladium Intermediate. *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202301436.

- [174] Changhe, Q.; Honchung, T.; Qingbei, Z.; Zhenfan, Y.; Xiaolin, Z. Preparation of pyrazine compounds for treating adenosine receptor associated diseases. U.S. Patent WO2020035052, 20 February 2020.
- [175] Seidel, H.M.; Roush, W.R.; Katz, J.; Venkatraman, S. Preparation of oxalamide heterobicyclic compounds for treating conditions associated with STING activity. U.S. Patent WO2021067805, 08 April 2021.
- [176] Zhu, D.-L.; Jiang, S.; Wu, Q.; Wang, H.; Li, H.-Y.; Li, H.-X. Nickel-Catalyzed Etherification of Phenols and Aryl Halides through Visible-Light-Induced Energy Transfer. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 8327–8332.
- [177] Shakya, B.; Shahi, N.; Ahmad, F.; Yadav, P.N.; Pokharel, Y.R. 2-Pyridineformamide N(4)-ring incorporated thiosemicarbazones inhibit MCF-7 cells by inhibiting JNK pathway. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1677–1681.
- [178] Oqba, N. Reactivity of π -Deficient Molecules. College of Pharmacy 2020.
- [179] Kraetzschmar, F.; Kassel, M.; Delony, D.; Breder, A. Selenium-Catalyzed C(sp³)-H Acyloxylation: Application in the Expedient Synthesis of Isobenzofuranones. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 7030–7034.
- [180] Klimesova, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Pour, M.; Kaustova, J. New pyridine derivatives as potential antimicrobial agents. *Farmaco* **1999**, *54*, 666–672.
- [181] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.V.; Bloino, J.; Janesko, B.G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, P.; Ortiz, J.V.; Izmaylov, A.F.; Sonnenberg, J.L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V.G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J.A.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.J.; Heyd, J.J.; Brothers, E.N.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Keith, T.A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.P.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J.M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.;

Farkas, O.; Foresman, J.B.; Fox, D.J. Gaussian 16 Revision C.01, 2016. Gaussian, Inc., Wallingford CT.

[182] Foks, H; Balewski, Ł.; Gobis, K; Dabrowska-Szponar, M; Wiśniewska, K. Studies on pyrazine derivatives LII: Antibacterial and antifungal activity of nitrogen heterocyclic compounds obtained by pyrazinamidrazone usage. *Heteroat. Chem.* **2012**, *23*, 49–58.

[183] Xu, L.; Xiao, C.; Yu, Z. Unsymmetrical pyridinyl triazinyl phosphine oxide derivative and synthesis method thereof, and application in co-extraction separation of trivalent lanthanide and actinide in nuclear waste liquid. U.S. Patent CN114560889 A, 31 May 2022.

[184] Tani, Y.; Kobayashi, K.; Nomura, K. Metal complex compound dyes and dye solutions for photoelectric conversion components and dye-sensitized solar cells. U.S. Patent WO2013088898 A1, 20 June 2013.

[185] Ben Salem, A.; Ben Salah, B.; Mhalla, D.; Trigui, M.; Mourer, M.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Kossentini, M. Synthesis, crystal structure and biological studies of novel amidrazones, triazoles, thiatriazole and triazine compounds. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1214*, 128209.

[186] Aly, A.A.; Ramadan, M.; Fatthy, H.M. Synthesis of Heterocycles From Amidrazones. W *Adv Heterocycl Chem*, 1st ed.; Scriven, E.F.V.; Ramsden, C.A., Edyt.; Academic Press: Cambridge, Massachusetts, Stany Zjednoczone, 2017, 122, 115–139.

[187] Bogdanowicz, A.; Foks, H.; Kędzia, A.; Kwapisz, E.; Zwolska, Z.; Augustynowicz-Kopeć, E. The Synthesis and Microbiological Activity of New 4-Chloropyridin-2-yl Derivatives. *Heterocycles* **2009**, *78*, 2217–2231.

[188] Raczuk, E.; Dmochowska, B.; Samaszko-Fiertek, J.; Madaj, J. Different Schiff Bases—Structure, Importance and Classification. *Molecules* **2022**, *27*, 787.

[189] Subasi, N.T. Overview of Schiff Bases. W *Schiff Base in Organic, Inorganic and Physical Chemistry*; Akitsu, T. Edyt.; Wydawca: IntechOpen Limited, Wielka Brytania, 2022.

- [190] Sani, U.; Na'ibi, H.U.; Dailami, S.A. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Studies on N-(2-hydroxybenzylidene) pyridine-2-amine and its M(II) Complexes. *Nig. J. Basic Appl. Sci.* **2017**, *25*, 81–88.
- [191] Popiołek, Ł.; Biernasiuk, A. Synthesis and investigation of antimicrobial activities of nitrofurazone analogues containing hydrazide-hydrazone moiety. *Saudi Pharm J.* **2017**, *25*, 1097–1102.
- [192] Foks, H.; Buraczewska, M.; Manowska, W.; Sawlewicz, J. Investigation on pyrazine derivatives. I. Synthesis and tuberculostatic action of pyrazinamidrazone 6-chloropyrazinamidrazone and their condensation products with aldehydes and ketones. *Diss. Pharm. Pharmacol.* **1971**, *23*, 49–58.
- [193] Minor, W.; Cymborowski, M.; Borek, D.; Cooper, D.R.; Chruszcz, M.; Otwinowski, Z. Optimal structure determination from sub-optimal diffraction data. *Protein Sci.* **2022**, *31*, 259–268.
- [194] O'Donnell, F.; Smyth, T.; Ramachandran, V.; Smyth, W. A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolines. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 30–38.
- [195] Perveen, S.; Kumari, D.; Singh, K.; Sharma, R. Tuberculosis drug discovery: Progression and future interventions in the wake of emerging resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *229*, 114066.
- [196] O'Toole, R.F.; Gautam, S.S. Limitations of the *Mycobacterium tuberculosis* reference genome H37Rv in the detection of virulencerelated loci. *Genomics* **2017**, *109*, 471–474.
- [197] Periwal, V.; Patowary, A.; Vellarikkal, S.K.; Gupta, A.; Singh, M.; Mittal, A.; Jeyapaul, S.; Chauhan, R.K.; Singh, A.V.; Singh, P.K.; et al. Comparative whole-genome analysis of clinical isolates reveals characteristic architecture of *Mycobacterium tuberculosis* pangenome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122979.
- [198] Heunis, T.; Dippenaar, A.; Warren, R.M.; van Helden, P.D.; van der Merwe, R.G.; Gey van Pittius, N.C.; Pain, A.; Sampson, S.L.; Tabb, D.L. Proteogenomic Investigation of Strain Variation in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 3841–3851.
- [199] Fleischmann, R.D.; Alland, D.; Eisen, J.A.; Carpenter, L.; White, O.; Peterson, J.; DeBoy, R.; Dodson, R.; Gwinn, M.; Haft, D.; et al. Whole-genome comparison of

Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5479–5490.

[200] Castelli, M.S.; McGonigle, P.; Hornby, P.J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2019**, *7*, e00535.

[201] Yao, M.; Walker, G.; Gamcsik, M.P. Assessing MTT and sulforhodamine B cell proliferation assays under multiple oxygen environments. *Cytotechnology* **2023**, *75*, 381–390.

[202] Colombo, I.; Sangiovanni, E.; Maggio, R.; Mattozzi, C.; Zava, S.; Corbett, Y.; Fumagalli, M.; Carlino, C.; Corsetto, P.A.; Scaccabarozzi, D.; Calvieri, S.; Gismondi, A.; Taramelli, D.; Dell'Agli, M. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 7435621.

[203] Soledade, M.; Santos C.S.; Matos A.M.; Reis, M.; Martins, F. Lipophilicity assessment of some isoniazid derivatives active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* **2020**, *599*, 124820.

[204] Kawsar, S.M.A; Hosen, M.A.; Ahmad, S.; El Bakri, Y.; Laaroussi, H.; Hadda, T.B.; Almalki, F.A.; Ozeki, Y.; Goumri-Said, S. Potential SARS-CoV-2 RdRp inhibitors of cytidine derivatives: Molecular docking, molecular dynamic simulations, ADMET, and POM analyses for the identification of pharmacophore sites. *PloS One* **2022**, *17*, e0273256.

[205] Rigaku Oxford Diffraction. CrysAlis PRO. Rigaku Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England, 2015.

[206] Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112–122.

[207] Sheldrick, G.M. SHELXT—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Cryst.* **2015**, *C71*, 3–8.

[208] Macrae, C.F.; Sovago, I.; Cottrell, S.J.; Galek, P.T.A.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G.P.; Stevens, J. S.; Towler, M.; Wood, P.A. *Mercury 4.0*: from visualization to analysis, design and prediction. *J. Appl. Cryst.* **2020**, *53*, 226–235

[209] Westrip, S.P. *publCIF*: software for editing, validating and formatting crystallographic information files. *J. Appl. Cryst.* **2010**, *43*, 920–925.

[210] Woods, G.L. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd ed. CLSI standard M24, 2018

[211] Franzblau, S.G.; Witzig, R.S.; McLaughlin, J.C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M.T.; Cook, M.B.; Quenzer, V.K.; Ferguson, R.M.; et al. Rapid, Low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362–366.

[212] Reck, F.; Alm, R.; Brassil, P.; Newman, J.; Dejonge, B.; Eyermann, C.J.; Breault, G.; Breen, J.; Comita-Prevoir, J.; Cronin, M.; et al. Novel N-linked aminopiperidine inhibitors of bacterial topoisomerase type II: Broad-spectrum antibacterial agents with reduced hERG activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7834–7847.

[213] Borowa, B. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej chemoterapeutyków wobec komórek nowotworowych, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Katedra Technologii Leków i Biochemii, Kultury tkankowe i komórkowe roślin i zwierząt.